

Л.М. Пустовалова

ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ ПО БИОХИМИИ

СРЕДНЕЕ
ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ
ОБРАЗОВАНИЕ



Серия «Среднее профессиональное образование»

Пустовалова Л.М.

Практические работы по биохимии

*Допущено Министерством образования
Российской Федерации в качестве учебного пособия
для студентов образовательных учреждений
среднего профессионального образования*

Ростов-на-Дону

«Феникс»

2004

ББК 28.072

П 89

Л. М. Пустовалова, заведующая кафедрой общей и клинической биохимии № 2 Ростовского государственного медицинского университета, профессор Российской Академии естествознания, кандидат медицинских наук, специалиста по «Клинической лабораторной диагностике (сертификат биохимия)»

Рецензенты:

- А. Е. Губарева** — доцент кафедры биохимии Московской государственной медицинской академии им. И. М. Сеченова, кандидат медицинских наук;
- А. В. Ткачев** — зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней Ростовского государственного медицинского университета, профессор, доктор медицинских наук.

Пустовалова Л.М.

П 89 Практические работы по биохимии/ Серия «Среднее профессиональное образование». — Ростов н/Д: Феникс, 2004. — 320 с.

Учебное пособие и лабораторные занятия по основам биохимии с методами клинико-биохимических исследований предназначено для студентов и преподавателей медицинских колледжей отделения «Лабораторная диагностика» по специальности 0407.

ISBN 5-222-03725-8

ББК 28.072

© Пустовалова Л.М., 2004

© Издательство «Феникс», оформление, 2004

Предисловие

Введение Государственного образовательного стандарта среднего профессионального образования (введен в действие 1.09.2002 г.) ориентирует на активизацию роли студента в образовательном процессе путем увеличения его самостоятельной и творческой работы, подлежащей оценке в рамках учебного процесса. Одна из важнейших форм такой деятельности — выполнение лабораторных работ на практических занятиях по основам биохимии с методами клинико-биохимических исследований.

ГОСУДАРСТВЕННЫЕ ТРЕБОВАНИЯ

к минимуму содержания и уровню подготовки
выпускников по специальности 0407

«Лабораторная диагностика» (базовый уровень
среднего профессионального образования)

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

в области основ биохимии

с методами клинико-биохимических исследований

знать:

- сущность биохимических процессов, протекающих в организме человека в норме и при патологии;
- механизмы обмена веществ и их регуляцию;
- основные методы исследования обмена веществ: белков, липидов, углеводов, гормонов, ферментов, системы гемостаза и другие;
- владеть унифицированными методами анализа биологических жидкостей;

уметь:

- работать на фотоколориметрах, биохимических и коагулологических анализаторах и другом оборудовании, применять автоматические пипетки, дозаторы и другую малую механизацию;
 - интерпретировать полученные результаты биохимических исследований.
-

СД.06

Основы биохимии с методами клинико-биохимических исследований. Основы биохимии. Обмен веществ и механизмы его регуляции. Биохимические исследования биологических жидкостей. Внутрिलाбораторный контроль качества биохимических исследований.

Для успешного решения задач, поставленных перед студентами медицинских колледжей отделения «Лабораторная диагностика» Государственным образовательным стандартом среднего профессионального образования в области получения ЗНАНИЙ по основам биохимии, издательством «Феникс» (г. Ростов-на-Дону) в 2003 году было выпущено пособие «Основы биохимии для медицинских колледжей».

Но кроме теоретических знаний студент отделения «Лабораторная диагностика» — будущий медицинский лабораторный техник, ДОЛЖЕН:

- уметь готовить посуду и необходимые материалы для лабораторных исследований;
- уметь пользоваться необходимой аппаратурой;
- владеть техникой лабораторных работ;
- иметь представление о методах внутрिलाбораторного контроля качества;
- строить калибровочные графики;
- определить показатели белкового обмена (общий белок, белковые фракции, мочевины, мочевую кислоту, креатинин и др.);
- определить показатели липидного обмена (липопротеины, фракции липопротеинов, холестерин, фосфолипиды и др.);
- показатели углеводного обмена;
- определить белки острой фазы воспаления (серомукоид, сиаловые кислоты, С-реактивный белок);
- определить показатели минерального обмена в плазме крови, моче (натрий, калий, хлориды, кальций, железо и др.);
- показатели кислотно-основного равновесия (КОР) крови;
- определить активность ферментов в сыворотке крови и моче (аспартатаминотрансферазы, аланинами-

- нотрансферазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, липазы, кислой и щелочной фосфатазы и др.);
- определить показатели гормонального профиля: 17-кетостероидов в моче, 17-оксикортикостероидов и др.;
 - показатели состояния гемостаза;
 - активированное время рекальцификации плазмы;
 - протромбиновое время (тромбопластиновое);
 - содержание фибриногена в плазме крови;
 - толерантность плазмы к гепарину;
 - время кровотечения;
 - время свертывания крови;
 - степень ретракции кровяного сгустка;
 - на основании результатов дать качественную и количественную оценку исследований;
 - дифференцировать нормальные и патологические показатели результатов лабораторного исследования;
 - по результатам анализа выявлять признаки типовых патологических процессов в органах и тканях;
 - уметь провести внутрилабораторный контроль качества;
 - уметь оформить результаты исследований.

Настоящее пособие поможет студентам медколледжей отделения «Лабораторная диагностика» в приобретении **УМЕНИЙ** по основам биохимии с методами клинико-биохимических исследований, что позволит им в дальнейшем успешно решать вышепоставленные профессиональные задачи.

Специалист в области лабораторной диагностики должен быть связующим звеном между клиницистами различных специальностей и возможностями возрастающей медицинской лабораторной техники. Данные, получаемые будущим специалистом по клинической лабораторной диагностике, необходимы врачу-клиницисту:

- 1) для постановки дифференциального диагноза;
- 2) выбора метода лечения;
- 3) контроля за правильностью назначенного лечения;
- 4) определения критерия излеченности процесса у данного больного.

Контроль знаний на практических занятиях может успешно проводиться с применением тестов. Тесты, предлагаемые в данном руководстве, содержат как теоретический материал из «Основ биохимии для медицинских кол-

леджей», так и материал, изучаемый на практических занятиях (лабораторные работы).

Тесты составлены по форме, рекомендованной ВОЗ для внедрения в медицинское и медико-биологическое образование:

1) выбор наиболее правильного ответа из числа предложенных;

2) выбор правильной комбинации ответов.

В основу данного учебного пособия положен многолетний опыт проведения практических занятий со студентами, как в высшей медицинской школе, так и в медколледже Ростовского государственного медицинского университета на отделении «Лабораторная диагностика» по биохимии, клинической химии и лабораторной диагностике.

Автор будет признательна всем, кто выскажет свои соображения по поводу данного руководства.

Глава 1

Введение в практикум по основам биохимии с методами клинико-биохимических исследований

1.1. Основные методы, используемые в клинко-биохимических исследованиях

I. Хроматография. Метод впервые предложен в 1903 году М.С. Цветом как средство для изучения растительных пигментов. Хроматография применяется для разделения различных смесей на составляющие их компоненты. Применяют в основном четыре вида хроматографии. Информационная колоночная хроматография. Если растворимые вещества, которые необходимо разделить, способны существовать в виде ионов, то используют ионообменную хроматографию. Неподвижной фазой являются вещества, которые называются ионообменниками. Ионообменники представляют собой смолы, являющиеся полимерными органическими соединениями. Ионообменники состоят из двух каркасов: неподвижного и подвижного. Если подвижный каркас содержит остатки серной кислоты, карбоксильных групп, т. е. содержит подвижные положительно заряженные ионы, которые могут обмениваться, то такая смола называется катионообменником. Анионообменники представляют собой хлоропроизводные аминов. В данном случае отрицательно заряженный хлор обменивается на анионы анализируемого образца. При движении раствора смеси веществ происходит обмен подвижных ионов смолы на ионы, содержащиеся в смеси, и движение ионов замедляется. Степень связывания зависит от заряда каждого компонента смеси. Чем больше заряд, тем больше взаимодействие со смолой и медленнее будет двигаться вещество по колонке. Одни вещества задерживаются на колонке, а другие — нет. Осажденные вещества на колонке снимают, применяя растворы с различными значениями pH. Жидкость, вытекающую из колонки, называют элюатом. Сбор элюатов производят автоматическим коллектором.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. В основе лежит хроматографический метод. В качестве неподвижной фазы используют микроскопические частицы, что резко повышает взаимодействие веществ, движущихся через колонку с твердой фазой. Поскольку плотная упаковка снижает скорость подвижной фазы, то необходимо приложить давление. Этот метод обладает высокой разрешающей способностью и позволяет за короткое время (10–15 мин) разделить смесь практически любых соединений.

Хроматография распределительная. Смесь веществ делится на индивидуальные компоненты, потому что эти вещества по-разному растворяются (распределяются) в подвижном и неподвижном растворителях в зависимости от величины радикала и наличия функциональных (гидрофильных) групп.

На полоску хроматографической бумаги в 1 см от нижнего края или на тонкий слой силикагеля наносят каплю смеси веществ и помещают в хроматографическую камеру, на дне которой находится подвижный растворитель — чаще всего органический растворитель. Атмосфера камеры насыщена парами воды, которые адсорбируются на носителе, образуя неподвижный (полярный) растворитель. Подвижный растворитель движется вверх по носителю, смоченному водой, увлекая с собой гидрофобные вещества, а гидрофильные вещества остаются почти у места нанесения, растворяясь в воде. Для каждого вещества после проявления его соответствующим раствором вычисляют коэффициент R_f — индивидуальный показатель, с помощью которого по таблице можно идентифицировать это вещество или использовать стандарты веществ при хроматографии.

Газожидкостная хроматография подробно описана в разделе «Промежуточный обмен ВЖК в организме».

Аффинная хроматография (хроматография сродства). Метод основан на свойстве белков специфически связываться с определенным соединением. Обычно специфически связываемым веществом является антитело, для которого белок — антиген. Методически метод похож на колоночную хроматографию, колонка наполняется твердой полимерной фазой, к которой предварительно было «пришито» антитело. По мере движения смеси белков по колонке выявляется единственно отстающий белок — тот,

который связывается с антителом». Все остальные белки, не обладающие этой способностью, без задержки проходят через колонку.

Гель-хроматография. В качестве стационарной фазы используют гель в виде крошечных гранул, т. е. такую неподвижную фазу можно рассматривать как молекулярные сита. Гранулы геля изготовлены из полимера со спиртовой структурой, подобной сити. В качестве такого полимера используется декстран или полиакриламид. В водной среде полимерный материал сорбирует воду и набухает, превращаясь в гелеподобные гранулы, сохраняющие пористую структуру, причем размер пор такого набухшего материала определяется степенью сшивки полимера. Нанесенные на колонку соединения начинают взаимодействовать с гранулами геля, проникая в объем гранулы через поры, что замедляет движение растворенного вещества по колонке. Молекулы небольшого размера совсем не будут проникать в объем гранул и просто пройдут через колонку. Каждый компонент разделяемой смеси описывается объемом элюирования, который равен объему элюата, собранного до момента, соответствующего максимуму пика. Если при разделении получается только один пик (максимум поглощения в УФ-области), то это указывает на чистоту исходного препарата. Таким образом делят белки с различной молекулярной массой.

II. Электрофорез применяется для разделения молекул, несущих заряды. Исследуемую смесь веществ наносят на хроматографическую бумагу, которая служит инертным носителем. Концы бумаги должны быть опущены в буферный раствор, который служит средой для электрического поля, когда приложено напряжение. Под влиянием напряжения отдельные молекулы в разделяемой смеси движутся к (+) или к (-) заряженному полюсу в зависимости от их относительных масс, знака и величины зарядов. Подвижность заряженной частицы в электрическом поле называется электрофоретической подвижностью. Она увеличивается с уменьшением массы и увеличением заряда молекулы.

Гель-электрофорез применяется для анализа, разделения смесей, выделения макромолекул. В качестве носителей используют гели из агара, крахмала, ацетата целлюлозы, полиакриламида. Исследуемый раствор образца

вводят в колонку или тонкий слой геля, затем гель погружают в подходящий буфер и накладывают электрическое поле, подсоединяя электроды к обоим концам геля. Разные ионы начинают мигрировать в геле с различными скоростями и их локализацию в геле в конце опыта можно определить по окрашиванию колонки или геля. С помощью данного метода можно анализировать белковый состав сыворотки крови, спинномозговой жидкости, ЛП крови.

Изоэлектрическое фокусирование в градиенте pH. Метод основан на том, что любой биополярный ион в зависимости от значений pH меняет свой заряд. При изоэлектрической точке он нейтрален, следовательно, не движется в электрическом поле. Следовательно, в геле с различными значениями pH по длине колонки данный белок при наложении электрического поля будет двигаться до достижения слоя геля с pH, отвечающим pI данного белка.

Иммуноэлектрофорез. Электрофорез проводят в слое агарового геля, заряженного отрицательно. По обеим сторонам слоя, параллельно движению смеси, прорезают полосы и наполняют раствором антител, специфических к белкам, разделяемым данным методом. В результате каждая реакция антигена с антителом сопровождается образованием полосы преципитации. Группу белков с одной и той же электрофоретической подвижностью можно разделить на компоненты благодаря реакции с антителами.

III. Потенциометрические методы основаны на измерении разности потенциалов между парой подходящих электродов, погруженных в анализируемый раствор. Необходимая для этого установка содержит индикаторный (определения) электрод, электрод сравнения, прибор для измерения потенциала — потенциометр. Потенциал электрода может изменяться при изменении концентрации одного или нескольких веществ в растворе, в который погружен, т. е., измеряя потенциал электрода, можно количественно определить содержание вещества в растворе. К индикаторным относят электроды, которые изменяют значение потенциала при изменении концентрации определяемого иона или вещества. При определении pH раствора пользуются в качестве индикаторных электродов: стеклянным, водородным, хингидронным. Для оп-

ределения концентрации ионов — ионселективными электродами.

Электрод сравнения должен в данных условиях иметь постоянный потенциал. Можно использовать один из двух электродов сравнения: хлорсеребряный, каломельный.

IV. Фотоэлектроколориметрические методы анализа основаны на сравнении интенсивности окраски исследуемого раствора с окраской раствора, концентрация которого известна (стандартного раствора). При колориметрических определениях используют реакции, в результате которых определяемое вещество переводят в окрашенное соединение. Интенсивность окраски полученного раствора измеряют на фотоэлектроколориметре (ФЭКе). Она прямо пропорциональна концентрации окрашенного раствора и толщине рассматриваемого слоя. Чем больше интенсивность окраски, тем выше оптическая плотность. Графически зависимость представляется градуированным графиком, в котором по оси абсцисс откладывают концентрацию вещества в моль/л, (С) на оси ординат — оптическую плотность (D) раствора.

Условием применимости метода является прямо пропорциональная зависимость между D и С. Для этого экспериментальным путем находят оптимальные условия для получения устойчивого окрашенного соединения.

Принцип работы ФЭКа: световая энергия с помощью фотоэлемента преобразуется в электрическую. Возникающий ток регистрируется гальванометром. Отклонение стрелки гальванометра пропорционально освещенности фотоэлемента, которая изменяется в зависимости от интенсивности окраски исследуемого раствора при соответствующей длине волны (подбор с помощью фильтров).

V. Спектрофотометрические методы анализа. Спектрофотометрия — определение количества вещества в растворе или твердой среде по измерению светопоглощения волн строго определенной длины. Светопоглощение измеряют с помощью фотоэлемента по изменению силы тока, возникающего в нем, при падении на фотоэлемент светового потока, прошедшего через контрольный, а затем через исследуемые растворы или образцы.

Измерение светопоглощения производится в приборе спектрофотометре, кварцевая призма которого выявляет монохроматические пучки спектра, поэтому прибор отличается большой чувствительностью и точностью.

Используя спектрофотометр, можно работать как в видимой области спектра, так и в ультрафиолетовой области:

- от 220 до 650 нм — ультрафиолетовая область спектра;
- от 600 до 1100 нм — видимая область спектра.

1.2. Лабораторная посуда

В практикуме по основам биохимии применяют следующую лабораторную посуду:

1. Колбы — круглодонные, плоскодонные, мерные (от 25 мл до 5,0 л),
2. Химические стаканы — различных объемов (чаще от 50 мл до 2,0 л),
3. Пробирки — цилиндрические и конические,
4. Цилиндры — от 10 мл до 2,0 л,
5. Мензурки — от 50 мл до 1,0 л.
6. Пипетки — емкостью от 0,1 мл до 100 мл — градуированные и пипетки Мора, автоматические, дозаторы.
7. Бюретки (иногда микробюретки).
8. Промывалки.
9. Фарфоровые тигли.
10. Фарфоровые чашки.
11. Фарфоровые ступки.
12. Эксикаторы.
13. Воронки.
14. Посуда для взвешивания — часовые стекла, бюксы, тигли.
15. Стекланные палочки, лопаточки, наконечники.

Зарисовать в тетради лабораторную посуду и записать назначение каждого из вышеперечисленных предметов.

МЫТЬЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ

1. Посуду после выполнения лабораторного анализа необходимо промыть в проточной водопроводной воде.

2. Затем тщательно промыть с помощью ершей.

3. Замочить на 1–2 часа в хромовой смеси («хром-пик»). Можно использовать синтетические моющие средства, не содержащие биодобавок.

4. Отполоскать от моющего средства с помощью проточной водопроводной воды: 10 раз при использовании хромовой смеси и 15 раз — при использовании синтетических моющих средств.

5. Прополоскать в проточной дистиллированной воде 3 раза,

6. Чистую посуду высушить в сушильном шкафу при температуре 150–180 °С.

Сухую посуду (колбы, стаканы) закрыть фильтровальной бумагой либо поставить в шкаф или на стол вверх дном. Пробирки сложить в чистые коробки или ящики столов, выложенные чистой фильтровальной бумагой. Сверху их также следует прикрыть фильтровальной бумагой от пыли и грязи.

1.3. Лабораторное оборудование и приборы

Выполняя лабораторные работы по «Основам биохимии с методами клиничко-биохимических исследований», студент медколледжа должен уметь работать с нижеперечисленным лабораторным оборудованием, соблюдая технику лабораторных работ:

— знать правила техники безопасности при проведении лабораторных исследований (изложены в гл. 1 «Основы биохимии»);

— знать теоретические основы лабораторных исследований (см. «Основы биохимии»);

— владеть навыками проведения лабораторных работ;

— иметь представление об устройстве лабораторного оборудования, знать принципы и правила работы с ним;

— уметь на основе лабораторного анализа дать количественную и качественную оценку объекта исследования;

— владеть элементами математического анализа результатов лабораторных исследований.

Лабораторное оборудование:

1. Спектрофотометры СФ-4, СФ-16, СФ-26, СФ-46.

2. Фотоэлектроколориметры (различных марок).

3. Центрифуги — различных марок и назначения.

4. рН-метры.

5. Иономеры с ионоселективными электродами.

6. Весы: аналитические, торзионные, технические

7. Термостат.

8. Хроматографические камеры.

9. Аппарат для электрофореза.

10. Газожидкостные анализаторы.

11. Автоматические анализаторы.

1.4. Подготовка воды для клинико-биохимических исследований

Воду для биохимического анализа следует использовать свежеперегнанную (1–2 дневную), прокипяченную, охлажденную.

1. Собирать дистиллированную воду следует в стеклянные бутылки лучше с нижним сливом, которые надо обязательно тщательно мыть 1 раз в 10–15 дней, как указано для всей посуды.

2. Бутылки с дистиллированной водой следует держать с закрытыми крышками или пробками.

3. Брать воду из бутылки следует через кран нижнего слива. Если такой кран отсутствует, то из силиконового (резинового) шланга с зажимом можно изготовить сифон. Такую систему следует использовать, чтобы полоскать посуду в проточной дистиллированной воде.

4. Дистиллированную воду для анализа (для разведения реагентов, для контрольной пробы) следует налить в термостойкую колбу через шланг сифона, прокипятить 3–5 минут и после охлаждения закрыть притертой или ватно-марлевой пробкой. Открытой воду не хранить. Колбу регулярно, не реже 1 раза в неделю, мыть по вышеуказанной схеме.

5. Отливать воду из колбы в стакан для работы можно, но стакан использовать только в течение рабочего дня, затем отправлять его в мойку.

6. Даже если используется деионизированная вода, кроме того, что она должна быть свежеперегнанной (1–2 дневной), ее обязательно следует кипятить. Это необходимо делать, потому что носители, на которых идет очистка воды в деионизаторах (ионообменные смолы), являются хорошей средой для размножения микроорганизмов. Попадая в деионизированную воду, микрофлора очень быстро изменяет ее состав.

1.5. Общие правила работы с наборами для клинико-биохимических исследований

При работе с биохимическими наборами для того, чтобы избежать наиболее распространенных ошибок, необходимо придерживаться следующих общих правил:

1. Тщательно изучить инструкцию по применению набора и пунктуально ей следовать, выполняя все рекомен-

дации по условиям хранения компонентов набора и раствора рабочего реагента (температура, тара, время, освещение), а также по условиям проведения анализа (температура, последовательность добавления реагентов, время реакции и т.д.).

2. Не использовать наборы, если герметичность их упаковки нарушена или внешний вид не соответствует паспортным данным.

3. Наборы с истекшим сроком годности необходимо проверить на правильность определения по контрольным сывороткам. Если определенное вами содержание компонента соответствует паспортным данным контрольной сыворотки, то набор можно использовать. Без проверки использовать просроченные наборы нельзя.

4. Посуду для приготовления раствора рабочего реагента и пробирки для проведения анализа промыть либо с помощью хромовой смеси (хромпика), либо с помощью моющих средств, не содержащих биодобавки, тщательно прополоскать водопроводной, а затем дистиллированной водой и просушить в сушильном шкафу. Каждый раз для приготовления раствора рабочего реагента брать чистую посуду, не использовать посуду, пробирки, пипетки и наконечники для автоматических дозаторов повторно.

5. Использовать только дистиллированную, свежеперегнанную, прокипяченную, охлажденную воду.

6. Растворы рабочих реагентов из общей склянки (колбы, флакона) отлить в другую склянку (колбу, флакон) в количестве, необходимом на один рабочий день, и пользоваться ими, а не отбирать пипеткой многократно из общей склянки.

7. Использовать автоматические дозаторы для отбора проб сыворотки, калибратора, а также раствора рабочего реагента. Дозаторы необходимо регулярно, не менее одного раза в год, проверять.

8. Для измерения оптической плотности использовать кюветы с толщиной поглощающего свет слоя жидкости 1 см, если не указано специально, что можно использовать кюветы меньшей толщины. Объем помещаемого в кювету исследуемого раствора должен быть достаточным, чтобы луч света проходил ниже уровня жидкости.

9. При проведении анализа для инкубации проб следует использовать водяной термостат. Если все-таки приходится использовать воздушный термостат, то необходимо

увеличить время прогрева рабочего раствора перед началом реакции с 5 минут до 10–15 минут.

10. Все растворы рабочих реагентов и других реагентов, готовых к использованию, после отбора реагента следует плотно закрыть и держать закрытыми.

11. Предельно внимательно и аккуратно следует работать с калибратором. Нельзя определять самим концентрацию калибратора или разбавлять его, чтобы получить более низкую концентрацию. Для отбора калибратора следует использовать только новые наконечники.

12. При внесении пробы в реакционную смесь, особенно если ее объем составляет 5–10 мкл, необходимо следить, чтобы проба не осталась на стеклах пробирки или кончике пипетки. Смесь после внесения пробы следует тщательно перемешать, не допуская при этом вспенивания.

13. В процессе растворения реагентов, содержащих ферменты, нельзя допускать вспенивания, так как это может привести к их инактивации.

1.6. Калибровка мерной посуды, пипеток, бюреток

Номинальная емкость мерной посуды не всегда соответствует ее истинной емкости. Для повышения точности объемного анализа мерную посуду, используемую в лаборатории, необходимо калибровать.

За единицу объема в метрической системе мер принимают «истинный литр», т.е. объем, занимаемый массой воды в 1 кг при температуре ее наибольшей плотности (т.е. при 3,98 °C), взвешенной в безвоздушном пространстве.

В качестве стандартной температуры при калибровке мерной посуды в настоящее время принята температура +20 °C.

«Нормальный литр» равен объему такого количества вещества, которое занимает при +20 °C объем истинного литра.

Мерную посуду калибруют или проверяют, определяя вес чистой воды, содержащейся в ней, или вес воды, вылитой из нее, при определенной температуре; по весу воды рассчитывают емкость посуды.

Калибровка мерных колб. Емкость мерной колбы проверяют путем взвешивания на технических весах воды, вмещаемой колбой. Для предотвращения ошибок, для

занной с неравноплечностью технических весов, рекомендуется следующий порядок взвешивания.

Чистую сухую мерную колбу помещают на левую чашку весов. На эту же чашку ставят разновес, соответствующий весу воды в объеме калибруемой колбы. Затем уравновешивают весы и заполняют колбу дистиллированной водой, имеющей температуру окружающего воздуха. Следят за тем, чтобы при заполнении колбы капли воды не остались на стенке горла колбы выше метки (капли воды снимают фильтровальной бумагой). Колбу с водой взвешивают, уравновешивая весы снятием разновеса с левой чашки. Вес воды в колбе равен весу разновесов, снятых с левой чашки весов. (Если вес воды в колбе больше веса снятого разновеса, то для уравновешивания разновесы добавляют на правую чашку весов). Определение повторяют еще два-три раза.

Калибровка пипеток. Чтобы проверить емкость пипетки, надо взвесить на аналитических весах бюкс с крышкой.

Набрать в пипетку дистиллированную воду до черты (по нижнему мениску), перенести ее во взвешенный бюкс. Согласно ГОСТ 1770-74, продолжительность вытекания воды из пипеток должна быть следующей:

Емкость пипетки, мл	5	10	25	50	100
Время вытекания, сек	15	20	25	30	40

После опорожнения пипетки выжидают еще 15 с и только после этого отнимают кончик пипетки от стенки сосуда. В кончике пипетки всегда остается небольшое количество жидкости. На это не обращают внимания, т.к. пипетка градуируется на вытекание, и та капля, которая остается в пипетке, не входит в ее объем. Поэтому эту каплю из пипетки не следует ни выдувать, ни выжимать.

Бюкс, в который перенесли воду, закрыть крышкой и снова взвесить. Вес воды в объеме пипетки находят по разности двух взвешиваний. Процедуру определения емкости пипетки проводят трижды, используя для этого три отдельные сухие емкости, и берут среднее арифметическое из 3-х взвешиваний.

При калибровке микропипеток взвешиваемый объем должен превышать погрешность взвешивания в 100 раз, так при калибровке микропипеток вместимостью 10 мкл

необходимо поместить во взвешенный бюкс не менее 5 ее объемов.

Калибровка бюреток. Процедура проверки емкости бюретки такая же, как для пипеток, только проделывать ее надо для каждого объема последовательно, т.е. если бюретка вместимостью 50 мл, то взвешивают три раза 5 мл воды (спуская воду от нулевого деления до 5) и находят поправку, затем 10 мл и т.д. до 50 мл. При использовании автоматических микропипеток лучше пользоваться одним дозатором для отбора проб и калибратора, меняя только наконечники.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные методы, используемые в клинико-биохимических исследованиях.
 2. Назовите принципы хроматографии: распределительной, адсорбционной, ионообменной, аффинной, гель-фильтрации.
 3. Каков принцип разделения веществ методом электрофореза? Назовите принцип потенциометрического метода исследования.
 4. На чем основаны методы фотометрического анализа?
 5. Каков принцип спектрофотометрического анализа?
 6. Перечислите лабораторную посуду и укажите назначение каждого предмета при проведении биохимических исследований.
 7. Перечислите лабораторное оборудование, используемое в клинико-биохимических исследованиях. Каково назначение каждого прибора?
 8. Укажите основные этапы подготовки воды к проведению биохимический исследований.
 9. Перечислите общие правила работы с наборами для биохимических исследований.
 10. Укажите правила калибровки колб, бюреток, пипеток, используемых для клинико-биохимических анализов.
-

1.7. Тест-контроль по теме «Введение в практикум по основам биохимии с методами клинико-биохимических исследований»

Раздел I. Лабораторная посуда и оборудование

- 1. Зажигаете спиртовку:**
 - 1) спичкой
 - 2) лучинкой
 - 3) свечой
 - 4) зажигалкой.
 - 2. Нагревать вещества можно в посуде:**
 - 1) толстостенной
 - 2) тонкостенной
 - 3) стеклянной
 - 4) фарфоровой.
 - 3. При разбавлении концентрированных кислот, особенно серной, вливать:**
 - 1) кислоту в воду
 - 2) воду в кислоту
 - 3) щелочь в кислоту
 - 4) бензол в кислоту.
 - 4. В пробирке жидкость при нагревании должна занимать:**
 - 1) не более $1/3$ объема
 - 2) менее $1/3$ объема
 - 3) $1/2$ объема
 - 4) более $1/3$ объема.
 - 5. Опыты с ядовитыми, неприятно пахнущими веществами, а также упаривание кислот и кислых растворов производить:**
 - 1) в коридорах
 - 2) в лаборатории
 - 3) в вытяжном шкафу
 - 4) в учебной комнате.
 - 6. Опыты с легковоспламеняющимися веществами необходимо производить:**
 - 1) вблизи огня
 - 2) вдали от огня
-

- 3) в лаборатории
- 4) на асбестовой сетке.

7. При попадании на кожу концентрированных кислот следует:

- 1) промыть водой
- 2) наложить повязку из ваты, смоченной 3%-ным спиртовым раствором перманганата калия
- 3) обратиться к врачу
- 4) промыть раствором кислоты.

8. При ожоге растворами щелочей следует:

- 1) промыть водой
- 2) наложить повязку из ваты, смоченной 3%-ным спиртовым раствором перманганата калия
- 3) смазать мазью от ожогов
- 4) промыть раствором щелочи.

9. При отравлении хлором, бромом, сероводородом необходимо:

- 1) вывести пострадавшего на воздух
- 2) оставаться в лаборатории
- 3) уложить пострадавшего на кушетку
- 4) продолжать выполнять работу.

10. Виды колб, используемых в лаборатории:

- 1) плоскодонные
- 2) круглодонные
- 3) колбы Вюрца
- 4) конические.

11. Пробирки:

- 1) цилиндрические
- 2) конические
- 3) градуированные
- 4) круглые.

12. Стеклянная посуда:

- 1) стаканы
 - 2) воронки
 - 3) эксикаторы
 - 4) часовые стекла.
-

13. Фарфоровая посуда:

- 1) чашки
- 2) стаканы
- 3) тигли
- 4) ступки с пестиками.

14. Мерная посуда:

- 1) колбы
- 2) пипетки
- 3) бюретки
- 4) мензурки.

15. Посуда для взвешивания:

- 1) часовые стекла
- 2) бюксы
- 3) тигли
- 4) стаканы.

16. Лабораторные нагревательные приборы:

- 1) газовые горелки
- 2) сушильные шкафы
- 3) плитки
- 4) бани.

17. Лабораторные бани:

- 1) водяная
- 2) песчаная
- 3) воздушная
- 4) электрические печи.

18. Лабораторные весы:

- 1) аналитические
- 2) торсионные
- 3) чашечные
- 4) теххимические.

19. Анализаторы ОКДЛ:

- 1) гематологический автоматический анализатор крови
 - 2) микроанализатор ОФ-2661
 - 3) анализаторная система «ФР-9»
 - 4) спектрофотометр СФ-26.
-

20. Лабораторное оборудование и аппаратура:

- 1) термостат
- 2) фотоэлектроколориметр
- 3) ионметр (рН-метр)
- 4) центрифуга.

**Раздел II. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ
В КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ****1. Для колориметрических определений характерно, что:**

- 1) определяемое вещество переводят в окрашенное соединение
- 2) интенсивность окраски раствора измеряют на фотоэлектроколориметре (ФЭКе)
- 3) интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации определяемого вещества
- 4) интенсивность окраски раствора обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества.

2. Фотоколориметрические методы исследования основаны на:

- 1) сравнении интенсивности окраски исследуемого раствора с окраской стандартного раствора
- 2) сравнении оптической плотности исследуемого раствора с оптической плотностью стандартного раствора
- 3) измерении показателя преломления анализируемого вещества
- 4) измерении интенсивности светового потока, проходящего через окрашенный раствор, с помощью фотоэлементов.

3. Укажите основные принципы работы ФЭКа:

- 1) световая энергия с помощью фотоэлементов преобразуется в электрическую
 - 2) возникающий ток регистрируется гальванометром
 - 3) величина электрического тока, регистрируемая гальванометром, пропорциональна концентрации определяемого вещества в растворе
-

- 4) освещенность фотозлементов изменяется в зависимости от интенсивности окраски исследуемого раствора.

4. Дайте определение спектрофотометрии:

- 1) определение концентрации вещества в растворе по изменению светопоглощения волн строго определенной длины
- 2) определение концентрации вещества в растворе по изменению электропроводности
- 3) определение концентрации вещества в растворе по измерению потенциала электрода, погруженного в анализируемый раствор
- 4) определение концентрации вещества в растворе в зависимости от его электрохимических свойств.

5. Используя спектрофотометр, можно работать:

- 1) в видимой области спектра
- 2) в ультрафиолетовой области спектра
- 3) в области спектра с длиной волны от 220 до 650 нм
- 4) в области спектра с длиной волны от 650 до 1100 нм.

6. Выберите правильные утверждения:

- 1) при колориметрических методах анализа измеряют поглощение световых лучей широких участков видимого спектра или всего видимого спектра окрашенными растворами
- 2) при спектрофотометрических методах исследования измеряют поглощение монохроматических пучков спектра
- 3) при колориметрических методах исследования измеряют поглощение монохроматических пучков спектра раствором определяемого вещества
- 4) при спектрофотометрических методах исследования измеряют поглощение световых лучей широких участков видимого спектра или всего видимого спектра окрашенным раствором.

7. Укажите преимущества спектрофотометрического анализа по сравнению с фотозлектроколориметрией:

- 1) большая точность
 - 2) большая чувствительность
-

- 3) возможность определения концентрации вещества в неокрашенных растворах
- 4) возможность идентификации веществ в растворах биологического происхождения по характерным для них спектрам поглощения.

8. Хроматография — это эффективный аналитический метод исследования, позволяющий:

- 1) идентифицировать отдельные компоненты различных химических соединений
- 2) разделить сложные смеси различных химических соединений
- 3) накопить какое-либо вещество в чистом виде
- 4) исследовать практически неограниченный диапазон веществ: от неорганических ионов до биополимеров.

9. Использование метода хроматографии необходимо врачу для получения ответа на ряд важнейших вопросов:

- 1) какие вещества и в каком количестве содержатся в исследуемой биологической жидкости
- 2) как изменяется состав биологической жидкости при различных заболеваниях
- 3) приводит ли проводимое лечение к нормализации измененных в результате болезни показателей биологической жидкости
- 4) установить наличие изменений в составе исследуемых объектов в тех случаях, когда другими методами это сделать невозможно.

10. По механизму разделения различают следующие виды хроматографии:

- 1) адсорбционная
- 2) распределительная
- 3) ионообменная
- 4) гель-фильтрация.

11. В зависимости от используемого технического способа проведения разделения веществ различают следующие виды хроматографии:

- 1) колоночная
 - 2) тонкослойная
 - 3) бумажная
 - 4) газожидкостная.
-

12. При разделении веществ на колонках чаще всего используют принцип:

- 1) адсорбционной хроматографии
- 2) ионообменной хроматографии
- 3) распределительной хроматографии
- 4) гель-фильтрации.

13. Принцип распределительной хроматографии лежит в основе следующих видов хроматографии:

- 1) тонкослойной
- 2) газожидкостной
- 3) хроматографии на бумаге
- 4) адсорбционной.

14. Распределительная хроматография основана на том, что смесь веществ делится на индивидуальные компоненты, потому что эти вещества по-разному распределяются в подвижных и неподвижных растворителях в зависимости от:

- 1) величины углеводородного радикала
- 2) наличия гидрофильных свойств
- 3) наличия гидрофобных свойств
- 4) наличия заряда.

15. В состав подвижной фазы растворителя при хроматографии на бумаге входят:

- 1) вода
- 2) кислота
- 3) спирт
- 4) органический растворитель.

16. В состав неподвижной фазы растворителя при хроматографии на бумаге входят:

- 1) вода
- 2) спирт
- 3) кислота
- 4) органический растворитель.

17. Метод распределительной хроматографии может быть использован для изучения:

- 1) аминокислот
 - 2) липидов
 - 3) сахаров
 - 4) витаминов.
-

18. Распределение веществ при тонкослойной хроматографии происходит, так как:

- 1) вещества имеют различную способность адсорбироваться на поверхности сорбента
- 2) вещества имеют в своей структуре различные функциональные группы
- 3) вещества имеют сродство к сорбенту
- 4) вещества не имеют сродств к сорбенту.

19. Какое свойство вещества является основным при разделении веществ методом гель-фильтрации:

- 1) величина заряда
- 2) степень сродства к сефадексу
- 3) размер молекулы
- 4) степень растворения в органических растворителях.

20. Какой принцип лежит в основе газожидкостной хроматографии:

- 1) распределительный
 - 2) адсорбционный
 - 3) ионообменный
 - 4) молекулярный.
-

Глава 2

Химия биоорганических соединений

2.1. Химия белков, пептидов, аминокислот

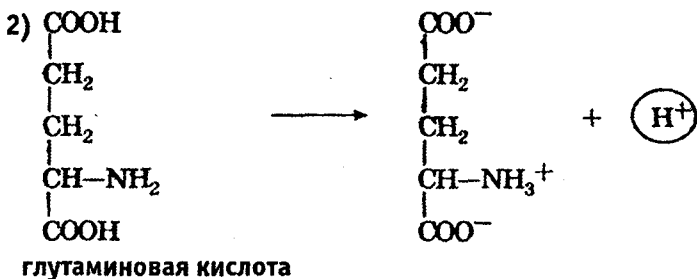
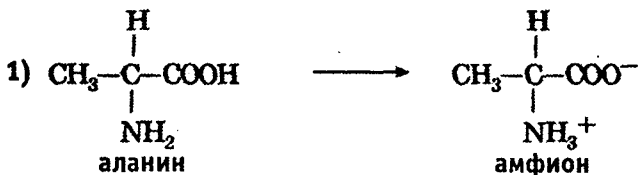
2.1.1. Лабораторная работа

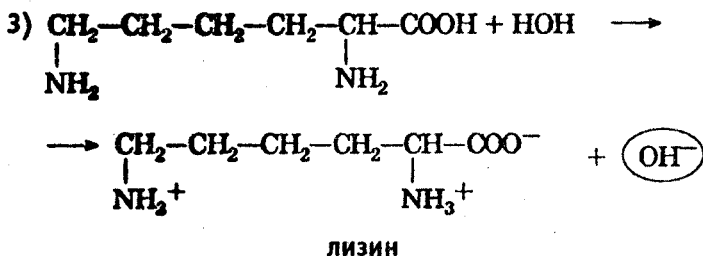
Реакции обнаружения аминокислот в растворах

Опыт 1. Реакции аминокислот в водных растворах

В три маленькие пробирки поместите по 5 капель растворов: в 1-ю пробирку — аланина, во 2-ю — глутаминовой кислоты, в 3-ю пробирку — лизина. Во все три пробирки добавьте по 1 капле универсального индикатора.

Отметьте развивающуюся окраску в каждой пробирке, сделайте заключение о реакции среды. Напишите уравнения реакций, описывая поведение аминокислот в водных растворах:

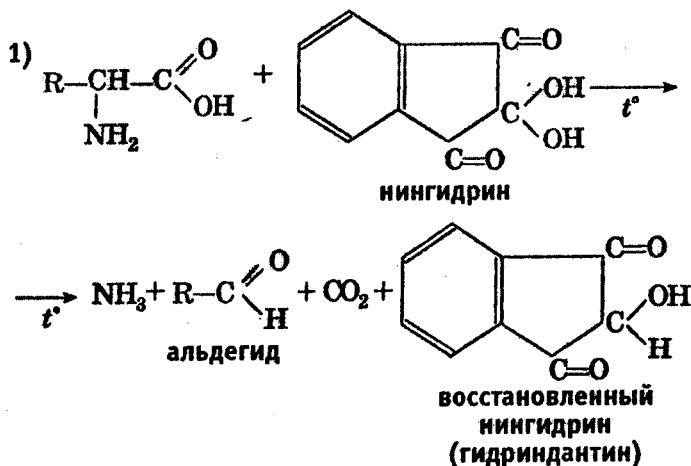




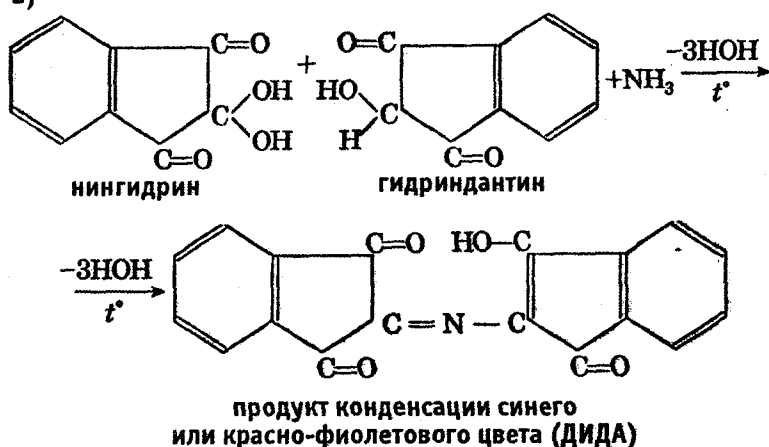
Опыт 2. Нингидриновая реакция

К 5–10 каплям раствора глицина добавляют 6–10 капель 0,2%-го раствора нингидрина. Нагревают до кипения. Появляется фиолетово-синее окрашивание за счет образования дикетогидриндилидена-дикетогидриндамина (ДИДА) — продукта конденсации нингидрина с аминокислотой. Запишите в тетрадь две стадии уравнения этой реакции. Сделайте вывод.

Эту реакцию широко используют в биохимической лаборатории для количественного определения аминокислот в биологических жидкостях (кровь, моча, спинномозговая жидкость и др.), а также для количественного определения белков и пептидов:

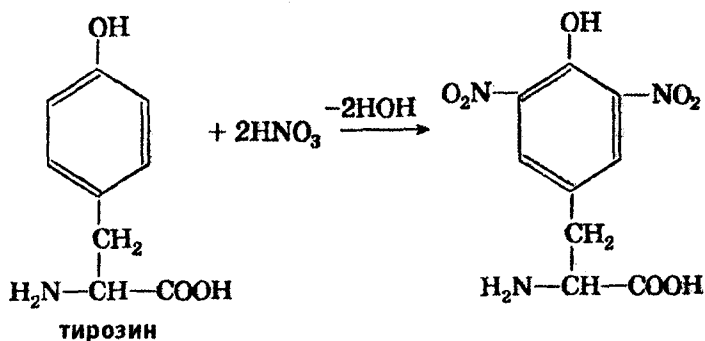


2)



Опыт 3. Ксантопротеиновая реакция

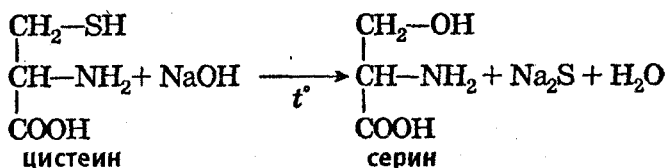
К 0,5 мл биологической жидкости прибавляют 5–6 капель концентрированной азотной кислоты. Осторожно нагревают. При наличии в растворе циклических аминокислот или белков, в которых присутствуют эти аминокислоты, появляется желтое окрашивание за счет нитрования бензольного кольца. Запишите в тетрадь уравнение реакции нитрования тирозина, сделайте вывод.



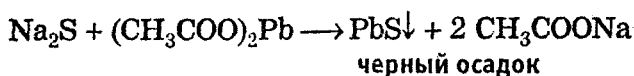
Опыт 4. Реакция Фоля на серосодержащие аминокислоты

В пробирку наливают 5 капель биологической жидкости, затем прибавляют 5 капель 30%-го раствора едкого натра и 1 каплю 5%-го раствора уксуснокислого свинца. При длительном нагревании жидкость, содержащая серосодержащие аминокислоты (цистеин, цистин, метионин) и белки, в которых присутствуют эти аминокислоты, буреет, и выпадает черный осадок сернистого свинца. Реакция протекает в два этапа: 1-й этап — переход серы из органического соединения в неорганическое; 2-й этап — качественное обнаружение серы в растворе. Запишите в тетрадь уравнения этих реакций, сделайте вывод.

а) на первом этапе происходит отщепление SH-групп аминокислоты и переход серы из органического соединения в неорганическое:



б) на втором этапе качественное обнаружение ионов серы в растворе:



Реакция характерна на цистеин, цистин, метионин или на белки, в которых эти аминокислоты присутствуют.

Опыт 5. Современные методы анализа аминокислотного состава белков и пептидов. Разделение и количественное определение аминокислот в аминокислотном анализаторе

Аминокислотный анализатор состоит из двух колонок, заполненных ионообменными смолами, на которых происходит разделение смеси аминокислот на индивидуальные.

Далее вытекающий бесцветный раствор аминокислоты взаимодействует в термостате с раствором нингидрина,

что приводит к образованию окрашенных производных ДИДА (красно-фиолетового цвета).

Окрашенные соединения далее проходят через автоматический фотоэлектроколориметр (ФЭК), и постоянно измеряемая оптическая плотность окрашенного комплекса записывается непрерывной линией на ленте автоматического регистратора в виде отдельных пиков, по площади которых судят о количестве той или иной аминокислоты в анализируемой смеси.

СХЕМА УСТРОЙСТВА АМИНОКИСЛОТНОГО АНАЛИЗАТОРА



2.1.2. Тест-контроль по теме «Химия аминокислот»

1. Укажите органические соединения, которые можно обнаружить с помощью нингидриновой реакции:

- | | |
|--------------------------|--------------|
| 1. Глюкозу | 4. Глицерин |
| 2. Пальмитиновую кислоту | 5. Глицин |
| 3. Глютаминовую кислоту | 6. Альбумин. |

2. Укажите органические соединения, которые можно обнаружить с помощью ксантопротеиновой реакции:

- | | |
|-------------------------|------------|
| 1. Стеариновую кислоту | 4. Тирозин |
| 2. Аспаргиновую кислоту | 5. Аланин |
| 3. Фенилаланин | 6. Серин. |

3. Укажите полярные ионогенные аминокислоты:
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Гли | 3. Ала | 5. Лиз |
| 2. Сер | 4. Асп | 6. Гис. |
4. Укажите полярные неионогенные аминокислоты:
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Асп | 3. Вал | 5. Цис |
| 2. Глу | 4. Гли | 6. Мет. |
5. Укажите неполярные аминокислоты:
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Тре | 3. Ала | 5. Глу |
| 2. Тир | 4. Мет | 6. Арг. |
6. Укажите ациклические аминокислоты;
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Гли | 3. Лиз | 5. Гис |
| 2. Ала | 4. Фен | 6. Три. |
7. Укажите циклические аминокислоты:
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Фен | 3. Тир | 5. Глу |
| 2. Лиз | 4. Лей | 6. Сер. |
8. Укажите гомоциклические аминокислоты:
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Фен | 3. Три | 5. Арг |
| 2. Тир | 4. Лиз | 6. Асп. |
9. Укажите гетероциклические аминокислоты:
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Фен | 3. Гис | 5. Глу |
| 2. Три | 4. Асп | 6. Лей. |
10. Укажите моноаминокарбоновые аминокислоты:
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Лей | 3. Лиз | 5. Асп |
| 2. Гли | 4. Арг | 6. Глу. |
11. Укажите моноаминодикарбоновые аминокислоты:
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Лиз | 3. Асп | 5. Илей |
| 2. Лей | 4. Глу | 6. Цис. |
12. Укажите диаминомонокарбоновые аминокислоты:
- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Асп | 3. Лей | 5. Лиз |
| 2. Глу | 4. Гли | 6. Арг. |
13. Укажите биологическое значение аминокислот:
1. Входят в состав белков
 2. Входят в состав липидов
-

3. Входят в состав углеводов
4. Часть гормонов — производные аминокислот
5. Участвуют в биосинтезе минеральных веществ
6. Являются витаминами.

14. Фенилаланин в растворе можно обнаружить с помощью:

- | | | |
|---------------|---------|---------------------|
| 1. нингидрина | 3. NaOH | 5. CuSO_4 |
| 2. HCl | 4. KOH | 6. HNO_3 . |

15. Укажите аминокислоты, которые можно обнаружить с помощью реакции Фоля:

- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1. Гли | 3. Цис | 5. Ала |
| 2. Вал | 4. Мет | 6. Глу. |

2.1.3. Белки сыворотки, плазмы, спинномозговой жидкости

Концентрация общего белка в сыворотке зависит главным образом от синтеза и распада двух основных белковых фракций — альбумина и глобулина. Количественные изменения остальных белков сыворотки не оказывают существенного воздействия на концентрацию общего белка. Альбумин синтезируется главным образом в печени, глобулины — в лимфоцитах. Распад белков плазмы происходит во всех тканях пропорционально их метаболической активности. Белки сыворотки поддерживают объем крови, создавая онкотическое давление, транспортируют многие вещества (альбумин), обеспечивают иммунологическую сопротивляемость и воспалительную реакцию (глобулины), выполняют много других функций как гормоны, ферменты, биологически активные вещества, регуляторы энзимов.

Определение содержания общего белка плазмы (сыворотки) крови — элемент комплекса профилактических и лечебных мероприятий уже на начальном этапе оказания медицинской помощи. Большинство белков плазмы крови синтезировано в гепатоцитах. Катаболизм многих белков плазмы крови происходит в эндотелиальных клетках капилляров и системе функциональных фагоцитов — моноцитов и макрофагов, после поглощения белков путем пиноцитоза. Белки с небольшой молекулярной массой проходят через фильтрационный барьер почечных телец в

первичную мочу, из которой их реабсорбируют эпителиальные клетки проксимальных канальцев и катаболизируют до аминокислот.

Содержание белков во внутрисосудистом пространстве в каждый момент времени — результат постоянного равновесия, имеющегося между синтезом и секрецией белков в кровь, поглощением их клетками, процессами катаболизма и экскрецией низкомолекулярных белков с мочой. Кроме того, постоянный обмен белками происходит между внутрисосудистым и внесосудистым пулом внеклеточной жидкости. Поддержание постоянства внутрисосудистого объема крови осуществляет коллоидно-осмотическая система. Постоянство онкотической составляющей осмотического давления в крови обеспечивает альбумин.

БЕЛОК ОБЩИЙ сыворотка

Нормальные значения:	г/л
Кровь из пуповины	48-80
Недоношенные	36-60
Новорожденные	46-70
1 неделя	44-76
Дети до 1 года	51-73
до 2 лет	56-75
свыше 2 лет	60-80
Взрослые	64-83

БЕЛОК спинномозговая жидкость

Нормальные значения:	г/л
1-30 дней	0,20-1,50
1-3 месяца	0,20-1,00
3-6 месяцев	0,15-0,50
0,5-10 лет	0,10-0,30
10-40 лет	0,15-0,45
40-50 лет	0,20-0,50
50-60 лет	0,25-0,55
60 лет	0,30-0,60

2.1.4. Лабораторная работа

Опыт 1. Обнаружение белков и пептидов в растворах биуретовой реакцией

К 1 мл биологической жидкости прибавляют 1 мл 10%-го раствора едкого натрия и 2 капли 1%-го раствора сернокислой меди. В присутствии белков и пептидов (начиная с трипептидов) появляется розово-фиолетовое окрашивание.

Реакция основана на образовании хелатного (внутрикомплексного) соединения ионов меди (II) с двумя пептидными связями, выступающими в роли полидентатных лигандов:



Опыт 2. Разделение белков сыворотки крови методом высаливания. Выделение γ -глобулинов

Метод основан на разделении белков путем их фракционного осаждения из растворов под действием концентрированных растворов солей. Добавляемые ионы солей, в основном сульфата аммония, уменьшают устойчивость белковых молекул в водных растворах, так как:

1) снимают гидратную оболочку (дегидратирующее действие);

2) нейтрализуют заряд белковых молекул, т. е. устраняют факторы устойчивости растворов ВМС.

При высаливании белков сыворотки крови первыми выпадают в осадок γ -глобулины, так как они имеют большую молярную массу ($M = 160\ 000$) и меньший заряд ($pJ = 6,3$); затем выпадают α_1 -, α_2 -, β -глобулины ($M = 55\ 000$ – $75\ 000$), ($pJ = 4,8$ – $5,4$). Альбумины, имеющие больший заряд ($pJ = 4,64$) и меньшую молекулярную массу ($M = 67\ 000$), более устойчивы и высаливаются под действием более высоких концентраций солей (100% сульфатом аммония).

ХОД РАБОТЫ

К 5 мл сыворотки крови добавляют 2,5 мл 100% насыщенного раствора сульфата аммония до достижения 33%-го насыщения. Выпадает осадок γ -глобулинов, который отфильтровывают. К фильтрату добавляют 2,5 мл 100% насыщенного раствора сульфата аммония до достижения 50%-го насыщения. Выпадают в осадок α - и β -глобулины, их отфильтровывают. Для высаливания альбуминов в фильтрат добавляют кристаллический сульфат аммония до 100%-го насыщения. Выпадают альбумины. Осадок отфильтровывают. С фильтратом проводят биуретовую реакцию (добавляют равный объем 10%-го раствора едкого натрия и 1–2 капли 2%-го раствора сульфата меди). Отсутствие синего окрашивания является отрицательной реакцией на белок.

Опыт 3. Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза

Исследование соотношения белков в сыворотке крови используется с диагностическими и прогностическими целями.

Распространенным методом разделения белков сыворотки крови является электрофорез. В настоящее время существуют высокоэффективные разновидности электрофореза: диск-электрофорез в полиакриламидном геле, электрофорез в крахмальном блоке, иммуноэлектрофорез. Самым простым по технике выполнения является электрофорез на бумаге, посредством которого можно разделить белки сыворотки крови на 5 фракций: альбумины, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины. Необходимо помнить, что в каждую фракцию входят несколько индивидуальных белков, сходных по физико-химическим свойствам.

Сущность метода. Электрофорезом называется процесс передвижения заряженных частиц под действием электрического поля. Разделение белков основано на различной скорости перемещения белков в электрическом поле в зависимости от знака и величины электрического заряда и молекулярной массы белка.

ХОД РАБОТЫ

На полоске хроматографической бумаги отметить карандашом на концах $+$ и $-$, в середине провести поперечную линию. По этой линии нанести микропипеткой 0,01 мл сыворотки крови. Полоску поместить в камеру для электрофореза так, чтобы $+$ и $-$ на бумаге соответствовали $+$ и $-$ прибора. Бумагу смочить буферным раствором с $\text{pH} = 8,6$. В такой же раствор погружены электроды и концы бумаги. Камеру закрыть крышкой, подключить к электросети. Условия для электрофореза: напряжение электрического тока 400В, сила тока 10–12А, время разделения 1–1,5 ч. Затем ток отключить, крышку снять, полоску бумаги извлечь из камеры и высушить в сушильном шкафу при 100–150 °С, чтобы зафиксировать белки на бумаге. Окраска белковых фракций: бумагу поместить в сосуд с краской (бром-феноловый или амидошварц) на 5 мин, затем избыток краски смыть, опуская полоску бумаги в разбавленную уксусную кислоту до тех пор, пока промывная жидкость не будет бесцветной. На бумаге выявляется ряд окрашенных полос, соответствующих фракциям белков.

Зарисуйте электрофореграмму:



Объясните, почему электрофорез белков сыворотки крови осуществляют в среде с $\text{pH} = 8,6$. Обозначьте белковые фракции, охарактеризуйте их, используя данную таблицу.

Название белковой фракции	ИЭТ-р _л	Содержание, г/л	Молекулярная масса (средняя)	% от общего белка
Альбумин	4,64	34-42	67000	52-65
α_1 -глобулин	4,8	1-3	55 000	2-4,5
α_2 -глобулин	4,8	6-9	150 000	10-15
β -глобулин	5,4	4-9	75 000	6-13
γ -глобулин	6,3	6-13	160 000	10-19

Электрофореграмму разрезают на участки, соответствующие отдельным фракциям (альбумину, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулинам).

Каждый участок электрофореграммы измельчают и помещают в отдельную пробирку. В пробирку с альбумином приливают 10 мл 0,01 н. раствора NaOH. В пробирки с α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулинами приливают по 5 мл 0,01 н. раствора NaOH. Белковые фракции экстрагируют путем встряхивания пробирок в течение 10 мин. Затем растворы фильтруют через воронки с бумажным фильтром. Фильтраты фотоколориметрируют на ФЭКе, определяя оптическую плотность (D) против 0,01 н. раствора NaOH в кюветах толщиной 1 см, с зеленым светофильтром. Результаты вносят в таблицу. Величины оптической плотности (D) каждой фракции (с учетом разбавления) складывают и сумму принимают за 100%.

$$\text{Добщ} = \text{Дальб} \cdot 2 + \text{D}\alpha_1 + \text{D}\alpha_2 + \text{D}\beta + \text{D}\gamma\text{-глоб.}$$

Затем рассчитывают процентное содержание каждой фракции в сыворотке крови.

Белковые фракции сыворотки крови:

Фракции белков	Величина оптической плотности (D)	%-ное содержание фракций
Альбумины		
α_1 -глобулины		
α_2 -глобулины		
β -глобулины		
γ -глобулины		
Σ		100%

Вывод: обратить внимание на содержание альбуминов и глобулинов в сыворотке крови здорового человека и по данному исследованию.

Сделать соответствующие выводы.

Опыт 4. Определение изоэлектрической точки желатина по мутности (по коагуляции)

В три пробирки наливают по 0,5 мл буферных растворов с $\text{pH} = 3,7; 4,7; 5,7$ и по 0,5 мл 0,5%-го раствора желатина. Коагуляция желатина не наблюдается, так как желатин — гидрофильный белок, обладающий двумя факторами устойчивости: зарядом и водной оболочкой. Затем во все пробирки приливают по 1 мл этилового спирта. В одной из пробирок происходит коагуляция желатина (образуется мутность). Записать и объяснить результат.

Опыт 5. Определение изоэлектрической точки казеина по мутности (коагуляции)

В три пробирки наливают по 1 мл буферных растворов с $\text{pH} = 3,7; 4,7; 5,7$. Затем в каждую пробирку приливают по 1 мл золя казеина (казеин — гидрофобный белок и не имеет водной оболочки). Изоэлектрическая точка казеина равна значению pH смеси, в которой через 5–10 мин наблюдается наибольшее помутнение. Полученные результаты сравнить с ИЭТ желатина. Сделать вывод о факторах устойчивости казеина.

Опыт 6. Устойчивость растворов ВМС

В пробирку наливают 1 мл золя гидроокиси железа, в другую — 1 мл 0,5%-го раствора желатина. В обе пробирки добавляют раствор сернокислого аммония до наступления коагуляции (образования мутности). Записывают число капель, добавленных в первую и вторую пробирки. Сделать вывод.

Опыт 7. Защитное действие растворов высокомолекулярных соединений

В две пробирки наливают по 1 мл золя гидроокиси железа, затем в первую пробирку добавляют 1 мл 0,5%-го раствора желатина, а во вторую — 1 мл дистиллированной воды. Пробирки встряхнуть, в каждую пробирку добавлять по каплям раствор сернокислого аммония до появления мутности (коагуляции). Записать число капель,

необходимых для наступления коагуляции. Объяснить результат и сделать вывод.

Опыт 8. Количественное определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом

В сыворотке крови здорового человека содержится 65–85 г/л белка.

Снижение общего количества белка в сыворотке крови — гипопроотеинемия.

Причины гипопроотеинемии:

1. Снижение процесса биосинтеза белков крови в печени.
2. Недостаток поступления белка пищи.
3. Потеря белка организмом.

Повышение общего количества белка в сыворотке крови — гиперпротеинемия.

Причины гиперпротеинемии:

1. Сгущение крови из-за потери жидкости.
2. За счет усиления синтеза иммуноглобулинов при хронических инфекционных заболеваниях.
3. Появление патологических белков.

Определение содержания белка в сыворотке крови и построение калибровочной кривой проводят в одинаковых условиях, используя ту же пару кювет, с помощью которых проводилось построение калибровочной кривой, тот же ФЭКН-57, то же соотношение реактивов.

СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Белки реагируют в щелочной среде с серноокислой медью с образованием соединений, окрашенных в фиолетовый цвет (биуретовая реакция).

ХОД РАБОТЫ

К 0,1 мл сыворотки прибавляют 5,0 мл рабочего биуретового реактива, смешивают, избегая образования пены. Через 30 мин (и не позднее, чем через час) измеряют оптическую плотность на ФЭКе в кювете, толщиной 10 мм, при длине волны 540–560 нм (зеленый светофильтр) против контроля.

КОНТРОЛЬ

К 5,0 мл рабочего биуретового реактива прибавляют 0,1 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия, далее обрабатывают как опыт.

Расчет ведут по калибровочному графику.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Из стандартного раствора белка (100 г/л) готовят рабочие калибровочные растворы, как указано в таблице:

№ пробики	Калибровочный раствор белка (100 г/л)	9%-й раствор хлорида натрия	Концентрация белка, г/л
1.	0,4 мл	0,6 мл	40
2.	0,6 мл	0,4 мл	60
3.	0,8 мл	0,2 мл	80
4.	1,0 мл	—	100

Из каждого разведения берут 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5,0 мл рабочего биуретового реактива, через 30–60 мин измеряют на ФЭКе, как в опыте, против контроля. По полученным данным строят калибровочный график: по оси абсцисс — концентрацию белка, по оси ординат — значение оптической плотности.

Примечание: При содержании белка в сыворотке 100 г/л сыворотку разводят физиологическим раствором, а результаты умножают на коэффициент разведения.

Стандартный раствор белка: 1,0 г альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки) растворяют в 6 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия и доводят объем до 10 мл (100 г/л).

2.1.5. Клинико-диагностическое значение определения содержания белков в сыворотке крови

Повышение концентрации белков в сыворотке крови

- Острые и хронические инфекции
- Аутоиммунизационные болезни
- Парапротейнемические гемобластозы
- Миеломная болезнь
- Болезнь Вальденстрема
- Болезнь тяжелых цепей
- Лимфогранулематоз
- Саркоидоз
- Активный хронический гепатит
- Цирроз печени без выраженной печеночноклеточной недостаточности
- Обезвоживание.

Снижение концентрации белков в сыворотке крови**Пониженный синтез белка**

- Нехватка белков в рационе питания, недоедание
- Нарушения всасывания, энтериты, энтероколиты, панкреатиты
- Болезни печени (цирроз, атрофия, токсическое повреждение, новообразования)
- Длительное лечение кортикостероидами

Увеличенные потери белка:

- Нефротический синдром
- Гломерулонефрит
- Сахарный диабет
- Асцит, плевральные экссудаты, транссудаты
- Ожоги
- Кровотечения
- Физическое напряжение

Повышенный распад белка:

- Тиреотоксикоз
- Длительные лихорадочные состояния
- Травмы
- Опухоли

Гипергидратация.

2.1.6. Тест-контроль по теме**«Химия пептидов и белков»****1. Молекулярная масса высокомолекулярных пептидов:**

- | | | |
|-----------------|------------|---------------|
| 1) 500–5000 Д | 3) 4–1 ОД | 5) 50–100 Д |
| 2) 5000–16000 Д | 4) 10–50 Д | 6) 100–500 Д. |

2. Укажите биологическое значение пептидов:

- 1) гормоны
- 2) опорная
- 3) энергетическая
- 4) участвуют в регуляции пищеварения
- 5) участвуют в сокращении мышц
- 6) создание биопотенциалов.

3. Изoeлектрическая точка для трипептида Ала-Вал-Асп находится в области pH:

- | | | |
|---------|----------|-----------|
| 1) 4,99 | 3) 11,05 | 5) 7,25 |
| 2) 7,00 | 4) 8,99 | 6) 12,22. |

4. Какие связи обуславливают первичную структуру белка:

- | | |
|-----------------|-------------------------|
| 1) дисульфидные | 4) солеобразующие |
| 2) водородные | 5) силы Ван-дер-Ваальса |
| 3) пептидные | 6) гликозидные. |

5. Укажите связи, обуславливающие вторичную структуру белка:

- | | |
|------------------|------------------|
| 1) ковалентные | 4) водородные |
| 2) сложноэфирные | 5) гликозидные |
| 3) пептидные | 6) дисульфидные. |

6. Что представляет в пространстве третичная структура белка:

- 1) α -спираль
- 2) β -спираль
- 3) укладка α -спирали в определенную конфигурацию
- 4) комплекс субъединиц.

7. Выберите наиболее полное и правильное определение четвертичной структуры белка:

- 1) способ укладки полипептидной цепи в виде α -спирали
- 2) способ укладки полипептидной цепи в виде β -структур
- 3) количество протомеров, их расположение относительно друг друга и характер связей между ними в олигомерном белке
- 4) порядок чередования аминокислот в полипептидной цепи
- 5) фрагмент пептидного остова
- 6) способ укладки полипептидной цепи в пространстве.

8. Денатурация белковой молекулы — это:

- 1) уменьшение растворимости белка при добавлении солей щелочных или щелочноземельных металлов
 - 2) потеря биологической активности белка в результате его гидролиза
 - 3) изменение конформации белка, сопровождающееся потерей его биологической активности
-

- 4) конформационные изменения белка в результате взаимодействия с природными лигандами
- 5) способ укладки полипептидной цепи в пространстве
- 6) кооперативное изменение конформации протомеров.

9. Укажите факторы устойчивости белковых молекул в биологических жидкостях:

- 1) наличие простетической небелковой группы
- 2) наличие водной оболочки
- 3) наличие заряда
- 4) наличие пептидного остова
- 5) отсутствие заряда
- 6) отсутствие водной оболочки.

10. Укажите реакцию, позволяющую обнаружить пептид и белок в растворе:

- | | |
|----------------------|------------------|
| 1) нингидриновая | 4) реакция Фоля |
| 2) ксантопротеиновая | 5) проба Легала |
| 3) биуретовая | 6) проба Либена. |

11. Укажите, что происходит с белками при высаливании:

- 1) уменьшение растворимости белка
- 2) обратимое осаждение белка
- 3) необратимое осаждение белка
- 4) сохранение нативной структуры
- 5) необратимое изменение биологических свойств
- 6) уменьшение молекулярной массы.

12. Водная оболочка у молекул белка возникает вследствие:

- 1) наличия гидрофобных групп
 - 2) наличия гидрофильных групп
 - 3) изменения осмотического давления среды
 - 4) наличия заряда частиц
 - 5) наличия стабилизатора
 - 6) наличия диффузного слоя ионов.
-

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие реакции позволяют обнаружить наличие белков в биологических жидкостях организма человека? Принципы этих реакций.
2. На чем основаны количественные методы определения белков в сыворотке крови?
3. Каково содержание белков в сыворотке крови человека?
4. Каково содержание белковых фракций в сыворотке крови человека?
5. Что называют гипо- и гиперпротеинемиями? Причины их.

2.2 Химия углеводов

Глюкоза является основным энергетическим субстратом организма. Главные источники глюкозы — сахароза, крахмал, запасы гликогена в печени, а также реакции синтеза из аминокислот, лактата. Концентрация глюкозы в крови является производной активности процессов гликогенеза, гликогенолиза, глюконеогенеза и гликолиза. Основным гормоном, ответственным за утилизацию глюкозы и регуляцию гомеостаза глюкозы, является инсулин. В регуляции энергетических изменений принимают также участие контринсулярные гормоны: глюкагон, кортизол, адреналин, гормон роста, тироксин. Под воздействием инсулина концентрация глюкозы в крови понижается, под влиянием остальных гормонов повышается. Содержание глюкозы практически одинаково в плазме и форменных элементах крови. Содержание глюкозы в артериальной крови несколько выше, чем в венозной, что объясняется непрерывным использованием глюкозы клетками тканей и органов.

Нормальные значения для венозной крови:

Новорожденные	—	2,8–4,4 ммоль/л
Дети	—	3,9–5,8 ммоль/л
Взрослые	—	3,9–6,4 ммоль/л

2.2.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Доказательство восстанавливающей способности у глюкозы и отсутствие ее у фруктозы. Качественные реакции на глюкозу

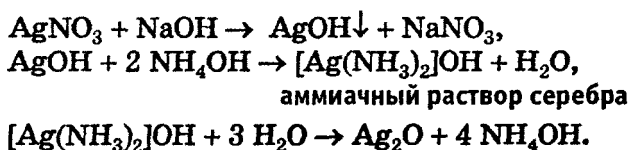
а) Реакция Троммера

В большую пробирку поместите 0,5 мл 0,5%-го раствора глюкозы и 6–8 капель 2н. NaOH. Затем по каплям добавляйте 0,2 н. раствор CuSO_4 , пока не прекратится его растворение. Осторожно нагрейте пробирку на спиртовке. Голубой не растворимый в воде осадок гидрата окиси меди постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди. Аналогичный опыт проделайте с 0,5%-ным раствором фруктозы.



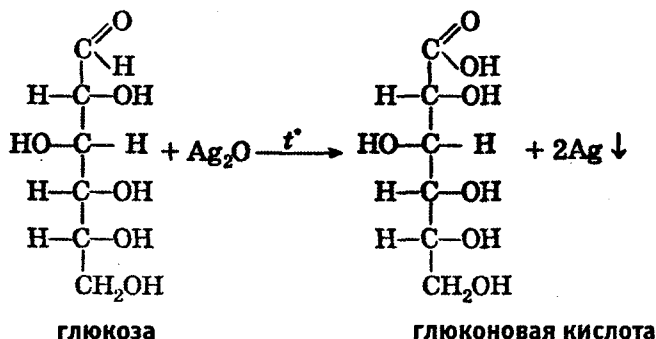
б) Реакция «серебряного зеркала»

В большую пробирку поместите 3 капли 0,2 н. раствора AgNO_3 , 5 капель 2 н. NaOH и добавляйте по каплям 2 н. NH_4OH до полного растворения образующегося осадка. Полученный бесцветный раствор — аммиачный раствор гидрата окиси серебра:



Затем к аммиачному раствору гидрата окиси серебра добавьте 3–4 капли 0,5%-го раствора глюкозы и слегка подогрейте на спиртовке. Металлическое серебро выделится либо в виде осадка черного цвета, либо в виде блестящего зеркального налета, если стенки пробирки химически чисты (пробирки помыты с помощью «хромовой смеси», а не моющими синтетическими средствами (порошками).

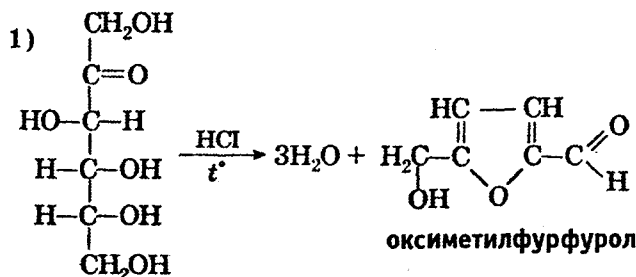
Аналогичный опыт проделайте с 0,5%-ным раствором фруктозы.



Опыт 2. Открытие фруктозы (р. Селиванова)

В первую пробирку вносят 10 капель 0,5%-го раствора фруктозы, во вторую пробирку — 10 капель 0,5%-го раствора глюкозы. В обе пробирки добавляют в равных объемах свежеприготовленный реактив Селиванова (0,5%-ный раствор резорцина в 20%-ной соляной кислоте). Осторожно нагрейте на спиртовке. В пробирке с фруктозой постепенно возникает красное окрашивание.

На первой стадии образуется оксиметилфурфурол, который во второй стадии, конденсируясь с резорцином, дает красное окрашивание:



2) Во второй стадии реакции оксиметилфурфурол, конденсируясь с резорцином, дает красное окрашивание.

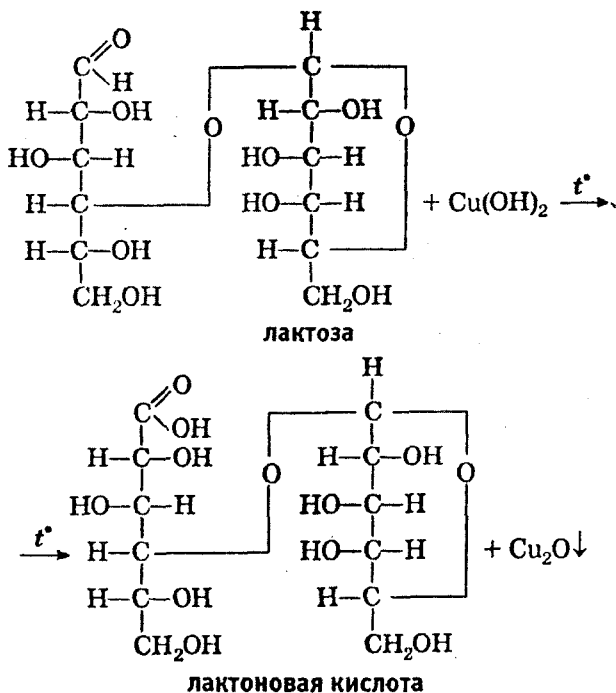
Опыт 3. Доказательство отсутствия

восстанавливающей способности сахарозы

В пробирку вносят 0,5 мл 0,5%-го раствора сахарозы и 6-8 капель 2 н. раствора едкого натра. Затем по каплям добавляют 0,2 н. раствора сульфата меди (II), пока не прекратится его растворение. Осторожно нагревают пробирку на спиртовке. Голубой осадок не переходит в желтый, а затем — в красный, что доказывает отсутствие восстанавливающей способности у сахарозы.

Опыт 4. Доказательство восстанавливающей способности лактозы

В пробирку вносят 0,5 мл 1 %-го р-ра лактозы и 6-8 капель 2 н. р-ра едкого натра. Затем по каплям добавляют 0,2 н. р-ра сульфата меди (II) до полного растворения. Осторожно нагревают на спиртовке: голубой осадок гидроксида окиси меди переходит в желто-оранжевый:



Опыт 5. Качественное обнаружение крахмала

К 2–3 мл 0,1%-ного водного раствора крахмала добавляют на холоде 1 каплю раствора йода. Появляется темно-синее окрашивание, вследствие адсорбции йода на молекуле крахмала; при нагревании окраска исчезает, так как происходит десорбция йода с крахмалом.

Опыт 6. Кислотный гидролиз крахмала

В большую пробирку с пипеткой помещают 1 мл 0,1%-го раствора крахмала и 20 капель 2 н. раствора серной кислоты. Нагреть на кипящей водяной бане в течение 10 мин, отбирая пипеткой каждые 2 мин в маленькие пробирки 3–4 капли гидролизата и добавляя в них по 1 капле йода после охлаждения.

Обратить внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. К последней пробе в большой пробирке добавить 2 капли 2 н. раствора сульфата меди, а затем добавлять по каплям 2 н. раствора гидроксида натрия до образования растворимого темно-синего соединения. О чем говорит эта реакция?

Далее полученный раствор нагреть (реакция Троммера). Появляется желто-красное окрашивание (положительная реакция Троммера). О чем говорит эта реакция? По результатам реакций сделать заключение о строении крахмала.

Опыт 7. Экспресс-методы определения глюкозы в биологических жидкостях человека

Для полуколичественной, скрининговой оценки содержания глюкозы в крови и моче в настоящее время широко используются тест-полоски,

Тест-полоска представляет собой полоску ватмана или другого полимерного материала, на которую наклеен аналитический элемент в виде квадрата светло-желтого, светло-розового или светло-бежевого цвета, выполненный из фильтрующего материала. Элемент пропитывается активным раствором. Глюкоза под влиянием глюкозооксидазы или дегидрогеназы окисляется с выделением эквимольного количества пероксида водорода, который при участии пероксидазы реагирует с красителями на аналитическом элементе, изменяя их окраску: желтый переходит в зеленый, розовый — в красный, бежевый — в синий. Возник-

шую окраску сравнивают с одним из участков цветовой гаммы шкалы, нанесенной на поверхности футляра, в котором хранятся сами тест-полоски. Виды тест-полосок: «Глюко-уротест» — для определения и обнаружения глюкозы в моче; диагностические полоски «ФАН» — для полуколичественного определения глюкозы в крови (от 1 до 44 ммоль /л); индикаторные полоски «БМ-Тест 1-44 РФ», «Гемо-Глюкотест» — для определения концентрации глюкозы в крови; «Глюкостикс» и многие другие.

ХОД РАБОТЫ

На тест-полоску наносят каплю крови или погружают на 1-2 секунды в мочу. Избыток мочи удаляют, проведя гранью полоски по краю сосуда. Выдерживают на воздухе 1-3 минуты и визуально сравнивают окраску аналитического элемента со стандартной окраской на поверхности пенала (футляра), в котором хранятся полоски.

Для получения правильных результатов исследования следует соблюдать два правила:

1. не прикасаться руками к аналитической зоне тест-полоски и не допускать попадания на нее прямых солнечных лучей;
2. хранить тест-полоски в герметической таре (футляре) в сухом прохладном месте, но не в холодильнике; избегать воздействия влаги, высокой температуры и действия различных химических веществ.

2.2.2. Клинико-диагностическое значение определения глюкозы в сыворотке крови

Повышение концентраций глюкозы

- Диабетический синдром
 - инсулинозависимый сахарный диабет I типа (ИЗСД)
 - сахарный диабет II типа (ИНСД)
 - нарушение толерантности к глюкозе
 - Нарушения функции гипофиза и надпочечника
 - болезнь и синдром Кушинга с сопутствующим диабетом
 - гигантизм и акромегалия
 - Болезни поджелудочной железы
 - острый или хронический панкреатит
 - рак поджелудочной железы
-

- У пациентов, подвергшихся диализу
- Феохромоцитомы
- Тиреотоксикоз
- Ожоги (первые сутки).

Снижение концентрации глюкозы

- Передозировка инсулина или отсутствие приема пищи после приема лекарства
- Передозировка пероральных противодиабетических препаратов (прием сульфанилмочевины вместе с другими лекарствами (салицилаты, сульфонамиды)
- Гиперинсулинизм
 - инсулинома
- Гормональная недостаточность гипофиза, надпочечников (дефицит АКТГ и глюкокортикостероидов)
- У пациентов после гастрэктомии
- Врожденные метаболические блоки
 - галактоземия
 - непереносимость фруктозы
 - гликогенозы
- Токсическое повреждение печени
 - хлороформ, четыреххлористый углерод, этанол, парацетамол, соединения салициловой кислоты, альфа-аманитин (отравление мухомором).

2.2.3 Тест-контроль по теме «Химия углеводов»

1. Функции углеводов в организме многочисленные, но наиболее важные из них:

- | | |
|-------------------|---------------------|
| 1) энергетическая | 3) гомеостатическая |
| 2) структурная | 4) защитная. |

2. Согласно принятой в настоящее время классификации углеводы подразделяются на 3 основные группы;

- | | |
|------------------|-------------|
| 1) моносахариды | 4) пиранозы |
| 2) олигосахариды | 5) фуранозы |
| 3) полисахариды | 6) альдозы. |

3. К гомополисахаридам относятся:

- | | | |
|-------------|--------------|--------------|
| 1) крахмал | 3) клетчатка | 5) декстраны |
| 2) сахароза | 4) гликоген | 6) мальтоза. |
-

4. К гетерополисахаридам относятся:

- | | |
|-------------------------|------------------|
| 1) гепарин | 4) целлюлоза |
| 2) гиалуроновая кислота | 5) протеогликаны |
| 3) хондроитинсульфаты | 6) декстраны. |

5. Полисахаридами бактериального происхождения являются:

- | | | |
|--------------|--------------|-------------|
| 1) крахмал | 3) клетчатка | 5) гликоген |
| 2) целлюлоза | 4) декстраны | 6) лактоза. |

6. Моносахариды по содержанию функциональных групп подразделяются на две группы:

- | | | |
|------------|------------|--------------|
| 1) альдозы | 3) рибозы | 5) пентозы |
| 2) кетозы | 4) тетразы | 6) пиранозы. |

7. По числу атомов углерода в молекуле моносахариды классифицируются на:

- | | | |
|------------|------------|--------------|
| 1) триозы | 3) пентозы | 5) гептозы |
| 2) тетразы | 4) гексозы | 6) фуранозы. |

8. К пентозам относятся следующие моносахариды:

- | | | |
|------------------|-------------|---------------|
| 1) рибоза | 3) рибулоза | 5) ксилулоза |
| 2) дезоксирибоза | 4) ксилоза | 6) арабиноза. |

9. В природе наиболее распространены следующие гексозы:

- | | | |
|-------------|--------------|----------------|
| 1) глюкоза | 3) галактоза | 5) эритроза |
| 2) фруктоза | 4) арабиноза | 6) эритрулоза. |

10. К дисахаридам относятся:

- | | | |
|-------------|----------------|-------------------|
| 1) сахароза | 3) изомальтоза | 5) целлюлоза |
| 2) мальтоза | 4) лактоза | 6) глюкopiраноза. |

11. В состав молекулы мальтозы входят остатки следующих моносахаридов:

1. α -Д-глюкопираноза
 2. α -Д-глюкофураноза
 3. β -Д-галактоза
 4. α -Д-манноза
 5. β -Д-глюкопираноза
 6. β -Д-глюкофураноза.
-

12. В состав молекул сахарозы входят остатки моносахаридов:

1. α -Д-глюкопираноза
2. β -Д-фруктофураноза
3. α -Д-фруктофураноза
4. β -Д-глюкопираноза
5. α -Д-глюкофураноза
6. β -Д-глюкофураноза.

13. Мономером клетчатки (целлюлозы) является:

1. α -Д-глюкопираноза
2. β -Д-глюкопираноза
3. α -Д-глюкофураноза
4. β -Д-глюкофураноза
5. α -рибоза
6. β -рибоза.

14. Остатки моносахаридов в макромолекуле крахмала соединены химической связью:

1. 1,4- α , α -0-гликозидной
2. 1,4- β , β -0-гликозидной
3. 1,2- α , α -0-гликозидной
4. 1,2- α , β -0-гликозидной
5. 1,6- β , β -0-гликозидной
6. 1,4- α , β -0-гликозидной.

15. Остатки моносахаридов в макромолекуле клетчатки соединены химической связью:

1. 1,4- α , α -0-гликозидной
2. 1,4- α , β -0-гликозидной
3. 1,4- β , β -0-гликозидной
4. 1,2- α , β -0-гликозидной
5. 1,6- β , β -0-гликозидной
6. 1,2- α , β -0-гликозидной.

16. В макромолекуле гликогена имеются следующие химические связи:

1. 1,4- α , α -0-гликозидная
 2. 1,6- α , α -0-гликозидная
 3. 1,2- α , α -0-гликозидная
 4. 1,2- β , β -0-гликозидная
 5. 1,4- β , β -0-гликозидная
 6. 1,4- α , β -0-гликозидная.
-

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каково содержание глюкозы в крови человека?
2. Каков механизм реакции Троммера?
3. Какое свойство глюкозы лежит в основе реакции «серебряного зеркала»?
4. Каков принцип реакции Селиванова?
5. Объясните присутствие восстанавливающей способности у сахарозы.
6. Почему лактоза обладает восстанавливающими свойствами?
7. Как обнаружить присутствие крахмала в растворе?
8. Перечислите промежуточные продукты кислотного гидролиза крахмала. Принципы их обнаружения.
8. На чем основан экспресс-метод обнаружения глюкозы в биологических жидкостях организма человека?

2.3. Химия жиров (липидов)

Нейтральные жиры, т.е. триацилглицерины поступают с пищей (экзогенные триацилглицерины) и синтезируются в организме (эндогенные триацилглицерины). Последние образуются в жировой ткани, печени главным образом из углеводов. Триацилглицерины являются главной формой накопления жирных кислот и фактически, основным источником энергии у людей. Триацилглицерины накапливаются в жировых клетках, откуда после гидролиза до глицерина и жирных кислот освобождаются в систему циркуляции.

ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНЫ (ТАГ)

Плазма, сыворотка крови

Нормальные значения: 0,55–2,29 ммоль/л

В норме около 1/3 общих липидов плазмы приходится на долю ФЛ. ФЛ плазмы включены в липопротеины, за исключением лизолецитина, который транспортируется альбумином. Более 90% плазменных ФЛ печеночного происхождения, они реализуются в циркулирующую кровь в составе липопротеинов. ФЛ входят в состав хиломикронов, последние формируются в энтероцитах из липидов, реабсорбированных в тонкой кишке.

ФОСФОЛИПИДЫ (ФЛ) сыворотка крови

Нормальные значения:

новорожденные	0,75–1,70 г/л
дети до 1 года	1,00–2,75 г/л
дети	1,80–2,95 г/л
взрослые	1,25–2,75 г/л
пожилые старше 65 лет	1,90–3,65 г/л

КЛССИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ

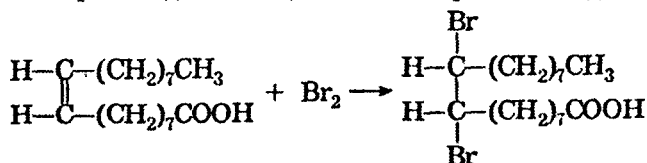
I	II	III
ПРОСТЫЕ	СЛОЖНЫЕ	ПРЕДШЕСТВЕННИКИ И ПРОИЗВОДНЫЕ ЛИПИДОВ
1) ТАГ	1) фосфолипиды	1) холестерин
2) α - β -ДАГ	2) гликолипиды	2) высшие жирные кислоты
3) β -МАГ	3) сульфолипиды	3) стероиды
4) ЭХС	4) липопротеины	4) простагандины
		5) тромбоксаны

2.3.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Определение неспредельности высших жирных кислот (ВЖК)

ХОД РАБОТЫ

В маленькую пробирку поместите 8–10 капле бромной воды и 2–3 капли подсолнечного масла (содержит большое количество неспредельных жирных кислот). Взболтайте. Происходит обесцвечивание бромной воды:



олеиновая кислота

9,10-дибромстеариновая
кислота

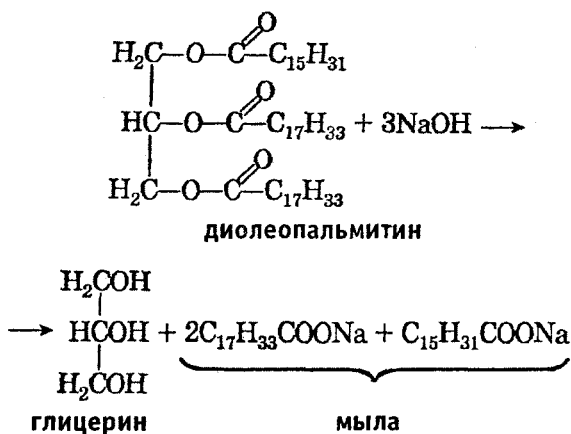
Степень неопределенности жиров, обусловленную присутствием неопределенных жирных кислот, количественно определяют по присоединению галогенов по месту двойной связи (йода, брома).

Опыт 2. Омыление жиров

ХОД РАБОТЫ

В небольшую фарфоровую чашечку поместите 0,5 мл касторового масла и 4 капли 35%-го раствора едкого натрия. Стеклопалочкой хорошенько размешайте щелочь с маслом до получения однородной эмульсии. Затем поставьте чашечку на электрическую печь и при незначительном подогревании продолжайте помешивать, пока не получится однородная, прозрачная, слегка желтоватая жидкость. Затем добавьте 2 мл дистиллированной воды и вновь нагрейте, тщательно перемешивая до полного упаривания воды. Снимите чашечку с электрической печи.

Получится кусочек твердого белого мыла.



Опыт 3. Экстракция липидов сыворотки крови

Цель: усвоить метод извлечения липидов из сыворотки и ознакомиться с ходом анализа. Липиды сыворотки экстрагируют органическими растворителями. Метод заключается в разрушении липидно-белковых комплексов полярным растворителем (например, метанолом), что способствует последующему экстрагированию липидов непо-

лярным растворителем (петролейным эфиром, этиловым эфиром, хлороформом). Полярные и неполярные растворители комбинируются в смеси (например, хлороформ: метанол или этанол: эфир).

1 мл сыворотки помещают в пробирку размером 15 × 250 мм, заливают 20 мл смеси хлороформ: метанол (2:1) и тщательно встряхивают в течение часа. Затем производят расслоение смеси на хлороформную и метаноловую фазы, добавляя в нижнюю часть пробирки 0,2 объема воды или солевого раствора (0,1%-го раствора NaCl или CaCl₂).

После расслоения фаз на два слоя:

1) в нижнем — хлороформном — слое все липиды, кроме ганглиозидов;

2) в верхнем метаноловом слое — нелипидные компоненты и ганглиозиды.

Нижний липидный слой собрать, упарить в токе азота на кипящей водяной бане и использовать для следующего опыта № 4.

Опыт 4. Исследование состава общих липидов методом тонкослойной хроматографии

Разделение веществ при тонкослойной хроматографии происходит благодаря различию в способности адсорбироваться на поверхности сорбента, что определяется характером функциональных групп, входящих в структуру отдельных липидов.

После разделения липиды проявляют на пластинке специальными реактивами.

Метод может быть использован как для качественного, так и количественного изучения липидных компонентов.

Подготовка пластины с адсорбентом

Для нанесения на пластины используют смесь силикагеля марки КСК и гипса. Гипс предварительно просушивается в течение 24 ч. при температуре 115–120 °С. Оба адсорбента измельчают и просеивают через сито с числом 200 меш.

Пластины размером 17 × 14 см тщательно обезжиривают. Готовят смесь из 4,5 г силикагеля и 0,5 г гипса, добавляя дистиллированную воду при тщательном помешивании в ступке до консистенции «жидкой сметаны».

Полученную массу равномерно распределяют по поверхности пластины, после чего ее подсушивают на воздухе в течение 8–12 ч. В таком виде пластина готова для проведения анализа.

Раствор исследуемых липидов в хлороформе (0,3–0,5 мг) наносят на пластину с помощью микропипетки. Пробу наносят, отступя примерно 1,5 см от края пластины. При нанесении необходимо получить возможно меньший диаметр пятна, не нарушая слой силикагеля.

После нанесения липидов на пластину ее помещают в камеру, куда предварительно наливается смесь растворителей, количество которой должно обеспечивать слой жидкости на дне камеры в 0,8–1,0 см. Пластины устанавливают под углом так, чтобы нижний край был погружен в жидкость на 0,5 см. Хроматографирование производят в течение 45–60 мин при комнатной температуре. Фронт растворителей за это время поднимается на 9–10 см. Пластины извлекают из камеры и сушат на воздухе до исчезновения запаха растворителей. Для проявления отдельных липидных фракций пластины помещают в камеру, насыщенную парами йода. Йод, растворяясь в липидах, окрашивает их в темно-желтый цвет (интенсивность окраски зависит от длительности проявления).

На проявленных хроматограммах фракции липидов располагаются в порядке возрастания величин R_f следующим образом: фосфолипиды, холестерин, моноацилглицерины, диацилглицерины, свободные жирные кислоты, триацилглицерины, эфиры холестерина.

РЕЗУЛЬТАТЫ

разделение общих липидов методом ТСХ



подвижный растворитель:

гексан	:	диэтиловый эфир	:	уксусная кислота
70	:	30	:	2

Опыт 5. Разделение фосфолипидов печени ТСХ на силуфоле

5 г печени измельчают, заливают хлороформом и проводят экстракцию липидов в течение 1 часа. Хлороформный экстракт упаривают на кипящей водяной бане в токе азота и наносят на пластинку силуфола (фабричное изготовление). Пластинку помещают в хроматографическую камеру с растворителем : хлороформ : метанол : вода в соотношении 65 : 24 : 4 на 1 час. После разделения фосфолипидные фракции проявляют в парах йода. При использовании данной системы подвижного растворителя фосфолипиды на пластинке располагаются в порядке возрастания R_f следующим образом: лизофосфатиды, сфингомиелины, фосфатидилхолины, фосфатидилсерина, фосфатидилэтанола, фосфатидные кислоты, холестерин и триацилглицерины.

РЕЗУЛЬТАТЫ разделение фосфолипидов печени ТСХ



подвижный растворитель:

хлороформ	:	метанол	:	вода
65	:	24	:	4

2.3.2. Клинико-диагностическое значение определения липидов в сыворотке крови человека

Клинико-диагностическое значение определения ТАГ

Повышение концентрации ТАГ

Первичные гиперлипидемии

- Семейная гипертриглицеринемия (фенотип IV)
- Сложная семейная гиперлипидемия (фенотип IIb)
- Простая гипертриглицеринемия (фенотип IV)
- Семейная дисбеталипопротеинемия (фенотип III)
- Синдром хиломикронемии (фенотип I или V)
- Недостаток ЛХАТ (лецитинхолестеринацил-трансферазы)

Вторичные гиперлипидемии

- Тучность
- Цирроз печени алкогольный, билиарный
- Сахарный диабет
- Гипофункция щитовидной железы
- Нефротический синдром
- Панкреатит острый и хронический
- Пероральные противозачаточные препараты
- Подагра
- Препараты: некоторые бетаблокаторы, тиазидовые диуретики
- Беременность
- Гликогеноз.

Снижение концентрации ТАГ

- Гиполипопротеинемия
- Гипертиреоз
- Синдром малабсорбции

Клинико-диагностическое значение определения ФЛ

Повышение содержания ФЛ

- Беременность
 - Вирусный гепатит (легкое течение)
 - Гиперлипопротеидемия II типа
 - Алкогольный и билиарный цирроз печени
 - Нефротический синдром
 - Сахарный диабет.
-

Снижение содержания ФЛ

- Вирусный гепатит (тяжелое течение)
- Гипертиреоз
- Рассеянный склероз.

2.3.3. Тест-контроль по теме**«Химия жиров (липидов)»**

1. Липиды выполняют многообразные функции в организме, наиболее важные из них следующие:

1. структурная
2. транспортная
3. энергетическая
4. участие в передаче нервного импульса
5. участие в процессах терморегуляции
6. влияние на активность мембранно-связанных ферментов.

2. В зависимости от химического состава липиды подразделяются на:

1. простые, сложные, предшественники и производные липидов
2. низкомолекулярные и высокомолекулярные
3. ациклические и циклические
4. насыщенные и ненасыщенные
5. омыляемые и неомыляемые
6. содержащие остатки спиртов и не содержащие остатков спиртов.

3. Простые липиды — это:

1. простые эфиры
2. сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот
3. сложные эфиры высших одноатомных спиртов и высших жирных кислот
4. сложные эфиры углеводов и карбоновых кислот
5. сложные эфиры спиртов и карбоновых кислот
6. сложные эфиры аминокспиртов и карбоновых кислот.

4. К простым липидам относятся:

1. нейтральные жиры
 2. воск
 3. масла
-

4. фосфолипиды
5. ганглиозиды
6. цереброзиды.

5. Нейтральные жиры — это:

1. сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот
2. триацилглицерины (ТАГ)
3. диацилглицерины (ДАГ)
4. моноацилглицерины (МАГ)
5. фосфоглицерины
6. простые эфиры.

6. Сложные липиды — это сложные эфиры спиртов высших жирных кислот, дополнительно содержащие различные компоненты:

1. остаток фосфорной кислоты
2. остаток аминоспирта
3. остаток серной кислоты
4. остаток углеводов
5. остаток гепарина
6. остаток нуклеотида.

7. Сложные липиды обычно делят на классы:

1. фосфолипиды
2. гликолипиды
3. сульфолипиды
4. липопротеины
5. терпены
6. стероиды.

8. Фосфолипиды — это:

1. производные фосфатидной кислоты
2. сложные липиды, образованные спиртом, жирной кислотой, фосфорной кислотой и азотистым основанием
3. четырехкомпонентные системы
4. трехкомпонентные системы
5. двухкомпонентные системы
6. производные глицеро-3-фосфата.

9. В зависимости от природы спирта фосфолипиды делятся на:

1. фосфоглицериды (глицерофосфатиды)
 2. гликолипиды
-

3. ганглиозиды
4. цереброзиды
5. триацилглицерины
6. глицерофосфаты.

10. Важнейшими представителями глицерофосфатидов являются:

1. фосфатидилхолины
2. фосфатидилэтаноламин
3. фосфатидилинозитол
4. плазмалогены
5. кардиолипин
6. лизофосфолипиды.

11. Сфинголипиды — структурные аналоги глицеридов — вместо глицерина содержат:

1. высший ненасыщенный спирт
2. высший ненасыщенный двухатомный аминок-спирт
3. галактозу
4. глюкозу
5. олигосахарид
6. сфингозин.

12. Представителями сфинголипидов являются:

1. сфингомиелины
2. кардиолипины
3. плазмалогены
4. фосфатидилсерин
5. лецитин
6. кефалин.

13. Гликолипиды не содержат в своем составе:

1. остатка фосфорной кислоты
2. остатка ВЖК
3. углеводного остатка
4. остатка азотистого основания
5. глицерина
6. остатка сфингозина.

14. Типичными представителями гликолипидов являются:

1. цереброзиды
2. ганглиозиды
3. сфингомиелины

4. плазмалогены
5. фосфатиды
6. кардиолипиды.

15. Предшественниками и производными липидов являются:

1. жирные кислоты
2. стероиды
3. холестерин
4. простагландины
5. простагланцины и тромбоксаны
6. жирорастворимые витамины.

16. Наиболее часто в организме человека встречаются следующие жирные кислоты:

1. пальмитиновая
2. стеариновая
3. олеиновая
4. линоленовая
5. линолевая
6. арахидоновая.

17. Особенности ВЖК в организме:

1. все ненасыщенные жирные кислоты имеют цис-конфигурацию
2. все ненасыщенные жирные кислоты имеют транс-конфигурацию
3. все ВЖК содержат четное число атомов углерода
4. все ВЖК содержат нечетное число атомов углерода
5. все ВЖК имеют неразветвленный углеводородный радикал
6. все ВЖК имеют разветвленный углеводородный радикал.

18. Эссенциальные (незаменимые) ВЖК:

1. олеиновая
 2. стеариновая
 3. линолевая
 4. линоленовая
 5. пальмитиновая
 6. арахидоновая.
-

19. Биологическое значение ВЖК в организме состоит в следующем:

1. входят в структуру простых и сложных липидов
2. субстраты для образования гормоноподобных веществ: простагландинов, простацклинов, тромбоксанов и лейкотриенов
3. источники энергии в организме
4. необходимы для нормального роста, развития и функционирования организма
5. участвуют в хранении и передаче генетической информации
6. служат промежуточными продуктами распада или синтеза других липидов.

20. Стероиды делят на:

1. стерины
2. стериды
3. желчные кислоты
4. половые гормоны
5. кортикостероиды
6. терпены.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. На чем основано доказательство неопредельности ВЖК?
2. Какая реакция лежит в основе омыления жиров?
3. Принципы выделения липидов из сыворотки крови и тканей.
4. Методы разделения и анализа липидов.
5. Принцип метода тонкослойной хроматографии на силикагеле.
6. Что называют R_f ?

2.4. Химия нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты — полимеры мононуклеотидов со специфической структурой (первичной, вторичной, третичной).

$$НК = n \cdot [\text{мононуклеотид}]; Mm 10^4 - 10^{10}Д.$$

Дезоксирибонуклеиновая кислота представляет собою полимер, состоящий из мономеров — дезоксирибо-нуклеозидмонофосфатов. Рибонуклеиновая кислота является полимером, состоящим из рибонуклеозидмонофосфатов. В жи-

вой клетке любого организма содержатся три вида рибонуклеиновой кислоты: рибосомальная (р-РНК, 80%), транспортная (т-РНК, 15%) и информационная (и-РНК, 5%). Нуклеиновые кислоты имеют первичную, вторичную и третичную структуры.

Биологическая роль нуклеиновых кислот огромна. Они принимают участие в хранении и передаче наследственной информации; в биосинтезе белка, являясь структурными элементами ядра и протоплазмы.

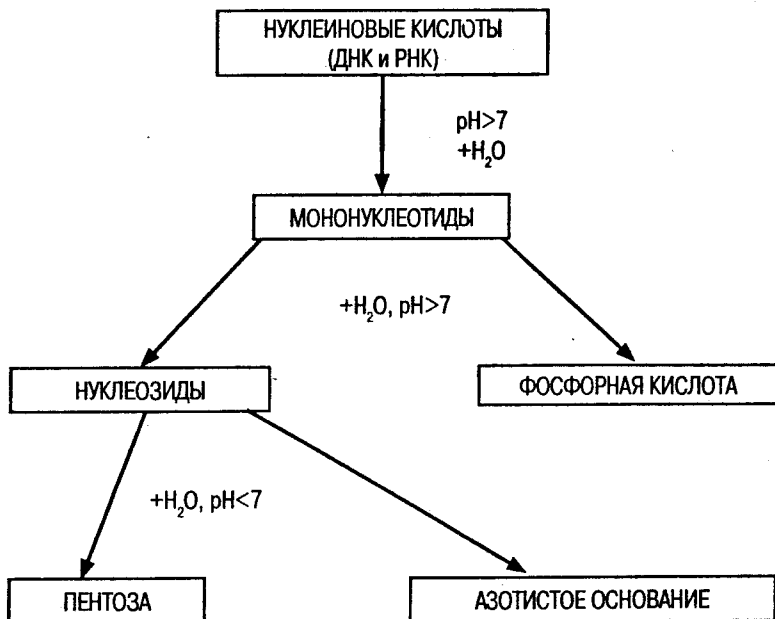
Основные функции нуклеиновых кислот:

- 1) Хранение генетической информации (в ядре клетки)
- 2) Передача генетической информации (репликация, транскрипция)
- 3) Участие в биосинтезе белков (трансляция).

2.4.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Изучение химического состава рибонуклеопротеинов дрожжей

Общая схема гидролиза нуклеиновых кислот (НК) имеет следующий вид:



ХОД РАБОТЫ

200 мг дрожжей помещают в широкую пробирку и добавляют 5 мл 10%-го раствора серной кислоты и 5 мл дистиллированной воды. Перемешивают и закрывают пробкой с обратным воздушным холодильником. Пробирку помещают на кипящую водяную баню и кипятят при слабом нагревании 1 час. Затем пробирки охлаждают, фильтруют содержимое и с фильтратом (гидролизатом) проводят реакции на составные части нуклеотидов.

а) Биуретовая реакция на белок

К 5–6 каплям гидролизата прибавляют 10 капель 10%-го раствора NaOH и 1 каплю 1%-го раствора сульфата меди. При наличии белка жидкость окрашивается в розово-фиолетовый цвет.

б) Серебряная проба на пуриновые основания

К 0,5 мл гидролизата добавляют аммиак до щелочной реакции на лакмус и 0,5 мл аммиачного раствора оксида серебра. Через 5 мин при стоянии выпадает небольшой хлопьевидный осадок серебряных соединений пуриновых оснований.

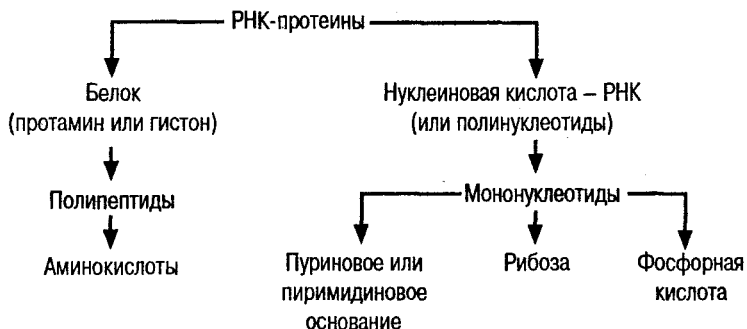
в) Реакция на пентозы

К 0,5 мл гидролизата добавляют 0,5 мл 10%-го раствора NaOH и по каплям раствор сульфата меди до образования гидрата окиси меди (избегать избытка). Нагревают до кипения. В случае присутствия моносахаридов (пентоз) образуется красный осадок закиси меди.

г) Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 0,5 мл гидролизата прибавляют равный объем молибденового реактива и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении образуется желтый осадок фосфорно-молибденовокислого аммония.

Схема полного распада РНК-протеинов может быть представлена в следующем виде:



Опыт 2. Спектрофотометрическое количественное определение нуклеиновых кислот в сыворотке крови (в основе метод А. С. Спирина)

Методика модифицирована на кафедре биохимии №2 зав. кафедрой, доцентом Л. М. Пустоваловой с сотрудниками.

ХОД РАБОТЫ

К 0,1 мл сыворотки крови добавляют 5 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты, кипятят 20 мин, охлаждают, отфильтровывают. Определяют оптическую плотность фильтрата на спектрофотометре при 260–270 и 290 нм.

І. Рассчитывают концентрацию нуклеиновых кислот по формуле:

$$C \left\{ \begin{array}{l} \text{мкг фосфора} \\ \text{в НК} \end{array} \right\} = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19},$$

где $C \left\{ \begin{array}{l} \text{мкг фосфора} \\ \text{в НК} \end{array} \right\}$ — количество мкг фосфора в 1 мл исследуемого раствора,

D_{270} — оптическая плотность при 270 нм,
 D_{290} — оптическая плотность при 290 нм.

$$\text{II. } C_{\text{мкг НК}} = C \left\{ \begin{array}{l} \text{мкг фосфора} \\ \text{в НК} \end{array} \right\} \times 10,3,$$

где $C_{\text{мкг НК}}$ — количество мкг НК в 1 мл исследуемого раствора.

III. Пересчет на 1 мл крови $C_{\text{мкг НК}}$; в 1 мл крови = $C_{\text{мкг НК}}$ в 1 мл раствора $\cdot 10 \cdot 5$.

Клиническое значение количественного определения общих нуклеиновых кислот в сыворотке крови

В норме содержание общих НК в сыворотке крови взрослого человека составляет 80–100 мкг/мл. Увеличение концентрации НК в сыворотке крови свидетельствует об усилении процессов катаболизма в клетках органов и тканей.

Опыт 3. Количественное определение РНК колориметрическим методом

Метод основан на цветной реакции орцинового реактива с пентозой, входящей в состав РНК.

ХОД РАБОТЫ

В опытную пробирку отмеривают 1 мл раствора РНК и 1 мл орцинового реактива. В контрольную пробирку отмеривают 1 мл дистиллированной воды и 1 мл орцинового реактива. Обе пробирки помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. После охлаждения измеряют интенсивность окраски на ФЭКе (красный светофильтр) против контроля. Измерив оптическую плотность опытной пробы, по калибровочному графику находят концентрацию РНК в данной пробе.

Опыт 4. Количественное определение ДНК колориметрическим методом

Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, давать синее окрашивание с дифениламиновым реактивом.

ХОД РАБОТЫ

Готовят 2 пробирки. В опытную пробирку отмеривают 1 мл водного раствора ДНК и 2 мл дифениламинового реактива. В контрольную пробирку отмеривают 1 мл дистиллированной воды и 2 мл дифениламинового реактива. Обе пробы помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем пробы охлаждают и измеряют интенсивность окраски на ФЭКе против контроля (красный светофильтр).

Зная оптическую плотность опытной пробы, по калибровочному графику находят содержание в ней ДНК.

2.4.2. Тест-контроль по теме «Химия нуклеиновых кислот»

1. Мономерами нуклеиновых кислот являются:

- 1) моонуклеотиды
- 2) моонуклеозиды
- 3) нуклеозидмонофосфаты
- 4) азотистые основания
- 5) нуклеозидтрифосфаты
- 6) нуклеозиддифосфаты.

2. Нуклеозидами являются:

- 1) уридин
- 2) цитидин
- 3) дезоксицитидин
- 4) аденозин
- 5) дезоксиаденозин
- 6) тимидин.

3. В состав аденозина входят компоненты:

- 1) аденин
- 2) рибоза
- 3) дезоксирибоза
- 4) фосфорная кислота
- 5) гипоксантин
- 6) ксилоза.

4. Компонентами моонуклеотидов являются:

- 1) углевод
- 2) гетероциклическое азотистое основание
- 3) фосфорная кислота
- 4) серная кислота
- 5) эфир
- 6) амин.

5. В состав рибонуклеотидов могут входить следующие азотистые основания:

- | | | |
|-----------|-----------|------------|
| 1) аденин | 3) урацил | 5) цитозин |
| 2) гуанин | 4) тимин | 6) инозин. |

6. В состав дезоксирибонуклеотидов могут входить следующие азотистые основания:

- | | | |
|------------|-----------|----------------|
| 1) цитозин | 3) тимин | 5) гипоксантин |
| 2) гуанин | 4) урацил | 6) аденин. |
-

7. К свободным нуклеотидам относятся:

- | | | |
|--------|----------|----------|
| 1) АТФ | 3) ТТФ | 5) Ц-ГМФ |
| 2) ГТФ | 4) Ц-АМФ | 6) ЦТФ. |

8. Универсальными аккумуляторами энергии в живых организмах и субстратом для биосинтеза нуклеиновых кислот являются:

- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1) АТФ | 3) АМФ | 5) ЦТФ |
| 2) АДФ | 4) УТФ | 6) ГТФ. |

9. В клетках энергия, накопленная в виде АТФ, используется в процессах:

- 1) биосинтез белка
- 2) биосинтез нуклеиновых кислот
- 3) биосинтез жирных кислот
- 4) биосинтез углеводов
- 5) биосинтез липидов
- 6) во внутриклеточном транспорте.

10. Дезоксирибонуклеотиды, соединяясь в длинные цепи с помощью фосфатных групп, образуют:

- 1) ДНК
- 2) РНК
- 3) протеогликаны
- 4) гетерополисахариды
- 5) гомополимеры
- 6) гетерополимеры.

11. Рибонуклеотиды, соединяясь в длинные цепи с помощью фосфатных групп, образуют:

- | | | |
|--------|-------------|------------------|
| 1) РНК | 3) белки | 5) протеогликаны |
| 2) ДНК | 4) стероиды | 6) липиды. |

12. Первичная структура НК (ДНК, РНК) обусловлена:

- 1) водородными связями
- 2) пептидными связями
- 3) фосфодиэфирными связями
- 4) ковалентными связями
- 5) гидрофобными взаимодействиями
- 6) дисульфидными связями.

13. Вторичная структура ДНК представляет:

- 1) двойную альфа-спираль
 - 2) одноцепочечную альфа-спираль
-

- 3) кольцо
 - 4) суперкольцо
 - 5) двойную правозакрученную вокруг общей оси спираль, состоящую из полинуклеотидных цепей
 - 6) одноцепочечную бетта-спираль.
- 14. Важнейшие функции ДНК:**
- 1) хранение генетической информации
 - 2) передача наследственных признаков
 - 3) программирование синтеза всех клеточных белков
 - 4) участие в роли матрицы в процессе транскрипции
 - 5) участие в роли матрицы в процессе репликации
 - 6) участие в транспорте аминокислот к месту биосинтеза белков.
- 15. К матричным биосинтезам относятся:**
- 1) биосинтез ДНК (репликация и репарация)
 - 2) биосинтез РНК (транскрипция)
 - 3) биосинтез белка (трансляция)
 - 4) биосинтез АТФ
 - 5) биосинтез ГТФ
 - 6) биосинтез липидов.

Контрольные вопросы

1. Каково содержание общих нуклеиновых кислот в сыворотке крови человека?
 2. Каково клинико-диагностическое значение определения нуклеиновых кислот в сыворотке крови человека?
 3. Каков принцип методов количественного определения ДНК и РНК колориметрическим методом?
 4. Каков принцип количественного определения нуклеиновых кислот спектрофотометрическим методом?
-

Глава 3

Витамины

Витамины — вещества, поступающие в наш организм с пищей и играющие важную роль в процессах метаболизма, являясь коферментами большого числа ферментов.

Отсутствие витаминов в пище приводит к различным заболеваниям, которые называются авитаминозами. Чаще встречаются гиповитаминозы — относительная недостаточность какого-либо витамина.

3.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Реакция с диазореактивом на тиамин (витамин В₁)

В основе реакции лежит способность витамина В₁ в щелочной среде с диазореактивом (смесь солянокислого или сернокислого раствора сульфаниловой кислоты с раствором нитрита натрия) образовывать сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета.

ХОД РАБОТЫ

В пробирку приливают 1 мл раствора сульфаниловой кислоты и 1 мл раствора нитрита натрия. Образуется диазореактив (см. в «Приложениях»). Сюда же вносят небольшое количество (на кончике шпателя) порошка или 0,5 мл раствора тиамина и по стенке пробирки осторожно добавляют 1 мл 20%-го раствора бикарбоната натрия.

На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого или красного цвета.

Опыт 2. Реакция восстановления рибофлавина (витамина В₂)

Образующийся при добавлении металлического цинка к концентрированной соляной кислоте водород восстанавливает желтый рибофлавин сначала в родофлавин (промежуточное соединение) красного цвета, а затем в бесцветный лейкофлавин.

ХОД РАБОТЫ

В пробирку приливают 1 мл раствора витамина В₂, 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и опускают кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином, восстанавливая его, и жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкофлавин вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

Опыт 3. Реакция на витамин РР (антипеллагрический)

При нагревании витамина РР с раствором ацетата меди образуется плохо растворимый синий осадок медной соли витамина РР.

ХОД РАБОТЫ

В пробирку помещают 5–10 мг витамина РР и растворяют при нагревании в 1–2 мл 10%-го раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору прибавляют такой же объем 5%-го раствора ацетата меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Опыт 4. Реакция на пиридоксин (витамин В₆)

При взаимодействии пиридоксина с раствором хлорида железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексной соли типа фенолята железа.

ХОД РАБОТЫ

В пробирке смешивают 1 мл водного раствора пиридоксина и 2 капли 5%-го раствора хлорида железа (III). Смесь встряхивают. Наблюдают окрашивание жидкости в красный цвет.

Опыт 5. Количественное определение витамина С методом йодиметрического титрования

Аскорбиновая кислота является сильным восстановителем и может быть определена йодиметрически при определенном значении рН раствора (например рН = 7). При титровании йодом аскорбиновая кислота окисляется, образуя дегидроаскорбиновую кислоту.

Подготовка экстракта из пищевых продуктов для определения витамина С.

2 г капусты или картофеля натереть на терке в чашке Петри или мелко порезать и растереть в ступке с небольшим количеством толченого стекла или песка. Затем, если измельчали на терке, собрать массу из чашки Петри в стаканчик, если в ступке — прямо в ступку добавить 10 смл 2%-го раствора НСl. Хорошо перемешанную массу отфильтровать через стеклянную воронку с ватой в коническую колбу на 50-100 мл. Массу на фильтре промыть несколькими каплями воды. В фильтрат прилить 1 мл 0,5%-го раствора крахмала и титровать рабочим раствором 0,003 н. I_2 до появления синего окрашивания.

При расчете содержания витамина С в продукте использовать формулу определения массы при помощи титра по определяемому веществу:

$$M = \frac{n \cdot \mathcal{E}}{1000} \cdot V(r), \text{ где}$$

н. — молярная концентрация эквивалента йода;

Э — молярная масса эквивалента аскорбиновой кислоты в г, равная в данном случае 88 г;

V — объем использованного на титрование йода, в мл.

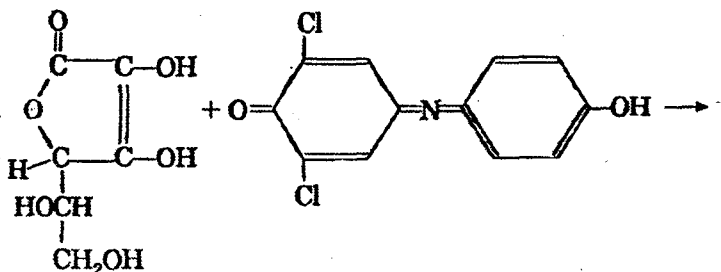
Для пересчета на содержание витамина С в 100 г продукта использовать формулу:

$$X = \frac{M \times 1000}{2} (r) .$$

Полученный результат сравнить с нормой: содержание витамина С в капусте 45 мг%, в картофеле — 20 мг%.

Опыт 6. Количественное определение аскорбиновой кислоты (витамина С) в шиповнике с 2,6-дихлорфенолиндофенолом

Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол:



L-аскорбиновая кислота

2,6-дихлорфенолиндофенол

Восстановленная форма
2,6-дихлорфенолиндофенола

дегидроаскорбиновая кислота

2,6-дихлорфенолиндофенол в щелочной среде имеет синюю окраску, в кислой — красную, а при восстановлении обесцвечивается.

ХОД РАБОТЫ

Отвешивают на весах 1 г сухого шиповника, измельчают его пестиком в фарфоровой ступке с 2 мл дистиллированной воды и 0,1 г стеклянного песка, количественно переносят в мерную колбу на 25 мл, постепенно приливая дистиллированную воду до метки.

Полученную смесь оставляют на 10 мин. Вытяжку фильтруют через бумажный фильтр.

Для титрования берут по 2 мл фильтрата, добавляют 2–3 капли 10%-го раствора соляной кислоты и 2–3 мл дистиллированной воды (титрование проводят в конических колбочках). Содержимое колбочек титруют 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с.

Расчет. Количество миллилитров 2,6-дихлорфенолиндофенола, затраченное на титрование исследуемого раствора, эквивалентно содержанию витамина С в титруемой жидкости: если на титрование пошло А мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, то в исследуемом растворе содержится такое же количество миллилитров аскорбиновой кислоты той же нормальности. Эквивалент аскорбиновой кислоты равен $176 : 2 = 88$. В 1 мл 0,001 н. раствора содержится 0,088 мг. Расчет производится по формуле

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot 25 \cdot 100}{2 \cdot 1} = \text{мг\%},$$

где x — содержание аскорбиновой кислоты в мг%,
А — количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола в мл, пошедшее на титрование; 1 — количество вещества в г, взятое для анализа, 2 — количество мл вытяжки, взятое для титрования; 25 — общее количество вытяжки (шиповника, хвои, картофеля); 100 — количество г шиповника, взятое для вычисления процентного содержания.

Сделать вывод о количественном содержании витамина С в сухом шиповнике и провести сравнительный анализ с количественным содержанием этого витамина в картофеле и капусте.

3.2. Тест-контроль по теме «Витамины»

1. Дайте общую характеристику витаминов:

- 1) образуются чаще всего в организме
 - 2) поступают с пищей извне
 - 3) являются коферментами ферментов
 - 4) регулируют обмен веществ через ферменты
 - 5) активируют гормоны
 - 6) ингибируют гормоны.
-

2. Укажите водорастворимые витамины:

- | | | |
|------|-------------------|-------|
| 1) А | 3) B ₁ | 5) РР |
| 2) Д | 4) B ₆ | 6) С. |

3. Укажите витамины, растворимые в жирах:

- | | | |
|------|------|-------|
| 1) А | 3) С | 5) К |
| 2) Е | 4) Д | 6) F. |

**4. По химической природе витамин А (антиксероф-
thalmический) представляет собой:**

- 1) производное холестерина
- 2) β -иононовое кольцо и 2 остатка изопрена
- 3) ретиналь
- 4) производное белков
- 5) производное циклопентанпергидрофенантрена
- 6) пиримидин.

5. Биологическая роль витамина А:

- 1) входит в состав родопсина
- 2) участвует в окислительно-восстановительных реакциях
- 3) участвует в процессе зрения
- 4) повышает проницаемость мембран клеток
- 5) влияет на рост и дифференцировку клеток и тканей
- 6) усиливает биосинтез гликопротеинов мембран клеток.

**6. По химической природе витамин D₃ (антирахити-
ческий) представляет собой:**

- 1) изопрен
- 2) β -иононовое кольцо
- 3) производное холестерина
- 4) производное циклопентанпергидрофенантрена
- 5) пуриновое производное
- 6) пиримидиновое производное.

7. Биологическая роль витамина D₃:

- 1) участвует в биосинтезе кальцийсвязывающего белка в слизистой тонкого кишечника
 - 2) регулирует обмен кальция и фосфора
 - 3) способствует всасыванию ионов кальция из пищи в тонком кишечнике
-

- 4) участвует в процессе зрения
- 5) является предшественником кальцитриола
- 6) участвует в биосинтезе холестерина.

8. По химической природе витамин Е (антистерильный) представляет собой:

- | | |
|---------------|-----------------|
| 1) ретинол | 4) кальциферолы |
| 2) токоферолы | 5) фолликулин |
| 3) рибофлавин | 6) холин. |

9. Биологическая роль витамина Е в организме:

- 1) антиоксидант
- 2) защита от перекисного окисления липидов мембран
- 3) предотвращает гемолиз эритроцитов
- 4) влияние на обмен селена в организме.

10. Витамин К (антигеморрагический) по химической природе представляет собой:

- 1) холекальциферол
- 2) токоферол
- 3) 7-дегидрохолестерин
- 4) рибофлавин
- 5) нафтохинон.

11. Биологическая роль витамина К:

- 1) кофермент γ -глутамилкарбоксилазы
- 2) участвует в биосинтезе протромбина
- 3) участвует в биосинтезе фактора Кристмаса
- 4) участвует в биосинтезе фактора Стюарта-Проуэра
- 5) участвует в биосинтезе фактора проконвертина
- 6) участвует в свертывании крови.

12. По химической природе витамин F представляет собой:

- | | |
|----------------------|---------------|
| 1) ретинол | 4) кобаламин |
| 2) токоферол | 5) нафтохинон |
| 3) эссенциальные ВЖК | 6) убихинон. |

13. В чем проявляются биологические изменения при гипо- и авитаминозах F:

- 1) повышении биосинтеза простагландинов
 - 2) повышении биосинтеза тромбоксанов
-

- 3) снижении биосинтеза эфиров холестерина
- 4) повышении биосинтеза холестерина
- 5) снижении биосинтеза простагландинов
- 6) снижении биосинтеза тромбоксанов.

14. По химической природе витамин B_1 (антиневритный) представляет собой:

- | | |
|---------------|---------------|
| 1) кобаламин | 4) тиазол |
| 2) рибофлавин | 5) пиридоксин |
| 3) тиамин | 6) инозит. |

15. Биохимические изменения при гипо- и авитаминозе B_1 :

- 1) нарушение обмена углеводов
- 2) нарушение ЦТК
- 3) нарушение ЦПЭ
- 4) нарушение ПФП
- 5) отрицательный азотистый баланс
- 6) накопление в крови пентозосахаров.

16. По химической природе витамин B_2 (витамин роста) представляет собой:

- | | |
|---------------|-------------------|
| 1) биотин | 4) кобаламин |
| 2) тиамин | 5) никотинамид |
| 3) рибофлавин | 6) рибонуклеотид. |

17. Биохимические нарушения при гипо- и авитаминозах B_2

- 1) нарушение ЦТК
- 2) нарушение ЦПЭ
- 3) нарушение микросомального окисления
- 4) нарушение β -окисления ВЖК
- 5) нарушение обмена нуклеиновых кислот
- 6) нарушение обмена биогенных аминов.

18. По химической природе витамин B_6 (антидерматитный) представляет собой:

- | | |
|---------------|----------------|
| 1) биотин | 4) никотинамид |
| 2) рибофлавин | 5) кобаламин |
| 3) пиридоксин | 6) тиамин. |

19. Биохимические изменения при гипо- и авитаминозах B_6 :

- 1) нарушение биосинтеза заменимых аминокислот
 - 2) нарушение биосинтеза гема
-

- 3) нарушение биосинтеза сфингомиелина
- 4) нарушение биосинтеза НАД⁺ и НАДФ⁺
- 5) нарушение образования ГАМК
- 6) нарушение обезвреживания биогенных аминов.

20. По химической природе витамин РР (антипеллагрический) представляет:

- | | |
|----------------|---------------|
| 1) никотинамид | 4) биотин |
| 2) рибофлавин | 5) пиридоксин |
| 3) флавин | 6) ретиналь. |

21. Биохимические изменения при гипо- и авитаминозе РР:

- 1) нарушение β -окисления ВЖК
- 2) нарушение прямого окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты
- 3) нарушение пентозофосфатного пути окисления глюкозы
- 4) нарушение ЦТК
- 5) нарушение декарбоксилирования аминокислот
- 6) нарушение переаминирования аминокислот.

22. По химической природе витамин В₁₂ (антианемический) представляет собой:

- | | |
|----------------|---------------|
| 1) кальциферол | 4) биотин |
| 2) тиамин | 5) пиридоксин |
| 3) кобаламин | 6) тиазол. |

23. Нарушения в организме человека при гипо- и авитаминозе В₁₂:

- 1) нарушение кроветворения
- 2) нарушение зрения
- 3) пернициозная злокачественная анемия
- 4) нарушение катаболизма нечетных ВЖК и разветвленных аминокислот
- 5) накопление в мозгу нечетных ВЖК
- 6) нарушение психики вследствие отравления мозга.

24. По химической природе витамин С (антискорбутный) представляет собой:

- 1) глюконовую кислоту
 - 2) арахидоновую кислоту
-

- 3) аскорбиновую кислоту
- 4) липоевую кислоту
- 5) мевалоновую кислоту
- 6) гуанидинуксусную кислоту.

25. Нарушения в организме при гипо- и авитаминозах С:

- 1) нарушение биосинтеза коллагена
- 2) нарушение биосинтеза стероидных гормонов
- 3) нарушение биосинтеза норадреналина
- 4) нарушение биосинтеза карнитина
- 5) нарушение биосинтеза липидов
- 6) нарушение биосинтеза гема.

Контрольные вопросы

1. Каков химизм реакции обнаружения витамина B_1 ?
 2. На чем основана реакция обнаружения витамина B_2 ?
 3. На чем основана реакция обнаружения витамина РР?
 4. На чем основана реакция обнаружения витамина B_6 ?
 5. Принципы методов количественного обнаружения витамина С в пищевых продуктах.
 6. Укажите пищевые вещества, содержащие наибольшее количество витаминов А, Д, Е, F, B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , РР и С.
-

Глава 4

Ферменты

Ферменты — это специфические органические катализаторы, синтезируемые живыми клетками. Как правило все ферменты представляют собой белки с различными молекулярными массами.

В последние годы все большее диагностическое значение приобретает анализ ферментов в сыворотке крови, и медицинскому технику постоянно приходится иметь дело с различными контрольными материалами, содержащими ферменты. Ферментативные методы практически вытеснили химические методы анализа таких метаболитов, как глюкоза, холестерин, мочевины и др. Они отличаются высокой специфичностью, а реакции, используемые в анализах, протекают при температуре не выше 37 °C в водной среде.

Поразительная специфичность ферментов привела к созданию теории «ключа и замка», согласно которой для протекания реакции необходимо точное структурное соответствие между субстратом и активным центром фермента. Показано, что при взаимодействии с субстратом фермент «укладывается» вокруг субстрата, обеспечивая более точное соответствие подгоняемых структур.

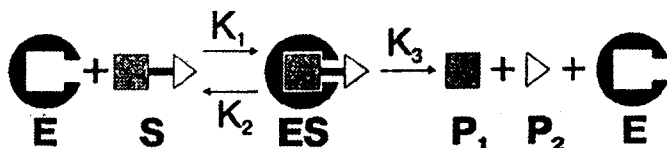


Схема ферментативной реакции

E — фермент;

S — субстрат;

ES — комплекс «фермент-субстрат»;

P₁, P₂ — продукты реакции;

K₁, K₂, K₃ — константы равновесия.

Для того чтобы количественно определить каталитическую концентрацию фермента, измеряют скорость катализируемой им реакции.

Скорость реакции — это скорость, с которой изменяется во времени концентрация субстрата (под действием фермента она уменьшается), или скорость, с которой увеличивается концентрация продукта реакции. Для того, чтобы измерить скорость ферментативной реакции, необходимо прежде всего «запустить» эту реакцию в определенное время, быстро смешав реагенты, а затем, при строго фиксированных условиях температуры и pH, измерять концентрацию продукта реакции или субстрата через определенные промежутки времени. По данным измерения строят кинетическую кривую.

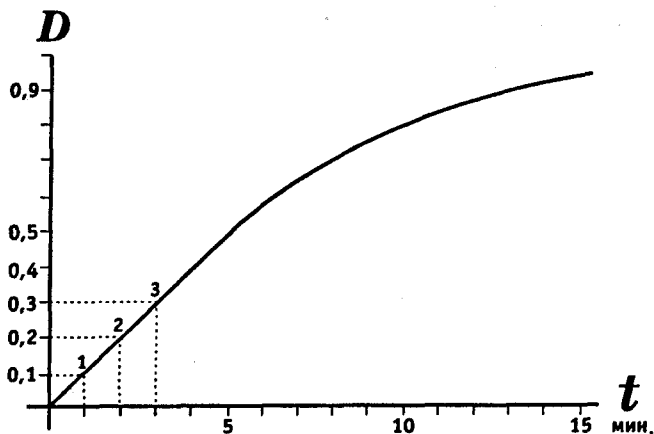
Кинетическая кривая — строится по данным измерения нескольких точек. Она отражает изменение концентрации продукта (или субстрата) во время реакции.

Единица активности в системе СИ (катал) — соответствует количеству фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата в 1 секунду.

Соотношение между единицами активности:

1 Е = 16,67 нанокатал;

1 катал = 6×10^7 Е.



Общий вид кинетической кривой

t — время в минутах;

D — оптическая плотность при определенной длине волны (340 нм, 520 нм и т. д.).

4.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Количественное определение активности α -амилазы в сыворотке крови унифицированным методом по Караеву

α -амилаза (1,4- α -D-глюкан-4-глюканогидролаза; К.Ф. 3.2.1.1) — фермент, осуществляющий гидролитическое расщепление α -1,4-глюкозидных связей крахмала и гликогена до декстринов и мальтозы:

Крахмал $\rightarrow$ амилодекстрины $\rightarrow$ эритродекстрины $\rightarrow$ охродекстрины $\rightarrow$ мальтотетрозы $\rightarrow$ мальтотриозы $\rightarrow$ мальтоза

Сыворотка крови человека содержит α -амилазу двух изомерных типов: панкреатическую (Р-тип), вырабатываемую поджелудочной железой, и слюнную (S-тип), продуцируемую слюнными железами. Амилолитической активностью обладают также клетки кишечника, печени, почек, легких. Молекулярная масса α -амилазы относительно низкая (примерно 48000 Да), поэтому в отличие от других ферментов она фильтруется в клубочках почек и содержится в моче.

Оптимум pH для действия фермента находится в интервале 6,5–7,5. Активность фермента значительно возрастает в присутствии ионов хлора. В структуру молекулы α -амилазы входит ион кальция, который не только ее активизирует, но и предохраняет от потери активности и гидролиза при действии протеолитических ферментов.

Активность фермента ингибируется фторидами, цитратом, оксалатом и ЭДТА, связывающими ионы кальция.

Принцип. α -амилаза гидролизует расщепление крахмала с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Об активности α -амилазы судят по уменьшению интенсивности окраски, измеряемой на ФЭКе или спектрофотометре.

Необходимые реактивы:

1. Бензойная кислота.
2. Гидрофосфат натрия (Na_2HPO_4).
3. Крахмал растворимый для нефелометрии или по Lintner (выпускается специально для использования в качестве субстрата).
4. 154 мМ (0,9%) раствор хлорида натрия: 9 г NaCl растворяют в небольшом количестве дистиллирован-

ной воды в мерной колбе емкостью 1 л, затем доводят объем дистиллированной водой до метки. 5. Субстратно-буферный раствор, рН 7,0: 13,3 г гидрофосфата натрия и 2 г бензойной кислоты растворяют в 250 мл 154 мМ раствора хлорида натрия и доводят до кипения. Суспензируют 0,2 г растворимого крахмала (для нефелометрии или по Lintner) в небольшом количестве холодной дистиллированной воды и вводят в кипящий буферный раствор. Кипятят 1 мин, охлаждают и доводят объем дистиллированной водой до 500 мл. Субстратно-буферный раствор должен быть прозрачным, он стабилен при комнатной температуре в течение 10–12 дней. 6. Йодид калия (KI). 7. Йодат калия (KIO_3). 8. Фторид калия (KF). 9. Концентрированная соляная кислота (HCl). 10. 0,01 н. раствор йода: 0,036 г йодата калия и 0,45 г йодида калия растворяют в 40 мл дистиллированной воды и медленно при помешивании добавляют 0,09 мл концентрированной соляной кислоты. 5 г фторида калия растворяют в 50 мл дистиллированной воды, фильтруют в мерную колбу, приливают 40 мл раствора йода и доливают дистиллированной водой до объема 100 мл. Хранят в посуде из темного стекла. Годен в течение месяца. Если в рабочий раствор йода не добавляют фторид калия, то его следует готовить ежедневно из 0,1 н. раствора йода.

Ход определения

5 мл субстратно-буферного раствора помещают в пробирку, нагревают 5 мин при 37 °С, добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки крови. Инкубируют 7,5 мин при 37 °С. Время инкубации необходимо точно отсчитывать по секундомеру с момента добавления сыворотки крови в крахмальный субстрат. Тотчас же после инкубации добавляют 5 мл 0,01 н. раствора йода и доводят объем дистиллированной водой до 50 мл. Фотометрируют в кювете толщиной в 10 мм при длине волны 630–690 нм (красный светофильтр) против дистиллированной воды.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку крови добавляют после инкубации с 0,01 н. раствором йода. Фотометрируют при тех же условиях, что и опытную пробу, против дистиллированной воды.

Расчет

Активность α -амилазы выражают в миллиграммах или граммах крахмала, гидролизованного 1 л биологической

жидкости за 1 с инкубации при 37 °С. Расчет производят по формуле:

$$A = \frac{E_k - E_0}{E_k} \cdot \frac{0,2 \cdot 10^5}{7,5 \cdot 60} = \frac{E_k - E_0}{E_k} \cdot 44,4, \text{ где}$$

A — активность α -амилазы, мг/(с · л);

E_k — экстинкция контрольной пробы;

E_0 — экстинкция опытной пробы;

0,2 — количество крахмала, введенного в опытную и контрольную пробы, мг;

10^5 — коэффициент пересчета на 1 л сыворотки крови;

7,5·60 — коэффициент пересчета на 1 с инкубации.

Нормальные величины. Сыворотка крови: 0,58 – 1,97 мккат/л или 3,3–8,9 мг/(с · л). Моча: до 44 мг/(с · л). Дуоденальное содержимое: 1,7–4,4 г/(с · л).

Клинико-диагностическое значение α -амилазы плазмы или сыворотки крови

Причины повышения активности α -амилазы плазмы или сыворотки крови

Превышение верхнего предела нормы более чем в 10 раз:

- 1) Острый панкреатит

Превышение верхнего предела нормы в 5–10 раз:

- 1) Прободная дуоденальная язва
- 2) Непроходимость кишечника
- 3) Другие состояния «острого живота»
- 4) Острая почечная недостаточность с олигурией
- 5) Диабетический кетоацидоз

Превышение верхнего предела нормы менее чем в 5 раз:

- 1) Поражения слюнных желез, например, камни и воспаление (включая эпидемический паротит)
- 2) Хроническая почечная недостаточность
- 3) Макроамилаземия
- 4) Введение морфина (спазм сфинктера Одди).

Опыт 2. Определение каталитической активности аланинаминотрансферазы (АлАТ или АЛТ) в сыворотке крови

Аланин-аминотрансфераза (L-аланин: 2-оксоглутарата-минотрансфераза, К. Ф. 2.6.1.2) катализирует реакцию между L-аланином и 2-оксоглутаратом, в результате ко-

торой они превращаются в L-глутамат и пировиноградную кислоту. Определение основано на измерении оптической плотности гидразонов пировиноградной кислоты в щелочной среде. Гидразон пировиноградной кислоты обладает высокой оптической плотностью.



ХОД РАБОТЫ

Отмерить, мл	Проба	Контрольный раствор
Субстрат АлАТ: смесь ДЛ-α-аланина 0,2 моль/л; 2-оксoglутарат – 2 ммоль/л; фосфатного буфера pH = 7,5 0,1 моль/л	0,25	0,25
Физиологический раствор	–	0,05
Предварительно инкубируют в течение 3 мин. при 37 °С		
Сыворотка крови	0,05	–
Инкубирует точно 60 мин. при 37 °С		
2,4-динитрофенилгидразин, раствор 1 ммоль/л в HCl 1 моль/л	0,25	0,25
Перемешивают и оставляют стоять 20 мин. при комнатной температуре		
Раствор гидроокиси натрия, 0,4 моль/л	2,50	2,50
Перемешивают и спустя 10 мин измеряют оптическую плотность пробы против контрольного раствора при длине волны 500–530 нм, светофильтр № 6 в кюветах 1 см		

РАСЧЕТ

По оптической плотности пробы на соответствующем калибровочном графике находят активность АЛАТ в сыворотке крови.

При активности ферментов свыше 0,56 мккат/л анализ следует повторить с сывороткой, разведенной физиологическим раствором (результат $\times$ разведение).

Повышенное содержание кетовеществ (в сыворотках диабетиков) вызывает завышение активности фермента АЛАТ. В таких случаях необходимо вычесть из оптической плотности пробы оптическую плотность сывороточного контрольного раствора. Сывороточный контрольный раствор приготавливают точно так же, как пробу, с той лишь разницей, что сыворотку добавляют в пробирку после раствора 2,4-динитрофенилгидразина.

Гемолиз повышает активность фермента АЛАТ. Занижение результатов вызывают синтетические моющие средства.

Нормальная величина активности АЛАТ 0,12–0,14 мккат/л, предельная величина — 0,88 мккат/л.

Построение калибровочного графика описано в работе по определению каталитической активности АсАТ в опыте № 3 (следующий опыт), но в качестве субстрата берется субстрат АЛАТ.

Клинико-диагностическое значение определения активности АЛАТ: при поражениях печени, особенно гепатиты, уже в продромальной стадии начинается повышение активности АЛАТ; особенно высокие показатели — при остром гепатите. Коэффициент Де Ритиса — АсАТ/АЛАТ — ниже 1,0. При тяжелом поражении печени (некротических процессах в гепатоцитах) соотношение ферментов трансаминаз меняется.

Опыт 3. Определение каталитической активности аспартатаминотрансферазы (АсАТ или АСТ) в сыворотке крови

Аспартатаминотрансфераза (L-аспартат: 2-оксоглутаратаминотрансфераза, К. Ф. 2.6.1.1.) катализирует реакцию между L-аспартатом и 2-оксоглутаратом, в результате которой они превращаются в L-глутамат и оксалоацетат. Определение основано на измерении оптической плотности гидразонов 2-оксоглутаровой и пировиноградной

При активности ферментов свыше 0,78 мккат/л анализ следует повторить с сывороткой, разведенной физиологическим раствором (результат $\times$ разведение). Повышенное содержание кетовеществ (в сыворотках диабетиков) вызывает завышение активности фермента АсАТ. В таких случаях необходимо вычесть из оптической плотности пробы оптическую плотность сывороточного контрольного раствора. Сывороточный контрольный раствор приготавливают точно так же, как пробу, с той лишь разницей, что сыворотку добавляют в пробирку после раствора 2,4-динитрофенилгидразина.

Гемолиз повышает активность фермента АсАТ. Занижение результатов вызывают синтетические моющие средства.

Нормальная величина активности АсАТ 0,18–0,60 мккат/л, предельная величина — 0,78 мккат/л.

КАЛИБРОВКА

В обозначенные пробирки вносят пипеткой отдельные растворы в следующем порядке (таблица). После добавления 2,4-динитрофенилгидразина содержимое пробирок перемешивают и спустя 20 мин добавляют раствор гидроксида натрия. Через 10 мин измеряют оптическую плотность растворов № 2–5 против раствора № 1. Строят калибровочный график зависимости оптической плотности от активности фермента АсАТ.

Раствор №	Физиологический раствор, мл	Субстрат АсАТ, мл	Эталонный раствор, мл	Раствор 2,4-динитрофенилгидразина, мл	Раствор гидроксида натрия, мл	Конечная активность, мккат/л
1	0,10	0,50	-	0,50	5,00	0
2	0,10	0,45	0,05	0,50	5,00	0,28
3	0,10	0,40	0,10	0,50	5,00	0,56
4	0,10	0,35	0,15	0,50	5,00	0,83
5	0,10	0,30	0,20	0,50	5,00	1,11

Клинико-диагностическое значение определения активности АсАТ в сыворотке крови: при дифференциаль-

ной диагностике инфаркта миокарда и стенокардии большое значение имеет этот тест, так как при инфаркте миокарда через 4-6 часов повышается АсАТ и снижается лишь на 5-7-й день заболевания.

Превышение верхнего предела нормы более чем в 10 раз:

Острый гепатит и некроз печени

Тяжелый синдром сдавления

Тяжелая гипоксия тканей

(значения активности иногда могут превышать верхний предел нормы более чем в 100 раз)

Превышение верхнего предела нормы в 5-10 раз:

Инфаркт миокарда

После хирургического вмешательства или травмы

Заболевание скелетных мышц

Холестаз

Хронический гепатит

Превышение верхнего предела нормы менее чем в 5 раз:

Физиологическое (у новорожденных)

Другие болезни печени

Панкреатит

Гемолиз (in vivo и in vitro)

Примечание. Аланин-трансаминаза плазмы повышается примерно в той же степени при заболеваниях печени, но в меньшей степени (или остается в пределах нормы) при других патологических состояниях.

Опыт 4. Унифицированный метод определения

каталитической активности

γ -глутамилтрансферазы

(γ -глутамилтранспептидазы, γ -ГТФ или ГПТ)

в сыворотке крови

γ -глутамилтрансфераза [(γ -глутамил)-пептид: аминокислота 5-глутамилтрансфераза, γ -глутамилтранспептидаза; К.Ф. 2.3.2.2.] открыта в 1950 г. Фермент катализирует реакцию переноса γ -глутамилового остатка глутаминовой кислоты на акцепторный пептид или на L-аминокислоту. γ -глутамилтрансфераза (γ -ГТФ) содержится почти во всех органах человека, наибольшая удельная активность определяется в ткани почек.

Принцип. γ -ГТФ катализирует реакцию переноса L- γ -глутамилового остатка с L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нит-

роанилида на глицил-глицин. Количество освобожденно-го в ходе реакции 4-нитроанилина служит мерой активности γ -глутамилтрансферазы.

Необходимые реактивы:

1. 0,55 М раствор глицил-глицина, pH 8,3:

3,63 г глицил-глицина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем до метки дистиллированной водой и растворяют (буферный раствор).

2. Субстратно-буферный раствор: в пробирку наливают 10 мл дистиллированной воды, добавляют 28 мг L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида и 82 мг хлорида натрия и, не прекращая перемешивание, растворяют содержимое пробирки на кипящей водяной бане в течение 60 с. Затем раствор охлаждают до 37 °С и добавляют 2,5 мл буферного раствора. Приготовленный раствор субстрата во время работы хранят в водяной бане при 37 °С. Неиспользованный субстрат можно хранить в холодильнике в течение недели. Субстрат плохо растворим, при комнатной температуре выпадает в осадок, поэтому перед употреблением кристаллы растворяют нагреванием в кипящей водяной бане. Нагревание и растворение субстрата допустимо повторять не более двух раз.

3. 10%-ный раствор уксусной кислоты: 10 мл ледяной уксусной кислоты (квалификации х.ч. или ч.д.а.) доводят дистиллированной водой до 100 мл.

4. Основной калибровочный раствор 4-нитроанилина: 82,9 мг 4-нитроанилина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и растворяют.

Для определения активности γ -ГТФ можно использовать наборы реактивов, производимых различными фирмами.

Ход определения

В пробирку вносят 0,5 мл раствора субстрата и помещают в водяную баню при температуре 37 °С, приливают 0,05 мл исследуемой сыворотки крови. Содержимое перемешивают и инкубируют точно 15 мин при 37 °С. Затем прибавляют 3 мл раствора уксусной кислоты и перемешивают. Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации. Фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 410 нм или на ФЭКе при длине волны 400–500 нм (фиолетовый

или синий светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 10 мм против контрольной пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов.

Расчет активности производят по калибровочному графику или по формуле:

$$A_{\text{оп}} = \frac{E_{\text{оп}} \cdot A_{\text{ст}}}{E_{\text{ст}}},$$

где

$A_{\text{оп}}$ — активность фермента в пробе, нмоль/(с • л);

$A_{\text{ст}}$ — активность фермента в стандартном растворе, нмоль/(с • л);

$E_{\text{оп}}$ — экстинкция опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ — экстинкция стандарта (калибровочной пробы).

Построение калибровочного графика: из основного калибровочного раствора готовят рабочие растворы, как указано в нижеприведенной таблице.

В каждую из 6 пробирок вносят по 0,05 мл рабочих калибровочных растворов 1–6, прибавляют по 3,5 мл раствора уксусной кислоты, перемешивают и фотометрируют против раствора уксусной кислоты при тех же условиях, что и опытную пробу. По полученным значениям экстинкции строят калибровочный график. Линейность калибровочного графика сохраняется в диапазоне активностей до 5000 нмоль/(с • л).

Нормальные величины:

мужчины — 250–1767 нмоль/(с • л), или 15–106 МЕ; женщины — 167–1100 нмоль/(с • л), или 10–66 МЕ при 37 °С,

или мужчины — 0,33–1,27 мккат/л; женщины — 0,2–0,9 мккат/л

Построение калибровочного графика для определения активности γ -ГТФ

№ пробирки	Калибровочный раствор 4-нитроанидида, мл	Вода дистиллированная, мл	Активность γ -ГТФ, нмоль/(с•д)
1	0,25	375	417
2	0,50	3,50	833
3	1,00	3,00	1667
4	1,00	1,00	3334
5	1,50	0,50	5001
6	2,0	—	6668

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГГТ:

**причины повышения активности
γ-глутамилтрансферазы сыворотки крови:**

Превышение верхнего предела нормы более чем в 10 раз:

Холестаз

Алкогольное поражение печени

Превышение верхнего предела нормы в 5–10 раз:

Гепатит (острый и хронический)

Цирроз (без холестаза)

Другие заболевания печени

Панкреатит

Превышение верхнего предела нормы менее чем в 5 раз:

Злоупотребление алкоголем

Лекарства, вызывающие индукцию фермента

Застойная сердечная недостаточность.

**Опыт 5. Определение каталитической активности
креатинфосфокиназы в сыворотке крови (КФК)**

Креатинфосфокиназа (КФК) (АТФ: креатин-N-фосфотрансфераза, К.Ф.2.7.3.2) — фермент, катализирующий обратимую реакцию переноса остатка фосфорной кислоты с АТФ на гуанидиновую группу креатина с образованием АДФ и креатинфосфата:

pH 9,0

Креатин + АТФ → Креатинфосфат + АДФ

КФК, Mg^{2+}

Креатин + АТФ ← Креатинфосфат + АДФ

pH 6,7

Креатинфосфокиназа участвует в энергообеспечении клеточного метаболизма, осуществляя депонирование химической энергии в виде креатинфосфата или ресинтез АТФ для поддержания высокого соотношения АТФ/АДФ. Фермент необходим для обеспечения энергией мышечных сокращений, немышечных форм подвижности, транспорта ионов через мембраны и многих других процессов.

Креатинфосфокиназа представляет собой димер с молекулярной массой около 82 кДа, состоящий из двух субъединиц: М и В. В тканях млекопитающих присутствуют три цитоплазматических изофермента КФК: ММ — мышечный, ВВ — мозговой, МВ — гибридный (сердечный), а также один митохондриальный. Сведения об общей и изоферментной активности КФК в некоторых тканях здорового взрослого человека представлены в нижеприведенной таблице.

Активность КФК в сыворотке крови зависит от пола, возраста, мышечной массы, а также физической активности пациента.

**Общая и изоферментная активность КФК
в некоторых тканях человека**

Ткань	Общая активность клеток МЕ/г ткани	Изоферментная активность (%)		
		КФК-ММ	КФК-МВ	КФК-ВВ
Скелетные мышцы	1080–3050	96–100	0–4	0
Сердечная мышца	190–692	58–86	15–42	0–1
Головной мозг	73–200	0	0	100
Мочевой пузырь	162	0–2	0–6	92–100
Плацента	250	19	1	80
Ободочная кишка	200	0–5	0–4	95–100
Подвздошная кишка	175	0–3	0–4	95–100
Желудок	170	0–5	4	96
Диафрагма	140	96	4	0–2
Щитовидная железа	32–34	7–11	0–6	90–96
Матка	9–38	2–20	2–20	60–96
Почки	10–50	0–13	0	87–100
Легкие	13–24	0–39	0–7	58–100
Предстательная железа	8–9	4–40	3–4	56–93
Селезенка	2–7	0–74	0	26–100
Печень	3–4	72	8	20
Поджелудочная железа	3	14	1	85

Принцип метода

Креатинфосфокиназа катализирует превращение креатина в креатинфосфат. Ион фосфата, освобожденный при гидролизе креатинфосфата, определяют после депротеинирования как желтый комплекс фосфорно-ванадиево-молибденовой кислоты.



ХОД РАБОТЫ

Отмерить, мл	№ пробирки			
	1	2	3	4
Раствор субстрата: смесь 670 мг глицина, углекислого натрия, сернокислого магния и креатина	0,50	—	0,50	—
Буферный раствор: смесь глицина, углекислого натрия и сернокислого магния	—	0,50	—	0,50
Раствор сравнения: фосфат, 1,20 моль/л	—	—	0,05	—
Раствор активатора — цистеин хлорида	0,20	—	—	—
Сыворотка крови	0,05	0,05	—	—
Дистиллированная вода	—	0,20	0,20	0,25

Перемешивают и предварительно инкубируют 5 мин при температуре 37 °С. Во все пробирки отмеривают по 0,10 мл раствора АТФ, перемешивают и инкубируют точно 60 мин при температуре 37 °С. Потом во все пробирки отмеривают по 0,30 мл трихлоруксусной кислоты 0,15 моль/л, перемешивают и центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин.

В чистые пробирки отмеривают по 0,60 мл надосадочной жидкости, добавляют 0,8 мл раствора реактива, при-

готовленного смешиванием одинаковых долей раствора аммония ванадиевокислого 2 ммоль/л в хлорной кислоте 0,5 ммоль/л и раствора аммония молибденовокислого 30 ммоль/л, перемешивают и через 5 мин измеряют оптическую плотность всех растворов против воды (A_1 , A_2 , A_3 , A_4) при длине волны 390–410 нм (светофильтр № 3), в кюветах 1 см.

РАСЧЕТ

Каталитическую активность креатинфосфокиназы X мккат/л рассчитывают по формуле

$$X = 0,33 \times \frac{(A_1 - A_2)}{(A_3 - A_4)}.$$

Посуда для определения креатинфосфокиназы не должна содержать следов фосфора. Параллельно с каждой пробой следует измерять контрольный раствор (A_2). При разности оптических плотностей ($A_1 - A_2$) выше 0,4 исследование повторяют, уменьшив длительность инкубации до 10–30 мин, а результат пересчитывают на инкубацию 60 мин. Сыворотку разводить не рекомендуется.

Повторные внутримышечные инъекции могут вызвать значительное повышение активности креатинфосфокиназы в сыворотке крови.

Активность креатинфосфокиназы в норме от 0,33 до 2,86 мккат/л у женщин, от 0,5 до 3,67 мккат/л у мужчин.

Клинико-диагностическое значение

Повышение активности фермента:

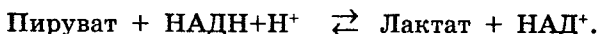
- 1) инфаркт миокарда: рост активности начинается через 4–6 ч после инфаркта, самая высокая активность отмечается через 18–30 ч, через 72 ч активность КФК_{общ.} и, как правило, нормализуется. Длительное сохранение повышенных значений КФК_{общ.} — плохой прогностический признак. Специфическим тестом при инфаркте миокарда является определение активности КФК-МВ, причем проводить исследование необходимо в первые часы появления симптомов.
 - 2) миодистрофии, выраженные изменения при миодистрофии Дюшенна (КФК-ММ);
-

- 3) внутримышечные инъекции тетрациклина, некоторых пенициллинов, хлорпромазина, диазепама, др. антибиотиков, седативных средств (КФК-ММ);
- 4) полимиозит (КФК-ММ);
- 5) травма мышц (краш-синдром) (КФК-ММ);
- 6) отравление стрихнином, окисью углерода (КФК общ.);
- 7) период после операционного вмешательства (КФК общ.);
- 8) травма головы (КФК-ВВ);
- 9) гипофункция щитовидной железы (КФК-ВВ);
- 10) острая лучевая болезнь (КФК общ.);
- 11) тяжелая физическая нагрузка (КФК-ММ).

Опыт 6. Определение каталитической активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови (ЛДГ)

Лактатдегидрогеназа, ЛДГ (L-лактат: НАД-оксидоредуктаза; К.Ф. 1.1.1.27) — цитоплазматический цинксо-держащий гликолитический фермент, обратимо катали-зирующий восстановление пировиноградной кислоты в молочную кислоту:

ЛДГ



Фермент широко распространен в организме человека. По степени убыли активности ЛДГ органы и ткани можно расположить в следующей последовательности: почки, сердце, скелетные мышцы, поджелудочная железа, селезенка, печень, легкие, сыворотка крови.

ЛДГ содержится в значительном количестве в эритроцитах, поэтому исследуемая сыворотка крови не должна содержать следов гемолиза.

ЛДГ имеет 5 изоферментов, представляющих различные комбинации из четырех субъединиц двух основных типов — Н (от англ. *heart* — сердце) и М (от англ. *muscle* — мышца).

Изоферментный спектр и тип обмена веществ в ткани коррелируют между собой: в тканях с преимущественно аэробным обменом веществ (мозг, сердце, почки и т.д.) наибольшей активностью обладают ЛДГ₁ и ЛДГ₂; в тканях с выраженным анаэробным обменом веществ (печень, скелетная мускулатура и др.) преобладают ЛДГ₄ и ЛДГ₅. Это распределение имеет большой биологический смысл. Изофермент ЛДГ₁ активен при низкой концентрации пи-

рувата и ингибируется его избытком, в то время как ЛДГ₅ сохраняет активность при сравнительно высоких концентрациях пирувата, следовательно, в тканях с аэробным гликолизом, аэробным характером окисления преобладает ЛДГ₁ (сердце), в тканях с анаэробным характером окисления веществ — ЛДГ₄ и ЛДГ₅ (скелетные мышцы).

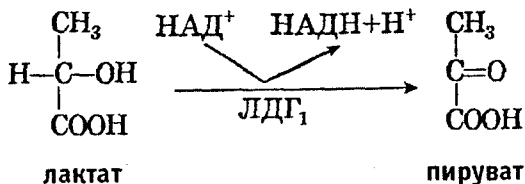
Однако в некоторых тканях нет зависимости между типом обмена и изоферментным спектром. Так, в эритроцитах, тромбоцитах, хрусталике глаза, где преобладает анаэробный обмен, фермент представлен в основном изоформами ЛДГ₁ и ЛДГ₂.

По степени подвижности при электрофорезе изоферменты ЛДГ располагаются в следующем порядке: ЛДГ₁ ближе к аноду, а вслед за ней — ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄ и ЛДГ₅.

Молекулярная масса каждой изоформы ЛДГ составляет 135000 Да (по другим данным — 140000 Да), а каждой субъединицы — 34000 Да. (по другим данным — 33500 Да).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ₁) катализирует превращение лактата в пируват при одновременном восстановлении НАД⁺ в НАДН⁺ + Н⁺, который далее восстанавливает в присутствии N-метилфеназонитметилсульфата йоднитротетразолиевый фиолетовый в красный формазан. Одновременно с определением общей каталитической активности лактатдегидрогеназы можно определить и долю фермента, устойчивого к действию мочевины, что характерно главным образом для изофермента сердечной фракции:



ХОД РАБОТЫ

Отмерить, мл	Пробирки				
	1	2	3	4	5
Буферный раствор ТРИС 1 моль/л, детергент и стабилизатор	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Субстрат I: литий лактат 0,2 моль/л	0,50	—	—	0,5	—
Субстрат II: литий лактат 0,2 моль/л; мочевины 3 моль/л	—	0,50	—	—	—
Раствор сравнения: Na ЭДТА 5,4 ммоль/л; калия оксалат 11 ммоль/л	—	—	0,50	—	0,50
Сыворотка крови	0,05	0,05	0,05	—	—
Эталонный раствор	—	—	—	0,05	0,05
Перемешивают и предварительно инкубируют 10 мин. при 37 °С					
Раствор II: смесь НАД и цветного компонента, представляющего собой смесь йодтротетразолиевого фиолетового с N-метил-феназонитметилсульфатом	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Перемешивают и инкубируют точно 10 мин. при 37 °С					
Раствор HCl 0,1 моль/л	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Перемешивают и измеряют оптическую плотность растворов во всех пяти пробирках против дистиллированной воды (A_1, A_2, A_3, A_4, A_5) при длине волны 500–530 нм (светофильтр № 6) в кюветах 1 см					

РАСЧЕТ

Общую каталитическую активность лактатдегидрогеназы X, мккат/л, рассчитывают по формуле

$$X = a \times \frac{A_1 - A_3}{A_4 - A_5}, \text{ где}$$

a — активность эталона, приведенная на этикетке флакона с эталоном.

Долю устойчивого к действию мочевины фермента Y, %, рассчитывают по формуле

$$Y = 100 \times \frac{A_2 - A_3}{A_1 - A_3}.$$

Если разность между оптическими плотностями пробы и контрольного раствора ($A_1 - A_2$) превышает 0,6, анализ повторяют с сывороткой, разведенной физиологическим раствором (результат $\times$ разведение).

Референтные величины: каталитическая активность лактатдегидрогеназы — 1,50–4,67 мкат/л; доля фермента, устойчивая к действию мочевины — 60–80%.

Опыт 7. Унифицированный метод определения общей активности ЛДГ по оптимизированному оптическому тесту

Принцип. В методе использовано различие в спектрах поглощения окисленной и восстановленной форм никотинамидадениндинуклеотида (НАД) при длине волны 340 нм.

РЕАКТИВЫ

1. 0,1 М раствор пирогосфата натрия ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), рН 8,8 (пирогосфатный буфер): 22,3 г кристаллогидрата пирогосфата натрия ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 100 мл дистиллированной воды, устанавливают рН 8,8 с помощью 0,1 М раствора соляной кислоты и доводят объем дистиллированной водой до 500 мл. Реактив стабилен в течение 1 мес. при хранении в холодильнике.

2. 0,16 М раствор лактата лития: 15,4 мг лактата лития растворяют в 1 мл дистиллированной воды.

3. 0,05 М раствор НАД, рН 7,5: 33 мг НАД растворяют в 1 мл дистиллированной воды.

Растворы лактата лития и НАД готовят непосредственно перед использованием.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Устанавливают на спектрофотометре длину волны 340 нм. В спектрофотометрической кювете с длиной оптического пути 10 мм смешивают 1,5 мл пирогосфатного буфера, 1,0 мл раствора лактата лития, 0,3 мл раствора НАД. Добавляют 0,2 мл исследуемой сыворотки крови, перемешивают стеклянной палочкой содержимое кюветы, рукояткой «щель» устанавливают стрелку микроамперметра на «О» и засекают время. Ровно через 3 мин отмечают величину оптической плотности. До начала исследования необходимо прогреть все реактивы и сыворотку при температуре 30 °С.

РАСЧЕТ

Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{V_{\text{пр.}}}{\varepsilon \cdot l \cdot V_{\text{сыв.}}} \cdot \left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right], \text{ где}$$

A — активность фермента в исследуемой сыворотке крови, нмоль/(с · л);

ε — коэффициент молярной экстинкции НАД · Н при длине волны 340 нм он равен $6,22 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

l — длина оптического пути (рабочая ширина кюветы), м ($1 \cdot 10^{-2}$);

$V_{\text{пр.}}$ — конечный объем пробы, 3 мл;

$V_{\text{сыв.}}$ — объем сыворотки крови в инкубационной смеси, 0,2 мл;

$\frac{\Delta E}{\Delta t}$ — изменение экстинкции за 1 с инкубации.

Нормальные значения результатов: до 533 нмоль/(с · л) при 30 °С.

Клинико-диагностическое значение определения ЛДГ:

1) ЛДГ общая повышена при пернициозной анемии, гепатитах, опухолевых процессах, циррозах печени, инфаркте миокарда;

2) ЛДГ₁ — при инфаркте миокарда, анемиях, некрозах почек;

3) ЛДГ₅ — при поражении мышц, раковых опухолях;

4) ЛДГ₂, ЛДГ₃ и ЛДГ₄ — при разрушении тромбоцитов.

Опыт 8. Определение активности фосфатазы в сыворотке крови

Фосфатазы (фосфомоноэстеразы) — группа ферментов, которые в норме поступают в кровь из печени, костного мозга, селезенки, почек, а при заболеваниях — из предстательной железы и других органов.

В клинической практике обычно определяют суммарную активность щелочных фосфатаз (фосфомоноэстераза I — 3.1.3.1, оптимум pH 8,6–10,0) и кислых фосфатаз (фосфомоноэстераза II — 3.1.3.2, оптимум pH 3,4–6,2), объединяя эти анализы одним термином «определение ак-

тивности фосфатазы». При заболеваниях печени (механических желтухах) активность щелочной фосфатазы возрастает в 5–10 раз, особенно резко при рахите, в меньшей степени она повышается при острых гепатитах, холангитах, циррозах, при различных заболеваниях костной системы. Определение активности кислой фосфатазы в сыворотке крови имеет исключительно важное значение при диагностике заболеваний предстательной железы, особенно при раковых опухолях простаты.

1. Щелочная фосфатаза

Щелочная фосфатаза, (ЩФ) (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; К.Ф. 3.1.3.1) содержится практически во всех тканях человека. Она образуется в костной ткани (остеобластах), костном мозге, клетках печени, почек, предстательной и молочной желез. Наибольшее количество ее сосредоточено в костной ткани.

Унифицированный метод определения активности щелочной фосфатазы по гидролизу п-нитрофенилфосфата

Принцип. Субстрат, п-нитрофенилфосфат натрия, гидролизует ферментом сыворотки крови с образованием п-нитрофенола, окрашивающегося в щелочной среде в желтый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.

Необходимые реактивы

1. п-Нитрофенилфосфат натрия (динатриевая соль п-нитрофенилового эфира фосфорной кислоты).
 2. Д мМ раствор соляной кислоты.
 3. Насыщенный раствор сульфата натрия: 50 г Na_2SO_4 растворяют в 100 мл дистиллированной воды.
 4. Бутиловый спирт.
 5. Диэтиловый эфир.
 6. 0,4%-ный раствор п-нитрофенилфосфата натрия в 1 мМ растворе соляной кислоты: 0,4 г п-нитрофенилфосфата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают до метки 1 мМ раствором соляной кислоты.
 7. 0,1 М и 0,02 М растворы гидроксида натрия (NaOH), свободные от карбонатов. Емкости с растворами NaOH закрывают пробками с поглотительными трубками, заполненными натронной известью.
-

8. Аминоуксусная кислота (глицин, гликокол), ч.д.а. или х.ч.

9. Хлорид магния, кристаллогидрат ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ч.д.а. или х.ч.

10. 0,05 М глициновый буферный раствор с добавлением в качестве катализатора хлорида магния (MgCl_2 — 95 мг/л): 375 мг глицина и 20,3 мг кристаллогидрата хлорида магния $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 42 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл.

11. Субстратно-буферный раствор, pH 10,5: готовят смешиванием равных частей реактивов 6 и 10. При необходимости pH доводят растворами соляной кислоты или гидроксида натрия. При смешивании 2 мл субстратно-буферного раствора с 10 мл 0,02 М раствора гидроксида натрия экстинкция реактива не должна превышать 0,1 при длине волны 400–420 нм в кювете, толщиной 1 см. В противном случае раствор непригоден и подлежит реэкстрагированию бутанолом или эфиром. После процедуры реэкстрагирования необходимо снова установить pH 10,5. Реактив можно хранить в холодильнике (лучше в замороженном состоянии) в течение 2–3 дней.

12. 0,05 М стандартный раствор п-нитрофенола: навеску 69,5 мг кристаллического п-нитрофенола квалификации х.ч. вносят в небольшое количество 0,02 М раствора гидроксида натрия, растворяют и доводят объем этим же раствором до 100 мл. 1 мл основного раствора, содержащего 5 мкмоль п-нитрофенола, доводят 0,02 М раствором гидроксида натрия до объема 100 мл. 1 мл полученного рабочего калибровочного раствора содержит 0,05 мкмоль п-нитрофенола.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В опытные и контрольные пробирки вносят по 1 мл субстратно-буферного раствора, прогревают их при температуре 37 °С в течение 5 мин, затем в опытные пробирки добавляют по 0,1 мл исследуемой сыворотки крови. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют при 37 °С в течение 30 мин. После инкубации пробирки помещают в водяную баню со льдом, в контрольные пробирки приливают по 0,1 мл исследуемой сыворотки крови. Затем во все пробирки интенсивной струей (для лучшего перемешивания реактивов) вносят по 10 мл 0,02 М раствора

гидроксида натрия, тщательно перемешивают. Через 3–5 мин опытные пробы фотометрируют при длине волны 400–420 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете толщиной 1 см против контрольных проб.

Расчет результатов производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика

Из рабочего калибровочного раствора готовят ряд разведений, как указано в нижеприведенной таблице, фотометрируют при тех же условиях, что и опытные пробы, против 0,02 М раствора гидроксида натрия.

По результатам фотометрирования строят график, откладывая по оси ординат значения экстинкции, а по оси абсцисс — активность фермента.

Нормальные величины: 278–830 нмоль/(с · л). Нормальные величины активности ЩФ в значительной степени зависят от возраста. Прием пищи повышает содержание кишечного изофермента ЩФ в сыворотке крови, особенно у людей с I и III группами крови. Активность возрастает у женщин после наступления менопаузы. Активность ЩФ в единицах СИ — 0,63–2,10 мкат/л.

Построение калибровочного графика для определения активности щелочной фосфатазы

№ пробирки	Рабочий калибровочный раствор п-нитрофенола, мл	Содержание п-нитрофенола в пробе, мкмоль	0,02 М раствор гидроксида натрия, мл	Активность ЩФ нмоль/(с · л)
1	1,0	0,05	10,1	278
2	2,0	0,10	9,1	556
3	3,0	0,15	8,1	834
4	5,0	0,25	6,1	1390
5	7,0	0,35	4,1	1946

Клинико-диагностическое значение определения ЩФ

Причины повышения активности щелочной фосфатазы сыворотки крови:

Физиологические:

Беременность (последний триместр)

Детский возраст

Патологические:

Часто превышение более чем в 5 раз верхней границы нормы:

Болезнь Педжета, поражение костной ткани
Остеомалация и рахит
Холестаз (внутри- и внепеченочный)
Цирроз

Обычно превышение менее чем в 5 раз верхней границы нормы:

Опухоли кости (первичные и вторичные)
Почечная остеодистрофия
Первичный гиперпаратиреоз с вовлечением кости
Заживающие переломы
Остеомиелит
Объемные поражения печени (опухоль, абсцесс)
Инфильтративное заболевание печени
Гепатит
Воспалительное заболевание желудка

II. Кислая фосфатаза (КФ)

Унифицированный метод определения активности общей и простатической фракции кислой фосфатазы по гидролизу п-нитрофенилфосфата

Кислая фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; К.Ф. 3.1.3.2) имеет оптимум рН в пределах 3,4–6,2. В группе кислых фосфатаз (КФ) различают несколько ферментов, которые отличаются оптимумом рН и происхождением — фосфомоноэстеразы II, III, IV.

Кислая фосфатаза II ($\text{pH}_{\text{оптим.}} 4,6$) в небольших количествах содержится в предстательной железе и эритроцитах, активность ее в сыворотке крови человека незначительна. Фосфомоноэстераза II в противоположность другим кислым фосфатазам сильно ингибируется тартратом, ионами фтора и железа, однако на нее не влияют ионы магния. При использовании 0,02 М раствора тартрата и п-нитрофенилфосфата в качестве субстрата ингибирование достигает 95%, т.е. простатическая КФ является тартрат-лабильной.

Кислая фосфатаза III ($pH_{\text{оптим.}}$ 3,4–4,4) характерна для печени и других паренхиматозных органов; кислая фосфатаза IV ($pH_{\text{оптим.}}$ 5,2–6,2) — для эритроцитов.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле обнаружено 7 фракций изоферментов КФ в сыворотке крови у здоровых взрослых людей и 6 фракций — у детей.

В клинической практике исследуют суммарную активность кислых фосфатаз и простатической фракции фермента для диагностики заболеваний печени, костей, предстательной железы. Активность кислой фосфатазы в различных органах и тканях (на 1 г ткани) распределяется следующим образом: предстательная железа, печень, селезенка, эритроциты, тромбоциты, костный мозг, женское молоко, сыворотка крови. У мужчин половина содержащейся в сыворотке крови кислой фосфатазы поступает из предстательной железы, а остальная часть — из печени и разрушающихся тромбоцитов и эритроцитов. У женщин кислая фосфатаза вырабатывается печенью, эритроцитами и тромбоцитами.

Методы определения КФ те же, что и для ЩФ, но различаются по используемым буферным растворам и значению pH .

Принцип. КФ гидролизует *p*-нитрофенилфосфат в кислой среде с образованием *p*-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание. Активность КФ предстательной железы ингибируется L-тарtratом.

Материал для исследования. Свежая сыворотка или плазма крови без признаков гемолиза.

Реактивы

1. 1 М раствор цитрата натрия (буферный раствор), pH 5,5.

2. 0,12 М раствор тарtrата калия (натрия) в 1 М растворе цитрата натрия (раствор ингибитора).

3. Хлорид натрия.

4. *p*-Нитрофенилфосфата динатриевая соль (не должна содержать примеси *p*-нитрофенола).

5. Раствор А: 80 мл буферного раствора (реактив 1) разбавляют 32 мл дистиллированной воды, в 37 мл полученного раствора растворяют 90 мг *p*-нитрофенилфосфата и 310 мг хлорида натрия.

Раствор Б: 40 мл раствора ингибитора (реактив 2) разбавляют 16 мл дистиллированной воды, в 18,5 мл полу-

ченного раствора растворяют 45 мг п-нитрофенилфосфата и 155 мг хлорида натрия.

Реактивы А и Б стабильны при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла в течение нескольких недель.

7. Основной калибровочный раствор п-нитрофенола: 16,68 мг п-нитрофенола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают до метки дистиллированной водой.

8. 0,1 М раствор гидроксида натрия (NaOH).

Ход определения

В одну пробирку вносят 0,5 мл раствора А (для исследования общей активности), в другую пробирку — 0,5 мл раствора В (тарtrat-стабильная фракция) и нагревают до 37 °С в течение 5 мин. Добавляют в обе пробирки по 0,1 мл исследуемой сыворотки или плазмы крови и инкубируют в течение 30 мин при 37 °С. Затем в обе пробирки добавляют по 2,0 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия. В контрольную пробу вносят 0,5 мл раствора А, далее обрабатывают так же, как опытную пробу, но сыворотку или плазму добавляют после инкубации. Фотометрируют при длине волны 405 нм в кювете толщиной 1 см против дистиллированной воды.

Расчет результатов производят по калибровочному графику. Из экстинкции опытной пробы (раствор А) вычитают экстинкцию контрольной пробы, разность экстинкции соответствует экстинкции общей КФ. Из экстинкции опытной пробы (раствор В) вычитают экстинкцию контрольной пробы, разность экстинкции соответствует экстинкции тарtratстабильной фракции фермента. Для обеих разностей находят соответствующую активность по калибровочному графику. Вычитая из величины активности общей КФ величину активности тарtratстабильной фракции, получают активность тарtrat-лабильной фракции КФ (КФ предстательной железы).

Построение калибровочного графика

Из основного калибровочного раствора готовят рабочие растворы, как указано в нижеприведенной таблице.

В каждую из 5 пробирок вносят по 0,1 мл соответствующего рабочего калибровочного раствора, прибавляют по 2,5 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия, перемешивают

и фотометрируют при тех же условиях, что и опытные пробы, против дистиллированной воды. По полученным значениям экстинкции строят график зависимости величины экстинкции от активности фермента.

Построение калибровочного графика для определения активности КФ

№ про- бирки	Рабочий калибровочный раствор п-нитрофенола, мл	Вода дистил- лированная, мл	Активность КФ	
			мкмоль/(мин · л) (МЕ)	нмоль/(с · л)
1	0,1	1,9	2,5	41,7
2	0,2	1,6	5,0	83,3
3	0,5	2,0	10,0	166,7
4	1,0	1,0	25,0	416,7
5	1,0	—	50,0	833,5

Нормальные величины. Общая активность КФ в норме составляет 67–167 нмоль/(с · л), или 4–10 МЕ; тар-трат-лабильной фракции КФ 0–16,7 нмоль/(с · л), или 0–1 МЕ; в единицах СИ — 0–11,6 нкат/л.

Клинико-диагностическое значение

Определение активности КФ, как правило, используется для диагностики карциномы предстательной железы, при этом простатическая фракция имеет большее диагностическое значение, чем общая КФ. Однако в начальной стадии рака простаты активность кислой фосфатазы может находиться в пределах нормы. При метастазах карциномы предстательной железы в костную ткань может нарастать и активность щелочной фосфатазы.

Определение активности КФ может быть использовано для дифференциальной диагностики метастазов рака предстательной железы в кости и заболеваний костной ткани, в частности, остеодистрофий, для которых характерно повышение уровня только ЩФ, в то время как при костных метастазах рака предстательной железы повышен уровень как ЩФ, так и КФ.

Массаж предстательной железы, катетеризация, цистоскопия, ректальные исследования приводят к повышению активности КФ, поэтому кровь для анализа рекомендуется брать не ранее, чем через 48 ч после указанных процедур.

4.2. Тест-контроль по теме «Ферменты»

1. Ферменты-катализаторы биохимических реакций характеризуются свойствами:

- 1) имеют большую молекулярную массу
- 2) термолабильны
- 3) эффективны
- 4) специфичны
- 5) регуляторны
- 6) действуют с выходом 100%.

2. При температурном оптимуме:

- 1) скорость ферментативной реакции минимальна
- 2) скорость ферментативной реакции максимальна
- 3) активность фермента максимальна
- 4) активность фермента минимальна
- 5) происходит денатурация фермента
- 6) происходит инактивация фермента.

3. По химической природе ферменты в организме человека являются:

1. простыми белками
2. сложными белками
3. пептидами
4. аминокислотами
5. липидами
6. нуклеиновыми кислотами.

4. При изменении pH активность фермента изменяется, так как изменяются:

- 1) знак зарядов ионогенных групп фермента
 - 2) величина зарядов ионогенных групп фермента
 - 3) первичная структура белковой части фермента
 - 4) вторичная структура белковой части фермента
 - 5) третичная структура белковой части фермента
 - 6) четвертичная структура белковой части фермента.
-

5. Специфичность действия ферментов может быть:

- 1) относительная (групповая)
- 2) абсолютная
- 3) стереоспецифичность
- 4) кратковременная
- 5) долговременная
- 6) постоянная.

6. Фермент, обладающий относительной специфичностью:

- 1) действует на сходные по структуре субстраты
- 2) действует только на один субстрат
- 3) действует только на один из изомеров
- 4) катализирует реакции одного типа
- 5) катализирует только одно превращение данного вещества
- 6) действует на один тип связей.

7. Фермент, обладающий абсолютной специфичностью:

- 1) действует на сходные по структуре субстраты
- 2) действует только на один субстрат
- 3) действует только на один из изомеров
- 4) катализирует реакции одного типа
- 5) катализирует только одно превращение данного вещества
- 6) действует на один тип связей.

8. Фермент, обладающий стереоспецифичностью:

- 1) действует на сходные по структуре субстраты
- 2) действует только на один субстрат
- 3) действует только на один из изомеров
- 4) катализирует реакции одного типа
- 5) катализирует только одно превращение данного вещества
- 6) действует на один тип связей.

9. Скорость ферментативной реакции зависит от:

- 1) температуры
 - 2) активности фермента
 - 3) количества фермента
 - 4) концентрации субстрата
-

- 5) кислотности среды
- 6) присутствия ингибиторов.

10. Белковую часть фермента называют:

- 1) кофактором
- 2) простетической группой
- 3) холоферментом
- 4) апоферментом
- 5) коферментом
- 6) эффектором.

11. Небелковую часть фермента называют:

- 1) холоферментом
- 2) апоферментом
- 3) эффектором
- 4) ингибитором
- 5) репрессором
- 6) кофактором.

12. Если небелковая часть фермента связана непрочно с белковой частью, то она называется:

- 1) кофактором
- 2) простетической группой
- 3) холоферментом
- 4) апоферментом
- 5) коферментом
- 6) эффектором.

13. Если небелковая часть фермента связана прочно с белковой частью, то она называется:

- 1) кофактором
- 2) простетической группой
- 3) холоферментом
- 4) апоферментом
- 5) коферментом
- 6) эффектором.

14. Коферменты могут быть представлены:

- 1) органическими молекулами
 - 2) неорганическими ионами
 - 3) неорганическими соединениями
 - 4) витаминами
 - 5) белками
 - 6) липидами.
-

15. Роль апофермента:

- 1) связывает фермент и субстрат в комплекс
- 2) обеспечивает специфичность взаимодействия фермента с данным субстратом
- 3) влияет на ход ферментативной реакции
- 4) участвует в катализе, осуществляя перенос электронов, групп атомов
- 5) осуществляет каталитическое воздействие на субстрат
- 6) изменяет трехмерную структуру апофермента и связанного с ним субстрата, обеспечивая их более прочное связывание.

16. Роль кофактора:

- 1) связывает фермент и субстрат в комплекс
- 2) обеспечивает специфичность взаимодействия фермента с данным субстратом
- 3) влияет на ход ферментативной реакции
- 4) участвует в катализе, осуществляя перенос электронов, групп атомов
- 5) осуществляет каталитическое воздействие на субстрат
- 6) изменяет трехмерную структуру апофермента и связанного с ним субстрата, обеспечивая их более прочное связывание.

17. Ферменты, катализирующие реакции соединения более простых молекул в сложные, сопровождаемые распадом АТФ, относятся к классу:

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

18. Ферменты, катализирующие взаимопревращение изомеров, относятся к классу:

- 1) оксидоредуктазы
 - 2) трансферазы
 - 3) гидролазы
 - 4) лиазы
-

- 5) изомеразы
- 6) лигазы.

19. Ферменты, катализирующие гидролиз сложных соединений, относятся к классу:

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

20. Ферменты, осуществляющие присоединение или отщепление от субстрата групп атомов негидролитическим путем (могут либо разрываться связи C—C или C—S, либо образовываться двойная связь, или присоединяться группа атомов), относятся к классу:

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

21. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции (перенос атомов H, O или электронов), относятся к классу:

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

22. Ферменты, катализирующие реакции переноса химических групп от одной молекулы к другой, относятся к классу:

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

23. Активность фермента можно изменить путем:

- 1) ковалентной модификации
- 2) репрессии генов
- 3) индукции генов
- 4) компартментализации
- 5) гликолиза
- 6) нековалентной модификации.

24. Изоферменты — это ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся друг от друга по:

- 1) аминокислотному составу
- 2) порядку связывания АК
- 3) константе Михаэлиса
- 4) электрофоретической подвижности
- 5) локализации в клетке и органе
- 6) различному сродству к исходному веществу и продукту реакции.

25. Ферменты, используемые в энзимодиагностике, должны удовлетворять требованиям:

- 1) обладать органоспецифичностью
- 2) обладать низкой стабильностью
- 3) обладать высокой стабильностью
- 4) выход в кровь фермента должен протекать только при повреждении органа
- 5) в норме в сыворотке крови активность фермента должна быть минимальна или полностью отсутствовать
- 6) в норме в сыворотке крови активность фермента должна быть максимальна.

26. При заболеваниях печени в сыворотке крови исследуют активность ферментов:

- 1) пепсина
- 2) трипсина
- 3) α -амилазы
- 5) лактазы
- 6) АЛТ.

27. При остром панкреатите в моче исследуют активность ферментов:

- 1) АЛТ
 - 2) АСТ
-

- 3) КФК
- 4) α -амилазы
- 5) каталазы
- 6) ЛДГ.

28. При аденоме предстательной железы в сыворотке крови исследуют активность:

- 1) ЛДГ₁
- 2) ЛДГ₂
- 3) ЛДГ₃
- 4) ЛДГ₅
- 5) кислой фосфатазы
- 6) щелочной фосфатазы.

29. При инфаркте миокарда в сыворотке крови увеличивается активность:

- 1) ММ-фракции креатинфосфокиназы
- 2) МВ-креатинфосфокиназы
- 3) ВВ-фракции креатинфосфокиназы
- 4) ТАГ — липазы
- 5) α -амилазы
- 6) пепсина.

30. При некрозе миокардиоцитов в сыворотке крови исследуют активность ферментов:

- 1) трипсина
- 2) химотрипсина
- 3) α -амилазы
- 4) АСТ
- 5) щелочной фосфатазы
- 6) кислой фосфатазы.

31. При панкреатитах в сыворотке крови исследуют активность ферментов:

- 1) липазы
- 2) каталазы
- 3) альдолазы
- 4) АЛТ
- 5) лактазы
- 6) мальтазы.

32. Для распознавания инфаркта миокарда в сыворотке крови исследуют:

- 1) щелочную фосфатазу
 - 2) кислую фосфатазу
-

- 3) ЛДГ₁
- 4) ЛДГ₅
- 5) трипсин
- 6) α -амилазу.

33. При опухолях костей в сыворотке крови исследуют активность ферментов:

- 1) каталазы
- 2) липазы
- 3) трипсина
- 4) щелочной фосфатазы
- 6) α -амилазы.

34. Какие ферменты содержатся в крови в норме?

- 1) АСТ
- 2) ЛДГ
- 3) холинэстераза
- 4) АЛТ
- 5) креатинфосфокиназа
- 6) все ответы правильные.

35. При инфаркте миокарда в крови повышается активность:

- 1) АСТ
- 2) ЛДГ₁
- 3) креатинфосфокиназы
- 4) ЛДГ общая
- 5) МВ-фракция креатинфосфокиназы
- 6) все ответы правильные.

Контрольные вопросы

- 1. Охарактеризуйте α -амилазу, укажите принцип унифицированного метода определения активности α -амилазы в сыворотке крови, клинико-диагностическое значение этого биохимического теста.
 - 2. Охарактеризуйте АлАТ, укажите принцип унифицированного метода определения активности АлАТ в сыворотке крови и клинико-диагностическое значение этого биохимического теста.
 - 3. Охарактеризуйте АсАТ, укажите принцип унифицированного метода определения активности АсАТ в сыворотке крови и клинико-диагностическое значение этого биохимического теста.
-

4. Охарактеризуйте ГГТ, укажите принцип унифицированного метода определения активности ГГТ в сыворотке крови и клинико-диагностическое значение этого биохимического теста.
 5. Охарактеризуйте щелочную фосфатазу, укажите принцип унифицированного метода определения активности ЩФ в сыворотке крови, клинико-диагностическое значение определения активности ЩФ.
 6. Охарактеризуйте кислую фосфатазу, укажите принцип унифицированного метода определения, активности КФ в сыворотке крови и клинико-диагностическое значение этого биохимического теста.
 7. Охарактеризуйте КФК, укажите принцип унифицированного метода определения активности КФК в сыворотке крови и клинико-диагностическое значение этого биохимического теста. Изоферменты КФК.
 8. Охарактеризуйте ЛДГ, ее изоферменты, их локализацию в тканях, укажите принцип унифицированного метода определения активности ЛДГ и ее изоформ в сыворотке крови, клинико-диагностическое значение этих биохимических тестов.
-

Глава 5

Обмен веществ и энергии в организме человека, пути их регуляции

Под обменом веществ понимают совокупность биохимических превращений, которые протекают в целостном организме и обеспечивают жизнедеятельность, рост, воспроизведение и обмен с окружающей средой.

Метаболизм — это совокупность внутриклеточных биохимических процессов превращения отдельных молекул, которые обеспечивают освобождение энергии и запасание в виде макроэргов, а также синтез новых макромолекул.

В метаболизме различают два противоположно протекающих процесса: катаболизм и анаболизм.

Катаболизм — это совокупность ферментативных реакций, обеспечивающих расщепление макромолекул и мономеров на конечные и промежуточные метаболиты, с выделением энергии. В катаболизме различают: специфические пути распада белков, углеводов, липидов и общий терминальный путь распада, включающий ЦТК и ЦПЭ, происходящие в митохондриях клеток.

Анаболизм — это реакции метаболизма, включающие процессы синтеза компонентов различных структур организма, обеспечивающих его функционирование, с затратой энергии.

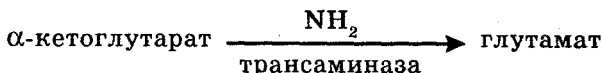
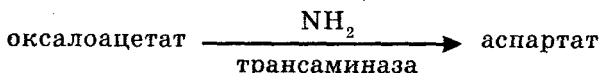
ЦТК — амфиболический цикл, выполняющий как катаболическую, так и анаболическую функции.

Катаболическая функция ЦТК

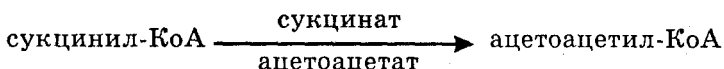
В результате взаимодействия ацетил-КоА с оксалоацетатом в серии реакций высвобождается 2 молекулы CO_2 и генерируется оксалоацетат, а также образуются восстановленные эквиваленты в виде трех молекул $\text{НАДН}^+ \cdot \text{H}^+$, и одной молекулы ФАДН_2 и одной молекулы ГТФ.

Анаболическая функция ЦТК

1. Цитрат, α -кетоглутарат, сукцинил-КоА, фумарат в ЦТК превращается в оксалоацетат, а из оксалоацетата может образоваться глюкоза;
2. Цитрат участвует в процессах синтеза жирных кислот;
3. Цитрат способен связывать ионы Ca^{2+} и участвовать в процессах его переноса и отложения (минерализации);
4. Путем трансаминирования из оксалоацетата образуется аспарагиновая кислота, а из α -кетоглутарата — глутаминовая кислота.



5. Сукцинил-КоА участвует в синтезе порфиринов (гема);
6. Сукцинил-КоА является донором HS-CoA в реакции образования активной формы ацетоацетата (кетонное тело)



ЦПЭ — окислительное фосфорилирование — это аэробный митохондриальный процесс преобразования энергии электронов восстановленных коферментов $\text{НАДН} + \text{H}^+$, ФАДН_2 и некоторых субстратов в энергию АТФ.

5.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата)

В мышечной ткани содержится два макроэргических соединения — АТФ и креатинфосфат, которые обеспечивают по мере надобности мышцу большим количеством энергии. Основным путем образования АТФ в тканях является окислительное фосфорилирование в процессе тканевого дыхания. Креатинфосфат образуется в мышце при участии АТФ в состоянии покоя и служит резервом высокоэргичес-

кого фосфата для синтеза АТФ из АДФ при активной мышечной работе. Метод основан на том, что два последних остатка фосфорной кислоты в АТФ, богатые энергией, так же как и фосфатный остаток в креатинфосфате, легко отщепляются при непродолжительном гидролизе в кислой среде — так называемый лабильно связанный фосфор. Сравнение содержания неорганического фосфора в пробах до гидролиза и после дает представление о количестве лабильно связанного фосфора, которое приходится на долю макроэргических соединений мышечной ткани. Количество фосфора определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты.

ХОД РАБОТЫ

1. 0,5 г мышечной кашицы помещают в пробирку, стоящую в ледяной бане, и добавляют в нее 5 мл охлажденного 10%-го раствора ТХУ. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой для экстрагирования АТФ и креатинфосфата в течение 5 мин. Экстракт фильтруют в мерную пробирку, стоящую в ледяной бане. Остаток мышечной кашицы в пробирке заливают 5 мл дистиллированной воды и продолжают экстракцию 5 мин на холоде. Полученный экстракт фильтруют в ту же мерную пробирку и доводят общий объем до 10 мл дистиллированной водой.

2. В две пробирки отбирают по 0,5 мл безбелкового фильтрата. Первая пробирка — контрольная, вторая — опытная. В опытную пробирку добавляют 1 мл 1 моль/л HCl , закрывают фольгой, помещают в кипящую водяную баню на 10 мин для гидролиза фосфорных связей. Затем раствор охлаждают и добавляют 1 мл 1 моль/л NaOH . В контрольную пробирку (без предварительного кипячения) добавляют 1 мл 1 моль/л раствора HCl и 1 мл 1 моль/л раствора NaOH .

В опытную и контрольную пробирки добавляют из бюретки по 7,5 мл дистиллированной воды для получения объема 10 мл.

3. Дальнейшие процедуры обязательно проводят одновременно с опытной и контрольной пробами. Из обеих пробирок отбирают по 5 мл жидкости, переносят в две другие пробирки и добавляют в каждую из них по 0,5 мл 2,5%-го молибдата аммония, 0,5 мл 1%го раствора аскорбиновой кислоты и по 2 мл дистиллированной воды.

Смесь в каждой пробирке быстро перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре точно 10 мин.

4. Контрольную и опытную пробы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром (длина волны 670 нм) против воды. В опытной пробе (после гидролиза) определяемый неорганический фосфор представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и фосфатных солей, присутствующих в тканях. В контрольной пробе — только фосфатные соли.

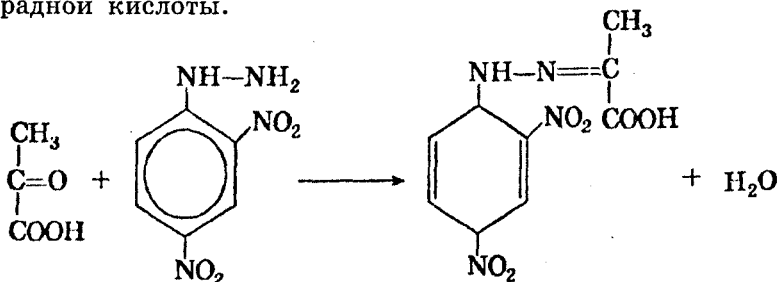
5. Вычитают из оптической плотности, найденной для опытной пробы, оптическую плотность, полученную для контрольной пробы. Концентрацию лабильно связанного неорганического фосфора в пробе находят по калибровочному графику.

Расчет

Рассчитывают количество лабильно связанного фосфора в мг на 100 г сырой ткани, учитывая разведение по формуле $x = A \cdot 3,3400 \cdot 100$; где x — содержание макроэргических соединений в пересчете на 1 мг АТФ в 100 г сырой ткани (мг/100 г); A — содержание АТФ в пробе, мг; 3,3400 — коэффициент пересчета на 1 г ткани с учетом разведения растворов.

Опыт 2. Количественное определение пировиноградной кислоты в крови колориметрическим методом (по Умбрайту). Содержание пирувата в крови здорового человека колеблется в пределах 0,05–0,14 ммоль/л, а в моче — от 10 до 25 мг в суточном диурезе.

Метод основан на том, что пировиноградная кислота при взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином в кислой среде образует 2,4-динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты.



Образующееся соединение в щелочной среде приобретает коричнево-красную окраску, интенсивность которой прямо пропорциональна содержанию пирувата.

ХОД РАБОТЫ

В пробирку отмеривают 1,8 мл 10%-го раствора ТХУ, добавляют 0,2 мл крови микропипеткой. Микропипетку несколько раз промывают содержимым пробирки, тщательно взбалтывают и оставляют стоять 10 мин для осаждения белков; затем фильтруют. Далее берут 2 пробирки — в первую переносят 1 мл фильтрата, во вторую — 1 мл дистиллированной воды. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл 0,1%-го раствора 2,4-ДНФГ, перемешивают и через 5 мин добавляют 2,5 мл водонасыщенного толуола. Содержимое пробирок встряхивают в течение 1 мин и оставляют стоять для расслоения. Из верхнего толуолового слоя отбирают пипеткой по 1 мл жидкости и переносят в сухие пробирки. В обе пробирки добавляют по 2 мл 2,5%-го спиртового раствора щелочи. Через 10 мин образуется красно-розовое окрашивание, 1-я пробирка — опыт, 2-я — контроль. Опытную пробу фотокolorиметрируют на ФЭКе со светофильтром № 4 в кюветах с толщиной слоя 1 см против контроля.

Расчет. Содержание пирувата в пробе определяют по калибровочному графику, построенному по стандартным растворам ПВК.

Клинико-диагностическое значение определения пирувата

Наиболее резкое повышения концентрации пирувата отмечается при мышечной работе и B_1 -витаминной недостаточности. При больших физических нагрузках концентрация ПВК может повышаться до 0,5 ммоль/л. Кроме того, повышение содержания ПВК в крови отмечается при паренхиматозных заболеваниях печени, сахарном диабете, сердечной декомпенсации, токсикозах. В спинномозговой жидкости концентрация пирувата значительно повышается после травмы черепа, при воспалительных процессах — менингите, абсцессе мозга. Повышенное содержание ПВК токсично для организма.

5.2. Тест-контроль по теме «Обмен веществ и энергии в организме человека, пути их регуляции»

1. Обменом веществ в организме человека называется:

- 1) совокупность биохимических превращений, протекающих в целостном организме и обеспечивающих жизнедеятельность, рост, воспроизведение и обмен с окружающей средой
- 2) распад белков, липидов, углеводов
- 3) биосинтез белков, липидов, углеводов
- 4) биосинтез нуклеиновых кислот
- 5) распад нуклеиновых кислот
- 6) биосинтез субклеточных структур.

2. Метаболизмом, или промежуточным обменом называют:

- 1) распад белков в клетках
- 2) биосинтез белков в клетках
- 3) совокупность внутриклеточных биохимических процессов, ведущих к расщеплению отдельных молекул, освобождению энергии и синтезу новых макромолекул
- 4) совокупность ферментативных реакций, обеспечивающих расщепление макромолекул и мономеров на конечные и промежуточные метаболиты
- 5) совокупность биохимических реакций, включающих процессы синтеза компонентов различных структур организма
- 6) биосинтез и распад нуклеиновых кислот.

3. Катаболизмом называют:

- 1) распад белков в организме
 - 2) распад липидов в организме
 - 3) совокупность биохимических процессов, ведущих к расщеплению отдельных молекул, освобождению энергии и синтезу новых макромолекул
 - 4) совокупность биохимических процессов, обеспечивающих расщепление макромолекул и мономеров на конечные и промежуточные метаболиты
-

- 5) совокупность биохимических превращений, обеспечивающих процессы жизнедеятельности, рост, воспроизведение и обмен с окружающей средой
- 6) совокупность биохимических реакций, включающих процессы синтеза компонентов различных структур организма.

4. Анаболизмом называют:

- 1) совокупность биохимических процессов, ведущих к расщеплению отдельных молекул, освобождению энергии и синтезу новых макромолекул
- 2) совокупность биохимических процессов, обеспечивающих расщепление макромолекул, и мономеров на конечные и промежуточные метаболиты
- 3) совокупность биохимических процессов, обеспечивающих процессы жизнедеятельности, рост и воспроизведение, и обмен с окружающей средой
- 4) совокупность биохимических реакций, включающих процессы синтеза компонентов различных структур организма
- 5) биохимические процессы освобождения энергии в клетках
- 6) биохимические процессы, ведущие к образованию энергии в клетках.

5. Функция амфиболических путей:

- 1) усиление процессов катаболизма
- 2) усиление процессов анаболизма
- 3) ослабление процессов катаболизма
- 4) ослабление процессов анаболизма
- 5) связывание анаболических и катаболических процессов
- 6) прекращение процессов анаболизма.

6. Конвергенция метаболизма — это:

- 1) объединение различных метаболических процессов, характерных для отдельных видов веществ, в единый процесс
- 2) разъединение различных метаболических процессов на множество реакций

- 3) объединение специфических путей превращения белков
- 4) объединение специфических путей превращения липидов
- 5) объединение специфических путей превращения углеводов
- 6) амфиболический путь.

7. Унификация метаболизма — это:

- 1) увеличение числа метаболитов в обмене белков
- 2) увеличение числа метаболитов в обмене углеводов
- 3) увеличение числа метаболитов в обмене липидов
- 4) постепенное уменьшение числа участников обменных процессов в метаболизме
- 5) использование универсальных метаболитов в метаболизме
- 6) увеличение числа компонентов клеток, участвующих в анаболизме.

8. Специфические пути в метаболизме:

- 1) ЦТК
- 2) гликолиз
- 3) глюконеогенез
- 4) β -окисления ВЖК
- 5) дезаминирование АК
- 6) ЦПЭ.

9. Общие пути в метаболизме:

- 1) ЦТК
- 2) гликолиз
- 3) глюконеогенез
- 4) β -окисления ВЖК
- 5) дезаминирование АК
- 6) ЦПЭ.

10. Назовите общие метаболиты, образовавшиеся из белков, углеводов и липидов в результате унификации метаболизма:

- 1) ПВК
 - 2) ацетил-КоА
-

- 3) α -кетоглутарат
- 4) оксалоацетат
- 5) глутаминовая кислота
- 6) олеиновая кислота.

11. Катаболизм $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{-SKoA}$ в цикле Кребса приводит к образованию:

- 1) H_2O
- 2) 1 мол. ГТФ
- 3) 2 мол. CO_2
- 4) 3 мол. $\text{НАДН} + \text{H}^+$
- 5) 1 мол. ФАДН_2
- 6) 3 мол. $\text{НАДФН} + \text{H}^+$.

12. Где протекает ЦТК:

- 1) в полисомах клетки
- 2) в ядре клетки
- 3) в митохондриях клетки
- 4) в матриксе митохондрий
- 5) в межмембранном пространстве митохондрий
- 6) на внутренней мембране митохондрий.

13. Назовите фермент ЦТК, обладающий стереоспецифичностью:

- 1) цитрат-синтаза
- 2) аконитаза
- 3) α -КГ-дегидрогеназный комплекс
- 4) L-малат-дегидрогеназа
- 5) фумараза
- 6) нуклеозиддифосфаткиназа.

14. Биохимические функции цикла Кребса:

- 1) интегративная
- 2) обезвреживание
- 3) катаболическая
- 4) анаболическая
- 5) транспортная
- 6) энергетическая.

15. Содержание ПВК в крови здорового человека составляет (в ммоль/л):

- | | | |
|--------------|--------------|---------------|
| 1) 0,01–0,02 | 3) 0,05–0,14 | 5) 0,18–0,20 |
| 2) 0,03–0,04 | 4) 0,15–0,17 | 6) 0,21–0,25. |

16. За сутки с мочой из организма человека выделяется ПВК (в мг/сутки):

- | | | |
|--------|--------|-----------|
| 1) 1-3 | 3) 6-7 | 5) 10-25 |
| 2) 4-5 | 4) 7-9 | 6) 26-40. |

17. Биологическое окисление — это:

- 1) совокупность окислительно-восстановительных реакций в организме, ведущих к образованию энергии
- 2) совокупность окислительно-восстановительных реакций, протекающих с затратой энергии
- 3) совокупность биохимических процессов, приводящих к биосинтезу фосфолипидов
- 4) совокупность биохимических процессов, приводящих к биосинтезу гликогена
- 5) совокупность восстановительных реакций
- 6) совокупность окислительных реакций.

18. Получение энергии в организме человека протекает путем:

- 1) аэробного гликолиза
- 2) анаэробного гликолиза
- 3) β -окисления ВЖК
- 4) переаминирования
- 5) субстратного фосфорилирования
- 6) окислительного фосфорилирования.

19. Поступивший в клетки кислород может быть использован:

- 1) оксидазным путем
- 2) оксигеназным путем
- 3) в реакциях переаминирования
- 4) в реакциях декарбоксилирования
- 5) в реакциях метилирования
- 6) в реакциях конъюгации.

20. При оксидазном пути использования кислорода является:

- 1) конечным акцептором электронов
 - 2) конечным акцептором протонов
 - 3) конечным акцептором электронов и протонов
 - 4) донором электронов
-

- 5) донором протонов
- 6) донором электронов и протонов.

21. Роль кислорода при оксигеназном пути его использования:

- 1) конечный акцептор электронов
- 2) донор электронов
- 3) встраивается в гидрофобные соединения
- 4) выполняет пластическую функцию
- 5) соединяется с протонами, образуя H_2O
- 6) превращает гидрофобные соединения в гидрофильные.

22. Принципы сопряжения эндо- и экзэргических процессов в организме человека:

- 1) эндерогоническая и экзэргоническая реакции должны осуществляться совместно и одновременно
- 2) экзэргоническая реакция должна протекать раньше эндерогонической
- 3) абсолютное значение изменения свободной энергии для экзэргонической реакции должно быть больше, чем для эндерогонической
- 4) эндерогоническая реакция должна протекать раньше экзэргонической
- 5) экзо- и эндерогоническая реакция должны иметь общий промежуточный продукт
- 6) свободная энергия экзо- и эндерогонических реакций должна быть равной.

23. Что представляет собой цепь переноса (транспорта) электронов (ЦПЭ):

- 1) мультиэнзимный комплекс
- 2) класс трансфераз
- 3) класс липаз
- 4) класс лиаз
- 5) ферментный ансамбль передачи e^- на кислород
- 6) совокупность комплексов ферментов, передающих электроны от НАДН + H^+ и ФАДН₂ на кислород?

24. Какие ферменты входят в состав ЦПЭ):

- 1) НАДН-дегидрогеназа
 - 2) каталаза
-

- 3) QH_2 -дегидрогеназа
- 4) цитохром В
- 5) цитохром С
- 6) цитохромоксидаза?

25. Ферменты ЦПЭ локализованы в:

- 1) наружной мембране митохондрий
- 2) внутренней мембране митохондрий
- 3) межмембранном пространстве
- 4) цитозоле клеток
- 5) матриксе митохондрий
- 6) ядре клеток.

26. Каков состав I ферментного комплекса ЦПЭ:

- 1) QH_2 -дегидрогеназа
- 2) ФАД
- 3) цитохром В
- 4) НАДН-дегидрогеназа
- 5) ФМН
- 6) Fe-S-белки?

27. Каков состав II ферментного комплекса ЦПЭ:

- 1) QH_2 -дегидрогеназа
- 2) цитохром В
- 3) цитохром C_1
- 4) НАДН-дегидрогеназа
- 5) ФМН
- 6) Fe-S-белки?

28. Каков состав III ферментного комплекса ЦПЭ:

- 1) QH_2 -дегидрогеназа
- 2) НАДН-дегидрогеназа
- 3) цитохромоксидаза
- 4) цитохром а
- 5) цитохром a_3
- 6) гемовое железо?

29. Укажите переносчики только электронов в ЦПЭ:

- 1) НАДН-дегидрогеназа
 - 2) Fe-S-белки
 - 3) цитохром В
 - 4) цитохром С
 - 5) цитохром а
 - 6) цитохром a_3 .
-

30. Укажите переносчики одновременно электронов и протонов в ЦПЭ:

- 1) НАДН-дегидрогеназа
- 2) QH_2 -дегидрогеназа
- 3) убихинон
- 4) цитохром В
- 5) цитохром а
- 6) цитохром a_3 .

31. Реакцию фосфорилирования АДФ в митохондриях катализирует фермент:

- 1) каталаза
- 2) НАДН-дегидрогеназа
- 3) QH_2 -дегидрогеназа
- 4) АТФ-синтетаза
- 5) Na^+/K^+ -АТФ-аза
- 6) сукцинатдегидрогеназа.

32. Условиями, необходимыми для окислительного фосфорилирования, являются:

- 1) наличие внутренней мембраны митохондрий
- 2) целостность внутренней мембраны митохондрий
- 3) активирование независимой АТФ-синтетазы
- 4) образование электрохимического потенциала не менее 0,2V
- 5) наличие кислорода
- 6) наличие ферментов переноса электронов и протонов.

33. Что представляет собой АТФ-синтетаза:

- 1) интегральный белок внутренней мембраны митохондрий
- 2) интегральный белок наружной мембраны митохондрий
- 3) состоит из двух частей: F_0 и F_1
- 4) состоит из трех частей: F_0 , F_1 и F_2
- 5) активирует биосинтез АТФ из АДФ и H_3PO_4
- 6) активирует биосинтез АТФ из АМФ и двух молекул H_3PO_4 ?

34. Ингибиторами переноса электронов в ЦПЭ от I ферментного комплекса на убихинон являются:

- 1) ротенон
 - 2) цианиды
-

- 3) угарный газ
- 4) барбитураты
- 5) олигомицин
- 6) кислород.

35. Ингибиторами переноса электронов от цитохромоксидазы на кислород в ЦПЭ являются:

- 1) ротенон
- 2) цианиды
- 3) угарный газ
- 4) барбитураты
- 5) олигомицин
- 6) водород.

36. Ингибитором H^+ -зависимой АТФ-азы в ЦПЭ является:

- 1) ротенон
- 2) цианиды
- 3) угарный газ
- 4) барбитураты
- 5) олигомицин
- 6) кислород.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Роль АТФ в организме человека.
 2. Принцип метода количественного определения АТФ в скелетных мышцах.
 3. Субстраты, из которых образуется ПВК в клетках организма.
 4. Биохимические процессы, приводящие к образованию ПВК.
 5. Принцип метода количественного определения ПВК в крови.
 6. Клинико-диагностическое значение определения ПВК в крови.
 7. Количественное содержание ПВК в крови здорового человека.
 8. Сколько ПВК выделяется с мочой за сутки?
-

Глава 6

Гормоны

Гормоны — это химические вещества, выделяемые железами внутренней секреции, которые с кровью переносятся к тканям, органам, клеткам-мишеням и изменяют в них метаболизм и функцию через ферменты.

Железы внутренней секреции:

- 1) эпифиз
- 2) гипоталамус
- 3) гипофиз
- 4) щитовидная железа
- 5) паращитовидные железы
- 6) тимус
- 7) поджелудочная железа
- 8) надпочечники
- 9) половые железы.

6.1. Лабораторная работа

1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ИНСУЛИН

Нормальные значения: 36–180 пмоль/л в плазме.

Опыт 1. Обнаружение инсулина биуретовой реакцией

В пробирку к 5 каплям раствора инсулина прибавляют 5 капель 10%-го раствора едкого натра и 1 каплю 1%-го раствора сернокислой меди. Перемешивают, встряхивают. Наблюдают появление фиолетового окрашивания.

Объяснить механизм реакции, сделать выводы.

Опыт 2. Обнаружение инсулина реакцией с сульфосалициловой кислотой

В пробирку вносят 1 мл раствора инсулина, добавляют 5 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка белого цвета.

Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

Опыт 3. Обнаружение инсулина реакцией Фоля

В термостойкую пробирку вносят 5 капель раствора инсулина, 5 капель 30%-го раствора едкого натра и 1–2 капли 5%-го раствора уксуснокислого свинца. При длительном нагревании жидкость в пробирке буреет и выпадает черный осадок сульфида свинца.

Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

Клинико-диагностическое значение определения инсулина

Повышение концентрации инсулина:

- при нормальной беременности
- сахарный диабет II типа (как правило, в начале заболевания)
- после подкожного введения быстродействующего инсулина
- ожирение
- болезни печени
- акромегалия
- синдром Кушинга
- мышечная дистрофия
- инсулинома
- семейная непереносимость фруктозы и галактозы.

Снижение концентрации инсулина

- длительная физическая нагрузка
- сахарный диабет I типа
- сахарный диабет II типа.

Абсолютные показатели концентрации инсулина часто имеют минимальное диагностическое значение, большее значение имеет тест стимуляции глюкозой. В случае сахарного диабета максимальная концентрация инсулина после введения глюкозы появляется позднее и может быть выше, чем у здоровых людей.

II. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГЛЮКАГОН

Глюкагон — полипептид, поэтому его качественно обнаруживают с помощью биуретовой или нингидриновой реакций, описанных ранее для полипептидов (см. гл. 2). Содержание глюкагона в плазме — 30–210 нг/л.

Клинико-диагностическое значение определения глюкагона

Выделение гормона увеличивается:

- гипогликемия
- голодание
- насыщенный белками рацион питания
- инфузия аминокислот
- интенсивная и длительная физическая работа
- повышение активности адренергической системы.

Повышение концентрации глюкагона

- глюкагонома (опухоль, выделяющая глюкагон)
- сердечная недостаточность
- тяжелые травмы
- кетоацидоз, гиперосмолярная кома при сахарном диабете
- сепсис
- тяжелый панкреатит
- синдром Кушинга
- лечение глюкокортикоидами
- акромегалия
- уремия (снижен распад в почках)
- цирроз печени.

III. РЕАКЦИИ НА АДРЕНАЛИН (в плазме $<0,48$ нмоль/л)

Опыт 4. Качественные реакции обнаружения адреналина

а) Реакция с хлоридом железа (III)

В пробирку вносят 1 мл адреналина (1 : 1000), прибавляют 1 каплю 3%-го раствора хлорида железа (III) и перемешивают. Появляется изумрудно-зеленое окрашивание, затем добавляют 1 каплю 10%-го раствора едкого натра — возникает вишнево-красное окрашивание.

Объясните механизм реакции, сделайте вывод.

б) Реакция с диазореактивом

К 1 мл 1%-ной сульфаниловой кислоты прибавляют 1 мл 5%-го раствора нитрита натрия (получается диазореактив). К диазореактиву добавляют 1,5 мл раствора адреналина (1 : 1000) и 1 мл 10%-го раствора карбоната на-

трия. Перемешивают. Раствор окрашивается в красный цвет.

Объясните механизм реакции, сделайте вывод.

Опыт 5. Количественное определение адреналина по Фолину

Метод основан на фотоколориметрическом определении количества адреналина по интенсивности синего окрашивания, возникающего при взаимодействии с реактивом Фолина. Реактив Фолина содержит соли фосфорновольфрамовой и фосформолибденовой кислот, которые восстанавливаются адреналином с образованием более низких оксидов металлов, комплексы которых окрашены в синий цвет.

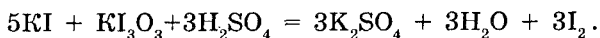
В пробирку на 10 мл помещают 1 мл исследуемого раствора, 4 мл 10%-го свежеприготовленного бикарбоната натрия и 0,5 мл реактива Фолина. Перемешивают. Через 5 минут развивается синее окрашивание. Раствор колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром против раствора бикарбоната натрия. Найдя оптическую плотность, по калибровочной кривой рассчитывают концентрацию адреналина. Если синее окрашивание интенсивное, то производят разведение 10%-ным раствором бикарбоната натрия. Разведение учитывают при расчете.

Повышение концентрации адреналина в крови происходит при стрессах (физических и эмоциональных) и при опухоли мозгового слоя надпочечников — феохромоцитоме.

IV. РЕАКЦИЯ НА ТИРЕОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Опыт 6. Реакция на гормоны щитовидной железы (тироксин) (в плазме тироксин общий — 39–155 нмоль/л)

В фарфоровой ступке измельчают 5 таблеток тиреоидина или 100 мг высушенной щитовидной железы. Образовавшуюся массу переносят в колбу с помощью 5 мл воды, добавляют 5 мл 10%-го раствора едкого калия и кипятят 15 минут на электрической печи с асбестовой сеткой. К 3 мл охлажденного гидролизата добавляют 10%-ный раствор серной кислоты до кислой реакции по лакмусу. Затем приливают 5 капель 1% раствора крахмала и 1 мл раствора йодата калия для окисления йодида калия. Молекулярный йод, который выделяется, даст синее окрашивание с крахмалом.



Сделайте вывод.

Современные количественные методы определения тиреоидных гормонов описаны в «Основы биохимии для медицинских колледжей» в гл. 6.

V. РЕАКЦИИ НА СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Опыт 7. Качественное обнаружение 17-кетостероидов в моче с помощью m-динитробензола (в плазме крови 0,14–0,55 мкмоль/л)

В пробирку помещают 5 капель мочи, 5 капель 30%-го раствора едкого натра и 5 капель 2% спиртового раствора m-динитробензола (в этаноле). Перемешивают. При стоянии появляется красное окрашивание за счет образования продуктов конденсации циклопентанопергидрофенантрена с m-динитробензолом.

Опыт 8. Качественная реакция на кортизол (в плазме утром 138–615, вечером 82–441 нмоль/л)

К 1 мл спиртового раствора кортизола добавляют 0,25 мл раствора гидроксида тетраметиламмония и 0,25 мл раствора синего тетразолия. Содержимое пробирки встряхивают и оставляют в темноте на 25 минут. Жидкость окрашивается в розовый цвет.

Реакция используется при колориметрическом методе для количественного определения содержания кортикостероидов в биологических жидкостях и основана на восстановлении синего тетразолия за счет оксикетонной группы у 17-го углеродного атома циклопентанпергидрофенантренового ядра.

Опыт 9. Качественная реакция на фолликулин (эстрон) с концентрированной серной кислотой

В маленькую пробирку наливают 20 капель спиртового раствора фолликулина и помещают ее в кипящую водяную баню на 5–10 минут для удаления спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 20 капель концентрированной серной кислоты и помещают пробирку вновь в кипящую водяную баню на 5–10 минут. Появляется соломенно-желтое окрашивание, переходящее

при нагревании в оранжевое и имеющее зеленую флюоресценцию. С масляным раствором фолликулина реакцию проводят при комнатной температуре.

Опыт 10. Качественная реакция на ароматическую группу фолликулина

К 2 каплям фолликулина приливают 1 каплю 30%-го раствора щелочи и 1 каплю реактива Фолина. Появляется синее окрашивание, обусловленное наличием фенольной группировки.

6.2. Тест-контроль по теме «Гормоны»

1. Укажите центральные железы эндокринной системы:

- 1) щитовидная железа
- 2) гипоталамус
- 3) поджелудочная железа
- 4) гипофиз (аденогипофиз)
- 5) тимус
- 6) эпифиз.

2. Укажите периферические железы эндокринной системы:

- 1) щитовидная железа
- 2) паращитовидная железа
- 3) поджелудочная железа
- 4) половые железы
- 5) надпочечники
- 6) тимус.

3. Укажите гормоны, выделяемые гипоталамусом:

- 1) кортиколиберин
- 2) тиреолиберин
- 3) соматолиберин
- 4) соматостатин
- 5) гонадолиберин
- 6) меланолиберин.

4. Укажите гормоны, выделяемые аденогипофизом:

- 1) адренотропный гормон
 - 2) тиреотропный гормон
 - 3) гонадотропный гормон
 - 4) соматотропный гормон
 - 5) меланостимулирующий гормон
 - 6) липотропный.
-

5. Укажите гормоны-белки:

- 1) эстрадиол
- 2) глюкагон
- 3) тироксин
- 4) инсулин
- 5) кортизол
- 6) соматотропин.

6. Укажите гормоны-пептиды:

- 1) адrenaлин
- 2) кортизол
- 3) АКТГ
- 4) глюкагон
- 5) прогестерон
- 6) вазопрессин.

7. Укажите гормоны, производные аминокислот:

- 1) инсулин
- 2) кортизол
- 3) тироксин
- 4) адrenaлин
- 5) тестостерон
- 6) эстрадиол.

8. Укажите гормоны-стероиды:

- 1) инсулин
- 2) адrenaлин
- 3) соматотропин
- 4) кортизол
- 5) тестостерон
- 6) глюкагон.

9. В регуляции обмена белков, липидов, углеводов в организме участвуют гормоны:

- 1) альдостерон
- 2) инсулин
- 3) адrenaлин
- 4) глюкагон
- 5) вазопрессин.

10. В регуляции водно-солевого обмена участвуют гормоны:

- 1) соматотропин
 - 2) АКТГ
 - 3) альдостерон
-

- 4) вазопрессин
- 5) глюкагон
- 6) адреналин.

11. В регуляции репродуктивной функции организма участвуют:

- 1) адреналин
- 2) глюкагон
- 3) прогестерон
- 4) тестостерон
- 5) эстрадиол
- 6) эстрон.

12. В регуляции функций эндокринных желез участвуют гормоны:

- 1) кортизол
- 2) соматотропин
- 3) тиреотропин
- 4) гонадотропин
- 5) кальцитонин
- 6) вазопрессин.

13. Влияние инсулина на биохимические показатели в крови:

- 1) повышает содержание глюкозы
- 2) понижает содержание глюкозы
- 3) содержание глюкозы не изменяет
- 4) повышает содержание НЭЖК
- 5) снижает содержание НЭЖК
- 6) содержание НЭЖК не изменяет.

14. Влияние адреналина на биохимические показатели в крови:

- 1) содержание глюкозы не изменяется
- 2) повышает содержание глюкозы
- 3) понижает содержание глюкозы
- 4) содержание НЭЖК не изменяет
- 5) снижение НЭЖК
- 6) повышает содержание НЭЖК.

15. Влияние глюкагона на биохимические показатели крови:

- 1) понижает содержание глюкозы
 - 2) содержание глюкозы не изменяет
-

- 3) повышает содержание глюкозы
- 4) повышает содержание НЭЖК
- 5) снижает содержание НЭЖК
- 6) содержание НЭЖК не изменяет.

16. Какие процессы активизируются в печени под влиянием кортизола:

- 1) гликолиз
- 2) глюконеогенез
- 3) биосинтез гликогена
- 4) распад гликогена
- 5) биосинтез кетоновых тел
- 6) биосинтез белков-ферментов.

17. Какие процессы активизируются в мышцах под влиянием кортизола;

- 1) гликолиз
- 2) биосинтез гликогена
- 3) распад гликогена
- 4) распад аминокислот
- 5) биосинтез белков
- 6) распад белков.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы принципы качественного обнаружения инсулина?
 2. Содержание инсулина в крови.
 3. Клинико-диагностическое значение определения инсулина.
 4. Принципы качественного обнаружения глюкагона.
 5. Содержание глюкагона в плазме крови.
 6. Клинико-диагностическое значение определения глюкагона.
 7. Принципы качественного обнаружения адреналина.
 8. Принцип количественного определения адреналина.
 9. Содержание адреналина в плазме крови.
 10. Принцип качественного обнаружения тиреоидных гормонов.
 11. Содержание общего тироксина в плазме крови.
 12. Принцип качественного обнаружения 17-кетостероидов в моче.
 13. Содержание 17-кетостероидов в плазме крови.
-

14. Принцип качественного обнаружения кортизола.
 15. Содержание кортизола в плазме крови в зависимости от времени суток.
 16. Принципы качественного обнаружения фолликулина (эстрогена).
-

Глава 7

Контроль качества лабораторных исследований

7.1. Контрольные материалы в клинико-биохимических исследованиях

Применение контрольных материалов, контрольных сывороток позволяет своевременно выявить ошибки анализа и принять меры к их устранению, обеспечить аккуратность и точность лабораторных тестов, повысить вероятность получения в лаборатории правильных результатов, которые могут с уверенностью использоваться врачами для постановки диагноза.

Срок годности контрольных сывороток составляет, как правило, не менее 1 года при температуре хранения 2–8 °С. После растворения сыворотку можно хранить в замороженном виде не менее 1 месяца; при температуре 2–8 °С — от трех до семи суток; при комнатной температуре — не более восьми часов. Следует иметь в виду, что самым лабильным ферментом является креатинкиназа. Ее активность сохраняется не более 12 часов при температуре 2–8 °С. Билирубин светочувствителен, поэтому образец сыворотки, предназначенный для его определения, рекомендуется хранить в темном флаконе.

При работе с лиофильно высушенными контрольными сыворотками следует соблюдать следующие правила:

1. Открывать флакон осторожно. Лиофильная масса находится под вакуумом, и при резком впуске воздуха во флакон может происходить потеря материала.
 2. При растворении контрольной сыворотки использовать дистиллированную свежеекипяченную и охлажденную воду.
-

3. Для растворения сыворотки и при отборе аликвоты в ходе анализа использовать проверенные пипетки и автоматические дозаторы.
4. Не допускать интенсивного встряхивания флакона, так как при вспенивании раствора может происходить инактивация ферментов.
5. После растворения сыворотку выдержать при комнатной температуре в течение времени, указанного в инструкции для каждой конкретной сыворотки. Обратить внимание на раздел «Замечания» в инструкции, где описаны особенности подготовки сыворотки для анализа некоторых компонентов (например, щелочной фосфатазы).
6. При замораживании происходит концентрирование ферментов, входящих в состав сыворотки, на дне флакона. Поэтому при использовании замороженной сыворотки необходимо после ее оттаивания несколько раз перевернуть флакон для перемешивания раствора.
7. После растворения сыворотку разлить небольшими порциями в чистые флаконы и тщательно укупорить. При анализе аликвоты сыворотки отбирать, используя каждый раз новый наконечник для автоматического дозатора. Это позволит предотвратить бактериальное загрязнение и снижение стабильности сыворотки.
8. Не следует использовать контрольную сыворотку с истекшим сроком годности или сыворотку, хранящуюся в условиях, не соответствующих требованиям инструкции.

Для оценки воспроизводимости анализов помимо коммерческих контрольных сывороток используют сливные сыворотки, которые можно приготовить в лаборатории. Очевидным достоинством сливной сыворотки является ее доступность и дешевизна. Однако она недостаточно стабильна, а многократное замораживание и оттаивание приводит к изменению содержания исследуемых компонентов. Для повышения сохранности слитой сыворотки при ее приготовлении иногда добавляют этиленгликоль. Этиленгликоль стабилизирует концентрацию биологических компонентов в процессе длительного хранения за счет бактериостатического действия и снижения точки замерзания водных растворов, что позволяет сохранить конт-

рольный материал в жидком состоянии при температуре до минус 15 °С.

Сливная сыворотка — это обычно сыворотка с нормальными концентрациями компонентов. Для контроля правильности проведения анализа во всем диапазоне линейной области определения в лаборатории необходимо иметь также контрольную сыворотку с высокими патологическими концентрациями компонентов.

Способами определения правильности могут быть следующие:

- 1) Способ добавки — внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества и определение его с помощью исследуемого метода.
- 2) Способ смешения проб — пробы биологической жидкости с низкой и высокой концентрацией исследуемого вещества смешиваются в разных соотношениях.
- 3) Сравнение с методом, правильность которого установлена (референтный метод).
- 4) Исследование контрольного материала (контрольной сыворотки или калибровочных образцов) с известным содержанием компонентов — наиболее простой способ оценки правильности. Однако для этого следует использовать только те контрольные материалы, в которых исследуемый компонент определен тем же методом, что и проверяемый. Кроме того, следует обращать внимание на сроки годности контрольного материала (не просрочены ли они) и соблюдение условий его хранения.

Результаты исследования контрольного материала используются для построения контрольных карт. Контрольная карта строится для каждого определяемого компонента и представляет собой систему координат, на оси абсцисс которой откладывают дни исследований, а на оси ординат — концентрацию компонента в исследуемых единицах. Через середину оси ординат и параллельно оси абсцисс проводят прямую, обозначающую среднюю арифметическую величину, а вверх и вниз от этой прямой чертят параллельные линии, обозначающие контрольные пределы ($\bar{x}_{cp} \pm 2S$). Каждый результат, полученный в дальнейшем при исследовании контрольного материала той же серии, отмечают на карте в виде точки и используют

для оценки воспроизводимости результатов данного компонента.

Двойное среднеквадратическое отклонение ($\pm 2S$) обычно считается пределом точности анализа.

Контрольная карта



7.2. Тест-контроль по теме «Контроль качества лабораторных исследований»

1. Результаты лабораторных исследований необходимы врачу-клиницисту для:

- 1) постановки дифференциального диагноза
- 2) выбора метода лечения
- 3) контроля за правильностью назначенного лечения
- 4) прогноза заболевания
- 5) служат критерием излеченности патологического процесса
- 6) все перечисленное верно.

2. На результаты анализа могут повлиять следующие факторы внелабораторного характера:

- 1) физическое и эмоциональное напряжение больного
- 2) циркадные ритмы

- 3) положение тела
 - 4) влияние климата
 - 5) прием медикаментов
 - 6) все перечисленные
3. На результаты анализа могут влиять следующие факторы внутрилабораторного характера:
- 1) условия хранения пробы
 - 2) используемые методы исследования
 - 3) характер пипетирования
 - 4) гемолиз
 - 5) липемия
 - 6) все перечисленные.
4. При взятии материала от пациента для лабораторного анализа необходимо учитывать:
- 1) положение тела
 - 2) обеспечение достаточного для исследования количества материала
 - 3) соотношение кровь/антикоагулянт
 - 4) время принятия пищи пациентом
 - 5) время взятия материала
 - 6) все перечисленное.
5. Внутрилабораторные погрешности связаны:
- 1) с низкой квалификацией персонала
 - 2) с недобросовестным отношением к работе
 - 3) с неправильными расчетами, ошибками при приготовлении реактивов
 - 4) с использованием устаревшего оборудования
 - 5) с использованием малочувствительных неспецифических методов
 - 6) все перечисленное верно.
6. Принципы проведения внутрилабораторного контроля качества:
- 1) систематичность
 - 2) охват всей области изменения теста
 - 3) включение контроля в обычный ход работы
 - 4) повседневность
 - 5) все перечисленное верно
 - 6) верно из перечисленных лишь 3.
-

7. Внелабораторные погрешности связаны с:

- 1) неправильным приготовлением реактивов
- 2) плохим качеством приборов
- 3) использованием неточного метода
- 4) нарушением условий хранения проб
- 5) неправильной подготовкой пациента
- 6) ошибками при расчете.

8. Основное требование межлабораторного контроля качества:

- 1) анализ контрольных проб проводится отдельно от анализируемых проб
- 2) анализ контрольных проб проводится заведующим лабораторией
- 3) анализ контрольных проб включается в обычный ход работы лаборатории
- 4) проводится любым лаборантом
- 5) проводится экспертами специальных лабораторий
- 6) все перечисленное верно.

9. Поверка средств измерений — это

- 1) определение характеристик измерений любой организацией, имеющей более точные измерительные устройства, чемверяемое
- 2) калибровка аналитических приборов по точным контрольным материалам
- 3) совокупность операций, выполняемых органами государственной метрологической службы с целью определения и подтверждения соответствия средства измерения установленным техническим требованиям
- 4) совокупность операций, выполняемых организациями с целью определения и подтверждения соответствия средства измерения современному уровню
- 5) калибровка приборов лаборантом
- 6) калибровка приборов медицинским техником.

10. Воспроизводимость измерения — это качество измерения, отражающее:

- 1) близость результатов к истинному значению измеряемой величины
 - 2) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях
-

- 3) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- 4) близость к нулю систематических ошибок в их результатах
- 5) все перечисленное, кроме 3, 4
- 6) все перечисленное.

11. Для достижения воспроизводимых результатов лабораторных анализов нужно иметь:

- 1) обученный персонал
- 2) современные средства дозирования
- 3) автоматизированные анализаторы
- 4) оборудованные рабочие места
- 5) компьютер
- 6) все перечисленное.

12. На воспроизводимость результатов исследований влияет:

- 1) центрифугирование
- 2) пипетирование
- 3) осаждение
- 4) изменение pH буфера
- 5) изменение температуры
- 6) все перечисленное.

13. Сходимость измерения — это качество измерения, отражающее:

- 1) близость результатов к истинному значению измеряемой величины
- 2) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях
- 3) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- 4) близость к нулю систематических ошибок в их результатах
- 5) все перечисленное
- 6) все перечисленное, кроме 1, 4.

14. Точность измерения — это качество измерения, отражающее:

- 1) близость результатов к истинному значению измеряемой величины
 - 2) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях
-

- 3) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- 4) близость к нулю систематических ошибок в их результатах
- 5) все перечисленное, кроме 3 и 4
- 6) все перечисленное.

15. Погрешностью результата измерений называется:

- 1) отклонение результатов последовательных измерений одной и той же пробы
- 2) разность показаний двух разных приборов, полученная на одной и той же пробе
- 3) отклонение результатов измерений от истинного (действительного) значения
- 4) разность показаний двух однотипных приборов, полученная на одной и той же пробе
- 5) отклонение результатов измерений одной и той же пробы с помощью различных методик
- 6) близость к нулю систематических ошибок в их результатах.

16. Правильность измерения — это качество измерения, отражающее:

- 1) близость результатов к истинному значению измеряемой величины
- 2) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях
- 3) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- 4) близость к нулю систематических ошибок в их результатах
- 5) все перечисленное
- 6) все перечисленное, кроме 2.

17. Контрольная карта — это:

- 1) перечень нормативных величин
 - 2) порядок манипуляций при проведении анализа
 - 3) схема расчета результатов
 - 4) графическое изображение сопоставимых измеряемых величин по мере их получения
 - 5) план проведения исследования
 - 6) план организации рабочего места.
-

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы особенности работы с лиофилизированными контрольными сыворотками?
 2. Укажите срок хранения контрольных сывороток при различных температурах.
 3. В чем преимущества и недостатки при работе со сливными сыворотками?
 4. Перечислите способы определения правильности проведенного биохимического исследования.
 5. Принцип составления контрольных карт.
 6. Каково назначение контрольных карт?
-

Глава 8

Обмен углеводов в норме и патологии

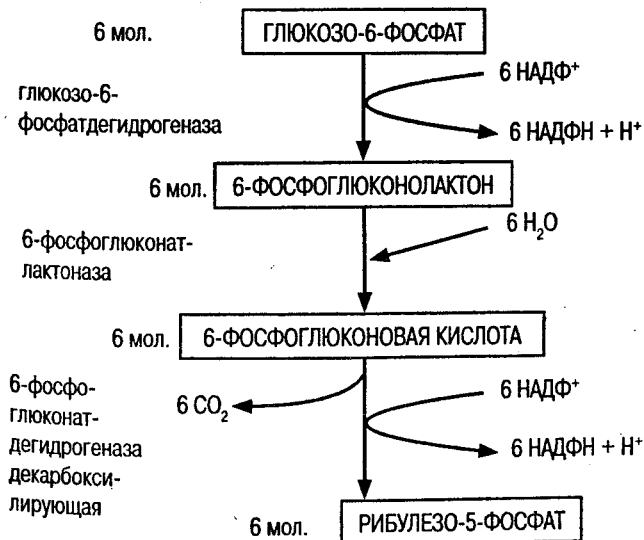
Обмен углеводов в организме человека включает 8 основных процессов:



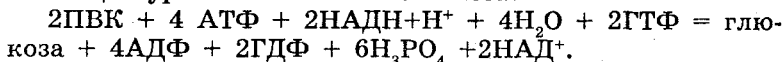
Схемы процессов 2, 3, 4, 7, 8 приведены и подробно описаны в «Основы биохимии для медицинских колледжей» (2003 г., «Феникс») (гл. 5 и 8).

Схема пентозофосфатного (апотомического) пути (ПОП) превращения глюкозы

І. Окислительная ветвь



Общее уравнение глюконеогенеза:



8.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Определение концентрации глюкозы в крови бензокаиновым методом

Концентрация глюкозы определяется по оптической плотности окрашенного раствора, образующегося при взаимодействии глюкозы, содержащейся в безбелковом фильтрате крови, с бензокаиновым реактивом.

ХОД РАБОТЫ

1. 0,1 мл безбелкового фильтрата крови переносят микропипеткой в сухую пробирку, приливают 2 мл бензокаинового реактива с помощью градуированной пробирки (соблюдать осторожность, так как реактив содержит концентрированную уксусную кислоту), нагревают в кипящей водяной бане 15 мин. Развивается желто-коричневая окраска.

2. После охлаждения раствора определяют его оптическую плотность на фотоэлектроколориметре против дистиллированной воды при синем светофильтре, в кюветах толщиной 5 мм. Используя калибровочный график, построенный по стандартному раствору глюкозы, определяют концентрацию глюкозы в исследуемой крови.

3. Делают заключение о количестве глюкозы в исследуемой пробе крови.

Содержание глюкозы в крови здорового человека составляет 3,3–5,5 ммоль/л.

Опыт 2. Исследование функции поджелудочной железы методом сахарной нагрузки

Определение количества глюкозы в крови имеет огромное значение. Оно производится для диагностики сахарного диабета.

Цель работы — проследить за содержанием глюкозы в крови в динамике после сахарной нагрузки, т. е. изучить толерантность организма к глюкозе.

ХОД РАБОТЫ

1. Натощак берут кровь и определяют в ней содержание глюкозы бензокаиновым методом.

2. Затем дают выпить раствор глюкозы или тростникового сахара из расчета 1,0–1,5 г на 1 кг массы тела обследуемого.

3. Через 30, 60 и 120 мин после приема сахара снова определяют содержание глюкозы бензокаиновым способом: 0,1 мл безбелкового фильтрата крови переносят микропипеткой в чистую сухую пробирку, приливают 2 мл бензокаинового реактива с помощью градуированной пробирки (соблюдать осторожность, так как реактив содержит уксусную кислоту), нагревают в кипящей водяной бане 15 мин. Развивается желто-коричневое окрашивание. После охлаждения раствора определяют его оптическую плотность на фотоэлектроколориметре против дистиллированной воды при светофильтре № 4. Используя калибровочный график, построенный по стандартному раствору глюкозы, определяют концентрацию глюкозы в исследуемой крови.

4. Результаты вносят в таблицу и на их основании строят сахарные кривые, откладывая на оси абсцисс время взятия крови, а на оси ординат — найденное содержание сахара в крови (ммоль/л):

Метод количественного определения глюкозы	Масса принятой глюкозы	Концентрация глюкозы в крови			
		До нагрузки глюкозой	после нагрузки глюкозой		
			через 30 мин.	через 60 мин.	через 120 мин.

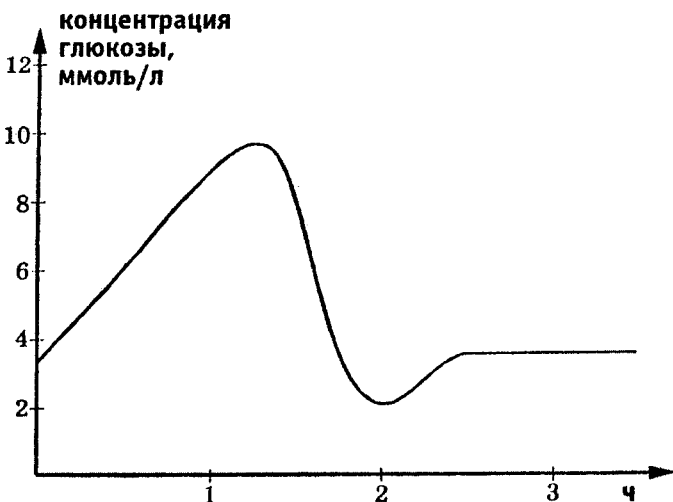
При анализе сахарных кривых обращают внимание на следующие параметры:

- а) начальное содержание сахара в крови;
- б) быстроту и высоту подъема;
- в) продолжительность гипергликемии и характер ее снижения.

Кривая здорового человека отличается быстрым подъемом, максимальный подъем наблюдается около 30 мин, количество сахара может при этом удвоиться. При сахарной болезни уровень сахара в крови возрастает дольше и достигает максимума через 30–60 мин или еще позднее, причем достигает очень высоких цифр — до 14 ммоль/л и более.

Понижение кривой имеет также диагностическое значение. У здоровых людей количество сахара уменьшается быстро и через 1,5–2,5 ч возвращается к исходной величине, а иногда оказывается и ниже ее. При диабете повышение держится 5–7 ч и возвращается к исходной величине очень медленно. При сахарном диабете происходит снижение толерантности организма к глюкозе.

**Динамика изменений концентрации глюкозы в крови
в норме**



Сделать заключение о толерантности данного пациента к глюкозе.

8.2. Тест-контроль по теме**«Обмен углеводов в норме и патологии»**

1. В переваривании углеводов в ЖКТ участвуют ферменты:
 - 1) α -амилаза слюны
 - 2) панкреатическая α -амилаза
 - 3) амило-1,6-глюкозидаза
 - 4) олиго-1,6-глюкозидаза
 - 5) мальтаза
 - 6) изомальтаза.
 2. Клетки — мишени для инсулина имеются в следующих органах и тканях:
 - 1) мозг
 - 2) сердце
 - 3) скелетные мышцы
 - 4) жировая ткань
 - 5) почки
 - 6) легкие.
 3. В организме глюкозо-6-фосфат используется для биосинтеза:
 - 1) гликогена
 - 2) аминокислот
 - 3) лактата
 - 4) пирувата
 - 5) пентоз
 - 6) ВЖК.
 4. Инсулин влияет на биосинтез гликогена:
 - 1) активируя глюкокиназу в печени
 - 2) активируя гексокиназу в мышцах
 - 3) ингибируя гексокиназу в мышцах
 - 4) ингибируя глюкокиназу в печени
 - 5) активируя гликогенсинтазу
 - 6) ингибируя гликогенсинтазу.
 5. Кортизол влияет на углеводный обмен следующим образом:
 - 1) тормозит синтез гликогена и активирует его распад в мышцах
 - 2) в печени — усиливает биосинтез гликогена
 - 3) понижает уровень глюкозы в крови
 - 4) повышает уровень глюкозы в крови
-

- 5) усиливает глюконеогенез в печени
 - 6) усиливает гликолиз в скелетных мышцах.
- 6. Процесс гликолиза локализован в цитозоле клеток:**
- 1) печени
 - 2) мышц
 - 3) в эритроцитах
 - 4) сердце
 - 5) жировой ткани
 - 6) в почках.
- 7. Регуляторными ферментами гликолиза являются:**
- 1) гексокиназа
 - 2) глюкокиназа
 - 3) глюкозо 6-фосфат изомеразы
 - 4) фосфофруктокиназа
 - 5) пируваткиназа
 - 6) фосфоглицераткиназа.
- 8. Анаэробный гликолиз протекает:**
- 1) в мышцах при усиленной работе
 - 2) в мышцах в состоянии покоя
 - 3) в сердце при недостаточном кровообращении или гипоксии
 - 4) в злокачественных опухолях
 - 5) в эритроцитах
 - 6) в печени.
- 9. Положительными аллостерическими модуляторами гликолиза являются:**
- 1) АМФ
 - 2) АДФ
 - 3) фруктозо-1,6-дифосфат
 - 4) цитрат
 - 5) АТФ
 - 6) НАДН+H⁺.
- 10. Инсулин активирует гликолиз, активируя ферменты:**
- 1) фосфофруктокиназу
 - 2) фосфоглицераткиназу
 - 3) гликогенсинтазу
 - 4) гексокиназу
 - 5) пируваткиназу
 - 6) енолазу.
-

- 11. Восстановленные эквиваленты, образующиеся в окислительной ветви ПФП НАДФН + H⁺, поступают на следующие процессы:**
- 1) синтез ВЖК
 - 2) глюконеогенез
 - 3) синтез холестерина
 - 4) восстановление метгемоглобина до гемоглобина
 - 5) гидроксилирование в организме
 - 6) предохранение мембран от окисления.
- 12. Неокислительная ветвь ПФП поставляет пентозы, идущие на биосинтез:**
- 1) нуклеиновых кислот
 - 2) АТФ
 - 3) ГТФ
 - 4) ц-АМФ
 - 5) ВЖК
 - 6) ЦТФ.
- 13. При сахарном диабете происходят следующие нарушения обмена углеводов:**
- 1) активирован гликолиз
 - 2) ингибирован гликолиз
 - 3) активирован глюконеогенез
 - 4) ингибирован глюконеогенез
 - 5) снижен биосинтез гликогена
 - 6) повышен уровень глюкозы в крови.
- 14. Сахарный диабет характеризуется следующими биохимическими симптомами:**
- 1) гипергликемия
 - 2) гипогликемия
 - 3) кетонурия и кетонемия
 - 4) азотемия и азотурия
 - 5) полидипсия и полиурия
 - 6) ацидоз.
- 15. Пентозофосфатный путь протекает в цитозоле клеток:**
- 1) жировой ткани
 - 2) коры надпочечников
 - 3) сетчатки глаза
 - 4) лактирующей молочной железы
 - 5) в эритроцитах
 - 6) в быстро растущей эмбриональной ткани.
-

16. Глюконеогенез локализован в следующих органах и тканях:

- 1) в скелетных мышцах
- 2) в печени
- 3) в корковом слое надпочечников
- 4) в слизистой кишечника
- 5) в жировой ткани
- 6) в эритроцитах.

17. Интенсивность глюконеогенеза возрастает при следующих состояниях:

- 1) голодание
- 2) сахарный диабет
- 3) избыток углеводов в пище
- 4) избыток липидов в пище
- 5) интенсивность глюконеогенеза всегда постоянна
- 6) снижается при сахарном диабете.

18. Субстратами глюконеогенеза являются:

- 1) лактат
- 2) пируват
- 3) оксалоацетат
- 4) α -кетоглутарат
- 5) сукцинат, глицерин
- 6) ацетил-КоА.

19. Регуляторными ферментами глюконеогенеза являются:

- 1) пируваткарбоксилаза
- 2) малатдегидрогеназа
- 3) фосфоенолпируваткарбоксикиназа
- 4) фруктозо-1,6-дифосфатаза
- 5) глюкозо-6-фосфатаза
- 6) изомеразы.

20. Положительными модуляторами глюконеогенеза являются:

- 1) АДФ
 - 2) АМФ
 - 3) АТФ
 - 4) цитрат
 - 5) Mg^{2+}
 - 6) ацетил-КоА.
-

21. Адреналин влияет на обмен углеводов следующим образом:

- 1) активизирует распад гликогена по каскадному механизму через ц-АМФ
- 2) усиливает глюконеогенез
- 3) снижает глюконеогенез
- 4) активизирует гликолиз
- 5) повышает уровень глюкозы в крови
- 6) снижает уровень глюкозы в крови.

22. Причинами гипергликемии являются:

- 1) сахарный диабет
- 2) поступление избытка углеводов с пищей (алиментарная)
- 3) стресс
- 4) опухоль мозгового слоя надпочечников
- 5) панкреатиты
- 6) гепатиты.

23. Причины гипергликемии:

- 1) клетки не используют глюкозу из крови
- 2) гликолиз ингибирован
- 3) биосинтез гликогена повышен
- 4) биосинтез гликогена снижен
- 5) ЦТК нарушен
- 6) глюконеогенез активирован.

24. При сахарном диабете возникают следующие нарушения КОС:

- 1) ацидоз респираторный
- 2) ацидоз метаболический
- 3) алкалоз респираторный
- 4) алкалоз метаболический
- 5) не изменяется кислотно-основное состояние крови
- 6) алкалоз метаболический некомпенсированный.

25. Причинами гипогликемии могут явиться:

- 1) голодание
 - 2) панкреатиты или опухоли поджелудочной железы
 - 3) поражение гипофиза
 - 4) беременность и лактация
 - 5) поражение щитовидной железы
 - 6) передозировка инсулина.
-

26. При голодании во 2-й фазе наблюдаются следующие нарушения углеводного обмена:

- 1) глюконеогенез усилен
- 2) распад белков усилен
- 3) клетки перестают поглощать глюкозу из крови
- 4) биосинтез кетоновых тел усилен
- 5) биосинтез гликогена усилен
- 6) биосинтез кетоновых тел снижен.

27. К врожденным нарушениям углеводного обмена относятся:

- 1) фруктоземия
- 2) галактоземия
- 3) дефект ферментов пентозо-фосфатного пути
- 4) гликогенозы
- 5) гликозидозы
- 6) агликогенозы.

28. При гипоксических состояниях происходит:

- 1) накопление $\text{НАДН} + \text{H}^+$
- 2) накопление $\text{НАДФН} + \text{H}^+$
- 3) ингибирование ЦТК
- 4) угнетение гликолиза
- 5) нарушение биосинтеза АТФ
- 6) усиление гликолиза.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каково содержание глюкозы в крови практически здорового человека?
 2. Принцип количественного определения глюкозы в крови бензокаиновым методом.
 3. Принцип исследования функции поджелудочной железы в углеводном обмене.
 4. Принцип построения кривой методов сахарной нагрузки.
 5. Охарактеризуйте кривую сахарной нагрузки здорового человека.
 6. Охарактеризуйте кривую сахарной нагрузки при сахарном диабете.
-

Глава 9

Обмен белков в норме и патологии

Схема промежуточного обмена белков (аминокислот) в организме человека

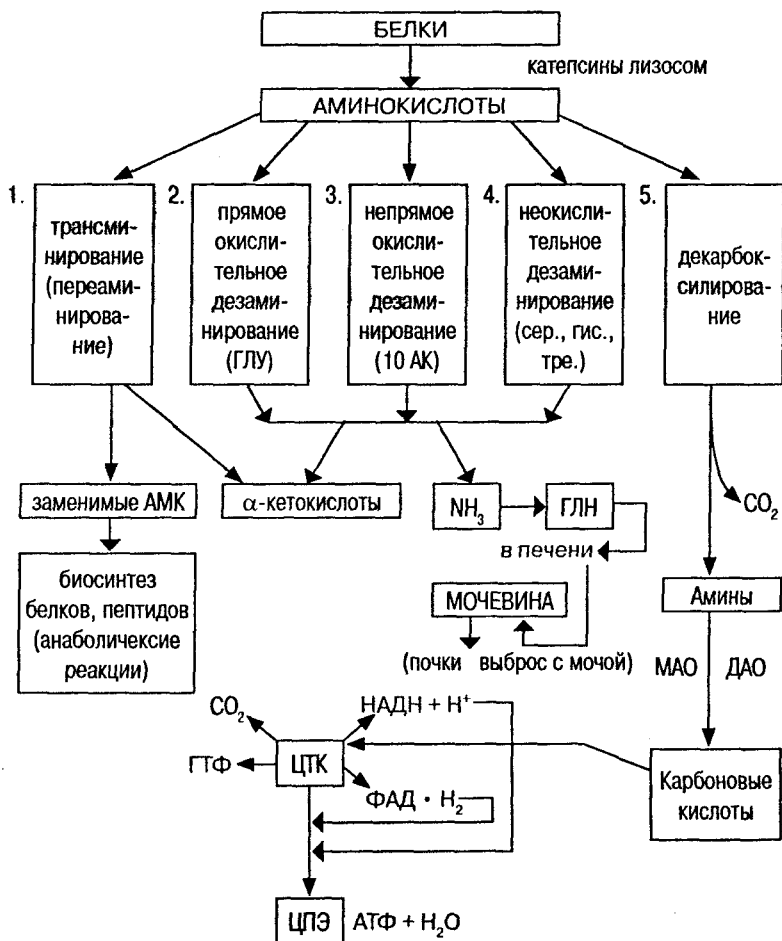
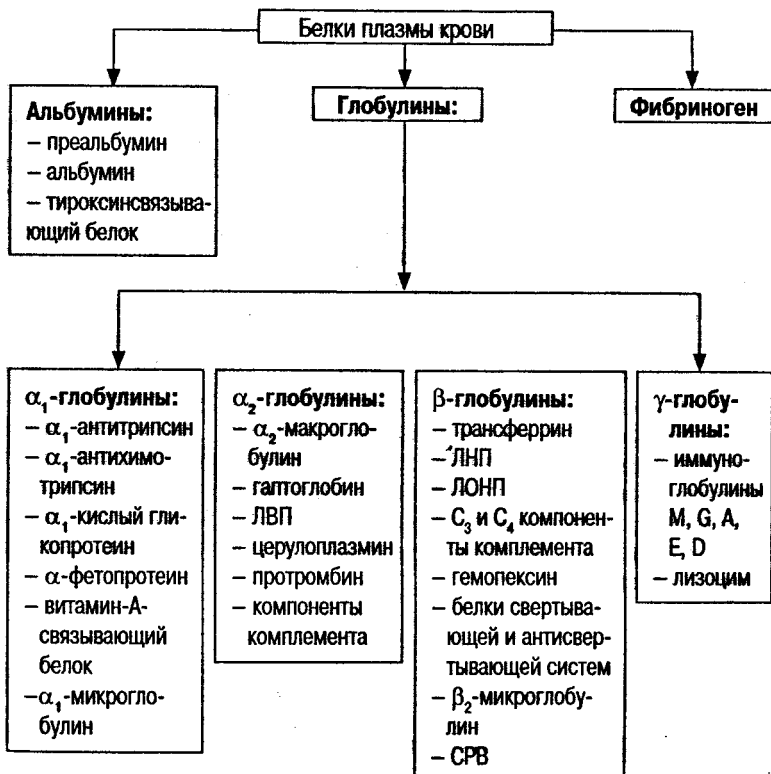


Схема
«Основные представители фракций белков плазмы крови»



К белкам плазмы крови относится группа белков, удовлетворяющих следующим требованиям:

- содержатся в плазме крови;
- синтезируются в печени или ретикулоэндотелиальной системе (реже в специализированных тканях);
- проявляют основную функцию в пределах сосудистой системы;
- в кровь секретируются, а не попадают в результате повреждения тканей;
- находятся в плазме в концентрации большей, чем в других биологических жидкостях;

- могут проявлять генетически обусловленный полиморфизм или иметь варианты формы, но это не связано с их тканевым происхождением;
- не являются продуктами катаболического протеолиза в плазме, но могут быть продуктами ограниченного протеолиза;
- имеют большее время биологического полураспада в плазме, чем время транспорта по крови.

Концентрация общего белка в сыворотке зависит главным образом от синтеза и распада двух основных белковых фракций — альбумина и глобулина. Количественные изменения остальных белков сыворотки не оказывают существенного воздействия на концентрацию общего белка. Альбумин синтезируется главным образом в печени, глобулины — в лимфоцитах. Распад белков плазмы происходит во всех тканях пропорционально их метаболической активности. Белки сыворотки поддерживают объем крови, создавая онкотическое давление, транспортируют многие вещества (альбумин), обеспечивают иммунологическую сопротивляемость и воспалительную реакцию (глобулины), выполняют много других функций как гормоны, ферменты, биологически активные вещества, регуляторы энзимов.

9.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Количественное определение общего белка сыворотки крови с помощью биуретовой реакции с использованием диагностического набора «ЭКОлаб» (Россия)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения содержания общего белка в сыворотке или плазме крови в клинико-диагностических и биохимических лабораториях.

Набор рассчитан на анализ 100 проб при расходе 5,0 мл биуретового реактива на анализ одной пробы.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ионы меди в щелочной среде взаимодействуют с пептидными связями белков сыворотки крови с образованием комплекса красного цвета (биуретовая реакция), оптическая плотность которого при 546 нм прямо пропорциональна концентрации общего белка в сыворотке (плазме) крови.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1. Концентрат биуретового реактива (100 мл) — 1 флакон.

Содержит:

- натрия гидроокись — 0,5 моль/л;
- сернокислую медь — 30 ммоль/л;
- калий-натрий виннокислый — 80 ммоль/л;
- калий иодистый — 75 ммоль/л.

Реагент 2. Калибратор (3 мл) — 1 флакон.

Калибровочный раствор сывороточного человеческого альбумина в физиологическом растворе, стабилизированный азидом натрия 0,095%, концентрация белка 60 г/л.

ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка или плазма крови.

ОБОРУДОВАНИЕ

Спектрофотометр (длина волны 546 нм, кювета 1 см) или фотоэлектроколориметр (зеленый светофильтр, длина волны 530–570 нм, кювета 1 см).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

1. Приготовление рабочего биуретового реактива.

Содержание флакона с реагентом 1 перенести в мерную колбу вместимостью 500 мл и довести дистиллированной водой до метки.

Раствор стабилен при хранении в темном месте в плотно закупоренной пластиковой посуде при температуре 15–25 °C в течение 12 месяцев.

2. Калибратор готов к использованию.

После вскрытия флакона калибратор стабилен при хранении при температуре 2–8 °C до срока годности набора.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В пробирки внести реагенты по следующей схеме:

	Опытная проба, мл	Холостая проба, мл	Калибровочная проба, мл
Рабочий раствор реагента	5,0	5,0	5,0
Калибратор	—	—	0,1
Исследуемый образец	0,1	—	—
Вода дистиллированная	—	0,1	—

Примечание: При использовании кюветы меньшего объема расход реагентов может быть уменьшен при сохранении указанных выше соотношений.

Содержимое пробирок тщательно перемешать, избегая образования пены, выдержать при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 30 минут и измерить на спектрофотометре при длине волны 548 нм или фотоэлектроколориметре при длине волны в интервале 530-570 нм (зеленый светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы.

Окраска стабильна в течение 1 часа.

РАСЧЕТ

Расчет содержания белка производится по следующей формуле:

$$C = \frac{A_0}{A_k} \times 60 ,$$

где С — содержание белка в пробе, г/л;

A_0 — оптическая плотность опытной пробы;

A_k — оптическая плотность калибровочной пробы;

60 — содержание белка в калибраторе, г/л.

Если оптическая плотность опытной пробы превышает 0,700, необходимо развести образец 0,9% раствором хлористого натрия в соотношении 1:1 и повторить анализ (результат умножить на 2).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Линейность — в интервале от 20 г/л до 100 г/л.

Воспроизводимость — коэффициент вариации — не более 3%.

Для оценки качества набора можно использовать контрольные сыворотки, аттестованные по данному методу.

Срок годности набора — 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Нормальные значения содержания белка в сыворотке или плазме крови:

взрослого человека — 65–85 г/л

новорожденных до 1 месяца — 44–76 г/л

детей до 1 года — 51–73 г/л

детей старше 1 года — 60–80 г/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон нормальных величин.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или другой возбудитель вирусной инфекции, поэтому при работе следует надевать резиновые перчатки.

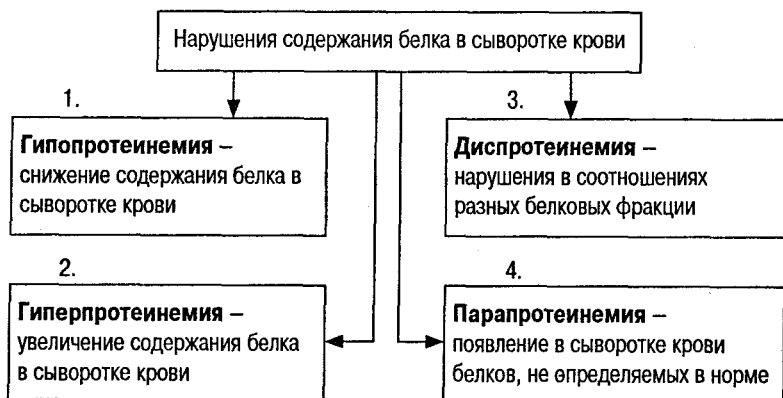
Биуретовый реактив содержит щелочь. При попадании его на кожу или слизистые немедленно смыть большим количеством воды.

Реагент 2 содержит азид натрия в качестве стабилизатора. Избегать контакта с кожей и слизистыми. Работать в резиновых перчатках.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Срок годности набора — 12 мес. со дня приемки ОБТК предприятия-изготовителя.

Хранить набор в сухом месте при 2–8 °С.

Схема «Нарушения содержания белка в сыворотке крови»**ПРИЧИНЫ РАЗВИТИЯ**

1. гипопроотеинемии являются следующие состояния:
 - 1) недостаточное поступление белков с пищей;
 - 2) нарушения усвоения белков (снижение активности ферментов желудочно-кишечного тракта и др.);
 - 3) понижение процессов биосинтеза белка (поражение паренхимы печени);
 - 4) потеря белка организмом: с мочой, кровью и др.
2. гиперпротеинемии (до 120 г/л и выше) при миеломной болезни (белки Бенс-Джонса), макроглобулинемии, хронических воспалительных процессах, обширных ожогах, обезвоживании организма;
3. диспротеинемии — нарушения соотношений белковых фракций наблюдаются при многих заболеваниях;
4. парапротеинемии — состояния, характеризующиеся появлением в сыворотке крови белков, не определяющихся в норме (обнаружение белков Бенс-Джонса при миеломной болезни, α -фетопротеина при первичном раке печени, антистрептолизина, антистрептокиназы и антистрептогиалуронидазы при ревматизме и т.д.).

Дис- и парапротеинемии определяются с помощью различных видов электрофореза (на пленке из ацетата целлюлозы, геле агарозы, полиакриламидном геле и пр.) и

методами, основанными на использовании антител к индивидуальным белкам (иммунохимические методы).

**Опыт 2. Определение мочевины в сыворотке крови
и в моче по цветной реакции
с диацетилмонооксимом (можно использовать
готовые диагностические наборы)**

Принцип метода

Мочевина в кислой горячей среде образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа окрашенный в розовый цвет комплекс. Интенсивность окрашивания пропорциональна уровню азота мочевины в исследуемой пробе.

РЕАКТИВЫ

1. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);
2. 2,5%-ный водный раствор диацетилмонооксима. Реактив стоек;
3. 0,25%-ный водный раствор тиосемикарбазида или 0,32%-ный водный раствор солянокислого тиосемикарбазида. Оба реактива стабильны при хранении в посуде из темного стекла при комнатной температуре;
4. Концентрированная серная кислота;
5. 85%-ная ортофосфорная кислота;
6. Раствор хлорида железа (FeCl_3).

Сначала готовят основной (5%) раствор хлорида железа: 5 г кристаллогидрата хлорида железа ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 95 мл дистиллированной воды и подкисляют добавлением 1 мл концентрированной серной кислоты. Из основного раствора готовят рабочий раствор хлорида железа: 1 мл основного раствора хлорида железа доводят до 100 мл дистиллированной водой, затем добавляют 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Раствор стабилен в течение 2 недель при хранении в посуде из темного стекла.

7. 0,2%-ный раствор бензойной кислоты: 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды при интенсивном перемешивании на водяной бане.

8. 7 мМ стандартный раствор мочевины: 42 мг мочевины растворяют в 100 мл 0,2%-го раствора бензойной кислоты. 1 мл стандартного раствора содержит 0,007 ммоль

мочевины. Стандарт, приготовленный на растворе бензойной кислоты, более стабилен, чем водный.

9. Цветной реактив: к 30 мл рабочего раствора хлорида железа добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5%-го раствора диацетилмонооксида и 0,25 мл 0,25%-го раствора тиосемикарбазида. Цветной реагент готовят каждый раз перед употреблением.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сыворотка крови или суточная моча.

Мочу необходимо предварительно профильтровать и развести физиологическим раствором в соотношении 1:25 или 1:50.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В центрифужную пробирку вносят 0,8 мл дистиллированной воды и 0,2 мл сыворотки (или разведенной мочи), добавляют 1 мл 10%-го раствора ТХУ, тщательно перемешивают и через 15–20 мин центрифугируют.

В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости и 5 мл цветного реагента. Пробирку выдерживают 20 мин в кипящей водяной бане и немедленно охлаждают под струей холодной водопроводной воды.

Фотометрируют при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) против контрольной пробы в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Контрольную пробу обрабатывают так же, как опытную, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл дистиллированной воды. В стандартную пробу вносят вместо сыворотки 0,2 мл стандартного раствора мочевины.

РАСЧЕТ

Содержание мочевины в сыворотке крови рассчитывают по формуле:

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

где $C_{\text{моч.}}$ — концентрация мочевины в исследуемой пробе, ммоль/л;

$E_{\text{оп.}}$ — экстинкция опытной пробы;

$E_{\text{ст.}}$ — экстинкция стандартной пробы;

$C_{\text{ст.}}$ — концентрация мочевины в стандартном растворе, 7 ммоль/л.

Количество мочевины в суточной моче рассчитывают по формуле:

$$M_{\text{сут.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{оп.}} \cdot V \cdot K}{E_{\text{ст.}} \cdot v}, \text{ где}$$

$M_{\text{сут.}}$ — количество мочевины в суточной моче, ммоль/сут;
 $E_{\text{оп.}}$ — экстинкция опытной пробы,
 $E_{\text{ст.}}$ — экстинкция стандартной пробы,
 $C_{\text{ст.}}$ — концентрация мочевины в стандартном растворе, ммоль/л;

V — суточное количество мочи, в мл;

v — количество мочи, взятое для анализа, мл;

K — коэффициент разведения мочи.

МОЧЕВИНА в сыворотке крови

Нормальные значения: 2,5–8,3 ммоль/л.

Мочевина является основным азотсодержащим конечным продуктом катаболизма белков. Она синтезируется в печени, легко проходит через все мембраны клеток и поэтому равномерно распределяется практически во всех пространствах организма. Концентрация мочевины в крови зависит от скорости образования в печени и удаления почками. У большинства пациентов скорость образования мочевины отражает скорость утилизации и распада клеточного белка. У некоторых больных скорость образования мочевины ограничена. При тяжелой патологии печени способность гепатоцитов синтезировать мочевины нарушается. Аммиак накапливается, а мочевина снижается. В почках мочевина полностью фильтруется, 40–50% ее реабсорбируется в почечных канальцах и активно секретируется тубулярными клетками. Уровень мочевины в сыворотке зависит от функции почек. На почечную недостаточность указывает накопление в сыворотке мочевины и креатинина. Концентрация мочевины в крови повышается с возрастом.

Клинико-диагностическое значение определения мочевины:

Повышение концентрации

Увеличенное образование

- богатый белками рацион питания
- чрезмерный катаболизм белка организма, например, высокая температура, интенсивная мышечная работа

- инфекционные и воспалительные заболевания

Уменьшенное выведение с мочой

- ретенционная почечная азотемия (заболевания почек, фильтрация меньше 10 мл/мин и/или пониженная секреция в мочу)
- ретенционная внепочечная азотемия (обезвоживание, сердечно-сосудистая декомпенсация).

Снижение концентрации не имеет диагностического значения, может иметь место:

- после введения глюкозы
- пониженном катаболизме белков, повышенном диурезе
- после гемодиализа, например, при отравлении
- голодании.

МОЧЕВИНА В МОЧЕ

Нормальные значения: 330–580 ммоль/сутки (20–35 г/сутки).

Выведение мочевины пропорционально содержанию белка в рационе питания, а также скорости катаболизма эндогенных белков. Выводимая с мочой мочевина составляет около 90% выводимых из организма азотистых метаболитов. У взрослых в состоянии азотистого равновесия выделение 500 ммоль мочевины (или 14 г азота мочевины) в течение суток соответствует потреблению около 100 г белка. Положительный баланс имеет место в период роста, во время беременности, у тех, кто придерживается углеводного рациона питания с низким содержанием белка.

Клинико-диагностическое значение определения мочевины в моче

Повышение выделения (отрицательный азотистый баланс)

- Послеоперационные состояния
- Передозировка тироксина
- Гиперфункция щитовидной железы
- Прием 11-оксикортикостероидов.

Уменьшение выделения (положительный азотистый баланс)

- Нарушение функции почек (одновременный рост мочевины в крови)
-

- Болезни печени, сопровождающиеся снижением образования мочевины
- Непатология беременных
- Прием анаболических гормонов (гормон роста, тестостерон).

Опыт 3. Количественное определение креатинина в биологических жидкостях методом на основе реакции Яффе с депротеинизацией с использованием диагностического набора «Ольвекс диагностикум» (Россия, СПб)

Принцип метода

Метод основан на реакции Яффе. Креатинин в щелочной среде образует с пикриновой кислотой окрашенный комплекс.

Исследуемый материал:

1. Сыворотка или плазма крови. Липидная или гемолизированная сыворотка или плазма крови для анализа непригодна. Возможно хранение образцов в холодильнике в течение суток.

2. Свежая моча, разведенная дистиллированной водой в соотношении 1 : 99.

Состав набора:

Реагент № 1. Пикриновая кислота (100 мл).

Реагент № 2. Натрий едкий (100 мл).

Реагент № 3. Калибратор — 177 мкмоль/л (10 мл).

Реагент № 4. Трихлоруксусная кислота (100 мл).

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность: флаконы 1, 2, 3 и 4 содержат готовые к использованию реагенты. Плотно закрывать флаконы непосредственно после использования. Реагенты 1, 2 и 4 хранить при комнатной температуре. В случае длительного хранения вскрытого реагента 3 рекомендуется поместить флакон в холодильник. Срок хранения реагентов — 1 год. Дата изготовления, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Подготовка образцов к анализу:

К 0,5 мл исследуемого образца добавить 1,0 мл дистиллированной воды и 0,5 мл реагента № 4. Содержимое

пробирок перемешать и через 10 минут центрифугировать при 900 g в течение 15 минут. Для дальнейшего анализа использовать прозрачную надосадочную жидкость (супернатант).

Поставляемый в составе набора калибратор (реагент № 3) в данной процедуре не нуждается, так как она уже была проведена на предприятии-изготовителе.

Для приготовления контрольного раствора смешать 0,5 мл реагента № 4 и 1,5 мл дистиллированной воды (центрифугировать необязательно).

2. Определение содержания креатинина в исследуемых образцах:

Компоненты	Исследуемый образец (мл)	Калибратор (мл)	Контроль (мл)
Супернатант	1,0	—	—
Реагент №3	—	1,0	—
Контрольный раствор	—	—	1,0
Реагент №2	0,5	0,5	0,5
Реагент №1	0,5	0,5	0,5

Содержимое пробирок тщательно перемешать и инкубировать при температуре 18–25 °С точно 20 минут. Исследуемый образец и калибровочную пробу фотометрировать против контроля при длине волны 505 нм (ФЭК-490 нм.) в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см.

Расчет:

Креатинин сыворотки/плазмы крови:

$$C = (E_{\text{пробы}} / E_{\text{калибратора}}) \times 177 \text{ (мкмоль/л)}$$

Креатинин мочи:

$$C = (E_{\text{пробы}} / E_{\text{калибратора}}) \times 17,7 \text{ (ммоль/л) или}$$

$$C = (E_{\text{пробы}} / E_{\text{калибратора}}) \times 17,7 \times V \text{ (ммоль/сутки),}$$

где V — объем суточной мочи, л.

Нормальные величины:

сыворотка — женщины — 53–97 мкмоль/л;

мужчины — 61–115 мкмоль/л,

суточная моча — 4,4–17,7 ммоль/сутки

Аналитические характеристики набора:

Линейность — до 440 мкмоль/л

Воспроизводимость — коэффициент вариации <6%

КРЕАТИНИН В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Нормальные значения:	мкмоль/л
Новорожденные	27–88
Дети до 1 года	18–35
Дети	27–62
Подростки	44–88
Взрослые: мужчины	62–124, или 0,062–0,124 ммоль/л
женщины	44–97, или 0,044–0,097 ммоль/л.

Креатинин является конечным продуктом распада креатинфосфата, который вовлечен в энергетический обмен мышечной и других тканей. Креатин в клетках после фосфорилирования, катализируемого креатинфосфокиназой, превращается в креатинфосфат. Креатинфосфат является макроэргом и участвует в переносе энергии в клетке, в частности, между митохондриями и миофибриллами. Концентрация креатинина в плазме крови является производной от образования и выведения. Его образование непосредственно зависит от мышечной массы. Он не реутилизирован, а экскретируется почками с мочой. Определение креатинина широко используется для диагностики заболеваний почек.

Внимание!

Ложноповышенные результаты могут быть вызваны увеличенной концентрацией в крови некоторых эндогенных метаболитов, таких как глюкоза, фруктоза, кетоновые тела, гистидин, аспарагин, мочевины, индол, гиппуровая кислота; некоторых лекарств: аскорбиновая кислота, альдомед, леводопа, пирокатехол, резорцинол, гидрохинон, резерпин, нитрофуразон, нитрофурантроин.

**Клинико-диагностическое значение
определения креатинина****Повышение концентрации**

Увеличенное образование:

- акромегалия

Уменьшенное выделение:

- почечная недостаточность

- препараты с побочным нефротоксическим действием — соединения ртути, сульфаниламиды, тиазиды, антибиотики из группы аминокликозидов, цефалоспорины и тетрациклин, барбитураты, салицилаты, андрогены
- отравление органическими и неорганическими веществами

Механические, операционные массивные поражения мышц

- синдром длительного раздавливания
- лучевая болезнь

Снижение концентрации

- голодание
- кортикостероиды.

Опыт 4. Спектрофотометрическое определение мочевого кислоты в сыворотке крови

В широкую пробирку вносят 0,6 мл сыворотки крови, пробирку помещают на 2 мин в кипящую водяную баню. В результате этого образуется сгусток белков. После охлаждения добавляют 6 мл дистиллированной воды и экстрагируют мочевую кислоту из сгустка в термостате при 37 °C в течение 1 ч. Отфильтровывают через сухой бумажный фильтр в чистую пробирку экстракт и измеряют оптическую плотность при 289 нм в спектрофотометре.

Концентрацию мочевого кислоты определяют по предварительно построенному калибровочному графику с чистой мочевой кислотой. В норме содержание мочевого кислоты в сыворотке 0,2–0,56 ммоль/л.

МОЧЕВАЯ КИСЛОТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ПЛАЗМЕ

Концентрация мочевого кислоты в плазме крови зависит от скорости разложения пуриновых нуклеотидов (поступающих с пищей, эндогенных и синтезированных *de novo*) и выделения мочевого кислоты через почки. Мочевая кислота во внеклеточной жидкости, в том числе и плазме, присутствует в виде соли натрия (ураты) в концентрации, близкой к насыщению, поэтому существует возможность кристаллизации урата натрия, если концентрация мочевого кислоты превысит максимум нормальных значений.

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ определения мочевой кислоты

Повышение концентрации в сыворотке крови:

1) Повышенное образование мочевой кислоты

- подагра
- синдром Леша-Нихана
- лечение цитостатиками
- тканевая гипоксия
- лейкозы
- сильное повреждение тканей
- чрезмерное поступление пуринов с пищей.

2) Пониженное выделение мочевой кислоты с мочой

- почечная недостаточность
- повышенная реабсорбция и/или пониженная секреция
- тиазидовые диуретики
- салицилаты (в малых количествах)
- отравление свинцом
- органические кислоты
- алкоголизм
- идиопатическая семейная гипоурикемия.

Снижение концентрации в сыворотке крови:

- Сниженная канальцевая реабсорбция.

Опыт 5. Определение общего, «прямого» и «непрямого» билирубина в сыворотке крови

Определение содержания билирубина в крови является важным диагностическим тестом. Билирубин обычно содержится в крови в небольших дозах (8–20 мкмоль/л), причем 75% из них составляет билирубин, связанный белками (нерастворимый) (5,7–15 мкмоль/л) и 25% — «прямой» билирубин (2–5 мкмоль/л). При различных поражениях печени и желтухах часто наблюдается гипербилирубинемия, концентрация билирубина повышается.

Метод основан на колориметрическом определении интенсивности окраски продукта взаимодействия билирубина с диазореактивом. Этот продукт окрашен в малиново-красный цвет. Билирубин-диглюкуронид реагирует с диазосмесью непосредственно. Связанный с белками билирубин реагирует с диазосмесью после диссоциации белково-

го комплекса, которая достигается прибавлением к сыворотке кофеинового реактива.

Определение билирубина в сыворотке крови

В три пробирки (для общего билирубина, «прямого» и для контроля) вводят реактивы согласно таблице.

Ингредиенты	Общий билирубин, мл	«Прямой» билирубин, мл	Контроль, мл
Сыворотка	0,5	0,5	0,5
Кофеиновый реактив	1,75	—	1,75
0,9%-ный раствор хлорида натрия	—	1,75	0,25
Диазосмесь	0,25	0,25	—

Для определения «прямого» билирубина колориметрирование следует проводить спустя 5–10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии в реакцию вступает «непрямой» билирубин.

Для определения общего билирубина пробу для развития окраски оставляют стоять на 20 мин, после чего колориметрируют.

При дальнейшем стоянии окраска не изменяется.

Измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр), в кювете толщиной 0,5 см против воды. Из показателей, полученных при колориметрировании общего и «прямого» билирубина, вычитают показатель контроля.

Расчет производят по калибровочному графику. Находят содержание общего и «прямого» билирубина. Для определения уровня «непрямого» билирубина вычитают из показателя общего его содержания показатель «прямого» билирубина.

Опыт 6. Качественное обнаружение «прямого» и «непрямого» билирубина в сыворотке крови

ХОД РАБОТЫ

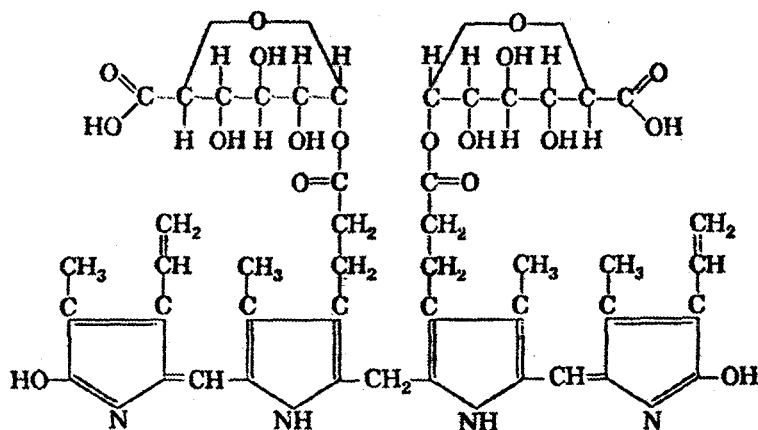
а) Обнаружение «прямого» билирубина.

На часовое стекло, под которое подложен лист белой бумаги, наносят каплю сыворотки крови, содержащей

«прямой» билирубин, добавляют 3 капли свежеприготовленного диазореактива и перемешивают стеклянной палочкой. Образуется характерное для билирубина красное окрашивание.

б) Обнаружение «непрямого» билирубина.

В пробирку отмеривают 1 мл сыворотки крови, 2 мл этилового спирта и фильтруют. К фильтрату добавляют 5 капель свежеприготовленного диазореактива — появляется красно-розовое окрашивание.



«прямой» билирубин (диглюкуронид билирубина)

БИЛИРУБИН ОБЩИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Нормальные значения:

Новорожденные 1 сут.	—	6,8–68,0 мкмоль/л
Новорожденные 3 сут.	—	17,7–171 мкмоль/л
Новорожденные 1 мес.	—	5,2–17,1 мкмоль/л
Взрослые	—	3,5–22,0 мкмоль/л.

Билирубин в организме образуется в ретикулоэндотелиальной системе при распаде гемоглобина. Дополнительным источником билирубина являются молекулы цитохромов и миоглобин. При соединении с альбумином образуется неконъюгированный билирубин, который переносится кровью. Непрямой (неконъюгированный) билирубин не растворим в воде, а растворим в липидах и токсичен. В клетках печени происходит конъюгация билируби-

на с глюкуроновой кислотой, образуется прямой (конъюгированный) билирубин, который растворим в воде, он выделяется в желчные протоки и удаляется с желчью и экскретируется кишечником. При повышении концентрации билирубина в сыворотке свыше 2 мг/дл появляется желтуха, повышение прямого билирубина сопровождается появлением его в моче. У новорожденных билирубин-конъюгирующая система несовершенна, чем объясняется физиологическая желтуха в первую неделю жизни. Гипербилирубинемия является результатом повышенной продукции билирубина или пониженной способности к конъюгации, усвоению и секреции билирубина гепатоцитами. Физиологическое повышение: новорожденные, беременность.

Клинико-диагностическое значение определения общего билирубина

Повышение концентрации общего билирубина:

Гипербилирубинемии гемолитические (надпеченочные желтухи), билирубин неконъюгированный:

- гемолитические анемии острые и хронические
- B_{12} -дефицитная анемия
- талассемия
- обширные гематомы

Гипербилирубинемии печеночные паренхиматозные (печеночные желтухи), билирубин неконъюгированный и конъюгированный:

- острые и хронические диффузные заболевания печени
 - вторичные дистрофические поражения печени при различных заболеваниях внутренних органов и правожелудочковой сердечной недостаточности
 - синдром Жильбера
 - холестатический гепатит
 - первичный билиарный цирроз печени
 - токсическое повреждение печени: четыреххлористым водородом, хлороформом, трихлорэтиленом, галотаном, посталкогольная желтуха
 - лекарственные отравления: парацетамол, изониазид, рифампицин, хлорпромазин.
 - токсическое повреждение печени при отравле-
-

- нии мухомором (альфа-аманетин)
- болезни нарушения обмена веществ:
 - синдром Дубин-Джонсона — нарушение транспортировки билирубина
 - синдром Кригер-Найяра тип I или II (соответственно, отсутствие или дефицит глюкуронилтрансферазы)
 - болезнь Вильсона (поздние стадии)
 - галактоземия
 - нехватка альфа-1-антитрипсина
 - тирозинемия

Гипербилирубинемии печеночные (подпеченочные желтухи), билирубин конъюгированный и неконъюгированный

- внепеченочная обтурация желчных протоков
- желчекаменная болезнь
- новообразования поджелудочной железы
- гельминтозы.

Билирубин «прямой» (конъюгированный) в сыворотке крови

Нормальные значения:

Взрослые — 0–5,1 мкмоль/л.

В сыворотке содержится билирубин, связанный с глюкуроновой кислотой, или прямореагирующий, и билирубин, не связанный с глюкуроновой кислотой, или непрямореагирующий. Обе фракции билирубина в сыворотке крови могут находиться в свободной форме или в виде комплексов с альбумином или фосфолипидами. Большая часть конъюгированного билирубина активно экскретируется из печеночных клеток в желчный проток. В желчных капиллярных ходах и желчном пузыре билирубин теряет глюкуроновую кислоту, превращается в мезобилирубин и уробилиноген. Бактерии в кишечнике переводят мезобилирубин в стеркобилиноген, который частично всасывается в кровь и выделяется почками, основная его часть окисляется в стеркобилин и выделяется с калом. Небольшое количество конъюгированного билирубина поступает из печеночных клеток в кровь. При гипербилирубинемии прямой билирубин накапливается в эластической ткани, глазном яблоке, мукозных мембранах и коже. Непрямой билирубин имеет тенденцию к накоплению в жировой ткани.

Клинико-диагностическое значение определения «прямого» билирубина

Повышение концентрации «прямого» билирубина:

- острый вирусный гепатит (болезнь Боткина)
- вирусная цитомегалия, инфекционный мононуклеоз
- амёбный абсцесс печени, описторхоз, актиномикоз
- сифилис вторичный, третичный
- острые токсические и медикаментозные гепатиты
- цирроз печени, холангит
- первичный рак печени, метастатические поражения печени
- механическая желтуха
- рецидивирующая желтуха беременных
- лимфогранулематоз.

9.2. Тест-контроль по теме «Обмен белков в норме и патологии»

Раздел 1. ОБМЕН БЕЛКОВ

1. Какова суточная потребность человека в белках:

- | | | |
|----------|----------|-----------|
| 1) 50 г | 3) 70 г | 5) 150 г |
| 2) 300 г | 4) 100 г | 6) 200 г? |

2. Обновление белков в организме человека происходит за:

- | | |
|------------|-------------|
| 1) 15 дней | 4) 45 дней |
| 2) 25 дней | 5) 55 дней |
| 3) 35 дней | 6) 65 дней. |

3. Обновление аминокислот в организме человека происходит за:

- | | | |
|-------------|-------------|--------------|
| 1) 100 дней | 3) 130 дней | 5) 150 дней |
| 2) 120 дней | 4) 140 дней | 6) 160 дней. |

4. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте происходит:

- 1) в ротовой полости
 - 2) в желудке
 - 3) в 12-перстной кишке
 - 4) в тонком кишечнике
 - 5) в толстом кишечнике
 - 6) в желчном пузыре.
-

5. В переваривании белков в желудочно-кишечном тракте участвуют ферменты:
- 1) амилазы
 - 2) пепсин
 - 3) трипсин
 - 4) химотрипсин
 - 5) аминопептидазы
 - 6) карбоксипептидазы.
6. Конечным продуктом распада белков в желудочно-кишечном тракте являются:
- 1) высокомолекулярные полипептиды
 - 2) низкомолекулярные полипептиды
 - 3) трипептиды
 - 4) дипептиды
 - 5) аминокислоты
 - 6) тетрапептиды.
7. Значение соляной кислоты в составе желудочного сока:
- 1) создание оптимума pH для действия пепсина
 - 2) стимуляция выделения трипсина
 - 3) набухание и денатурация белков пищи
 - 4) превращение пепсиногена в пепсин
 - 5) бактерицидное действие
 - 6) стимуляция выделения секрета.
8. К эндопептидазам, осуществляющим полостное пищеварение белков, относятся:
- 1) дипептидазы
 - 2) пепсин
 - 3) трипсин
 - 4) химотрипсин
 - 5) эластаза
 - 6) карбоксипептидаза А.
9. К экзопептидазам, осуществляющим пристеночное пищеварение белков, относятся:
- 1) пепсин
 - 2) карбоксипептидаза А
 - 3) карбоксипептидаза В
 - 4) аминопептидаза
-

- 5) трипептидаза
- 6) дипептидаза.

10. Всасывание аминокислот в кровь из желудочно-кишечного тракта осуществляется с участием:

- 1) желчных кислот
- 2) смешанных мицелл
- 3) глутатиона
- 4) гистамина
- 5) гастрина
- 6) секретина.

11. В промежуточном обмене аминокислот в тканях протекают реакции:

- 1) фосфорилирования
- 2) прямого окислительного дезаминирования
- 3) непрямого окислительного дезаминирования
- 4) неокислительного дезаминирования
- 5) декарбоксилирования
- 6) трансаминирования (переаминирование).

12. Прямое окислительное дезаминирование протекает с аминокислотами:

- 1) триптофаном
- 2) глютаминовой кислотой
- 3) аспарагиновой кислотой
- 4) валином
- 5) цистеином
- 6) аланином.

13. Прямое окислительное дезаминирование протекает под влиянием ферментов:

- 1) L-оксидаз
- 2) глутаматдегидрогеназы
- 3) аспартатаминотрансферазы
- 4) аланинаминотрансферазы
- 5) сериндегидратазы
- 6) треониндегидратазы.

14. Коферментом глутаматдегидрогеназы является:

- | | | |
|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1) ФАД | 3) НАДФ ⁺ | 5) ТГФК |
| 2) ФАДН ₂ | 4) НАД ⁺ | 6) НАДФН + Н ⁺ . |

15. Неокислительному (гидролитическому) дезаминированию подвергаются аминокислоты:
- 1) валин
 - 2) лейцин
 - 3) тирозин
 - 4) фенилаланин
 - 5) серин
 - 6) треонин.
16. Значение реакций трансаминирования (переаминирования) в организме:
- 1) образование дипептидов
 - 2) биосинтез 10 заменимых аминокислот
 - 3) 1-я стадия непрямого окислительного дезаминирования
 - 4) доставка аминокрупп из мышц в печень в цикле «аланин-глюкоза»
 - 5) доставка аминокрупп в виде АСП для биосинтеза мочевины в печени
 - 6) поддержание онкотического давления.
17. Коферментом трансаминаз (аминофераз) является производное:
- 1) витамина С
 - 2) витамина В₁
 - 3) витамина В₆
 - 4) витамина В₁₂
 - 5) витамина РР
 - 6) витамина Н.
18. Внутримолекулярному дезаминированию подвергаются аминокислоты:
- 1) глицин
 - 2) лизин
 - 3) треонин
 - 4) серин
 - 5) гистидин
 - 6) лейцин.
19. Реакции декарбоксилирования, протекающие под влиянием ферментов декарбоксилаз, приводят к образованию:
- 1) гистамина
 - 2) триптамина
 - 3) ДОФА-мина
 - 4) путресцина
 - 5) кадаверина
 - 6) агматина.
-

20. Коферментом декарбоксилаз является:

- 1) никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- 2) никотинамидадениндинуклеотид
- 3) пиридоксальфосфат
- 4) никотинамид
- 5) флавинмононуклеотид
- 6) тиаминпирофосфат.

21. Образование аммиака в организме протекает из следующих субстратов:

- 1) глюкозы
- 2) биогенных аминов
- 3) аминокислот
- 4) пуриновых азотистых оснований
- 5) пиримидиновых азотистых оснований
- 6) амидов аминокислот.

22. Образование аммиака в организме протекает в ходе следующих процессов:

- 1) окислительного прямого дезаминирования
- 2) окислительного непрямого дезаминирования
- 3) неокислительного (гидролитического) дезаминирования
- 4) внутримолекулярного дезаминирования
- 5) воздействия моноаминоксидаз
- 6) воздействия диаминоксидаз.

23. Обезвреживание аммиака в организме происходит в процессах:

- 1) биосинтеза мочевины
- 2) биосинтеза пиримидиновых оснований
- 3) образования амидов дикарбоновых кислот
- 4) биосинтеза триацилглицеринов
- 5) восстановительного аминирования
- 6) образования аммонийных солей.

24. Биосинтез мочевины протекает:

- 1) в почках
 - 2) в поджелудочной железе
 - 3) в печени
 - 4) в мышцах
 - 5) в жировой ткани
 - 6) в коже.
-

25. Укажите ферменты, участвующие в биосинтезе мочевины:

- 1) карбамоилфосфатсинтетаза I
- 2) карбамоилфосфатсинтетаза II
- 3) орнитинкарбамоилтрансфераза
- 4) аргининосукцинатсинтетаза
- 5) аргининосукцинатлиаза
- 6) аргиназа.

26. За сутки в организме синтезируются (в среднем) мочевины:

- 1) 10–20 г
- 2) 20–25 г
- 3) 25–30 г
- 4) 35–45 г
- 5) 50–60 г
- 6) 60–70 г.

27. Содержание мочевины в сыворотке крови человека составляет:

- 1) 3,3–6,6 ммоль/л
- 2) 1–2 ммоль/л
- 3) 10–20 ммоль/л
- 4) 15–30 ммоль/л
- 5) 0,5–1 ммоль/л.

28. Какие компоненты составляют остаточный (небелковый) азот сыворотки крови:

- 1) азот мочевины
- 2) азот аминокислот
- 3) азот мочевой кислоты
- 4) азот креатинина и креатина
- 5) азот аммиака
- 6) азот индикана?

29. Конечным продуктом распада белков в организме являются:

- 1) аминокислоты
 - 2) мочевина
 - 3) CO_2
 - 4) H_2O
 - 5) полипептиды
 - 6) биогенные амины.
-

30. Содержание белков в сыворотке крови составляет:

- 1) 20–30 г/л
- 2) 30–40 г/л
- 3) 45–50 г/л
- 4) 50–55 г/л
- 5) 55–60 г/л
- 6) 65–85 г/л.

31. Содержание остаточного азота (небелкового) в сыворотке крови составляет:

- 1) 1–2 ммоль/л
- 2) 3–4 ммоль/л
- 3) 5–6 ммоль/л
- 4) 7–14 ммоль/л
- 5) 15–20 ммоль/л
- 6) 21–25 ммоль/л.

Раздел II. БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

1. Назовите факторы, позволяющие считать белки истинно плазменными:

- 1) попадают в кровь в результате деструкции ткани
- 2) активно секретируются в кровь
- 3) находятся в плазме в течение времени полураспада (несколько суток — месяц)
- 4) синтезируются либо в печени, либо в ретикуло-эндотелиальной системе, либо в лимфоидной ткани
- 5) наличие в плазме этого белка в большей концентрации, чем где бы то ни было
- 6) функцию осуществляют в плазме.

2. Основную массу белков плазмы составляют:

- 1) альбумины
- 2) α_1 -глобулины
- 3) α_2 -глобулины
- 4) β -глобулины
- 5) γ -глобулины
- 6) фибриноген.

3. Укажите функции альбуминов в организме человека:

- 1) создают онкотическое давление (0,03–0,04 атм)
 - 2) транспорт промежуточных продуктов обмена
-

- 3) пластический материал
 - 4) энергетический материал
 - 5) регуляция pH крови
 - 6) участвуют в процессах детоксикации/
4. К каким последствиям приводит гипоальбуминемия:
- 1) снижен транспорт лекарственных препаратов
 - 2) понижается онкотическое давление, что приводит к отекам мягких тканей
 - 3) повышается онкотическое давление
 - 4) повышается уровень холестерина в крови
 - 5) повышается количество ВЖК в крови
 - 6) понижается количество ХС, ВЖК и других промежуточных продуктов обмена в плазме крови?
5. Где в организме синтезируются альбумины? Выберите правильный ответ:
- 1) 50% в печени
 - 2) 100% в печени
 - 3) в легких
 - 4) в скелетных мышцах
 - 5) в плазме крови — 100%
 - 6) в плазме крови частично.
6. Такие белки, как α_1 -кислый гликопротеин, α_1 -антитрипсин, церулоплазмин, гаптоглобин, фибриноген, С-реактивный белок, называют белками «острой фазы воспаления», так как:
- 1) повышение их количества — показатель воспалительных процессов
 - 2) понижение их количества — показатель воспалительных процессов
 - 3) все они ингибиторы и дезактиваторы ферментов, которые освобождаются при деструкции лизосом клеток
 - 4) все они — активаторы протеолитических ферментов лизосом клеток
 - 5) уменьшают вторичное повреждение тканей
 - 6) увеличивают вторичное повреждение тканей.
7. Укажите основные биологические свойства α_1 -антитрипсина:
- 1) ингибирование трипсина и химотрипсина
 - 2) активация панкреатических ферментов
 - 3) ингибирование ферментов свертывания крови
-

- 4) активация плазмينا
- 5) активация тромбина
- 6) ингибирование протеиназ при распаде лейкоцитов и чужеродных клеток.

8. Где синтезируются α_1 -глобулины? Выберите правильный ответ:

- 1) не синтезируются в печени
- 2) синтезируются в плазме крови
- 3) 90% синтезируются в печени
- 4) 10% синтезируются в печени
- 5) синтезируются в ретикуло-эндотелиальной системе
- 6) синтезируются в почках — 100%.

9. Выберите основные показатели, характеризующие церулоплазмин:

- 1) является белком «острой фазы воспаления»
- 2) не является белком «острой фазы воспаления»
- 3) регулирует обмен меди в организме
- 4) обладает феррооксидазной активностью, превращая Fe^{2+} в Fe^{3+}
- о) участвует в биосинтезе трансферрина
- 6) участвует в транспорте Fe^{3+} в печень

10. Какова роль гаптоглобина в плазме крови:

- 1) связывает гемоглобин с образованием комплексов
- 2) предотвращает выделение железа с мочой
- 3) защищает почки от повреждения гемоглобином
- 4) является белком «острой фазы воспаления»
- 5) не является белком «острой фазы воспаления»
- 6) не участвует в процессах детоксикации?

11. Какие из указанных ниже белков плазмы находятся во фракции β -глобулинов:

- 1) альбумин
 - 2) трансферрин
 - 3) гемопексин
 - 4) церулоплазмин
-

- 5) гаптоглобин
 - 6) С-реактивный белок?
12. Выберите основные показатели, характеризующие трансферрин:
- 1) насыщен железом на 30%
 - 2) молекулы трансферрина не связаны с железом
 - 3) осуществляет транспорт железа из печени в кровь
 - 4) осуществляет транспорт железа из кишечника и других тканей в печень
 - 5) не участвует в транспорте железа
 - 6) проявляет наибольшее сродство к железу по сравнению с другими белками.
13. Укажите место синтеза и свойства γ -глобулинов:
- 1) 100% в печени
 - 2) 50% в печени
 - 3) 10% в печени
 - 4) 90% В-лимфоцитами
 - 5) являются антителами
 - 6) выполняют транспортную функцию.
14. Укажите причины гипопроteinемии:
- 1) недостаток поступления белка пищи
 - 2) увеличение проницаемости капилляров
 - 3) потеря белка организмом
 - 4) снижение процесса биосинтеза белков крови в печени
 - 5) диабет
 - 6) пища, содержащая большое количество белка.
15. Какие из указанных ниже белков плазмы находятся во фракции α_1 -глобулинов:
- 1) α_1 -антитрипсин
 - 2) α_1 -кислый гликопротеин
 - 3) трансферрин
 - 4) С-реактивный белок
 - 5) иммуноглобулин
 - 6) фибриноген?
16. Какие из указанных ниже белков плазмы находятся во фракции α_2 -глобулинов:
- 1) фибриноген
 - 2) церулоплазмин
-

- 3) гаптоглобин
- 4) гемопексин
- 5) α_2 -макроглобулин
- 6) тироксинсвязывающий белок?

17. Укажите функции α_1 -глобулинов в организме:

- 1) транспорт ретинола
- 2) транспорт высших жирных кислот
- 3) связывают и транспортируют тироксин
- 4) ингибируют многие протеолитические ферменты
- 5) активируют многие протеолитические ферменты
- 6) связывают и транспортируют кортизол и кортикостерон.

18. Укажите функции α_2 -глобулинов в организме:

- 1) осмотическая регуляция
- 2) ингибирование протеаз
- 3) связывают гемоглобин и помогают его сохранению
- 4) транспорт витаминов Д, К, Е
- 5) транспорт меди
- 6) регулируют уровень меди в печени.

19. Укажите функции β -глобулинов в организме:

- 1) антитела
- 2) связывают и переносят железо
- 3) транспорт лекарственных препаратов
- 4) связывают гем, образуя комплекс гем-гемопексин
- 5) предотвращают выведение гема с мочой
- 6) связывают и переносят медь.

20. Укажите функции γ -глобулинов в организме:

- 1) эффекторы гуморальной и иммунной системы
 - 2) не являются иммуноглобулинами
 - 3) способны распознавать проникшие в организм вирусы или чужеродные белки
 - 4) выполняют защитную функцию в организме
 - 5) являются антителами
 - 6) связываются с антигенами, вызывая образование осадка.
-

Раздел III. ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И НУКЛЕОТИДОВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

- 1. Обмен нуклеиновых кислот и нуклеотидов включает:**
 - 1) биосинтез и распад нуклеиновых кислот
 - 2) биосинтез и катаболизм пуриновых рибонуклеотидов
 - 3) биосинтез и катаболизм пиримидиновых рибонуклеотидов
 - 4) биосинтез и катаболизм дезоксирибонуклеотидов
 - 5) регуляцию обмена нуклеиновых кислот
 - 6) типы нарушений обмена пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

 - 2. Переваривание нуклеиновых кислот и нуклеотидов под действием ферментов происходит:**
 - 1) в ротовой полости
 - 2) в желудке
 - 3) в 12-ти перстной кишке
 - 4) в тонком кишечнике
 - 5) в толстом кишечнике
 - 6) в слизистой желудка.

 - 3. Ферменты, участвующие в деградации нуклеиновых кислот:**
 - 1) ДНК-аза
 - 2) РНК-аза
 - 3) фосфодиэстераза
 - 4) фосфатаза
 - 5) нуклеотидаза
 - 6) нуклеозидаза.

 - 4. Конечные продукты переваривания нуклеиновых кислот в ЖКТ:**
 - 1) нуклеозиды
 - 2) дезоксирибоза
 - 3) пуриновые основания
 - 4) пиримидиновые основания
 - 5) рибоза
 - 6) H_3PO_4 .
-

5. Конечные продукты распада нуклеиновых кислот в организме:
- 1) CO_2 , H_2O
 - 2) H_3PO_4
 - 3) мочевая кислота
 - 4) мочевины
 - 5) β -аланин
 - 6) β -амино-изомасляная кислота.
6. Пуриновые и пиримидиновые основания, пентозы используются в качестве субстратов биосинтеза нуклеиновых кислот:
- 1) по резервному пути
 - 2) de novo
 - 3) при беременности
 - 4) при росте эмбриональной ткани
 - 5) при регенерации тканей
 - 6) при росте злокачественных клеток.
7. При генетическом дефекте фермента гуанингипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ) в тканях наблюдается:
- 1) накопление свободных азотистых оснований (аденина, гуанина, гипоксантина)
 - 2) повышение биосинтеза АМФ, ГМФ, ИМФ
 - 3) Понижение биосинтеза пуриновых нуклеотидов
 - 4) понижение биосинтеза нуклеиновых кислот
 - 5) уменьшено содержание мочевой кислоты
 - 6) образуется много мочевой кислоты.
8. Скорость образования мочевой кислоты может увеличиваться по разным причинам:
- 1) ускорен биосинтез пуринов
 - 2) ускорен биосинтез пиримидинов
 - 3) усилен катаболизм нуклеиновых кислот
 - 4) дефект фермента фосфорибозилтрансферазы
 - 5) уменьшен биосинтез пуринов
 - 6) уменьшен биосинтез пиримидинов.
9. Синдром Леша-Нихана — наследственное заболевание, обусловленное отсутствием:
- 1) пуринов
 - 2) аденина
 - 3) гипоксантина
-

- 4) гуанина
- 5) фермента аденинрибозил-трансферазы
- 6) фермента гуанин-гипоксантинфосфорибозил-трансферазы.

10. Синдром Леша-Нихана характеризуется:

- 1) гипоурикемией
- 2) гиперурикемией
- 3) нарушением умственного развития
- 4) агрессивностью поведения
- 5) самонанесением ран (особенно у детей)
- 6) кахексией.

11. Причины подагры:

- 1) снижение активности фермента ксантиноксидазы
- 2) увеличение активности ГГФРТ
- 3) уменьшение нуклеиновых кислот в пище
- 4) активация фермента ксантиноксидазы
- 5) снижения активности ГГФРТ
- 6) увеличение нуклеиновых кислот в пище.

12. Лечение подагры:

- 1) аллопуринолом
- 2) электрофорезом солями лития
- 3) гипоксантином
- 4) ксантином
- 5) аденином
- 6) гуанином.

13. Лечение подагры аллопуринолом основано на том, что он является:

- 1) аналогом мочевой кислоты
- 2) конкурентным ингибитором фермента ксантиноксидазы
- 3) активатором фермента ксантиноксидазы
- 4) структурным аналогом ксантина
- 5) структурным аналогом гипоксантина
- 6) неконкурентным ингибитором ксантиноксидазы.

14. Механизм действия аллопуринола сводится к следующему:

- 1) уменьшает скорость образования мочевой кислоты

- 2) увеличивает скорость образования гипоксантина
- 3) увеличивает концентрацию гипоксантина в моче
- 4) увеличивает биосинтез мочевой кислоты
- 5) тормозит биосинтез мочевой кислоты
- 6) уменьшает содержание гипоксантина в моче.

Раздел IV. ОБМЕН ХРОМОПРОТЕИНОВ

1. Субстратами для синтеза гема гемоглобина являются:

- 1) глицин
- 2) активная форма янтарной кислоты
- 3) сукцинил-коэнзим А
- 4) ацетил-коэнзим А
- 5) ионы железа
- 6) аланин.

2. Ионы железа:

- 1) всасываются в кишечнике с участием аскорбиновой кислоты
- 2) всасываются в кишечнике с участием витамина B_{12}
- 3) депонируются в составе ферритина в печени
- 4) экскретируются печенью с желчью
- 5) транспортируются в составе ферритина кровью
- 6) выводятся с мочой.

3. Транспортной формой ионов железа в крови являются:

- 1) ферритин
- 2) трансферрин
- 3) гаптоглобин
- 4) гемосидерин
- 5) церулоплазмин
- 6) гемопексин.

4. Какая комбинация субъединиц глобина соответствует основному типу гемоглобина взрослых людей:

- | | | |
|----------------------|----------------------|-----------------------|
| 1) $2\alpha 2\beta$ | 3) $2\alpha 2\gamma$ | 5) $2\beta 2\delta$ |
| 2) $2\alpha 2\delta$ | 4) $2\beta 2\gamma$ | 6) $1\alpha 3\beta$. |

5. Какая комбинация субъединиц глобина соответствует гемоглобину плода (HbF):

- | | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1) $2\alpha 2\beta$ | 3) $2\beta 2\gamma$ | 5) $2\beta 2\delta$ |
| 2) $2\alpha 2\delta$ | 4) $2\alpha 2\gamma$ | 6) $1\alpha 3\beta?$ |

6. Миоглобин имеет следующие свойства:

- 1) более выраженное сродство к O_2 по сравнению с гемоглобином
- 2) подчиняется кооперативному эффекту насыщения кислородом
- 3) способен сохранять запас кислорода в мышцах
- 4) меньшее сродство к кислороду по сравнению с цитохром-оксидазой
- 5) переносит кислород в митохондри
- 6) меньшее сродство к O_2 по сравнению с гемоглобином.

7. Какой гемоглобин является аномальным в результате генетического дефекта:

- | | | |
|---------|----------------------|------------------------|
| 1) Hb C | 3) Hb A ₂ | 5) Hb S |
| 2) HbA | 4) Hb F | 6) Hb A ₃ . |

8. Печень выполняет важную роль в обмене желчных пигментов, которые образуются в результате распада:

- 1) каталазы
- 2) цитохромов
- 3) гемоглобина
- 4) миоглобина
- 5) гема
- 6) хиломикронов.

9. В печени $1/4$ часть билирубина связывается с УДФ-глюкуроновой кислотой и называется:

- 1) «прямой» билирубин
 - 2) диглюкуронид билирубина
 - 3) «непрямой» билирубин
 - 4) гаптоглобин
 - 5) нерастворимый билирубин
 - 6) свободный билирубин.
-

10. В результате распада билирубина образуются желчные пигменты:

- 1) уробилиноген
- 2) стеркобилиноген
- 3) стеркобилин
- 4) уробилин
- 5) биливердин
- 6) гаптоглобин.

11. В норме суточная моча содержит до 4 мг уробилина. О чем свидетельствует исчезновение уробилина в моче:

- 1) о прекращении поступления желчи в кишечник
- 2) об избыточном распаде эритроцитов
- 3) о закупорке желчных протоков
- 4) о повышении билирубина
- 5) об уменьшении активности глюкуронилтрансферазы
- 6) о разрушении части гепатоцитов.

12. Показателем нарушения пигментного обмена в печени является содержание в крови:

- 1) непрямого билирубина
- 2) белка
- 3) гликогена
- 4) прямого билирубина
- 5) общего билирубина
- 6) гемопексина.

13. В норме в крови содержится прямого билирубина:

- 1) до 5 мкмоль/л
- 2) до 10 мкмоль/л
- 3) до 15 мкмоль/л
- 4) до 20 мкмоль/л
- 5) до 25 мкмоль/л
- 6) до 30 мкмоль/л.

14. В норме общего билирубина в крови

- 1) до 20 мкмоль/л
 - 2) до 30 мкмоль/л
 - 3) до 40 мкмоль/л.
-

- 4) до 50 мкмоль/л
- 5) до 55 мкмоль/л
- 6) до 60 мкмоль/л.

15. Содержание в крови прямого билирубина в норме составляет от общего билирубина:

- 1) 10%
- 2) 20%
- 3) 25%
- 4) 30%
- 5) 35%
- 6) 50%.

16. Повышение содержания билирубина в крови ведет к отложению его в тканях и вызывает желтуху.

Укажите основные причины гипербилирубинемии:

- 1) увеличение гемолиза эритроцитов
- 2) дефицит или дефект фермента — глюкуронил-трансферазы
- 3) закупорка желчных протоков внепеченочных и внутрипеченочных
- 4) опухоль желчных протоков и печени
- 5) нарушение равновесия между образованием и выведением билирубина
- 6) повреждение гепатоцитов (вирусами, токсическими гепатотропными веществами, гепатиты, цирроз печени).

17. В зависимости от причин гипербилирубинемии различают:

- 1) гемолитическую желтуху
- 2) паренхиматозную желтуху
- 3) обтурационную желтуху
- 4) физиологическую желтуху у новорожденных
- 5) приобретенную желтуху
- 6) врожденную негемолитическую желтуху (временную).

18. Что является диагностическим тестом для определения происхождения желтухи:

- 1) определение желчных пигментов в крови
 - 2) определение желчных пигментов в моче
 - 3) определение желчных пигментов в кале
-

- 4) определение содержания билирубина в моче
- 5) определение содержания глюкозы в крови
- 6) определение содержания желчных кислот в моче?ы

19. Назовите возможные причины возникновения гемолитической желтухи:

- 1) интенсивный распад эритроцитов в РЭС
- 2) прием лекарств, стимулирующих гемолиз эритроцитов
- 3) переливание несовместимой группы крови
- 4) резкое снижение осмотического давления
- 5) уменьшение активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы
- 6) усиленное питание углеводами.

20. Биохимические показатели гемолитической желтухи:

- 1) увеличение непрямого билирубина в крови до 150 мкмоль/л
- 2) увеличение уробилина в моче
- 3) увеличение стеркобилина в кале
- 4) гипергликемия
- 5) темный цвет кала и мочи
- 6) кожа и слизистые окрашены в желтый цвет.

21. Назовите возможные причины паренхиматозной желтухи:

- 1) нарушение улавливания билирубина гепатоцитами из кровотока
- 2) затруднение отщепления свободного билирубина от альбумина
- 3) деструкция печеночных клеток
- 4) некроз гепатоцитов
- 5) нарушение проницаемости мембран гепатоцитов
- 6) нарушение конъюгации билирубина.

22. Биохимические показатели паренхиматозной желтухи:

- 1) увеличение содержания «прямого» и «непрямого» билирубина
 - 2) кетонемия
-

- 3) появление в моче «прямого» билирубина и снижение уробилина
- 4) кетонурия
- 5) уменьшение выделения стеркобилина в кале
- 6) значительное увеличение активности аспаратаминотрансферазы.

23. Укажите возможные причины обтурационной (механической) желтухи:

- 1) уменьшение распада гемоглобина
- 2) опухоль, метастазы печени
- 3) механическая травма печени
- 4) нарушение секреции желчи в желчный пузырь
- 5) нарушение обмена жирорастворимых витаминов
- 6) усиленный распад гемоглобина.

24. Биохимические показатели механической желтухи следующие:

- 1) увеличение содержания «прямого» билирубина в крови
- 2) увеличение содержания «прямого» билирубина в моче и нет уробилина
- 3) отсутствие желчных пигментов в кале
- 4) кал темный
- 5) увеличение содержания желчных кислот и ускоренное СОЭ
- 6) увеличение уровня щелочной фосфатазы и аланинаминотрансферазы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

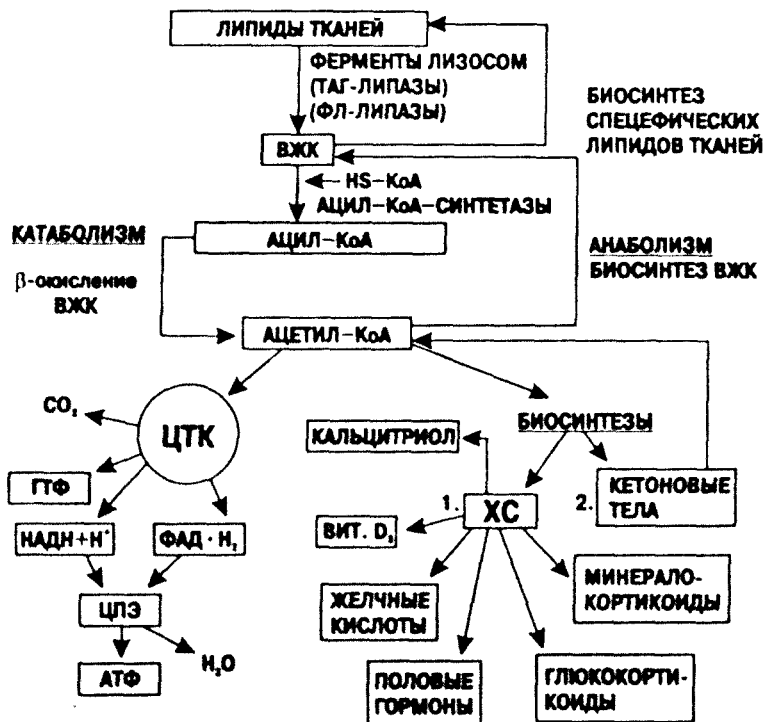
1. Каков принцип метода количественного определения общего белка в сыворотке крови?
 2. Каково клинико-диагностическое значение определения общего белка в сыворотке крови?
 5. Каков принцип количественного определения мочевины в сыворотке крови и моче?
 4. Каково клинико-диагностическое значение определения мочевины?
 5. Каков принцип количественного определения креатинина в крови?
-

6. Каково клинико-диагностическое значение определения креатинина в биологических жидкостях?
 7. Каков принцип метода спектрофотометрического определения мочевой кислоты в сыворотке крови?
 8. Клинико-диагностическое значение определения мочевой кислоты в сыворотке крови.
 9. Каковы принципы методов количественного определения «прямого», «непрямого» и общего билирубина в сыворотке крови?
 10. Каково клинико-диагностическое значение определения билирубина и его фракций?
-

Глава 10

Обмен липидов в норме и патологии

Схема промежуточного обмена липидов и ВЖК в организме человека



10.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Определение общего холестерина в сыворотке крови, основанное на реакции Либермана-Бурхарда (метод Илька)

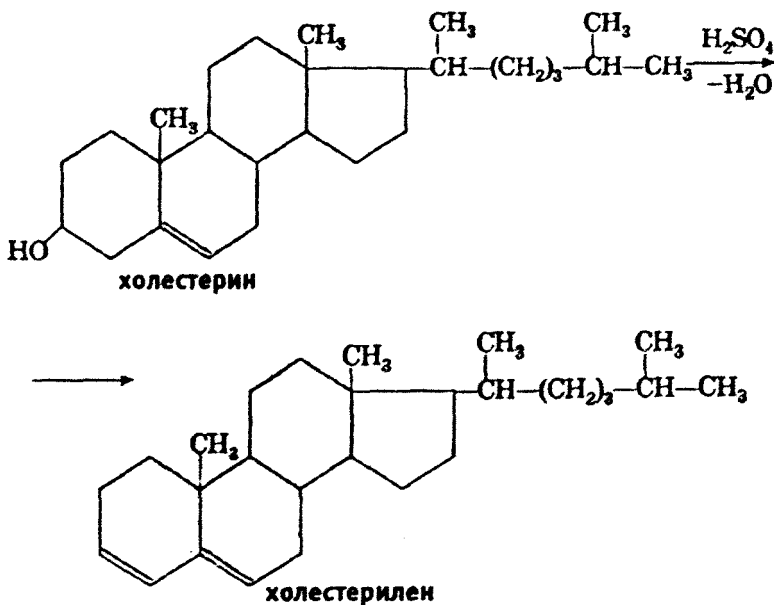
Принцип метода

При добавлении к сыворотке крови уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты жидкость окра-

шивается последовательно в красный, синий и, наконец, зеленый цвет. Реакция обусловлена образованием сульфокислоты холестерина зеленого цвета.

Ход определения. В сухую пробирку помещают 2,1 мл реактива Либермана-Бурхарда (содержит уксусный ангидрид и серную кислоту), очень медленно по стенке пробирки добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки крови, энергично встряхивают пробирку, термостатируют 20 мин при 37 °С. Развивается изумрудно-зеленая окраска, которую колориметрируют на ФЭКе при красном светофильтре (630–690 нм) против реактива Либермана-Бурхарда. Полученную на ФЭКе оптическую плотность используют для определения концентрации холестерина по стандартному калибровочному графику.

Калибровочный график строят по величинам оптической плотности приготовленных стандартных растворов холестерина, которые обрабатывают так же, как исследуемую сыворотку крови.



Содержание ХС в норме 3,9–6,5 ммоль/л

**Клинико-диагностическое значение
определения общего ХС в сыворотке крови:**

Повышение концентрации ХС:

Первичные гиперлипидемии

- семейная гиперхолестеринемия (фенотип IIa, IIb)
- семейная комбинированная гиперлипидемия (фенотип IIa, IIb)
- полигенная гиперхолестеринемия (фенотип IIa)
- семейная дисбеталипопротеинемия (фенотип III)

Вторичные гиперлипидемии

- болезни печени
 - внепеченочные желтухи
Прекращение застоя желчи в желчных протоках ведет к быстрой нормализации уровня холестерина в плазме
 - болезнь Гирке (болезнь накопления гликогена)
 - гепатит
 - первичный билиарный цирроз печени
- болезни почек
 - нефротический синдром
 - хроническая почечная недостаточность
- болезни поджелудочной железы
 - хронический панкреатит
 - злокачественные опухоли поджелудочной железы
- сахарный диабет
- гипофункция щитовидной железы
- дефицит соматотропного гормона
- ожирение
- беременность
- лекарства:
 - бетаблокаторы
 - тиазидовые диуретики
 - оральные контрацептивы
 - кортикостероиды, андрогены.

Понижение концентрации ХС:

- болезни печени
 - цирроз печени в поздней стадии заболевания
 - острая дистрофия печени
 - инфекции, связанные с повреждением печени
 - голодание
-

- сепсис
- гиперфункция щитовидной железы
- мегалобластическая анемия
- талассемия.

Опыт 2. Количественное определение липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в сыворотке крови

Клинико-диагностическое значение

Содержание ЛНП в крови колеблется в зависимости от возраста, пола и составляет в норме 3,0–4,5 г/л. Увеличение концентрации ЛНП наблюдается при атеросклерозе, механической желтухе, острых гепатитах, хронических заболеваниях печени, диабете, гликогенозах, ксантоматозе и ожирении, снижение — при β -плазмодцитоме. Среднее содержание холестерина и ЭХС в ЛНП около 50%.

Принцип метода

При взаимодействии ЛНП сыворотки крови с гепариновым реактивом появляется мутность, интенсивность которой определяют фотометрически. Гепариновый реактив представляет собой смесь гепарина с хлоридом кальция.

Ход работы

В пробирке смешивают 0,1 мл сыворотки крови и 5 мл гепаринового реактива, интенсивно встряхивают и оставляют стоять в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем снова встряхивают и измеряют оптическую плотность пробы (А) против дистиллированной воды на ФЭКе (длина волны 580–600 нм, кюветы с толщиной слоя 1 см). Полученную величину умножают на калибровочный фактор F, равный 18,1, выведенный экспериментальным путем. Рассчитывают количество ЛНП:

$$F \cdot A = \text{ЛНП г/л,}$$

где F — калибровочный фактор (18,1); A — оптическая плотность пробы.

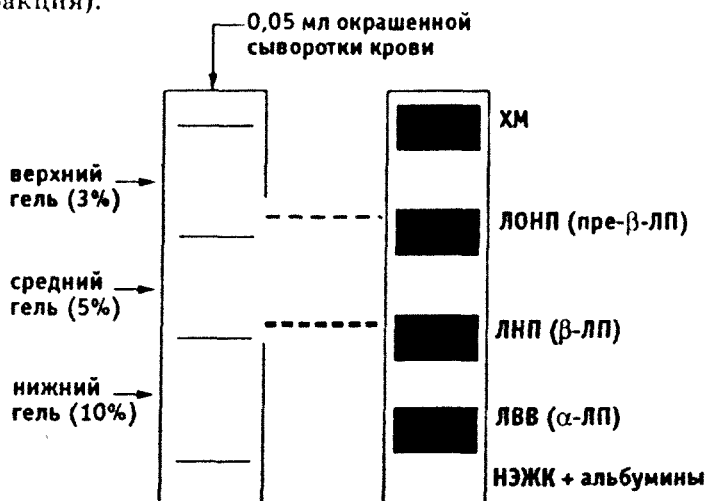
В отличие от других липопротеинов ЛВП осуществляют транспорт холестерина от клеток периферических органов в печень, где холестерин переводится в желчные кислоты и выводится из организма. Это характерно для сосудов сердца, артерий мозга и других органов. Снижение концентрации ЛВП ниже 0,9 ммоль/л связывается с повышенным риском атеросклероза. Повышенный уровень ЛВП рассматривается как антиатерогенный фактор.

Опыт 3. Разделение липопротеинов сыворотки крови методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле

Принцип метода

Разделение липопротеинов (ЛП) основано на их различной электрофоретической подвижности, определяемой величиной заряда апобелков, а также размерами частиц ЛП, которые по-разному проходят через трехслойное молекулярное сито полиакриламидного геля (ПААГ). Чем выше заряд и меньше размер ЛП, тем быстрее он перемещается в электрическом поле в ПААГ сверху вниз.

Характеристика геля. Прозрачный гидрофильный гель ПАА с $\text{pH} = 8,9$ получают полимеризацией двух мономеров акриламида и метилен-бисакриламида в присутствии катализаторов и буферного раствора. Полимер геля готовят в стеклянных трубочках, поставленных в штативе вертикально, в виде трех слоев с разной концентрацией полимера: нижний гель — 10%, средний — 5, верхний — 3%. Концентрация полимера обуславливает разный размер пор, образуя трехслойное молекулярное сито: верхний гель задерживает самые крупные ЛП — хиломикроны (ХМ), на границе верхнего и среднего гелей задерживаются ЛОНП (пре- β -ЛП), на границе среднего и нижнего гелей задерживаются ЛНП (β -ЛП), в нижний гель проходят ЛВП и НЭЖК + альбумины (узкая, самая подвижная фракция).



Подготовка сыворотки крови. 0,3 мл сыворотки крови в пробирке смешивают с 0,15 мл красителя судана черного и 0,5 мл раствора сахарозы, выдерживают 1 ч при комнатной температуре. Для исследования помещают 0,05 мл окрашенной сыворотки в одну трубочку на верхний гель. Судан черный, адсорбируясь на липидах, окрашивает ЛП в сине-черный цвет.

Прибор для диск-электрофореза состоит из двух камер, которые устанавливают одну над другой. В дне верхней камеры имеются отверстия, в которых герметически укрепляют трубочки с гелем и сывороткой крови таким образом, чтобы нижние концы трубочек опустились в нижнюю камеру. В верхнюю и нижнюю камеры наливают электродный буфер с $\text{pH} = 8,9$, чтобы верхние и нижние концы трубочек были погружены в буфер на 2–3 см и чтобы в них не было пузырьков воздуха. В центре камер укрепляют платиновые электроды: верхний — (–) катод, нижний — (+) анод. Подключают камеру к блоку электропитания из расчета 5–6 мА на одну трубочку. Электрофорез длится 1–1,5 ч, за это время окрашенные липопротеины располагаются так, как изображено на рисунке на стр. 20.

Количественный анализ ЛП проводят путем денситометрии (по плотности окраски) прибором денситометром. Ориентировочную оценку липопротеинограммы можно провести визуально.

Опыт 4. Исследование состава фосфолипидов сыворотки крови методом тонкослойной хроматографии

Принцип метода

Метод тонкослойной хроматографии сочетает принципы распределительной и адсорбционной хроматографии. ФЛ, отличающиеся по структуре, с различной скоростью перемещаются по пластинке с тонким слоем адсорбента, так как по-разному взаимодействуют с адсорбентом, органической и водной фазами. Чем более выражены гидрофильные свойства у ФЛ, тем медленнее он движется, так как лучше адсорбируется и больше распределяется в водной среде.

Адсорбент — порошок силикагеля — нанесен в виде тонкого слоя на пластинку фольги (стандартные плас-

тинки). Подвижный растворитель: хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4).

Материал для исследования — хлороформенный экстракт липидов сыворотки крови.

Ход работы

На конец пластинки, отступая 1 см от нижнего края, нанести с помощью капиллярной пипетки небольшую каплю хлороформенного экстракта липидов сыворотки крови. Поместить пластинку в хроматографическую камеру вертикально таким образом, чтобы смесь для разделения, находящаяся на дне камеры, не была выше места нанесения липидов на пластинке и не смыла липиды. Закрыть камеру крышечкой из фольги. Смесь для разделения ФЛ: хлороформ-метанол-вода (65 : 25 : 4) по отношению к адсорбенту разделяется на органическую подвижную фазу и водную малоподвижную. Более гидрофильные ФЛ перемещаются с водной фазой, более гидрофобные — с органической. Разделение продолжается 10–15 мин, пока фронт растворителя не дойдет на 1 см до верхнего края пластинки. Пластинку извлечь из камеры, подсушить на воздухе в вытяжном шкафу, затем поместить на 1–2 мин в камеру с кристаллами йода (в атмосферу йодных паров). Йод адсорбируется на пятнах липидов, окрашивая их в желтый цвет. После окрашивания можно идентифицировать ФЛ, распределяющиеся снизу вверх в следующем порядке: лизоФЛ, СФМ, ФХ, ФС, ФЭА, ФК. Все остальные липиды идут одним пятном с фронтом растворителя.

Зарисовать хроматограммы ФЛ сыворотки крови в тетради, написать структурные формулы, объяснить различия в свойствах при хроматографии.

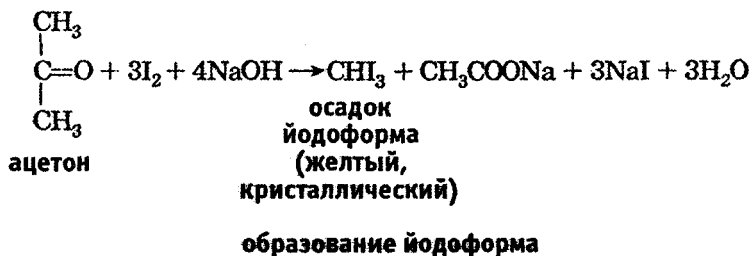
Опыт 5. Качественные реакции на кетоновые тела в моче

Проба Либена

Реакция основана на свойстве ацетона превращаться в йодоформ в присутствии йода в щелочной среде.

К 1 мл исследуемой мочи добавляют несколько капель раствора Люголя (йод в растворе йодистого калия) и несколько капель 10%-го раствора гидроксида натрия. При

наличии ацетона в моче появляется помутнение за счет образования йодоформа, имеющего характерный запах:



Проба Легалья

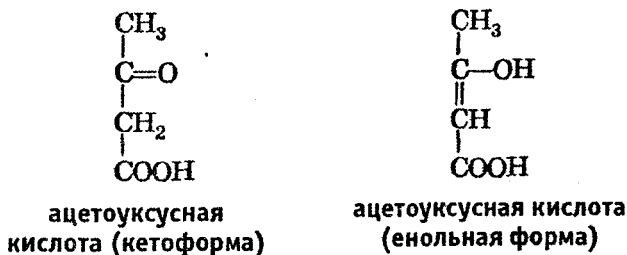
Реакция основана на том, что ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом натрия комплексные анионы оранжево-красного цвета, переходящего в вишнево-красный при подкислении концентрированной уксусной кислотой.

К 1 мл мочи добавляют несколько кристаллов нитропрусида натрия и 3–4 капли 10%-го раствора гидроксида натрия. При кетонурии появляется оранжевое окрашивание, которое превращается в вишневое при добавлении 5–8 капель концентрированной уксусной кислоты.

Проба Герхардта

Енольная форма ацетоуксусной кислоты, взаимодействуя с хлорным железом, образует комплексное соединение вишнево-красного цвета.

К 1 мл мочи добавляют несколько капель хлорного железа. При наличии в моче ацетоацетата появляется вишнево-красное окрашивание.



Современные ферментативные методы исследования показателей обмена липидов в организме человека

Опыт 6. Определение концентрации триацилглицеринов (ТАГ) в сыворотке и плазме крови ферментативным колориметрическим методом (с набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум», г. Санкт-Петербург)

Принцип метода:

1. ТАГ $\xrightarrow{\text{Таг-липаза}}$ Глицерин + ВЖК;
2. Глицерин + АТФ $\xrightarrow{\text{глицеролкиназа}}$ Глицерол-3-фосфат + АДФ;
3. Глицерол-3-фосфат $\xrightarrow{\text{глицерол-фосфат-оксидаза}}$ диоксиацетон-фосфат + H_2O_2 ;
4. H_2O_2 + 4-аминоантипирин + 4-хлорфенол $\xrightarrow{\text{пероксидаза}}$ хинонимин + H_2O .

Концентрация хинонимина, определяемая фотометрически, пропорциональна концентрации триацилглицеринов в пробе свежей сыворотки или плазмы.

Состав набора:

Реагент № 1. Буфер (2 × 50 мл)

Реагент № 2. Лиофилизат

Реагент № 3. Калибратор — 2,29 ммоль/л

ТАГ (1 мл) — стандартный раствор.

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Рабочий реактив: Содержимое флакона № 2, аккуратно перемешивая, растворить в содержимом флакона № 1. Рабочий реагент готов к использованию не ранее, чем через 20 минут после начала растворения. Полученный реагент стабилен не менее 20 дней при хранении при 2–8 °С в темноте. *Бледно-розовая окраска рабочего реагента до оптической плотности 0,150, измеренная против дистиллированной воды при $\lambda=500$ нм, не влияет на правильность*

определения триглицеридов в исследуемом образце. Реагент № 3 готов к работе. Плотно закрывать флакон сразу же после использования. Невскрытые реагенты № 1–3 стабильны не менее 12 месяцев при температуре 2–8 °С в темноте. Дата изготовления, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа:

	Опытная проба (мл)	Калибратор (мл)	Контроль (мл)
Рабочий реагент	2,00	2,00	2,00
Исследуемый образец	0,02	–	–
Реагент №3	–	0,02	–
Вода	–	–	0,02

Перемешать и инкубировать не менее 15 мин при температуре 20–25 °С или 10 мин при 37 °С. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см при длине волны 500 нм. Окраска стабильна не менее часа после окончания инкубации при предохранении от прямого солнечного света.

Автоматические анализаторы:

Параметры:

Длина волны _____ 500 нм
 Измерение против _____ Контрольной пробы
 Метод измерения _____ Конечная точка
 Изменение оптической плотности _____ Возрастает
 Температура _____ 37 °С
 Соотношение образец/реагент _____ 1:100
 Время преинкубации _____ 3 секунды
 Время реакции _____ 600 секунд
 Предел абсорбции контрольной пробы против воды _____ 0,15 А
 Предел максимальной абсорбции _____ 2,00 А
 Калибратор (стандарт) _____ 2,28 ммоль/л,
 Линейность _____ 11,4 ммоль/л

Расчет содержания триглицеридов в исследуемом образце:

$$C = 2,29 \times \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ (ммоль / л)}$$

Нормальные величины	—	0,15–1,71 ммоль/л
Группа риска	—	1,71–2,29 ммоль/л
Патологические показатели	—	> 2,29 ммоль/л.

Определение уровня триглицеридов необходимо для типирования гиперлипидемий и оценки риска инфаркта миокарда.

Клинико-диагностическое значение определения ТАГ

Повышение концентрации ТАГ:

Первичные гиперлипидемии

- семейная гипертриглицеринемия (фенотип IV)
- сложная семейная гиперлипидемия (фенотип IIb)
- простая гипертриглицеринемия (фенотип IV)
- семейная дисбеталипопротеинемия (фенотип III)
- синдром хиломикронемии (фенотип I или V)
- недостаток ЛХАТ (лецитинхолестеринацилтрансферазы)

Вторичные гиперлипидемии

- тучность
- цирроз печени алкогольный, билиарный
- сахарный диабет
- гипофункция щитовидной железы
- нефротический синдром
- панкреатит острый и хронический
- пероральные противозачаточные препараты
- подагра
- препараты: некоторые бетаблокаторы, тиазидовые диуретики
- беременность
- гликогеноз.

Снижение концентрации ТАГ:

- гиполипопротеинемия
- гипертиреоз
- синдром малабсорбции.

Опыт 7. Определение концентрации общего холестерина в сыворотке и плазме крови ферментативным колориметрическим методом (с набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум», г. Санкт-Петербург)

Принцип метода:

1. Эфиры холестерина + H_2O $\xrightarrow{\text{холестеролэстераза}}$ холестерин + ВЖК;
2. Холестерин + O_2 $\xrightarrow{\text{холестеролоксидаза}}$ холестерин + H_2O_2 ;
3. $2H_2O_2$ + 4-аминоантипирин + фенол $\xrightarrow{\text{пероксидаза}}$ хинонимин + $4H_2O$.

Концентрация хинонимина, определяемая фотометрически, пропорциональна концентрации общего холестерина в пробе свежей сыворотки или плазме крови. **ГЕМОЛИЗ НЕДОПУСТИМ.**

Состав набора:

Реагент № 1. Буфер (4 × 250 мл)

Реагент № 2. Лиюфилизат (4 флакона)

Реагент № 3. Калибратор — 5,17 чмоль/л (5,0 мл).

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Рабочий реагент: Содержимое флакона № 2 при аккуратном перемешивании растворить в содержимом флакона № 1. Полученный реагент стабилен не менее 60 суток при хранении при 2-8 °С. *Бледно-розовая окраска рабочего реагента до оптической плотности 0,150, измеренная против дистиллированной воды при $\lambda = 500$ нм, не влияет на правильность определения холестерина в исследуемом образце.* Реагент № 3 готов к использованию. Плотно закрывать 1 флакон сразу же после использования. Невскрытые реагенты № 1-3 стабильны не менее 12 месяцев при температуре 2-8 °С в темноте. Дата изготовления, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа:

	Опытная проба (мл)	Калибратор (мл)	Контроль (мл)
Сыворотка или плазма	0,02	—	—
Калибратор	—	0,02	—
Вода	—	—	0,02
Рабочий реагент	2,0	2,0	2,0

Перемешать и инкубировать не менее 15 минут при температуре 20–25°C или 10 минут при 37 °C. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм при длине волны 500 нм. Окраска стабильна не менее 2 часов после окончания инкубации при предохранении от прямого солнечного света.

Автоматические анализаторы:

Параметры:

Длина волны _____ 500 нм
 Измерение против _____ Контрольной пробы
 Метод измерения _____ Конечная точка
 Изменение оптической плотности _____ Возрастает
 Температура _____ 37 °C
 Соотношение образец/реагент _____ 1:100
 Время преинкубации _____ 3 секунды
 Время реакции _____ 600 секунд
 Предел абсорбции контрольной пробы против воды __ 0,15 А
 Предел максимальной абсорбции _____ 2,00 А
 Калибратор (стандарт) _____ 200 мг/100 мл (5,17 ммоль/л)
 Линейность _____ 1000 мг/100 мл (25,8 ммоль/д)

**Расчет содержания общего холестерина
в исследуемом образце:**

$$C = 5,17 \times \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ (ммоль / л).}$$

Интерпретация результатов анализа:

Нормальные показатели — до 5,17 ммоль/л

Пограничные показатели — 5,17–6,50 ммоль/л

Патологические показатели — свыше 6,50 ммоль/л.

10.2. Тест-контроль по теме «Обмен липидов в норме и патологии»

- 1. Желчные кислоты выполняют следующие функции в организме:**
 - 1) эмульгирование жиров
 - 2) активация липолитических ферментов
 - 3) участие в построении простой и сложной мицеллы
 - 4) всасывание аминокислот
 - 5) всасывание β -МАГ, α , β -ДАГ
 - 6) всасывание жирорастворимых витаминов.
 - 2. В печени синтезируются из холестерина первичные желчные кислоты:**
 - 1) холевая
 - 2) литохолевая
 - 3) тауродезоксихолевая
 - 4) хенодезоксихолевая
 - 5) гликолитихолевая
 - 6) тауролитохолевая.
 - 3. В кишечнике под влиянием ферментов микробов синтезируются вторичные желчные кислоты:**
 - 1) литохолевая
 - 2) дезоксихолевая
 - 3) холевая
 - 4) холановая
 - 5) хенодезоксихолевая
 - 6) гликохолевая.
 - 4. Желчные кислоты образуют конъюгаты:**
 - 1) с аланином
 - 2) с гликоколом
 - 3) с таурином
 - 4) с холестерином
 - 5) с жирными кислотами
 - 6) с пигментами.
 - 5. Конъюгаты желчных кислот и желчные кислоты образуют соли при взаимодействии:**
 - 1) с ионами натрия в составе желчи
 - 2) с ионами калия в составе желчи
-

- 3) с холестерином
- 4) с эфирами холестерина
- 5) с водой
- 6) с пигментами.

6. Какие продукты образуются при действии панкреатической липазы на триацилглицерины (ТАГ):

- 1) жирные кислоты
- 2) α , β -диацилглицерины
- 3) фосфорная кислота
- 4) β -моноацилглицерины
- 5) азотистые основания
- 6) глицерин?

7. При каких условиях действует панкреатическая липаза на липиды:

- 1) наличие желчных кислот
- 2) отсутствие желчных кислот
- 3) эмульгированные жиры
- 4) в кислой среде
- 5) образование комплекса панкреатической липазы с белком колипазой
- 6) в составе желудочного сока?

8. Роль эмульгаторов липидов играют:

- 1) триацилглицерины
- 2) соли желчных кислот
- 3) β -моноацилглицерины
- 4) вода
- 5) фосфолипиды
- 6) мыла.

9. В процессе эмульгирования липидов происходит:

- 1) образование тонкодисперсной системы
 - 2) увеличение поверхности контакта липидов с молекулами фермента липазы
 - 3) растворение липидов в воде
 - 4) всасывание липидов в кишечнике
 - 5) создаются условия для образования устойчивой жировой эмульсии
 - 6) уменьшение поверхностного натяжения на капле липида при контакте с водой.
-

10. Какие продукты образуются при гидролизе фосфолипидов:

- 1) холестерин
- 2) глицерин
- 3) жирные кислоты
- 4) фосфорная кислота
- 5) холин
- 6) триацилглицерины?

11. Укажите, какие из перечисленных процессов протекают с участием желчных кислот:

- 1) эмульгирование жира
- 2) всасывание глицерина
- 3) всасывание β -моноацилглицеринов
- 4) всасывание короткоцепочечных жирных кислот
- 5) всасывание высших жирных кислот и холестерина
- 6) повышение активности ТАГ-липазы.

12. переваривание фосфолипидов происходит под действием панкреатических фосфолипаз с образованием:

- 1) глицерина
- 2) β -моноацилглицеринов
- 3) высших жирных кислот
- 4) фосфорной кислоты
- 5) азотистых оснований
- 6) триацилглицеринов.

13. Укажите вещества, входящие в состав смешанной мицеллы, проникающей в клетки слизистой кишечника:

- 1) жирные кислоты
- 2) холестерин
- 3) желчные кислоты
- 4) моноацилглицерины
- 5) триацилглицерины
- 6) фосфолипиды.

14. Т. к. липиды не растворяются в водных фазах организма, то транспорт их по крови и лимфе осуществляется в виде:

- 1) в свободном виде
-

- 2) комплексов с белками
- 3) комплексов с фосфолипидами
- 4) хиломикронов (ХМ)
- 5) липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП)
- 6) липопротеинов высокой плотности.

15. Укажите состав простой мицеллы:

- 1) холестерин — 1 часть
- 2) желчные кислоты — 12,5 частей
- 3) желчные кислоты — 2 части
- 4) фосфолипиды — 2,5 частей
- 5) высшие жирные кислоты
- 6) β -моноацилглицерины.

16. Основной функцией хиломикронов является:

- 1) транспорт пищевого жира
- 2) транспорт ресинтезированного жира из эпителия тонкого кишечника
- 3) транспорт жира, синтезированного печенью
- 4) транспорт триацилглицеринов
- 5) хранение триацилглицеринов
- 6) транспорт фосфолипидов.

17. Что является транспортной формой неэстерифицированных жирных кислот в крови:

- 1) свободные жирные кислоты
- 2) комплекс неэстерифицированных жирных кислот с альбуминами
- 3) холестерин
- 4) эфиры холестерина
- 5) хиломикроны
- 6) триацилглицерины?

18. Назовите источники высших жирных кислот в организме:

- 1) из пищи в виде хиломикронов
 - 2) из пищи в виде ЛОНП
 - 3) гидролиз фосфолипидов
 - 4) гидролиз жиров в клетке под действием ТАГ-липазы
 - 5) биосинтез ВЖК
 - 6) комплекс НЭЖК с альбуминами.
-

19. Укажите место синтеза ВЖК (до C_{16})

- 1) в митохондриях печени
- 2) в цитозоле клеток скелетных мышц
- 3) в цитозоле клеток жировой ткани
- 4) в митохондриях сердечной мышцы
- 5) в цитозоле клеток печени
- 6) в митохондриях клеток скелетных мышц.

20. Какие факторы необходимы для переноса ВЖК в митохондрии из цитозоля клетки:

- 1) карнитин
- 2) альбумин
- 3) диффузия через мембрану клеток
- 4) активная форма уксусной кислоты
- 5) карнитинцитацитохром c цитозольная
- 6) карнитинцитохром c митохондриальная?

21. Под влиянием адреналина и глюкагона происходит:

- 1) активация карнитинцитохром c 1
- 2) активация β -окисления ВЖК
- 3) активация ТАГ-липазы
- 4) активация биосинтеза ВЖК
- 5) повышение концентрации ВЖК в митохондриях
- 6) повышение концентрации ВЖК в цитозоле.

22. Какие факторы вызывают жировую дегенерацию печени:

- 1) недостаток в пище холина, метионина
- 2) недостаточный синтез фосфатидилхолина
- 3) нарушение синтеза липопротеидных комплексов
- 4) накопление ТАГ в печени
- 5) накопление холестерина в печени
- 3) недостаток ферментов, расщепляющих ТАГ и фосфолипиды.

23. Какова роль S-аденозилметионина в биосинтезе фосфолипидов:

- 1) образование эндогенного холина в печени
 - 2) донор метильных групп
 - 3) донор аденозина
-

- 4) биосинтез фосфатидилхолина из фосфатидилэтаноламина
- 5) образование цистеина
- 6) биосинтез фосфатидилинозита.

24. Укажите фосфолипиды, которые содержат азот в своем составе:

- 1) фосфатидилсерин
- 2) фосфатидилинозит
- 3) фосфатидилхолин
- 4) сфингомиелин
- 5) фосфатидилэтаноламин
- 6) кардиолипин.

25. Какое значение имеет кишечно-печеночная циркуляция желчных кислот из печени в кишечник? Выберите правильный ответ:

- 1) транспорт солей желчных кислот
- 2) всасывание длинноцепочечных жирных кислот
- 3) всасывание β -моноацилглицеринов в энтероцитах
- 4) всасывание короткоцепочечных жирных кислот в кровь
- 5) снабжение печени холестерином
- 6) образование простых и сложных мицел.

26. Как действует инсулин на жировой обмен:

- 1) активирует липопротеинлипазу
- 2) активирует ТАГ-липазу
- 3) действует посредством аденилатциклазной системы
- 4) повышает скорость мобилизации жира
- 5) усиливает биосинтез ТАГ
- 6) стимулирует превращение углеводов в ТАГ?

27. Каким образом избыток энергии в организме влияет на биосинтез ВЖК:

- 1) замедляет ЦТК
 - 2) цитрат из митохондрий перейдет в цитозоль клетки
 - 3) усилится биосинтез ВЖК
 - 4) усилится липолиз ТАГ
-

- 5) повышается концентрация ацетил-КоА в цитозоле
- 6) повышается концентрация ацетил-КоА в митохондри?

28. Укажите факторы, увеличивающие скорость биосинтеза холестерина в организме:

- 1) растительная пища
- 2) мясо, рыба в рационе
- 3) повышение активности ГМГ-КоА-редуктазы
- 4) беременность
- 5) облучение
- 6) понижение активности ГМГ-КоА-редуктазы.

29. Укажите факторы, выключающие биосинтез холестерина:

- 1) большое количество холестерина в организме, (более 1,3 г в сутки)
- 2) мало ЛНП в плазме крови
- 3) снижение активности ГМГ-КоА-редуктазы
- 4) много ЛНП в плазме крови
- 5) растительная пища
- 6) много хенодезоксихолевой и холевой кислот в печени.

30. Укажите пути расходования холестерина в организме:

- 1) биосинтез желчных кислот
- 2) биосинтез витамина D_3 под влиянием ультрафиолетовых лучей
- 3) биосинтез стероидных гормонов
- 4) на построение мембран клеток
- 5) основная масса (150 г) холестерина выводится из организма
- 6) выводится из организма 0,5 г холестерина в виде желчных кислот.

31. Какие частицы являются атерогенными:

- 1) ХМ
 - 2) жирные кислоты
 - 3) ЛВП зрелые
 - 4) ЛНП
 - 5) ЛОНП
 - 6) ЛВП предшественники?
-

32. Какие частицы являются антиатерогенными:

- 1) ЛВП-зрелые
- 2) холестерин
- 3) ЛОНП
- 4) жиры
- 5) ЛВП-предшественники
- 6) комплекс НЭЖК и альбумина?

33. Назовите основные причины, приводящие к развитию гиперхолестеринемии:

- 1) избыточное потребление пищи, богатой углеводами
- 2) недостаточность синтеза рецепторов ЛНП
- 3) недостаточность ЛХАТ
- 4) нарушение процесса эндоцитоза
- 5) употребление в пищу в большом количестве жиров
- 6) физическая нагрузка.

34. Укажите место синтеза ХМ:

- 1) печень
- 2) плазма крови
- 3) клетки слизистой тонкого кишечника
- 4) лимфа крови
- 5) почки
- 6) скелетные мышцы.

35. Из каких компонентов формируются ЛОНП:

- 1) ТАГ пищевого происхождения
- 2) ЭХС
- 3) ХС
- 4) ТАГ — образовавшиеся в печени
- 5) апобелки В-100
- 6) апобелки В-48, апо-А, апо-С?

36. Укажите место синтеза ЛОНП

- 1) кровяное русло
 - 2) слизистая тонкого кишечника
 - 3) печень
 - 4) жировая ткань
 - 5) скелетные мышцы
 - 6) почки.
-

37. Роль ЛХАТ в обмене липопротеинов:

- 1) образование ЭХС
- 2) образование ЛВП зрелых
- 3) образование ЛВП предшественников
- 4) транспорт ХС из клеток
- 5) гидролиз ТАГ
- 6) гидролиз β -эфирной связи в ФХ.

38. Укажите причины, по которым ЛВП называют «антиатерогенными»:

- 1) собирают избыток свободного ХС с поверхности клеток периферических тканей
- 2) образуются из ЛОНП
- 3) собирают избыток свободного ХС с мембран
- 4) транспортируют избыток ХС в печень
- 5) постоянно циркулируют в крови
- 6) препятствуют развитию атеросклероза.

39. К чему приводит недостаточность ЛХАТ в плазме крови:

- 1) не образуются эфиры холестерина
- 2) не образуются ЛВП зрелые
- 3) образуются ЛВП зрелые
- 4) склероз сосудов
- 5) гиперхолестеринемия
- 6) образуются эфиры холестерина?

40. Печень синтезирует кетоновые тела, если:

- 1) сахарный диабет
- 2) наличие инсулина
- 3) отсутствие или мало инсулина в крови
- 4) клетки мозга не получают глюкозу
- 5) гипогликемия
- 6) гипергликемия.

41. Печень не использует кетоновые тела с энергетическими целями, т. к. в гепатоцитах отсутствует фермент:

- 1) ГМГ-КоА-редуктазы
 - 2) 3-кетоацил-КоА-трансфераза
 - 3) ГМГ-КоА-лиаза
 - 4) ТАГ — липаза
-

- 5) ЛХАТ
- 6) ацетил-КоА-ацетилтрансфераза.

42. Все ткани, кроме печени, используют кетоновые тела для покрытия энергетических затрат, т. к. содержат фермент:

- 1) 3-кетоацил-КоА-трансфераза
- 2) амило-1,6-глюкозидаза
- 3) декарбоксилаза
- 4) гексокиназа
- о) фосфолипаза
- б) гликогенсинтаза.

43. Укажите липопротеины, постоянно циркулирующие в плазме крови:

- 1) ХМ
- 2) ЛОНП
- 3) ЛНП
- 4) ЛВП-зрелые
- 5) комплекс НЭЖК и альбумина
- 6) ЛВП-предшественники.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1. Каков принцип количественного определения холестерина в сыворотке крови?
 - 2. Каково клинико-диагностическое значение определения: $XC_{\text{общего}}$, XC -ЛНП, XC -ЛВП?
 - 5. Каков принцип разделения липопротеинов сыворотки крови в полиакриламидном геле?
 - 4. Каково количественное содержание в сыворотке крови показателей обмена липидов в норме: $XC_{\text{общего}}$, XC -ЛНП, XC -ЛВП, ХМ, ЛОНП, ЛНП, ЛВП?
 - 5. Каков принцип разделения фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии в силикагеле?
 - 6. Что называют R_f ?
 - 7. Что называют кетоновыми телами?
 - 8. Каково количественное содержание кетоновых тел в крови здорового человека?
 - 9. Назовите реакции качественного обнаружения кетоновых тел в биологических жидкостях организма человека.
 - 10. Каковы принципы качественного обнаружения кетоновых тел?
-

11. Каков принцип количественного определения холестерина в плазме крови ферментативным колориметрическим методом?
 12. Каково клинико-диагностическое значение определения ТАГ в плазме крови?
 15. Каков принцип количественного определения ТАГ в плазме крови ферментативным колориметрическим методом?
 14. Представьте общую схему обмена липидов и ВЖК в организме человека.
-

Глава 11

Водно-минеральный обмен в норме и патологии

КИСЛОТНО-ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ

Нормальные значения показателей КОС (А. И. Карпищенко)

Возрастные группы	Показатель						
	pH	pCO ₂ , ммHg	BE, ммоль/л	BB, ммоль/л	SB, ммоль/л	AB, ммоль/л	Общая CO ₂ , ммоль/л
Новорожденные	7,2–7,36	24,35–36,00	-10,44–19,16	26,8–39,6	9,96–17,44	12,1–15,1	12,9–16,1
11 дней – 11 месяцев	7,41–7,43	29,67–30,93	-2,86–3,66	36,02–38,58	22,74–23,86	19,34–20,46	40,28–21,52
1 год – 3 года 11 мес.	7,42–7,46	29,18–31,22	-1,82–2,34	44,11–47,10	21,13–22,47	19,00–20,20	20,10–20,10
4 года – 7 лет 11 мес.	7,40–7,44	31,54–32,46	-1,78–2,18	42,90–45,3	22,96–23,44	21,11–21,71	22,00–22,60
8 лет – 14 лет 11 мес.	7,38–7,42	33,90–35,30	-1,80–2,2	43,15–45,95	23,19–23,59	21,58–23,28	22,20–23,30
15 лет – 18 лет	7,38–7,42	32,90–34,10	-2,49–3,1	42,00–43,6	20,47–20,93	19,44–20,16	20,59–21,21
Взрослые	7,35–7,43	35–45	-1,5–+3,1	44,90–51,80	21,30–24,80	19,10–23,40	20,10–25,90

Характер изменения значений pH, BE, и pCO_2 при различных синдромах нарушений кислотно-основного состояния

Синдромы кислотно-основного состояния	Показатели кислотно-основного состояния		
	pH	BE	pCO_2
Некомпенсированный метаболический ацидоз	↓↓	↓↓	N
Частично компенсированный метаболический ацидоз	↓	↓↓	↓
Компенсированный метаболический ацидоз	N	↓↓	↓↓
Некомпенсированный дыхательный ацидоз	↓↓	N	↑↑
Частично компенсированный дыхательный ацидоз	↓	↑	↑↑
Компенсированный дыхательный ацидоз	N	↑↑	↑↑
Некомпенсированный метаболический алкалоз	↑↑	↑↑	N
Частично компенсированный метаболический алкалоз	↑	↑↑	↑
Компенсированный метаболический алкалоз	N	↑↑	↑↑
Некомпенсированный дыхательный алкалоз	↑↑	N	↓↓
Частично компенсированный дыхательный алкалоз	↑	↓	↓↓
Компенсированный дыхательный алкалоз	N	↓↓	↓↓
Дыхательный и метаболический ацидоз	↓	↓	↑
Дыхательный и метаболический алкалоз	↑	↑	↑
Метаболический ацидоз и дыхательный алкалоз	Различный	↑	↓
Метаболический алкалоз и дыхательный ацидоз	Различный	↑	↑

Биохимические показатели мочи в норме

Показатель	Значение в традицион- ных единицах	Кoeffи- циент в пересче- тах	Значение в системе СИ
Общий азот	6–17 г/сут.	71,39	428,4–1213,7 ммоль/сут.
Азот аминокислот	50–200 мг/сут.		3,5–14,3 ммоль/сут.
АКТГ	15–70 пг/мл	0,22	3,3–15,4 пмоль/л
Альдостерон			8,34–41,7 нмоль/сут.
Амилаза	0,04–0,30 МЕ/мин	6,67	0,67–5 нкат/мин
Аминокислоты			
Тирозин:			
мужчины	15–40 мг/сут.		
женщины	15–49 мг/сут.		
Аммиак	30–50 ммоль/л		10–107 ммоль/сут.
Ацетон (качествен- ная реакция)	Отрицательная		Отрицательная
Гаптоглобин	0–5 мг/л		
Гликозаминогли- каны			
Осаждение ЦПХ	1,03–3,35 мг/1г креатинина		
Карбозоловая реакция	2,37–2,99 мг/л		
Глюкоза (качественные про- бы на глюкозу мочи отрицательные)			
δ -Аминолевулино- вая кислота	103–7 мг/сут.	7,6	10–53 мкмоль/сут.

Биохимические показатели мочи в норме

продолжение

Показатель	Значение в традицион- ных единицах	Кэффи- циент в пересче- тах	Значение в системе СИ
Калий	1,5–3,2 г/сут.		38–77 ммоль/сут.
Кальций	0–250 мг/сут.	0,025	0–6,25 ммоль/сут.
Катехоламины			
Адреналин	<10мкг/сут.		<55 нмоль/л
Норадреналин	<100мкг/сут.		<590 нмоль/л
Метанефрин	0,1–1,6 мг/сут.		0,5–8,1 мкмоль/л
17–Кетостероиды:			
мужчины	27,7–79,7 мкмоль/сут	1	27,7–79,7 мкмоль/сут.
женщины	17,4–55,4 мкмоль/сут.	1	17,4–55,4 мкмоль/сут.
Копропорфирин	50–250 мкг/сут.		80–380 нмоль/сут.
Кортизол, свободный	20–90 мкг/сут.	2,76	55–248 нмоль/сут.
Креатин:			
мужчины			0–0,30 ммоль/сут.
женщины			0–0,61 ммоль/сут.
Креатинин			
Клиренс:	120 мл/мин		
мужчины	1–2 г/сут.	8,84	8,8–17,7 ммоль/сут.
женщины	0,6–1,5 г/сут.	8,84	5,3–13,3 ммоль/сут.
Магний			3–5 ммоль/сут.
Медь	15–50 мкг/сут.	0,0157	0,24–0,78 мкмоль/сут.
Миоглобин	<4мкг/сут. (2–4 нг/мл)		
Мочевая кислота			1,48–4,43 ммоль/сут.

Биохимические показатели мочи в норме

окончание

Показатель	Значение в традицион- ных единицах	Козффи- циент в пересече- тах	Значение в системе СИ
Мочевина	20–35 г/сут.	16,65	333–587 ммоль/сут.
Натрий	3–6 г/сут.		40–220 ммоль/л
Оксалаты	10–40 мг/сут.	11,4	114–456 мкмоль/сут.
5-оксииндолилук- сусная кислота			5–42 мкмоль/сут.
17-Оксикортикосте- роиды (17-ОКС) 17-ОКС свободные			0,11–0,77 мкмоль/сут.
17-ОКС суммарно			4,1–13,7 мкмоль/сут.
Осмолярность	500–1400 мосмоль/кг		
Порфирины			
Копропорфирин	0–72 мкг/сут.	1,53	0–110 нмоль/сут.
Уропорфирин	0–27 мкг/сут.	1,2	0–32 нмоль/сут.
Порфобилиноген	0–2 мг/сут.	4,4	0–8,8 мкмоль/сут.
Серотонин			0,5–1,2 мкмоль/сут.
Титруемая кислот- ность мочи (ТК)			20–40 мэкв/сут.
Уробилиноген	0–6 мг/сут.		
Фосфор неоргани- ческий	0,9–1,3г/сут.		12,9–42 ммоль/сут.
Хлориды	3,6–9,0 г/сут.		170–210 ммоль/сут.
5-Гидроксииндолак- сусная кислота	0,2–5,7 мг/сут.	5,23	1–30 мкмоль/сут.



11.1 Лабораторная работа

Опыт 1. Определение концентрации ионов натрия и калия в сыворотке крови с помощью ионоселективных электродов

Актуальность темы

Унифицированным методом определения активности (концентрации) ионов натрия, калия в крови, плазме, сыворотке и других биологических жидкостях является потенциометрический метод с использованием ионоселективных электродов. Он дает возможность быстро (1–2 с) и точно (10^{-6} моль/л) определять активность ионов в биологических жидкостях.

В клинической практике контроль за содержанием указанных ионов необходим для правильной постановки диагноза, проведения послеоперационного лечения, наблюдения за состоянием сердечно-сосудистой системы и почек, определения кислотно-основного состояния организма (КОС) и др. В санитарно-химических лабораториях — для анализа продуктов питания, воды, воздуха, почвы, выхлопных газов. Фармакологи используют данный метод для анализа лекарственных препаратов.

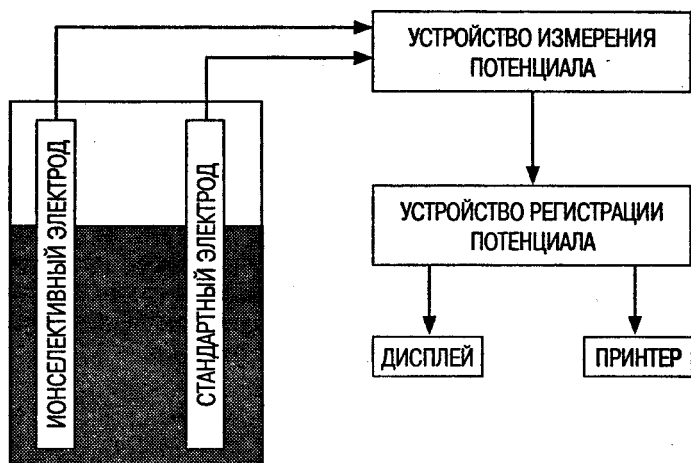
Применение ионоселективных электродов в медико-биологических исследованиях

Ионоселективные электроды применяются для определения концентрации (активности) таких ионов, как Na^+ ; K^+ ; Li^+ ; Ca^{2+} NH_4^+ , Cu^{2+} S^{2-} , CN^- , I^- , Cl^- , F^- . Ионоселективный электрод — электрод, позволяющий определять данный ион в любой смеси.

При погружении ионоселективного электрода в раствор, содержащий ионы, на поверхности электрода возникает

электрический потенциал, величина которого зависит от концентрации определяемого иона: $E = E^{\circ} + 0,059 \lg A$, где E — измеряемая э. д. с.; E° — постоянная величина, зависящая от выбранного вспомогательного электрода, A — активность (концентрация) определяемого иона.

Для измерения величины потенциала в исследуемый раствор помещают индикаторный электрод и электрод сравнения (хлорсеребряный), величина потенциала которого не меняется. Разность потенциалов измеряют с помощью прибора — потенциометра.



Блок-схема прибора для определения концентрации электролитов с помощью ионселективных электродов

Для исследования используется цельная сыворотка крови, моча требует предварительного разведения.

Для анализа одного типа ионов необходимо 0,15 мл биологического материала.

Точность определения концентрации натрия, калия, хлора — 2%, кальция — 3%.

Воспроизводимость:

для калия в сыворотке — 1%, в моче — 3%;

для натрия в сыворотке — 1%, в моче — 3%;

для кальция в сыворотке — 2%;

для хлора в сыворотке — 1%.

Производительность без учета подготовки материала для исследования составляет до 180 анализов в 1 ч. При

определении трех электролитов в одной пробе — 60 проб в 1 ч.

Область измерений:

калия — 2–10 ммоль/л;

натрия — 100–200 ммоль/л;

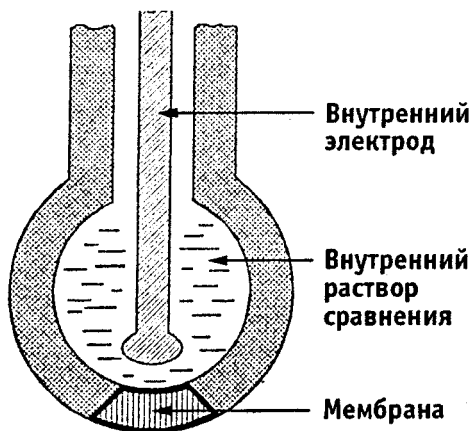
кальция — 0,2–8,0 ммоль/л;

хлора — 50–150 ммоль/л.

Время эксплуатации электрода — 3 мес.

Использование ионселективных электродов на кальций и магний позволяет определять их ионизированные формы.

Натрий-селективный электрод — электрод со стеклянным рН-чувствительным шариком на конце. Внутри электрода находятся раствор с постоянной концентрацией ионов натрия и электрод сравнения (хлорсеребряный или внутренний). Электродноактивным материалом является натриевое стекло, содержащее оксиды натрия, алюминия и кремния в различных соотношениях. При контакте мембраны с раствором, содержащим ионы натрия, на разделе фаз «мембрана — раствор» возникает разность потенциалов, величина которой зависит от концентрации ионов натрия в растворе образца. Электрод чувствителен к ионам натрия при их концентрации от 10^{-6} моль/л.



Устройство натрий-селективного электрода

Ход работы

1. В исследуемый раствор помещают ионоселективный электрод и электрод сравнения.

2. Устанавливают переключатель «род работы» на положение «mv».

3. Переключатель «размах» устанавливается в положение (-2 до 14) или (-1 до 19), приближенно э. д. с. определяют по шкале «mv» (нижняя шкала). Для измерения точного значения переключатель «пределы измерения» переводят на диапазон, в пределах которого находится приближенное значение э. д. с. Найденные значения умножают на 100.

4. По калибровочному графику находят концентрацию исследуемого раствора, соответствующую полученному значению э. д. с.

5. Делают вывод о соответствии концентрации натрия норме или состоянию гипер- или гипонатриемии.

Опыт 2. Определение концентрации железа в сыворотке или плазме крови колориметрическим методом без депротсинизации (Набор реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум», г. Санкт-Петербург)

Принцип метода

В кислой среде белковые комплексы, связывающие железо, диссоциируют, и железо восстанавливается до Fe^{++} . Ионы двухвалентного железа связываются с хромогеном (Nitro-PAPS), образуя окрашенный комплекс, концентрация которого пропорциональна концентрации железа в пробе.

Исследуемый материал:

Свежая сыворотка или гепаринизированная плазма крови.

Состав набора:

Реагент № 1. Монореагент

Реагент № 2. Калибратор — 30 мкмоль/л: железа стандартный раствор.

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность

Реагенты готовы к использованию и стабильны в течение 12 месяцев при температуре 18–25 °C в темноте.

Процедура анализа

	Опытная проба (мл)	Калибратор (мл)	Контроль мл)
Реагент № 1	2,0	2,0	2,0
Исследуемый образец	0,10	—	—
Реагент № 2	—	0,10	—
Вода	—	—	0,10

Реакционную смесь перемешать и инкубировать 3–5 минут при 18–25 °С. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см при длине волны 578 нм. Окраска стабильна в течение 2 часов.

Автоматические анализаторы:

Параметры:

Длина волны _____ 578 нм
 Измерение против _____ Контрольной пробы
 Метод измерения _____ Конечная точка
 Изменение оптической плотности _____ Возрастает
 Температура _____ 37 °С
 Соотношение образец/реагент _____ 1:20
 Время преинкубации _____ 3 секунды
 Время реакции _____ 180 секунд
 Предел абсорбции контрольной пробы против воздуха __ 0,20 А
 Предел максимальной абсорбции _____ 1,00 А
 Калибратор (стандарт) _____ 167 мкг/100 мл (30 мкмоль/л)
 Линейность _____ 1 мг/100 мл (179 ммоль/л)

Расчет содержания железа в исследуемом образце:

$$C = 167 \times \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ (мкг/100 мл)}$$

$$\text{или } C = 30 \times \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ (ммоль / л) .}$$

Нормальные величины:

мужчины — 9,5–30 мкмоль/л (53–167 мкг/100 мл)

женщины — 8,8–27 мкмоль/л (49–151 мкг/100 мл)

ВНИМАНИЕ: тест очень чувствительный. Используйте только бидистиллированную или деионизованную воду. Недостаточно чистая посуда является источником грубых ошибок, поэтому тщательно мойте посуду *хромовой смесью или 4 моль/л HCl и споласкивайте ее только бидистиллированной или деионизованной водой*. Рекомендуется использование одноразовой пластиковой посуды.

Опыт 3. Определение общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС) крови методом с карбонатом магния (с набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум», г. Санкт-Петербург)

Принцип метода

Сыворотку выдерживают с раствором трехвалентного железа, при этом весь трансферрин насыщается. Избыток солей железа удаляют адсорбцией на карбонате магния и определяют концентрацию железа колориметрическим методом.

Аналитические характеристики набора

Линейность, коэффициент вариации, чувствительность и др. зависят от используемого для определения железа набора.

Исследуемый материал

Свежая сыворотка без следов гемолиза.

Реагенты:

- № 1. Раствор хлорного железа (5 мл)
Железо хлорное 4,5 ммоль/л
Стабилизаторы
- № 2. Карбонат магния (8 г)

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность

Все реагенты полностью готовы к употреблению и стабильны в течение 12 месяцев при комнатной температуре в плотно закрытой посуде в темноте. Дата изготовления, серия и номер по каталогу указаны на упаковке.

Анализ

Добавьте 10 мкл реагента № 1 к 0,25 мл сыворотки. Хорошо перемешайте и оставьте на 10 минут. Добавьте

небольшое количество (на конце прилагаемого шпателя) реагента № 2. Несколько раз встряхните и оставьте еще на 15 минут. Снова встряхните и отцентрифугируйте в течение 15 минут при 3000 об/мин. Прозрачный супернатант используйте для определения концентрации железа в соответствии с инструкцией к используемому набору.

Нормальные величины:

мужчины — 45–75 мкмоль/л;

женщины — на 10–15% ниже, чем у мужчин.

ОБРАТИТЬ ВНИМАНИЕ: после добавления карбоната магния тщательно встряхивайте пробу и тщательно центрифугируйте. Супернатант после центрифугирования должен быть прозрачным.

Железо в сыворотке крови

Нормальные значения: 8,9–31,2 мкмоль/л.

Железо в организме входит в состав порфириновых соединений, главным образом гемоглобина и миоглобина; в небольших количествах оно включается в состав цитохромов, некоторых ферментов. Железо в сыворотке связывается с белками, образуя гемосидерин, ферритин, трансферрин. Концентрация железа в сыворотке зависит от резорбции в желудочно-кишечном тракте, накопления в кишечнике, селезенке и костном мозге, от синтеза и распада гемоглобина и его потери организмом. Средние показатели железа ниже у женщин, чем у мужчин, но у тех и у других с возрастом показатель железа падает. Концентрация железа имеет суточный ритм, а у женщин — связь с менструальным циклом. При беременности содержание железа в организме уменьшается, особенно во второй половине беременности.

Клинико-диагностическое значение определения содержания железа

Повышение концентрации

- чрезмерная резорбция железа
 - избыточное внутривенное и внутримышечное введение препаратов железа
 - частые переливания крови
 - острое отравление препаратами железа (у детей при чрезмерном пероральном приеме препаратов железа)
 - первичный и вторичный гемохроматоз
-

- гемолитические анемии
- гипопластические и апластические анемии
- талассемия
- B_{12} - и фолиеводефицитные анемии
- свинцовая интоксикация
- болезни печени
 - острый гепатит
 - острый некроз печени (повышение концентрации железа пропорционально степени некроза)
- хронический холецистит
- пероральные контрацептивы

Снижение концентрации

- железодефицитная анемия
- периоды активного эритропоза (начальная фаза ремиссии при злокачественной анемии)
- рак печени
- холестатический синдром (обтурационная желтуха)
- гемосидероз внутренних органов.
- дефицит витамина С
- миома матки
- болезни почек.

ОБЩАЯ ЖЕЛЕЗОСВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ (ОЖСС)

Сыворотка крови

Нормальные значения: 45–72 мкмоль/л.

ОЖСС является показателем концентрации в сыворотке трансферрина, транспортного белка, переносящего железо. В обычных условиях около 35% трансферрина связано с железом.

Физиологические изменения ОЖСС

- Нормально протекающая беременность (ОЖСС увеличивается до 450 мкг/дл, одновременно снижается содержание железа)
- Здоровые дети (сразу после рождения ОЖСС снижается затем постепенно повышается до 400 мкг/дл на второй год жизни).

Клинико-диагностическое значение определения ОЖСС

Повышение ОЖСС

- повышенная концентрация железа в сыворотке
 - повреждение печени (острый гепатит, цирроз)
 - чрезмерное получение железа
-

- слишком долгое лечение препаратами железа
- частые переливания крови
- гемохроматоз
- пониженные концентрации железа в сыворотке:
 - нормально протекающая беременность
 - острая и хроническая потеря крови
 - иногда при железодефицитных анемиях.

Снижение ОЖСС:

- острые и хронические инфекции
- B_{12} - и фолиевыедефицитная анемия (состояния обострения)
- уремия
- болезни, связанные с новообразованиями
- нефротический синдром
- гемолитическая анемия
- ревматическое воспаление суставов.

11.2. Тест-контроль по теме

«Водно-минеральный обмен в норме и патологии»

Раздел I

1. Водно-электролитным обменом называют:

- 1) совокупность процессов поступления воды и электролитов в организм
- 2) распределение воды и электролитов в организме
- 3) образование веществ в организме
- 4) выделение из организма воды и электролитов
- 5) распределение белков в организме
- 6) обмен веществ в организме.

2. Вода в организме выполняет роль:

- 1) метаболическую
- 2) пластическую
- 3) гомеостатическую
- 4) транспортную
- 5) гормональную
- 6) регуляторную.

3. Эндогенная вода образуется в организме при терминальном окислении веществ. В расчете на 100 г вещества наибольшее количество воды образуется при окислении:

- 1) белков
-

- 2) жиров
- 3) углеводов
- 4) гетерополисахаридов
- 5) нуклеиновых кислот
- 6) гликогена.

4. Суточный объем эндогенной воды равен:

- 1) 300–400 мл
- 2) 600–800 мл
- 3) 1 л–1,5 л
- 4) 2–2,5 л
- 5) 1,5–2 л
- 6) 2–3 л.

5. Из организма ежедневно выводится вода в количестве:

- 1) 300–400 мл
- 2) 600–800 мл
- 3) 1–1,5 л
- 4) 2–2,5 л
- 5) 1,5–2 л
- 6) 2–3 л.

6. К параметрам, характеризующим водно-электролитный обмен, относятся:

- 1) значение давления
- 2) общий объем воды
- 3) распределение воды внутри и вне клеток
- 4) pH плазмы
- 5) осмолярность плазмы
- 6) температура.

7. Осмолярность плазмы зависит от концентрации:

- 1) ионов калия
- 2) ионов натрия
- 3) глюкозы
- 4) мочевой кислоты
- 5) мочевины
- 6) ионов магния.

8. В норме значение осмолярности равно (в ммоль/л):

- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1) 385 | 3) 229 | 5) 289 |
| 2) 285 | 4) 224 | 6) 385. |
-

9. Осмолярность зависит от:

- 1) разности давлений
- 2) разности концентраций электролитов внутри и вне клетки
- 3) давления CO_2
- 4) концентрации ионов натрия
- 5) концентрации глюкозы
- 6) концентрации мочевины.

10. Если значение осмолярности изменено, то какое состояние называется:

- 1) гиперосмолярность
- 2) гипоосмолярность
- 3) изоосмолярность
- 4) изогидрия
- 5) изотермия
- 6) изоосмия?

11. В регуляции водно-электролитного обмена принимают участие:

- 1) глюкагон
- 2) вазопрессин
- 3) альдостерон
- 4) ренин-ангиотензиновая система
- 5) кортизол
- 6) инсулин.

12. Химическая природа вазопрессина:

- 1) производное аминокислот
- 2) производное ВЖК
- 3) стероидная
- 4) пептидная
- 5) производное холестерина
- 6) белковая.

13. Механизм действия вазопрессина:

- 1) мембранно-внутриклеточный
 - 2) увеличивает проницаемость клеток дистальных канальцев собирательной трубочки
 - 3) активирует гиалуронидазу
 - 4) усиливает глюконеогенез в печени
 - 5) вызывает деполимеризацию гиалуроновой кислоты
 - 6) вызывает биосинтез аквапорина.
-

14. Альдостерон в организме оказывает действие:

- 1) суживает кровеносные сосуды
- 2) расширяет кровеносные сосуды
- 3) усиливает реабсорбцию ионов натрия из первичной мочи
- 4) ослабляет реабсорбцию ионов натрия из первичной мочи
- 5) усиливает секрецию вазопрессина
- 6) уменьшает реабсорбцию ионов калия.

15. Действие альдостерона приводит к:

- 1) увеличению объема крови
- 2) уменьшению объема крови
- 3) увеличению артериального давления
- 4) уменьшению артериального давления
- 5) увеличению осмотического давления
- 6) уменьшению осмотического давления.

16. Ренин является:

- 1) гормоном
- 2) протеолитическим ферментом
- 3) пептидом
- 4) белком
- 5) стероидом
- 6) производным витамина D.

17. Ренин синтезируется в:

- 1) корковом слое надпочечников
- 2) почках
- 3) печени
- 4) паращитовидных железах
- 5) мозге
- 6) поджелудочной железе.

18. Ренин синтезируется в ответ на:

- 1) увеличение артериального давления
- 2) увеличение осмотического давления
- 3) уменьшение осмотического давления
- 4) изменение онкотического давления
- 5) уменьшение артериального давления
- 6) увеличение концентрации глюкозы.

19. Ангиотензин II вызывает следующие метаболические эффекты:

- 1) уменьшает секрецию вазопрессина и альдостерона
- 2) увеличивает секрецию вазопрессина и альдостерона
- 3) суживает кровеносные сосуды
- 4) расширяет кровеносные сосуды
- 5) вызывает чувство жажды (полидипсию)
- 6) повышает артериальное давление.

20. Роль кальция в организме:

- 1) механическая (опорная), т. к. входит в состав скелета
- 2) участвует в свертывании крови
- 3) влияет на проницаемость мембран для ионов
- 4) участвует в проведении нервных импульсов
- 5) участвует в мышечном сокращении
- 6) активирует ферменты.

21. Содержание кальция в сыворотке крови колеблется в пределах (в ммоль/л):

- 1) 2,24–2,99
- 2) 2,24–2,29
- 3) 2,00–3,00
- 4) 1,19–2,29
- 5) 3,12–4,15
- 6) 3,33–5,55.

22. Укажите содержание натрия в плазме крови (ммоль/л):

- 1) 100–110
- 2) 115–120
- 3) 125–130
- 4) 135–155
- 5) 160–175
- 6) 180–195.

23. Укажите содержание калия в плазме крови (ммоль/л):

- 1) 1,0–1,2
 - 2) 1,5–2,1
-

- 3) 2,2-3,3
- 4) 3,6-5,0
- 5) 5,2-6,3
- 6) 6,9-8,4.

24. Укажите содержание фосфатов в плазме крови (ммоль/л):

- 1) 0,52-0,61
- 2) 0,63-0,75
- 3) 0,81-1,45
- 4) 7,23-7,31
- 5) 1,51-2,15
- 6) 2,29-2,99.

25. Химическая природа паратгормона:

- 1) пептидная
- 2) производное аминокислот
- 3) белковая
- 4) стероидная
- 5) гетерополисахарид
- 6) производное ВЖК.

26. Механизм действия паратгормона:

- 1) мембранный
- 2) мембранно-внутриклеточный
- 3) цитозольный
- 4) через ц-АМФ
- 5) клеточный
- 6) через ГТФ.

27. Паратгормон выделяется клетками желез:

- 1) поджелудочной
- 2) щитовидной
- 3) паращитовидной
- 4) слюнных
- 5) тимусом
- 6) половыми.

28. Химическая природа кальцитонина:

- 1) производное ВЖК
- 2) стероидная
- 3) пептидная
- 4) производное аминокислот

- 5) белковая
- 6) гетерополисахарид.

29. Механизм действия кальцитонина:

- 1) мембранный
- 2) мембранно-внутриклеточный
- 3) цитозольный
- 4) через ц-АМФ
- 5) клеточный
- 6) через ГТФ.

30) Кальцитонин выделяется клетками желез:

- 1) поджелудочной
- 2) щитовидной
- 3) паращитовидной
- 4) слюнных
- 5) тимусом
- 6) половыми.

31. Химическая природа кальцитриола:

- 1) пептидная
- 2) стероидная
- 3) производное ВЖК
- 4) производное аминокислот
- 5) белковая
- 6) гетерополисахарид.

32. Механизм действия кальцитриола:

- 1) мембранный
- 2) мембранно-внутриклеточный
- 3) цитозольный
- 4) через ц-АМФ
- 5) клеточный
- 6) через ГТФ.

33. К гормонам, увеличивающим уровень кальция в сыворотке крови, относятся:

- 1) паратгормон
 - 2) кальцитонин
 - 3) кальцитриол
 - 4) кортизол
 - 5) вазопрессин
 - 6) глюкагон.
-

34. К гормонам, снижающим уровень кальция в сыровотке крови, относятся:

- 1) паратгормон
- 2) кальцитонин
- 3) кальцитриол
- 4) кортизол
- 5) альдостерон
- 6) вазопрессин.

35. К гормонам, увеличивающим реабсорбцию фосфатов из первичной мочи, относятся:

- 1) паратгормон
- 2) кальцитонин
- 3) кальцитриол
- 4) кортизол
- 5) вазопрессин
- 6) альдостерон.

36. К гормонам, снижающим реабсорбцию фосфатов из первичной мочи, относятся:

- 1) паратгормон
- 2) кальцитонин
- 3) кальцитриол
- 4) кортизол
- 5) вазопрессин
- 6) глюкагон.

Раздел 2 Биохимия почек

1. К органам выделительной системы относятся:

- 1) сердце
- 2) почки
- 3) легкие
- 4) печень
- 5) кожа
- 6) ЖКТ.

2. Через почки из организма выводятся продукты:

- 1) углекислый газ
 - 2) гидрокарбонат натрия
 - 3) желчные кислоты
 - 4) азотистого обмена
-

- 5) детоксикации, образуемые в печени
- 6) желчь.

3. Конечными продуктами распада азотсодержащих соединений, выводимыми почками, являются:

- 1) аммиак
- 2) мочевины
- 3) соли аммония
- 4) мочевая кислота
- 5) индикан
- 6) креатинин.

4. Мочевина — конечный продукт распада:

- 1) углеводов
- 2) аминокислот
- 3) аминов
- 4) азотистых оснований
- 5) липидов
- 6) пептидов, белков.

5. Мочевая кислота является конечным продуктом распада:

- 1) пиримидиновых оснований
- 2) мочевины
- 3) пуриновых оснований
- 4) уробилина
- 5) индикана
- 6) липидов.

6. Креатинин образуется в результате реакции:

- 1) окислительного дезаминирования аминокислот
- 2) неферментативного дефосфорилирования креатинфосфата
- 3) ферментативного распада креатинфосфата
- 4) гидролитического дезаминирования серина
- 5) гидролитического дезаминирования треонина
- 6) распада гема.

7. Уробилин является конечным продуктом распада:

- 1) аминов
 - 2) цитохромов
 - 3) каталазы
-

- 4) гема
- 5) глобина
- 6) пурина.

8. Функциями почек в организме являются:

- 1) поддержание гомеостаза (КОС, изоосмии)
- 2) поддержание водно-электролитного баланса
- 3) выведение продуктов детоксикации
- 4) выведение конечных продуктов метаболизма азотсодержащих соединений
- 5) синтетическая
- 6) поддержание объема крови.

9. Фильтрация в сосудистых клубочках — это:

- 1) конечный этап образования мочи
- 2) пассивный процесс, протекающий за счет разности давлений
- 3) первый этап образования мочи
- 4) образование ультрафильтрата плазмы крови
- 5) гормонально регулируемый процесс
- 6) ферментативный процесс.

10. В состав первичной мочи входят органические и неорганические вещества:

- 1) белки, ферменты
- 2) минеральные соли
- 3) глюкоза
- 4) хлорид и гидрокарбонат натрия
- 5) креатин
- 6) аминокислоты.

11. Реабсорбция первичной мочи в проксимальных канальцах протекает:

- 1) при участии ионных насосов
- 2) изотонически
- 3) без участия гормонов
- 4) с участием гормонов
- 5) с участием фермента К-На АТФазы
- 6) с затратой АТФ.

12. Реабсорбция мочи в дистальных канальцах протекает:

- 1) изотонически
 - 2) без участия гормонов
-

- 3) с участием гормонов
- 4) дифференциально
- 5) пассивно
- 6) по механизму симпорта.

13. Гормонами, регулирующими реабсорбцию, являются:

- 1) вазопрессин
- 2) альдестерон
- 3) кортизол
- 4) паратгормон
- 5) кальцитриол
- 6) АДГ.

14. Для определения скорости клубочковой фильтрации сопоставляют концентрации определенного вещества в плазме и моче. При этом используемое вещество должно соответствовать условиям:

- 1) полностью всасываться в канальцах нефрона обратно в кровь
- 2) не всасываться в нефроне обратно в кровь
- 3) выделяться с мочой только путем фильтрации
- 4) секретироваться эпителием канальцев
- 5) пассивно диффундировать в кровь
- 6) изменяться в моче.

15. Этим условиям соответствуют вещества:

- 1) инсулин
- 2) маннитол
- 3) креатинин
- 4) инулин
- 5) креатин
- 6) глюкоза.

16. Коэффициентом очищения крови почками (клиренсом) называют:

- 1) объем плазмы крови в мл, очищенный от инулина, в мин.
 - 2) объем плазмы крови в мл, очищенный от данного вещества, в мин.
 - 3) объем плазмы крови в мл, очищенный от маннитола
 - 4) объем плазмы крови в мл, очищенный от креатинина
-

- 5) объем плазмы крови в мл, протекающий через нефрон
- 6) объем плазмы в мл, очищенной от глюкозы.

17. Норма клиренса (в мл/мин):

- 1) менее 100
- 2) более 125
- 3) от 100 до 125
- 4) 75
- 5) 130
- 6) 50.

18. Если клиренс данного вещества больше нормы, то это вещество:

- 1) выделяется почками только путем фильтрации
- 2) выделяется за счет фильтрации и частично секретруется эпителием канальцев
- 3) частично реабсорбируется в канальцах
- 4) фильтруется и не реабсорбируется
- 5) выделяется только секретцией
- 6) полностью реабсорбируется.

19. Если клиренс данного вещества меньше нормы, то это вещество:

- 1) выделяется почками только путем фильтрации
- 2) выделяется за счет фильтрации и частично секретруется эпителием канальцев
- 3) частично реабсорбируется в канальцах
- 4) фильтруется и не реабсорбируется
- 5) выделяется только секретцией
- 6) полностью реабсорбируется.

20. Если клиренс вещества соответствует норме, то это вещество:

- 1) выделяется почками только путем фильтрации
 - 2) выделяется за счет фильтрации и частично секретруется эпителием канальцев
 - 3) частично реабсорбируется в канальцах
 - 4) выделяется только секретцией
 - 5) полностью реабсорбируется
 - 6) выделяется только секретцией.
-

21. Почки участвуют в поддержании кислотно-основного состояния за счет:

- 1) обмена ионов калия на ионы водорода
- 2) обмена ионов натрия на ионы водорода
- 3) обмена ионов калия на ионы натрия
- 4) возврата гидрокарбоната натрия в плазму из первичной мочи
- 5) образования ионов аммония
- 6) возврата фосфатов из первичной мочи.

22. Общие свойства мочи характеризуются:

- 1) pH
- 2) суточным количеством
- 3) плотностью
- 4) цветом
- 5) прозрачностью
- 6) СОЭ.

23. Нормальный объем мочи, выделяемой в сутки, составляет (в литрах):

- | | |
|-----------|------------|
| у женщин | 1) 1,2–1,5 |
| | 2) 1,5–2,0 |
| | 3) 2–2,5 |
| у мужчин: | 4) 1,2–1,5 |
| | 5) 1,5–2,0 |
| | 6) 2–2,5. |

24. Если объем мочи больше нормы, то это называется:

- 1) полиурией
- 2) олигоурией
- 3) анурией
- 4) кетонурией
- 5) глюкозурией
- 6) гематурией.

25. Если объем мочи меньше нормы, то это:

- 1) полиурия
 - 2) олигоурия
 - 3) анурия
 - 4) глюкозурия
 - 5) кетонурия
-

6) гематурия.

26. Отсутствие мочи наблюдается при:

- 1) полиурии
- 2) олигоурии
- 3) анурии
- 4) кетонемии
- 5) глюкозурии
- 6) гематурии.

27. В норме при употреблении смешанной пищи рН мочи составляет:

- 1) 1-3
- 2) 3-5
- 3) 5-7
- 4) 8-11
- 5) 11-14
- 6) 10-14.

28. Значение рН мочи смещается в кислую сторону при употреблении:

- 1) продуктов растительного происхождения
- 2) продуктов животного происхождения
- 3) смешанной пищи
- 4) мяса
- 5) рыбы
- 6) картофеля.

29. Значение рН мочи смещается в щелочную сторону при приеме:

- 1) продуктов растительного происхождения
- 2) продуктов животного происхождения
- 3) смешанной пищи
- 4) мяса
- 5) рыбы
- 6) картофеля.

30. Цвет мочи определяется характером заболевания и может иметь окраску:

- 1) коричневую
 - 2) зеленую
 - 3) «мясных помоев»
 - 4) соломенно-желтую
-

- 5) голубую
- 6) черную.

31. В норме в состав мочи входят следующие органические вещества:

- 1) белки
- 2) глюкоза
- 3) мочевины и мочевая кислота
- 4) креатинин
- 5) аминокислоты
- 6) гиппуровая кислота.

32. Из неорганических компонентов в моче присутствуют:

- 1) ионы натрия
- 2) ионы калия
- 3) ионы кальция и фосфат-ионы
- 4) хлорид аммония
- 5) гидрокарбонат натрия
- 6) хлорид ионы.

33. При заболеваниях патологическими компонентами мочи являются:

- 1) белки
- 2) глюкоза
- 3) кетоновые тела
- 4) билирубин
- 5) креатин
- 6) креатинин.

34. Протеинурия наблюдается при:

- 1) сахарном диабете
- 2) голодании
- 3) заболеваниях почек
- 4) переедании
- 5) несахарном диабете
- 6) гликозидозах.

35. Глюкозурия возникает при:

- 1) сахарном диабете
 - 2) стероидном диабете
 - 3) голодании
 - 4) переедании
-

- 5) тиреотоксикозе
- 6) гиперкортицизме.

36. Кетоновые тела появляются в моче при:

- 1) сахарном диабете
- 2) голодании
- 3) тиреотоксикозе
- 4) переедании
- 5) заболеваниях почек
- 6) гликозидозах.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1. Каков принцип количественного определения ионов калия и натрия с помощью ионоселективных электродов?
 - 2. Каково количественное содержание калия и натрия в плазме крови и эритроцитах?
 - 3. Каково клинико-диагностическое значение определения натрия и калия в плазме крови?
 - 4. Каков принцип метода определения железа в плазме и сыворотке крови?
 - 5. Каков принцип метода определения общей железосвязывающей способности сыворотки крови?
 - 6. Каково клинико-диагностическое значение определения железа?
 - 7. Каково клинико-диагностическое значение определения ОЖСС?
 - 8. Каково количественное содержание железа в сыворотке крови?
-

Глава 12

Гемостаз

12.1. Лабораторная работа

Опыт 1. Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АЧ(П)ТВ).
Используется для выявления гипер- и гипокоагуляционного сдвига, контроля за гепаринотерапией при тромбозах, тромбоэмболиях и ДВС-синдромах, для диагностики гемофилии

Принцип метода

Определяется время свертывания крови в условиях стандартизированной контактной (каолином) и фосфолипидной (кефалином) активации процесса в присутствии Ca^{2+} .

Оборудование, материалы, реагенты

Термостат, секундомер, пипетки вместимостью 0,1 мл, 5,0 мл, пробирки стеклянные, цилиндр мерный 200 мл, перчатки резиновые, вода дист.

Подготовка анализа. Кровь забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконовую пробирку, содержащую 3,8% р-р цитрата натрия. Соотношение кровь-цитрат 9:1. Кровь центрифугируют при 1000 об/мин, в течение 7 мин. Плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют при 3000 об/мин 15 мин. Центрифугирование должно проводиться сразу после взятия крови, а отбор плазмы – сразу после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки, гемолиз и полученной более 2 ч. назад, а также замороженной.

Реагенты. Каолин-кефалиновая смесь (ККС).

Проведение анализа. К 0,1 мл плазмы прибавить 0,1 мл ККС. Пробирку встряхнуть и поместить в термостат

при 37 °С на 3 мин. Через 3 мин термостатирования добавить 0,1 мл р-ра CaCl_2 , включить секундомер и отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки. Норма АПТВ – 35–45 с.

Опыт 2. Активированное время рекальцификации плазмы

Принцип. Определяется время свертывания плазмы в условиях стандартизированной контактной активации каолином.

Реактивы. Суспензия каолина 5 мг/мл в 0,85% NaCl , р-р CaCl_2 0,02 М, плазма.

Ход работы

0,1 мл плазмы смешивают с 0,1 мл суспензии каолина, термостатируют при 37 °С 5 мин, затем добавляют 0,1 мл CaCl_2 . Одновременно включают секундомер и определяют время образования сгустка. Повторяют три раза, берут среднее значение. Норма АВР 45–60 с (50–70 с).

Значения выше нормы при тромбоцитопатиях, тромбоцитопениях, избытке антикоагулянтов. При нормальном АЧТВ удлинение с АВР говорит о нарушении в тромбоцитарном гемостазе. При значениях АВР ниже нормы – активация свертывания.

Опыт 3. Методы исследования антикоагуляционной активности крови. Определение тромбинового времени крови

Принцип. Определяется время свертывания цитратной плазмы, исследуемой под влиянием тромбина со стандартизированной на нормальной плазме активностью.

Реактивы. 3,8% цитрат натрия, свежеприготовленный р-р тромбина активностью 15–18 с.

Ход работы

0,2 мл плазмы термостатируют в течение 1 мин при 37 °С, после чего добавляют 0,2 мл рабочего р-ра тромбина, подогретого до 37 °С. Немедленно включают секундомер, смесь встряхивают и определяют время свертывания.

Норма тромбинового времени (с) – 14–17 с.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ВТОРОЙ ФАЗЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ – ОБРАЗОВАНИЯ ТРОМБИНА

Опыт 4. Протромбиновое время (ПВ) (протромбиновый индекс-ПИ)

В данном тесте определяется время рекальцификации плазмы при добавлении тканевого тромбопластина, что позволяет судить об образовании протромбиназы по внешнему пути при участии ф. VII и Ca^{+2} . Кроме того, данный метод позволяет оценить активность факторов, включающихся в процесс свертывания крови на этапах тромбоино-и фибринообразования (X, V, II, I).

Принцип. Определяется время свертывания бестромбоцитарной стабилизированной плазмы при добавлении суспензии тромбопластина и хлорида кальция.

Реактивы

1. 0,025 М раствор хлорида кальция.
2. 1% суспензия тромбопластина (должен быть оттестирован на плазме здоровых людей).

Оборудование

1. Водяная баня на 37 °С.
2. Секундомеры.

Материал для исследования. Бестромбоцитарная стабилизированная плазма.

Ход определения. В пробирку вносят 0,1 мл плазмы и 0,1 мл суспензии тромбопластина. Инкубируют при 37 °С в течение 1 мин. Добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, включают секундомер и отмечают время образования сгустка. Исследование проводят в параллельных пробах и вычисляют средний результат.

Нормальные величины. 12–20 с.

Клиническое значение

Удлинение протромбинового времени отмечается при приобретенном или врожденном дефиците факторов, определяющих образование протромбиназы по внешнему пути. Кроме того и чаще всего удлинение протромбинового времени связано с недостаточностью факторов, превращающих протромбин в тромбин (X, V, II). Речь идет о витамин К-зависимых факторах, синтезируемых в пече-

ни. Удлинение протромбинового времени отмечается у больных, применяющих антикоагулянты непрямого действия (неодикумарин, синкумар, омефин и др.), при тяжелых поражениях паренхимы печени, недостаточности витамина К.

Для вычисления протромбинового индекса наряду с исследованием плазмы больного исследуют плазму донора и выражают в процентах отношение времени свертывания нормальной плазмы к протромбиновому времени исследуемой плазмы. Нормальные величины протромбинового индекса 80–120%. Уменьшение протромбинового индекса имеет то же значение, что и удлинение протромбинового времени.

Опыт 5. Унифицированный колориметрический метод определения фибриногена в плазме

Принцип. Фибриноген плазмы под действием раствора тромбина превращается в фибрин, после чего его подвергают гидролизу и в гидролизате определяют концентрацию белка по биуретовой реакции.

Реактивы

1. 0,85% раствор хлорида натрия.
2. Раствор тромбина в 0,85% растворе хлорида натрия, активностью 7–10 с.
3. 1 н раствор гидроксида натрия.
4. Биуретовый реактив.
5. Фибриноген бычий или человеческий с известной концентрацией свертываемого белка.

3

Оборудование

1. Водяная баня на 37 °С.
2. Кипящая водяная баня.
3. Фотоэлектроколориметр.
4. Секундомер.

Материал для исследования. Стабилизированная бес-тромбоцитарная плазма.

Ход определения. Для постановки параллельных проб готовят 2–3 пробирки, в которые вносят 0,2 мл исследуемой плазмы, добавляют по 0,1 мл раствора тромбина и устанавливают в водяную баню на 1 ч. После инкубации сгустки извлекают, трижды промывают охлажденным изо-

тоническим раствором и высушивают на фильтровальной бумаге. Каждый из высушенных сгустков помещают в отдельную пробирку с 1 мл раствора гидроксида натрия и кипятят 5 мин. Затем пробы охлаждают до комнатной температуры и приливают в каждую по 1 мл биуретового реактива. Через 30 мин пробы фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) против дистиллированной воды.

Расчет результатов. Для установления концентрации фибриногена в исследуемых пробах предварительно строят калибровочную кривую, которая представляет собой соотношение между показаниями ФЭКа и концентрациями фибриногена в растворе. Для построения калибровочной кривой используют стандартные разведения чистого фибриногена в пределах от 50 до 1000 мг/дл (0,5-10 г/л).

Нормальные величины: 2-4 г/л.

Клиническое значение. Уменьшение концентрации фибриногена отмечается при его врожденной недостаточности (афибриногенемии, гипофибриногенемии, дисфибриногенемии), тяжелых заболеваниях печени, ДВС-синдроме, острым фибринолизе. Увеличение концентрации фибриногена отмечается при инфекционных заболеваниях, острых и хронических воспалительных процессах, новообразованиях, тромбозах, тромбозмболиях, после травм, родов, операций.

Опыт 6. Метод определения толерантности плазмы к гепарину

Принцип. Измеряется время рекальцификации плазмы при внесении в нее определенного количества гепарина.

Реактивы

1. Раствор гепарина 5000 МЕ в 1 мл.
2. 0,025 М раствор хлорида кальция.
3. Гепарин-кальциевая смесь.

Оборудование

1. Водяная баня на 37 °С.
2. Ледяная баня.
3. Секундомер.

Материал для исследования. Стабилизированная тромбоцитарная плазма.

Ход определения. Пробирки со свежезабранной стабилизированной кровью как можно быстрее ставят в баню со льдом. Затем центрифугируют для получения тромбоцитарной плазмы. 0,2 мл цитратной плазмы наливают в пробирки и прогревают в водяной бане при 37 °C 1 мин. После инкубации добавляют 0,2 мл гепарин-кальциевой смеси, предварительно прогретой до той же температуры, и включают секундомер. Смесь слегка встряхивают или перемешивают проволоочной петлей. Через 1–2 мин и далее через каждые 30 с после добавления гепарин-кальциевой смеси пробирку наклоняют, отмечая время образования фибринового сгустка. Как правило, прозрачность плазмы изменяется через 5–6 мин, и появляются единичные фибриновые нити. Секундомер останавливают, когда плазма перестает нтекать на стенки пробирки.

Нормальные величины: 11–16 мин.

Клиническое значение. Показания теста достаточно ценны для суждения о взаимодействии коагуляционного и антикоагуляционного механизмов системы свертывания крови. Считается, что толерантность характеризует устойчивость, в данном случае, плазмы к действию гепарина. Если после введения гепарина резко увеличивается время образования сгустка, то толерантность плазмы к гепарину понижена, если, наоборот, время образования сгустка уменьшается, то устойчивость плазмы к действию этого антикоагулянта высока.

Толерантность плазмы к гепарину снижается до 20 мин при любом дефиците факторов коагуляции, особенно факторов протромбинаобразования, при тромбоцитопении, повышении антикоагулянтной активности крови, после гепаринотерапии при нормальном уровне антитромбина III.

Повышение толерантности плазмы к гепарину до 1–9 мин всегда свидетельствует о внутрисосудистом свертывании (вследствие любых причин), в т.ч. появлении больших количеств тканевого тромбопластина, связывающего гепарин, истощении антитромбина III или его врожденном дефекте. Антитромбин III является кофактором гепарина и действует только в комплексе с последним, поэтому наряду с толерантностью плазмы к гепарину рекомендуется определять активность АТ–III, что важно для проведения тактических лечебных мероприятий при ДВС-синдроме.

Опыт 7. Определение фибринолитической активности крови (ФАК)

Время лизиса эуглобулиновых сгустков (унифицированный метод)

(метод Ковальского, Копека и Ниверовского)

Принцип. Метод основан на осаждении в кислой среде и при низкой температуре эуглобулиновой фракции, содержащей факторы свертывания и фибринолиза. Главным компонентом эуглобулиновой фракции является плазминоген. Кроме того, в ней содержится около 25% фибриногена, протромбин и другие факторы свертывающей системы крови. Полученный осадок эуглобулинов растворяется. Фибриноген превращается в фибрин. Время от момента образования сгустка фибрина до его растворения выражает фибринолитическую активность крови.

Реактивы

1. 0,1 М раствор оксалата аммония или щавелевокислого натрия:
2. Раствор борнокислого натрия (9,0 г NaCl и 1,0 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ растворяют в 1 л дистиллированной воды);
3. Кислая вода: 1 мл. 1 % раствора уксусной кислоты и 90 мл дистиллированной воды.
4. 0,025 М раствор CaCl_2 .

Ход определения. 0,1 мл плазмы переносят в центрифужную пробирку и добавляют 1,8 мл кислой воды. При этом из плазмы выпадает эуглобулиновая фракция белка. Содержимое пробирки осторожно перемешивают и помещают пробирку в холодильник при $+4^\circ\text{C}$. Через 20 минут центрифугируют в течение 10 минут при 2000 об./мин. Надосадочную жидкость отсасывают. К осадку приливают 0,1 мл борнокислого натрия и ставят в термостат при 37°C на несколько минут до полного растворения. Приливают 0,1 мл CaCl_2 . Отмечают момент образования сгустка и вновь ставят в термостат до полного лизиса.

Нормальные величины ФАК: сгусток лизируется в течение 150–220 и даже 260 минут.

Опыт 8. Определение продуктов деградации фибриногена/фибрина (ПДФ) в сыворотке крови

Особый интерес представляет изучение промежуточных продуктов распада фибриногена и фибрина – X, Y, D и E,

активно влияющих на коагуляцию. Так, фрагмент X медленно, но почти полностью сворачивается тромбином. Фрагменты У, D и E тромбином не сворачиваются.

Промежуточные фрагменты X и У имеют множественные антигенные детерминанты, идентичные таковым фибриногена. Конечные фрагменты D и E несут только одну определяющую антигенную детерминанту из исходной молекулы фибриногена. Иммунологически антигенные детерминанты фрагментов D и E отличаются одна от другой.

Все ПДФ – X, У, D и E, обладая антигенным родством с фибриногеном и фибрином, реагируют с антифибриногеновой и антифибриновой сыворотками (АФС). Причем каждый из фрагментов обладает характерной подвижностью в агаровом геле.

Проба с протамина сульфатом для обнаружения ПДФ в крови

Принцип. Наблюдают за образованием осадка в сыворотке крови после добавления к ней 1%-го раствора протамина сульфата, обладающего способностью осаждать ранние ПДФ.

Реактивы: 1%-ный раствор протамина сульфата.

Оборудование

1 Водяная баня на 37 °C;

2. Секундомер.

Материал исследования: Свежая сыворотка крови.

Ход определения: В пробирку наливают 0,4 мл сыворотки и добавляют 0,1 мл раствора протамина сульфата. Перемешивают содержимое и ставят пробирку в водяную баню. Через 5 минут пробирку вынимают и читают результат. Образование геля, нитей или хлопьев учитывают как положительный результат («1»), а помутнение или зернистость – как отрицательный результат («0»).

Клиническое значение: Положительный результат («1») указывает на увеличение содержания ПДФ в сыворотке, что является одним из лабораторных критериев патологического внутрисосудистого свертывания крови. Проба становится положительной при концентрации ПДФ 0,015 г/л (15 мкг/мл) и более.

12.2. Тест-контроль по теме «Гемостаз»

1. Белки плазмы крови, участвующие в гемостазе:

- 1) конвертин
- 2) церулоплазмин
- 3) трансферрин
- 4) протромбин
- 5) фибриноген
- 6) тканевой тромбопластин.

2. Какие из факторов гемостаза не являются протеазами:

- 1) тромбин
- 2) тромбосан
- 3) фибрин
- 4) акцелерин
- 5) антигемофильный глобулин А
- 6) фактор Стюарта-Проуэра?

3. Какие из факторов гемостаза являются аллостерическими модуляторами ферментов:

- 1) фактор IIa
- 2) фактор IXa
- 3) фактор Va
- 4) фактор Ia
- 5) фактор VIIa
- 6) фактор VIIIa?

4. Факторы гемостаза, являющиеся протеолитическими ферментами:

- 1) фактор Стюарта-Проуэра
- 2) фактор Кристмаса
- 3) фактор Хагемана
- 4) фактор XIII
- 5) фактор VII
- 6) калликреин.

5. Какие факторы гемостаза не участвуют во внешнем пути:

- 1) антигемофильный глобулин А
 - 2) антигемофильный глобулин В
 - 3) фактор Хагемана
-

- 4) проконвертин
- 5) проакцелерин
- 6) плазменный тромбопластин.

6. Факторы гемостаза, в синтезе которых участвует витамин К:

- 1) протромбин
- 2) проконвертин
- 3) проакцелерин
- 4) прекалликреин
- 5) фактор Стюарта-Проуэра
- 6) фактор Кристмаса.

7. Витамин К является кофактором фермента:

- 1) трансклутаминазы
- 2) γ -глутаматкарбоксилазы
- 3) тромбиназы
- 4) тромбостенина
- 5) АТФ-азы
- 6) проконвертина.

8. В тромбоцитарном гемостазе участвуют:

- 1) тромбин
- 2) тромбосан A_2
- 3) серотонин
- 4) простаглицлин
- 5) АДФ
- 6) фибрин.

9. Общие реакции в гемостазе по внутреннему и внешнему путям:

- 1) образование тромбина
- 2) активация фактора Стюарта-Проуэра
- 3) активация проконвертина
- 4) образование нерастворимого фибрина
- 5) активация проакцелерина
- 6) активация фактора Кристмаса.

10. Реакции, происходящие при активации внешнего пути гемостаза:

- 1) активация фактора Хагемана
 - 2) частичный протеолиз протромбина
 - 3) активация фактора X
-

- 4) активация фактора XIII
- 5) превращение проконвертина в конвертин
- 6) активация тканевого тромбопластина.

11. Последовательность в активации факторов гемостаза по внутреннему пути:

- 1) ф. XIV→ф. XII→ф. XI→ф. IX→ф. X
- 2) ф. XII→ф. XIII→ф. XIV→ф. X
- 3) ф. XIII→ф. XIV→ф. XI→ф. X
- 4) ф. III→ф. IX→ф. XII→ф. X
- 5) ф. VIII→ф. X→ф. II→ф. I
- 6) ф. II→ф. V→ф. X.

12. Последовательность в активации факторов внешнего пути гемостаза:

- 1) ф. III→ф. VII→ф. X→ф. II→ф. I
- 2) ф. X→ф. II→ф. IX
- 3) ф. X→ф. II→ф. I
- 4) ф. XII→ф. XI→ф. X→ф. II
- 5) ф. I→ф. II→ф. III→ф. X
- 6) ф. IX→ф. X→ф. XI→ф. XII.

13. В основе образования красного тромба лежит реакция:

- 1) полимеризации фибриногена
- 2) полимеризации фибрина
- 3) полимеризации фибронектина
- 4) агрегация и адгезия тромбоцитов
- 5) образование фибрин-мономеров
- 6) активация протромбина.

14. Какой фактор ускоряет гемостаз в 350 раз:

- 1) проконвертин
- 2) проакцелерин
- 3) протромбин
- 4) фибрин
- 5) калликреин
- 6) акцелерин.

15. Последовательность реакций при образовании тромба:

- 1) частичный протеолиз фибриногена→полимеризация фибрина→образование рыхлого тромба→образование плотного тромба
-

- 2) образование фибрин-мономеров→образование фибриновой сети→ретракция сгустка→образование рыхлого тромба
- 3) формирование плотного тромба→ретракция тромба
- 4) превращение растворимого фибрина в нерастворимый→стабилизация фибрина→агрегация тромбоцитов→белый тромб.
- 5) фибриновая сеть→рыхлый тромб→плотный тромб→фибринолиз
- 6) фибрин-мономер→фибринолиз→фибрин-полимер.

16. Для активации X фактора при внешнем гемостазе необходим комплекс из:

- 1) ф. 3, ф. Va, ф. VII, ф. IV
- 2) ф. 3, ф. VIIa, ф. IXa, Ca^{2+}
- 3) ф. III, ф. XIa, ф. Va, Ca^{2+}
- 4) ф. XIIa, ф. Va, ф. IIa, ф. IVa
- 5) ф. XIa, ф. 3, ф. 8, ф. IV
- 6) ф. 3, акцелерин, конвертин, ионы Ca^{2+} .

17. Предотвратить свертывание крови при хранении можно:

- 1) добавлением цитрата Ca^{2+}
- 2) добавлением цитрата Na^+
- 3) добавлением NaHCO_3
- 4) добавлением витамина К
- 5) добавлением викасола
- 6) добавлением физ. раствора.

18. Какой протеолитический фермент активирует I, V, VIII и XIII факторы гемостаза:

- 1) фактор Кристмаса
- 2) фактор Розенталя
- 3) фактор Стюарта
- 4) калликреин
- 5) тромбин
- 6) фактор Хагемана?

19. Какие факторы гемостаза относятся к тромбоцитарным:

- 1) тромбин
 - 2) тромбосан A_2
-

- 3) ф. 3
- 4) ф. III
- 5) тромбостенин
- 6) ф. 8?

20. Какое вещество является мощным антиагрегационным фактором для тромбоцитов:

- 1) тромбоксан
- 2) тромбостенин
- 3) тромбин
- 4) простациклин
- 5) простагландин E_2
- 6) фибрин?

21. Образование мономеров для фибрина происходит под действием:

- 1) протромбина
- 2) тромбина
- 3) тромбиназы
- 4) комплекса ф. 3, ф. Va, Ca^{2+}
- 5) акцелерина
- 6) транслугтаминазы.

22. В образовании фибрин-полимера из мономеров участвует фермент:

- 1) транслугтаминаза
- 2) фибринстабилизирующий
- 3) тромбостенин
- 4) γ -глутамилкарбоксилаза
- 5) плазмин
- 6) ф. XIIIa.

23. Активация факторов гемостаза осуществляется, в основном, путем:

- 1) частичного протеолиза
- 2) полного протеолиза
- 3) фосфорилирования
- 4) дефосфорилирования
- 5) ассоциации
- 6) диссоциации.

24. Превращение фибриногена в фибрин-мономер происходит:

- 1) под действием тромбина
 - 2) под действием плазмينا
-

- 3) путем частичного протеолиза
- 4) путем фосфорилирования
- 5) путем карбоксилирования
- 6) под действием гепарина.

25. Какие вещества рассасывают тромб:

- 1) гепарин
- 2) плазмин
- 3) плазминоген
- 4) тромбин
- 5) протромбин
- 6) антитромбин?

26. Активация плазминогена под действием:

- 1) урокиназы
- 2) калликреина
- 3) стрептокиназы
- 4) трипсина
- 5) тромбина
- 6) адреналина.

27. Расщепление тромба происходит путем:

- 1) гидролиза
- 2) фибринолиза
- 3) синерезиса
- 4) деполимеризации
- 5) денатурации
- 6) желатинирования.

28. Препятствуют образованию тромба:

- 1) гепарин
- 2) антитромбин III
- 3) комплекс гепарин+ антитромбин III
- 4) тромбин
- 5) антитромбопластан
- 6) плазмин.

29. Фибринолитическая активность плазмы крови зависит от активности:

- 1) простациклина
 - 2) пламина
 - 3) антитромбина
 - 4) урокиназы
-

- 5) стрептокиназы
- 6) гепарина.

30. Антисвертывающая система крови включает:

- 1) антиконвертин
- 2) антитромбин
- 3) антиакцелерин
- 4) ионы Ca^{2+}
- 5) гепарин
- 6) плазмин.

31. ДВС-синдром возникает:

- 1) при отсутствии ф. VIII
- 2) при отсутствии ф. IX
- 3) при активации гемостаза
- 4) при активации фибринолиза
- 5) при активации гемостаза с последующим фибринолизом
- 6) при нарушении регуляции гемостаза и фибринолиза.

32. Склонность к геморрагическим явлениям наблюдается у пациентов с недостатком:

- 1) витамина С
- 2) витамина К
- 3) ф. VIIIa
- 4) ф. IXa
- 5) ф. XI
- 6) ионов Ca^{2+} .

33. Гемофилия А возникает:

- 1) при наследственном дефекте ф. VIII
- 2) при наследственном дефекте ф. 8
- 3) при наследственном дефекте ф. IX
- 4) при наследственном дефекте ф. XI
- 5) при наследственном дефекте ф. IV
- 6) при наследственном дефекте ф. X.

34. Гемофилия В возникает при отсутствии:

- 1) ф. IIa
 - 2) ф. Xa
 - 3) ф. IXa
 - 4) ф. XIIa
-

- 5) ф. XIa
- 6) ф. XIVa.

35. Гемофилия С возникает при отсутствии:

- 1) фактора Хагемана
- 2) фактора Стюарта-Проуэра
- 3) фактора Розенталя
- 4) фактора Кристмаса
- 5) фактора Виллибрандта
- 6) простациклина I_2 .

36. Антикоагулянты, являющиеся авитаминами К:

- 1) гепарин
- 2) дикумарол
- 3) викасол
- 4) салициловая кислота
- 5) аспирин
- 6) антиконвертин.

37. Гепарин выполняет следующие функции:

- 1) активацию антитромбина
- 2) активацию липопротеинлипазы
- 3) антиагрегационную
- 4) антиплазминовую
- 5) антифибринолитическую
- 6) антикоагуляционную.

38. Какой из факторов антисвертывающей системы является по строению гликозаминогликаном:

- 1) гепарин
- 2) гиалуроновая кислота
- 3) хондроитинсульфат
- 4) плазмин
- 5) тромбин
- 6) фибрин?

39. Концентрация какого фактора плазменного гемостаза количественно преобладает:

- 1) фибриногена
 - 2) протромбина
 - 3) проконвертина
 - 4) ионов Ca^{2+}
 - 5) проакцелерина
 - 6) прекалликреина?
-

40. Плазмин обладает активностью:

- 1) трипсиноподобной
- 2) фосфолипазной
- 3) гликозидазной
- 4) липазной
- 5) нуклеотидазной
- 6) амилазной.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Принцип метода определения АЧТВ и нормальные величины его.
 2. Принцип метода определения АВР и нормальные величины его.
 3. Принцип метода определения тромбинового времени и нормальная величина его.
 4. Принцип определения протромбинового времени, нормальные величины его, клиническое значение.
 5. Принцип метода определения количества фибриногена в плазме, содержание фибриногена в плазме, клиническое значение показателя.
 6. Принцип метода определения толерантности плазмы к гепарину, нормальные величины и клиническое значение.
 7. Принцип метода определения фибринолитической активности крови (ФАК), нормальные величины.
 8. Принцип метода определения продуктов дегидрации фибриногена-фибрина (ПДФ), учет результатов исследования, клиническое значение.
-

Глава 13

Взаимосвязь обменов веществ

13.1. Лабораторная работа

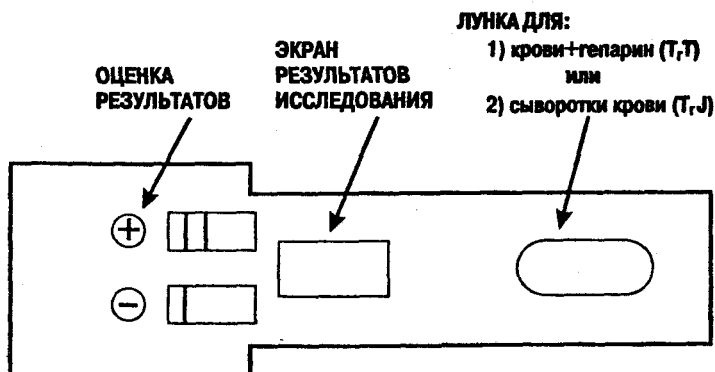
Опыт 1. Экспресс-метод ранней диагностики инфаркта миокарда

Принцип метода

Метод основан на тканевой специфичности регуляторных белков сокращения мышц – тропонинов. Тропонины Т и I скелетных мышц отличаются от тропонинов Т и I сердечной мышцы. При повреждении (некрозе) миокарда – инфаркте миокарда – уже через 1 час в сыворотке крови в 100 раз увеличивается количество миокардиальных тропонинов.

Ход работы

Используется тест-система, в которой имеются готовые моноклональные антитела к тропонинам Т и I. Если в тест-систему внести кровь или сыворотку крови, содержащие миокардиальные тропонины Т и I, то происходит реакция антиген-антитело с образованием дополнительной линии преципитации.



13.2. Тест-контроль по теме «Взаимосвязь обменов веществ»

Раздел I. БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ

- 1. Функции печени многочисленны и сложны, но наиболее важные из них:**
 - 1) регуляторно-гомеостатическая
 - 2) гемостатическая
 - 3) мочевинообразование и желчеобразование
 - 4) детоксикационная
 - 5) биосинтетическая и катаболическая
 - 6) выделительная.
 - 2. Важнейшей функцией печени является биосинтетическая. Назовите основные соединения, которые синтезируются в печени:**
 - 1) кетоновые тела
 - 2) холестерин и эфиры холестерина
 - 3) белки плазмы
 - 4) ферменты глюконеогенеза, орнитинового цикла и др.
 - 5) глюкоза, заменимые аминокислоты
 - 6) ВЖК, ФЛ, ТАГ (2-й ресинтез).
 - 3. Избыточное накопление ТАГ в печени приводит к жировому перерождению печени – циррозу. Основными причинами жировой дегенерации печени являются:**
 - 1) увеличение биосинтеза фосфолипидов
 - 2) уменьшение биосинтеза фосфолипидов
 - 3) увеличение потребления с пищей липотропных веществ
 - 4) уменьшение потребления с пищей липотропных веществ
 - 5) уменьшение образования ЛОНП
 - 6) увеличение образования кетоновых тел.
 - 4. Обмен липидов в печени наиболее интенсивно протекает по следующим путям:**
 - 1) β -окисление высших жирных кислот
 - 2) биосинтез ВЖК, ТАГ, ФЛ
-

- 3) биосинтез холестерина и эфиров холестерина
 - 4) биосинтез кетоновых тел
 - 5) биосинтез транспортных форм липидов ЛОНП и ЛВП незрелых
 - 6) распад ТАГ, ФЛ, ХС, эфиров холестерина, ЛВП зрелых.
5. Кетоновые тела синтезируются в печени, но не используются ею как энергетические субстраты. Укажите причину:
- 1) отсутствие в печени фермента сукцинил-КоА-ацетоацетат трансферазы
 - 2) отсутствие в печени фермента ацетоацетил-КоА-тиолазы
 - 3) присутствие в печени большого количества ацетил-КоА.
 - 4) увеличение скорости гликолиза
 - 5) недостаток в печени ацетил-КоА
 - 6) отсутствие фермента 3-кетоацил-КоА-трансферазы.
6. Какова судьба холестерина в печени:
- 1) подвергается окислению с образованием желчных кислот
 - 2) используется для построения мембран гепатоцитов
 - 3) участвует в формировании ЛОНП
 - 4) подвергается этерификации
 - 5) подвергается конъюгации
 - 6) участвует в образовании желчи?
7. Ранним проявлением недостаточности печени является нарушение обмена белков, которое характеризуется:
- 1) уменьшением биосинтеза белков свертывающей и антисвертывающей системы
 - 2) увеличением биосинтеза альбумина
 - 3) уменьшением биосинтеза альбумина
 - 4) увеличением биосинтеза мочевины
 - 5) уменьшением биосинтеза мочевины
 - 6) уменьшением биосинтеза заменимых аминокислот.

8. Нарушение обмена липидов при печеночно-клеточной недостаточности проявляется в:

- 1) увеличении ПОЛ
- 2) уменьшении биосинтеза ВЖК, ФЛ, ТАГ
- 3) уменьшении биосинтеза холестерина
- 4) уменьшении ПОЛ
- 5) уменьшении биосинтеза ЛОНП, ЛВП (незрелых)
- 6) увеличении биосинтеза ЛОНП, ЛВП (незрелых).

9. К наиболее постоянным проявлениям поражения клеток печени относятся изменения обмена желчных пигментов, в результате которых:

- 1) увеличивается содержание «непрямого» билирубина в крови
- 2) уменьшается содержание «непрямого» билирубина в крови
- 3) увеличивается содержание «прямого» и «непрямого» билирубина в крови
- 4) уменьшается содержание «прямого» и «непрямого» билирубина в крови
- 5) нарушается секреция связанного билирубина (конъюгированного в печеночные протоки)
- 6) увеличивается содержание «прямого» билирубина в крови.

10. Одной из функций печени является выделительная. Назовите вещества, которые печень выделяет в просвет желудочно-кишечного тракта:

- 1) холестерин
- 2) желчные кислоты
- 3) желчные пигменты
- 4) железо
- 5) мочевины
- 6) аминокислоты.

11. Печень является одним из основных органов, поставляющих свободную глюкозу в кровь, т. к. в печени имеется фермент, расщепляющий глюкозо-6-фосфат:

- 1) глюкозо-6-фосфатаза
 - 2) глюкокиназа
-

- 3) гексокиназа
- 4) фосфоорилаза
- 5) изомераза
- 6) аланинаминотрансфераза.

12. Процесс «обезвреживания» токсинов в печени включает следующие реакции:

- 1) гидроксилирование
- 2) окисление
- 3) восстановление
- 4) конъюгации
- 5) ацетилирование
- 6) метилирование.

13. В результате реакции «обезвреживания» образуются:

- 1) гидрофильные вещества
- 2) гидрофобные вещества
- 3) желчные пигменты
- 4) желчные кислоты
- 5) нетоксичные парные соединения
- 6) конъюгаты.

14. В результате нарушения детоксикационной функции печени в крови увеличивается содержание:

- 1) фенола
- 2) крезол
- 3) индола
- 4) кетонных тел
- 5) аммиака
- 6) скатола.

15. Основными причинами печеночно-клеточной недостаточности являются:

- 1) некроз гепатоцитов
 - 2) развитие портокавальных анастомозов
 - 3) изменение интенсивности окислительных процессов в печени
 - 4) изменение кровоснабжения печени
 - 5) нарушение обменных процессов
 - 6) нарушение проницаемости клеточных мембран печени.
-

16. При печеночно-клеточной недостаточности в сы-
воротке крови резко увеличивается уровень ряда
ферментов:

- 1) аланинаминотрансферазы
- 2) щелочной фосфатазы
- 3) трипсина
- 4) химотрипсина
- 5) амилазы
- 6) АсАТ.

17. Наиболее ярко биохимическая картина печеноч-
ной недостаточности проявляется при печеночной
коме, которая характеризуется:

- 1) накоплением токсических продуктов
- 2) активацией ПОЛ
- 3) прекращением биосинтеза мочевины
- 4) снижением онкотического давления
- 5) накоплением продуктов распада гормонов
- 6) ацидозом.

18. При печеночной коме в крови имеют место следу-
ющие биохимические показатели:

- 1) количество мочевины уменьшается
- 2) содержание аммиака увеличивается
- 3) количество альбуминов уменьшается
- 4) количество непрямого билирубина сильно уве-
личивается
- 5) СОЭ увеличивается
- 6) количество альбуминов увеличивается.

Раздел II. БИОХИМИЯ МИОКАРДА

1. Метаболизм миокарда в сравнении со скелетными
и гладкими мышцами характеризуется:

- 1) интенсивным окислительным фосфорилирова-
нием
- 2) интенсивным анаэробным гликолизмом
- 3) интенсивным аэробным гликолизмом
- 4) интенсивным β -окислением ВЖК
- 5) интенсивным процессом биосинтеза ТАГ
- 6) интенсивным распадом ацетил-КоА в ЦТК.

2. Образование аммиака в миокарде протекает:

- 1) в цикле трикарбоновых кислот
 - 2) в процессе β -окисления ВЖК
-

- 3) в цикле Кори
- 4) в пуриновом цикле
- 5) в орнитиновом цикле
- 6) в цикле «аланин-глюкоза».

3. Миокард в сравнении со скелетными мышцами содержит больше:

- 1) АТФ
- 2) гликогена
- 3) миоглобина
- 4) креатинфосфата
- 5) фосфолипидов
- 6) дипептидов.

4. Миокард в сравнении с гладкими мышцами содержит больше:

- 1) АТФ
- 2) гликогена
- 3) миоглобина
- 4) креатинфосфата
- 5) фосфолипидов
- 6) миоальбумина.

5. В сокращении миокарда участвуют белки:

- 1) альбумин
- 2) миозин
- 3) актин
- 4) тропонин
- 5) тропомиозин
- 6) миоглобин.

6. Субстратами для получения АТФ в миокарде служат:

- 1) фруктоза
- 2) ВЖК
- 3) сахароза
- 4) глюкоза
- 5) пируват
- 6) лактат.

7. Миокард энергию для сокращения преимущественно получает за счет следующих процессов:

- 1) β -окисления ВЖК
 - 3) аэробного гликолиза
-

- 4) окислительного фосфорилирования
- 2) анаэробного гликолиза
- 5) пентозофосфатного пути
- 6) цикла трикарбоновых кислот.

8. На окисление ВЖК в миокарде расходуется кислорода:

- 1) 10%
- 2) 20%
- 3) 40%
- 4) 50%
- 5) 70%
- 6) 80%.

9. На окисление глюкозы в миокарде расходуется кислорода:

- 1) 10%
- 2) 20%
- 3) 30%
- 4) 40%
- 5) 50%
- 6) 60%.

10. В миокарде интенсивнее всего окисляется ВЖК:

- 1) пальмитиновая
- 2) стеариновая
- 3) олеиновая
- 4) линолевая
- 5) линоленовая
- 6) арахидоновая.

11. Миокард в период абсорбтивной стадии пищеварения энергию получает преимущественно за счет окисления: -

- 1) ВЖК
- 2) глицерина
- 3) лактата
- 4) глюкозы
- 5) пирувата
- 6) кетоновых тел.

12. Миокард в период постабсорбтивной стадии пищеварения энергию получает преимущественно за счет окисления:

- 1) глюкозы
-

- 2) лактата
- 3) глицерина
- 4) ВЖК
- 5) кетоновых тел
- 6) пирувата.

13. Миокард в период значительных физических нагрузок энергию получает преимущественно за счет окисления:

- 1) глюкозы
- 2) лактата
- 3) глицерина
- 4) ВЖК
- 5) пирувата
- 6) кетоновых тел.

14. В норме в миокарде протекают следующие процессы обмена углеводов:

- 1) анаэробный гликолиз
- 2) аэробный гликолиз
- 3) цикл Кори
- 4) пентозофосфатный путь
- 5) биосинтез гликогена
- 6) распад гликогена.

15. Ресинтез АТФ в миокарде протекает:

- 1) пентозофосфатным путем
- 2) креатинкиназным путем
- 3) в цикле трикарбоновых кислот
- 4) миокиназным путем
- 3) в пуриновом цикле
- 6) в цикле «аланин-глюкоза».

16. Наличие какого изофермента позволяет использовать в миокарде лактат в качестве субстрата для получения АТФ:

- 1) ЛДГ₁
 - 2) ЛДГ₂
 - 3) ЛДГ₃
 - 4) ЛДГ₄
 - 5) ЛДГ₅
 - 6) АСТ.
-

17. Энзимодиагностика инфаркта миокарда основана на определении в сыворотке крови активности:

- 1) АСТ
- 2) КФК₁
- 3) КФК₂
- 4) КФК₃
- 5) ЛДГ₁
- 6) ЛДГ₅.

18. Для проведения дифференциального диагноза заболеваний миокарда и скелетных мышц какие биохимические анализы крови необходимо выполнить:

- 1) количественное определение глобулинов
- 2) количественное определение гемоглобина
- 3) количественное определение миоглобина
- 4) количественное определение белков «острой» фазы
- 5) определение уровня «средних молекул»
- 6) определение миокардиальных тропонинов Т и I?

19. Наличие какого изофермента позволяет интенсивно ресинтезировать АТФ в миокарде:

- 1) ЛДГ₁
- 2) ЛДГ₃
- 3) ЛДГ₅
- 4) КФК₁
- 5) КФК₂
- 6) КФК₃?

Раздел III. БИОХИМИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

1. Поджелудочная железа имеет две основные биохимические функции. Одна из них — экзокринная, которая состоит в секреции в просвет 12-перстной кишки:

- 1) ряда ферментов в неактивной форме
 - 2) ионов, необходимых для процессов пищеварения
 - 3) панкреатического сока
 - 4) соляной кислоты
 - 5) гормонов
 - 6) желчных кислот.
-

2. Эндокринную функцию поджелудочной железы осуществляют островки Лангерганса, которые секретируют следующие гормоны:
 - 1) глюкогон
 - 2) инсулин
 - 3) соматостатин
 - 4) панкреатический полипептид (ПП)
 - 5) вазоактивный интестинальный полипептид (ВИП)
 - 6) кортизол.
 3. В гидролизе питательных веществ, осуществляемом в 12-перстной кишке, особенно велика роль сока поджелудочной железы, который содержит:
 - 1) воду
 - 2) белок
 - 3) ряд анионов (гидрокарбонат ионов, хлорид ионов и др.)
 - 4) ряд катионов металлов (преимущественно ионов калия, кальция, натрия)
 - 5) ферменты
 - 6) желчь.
 4. Протеолитическое действие панкреатического сока на белки и полипептиды, поступающие из желудка, обуславливается ферментами:
 - 1) трипсином
 - 2) липопроteinлипазой
 - 3) химотрипсином
 - 4) эластазой
 - 5) гликозидазой
 - 6) карбоксипептидазой.
 5. Сок поджелудочной железы содержит ферменты, расщепляющие полисахариды до олиго-, ди- и моносахаридов:
 - 1) α -амилазу
 - 2) гексокиназу
 - 3) олиго-1,6-гликозидазу
 - 4) глюкокиназу
 - 5) фосфорилазу
 - 6) амило-1.6-гликозидазу
 6. В секрете поджелудочной железы содержится ряд ферментов, расщепляющих липиды:
 - 1) ТАГ-липаза
 - 2) фосфолипаза A_2
-

- 3) холестеролэстераза
 - 4) фосфатаза
 - 5) гидратаза
 - 6) фосфодиэстераза.
7. Сок поджелудочной железы участвует и в переваривании нуклеиновых кислот, т. к. содержит ферменты, расщепляющие фосфодиэфирные химические связи:
- 1) рибонуклеазы (РНК-азы)
 - 2) дезоксирибонуклеазы (ДНК-азы)
 - 3) нуклеозидазы
 - 4) фосфатазы
 - 5) холестеролэстеразы
 - 6) эндонуклеазы.
8. Эндокринная активность поджелудочной железы регулируется нейрогуморально. Ведущее значение в гуморальной регуляции принадлежит гормонам местного значения, которые синтезируются в клетках 12-перстной кишки и в клетках проксимального отдела тонкого кишечника:
- 1) секретину
 - 2) холицистокинину
 - 3) панкреазимину
 - 4) гастрину
 - 5) кортикотропину
 - 6) соматотропину.
9. Секретин усиливает выделение клетками поджелудочной железы:
- 1) воды
 - 2) гидрокарбонат ионов
 - 3) хлорид ионов
 - 4) фосфат ионов
 - 5) катионов калия
 - 6) катионов кальция.
10. Под влиянием холецистокинина ткань поджелудочной железы усиливает секрецию пищеварительных проферментов и ферментов:
- 1) трипсиногена
 - 2) химотрипсиногена
-

- 3) прокарбоксипептидазы
- 4) проэластазы
- 5) ферментов липидного обмена
- 6) ферментов обмена углеводов и нуклеиновых кислот.

11. Панкреатиты — заболевание поджелудочной железы, возникают вследствие:

- 1) несбалансированного питания (много жирной и острой пищи)
- 2) закупорки выводного протока поджелудочной железы
- 3) алкоголизма
- 4) преждевременной активации панкреатических ферментов и воздействия их на паренхиму железы
- 5) воспалительных процессов
- 6) травм поджелудочной железы.

12. При панкреатитах нарушаются экзокринная и эндокринная функции поджелудочной железы, в результате чего наблюдается следующая биохимическая картина:

- 1) ферментативная токсемия
- 2) накопление цитотоксических ядов
- 3) увеличение средних молекул
- 4) нарушение гликорегуляции
- 5) увеличение распада коллагена соединительной ткани
- 6) разрушение мембран клеток.

Раздел IV. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ДИАГНОЗА

1. Укажите содержание гемоглобина в крови женщин в г/л:

- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 100–110 | 3) 120–140 | 5) 160–180 |
| 2) 110–115 | 4) 140–160 | 6) 180–200. |

2. Укажите содержание гемоглобина в крови мужчин в г/л:

- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 100–110 | 3) 120–140 | 5) 160–180 |
| 2) 110–115 | 4) 140–160 | 6) 180–200. |
-

3. Укажите содержание общего белка в плазме крови (г/л):

- | | | |
|----------|----------|-------------|
| 1) 20-40 | 3) 55-60 | 5) 90-100 |
| 2) 45-50 | 4) 65-85 | 6) 110-120. |

4. Укажите содержание альбуминов в плазме крови (г/л):

- | | | |
|----------|----------|-------------|
| 1) 20-25 | 3) 35-55 | 5) 80-90 |
| 2) 25-30 | 4) 60-70 | 6) 100-110. |

5. Каково содержание глобулинов в плазме крови (г/л):

- | | | |
|----------|----------|------------|
| 1) 10-15 | 3) 40-50 | 5) 70-80 |
| 2) 20-35 | 4) 60-70 | 6) 90-100. |

6. Укажите содержание фибриногена в плазме крови (г/л):

- | | | |
|----------|--------|----------|
| 1) 0,5-1 | 3) 2-4 | 5) 7-8 |
| 2) 1-1,5 | 4) 5-6 | 6) 9-10. |

7. Укажите содержание глюкозы в плазме крови (ммоль/л):

- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 1,3-2,3 | 3) 3,3-5,5 | 5) 7,5-8,3 |
| 2) 2,5-3,0 | 4) 6,3-7,3 | 6) 8,5-9,3. |

8. Укажите содержание пировиноградной кислоты в плазме крови (ммоль/л):

- | | | |
|--------------|--------------|---------------|
| 1) 0,01-0,02 | 3) 0,05-0,06 | 5) 0,15-0,20 |
| 2) 0,03-0,04 | 4) 0,07-0,14 | 6) 0,25-0,30. |

9. Укажите содержание мочевины в плазме крови (ммоль/л):

- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 1,1-2,2 | 3) 2,9-3,1 | 5) 6,8-7,0 |
| 2) 2,5-2,8 | 4) 3,3-6,6 | 6) 7,2-8,6. |

10. Укажите содержание молочной кислоты в артериальной крови (ммоль/л):

- | | | |
|--------------|------------|-------------|
| 1) 0,33-0,75 | 3) 1,0-1,2 | 5) 2,5-3,0 |
| 2) 0,85-0,95 | 4) 1,5-2,0 | 6) 3,0-4,0. |

11. Укажите содержание мочевой кислоты в плазме крови (ммоль/л):

- | | | |
|------------|------------|--------------|
| 1) 2,5-3,0 | 3) 1-1,2 | 5) 0,5-0,7 |
| 2) 1,5-2,0 | 4) 0,8-0,9 | 6) 0,2-0,47. |
-

12. Укажите содержание креатина в плазме крови (муж.) мкмоль/л:

- | | | |
|--------------|--------------|--------------|
| 1) 0,08-0,11 | 3) 0,16-0,18 | 5) 0,25-0,30 |
| 2) 0,12-0,15 | 4) 0,20-0,24 | 6) 13-53. |

13. Укажите содержание креатинина в плазме крови (жен.) мкмоль/л:

- | | | |
|---------------|---------------|---------------|
| 1) 0,01-0,015 | 3) 0,03-0,035 | 5) 0,05-0,055 |
| 2) 0,02-0,025 | 4) 0,04-0,045 | 6) 44-97. |

14. Укажите содержание остаточного азота (ммоль/л) в плазме крови:

- | | | |
|------------|--------------|---------------|
| 1) 5,0-6,2 | 3) 9,0-10,3 | 5) 14,3-28,6 |
| 2) 7,0-8,3 | 4) 10,5-12,8 | 6) 30,1-33,2. |

15. Укажите содержание общих липидов в плазме крови (в г/л):

- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 1,5-1,7 | 3) 2,1-2,2 | 5) 2,8-3,5 |
| 2) 1,8-2,0 | 4) 2,3-2,7 | 6) 3,8-8,0. |

16. Укажите содержание триацилглицеринов в плазме крови (в ммоль/л):

- | | | |
|------------|--------------|-------------|
| 1) 0,1-0,2 | 3) 0,45-1,81 | 5) 3,3-6,6 |
| 2) 0,3-0,4 | 4) 2,5-3,1 | 6) 7,1-8,5. |

17. Укажите содержание хиломикронов (ХМ) в сыворотке крови (в г/л):

- | | | |
|--------|--------|-----------|
| 1) 0-2 | 3) 4-6 | 5) 8-10 |
| 2) 2-4 | 4) 6-8 | 6) 10-12. |

18. Укажите содержание ЛОНП в сыворотке крови (в г/л):

- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 0,5-0,6 | 3) 0,8-0,9 | 5) 1,7-2,0 |
| 2) 0,7-0,8 | 4) 1,0-1,5 | 6) 2,5-3,3. |

19. Укажите содержание ЛНП в сыворотке крови (в г/л):

- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 0,5-0,6 | 3) 0,9-1,0 | 5) 2,0-4,0 |
| 2) 0,7-0,8 | 4) 1,0-1,5 | 6) 5,0-6,0. |

20. Укажите содержание ЛВП в сыворотке крови (в г/л):

- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 0,5-0,6 | 3) 1,0-3,0 | 5) 6,0-7,0 |
| 2) 0,7-0,8 | 4) 4,0-5,0 | 6) 8,0-9,0. |
-

21. Укажите содержание НЭЖК в плазме крови (ммоль/л):
- | | | |
|--------------|--------------|-------------|
| 1) 0,1-0,2 | 3) 0,25-0,28 | 5) 0,9-1,0 |
| 2) 0,22-0,23 | 4) 0,3-0,9 | 6) 1,2-1,5. |
22. Укажите содержание холестерина в плазме крови (ммоль/л):
- | | | |
|------------|-------------|---------------|
| 1) 3,9-6,5 | 3) 7,4-8,3 | 5) 10,5-11,6 |
| 2) 6,6-7,1 | 4) 9,1-10,2 | 6) 12,1-15,3. |
23. Укажите содержание фосфолипидов в плазме крови (г/л):
- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 1,5-1,8 | 3) 4,1-5,3 | 5) 6,3-7,5 |
| 2) 2,2-3,0 | 4) 5,5-6,1 | 6) 7,8-8,3. |
24. Укажите содержание кетоновых тел в плазме крови (ммоль/л):
- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 0,1-0,6 | 3) 1,0-1,2 | 5) 2,5-3,2 |
| 2) 0,7-0,9 | 4) 1,5-2,1 | 6) 3,3-6,6. |
25. Укажите содержание молочной кислоты в плазме крови (ммоль/л):
- | | | |
|--------------|------------|-------------|
| 1) 0,99-1,78 | 3) 2,5-3,0 | 5) 4,5-5,0 |
| 2) 1,5-1,0 | 4) 3,5-4,0 | 6) 5,5-6,0. |
26. Укажите содержание общего билирубина в сыворотке крови (мкмоль/л):
- | | | |
|---------|----------|-----------|
| 1) 1-5 | 3) 15-18 | 5) 8-30 |
| 2) 6-10 | 4) 5-20 | 6) 10-40. |
27. Укажите содержание «прямого» билирубина в сыворотке крови:
- | | | |
|----------|--------|------------|
| 1) 15-20 | 3) 8-9 | 5) 7,5-8,3 |
| 2) 10-15 | 4) 6-7 | 6) 1-5. |
28. Укажите содержание «непрямого» билирубина в сыворотке крови:
- | | | |
|--------|--------|-----------|
| 1) 1-2 | 3) 5-6 | 5) 12-13 |
| 2) 3-4 | 4) 7-8 | 6) 15-19. |
29. Укажите содержание натрия в плазме крови (ммоль/л):
- | | | |
|------------|----------------|-------------|
| 1) 100-110 | 3) 125-130 | 5) 160-175 |
| 2) 115-120 | 4) 130,5-156,6 | 6) 180-195. |
-

30. Укажите содержание калия в плазме крови (ммоль/л):

- | | | |
|------------|------------|-------------|
| 1) 1,0-1,2 | 3) 2,2-3,3 | 5) 5,2-6,3 |
| 2) 1,5-2,1 | 4) 3,6-5,0 | 6) 6,9-8,4. |

31. Укажите содержание кальция в плазме крови (ммоль/л):

- | | | |
|--------------|--------------|---------------|
| 1) 0,52-0,61 | 3) 0,81-0,95 | 5) 1,51-2,15 |
| 2) 0,63-0,75 | 4) 1,23-1,31 | 6) 2,29-2,99. |

32. Укажите содержание pH в крови:

- | | | |
|--------------|--------------|---------------|
| 1) 7,26-7,28 | 3) 7,31-7,33 | 5) 7,36-7,42 |
| 2) 7,29-7,30 | 4) 7,34-7,35 | 6) 7,45-7,48. |

33. Укажите значение щелочных резервов в крови (ммоль/л):

- | | | |
|--------------|--------------|----------------|
| 1) $\pm 0,1$ | 3) $\pm 0,8$ | 5) $\pm 1,8$ |
| 2) $\pm 0,5$ | 4) $\pm 1,2$ | 6) $\pm 2,3$. |

34. Укажите $p\text{CO}_2$ в крови (мм рт. ст.):

- | | | |
|----------|----------|-----------|
| 1) 20-32 | 3) 36-44 | 5) 56-60 |
| 2) 33-35 | 4) 45-55 | 6) 61-70. |

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каков принцип метода обнаружения миокардиальных тропонинов Т и I в сыворотке крови?
 2. В чем преимущества экспресс-метода диагностики инфаркта миокарда в сравнении с ранее применявшимися методами?
 3. Почему количество миокардиальных тропонинов в сыворотке крови увеличивается в 100 раз уже в 1-й час инфаркта миокарда?
-

Литература

1. Алейникова Т. Л., Рубцова Г. В., Павлова Н. А. под ред. Е. С. Северина.
 2. Баркаган В. С. Введение в клиническую гемостазиологию. М., Ньюдиамед — АО, 1988
 3. Долгов В. В., Морозова В. Т., и др. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей. — М.: Центр, 1995.
 4. Исследование системы крови в клинической практике/ Под ред. Козинца Г. И. и Макарова В. А. — М.: Триада-Х, 1998.
 5. Квалификационные тесты по клинической лабораторной диагностике (для среднего медицинского персонала)/Под ред. Долгова В. В., Морозовой В. Т. — Москва: 1999
 6. Клиническая биохимия/Под ред. В. А. Ткачука. — М.: 2002.
 7. Клиническая лабораторная аналитика (частные аналитические технологии в клинической лаборатории)/Под ред. Меньшикова В. В. — Т. II, М.: 1999; т. III. М.: Лабрис, 2000
 8. Обеспечение качества лабораторных исследований. Справочное пособие/Под ред. Меньшикова В. В. — М.: 1999.
 9. Пустовалова Л. М. Практикум по биохимии. — Ростов-на-Дону: Феникс, 1999.
 10. Ронин В. С., Старобинец Т. М. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований. — М.: Медицина, 1989.
 11. Сапрыгин Д. Б., Романов М. Ю. Миокардиальные маркеры. Значение тропонинов Тр I и Т, креатинкиназы МВ (ККМВ) и миоглобина (Мг) в диагностике острого инфаркта миокарда (ОИМ). Лабораторная медицина, № 3. С. 13, 2000.
 12. Справочник «Медицинские лабораторные технологии»/ Под ред. Карпищенко А. И. в 2-х томах. — Т. I — 1998, т. II — 1999, СПб.: Интермедика.
 13. Справочник «Медицинские лабораторные технологии»/ Под ред. Карпищенко А. И. — СПб, Интермедика, 1997.
 14. Тесты по общей, биорганической и биологической химии для студентов I курса медицинских вузов/Под ред. Л.М. Пустоваловой. — Ростов-на-Дону, 2003
 15. Тесты по общей и клинической биохимии для студентов II курса медицинских вузов/Под ред. Л. М. Пустоваловой. — Ростов-на-Дону, 2002
 16. Управление качеством клинических лабораторных исследований. Нормативные документы/ Под ред. В.В. Меньшикова. — Лабпресс, 2000.
-

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РЕАКТИВОВ И ПРЕПАРАТОВ

1. Азотнокислое серебро, 0,001 н. Отвешивают на аналитических весах 1,6987 г химически чистого азотнокислого серебра, помещают в мерную литровую колбу с притертой пробкой, доливают дистиллированной водой до метки и растворяют, тщательно перемешивая содержимое.

2. Аммиачный раствор серебра. К 5%-ному раствору азотнокислого серебра добавляют концентрированный раствор аммиака до растворения выпадающего осадка.

3. Ацетат-вероналовый буфер pH 8,6. В 30 мл дистиллированной воды растворяют 6,48 г уксуснокислого натрия, 8,71 г вероната и 1,89 г едкого натра. Доливают к раствору 60 мл 0,1 моль/литр раствора соляной кислоты и доводят общий объем дистиллированной водой до 1 л.

4. Боратный буфер. 57,1 г бората натрия (буры) растворяют в 1500 мл воды, добавляют 100 мл 1 н. раствора соляной кислоты и доводят дистиллированной водой объем до 2 л.

5. Бромфенол синий для окраски белков после электрофоретического разделения на бумаге.

В колбу помещают 0,5 г бромфенолового синего, 10,0 г сулемы и 20,0 мл ледяной уксусной кислоты, доводят дистиллированной водой объем до 1 л. Перемешивают.

6. Вероналовый буфер, pH=8,6. В колбу помещают 16,575 г вероната и 3,25 г едкого натрия и 700 мл дистиллированной воды. Растворение производят нагреванием на кипящей водяной бане. Остывший раствор разводят до 1 л.

7. Вероналовый буфер, pH=8,2. К 50 мл 0,2 М раствора медианала добавить 12,7 мл 0,2 М раствора соляной кислоты и довести дистиллированной водой до 200 мл. Хранить в холодильнике.

8. Диазореактив. Основной раствор можно хранить в темной склянке неопределенно долгое время. Его готовят растворением 0,9 г сульфанидовой кислоты в 9 мл концентрированной соляной кислоты с последующим разбавлением раствора дистиллированной водой до объема 100 мл.

9. Раствор ЭДТА для определения кальция. Растворяют в 1 л дистиллированной воды 0,748 г трилона Б. При этом получается примерно 0,002 М раствор. Его концентрацию проверяют по 0,002 М раствору $ZnCl_2$ (0,2724 г в 1 л) или по 0,002 М $MgSO_4$ (лучше из фиксанала).

10. Раствор белка для реакций осаждения. Белки куриных яиц отделяют от желтков, смешивают с 20-кратным объемом воды и фильтруют через несколько слоев марли.

11. Раствор белка для реакции высаливания. Белки трех куриных яиц отделяют от желтков, смешивают с 700 мл дистиллированной воды и 300 мл насыщенного раствора хлористого натрия и фильтруют через несколько слоев марли.

12. Раствор йода в йодистом калии. 20 г йодистого калия и 10 г кристаллического йода растирают в ступке и растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

13. Раствор пепсина в соляной кислоте и раствор соляной кислоты. К 100 мл 2%-го водного раствора сухого препарата пепсина добавляют 20–30 капель 2%-го раствора соляной кислоты. Раствор соляной кислоты готовят добавлением этого же количества ее к 100 мл.

14. Разбавленная слюна. Предварительно рот ополаскивают дистиллированной водой. Затем, набрав в рот приблизительно 20–25 мл дистиллированной воды и подержав ее там в течение нескольких минут, собирают и фильтруют ее.

15. Раствор фуксинсернистой кислоты. 0,1 г основного фуксина растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Через 24 ч полученный раствор смешивают с 10–20 мл насыщенного раствора сульфита натрия, а еще через 1 час добавляют концентрированную соляную кислоту до полного обесцвечивания раствора. При этом обычно расходуется 3–8 мл концентрированной соляной кислоты.

16. Раствор крахмала для определения аскорбиновой кислоты. 0,5 г растворимого крахмала, взвешенного с точностью до 0,01 г, растирают в ступке с 5 мл воды до получения однородной кашицы. Смесь медленно вливают при постоянном помешивании в 100 мл кипящей воды и кипятят 2–3 мин до получения прозрачной или слабоопалесцирующей жидкости. Раствор должен храниться на холоде не более 2–3 дней.

17. Раствор йода в йодистом калии (раствор Люголя). В 100 мл воды растворяют 20 г йодистого калия и 10 г йода. Для реакции с крахмалом полученный раствор разводят в 5 раз дистиллированной водой.

18. Раствор парадиметиламинобензальдегида. 2 г перекристаллизованного парадиметиламинобензальдегида растирают в ступке с небольшим количеством концентрированной соляной кислоты, переносят в мерный цилиндр, доливают концентрированной соляной кислотой до 7,5 мл дистиллированной водой до 15 мл.

19. Раствор тирозина. 0,1 г тирозина растворяют в 200 мл 0,1%-го раствора углекислого натрия при нагревании на кипящей водяной бане.

20. Растворы аминокислот для хроматографии на бумаге. Готовят несколько смесей аминокислот, сохраняя их в холодильнике.

Смесь № 1: 60 мг глутаминовой кислоты, 40 мг аланина и 50 мг лейцина растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

Смесь № 2: 60 мг глутаминовой кислоты, 40 мг гликокола и 40 мг аланина растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

Смесь № 3: 60 мг аспарагиновой кислоты, 40 мг серина и 40 мг лейцина растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

21. Реактив для количественного определения фосфора.

Реактив № 1. Смешивают 3 объема 10 н. раствора H_2SO_4 , 1 объем 0,1 М раствора HJO_4 и 6 объемов 96°-го этанола (готовят перед употреблением).

Реактив № 2. 6,0 г метабисульфита натрия, 10 мг эйконогена, 200 мг сернистоокислого натрия высыпают в мерный стакан на 1 л, растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды, прибавляют 60 мл 2,5%-го раствора молибдата аммония, перемешивают и общий объем доводят дистиллированной водой до 960 мл.

22. Растворители для хроматографического разделения аминокислот на бумаге. Используют несколько подвижных растворителей:

1. фенол, насыщенный водой. 100 г расплавленного фенола (в теплой воде) и 50 мл дистиллированной воды энергично взбалтывают в делительной воронке в течение нескольких минут. Жидкости дают отстояться и через 10–12 ч нижний слой водонасыщенного фенола сливают в хроматографическую камеру;

2. бутилово-уксусно-водная смесь. Смешивают в делительной воронке 40 мл н-бутанола, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл дистиллированной воды. После расслаивания (15–20 мин) берут верхний слой и используют в качестве подвижного растворителя. Нижний свой используют для насыщения атмосферы камеры;

3. бутилово-уксусно-водная смесь — подвижный растворитель без расслоения: 40 мл бутанола, 15 мл ледяной уксусной кислоты и 5 мл воды.

23. Раствор трехзамещенного фосфата $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ (6,45 г растворяли в 500 мл свежeproкипяченной воды, добавляли 7,2 г NaOH и доводили водой до литра).

24. Реактив Гайнеса.

1. Растворяют 13,3 г кристаллического $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (х. ч.) в 400 мл дистиллированной воды.

2. Растворяют 50 г гидроксида натрия в 400 мл дистиллированной воды.

3. Растворяют 15 г глицерина в 200 мл дистиллированной воды. Смешивают растворы 1 и 2 и тотчас приливают раствор 3. Реактив стоек при хранении.

25. Реактив Ниландера. 2 г основного азотнокислого висмута и 4 г сегнетовой соли растворяют на кипящей водяной бане в 100 мл 10%-го раствора едкого натрия, охлаждают и отфильтровывают от выпавшего осадка.

26. Реактив Селиванова. 0,05 г резорцина растворяют в 100 мл 20%-ной соляной кислоты.

27. Реактив Стокса. Одну часть сернокислого железа и две части виннокаменной кислоты растворяют в 15 частях дистиллированной воды. Перед употреблением добавляют аммиак до слабощелочной реакции. Раствор должен быть прозрачным и окрашенным в зеленый цвет.

28. Реактив Толленса. Растворяют 1 г нафторезорцина в 100 мл 90%-го этилового спирта.

29. Реактив Фелинга. Готовят отдельно два раствора:

1) 200 г сегнетовой соли и 150 г едкого натрия растворяют в мерной литровой колбе и доводят дистиллированной водой до метки;

2) 40 г медного купороса растворяют в мерной литровой колбе и доводят дистиллированной водой до метки.

Перед употреблением смешивают равные объемы 1 и 2.

30. Реактив Шиффа. 4 г основного фуксина растворяют в 1 л воды, нагретой до 90–95 °С. Раствор тщательно перемешивают до тех пор, пока его температура не станет 40 °С. После этого к раствору фуксина прибавляют 8 г $K_2S_2O_8$ и 10 мл концентрированной HCl. Раствор оставляют в плотно закрытой склянке на 16–18 ч. Затем к нему прибавляют 2 г активированного угля, тщательно перемешивают и отфильтровывают (лучше на воронке Бюхнера). Раствор должен быть абсолютно прозрачным и бесцветным. Хранить его нужно в холодильнике и использовать не больше 1 мес. Появление розовой окраски свидетельствует о непригодности реактива.

31. Реактив Фолина для определения белка в сыворотке крови. В круглодонную колбу на 300–500 мл помещают 20 г двуводного вольфрамвокислого натрия ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), 5 г двуводного молибденовокислого натрия $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ и растворяют их в 140 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 10 мл 85%-ной фосфорной кислоты (ортофосфорная кислота H_3PO_4) и 20 мл концентрированной соляной кислоты. К колбе присоединяют обратный холодильник и смесь кипятят на сетке в течение 10 ч. После окончания кипячения в колбу добавляют 30 г сернокислого лития ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$), 10 мл дистиллированной воды и несколько капель брома. Смесь кипятят без холо-

дильника 15 минут под тягой для удаления избытка брома. Раствор охлаждают до комнатной температуры, объем его доводят дистиллированной водой до 200 мл и фильтруют. Полученный раствор ярко-желтого цвета хранят в темной склянке. Реактив может храниться длительное время.

Перед употреблением нужное для работы количество реактива Фолина разбавляют дистиллированной водой в 2 раза. Кислотность его должна соответствовать 1 н. раствору. Кислотность проверяют титрованием 1 н. раствором щелочи в присутствии фенолфталеина. Если разведенный раствор окажется слабее 1 н., то добавляют рассчитанное количество реактива Фолина и повторяют титрование 1 н. раствором щелочи. В случае, если полученный раствор окажется крепче, чем 1 н., прибавляют рассчитанное количество дистиллированной воды и повторяют титрование 1 н. раствором щелочи до тех пор, пока кислотность реактива Фолина не будет соответствовать 1 н. раствору.

32. Субстрат I для определения аспартат-трансаминазы.

1,33 г DL-аспарагиновой кислоты, 0,073 г α -кетоглутаровой кислоты, 0,4 г Na_2HPO_4 (безводного) и 0,07 г KH_2PO_4 помещают в мерную колбу на 50 мл и добавляют 4,4 мл 10%-го раствора едкого натрия. Объем раствора доводят дистиллированной водой до метки, добавляют 0,2 мл хлороформа, тщательно перемешивают и хранят в замороженном состоянии.

33. Субстрат II для определения аланин-трансаминазы. 0,89 г DL-аланина и 0,073 г α -кетоглутаровой кислоты помещают в мерную колбу на 50 мл, добавляют 0,4 г Na_2HPO_4 и 0,07 г KH_2PO_4 , затем приливают 5-8 мл дистиллированной воды и 0,4 мл 10%-го раствора едкого натрия. Объем доводят до метки дистиллированной водой и добавляют 0,2 мл хлороформа. Раствор хранят в замороженном состоянии.

34. Фосфатный буфер, pH=6. Отдельно готовят два раствора: 1) растворяют 9,078 г однозамещенного фосфата калия (KH_2PO_4) в мерной колбе на 1 л, доводят дистиллированной водой до метки; 2) растворяют 11,876 г 2-замещенного фосфата натрия (Na_2HPO_4) в мерной колбе на 1 л, доводят дистиллированной водой до метки.

Для получения фосфатного буфера с pH=6,0 смешивают 9 частей 1-го раствора с одной частью 2-го раствора. Фосфатный буфер, pH=7,5, М/15. Вначале получают двузамещенный фосфорнокислый натрий, содержащий 2 молекулы кристаллизационной воды, путем выветривания в течение 2 суток на воздухе до постоянного веса $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Готовят отдельно 2 раствора:

- 1) 11,86 г двузамещенного фосфорнокислого натрия растворяют в 1 л воды;

- 2) 9,1 г однозамещенного фосфорнокислого калия растворяют в 1 л воды.

Для получения буферного раствора $\text{pH}=7,5$ смешивают 840 мл первого раствора и 160 мл второго раствора. Для хранения к приготовленному буферному раствору можно добавить 5–10 мл хлороформа и хранить в холодильнике в течение 4–5 мес.

35. Очищенный кварцевый песок. Песок просеивают через сито с диаметром отверстий 4–5 мм, промывают водопроводной водой, которую после отстаивания песка сливают. Затем приливают к песку соляную кислоту (крепкая кислота разводится 1:1), перемешивают и оставляют на ночь. Далее песок промывают водопроводной водой и затем дистиллированной — до исчезновения реакции на хлор (проба с раствором азотнокислого серебра) и высушивают. Песок вновь просеивают через сито с диаметром отверстий 1–1,5 мм и прокаливают для удаления органических веществ. Очищенный песок должен быть проверен на отсутствие следов железа (проба с 5%-ной соляной кислотой и роданидом с учетом результатов параллельной пробы на содержание железа в соляной кислоте).

Очищенный песок хранят в чистой и плотно закрытой стеклянной банке. Удобно пользоваться стеклянным порошком.

Оглавление

Предисловие	3
Глава 1. Введение в практикум по основам биохимии с методами клинико-биохимических исследований	7
1.1. Основные методы, используемые в клинико-биохимических исследованиях	8
1.2. Лабораторная посуда	13
1.3. Лабораторное оборудование и приборы	14
1.4. Подготовка воды для клинико-биохимических исследований	15
1.5. Общие правила работы с наборами для клинико-биохимических исследований	15
1.6. Калибровка мерной посуды, пипеток, бюреток	17
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	19
1.7. Тест-контроль по теме «Введение в практикум по основам биохимии с методами клинико-биохимических исследований»	20
Глава 2. Химия биоорганических соединений	28
2.1. Химия белков, пептидов, аминокислот	29
2.1.1. Лабораторная работа	
Реакции обнаружения аминокислот в растворах	29
Опыт 1. Реакции аминокислот в водных растворах	29
Опыт 2. Нингидриновая реакция	30
Опыт 3. Ксантопротеиновая реакция	31
Опыт 4. Реакция Фоля на серосодержащие аминокислоты	32
Опыт 5. Современные методы анализа аминокислотного состава белков и пептидов. Разделение и количественное определение аминокислот в аминокислотном анализаторе ...	32
2.1.2. Тест-контроль по теме «Химия аминокислот»	33
2.1.3. Белки сыворотки, плазмы, спинномозговой жидкости	35
2.1.4. Лабораторная работа	37
Опыт 1. Обнаружение белков и пептидов в растворах биуретовой реакцией	37
Опыт 2. Разделение белков сыворотки крови методом высаливания. Выделение γ -глобулинов	37
Опыт 3. Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза	38
Опыт 4. Определение изоэлектрической точки желатина по мутности (по коагуляции)	41
Опыт 5. Определение изоэлектрической точки казеина по мутности (коагуляции)	41

Опыт 6. Устойчивость растворов ВМС	41
Опыт 7. Защитное действие растворов высокомолекулярных соединений	41
Опыт 8. Количественное определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом	42
2.1.5. Клинико-диагностическое значение определения содержания белков в сыворотке крови	43
2.1.6. Тест-контроль по теме «Химия пептидов и белков»	44
Контрольные вопросы	47
2.2 Химия углеводов	47
2.2.1. Лабораторная работа	48
Опыт 1. Доказательство восстанавливающей способности у глюкозы и отсутствие ее у фруктозы. Качественные реакции на глюкозу	48
Опыт 2. Открытие фруктозы (р. Селиванова)	49
Опыт 3. Доказательство отсутствия восстанавливающей способности сахарозы	50
Опыт 4. Доказательство восстанавливающей способности лактозы	50
Опыт 5. Качественное обнаружение крахмала	51
Опыт 6. Кислотный гидролиз крахмала	51
Опыт 7. Экспресс-методы определения глюкозы в биологических жидкостях человека	51
2.2.2. Клинико-диагностическое значение определения глюкозы в сыворотке крови	52
2.2.3 Тест-контроль по теме «Химия углеводов»	53
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	56
2.3. Химия жиров (липидов)	56
2.3.1. Лабораторная работа	57
Опыт 1. Определение непереносимости высших жирных кислот (ВЖК)	57
Опыт 2. Омыление жиров	58
Опыт 3. Экстракция липидов сыворотки крови	58
Опыт 4. Исследование состава общих липидов методом тонкослойной хроматографии	59
Опыт 5. Разделение фосфолипидов печени ТСХ на силуфоле	61
2.3.2. Клинико-диагностическое значение определения липидов в сыворотке крови человека	62
2.3.3. Тест-контроль по теме «Химия жиров (липидов)»	63
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	67
2.4. Химия нуклеиновых кислот	67
2.4.1. Лабораторная работа	68
Опыт 1. Изучение химического состава рибонуклеопротеинов дрожжей	68

Опыт 2. Спектрофотометрическое количественное определение нуклеиновых кислот в сыворотке крови (в основе метод А. С. Спирина)	70
Опыт 3. Количественное определение РНК колориметрическим методом	71
Опыт 4. Количественное определение ДНК колориметрическим методом	71
2.4.2. Тест-контроль по теме «Химия нуклеиновых кислот»	72
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	74
Глава 3. Витамины	75
3.1. Лабораторная работа	76
Опыт 1. Реакция с диазореактивом на тиамин (витамин В ₁) ...	76
Опыт 2. Реакция восстановления рибофлавина (витамина В ₂)	77
Опыт 3. Реакция на витамин РР (антипеллагрический)	77
Опыт 4. Реакция на пиридоксин (витамин В ₆)	77
Опыт 5. Количественное определение витамина С методом йодиметрического титрования	78
Опыт 6. Количественное определение аскорбиновой кислоты (витамина С) в шиповнике с 2,6-дихлорфенолиндофенолом	79
3.2. Тест-контроль по теме «Витамины»	80
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	85
Глава 4. Ферменты	86
4.1. Лабораторная работа	89
Опыт 1. Количественное определение активности α -амилазы в сыворотке крови унифицированным методом по Каравею	89
Опыт 2. Определение каталитической активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови	91
Опыт 3. Определение каталитической активности аспартатаминотрансферазы (АсАТ или АСТ) в сыворотке крови	93
Опыт 4. Унифицированный метод определения каталитической активности γ -глутамилтрансферазы (γ -глутамилтранспептидазы, γ -ГТФ) в сыворотке крови	96
Опыт 5. Определение каталитической активности креатинфосфокиназы в сыворотке крови (КФК)	99
Опыт 6. Определение каталитической активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови (ЛДГ)	103
Опыт 7. Унифицированный метод определения общей активности ЛДГ по оптимизированному оптическому тесту	106
Опыт 8. Определение активности фосфатазы в сыворотке крови	107
4.2. Тест-контроль по теме «Ферменты»	115

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	122
Глава 5. Обмен веществ и энергии в организме человека, пути их регуляции	124
5.1. Лабораторная работа	126
Опыт 1. Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата)	126
Опыт 2. Количественное определение пировиноградной кислоты в крови колориметрическим методом (по Умбрайту)	128
5.2. Тест-контроль по теме «Обмен веществ и энергии в организме человека, пути их регуляции»	130
Контрольные вопросы	138
Глава 6. Гормоны	139
6.1. Лабораторная работа	140
Опыт 1. Обнаружение инсулина биуретовой реакцией	140
Опыт 2. Обнаружение инсулина реакцией с сульфосалициловой кислотой	140
Опыт 3. Обнаружение инсулина реакцией Фолы.	141
Опыт 4. Качественные реакции обнаружения адреналина ...	142
Опыт 5. Количественное определение адреналина по Фолину	143
Опыт 6. Реакция на гормоны щитовидной железы	143
Опыт 7. Качественное обнаружение 17-кетостероидов в моче с помощью m-динитробензола	144
Опыт 8. Качественная реакция на кортизол	144
Опыт 9. Качественная реакция на фолликулин (эстрон) с концентрированной серной кислотой	144
Опыт 10. Качественная реакция на ароматическую группу фолликулина	145
6.2. Тест-контроль по теме «Гормоны»	145
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	148
Глава 7. Контроль качества лабораторных исследований	150
7.1. Контрольные материалы в клинико-биохимических исследованиях	151
7.2. Тест-контроль по теме «Контроль качества лабораторных исследований»	154
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	159
Глава 8. Обмен углеводов в норме и патологии	160
8.1. Лабораторная работа	164
Опыт 1. Определение концентрации глюкозы в крови бензокаиновым методом	164

Опыт 2. Исследование функции поджелудочной железы методом сахарной нагрузки	164
8.2. Тест-контроль по теме «Обмен углеводов в норме и патологии» ..	167
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	172
Глава 9. Обмен белков в норме и патологии	173
9.1. Лабораторная работа	176
Опыт 1. Количественное определение общего белка сыворотки крови с помощью биуретовой реакции с использованием диагностического набора «ЭКОлаб» (Россия)	176
Опыт 2. Определение мочевины в сыворотке крови и в моче по цветной реакции с диацетилмонооксимом (можно использовать готовые диагностические наборы)	181
Опыт 3. Количественное определение креатинина в биологических жидкостях методом на основе реакции Яффе с депротеинизацией с использованием диагностического набора «Ольвекс диагностикум» (Россия, СПб)	185
Опыт 4. Спектрофотометрическое определение мочевой кислоты в сыворотке крови	188
Опыт 5. Определение общего, « прямого » и « непрямого » билирубина в сыворотке крови	189
Опыт 6. Качественное обнаружение « прямого » и « непрямого » билирубина в сыворотке крови	190
9.2. Тест-контроль по теме «обмен белков в норме и патологии» ...	194
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	213
Глава 10. Обмен липидов в норме и патологии	215
10.1. Лабораторная работа	216
Опыт 1. Определение общего холестерина в сыворотке крови, основанное на реакции Либермана-Бурхарда (метод Илька)	216
Опыт 2. Количественное определение липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в сыворотке крови	219
Опыт 3. Разделение липопротеинов сыворотки крови методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле	220
Опыт 4. Исследование состава фосфолипидов сыворотки крови методом тонкослойной хроматографии	221
Опыт 5. Качественные реакции на кетоновые тела в моче	222
Современные ферментативные методы исследования показателей обмена липидов в организме человека	224
Опыт 6. Определение концентрации триацилглицеринов (ТАГ) в сыворотке и плазме крови ферментативным колориметрическим методом (с набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум», г. Санкт-Петербург)	224

Опыт 7. Определение концентрации общего холестерина в сыворотке и плазме крови ферментативным колориметрическим методом (с набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум», г. Санкт-Петербург)	227
10.2. Тест-контроль по теме «Обмен липидов в норме и патологии» ...	229
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	238
Глава 11. Водно-минеральный обмен в норме и патологии	240
11.1. Лабораторная работа	246
Опыт 1. Определение концентрации ионов натрия и калия в сыворотке крови с помощью ионоселективных электродов	246
Опыт 2. Определение концентрации железа в сыворотке или плазме крови колориметрическим методом без депротеинизации (Набор реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум», г. Санкт-Петербург)	249
Опыт 3. Определение общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС) крови методом с карбонатом магния (с набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум», г. Санкт-Петербург)	251
11.2. Тест-контроль по теме «Водно-минеральный обмен в норме и патологии»	254
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	269
Глава 12. Гемостаз	270
12.1. Лабораторная работа	270
Опыт 1. Активированное частичное [парциальное] тромбопластиновое время [АЧ[П]ТВ]	271
Опыт 2. Активированное время рекальцификации плазмы ..	272
Опыт 3. Методы исследования антикоагуляционной активности крови. Определение тромбинового времени крови	272
Опыт 4. Протромбиновое время (ПВ) (протромбиновый индекс-ПИ)	273
Опыт 5. Унифицированный колориметрический метод определения фибриногена в плазме	274
Опыт 6. Метод определения толерантности плазмы к гепарину	275
Опыт 7. Определение фибринолитической активности крови (ФАК)	277
Опыт 8. Определение продуктов деградации фибриногена/фибрина (ПДФ) в сыворотке крови	277
12.2. Тест-контроль по теме «Гемостаз»	279
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	287
Глава 13. Взаимосвязь обменов веществ	288
13.1. Лабораторная работа	289

Опыт 1. Экспресс-метод ранней диагностики инфаркта миокарда	289
13.2. Тест-контроль по теме «Взаимосвязь обменов веществ»	290
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	305
Литература	306
ПРИЛОЖЕНИЕ	307
Приготовление некоторых реактивов и препаратов	307

Учебное издание

Пустовалова Лидия Михайловна

Практические работы по биохимии

Ответственный редактор:	<i>Оксана Морозова</i>
Технический редактор:	<i>Галина Логвинова</i>
Корректор:	<i>Николай Передистый</i>
Компьютерная верстка:	<i>Михаил Говоров</i>

Сдано в набор 20.01.2004. Подписано в печать 17.08.2004.

Формат 84x108 $\frac{1}{32}$. Бумага Типографская №2.

Гарнитура ScoolBook. Тираж 5000 экз. Зак. № 475.

Издательство «Феникс»

344082, г. Ростов-на-Дону, пер. Халтуринский, 80.

Тел.: (8632) 61-89-76, тел./факс: 61-89-50.

E-mail: morozova@phoenixrostov.ru

Отпечатано с готовых диапозитивов в ЗАО «Книга».

344019, г. Ростов-на-Дону, ул. Советская, 57

Качество печати соответствует предоставленным диапозитивам