



ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

**«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»**

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Кафедра фундаментальной и клинической биохимии

С.П. Корочанская, П.Г. Сторожук, И.М. Быков

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

ЧАСТЬ I

*Статика белков, витамины, ферменты, гормоны, обмен
углеводов*

Рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинскому
и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного
пособия для студентов медицинских вузов

**КРАСНОДАР
2022**

УДК 577.1(035)
ББК 28.902
К 68

Корочанская С.П., Сторожук П.Г., Быков И.М. Учебно-методическое пособие по биологической химии. – Краснодар, 2022.

Авторы — сотрудники кафедры фундаментальной и клинической биохимии Кубанского государственного медицинского университета, имеющие большой опыт научно-исследовательской и педагогической работы.

Учебно-методическое пособие составлено в соответствии с требованиями рабочих программ по дисциплинам «Биологическая химия», «Медицинская биохимия» ФГОС ВО специальностей 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.02 Педиатрия, 31.05.03 Стоматология, 33.05.01 Фармация, 32.05.01 Медико-профилактическое дело. В пособии представлены биохимические методы исследования, включенные в лабораторный практикум при изучении студентами курса биохимии. Первая часть учебно-методического пособия включает в себя статическую биохимию и раздел динамической биохимии «Энергетический обмен, обмен и функции углеводов».

Рецензенты: зав.кафедрой теоретической и клинической биохимии Волгоградского государственного медицинского университета, д.м.н., профессор **О.В. Островский**;

зав.кафедрой медицинской и клинической биохимии Дагестанской государственной медицинской академии, д.м.н., профессор **Э.Р. Нагиев**

Учебно-методическое пособие рекомендовано к изданию Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России, Центральным методическим советом Кубанского государственного медицинского университета.

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие по биологической химии для студентов лечебного, педиатрического, медико-профилактического и стоматологического факультетов составлены с учетом действующих в настоящее время учебных программ и планов.

В первую часть пособия вошли разделы: статика белков, витамины, ферменты, гормоны, энергетический обмен и обмен углеводов.

При составлении настоящего учебно-методического пособия авторы не преследовали целей охватить все разделы современной биохимии. Основная задача состояла в том, чтобы дать студенту представления о молекулярном уровне основ жизни вообще и человеческой в частности, вызвать интерес к одному из важнейших разделов современной биологии и побудить будущего специалиста постоянно углублять свои знания и представления о сути биохимических изменений при той или иной патологии, осмысленно подходить к ее устранению, помочь освоить принципы проведения основных биохимических анализов, научить трактовать результаты биохимических исследований.

РАЗДЕЛ I

СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Цель изучения раздела: изучить структурную организацию, физико-химические свойства и биологические функции основных классов простых и сложных белков; научиться применять знания о структурном и функциональном многообразии белков для объяснения функций организма в норме и при патологии; научиться использовать знания о свойствах белков для качественного и количественного определения белков в биологических объектах в норме и при болезнях.

Основные вопросы раздела

1. Физико-химические свойства белков.
2. Структурная организация белков и методы ее изучения.
3. Методы разделения, очистки и количественного определения белков.
4. Общая характеристика основных классов простых и сложных белков.
5. Белковый состав органов и тканей, его изменение в онтогенезе и при болезнях.

Белки – это высокомолекулярные, азотсодержащие органические вещества, построенные из аминокислот, разное количественное соотношение и порядок которых обеспечивают многообразие белков в живой природе.

Белки составляют до 50% сухого веса живых клеток, они играют главную роль в формировании структуры и выполнении функций живых клеток. Это молекулярные инструменты, с помощью которых реализуется генетическая информация. Основные проявления жизни: пищеварение, раздражимость, сократимость, способность к росту и размножению, движение, выработка энергии, биокатализ – связаны с веществами белковой природы.

Белкам присущи многообразные биологические функции:

1. Структурная.
2. Каталитическая.
3. Регуляторная.

4. Защитная.
5. Транспортная.
6. Трофическая.
7. Сократительная.

Структурными единицами белковых молекул являются аминокислоты, соединенные в линейную цепь пептидными связями.

Для белков характерны следующие физико-химические свойства, обусловленные аминокислотным составом:

- 1) Растворимость. Она зависит от аминокислотного состава белка и природы растворителя.
- 2) Ионизация. Заряд белковой молекулы обусловлен реакцией среды и соотношением ионогенных групп в белковой молекуле.
- 3) Гидратация. Молекула белка дифильна, в ней имеются гидрофильные и гидрофобные группы, причем гидрофильные в большинстве нативных белков находятся на поверхности, а гидрофобные внутри белковой молекулы.

Для белков характерна сложная структурная организация молекулы. Различают первичную, вторичную, третичную структуры. Ряд белков обладает и четвертичной структурой.

Первичная структура – это последовательность аминокислот в полипептидной цепи, связанных ковалентной кислото-амидной (пептидной связью). 20 аминокислот, формирующих первичную структуру белков, называются протеиногенными (протеин – белок). Поскольку в образовании пептидной связи участвуют только α -амино- и α -карбоксильные группы аминокислот, первичная структура всегда линейна. Она отвечает за последующие уровни структурной организации белков, определяет большинство физико-химических свойств, видовую и тканевую специфичность, а также, опосредованно, и функции белков.

Вторичная структура – тип спирализации белковой молекулы. Третичная структура – это форма молекулы в пространстве. По форме белковые молекулы подразделяются на глобулярные и фибриллярные. Если первичная структура белка содержит более 200 аминокислотных остатков, то в третичной структуре могут выделяться самостоятельные участки – домены. *Домен* – фрагмент полипептидной цепи, сходный по свойствам с самостоятельным глобулярным белком. Домену всегда соответствует непрерывный участок полипептидной цепи, который формирует компактное глобулярное образование, обладающее самостоятельными функциями. Между собой домены соединяются малоструктурированными полипептидными участками. Так неколлагеновый белок межклеточного

вещества соединительной ткани фибронектин состоит из нескольких доменов, каждый из которых имеет центры связывания с другими молекулами (коллагеном, гликозаминогликанами, интегрином, другими молекулами фибронектина). Вторичная и третичная структуры удерживаются нековалентными связями, они лабильны и под действием различных факторов легко нарушаются. Процесс формирования пространственной структуры белка называется **фолдингом**. Это энергоемкий процесс, в котором принимает участие особая группа защитных белков – шапероны. **Шапероны** – белки, которые обеспечивают правильную пространственную укладку полипептидной цепи в процессе ее синтеза, подавляя образование нежелательных побочных взаимодействий аминокислотных остатков. Так образуется энергетически наиболее выгодная функционально-активная **нативная** структура белковой молекулы. Шапероны защищают нативную структуру белка от нарушений в процессе выполнения белком функций, их называют «**белками теплового шока**».

Для качественного открытия белков используют две группы реакций:

1. Цветные, основанные на открытии пептидной связи или функциональных групп аминокислот;
2. Осадочные, обусловленные физико-химическими свойствами белков.

Такие реакции бывают обратимыми и необратимыми.

При обратимом осаждении белки теряют факторы стабильности (гидратную оболочку, заряд), белковые частицы образуют крупные агрегаты и выпадают в осадок под действием силы тяжести (седиментируют). Поскольку нативная структура белка при этом не нарушается, процесс обратим.

Поверхность нативной белковой молекулы всегда мозаична, имеет место чередование гидрофильных и гидрофобных групп аминокислотных остатков. При необратимом осаждении белков нарушается нативная конформация, теряется мозаичность, а значит, способность выполнять функции. Этот процесс называется **денатурацией**.

Признаки денатурации:

1. Изменение размеров и формы белковой молекулы;
2. Потеря гидрофильных и приобретение гидрофобных свойств;
3. Потеря способности растворяться в воде и приобретение способности растворяться в избытке осадителя;
4. Изменение оптических свойств белкового раствора;
5. Потеря биологической активности.

За счет мозаичности на поверхности нативной белковой молекулы

формируются центры связывания, по которым высоко специфично, высоко избирательно присоединяются различные высокомолекулярные и низкомолекулярные соединения как органические, так и неорганические, называемые **лигандами**. Присоединение лиганда идет по принципу комплементарности (взаимного соответствия дополняющих друг друга структур) с образованием нековалентных связей (фермент-субстрат, рецептор-гормон, антитело-антиген и т.д.). Образование белково-лигандного комплекса – обратимый процесс.

Для выделения белков из смеси и разделения индивидуальных белков используются различные физико-химические методы:

1. Растворение с использованием различных растворителей;
2. Хроматография (различные виды);
3. Электрофоретическое разделение;
4. Кристаллизация.

Для количественного определения белков используют непрямые методы (определяют содержание азота в пробе с последующим расчетом количества белка) и прямые, основанные на цветных реакциях или физико-химических свойствах белка.

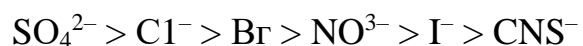
Белковый состав органов и тканей различен и определяется функциями органов и тканей, он изменяется в ходе онтогенеза (в связи с изменениями функций) и при заболеваниях.

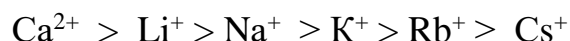
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Работа 1. **Высаливание белков**

Цель: научиться разделять белки на фракции с помощью нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов.

Высаливание – это обратимое осаждение белков из растворов с помощью высоких концентраций нейтральных солей: сульфата аммония, сульфата магния, хлорида натрия. Механизм высаливания заключается в дегидратации белковой молекулы и снятии заряда. На процесс высаливания влияют: степень гидрофильности белка, его заряд, молекулярная масса. Поэтому для высаливания разных белков требуется различная концентрация одних и тех же солей, разные условия pH среды. Высаливающее действие ионов зависит от их дегидратирующей способности, которая характеризуется положением в лиотропном ряду Гофмейстера:





Работа 1.1. Высаливание белков сульфатом аммония

Для высаливания белков сульфатом аммония используется раствор яичного белка, содержащий смесь альбуминов и глобулинов.

Порядок выполнения работы

В пробирку налить 2-3 мл раствора белка и добавить равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, перемешать. Смесь представляет собой полунасыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. В этих условиях выпадают в осадок глобулины, молекулярная масса которых значительно выше молекулярной массы альбуминов. Через 5 минут осадок отфильтровать через бумажный фильтр. На фильтре останутся глобулины, в фильтрате – альбумины.

К фильтрату добавить порошок сернокислого аммония до полного насыщения (на дне пробирки нерастворяющийся $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Появившаяся муть свидетельствует о выпадении в осадок альбуминов. Через влажный бумажный фильтр отфильтровать альбумины. В фильтрате белок должен отсутствовать. Проверить с помощью биуретовой реакции: добавить к фильтрату 1 каплю 1% раствора CuSO_4 и по каплям 10% раствор едкого натра для развития окраски. Появляющаяся голубая окраска раствора (отрицательная биуретовая реакция) свидетельствует об отсутствии белка.

Если раствор приобретает сине-фиолетовый или фиолетовый цвет (положительная биуретовая реакция) – это свидетельствует о неполном осаждении белка, о несоблюдении условий опыта.

Данные занести в таблицу № 1 .

Работа 1.2. Высаливание белков хлористым натрием

Хлористый натрий обладает слабым дегидратирующим действием, поэтому только при полном насыщении выпадают в осадок глобулины. Для осаждения альбуминов хлористым натрием надо еще и привести белок в изoeлектрическое состояние.

Порядок выполнения работы

К 2-3 мл раствора яичного белка добавить порошок хлористого натрия до полного насыщения. Дать постоять 5 минут. Появившаяся муть — выпавшие глобулины. Профильтровать раствор через влажный (смоченный

дистиллированной водой) бумажный фильтр. На фильтре — осадок глобулинов, в фильтрате — альбумины. Фильтрат подкислить несколькими каплями 1% уксусной кислоты до появления мути (в изоэлектрической точке выпадают в осадок альбумины). Осадок отфильтровать, проделать с фильтратом биуретовую реакцию (см. предыдущую работу).

Данные оформить в виде таблицы.

Таблица 1

Реакции высаливания белков

Осадитель	Насыщение	pH	Тип осаждаемого белка	Механизм осаждения

Общий вывод:

Сделать вывод об условиях высаливания альбуминов и глобулинов.

Высаливание широко используется как метод разделения белков, выделения индивидуальных белков, получения белков в чистом виде.

РЕАКЦИИ НЕОБРАТИМОГО ОСАЖДЕНИЯ

Работа 2. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Цель работы: изучить механизм денатурации. Научиться необратимо осаждать белки из биологических жидкостей, знать клиническое значение и применение реакций необратимого осаждения белков.

В отличие от высаливания осаждение солями тяжелых металлов:

- 1) является процессом необратимым, механизм которого сводится к нарушению конформации белковой молекулы;
- 2) происходит при низких концентрациях соли;
- 3) при внесении в реакционную смесь большого избытка осадителя происходит процесс адсорбционной пептизации, что сопровождается растворением осадка.

Работа 2.1. Осаждение белков сульфатом меди

К 15-20 каплям раствора белка добавить 1-2 капли 10% раствора сульфата меди. Появление бледно-голубой мути – свидетельство осаждения белка.

Добавить раствор сульфата меди до растворения осадка (раствор становится прозрачным). В основе растворения осадка лежит механизм адсорбционной пептизации.

Данные занести в табл. 2.

Работа 2.2. Осаждение белков ацетатом свинца

К 15-20 каплям раствора белка добавить 1-2 капли 5% уксуснокислого свинца. Появляется белый осадок, который растворяется в избытке осадителя. Данные занести в табл. 2.

Способность белков давать нерастворимые осадки с солями тяжелых металлов широко используется в клинической практике. При отравлении солями тяжелых металлов (ртути, свинца, меди) в качестве противоядия вводят белки (молоко, раствор яичного белка), которые прочно связывают соль тяжелого металла в желудке и прекращают всасывание яда в кровь.

Работа 3. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Механизм осаждения обусловлен нарушением конформации белковой молекулы. Происходит денатурация белка, он теряет гидрофильные, приобретает гидрофобные свойства и выпадает в осадок.

В избытке концентрированной кислоты осадок растворяется за счет адсорбционной пептизации. Исключение составляет концентрированная азотная кислота, в избытке которой осадок не растворяется.

Работа 3.1. Осаждение белка концентрированной азотной кислотой

В пробирку налить 5-10 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно наложить 5-10 капель раствора белка (пробирку держать под углом 45°). На границе двух слоев появляется небольшое кольцо, белого осадка. Встряхнуть пробирку и добавить еще несколько капель азотной кислоты. Раствор остается мутным, осадок белка в избытке азотной кислоты не растворяется.

Данные занести в табл. 2.

Работа 3.2. Осаждение белка серной кислотой

Внести в пробирку 5-10 капель серной кислоты. Осторожно по стенке пробирки наложить 5-10 капель раствора белка. На границе двух слоев появляется кольцо. При встряхивании пробирки раствор становится прозрачным за счет растворения осадка. Данные занести в табл. 2.

Работа 4. Осаждение белков органическими кислотами

Осаждение органическими кислотами является необратимым процессом. Механизм осаждения заключается в нарушении конформации белковой молекулы, потере гидрофильности и нативных свойств.

Работа 4.1. Осаждение белков трихлоруксусной кислотой (CCl₃COOH)

В пробирку внести 5 капель раствора белка и добавить 2 капли 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Появляется белый осадок, нерастворимый в избытке кислоты.

Данные занести в табл. 2.

Особенностью реакции является способность трихлоруксусной кислоты осаждать белок и не осаждать продукты гидролиза белка. Реакция широко используется в лабораторной практике для получения безбелковых фильтратов крови.

Работа 4.2. Осаждение белков сульфосалициловой кислотой

В пробирку внести 5 капель раствора белка и добавить 2 капли 20% раствора сульфосалициловой кислоты, появляется белый осадок.

Данные занести в табл. 2.

Особенностью реакции является высокая чувствительность.

Реакция применяется в клинике для обнаружения малых количеств белка в биологических жидкостях (спинно-мозговой, моче, экссудатах).

Сделать общий вывод по реакциям осаждения белка.

Таблица 2

Реакции необратимого осаждения белков

Осадитель	Характер и цвет	Механизм осаждения	Особенности реакции

Общий вывод:

ГИДРОЛИЗ ПРОСТОГО БЕЛКА

Гидролиз – это распад сложного вещества на более простые составные части с присоединением ионов воды по месту разрыва связей. Гидролиз простого белка идет поэтапно через ряд промежуточных продуктов и заканчивается высвобождением аминокислот.

Схема гидролиза простого белка

Продукт	Цвет при биуретовой реакции
Белок	сине-фиолетовый
Полипептиды	фиолетовый
Крупные пептиды	розово-фиолетовый
Мелкие пептиды	розовый
Дипептиды	голубой
Аминокислоты	голубой

В зависимости от катализатора различают: ферментативный, кислотный и щелочной гидролиз. В зависимости от глубины различают полный гидролиз (до аминокислот) и неполный (в гидролизате – промежуточные продукты). По условиям различают: мягкий гидролиз ($T=37^{\circ}$, отсутствие концентрированных кислот, щелочей, нормальное давление) и жесткий (высокая T° , давление, концентрированные кислоты, щелочи). Жесткий гидролиз проводится в лабораторных условиях и сопровождается разрушением некоторых аминокислот: три, сер, тре, цис, тир, фен. Мягкий гидролиз белка – поэтапный ферментативный имеет место в желудочно-кишечном тракте и тканях организма.

Работа 5. Кислотный гидролиз простого белка

Цель работы: научиться проводить кислотный гидролиз белка, уметь судить о глубине гидролиза по биуретовой реакции.

Порядок выполнения работы

В химический стакан налить 25 мл раствора яичного белка, добавить 5 мл (мерной пробиркой) концентрированной серной кислоты. Стакан закрыть крышкой из фольги и поместить на электрическую плитку под вытяжной шкаф. Провести биуретовую реакцию с исходным раствором белка. Через 15, 30, 45, 60 минут от начала кипения отбирать по 5 капель гидролизата и проводить биуретовую реакцию. Данные занести в табл. 3.

Показатели глубины гидролиза простого белка

Время гидролиза	Цвет биуретовой реакции	Продукт гидролиза	Общий вывод по работе
0'			
15'			
30'			
45'			
60'			

Работа 6. Хроматографическое разделение аминокислот

Цель работы: освоить метод бумажной радиальной распределительной хроматографии. Научиться идентифицировать аминокислоты в смеси по свидетелям и R_f — коэффициенту распределения.

Хроматография – это метод разделения смеси на компоненты без учета сил разделения. Для разделения смеси аминокислот используется бумажная распределительная хроматография, основанная на различии коэффициента распределения аминокислот между органической и водной фазами. Органический растворитель (фенол), насыщенный водой, в специальной камере, передвигаясь под действием капиллярных сил, одновременно увлекает за собой нанесенные на бумагу аминокислоты.

Скорость перемещения аминокислот зависит от химического строения аминокислот, их способности быстрее растворяться в подвижном органическом растворителе, или менее подвижном – воде. Коэффициент распределения определяется по уравнению:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

a – расстояние, пройденное аминокислотой;
 b – расстояние, пройденное фронтом растворителя.

Чем лучше растворимость аминокислоты в органическом растворителе, тем выше R_f , тем подвижнее аминокислота. Поскольку у аминокислот в смеси различная скорость движения, происходит их распределение.

Порядок выполнения работы

Диск хроматографической бумаги карандашом (только простым) разделить на 4 части. В центре диска сделать отверстие и поместить в него "ножку" из фильтровальной бумаги в виде трубочки высотой 2 см.

В каждой из 4 частей на расстоянии 1 см от ножки обвести по небольшому кружку (линия старта). Капилляром в каждую часть диска, положенного на чашку Петри, на линию старта нанести один из растворов: смесь аминокислот, аланин, глутаминовая кислота, лейцин. Диск высушить на воздухе (по краю карандашом надписать нанесенные растворы). На дно хроматографической камеры (чашки Петри) налить 10 мл растворителя (фенол, насыщенный водой), опустить в него "ножку" хроматограммы, чтобы она погрузилась в растворитель. Чашку накрыть крышкой и оставить при комнатной температуре на 45-60 минут для разгона.

Когда фронт растворителя подойдет к краю диска, открыть крышку, карандашом отметить границу, вытащить "ножку" и для фиксации поместить бумажный диск в термостат на 10 минут (температура 100-120°). Высушенный диск проявить спиртовым раствором нингидрина, опустив в посуду с нингидрином на 1-2 секунды. Затем поместить диск на 5-10 минут в термостат и вновь высушить. Полученную хроматограмму идентифицировать.

Указания к составлению отчета

Записать принцип работы хроматографического метода, зарисовать или подклеить в тетрадь полученные хроматограммы с указанием идентифицированных аминокислот.

С помощью линейки измерить расстояние:

- 1) от места нанесения капли раствора до середины каждого пятна (a);
- 2) от места нанесения капли раствора до линии фронта

растворителя (b).

Вычислить коэффициент распределения
аминокислоты. Сделать вывод.

$$Rf = \frac{a}{b} \text{ для каждой}$$

**Работа 7. Рефрактометрический метод определения
концентрации белка**

Цель работы: научиться определять количество белка с помощью рефрактометра.

Принцип метода основан на способности белковых частиц преломлять луч света. Степень рефракции зависит от концентрации веществ в растворе, физического состояния растворённых частиц, природы веществ в растворе, длины волны света, температуры.

Для работы используется рефрактометр ИРФ-464, состоящий из корпуса,

имеющего форму трубы, и квадратной измерительной коробки с двумя вмонтированными призмами, пространство между которыми заполняется исследуемой жидкостью. Внутри прибора имеется две шкалы, одна из которых показывает показатель преломления исследуемого образца, а вторая – концентрацию белка в данном образце.

Порядок выполнения работы

Открыть крышку и пипеткой нанести на нижнюю призму 1-2 капли исследуемого раствора. Закрыть крышку. Прибор расположить таким образом, чтобы в окошечко измерительной коробки попадало достаточное количество света. В окуляре должна быть четко видна шкала прибора. Показания прибора считываются по шкалам по границе раздела темной и светлой части круга. Повторить описанную процедуру с несколькими растворами белка. Показания занести в таблицу 4.

Таблица 4

Раствор	Показатель преломления	Содержание белка, %

Работа 8. **Количественное определение концентрации веществ с помощью фотоэлектроколориметра**

Цель работы: освоить принцип работы фотоэлектроколориметра, научиться определять с его помощью концентрацию веществ.

Принцип работы фотоэлектроколориметра основан на возникновении электрического тока в цепи под влиянием лучей света, проходящих через окрашенный раствор и попадающих на фотоэлемент.

В основе действия прибора лежит закон Ламберта-Бугера-Бэра о пропорциональности между интенсивностью окраски раствора и степенью поглощения им света.

Современные фотоэлектроколориметры относятся к компенсационным, в них 2 фотоэлемента соединены с гальванометром таким образом, что стрелка гальванометра стоит на нуле, если фотоэлементы одинаково освещены. Если перед одним фотоэлементом помещается раствор с более интенсивной окраской, он сильнее поглощает лучи света, и стрелка гальванометра отклоняется, причем тем сильнее, чем интенсивней окрашен раствор.

Чтобы вновь привести стрелку к нулю, нужно ослабить пучок света, падающий на второй фотоэлемент. Степень ослабления света учитывается по отклонению стрелки гальванометра и отсчитывается по специальным шкалам, нанесенным на отсчетные барабаны.

Освещенность левого фотоэлемента регулируется фотометрическим клином, а правого – щелевого – диафрагмой. Правый световой пучок является измерительным, левый – компенсационным.

Для увеличения точности определения на пути лучей света ставится светофильтр, пропускающий лучи строго определенной длины. Фотоэлектроколориметр включается в сеть через стабилизатор, что обеспечивает постоянство режима освещения.

Порядок выполнения работы

В 2 кюветы с выбранной рабочей длиной внести дистиллированную воду или раствор, служащий контролем. В третью кювету поместить исследуемый раствор (чем интенсивней окраска исследуемого раствора, тем меньше должна быть рабочая длина кювет).

Открыть крышку прибора и поместить все три кюветы в гнезда кюветодержателя так, чтобы против световых пучков слева был контрольный раствор, справа исследуемый.

Вторую кювету с контрольным раствором поместить справа в соседнее гнездо. Оба барабана установить так, чтобы шкалы отсчета были на нуле. Винтом слева (№ 1–9) установить нужный светофильтр. Прибор включить в сеть, перевести выключатель на стабилизаторе в положение «включен» и дать прогреться прибору в течение нескольких минут, винтом «нуль» слева на корпусе прибора установить стрелку гальванометра на «нуль». Открыть шторку на верхней панели прибора. Световые пучки, проходя через испытуемый и контрольный растворы, поглощаются не одинаково, и стрелка гальванометра отклоняется. Левым барабаном привести стрелку гальванометра к нулю. Закрыть шторку; винтом справа, соединенным с

узлом кюветодержателя, перевести кюветы, против световых пучков теперь будут контрольные растворы, одинаково поглощающие свет. Открыть шторку, правым барабаном привести стрелку гальванометра к нулю.

Закрывать шторку и записать показания прибора. Из кюветы с исследуемым раствором вылить жидкость, поместить следующий раствор, тщательно протереть поверхности кюветы и повторить определение. (За рабочие поверхности кюветы руками не брать.)

На фотоколориметре определяется только оптическая плотность раствора. Для определения концентрации использовать стандартную кривую, построенную по растворам с известной концентрацией. Для этого на графике определить оптическую плотность, найденную на ФЭКе, и провести линию до пересечения со стандартной кривой. Опустить перпендикуляр на горизонтальную ось и определить концентрацию раствора. Можно пользоваться стандартными таблицами или проводить определение с опытной и стандартной (с заведомо известной концентрацией) пробами. Освоить работу на ФЭКе на примере количественного определения белка по биуретовой реакции.

Работа 9. Количественное определение концентрации белка биуретовым методом

Цель работы: научиться определять количество белка в биологических жидкостях колориметрическим методом с помощью биуретового реактива. Принцип метода основан на том, что белок сыворотки крови реагирует в щелочной среде с сернокислой медью с образованием соединений, окрашенных в фиолетовый цвет; Интенсивность развивающегося окрашивания прямо пропорциональна концентрации белка в растворе.

Порядок выполнения работы

Отмерить мерной пробиркой 5 мл рабочего раствора биуретового реактива, прибавить пипеткой, избегая образования пены, 2 капли сыворотки крови. Перемешать и оставить на 30 минут при комнатной температуре. После инкубации пробу проколориметрировать на ФЭКе в кювете шириной 10 мм при зеленом светофильтре против контроля. В качестве контроля использовать рабочий раствор биуретового реактива.

Рассчитать содержание белка по формуле:

$$X = E \cdot 200 \text{ г/л, где}$$

E – экстинция раствора;

200 – коэффициент для пересчета содержания белка в г/л, найденный экспериментально.

Количество общего белка в сыворотке крови в норме составляет 65-80 г/л. Оформить в виде протокола.

Работа 10. Разделение и количественное определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге

Цель работы: ознакомиться с принципом метода электрофоретического разделения белков сыворотки крови. Научиться идентифицировать электрофореграммы, рассчитывать процентное содержание белковых фракций, усвоить клиническое значение метода.

Принцип метода основан на способности белков под действием внешнего электрического поля передвигаться в растворе к противоположным заряженным полюсам. Скорость и направление движения зависят от знака, величины заряда и относительной молекулярной массы белковой частицы.

Скорость движения частицы в электрическом поле прямо пропорциональна величине заряда частицы и обратно пропорциональна ее размеру и степени гидратации.

Разделять белки сыворотки крови можно с использованием различных твердых носителей: бумаги, природных и синтетических гелей.

Поскольку величина и знак заряда белковой частицы определяются соотношением ионогенных групп, рН и ионной силой раствора, то при разных значениях рН раствора белки сыворотки крови будут передвигаться с разной скоростью и иметь разный заряд.

Чаще электрофоретическое разделение сывороточных белков

проводится при рН 8,6. При этом все белки имеют отрицательный заряд, движутся к аноду. Наиболее высокая скорость движения у альбуминов (низкая молекулярная масса). При бумажном электрофорезе белки сыворотки крови разделяются на 5 фракций: альбумины, α_1 , α_2 , β и γ -глобулины. Наиболее медленно будут передвигаться γ -глобулины.

Порядок выполнения работы

Ознакомиться с устройством камеры для электрофоретического разделения белков. Усвоить, что порядок работы складывается из следующих этапов:

1. подготовка камеры к работе (заполнение буферными растворами, подключение электродов), подготовка бумажных полос;
2. нанесение сыворотки крови на стартовую линию электрофореграммы;
3. включение прибора в сеть и разгон белков;
4. фиксация и проявление электрофореграмм;
5. идентификация и количественное определение белковых фракций.

Взять готовую электрофореграмму и изучить распределение белковых фракций. Рассчитать процентное содержание белковых фракций. Для этого отметить и измерить ширину окрашенного пятна, занимаемого каждой белковой фракцией. Измерить наименьшую и наибольшую ширину и найти среднюю величину. За 100% принять общую ширину окрашенных пятен (находится путем суммирования отдельных пятен). Рассчитать процентное содержание каждой из выявленных фракций.

Пример расчета. Средняя длина пятна альбуминов (А) 2,7 см, α_1 -глобулины – 0,2 см, α_2 -глобулины – 0,4 см, β -глобулины – 0,5 см, γ -глобулины – 0,7 см. Общее расстояние, занимаемое пятнами, составляет 4,5см. Эту величину следует принять за 100%. Расстояние, занимаемое альбуминами (2,7 см) – X%.

$$A = \frac{2,7 \cdot 100}{4,5} = 60\%$$

$$\alpha_2\text{-глобулинов} = \frac{0,2 \cdot 100}{4,5} = 4,4\% \text{ и т.д.}$$

Данные оформить в виде таблицы 5.

Фракции	Расстояние в см	% содержание фракций	% содержание фракций в норме	Выводы
Альбумины			52 - 65%	
α_1 -глобулины			2,5 - 5%	
α_2 -глобулины			7 - 13%	
β -глобулины			8 - 14%	
γ -глобулины			12 - 22%	
Общий белок (суммарно)			100%	

Зарисовать фореграмму в тетрадь. Сделать вывод.

Клинико-диагностическое значение метода: при ряде патологических состояний имеет место количественное изменение белковых фракций сыворотки крови. Нарушение соотношения белковых фракций получило название диспротеинемии. Они встречаются при многих заболеваниях, характеризуются большой динамикой, зависят от фазы патологического процесса, его длительности и интенсивности лечебных мероприятий. Наиболее выражены диспротеинемии при поражении органов и систем, где идет интенсивный биосинтез белка.

Увеличение фракции альбуминов встречается крайне редко, в основном при гиперпротеинемии за счет дегидратации. Гипоальбуминемия может быть:

- 1) генетически обусловленная вплоть до анальбуминемии;
- 2) за счет поражения печени (нарушен их синтез);
- 3) за счет поражения почек (повышение проницаемости почечного фильтра).

Глобулиновые фракции чаще растут.

Фракции α_1 - и α_2 -глобулинов растут в плазме крови при стрессах и

воспалениях за счет белков «острой фазы», при коллагенозах и метастазировании злокачественных новообразований.

Фракция β -глобулинов растет при гиперлиппротеинемиях. Фракция γ -глобулинов повышается при иммунных реакциях, вызванных вирусными и бактериальными инфекциями, при деструкции тканей, при белковой недостаточности.

Снижение гамма-глобулиновой фракции может иметь место при первичном (врожденном) и вторичном (приобретенном) иммунодефиците.

Различают 6 основных типов патологических отклонений в электрофореграммах:

1) острые воспалительные процессы: сепсис, пневмония, свежий инфаркт миокарда, острые полиартриты, при этом резко снижается содержание альбуминов, увеличение фракций α_1 - и α_2 -глобулинов;

2) подострый и хронический воспалительные процессы (поздние стадии пневмонии, хронический туберкулезный процесс, хронический эндокардит, цистит, пиелит и т. д.). Характерно умеренное снижение фракции альбуминов, увеличение α_2 - и γ -глобулинов;

3) нефротический синдром (нефрит, нефроз, кахексия, гестоз беременности). Характерно значительное снижение альбуминов, повышение α_2 - и β -глобулинов, снижение фракции γ -глобулинов;

4) поражение печени, дерматозы, гемолитические состояния. При этом уменьшается содержание альбуминов и увеличивается концентрация γ -глобулиновой фракции;

5) цирроз печени характеризуется резким уменьшением альбуминов в плазме крови и резким увеличением γ -глобулиновой фракции;

6) злокачественные новообразования сопровождаются резким уменьшением содержания альбуминов и увеличением всех глобулиновых фракций.

В клинической практике встречается значительно большее количество схем изменений в спектре белков сыворотки крови.

Для интегральной оценки протеинограмм используют коэффициенты отношений:

1. Альбумины/глобулины (А/Г)

2. Альбумины/суммарная фракция альфа-1+альфа-2 глобулинов.

Альбуминово-глобулиновое соотношение (коэффициент А/Г) составляет в норме 1,2-1,8, он снижается при хронических диффузных поражениях печени, инфекционных заболеваниях, пневмонии, туберкулезе, при воспалительных процессах различной локализации и злокачественных новообразованиях.

Коэффициент альбумины/альфа-1+альфа-2 глобулины в норме

составляет 3,9-6,1 и является информативным и адекватным тестом оценки активности воспалительного процесса. При умеренных, выраженных и резких воспалительных изменениях в бронхолегочной системе величина этого соотношения меняется до 2,8-3,8; 2,7-2,0 и ниже 2,0 соответственно.

При всех рассмотренных типах протеинограмм имеет место абсолютное или относительное уменьшение фракции альбуминов на фоне увеличения содержания отдельных фракций глобулинов.

Работа 11. Количественное определение гемоглобина, растворенного в плазме

Цель работы: научиться количественно определять содержание растворенного в плазме гемоглобина, усвоить диагностическое значение метода. Принцип метода основан на способности гемоглобина, а точнее ферментов, присутствующих вместе с гемоглобином в эритроците, окислять бензидин в присутствии перекиси водорода. О количестве гемоглобина судят по интенсивности развивающегося голубого окрашивания.

Порядок выполнения работы

В 2 пробирки (контроль и опыт) налить из бюретки по 4 мл ацетатного буфера с рН 4,6, добавить мерной пробиркой по 2 мл 0,3% раствора перекиси водорода и по 2 мл 0,1% раствора бензидина. В опытную добавить 1 каплю плазмы крови. В контрольную пробирку внести 1 каплю физиологического раствора. Перемешать. Через 3 мин. проколориметрировать при рабочей длине кюветы 1 см и красном светофильтре против контроля.

Количество растворенного гемоглобина определять по калибровочной табл. 6, построенной по растворам с точно известным содержанием гемоглобина.

Оформить в виде протокола.

Диагностическое значение метода. В норме содержатся следы растворенного гемоглобина в плазме (0,2-2,5 мг%). Повышенное

содержание гемоглобина, растворенного в плазме, — показатель внутрисосудистого гемолиза. Записать результаты, сделать вывод.

Таблица 6

Определение гемоглобина на ФЭК-М

ОП	Hb, мг%	ОП	Hb, мг%	ОП	Hb, мг%	ОП	Hb, мг%
0,005	0,2	0,125	4,8	0,245	9,8	0,365	15,0
0,010	0,4	0,130	4,9	0,250	10,0	0,370	15,2
0,015	0,6	0,135	5,1	0,255	10,2	0,375	15,5
0,020	0,8	0,140	5,3	0,260	10,5	0,380	15,7
0,025	1,0	0,145	5,5	0,265	10,7	0,385	15,9
0,030	1,2	0,150	5,7	0,270	10,9	0,390	16,1
0,035	1,4	0,155	5,9	0,275	11,1	0,395	16,4
0,040	1,6	0,160	6,2	0,280	11,3	0,400	16,6
0,045	1,8	0,165	6,4	0,285	11,6	0,405	16,8
0,050	2,0	0,170	6,6	0,290	11,8	0,410	17,1
0,055	2,1	0,175	6,8	0,295	12,0	0,415	17,2
0,060	2,3	0,180	7	0,300	12,2	0,420	17,4
0,065	2,5	0,185	7,2	0,305	12,4	0,425	17,7
0,070	2,7	0,190	7,4	0,310	12,6	0,430	17,9
0,075	2,8	0,195	7,7	0,315	12,8	0,435	18,1
0,080	3,0	0,200	7,9	0,320	13,0	0,440	18,3
0,085	3,2	0,205	8,1	0,325	13,3	0,445	18,6
0,090	3,4	0,210	8,3	0,330	13,5	0,450	18,8
0,095	3,6	0,215	8,5	0,335	13,7	0,455	19,0
0,100	3,8	0,220	8,8	0,340	13,9	0,460	19,2
0,105	4,0	0,225	9,0	0,345	14,2	0,465	19,4
0,110	4,2	0,230	9,2	0,350	14,4	0,470	19,6
0,115	4,4	0,235	9,4	0,355	14,6	0,475	19,9
0,120	4,6	0,240	9,6	0,360	14,8	0,480	20,0

Работа 12. Исследование качественного состава фосфопротеина

Цель работы: освоить методику качественного открытия компонентов

сложного белка казеиногена (фосфопротеина).

Работу проводить со щелочным гидролизатом казеиногена, который получают путем кипячения казеиногена молока с 10% раствором гидроксида натрия в течение 10-15 минут в колбе с обратным холодильником. Гидролизат охлаждается.

Порядок выполнения работы

Работа 12.1. Открытие белка

В пробирку поместить 5 капель гидролизата и 1 каплю 1 % сульфата меди (щелочь не добавляется, т. к. гидролизат щелочной). Развивается окрашивание (положительная биуретовая реакция свидетельствует о наличии продуктов гидролиза белка в казеиногене).

Работа 12.2. Обнаружение фосфата

В пробирку поместить 10 капель гидролизата, 1-2 капли 1% раствора фенолфталеина и по каплям – 10% раствора азотной кислоты до исчезновения розовой окраски (нейтрализации). Затем добавить 20 капель молибденовокислого аммония и прокипятить в течение 3-5 минут. Охладить. Развивающееся желтое окрашивание указывает на присутствие фосфата в гидролизате.

Работа 13. Исследование качественного состава гликопротеина

Цель работы: научиться выделять гликопротеин муцин из слюны и качественно открывать его составные части.

Порядок выполнения работы

В пробирку собрать около 2 мл слюны и по каплям добавить концентрированную уксусную кислоту до выпадения осадка муцина, не растворимого в избытке уксусной кислоты. Слить надосадочную жидкость в чистую пробирку, к осадку добавить 20 капель серной кислоты до растворения осадка.

Работа 13.1. Открытие белка биуретовой реакцией

К надосадочной жидкости добавить 1 каплю 1 % сульфата меди и по каплям 10% гидроксид натрия до развития окраски.

Работа 13.2. Открытие углеводного компонента реакцией Молиша

К растворенному осадку добавить 2-3 капли 1 % спиртового раствора тимола. В присутствии концентрированной серной кислоты идет дегидратация углеводов с образованием фурфурола (из пентоз) и метилфурфурола (из гексоз), продукт конденсации которых с тимолом дает

красное окрашивание. Результаты занести в таблицу 7. Сделать вывод.

Работа 14. Исследование качественного состава нуклеопротеинов

Цель работы: научиться проводить качественные реакции на составные части нуклеопротеинов.

Порядок выполнения работы

Работа проводится с готовым гидролизатом, полученным путем кипячения пекарских дрожжей с 10% раствором серной кислоты. В гидролизате открываются составные части сложного белка нуклеопротеина.

Работа 14.1. Открытие белкового компонента

Проводится биуретовая реакция. К 5 каплям гидролизата добавить 1 каплю 1% сульфата меди и затем по каплям 10% раствор гидроксида натрия до развития окрашивания.

Работа 14.2. Пуриновые основания

Открываются серебряной пробой. К 10 каплям гидролизата добавить по каплям крепкий раствор аммиака до щелочной реакции (лакмус синий) и 10 капель 2% аммиачного раствора нитрата серебра. Встряхнуть. Через 2-3 минуты появляется «облако» выпадающих в осадок пуриновых оснований.

Работа 14.3. Открытие пентоз реакцией Молиша

К 10 каплям гидролизата добавить 3 капли 1% спиртового раствора тимола и 20-30 капель концентрированной азотной кислоты. Встряхнуть. На дне появляется продукт конденсации фурфурола с тимолом красного цвета.

Работа 14.4. Реакция на дезоксирибозу и рибозу с дифениламином

К 10 каплям гидролизата добавить 20 капель 1% раствора дифениламина и прокипятить в водяной бане в течение 15 минут. Развивается сине-зеленое окрашивание, поскольку дезоксирибоза дает с дифениламином синее, а рибоза - зеленое окрашивание.

Работа 14.5. Открытие фосфорной кислоты молибденовой пробой

К 10 каплям гидролизата добавить 20 капель молибденового реактива. Прокипятить. Появляется желтое окрашивание, при быстром охлаждении под струей воды выпадают желтые кристаллы фосфорно-молибденовокислого аммония. Данные занести в таблицу 7.

Таблица 7

**Качественные реакции на открытие составных частей
сложных белков**

Название сложного белка	Название простетической группы	Открываемый компонент	Реакция	Развивающееся окрашивание
Нуклеопроtein	ДНК и РНК	белок	биуретовая	
		пентозы	Молиша	
		рибоза дезоксирибоза	дифенил-аминовая	
		пуриновые основания	серебряная проба	
		фосфорная кислота	молибденовая проба	
Фосфопротеин	Фосфорная кислота	белок	биуретовая	
		фосфорная кислота	молибденовая проба	
Гликопротеин	Углеводные компоненты	белок	биуретовая	
		пентозы гексозы	Молиша	

РАЗДЕЛ II

ВИТАМИНЫ, ФЕРМЕНТЫ, ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Цель изучения раздела: освоить методы качественного открытия отдельных водорастворимых и жирорастворимых витаминов, научиться определять количество витамина С в биологических жидкостях и различных продуктах. Освоить методы качественного открытия и количественного определения ряда ферментов, уметь использовать полученные данные для диагностики заболеваний и характеристики тяжести патологического процесса.

Уметь качественно открывать присутствие гормонов в биологических жидкостях, применять знания о регуляторном действии гормонов для объяснения механизмов регуляции метаболических процессов и функций организма в норме и при патологических состояниях.

Основные вопросы раздела

1. Витамины, биологическая роль в процессах жизнедеятельности, качественное открытие витаминов, количественное определение витамина С в биологических жидкостях и продуктах.
2. Ферменты, роль в процессах метаболизма, физико-химические свойства.
3. Свойства ферментов как катализаторов белковой природы.
4. Качественное открытие ферментов, их многообразие и классификация.
5. Принципы количественного измерения активности ферментов.
6. Диагностическое значение определения активности ферментов в биологических жидкостях в норме и при нарушениях процессов метаболизма.
7. Гормональная регуляция процессов метаболизма в норме и причины ее нарушения.

Витамины — это низкомолекулярные органические вещества, не синтезируемые в организме человека и животных, витамины — важнейшие

незаменимые факторы питания. Они участвуют в построении коферментных систем и обеспечивают нормальную скорость метаболических реакций. При участии витаминов протекают важнейшие биохимические процессы и функции организма. Для витаминов характерно: высокая биологическая активность, чувствительность организма как к недостатку, так и к избытку витаминов и невозможность нормального течения метаболических процессов в отсутствии витаминов, хотя они не являются ни пластическим, ни энергетическим материалом.

По способности растворяться витамины подразделяются на две группы: водорастворимые (группа В, С, Р, U) и жирорастворимые (А, D, Е, К).

Выделяют группу **витаминоподобных соединений**, среди них есть как водорастворимые, так и жирорастворимые низкомолекулярные органические вещества. В отличие от витаминов:

- 1) витаминоподобные соединения синтезируются в организме, но синтез не покрывает потребности, поэтому они должны поступать с пищей;
- 2) биологическая активность этих соединений ниже, поэтому потребность в них выше;
- 3) при недостатке витаминоподобных соединений имеют место нарушения метаболических процессов и биологических функций, но эти нарушения не имеют характерной клинической картины.

Источниками витаминов для человека являются:

- 1) животная и растительная пища;
- 2) синтез микрофлорой толстого кишечника;
- 3) провитамины (предшественники) – соединения, содержащие в своей структуре витамин, но не обладающие биологической активностью. В организме провитамины превращаются в витамины.

Нарушения обмена витаминов проявляются гипо(а)витаминозами и гипервитаминозами. Гипо(а)витаминозы – заболевания, возникающие вследствие недостатка или отсутствия витаминов в организме. При этом могут быть:

Витаминзависимые состояния – заболевания, в основе которых лежит дефект ферментов, обеспечивающих превращение витамина в активную форму, или снижена чувствительность клеточных рецепторов к активной форме витамина (витамин D-зависимый рахит — дефект почечной или печеночной гидролаз, превращающих витамин D в активную гидроксилированную форму). Лечат витаминзависимые состояния введением сверхбольших доз витаминов.

Витаминрезистентные состояния — генетически неоднородные заболевания, характеризующиеся неспособностью организма усваивать

витамин на клеточном уровне (отсутствие фермента, превращающего витамин в кофермент, отсутствие фермента, превращающего витамин в гидроксильную форму, отсутствие рецепторов на клеточной поверхности, воспринимающих активную форму витамина). Лечение витаминами этого типа патологии неэффективно.

Витаминодефицитные состояния – заболевания, обусловленные дефицитом в пище того или иного витамина. Это экзогенные гипо- и авитаминозы. Лечат введением лечебных доз витамина.

Гипервитаминозы — заболевания, возникающие вследствие избыточного поступления витаминов в организм (острые или хронические отравления витаминами).

Ферменты – специфические белки, присутствующие во всех живых клетках и обеспечивающие биокатализ, т.е. изменение скорости химических реакций. По химической природе ферменты делятся на однокомпонентные (простые белки), построенные только из аминокислотных остатков, и двухкомпонентные, состоящие из белкового компонента (апофермента) и небелкового (кофактора). Связь между этими компонентами может быть как ковалентной, так и нековалентной.

В отличие от неорганических катализаторов ферменты:

- 1) обладают высокой биологической активностью, обусловленной механизмом их каталитического действия;
- 2) обладают высокой специфичностью как действия, так и субстратной;
- 3) у ферментов иная зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, температуры, реакции среды, эффекторов, что обусловлено белковой природой ферментов.

В основе каталитического действия ферментов лежит способность высокоизбирательно образовывать белково-лигандные комплексы с субстратами (веществами, на которые направлено их действие) и вызывать химические превращения субстратов.

Участок молекулы фермента, отвечающий за распознавание, связывание и превращение субстрата – **активный центр**. У однокомпонентных ферментов он представлен функциональными группами аминокислот, расположенными порой далеко друг от друга в полипептидной цепи, но сближающимися при формировании функционально активной конформации фермента. У двухкомпонентных ферментов активный центр формируют гетероатомы кофакторов. Большую группу кофакторов составляют витаминсодержащие коферменты.

Различают ферменты **конститутивные**, синтезируемые клетками с постоянной скоростью и постоянно присутствующие в клетках, и

индуцируемые (адаптивные), скорость биосинтеза и количество которых изменяется в зависимости от функционального состояния организма, характера питания, условий внешней среды.

Нарушения активности ферментов приводит к нарушениям скорости метаболических реакций в тканях, что сопровождается развитием патологических процессов.

Исследование количественных и качественных отклонений в ферментном статусе организма широко используется в клинической практике для диагностики заболеваний.

Основные системы межклеточной коммуникации

Основными системами межклеточной коммуникации являются аутокринная, паракринная и эндокринная системы регуляции.

Аутокринная и паракринная регуляции обеспечиваются посредством различных соединений, которые секретируются клетками в межклеточное пространство, взаимодействуют с рецепторами своих же клеток (аутокринно) или близлежащих соседних клеток (паракринно) и оказывают регуляторный эффект.

По этому механизму регуляторное действие оказывают:

Факторы роста – регуляторные белки, выделяемые той же тканью, к которой они принадлежат (гепатоцитами, лимфоцитами), они взаимодействуют с рецепторами собственных клеток и регулируют рост и дифференцировку этих клеток (фактор роста эпидермиса, фактор роста тромбоцитов и др.).

Цитокины – регуляторные белки, участвующие в иммунном ответе и контролирующие степень воспалительной реакции. Они обладают как аутокринным, так и паракринным действием.

Лимфокины – представители цитокинов, полипептиды, которые осуществляют передачу сигнала от одних клеток к другим. Это биологически активные молекулы, выделяемые всеми популяциями лимфоцитов и составляющие молекулярную основу воспалительной реакции и иммунного ответа. К ним относятся интерфероны, интерлейкины, фактор некроза опухолей и др.

Каждый из них, в зависимости от условий, может стимулировать или ингибировать клеточную дифференцировку, оказывать различные эффекты на одну и ту же клетку.

Эндокринная регуляция обеспечивается гормонами.

Гормоны (биорегуляторы) – биологически активные вещества, вырабатываемые в организме специализированными клетками, тканями или органами (железами внутренней секреции) и осуществляющие регуляцию

деятельности других органов и тканей, метаболических процессов и физиологических функций организма. Совокупность регулирующего действия гормонов на организм - гормональная регуляция. Влияние гормонов на метаболизм осуществляется через ферментные системы: гормоны изменяют скорость биосинтеза ферментов (а значит их количество в клетке) или биологическую активность ферментов, или скорость транспорта веществ через мембраны клеток.

Для гормонов характерны следующие общебиологические признаки:

- 1) дистантность действия;
- 2) высокая биологическая активность;
- 3) высокая специфичность регулирующего действия;
- 4) опосредованность действия через ферментные системы;
- 5) высокая скорость метаболизма (они вырабатываются в ответ на сигнал, выполняют функцию и тут же подвергаются инактивации);
- 6) деятельность гормонов контролируется нервной системой.

Гормоны переносят информацию, или сигнал, от нервной системы к органам и тканям (орган-мишень), способным воспринимать этот сигнал за счет клеток-мишеней. Клетка-мишень имеет рецепторы к данному гормону, основным компонентом рецептора является рецепторный белок, способный высоко избирательно распознавать и связывать гормон с образованием (по принципу комплементарности) гормон-рецепторного комплекса. Рецепторы к гормонам могут быть встроены в цитоплазматическую мембрану, «плавать» по мембране или находиться в цитозоле и даже ядре клетки. Выделяют гормоны мембранного и цитозольного способа рецепции. При мембранном способе рецепции для передачи гормонального сигнала в клетку требуются вторичные посредники. Эту функцию выполняют циклические мононуклеотиды (ц-АМФ и ц-ГМФ), ионы кальция, инозитолфосфатиды.

По химической природе выделяют:

- 1) гормоны пептидной природы (пептиды, простые белки, гликопротеины);
- 2) производные аминокислот;
- 3) липидной природы (стероиды, эйкозаноиды).

Недостаточное или избыточное выделение гормонов приводит к эндокринным заболеваниям. С нарушениями гормональной регуляции, ее дискоординацией, во многом связаны процессы старения, онкологические и другие заболевания.

ВИТАМИНЫ

Работа 15. Качественное открытие жирорастворимых витаминов

Цель работы: научиться качественно открывать присутствие витаминов.

Работа 15.1. Качественное открытие витамина А

Витамин А – жирорастворимый витамин, способный кумулироваться в печени. Существуют два витамина А: А₁ – выделен из печени морских рыб, и А₂ – из печени пресноводных рыб; в растениях и овощах присутствуют каротины, являющиеся провитаминами А. В составе молекулы витамина А имеются (β-иононовое кольцо и остатки изопрена. Суточная потребность составляет 1,5 мг. Потребность резко возрастает (до 5 мг) при беременности и кормлении грудью. Витамин А содержится в печени рыб, рыбьем жире, яичных желтках, сливочном масле, бычьей печени.

Витамин А участвует в процессах фоторецепции, обеспечивает рост клеток и клеточную дифференцировку, это мощный антиоксидант.

а) Реакции с серной кислотой

Метод качественного открытия основан на способности витамина А под действием серной кислоты дегидратироваться с образованием продукта фиолетово-красного окрашивания, которое быстро переходит в бурое. Реакция не специфична.

Порядок выполнения работы

В сухую пробирку внести 5 капель рыбьего жира в хлороформе и добавить 1 каплю концентрированной серной кислоты. Что наблюдается?

б) Реакция с сульфатом железа

Реакция неспецифична.

Порядок выполнения работы

К 2 каплям рыбьего жира в хлороформе добавить 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа, и 1-2 капли концентрированной серной кислоты.

Что наблюдается? Результаты занести в табл.8.

Работа 15.2. Качественное открытие витамина D

Витамины группы D существуют в виде нескольких изомеров. Биологической активностью обладают D₂ и D₃. В организме человека витамины группы В подвергаются гидроксилированию по 1, 24, 25 положениям и превращаются в ди- и триоксикальциферолы, регулирующие фосфатно-кальциевый обмен.

Бромхлороформная проба

Метод основан на способности витамина при взаимодействии с раствором брома в хлороформе приобретать зеленовато-голубую окраску.

Порядок выполнения работы

В сухую пробирку внести 2-3 капли рыбьего жира и 2-4 капли раствора брома в хлороформе. Что наблюдается?

Работа 15.3. Качественное открытие витамина Е

Витамин Е существует в природе в виде нескольких изомеров токоферолов (α , β , γ). Витамин Е в клетках участвует в окислительно-восстановительных реакциях, является мощным антиоксидантом, защищая липиды мембран от окисления. Это витамин размножения.

Реакция с хлоридом железа

Метод основан на способности витамина окисляться хлоридом железа (III) с образованием токоферилхинона красного цвета.

Порядок выполнения работы

В сухую пробирку внести 4-5 капель спиртового раствора витамина, добавить 10 капель 1% раствора хлорида железа и тщательно перемешать. Что наблюдается?

Работа 15.4. Качественная реакция на викасол

Викасол – искусственно синтезированный аналог витамина K_1 . Витамины группы К (K_1 и K_2) являются производными нафтохинона. Это антигеморрагические соединения, обладающие высокой активностью и участвующие в процессах свертывания крови (стимулируют выработку печенью факторов свертывания крови), в процессах окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Реакция со щелочным раствором цистеина основана на способности витамина в щелочной среде реагировать с цистеином с развитием лимонно-желтого окрашивания.

Порядок выполнения работы

В сухую пробирку внести 3 капли раствора викасола, добавить 3 капли раствора цистеина и 1 каплю 10% едкого натра. Что наблюдается?

Работа 16. Качественное открытие водорастворимых витаминов

Витамин B_1 (тиамин) относится к водорастворимым витаминам, содержится в отрубях, крупах, бобовых. Суточная потребность 1,5-2 мг.

Витамин В₁ фосфорилируется и превращается в коферменты ГМФ, ТДФ (ТПФ), ТТФ и участвует в процессах окислительного декарбоксилирования α -кетокислот, а также в переносе кетогрупп.

Работа 16.1. Диазореакция

Диазореакция основана на способности витамина в щелочной среде образовывать с диазореактивом комплексное соединение оранжевого цвета.

Порядок выполнения работы

К 10 каплям диазореактива добавить 2 капли 5% раствора тиамин и осторожно (по стенке пробирки) 6 капель 10% бикарбоната натрия. Что наблюдается?

Работа 16.2. Качественная реакция на никотинамид

(витамин РР, В₃)

Водорастворимый витамин В₃ (амид никотиновой кислоты) обладает антипеллагрической активностью, содержится в рисовых и пшеничных отрубях, дрожжах, печени крупного рогатого скота. Суточная потребность составляет 10-15 мг. В организме витамин образует 2 нуклеотидных кофермента НАД (никотинамидадениндинуклеотид) и НАДФ (никотинамидадениндинуклеотид-фосфат), которые в составе дегидрогеназ участвуют во многих окислительно-восстановительных реакциях.

а) **Реакция с ацетатом меди** основана на способности витамина образовывать нерастворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Порядок выполнения работы

В пробирку поместить щепотку витамина и добавить 20 капель дистиллированной воды, тщательно взболтать и нагреть раствор до кипения. К горячему раствору никотинамида добавить 20 капель 5% раствора ацетата меди (предварительно его взболтать). Реакционную смесь довести до кипения и резко остудить под струей холодной воды. Что наблюдается?

б) **Качественная реакция с гидросульфитом натрия** основана на способности витамина давать с реактивом желтое окрашивание.

Порядок выполнения работы

В пробирку поместить щепотку витамина, добавить 15 капель 10% бикарбоната натрия и тщательно перемешать. Добавить 15 капель 5% (свежего) гидросульфита натрия. Что наблюдается?

Работа 16.3. Качественное открытие витамина В₆

Витамин В₆ (пиридоксол, пиридоксаль, пиридоксамин) имеет общее название пиридоксин, содержится в мясе, рыбе, яичном желтке, зеленой части растений. Суточная потребность 2 мг. Это витамин белкового обмена. В организме фосфорилируется и дает кофермент пиридоксальфосфат, входящий в состав ферментов, обеспечивающих переаминирование и декарбоксилирование аминокислот. При недостатке развиваются дерматиты, анемия.

Качественная реакция с хлористым железом основана на способности витамина образовывать комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

Порядок выполнения работы

К 5 каплям пиридоксина добавить 5 капель 1% хлорида железа. Перемешать. Что наблюдается?

Работа 16.4. Качественное открытие витамина С

Витамин С (аскорбиновая кислота) содержится в ягодах, фруктах, овощах (черной смородине, шиповнике, красном перце, зеленом луке и др.). Суточная потребность для человека 70-100 мг. Витамин участвует в окислительно-восстановительных реакциях, образуя мощную окислительно-восстановительную систему (аскорбиновая–дегидроаскорбиновая кислота). Входит в качестве кофермента в гидроксилазы, обеспечивая гидроксилирование пролина, лизина и многих других соединений (стероидных гормонов, дофамина и др.). Обеспечивает прочность коллагеновых волокон, повышает всасывание железа, восстанавливает витамин В₉ в ТГФК. При недостатке витамина С развивается цинга, которая сопровождается системным поражением соединительной ткани.

Окислительно-восстановительная реакция основана на способности витамина, окисляясь, восстанавливать железосинеродистый калий с образованием берлинской лазури.

Порядок выполнения работы

К 5 каплям 1% раствора аскорбиновой кислоты добавить 1 каплю 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю железосинеродистого калия. Перемешать. Добавить 3 капли 10% раствора соляной кислоты и 1 каплю 1 % раствора хлорида железа (III). Что наблюдается?

Данные всех качественных реакций занести в табл. 8.

Таблица 8

Название реакции	Название витамина (химическое, клиническое)	Используемые реактивы	Наблюдаемые изменения	Принцип и химизм реакции	Общие выводы

Работа 17. Количественное определение витамина С в биологических жидкостях и пищевых продуктах

Цель работы: научиться количественно определять содержание аскорбиновой кислоты в биологических жидкостях и продуктах. Уметь рассчитывать содержание витамина.

Метод основан на способности витамина восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол. Этот индикатор в щелочной среде имеет синюю окраску, в кислой – розовую окраску, при восстановлении он обесцвечивается. Титрование аскорбиновой кислоты проводится щелочным раствором индикатора. Раствор титруемого продукта при этом подкисляется. Пока в исследуемом продукте присутствует аскорбиновая кислота, приливаемый синий раствор (щелочной) индикатора восстанавливается витамином и переходит в бесцветную форму. Как только все количество витамина окислится, титруемый раствор приобретает розовое окрашивание за счет появления в среде окисленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Работа 17.1. Определение витамина С в моче

Порядок выполнения работы

В колбочку отмерить 10 мл мочи, добавить 10 мл дистиллированной воды и подкислить 20 каплями 10% соляной кислоты. Оттитровать из бюретки 0,001 н. щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до устойчивой розовой окраски. Рассчитать суточную экскрецию витамина С по формуле:

$$X = \frac{0,088 \cdot V \cdot Б}{В}, \text{ где}$$

- Х – суточная экскреция витамина С, в мг;
0,088 – количество аскорбиновой кислоты в мг, эквивалентное 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола;
V – объем затраченного на титрование индикатора;
Б – среднесуточное количество мочи (1200-1500 мл);
В – объем мочи, взятой для титрования.

В норме содержание витамина С в моче составляет 2-5 мг%.

Суточная экскреция витамина С с мочой дает представление о насыщении организма витамином. Однако, гипо- и авитаминозы нередко сопровождаются нормальной экскрецией витамина С. У здоровых при принятии 100 мг витамина С он быстро выделяется, и его концентрация в крови и моче растет. При гиповитаминозе аскорбиновая кислота задерживается в тканях и концентрация ее в моче не повышается.

Работа 17.2. Определение витамина С в пищевых продуктах

Работа проводится в форме УИРС, идет решение учебно-исследовательских задач.

Порядок выполнения работы

Отвесить навеску продукта согласно табл. 8, тщательно измельчить пестиком в фарфоровой ступке до образования гомогенной массы с небольшим количеством дистиллированной воды (2-3 мл). Перенести массу в мерный цилиндр на 25 мл и, тщательно смывая ступку дистиллированной водой, постараться без потерь весь гомогенат перенести в цилиндр. Довести дистиллированной водой объем смеси до 20 мл, перенести в колбу (или стакан), подкислить 10-15 каплями 10% раствора соляной кислоты (не взбалтывать) и оттитровать из бюретки 2,6-дихлорфенолиндофенолом до развития устойчивой розовой окраски. Рассчитать количество витамина С в продуктах по формуле:

$$X = \frac{0,088 \cdot V \cdot 100}{A}, \text{ где}$$

X – содержание витамина С в продуктах в мг%;

V – объем индикатора, затраченного на титрование;

A – навеска продукта в г;

100 – пересчет в %;

0,088 – количество мг аскорбиновой кислоты, эквивалентное 1 мл 0,001 н. раствора индикатора.

Данные занести в табл. 9.

Таблица 9

Продукт	Навеска продукта, г	Объем индикатора, мл	Содержание витамина С в продуктах в мг%	
			полученные данные	табличные данные
апельсин	1			60
лимон	1			40
перец болгарский	1			150
капуста	5			20-50
капуста цветная	5			70
картофель	5			6-20
петрушка	5			150
яблоко	5			13
груша	5			5
хвоя	1			150-250

Сравнить полученные данные с табличными и сделать вывод о содержании витамина С, объяснить причину возможных отклонений.

ФЕРМЕНТЫ

Работа 18. Качественное открытие ферментов

Цель работы: освоить методы качественного открытия ферментов по производимому ими действию на субстрат.

Принцип открытия основан или на исчезновении субстрата под действием фермента, или на появлении в реакционной смеси продуктов реакции. Биологическая жидкость, ткань или продукт, в которых в достаточном количестве присутствует фермент, называется источником фермента.

Работа 18.1. Открытие амилазы

Реакция основана на способности амилазы расщеплять крахмал с образованием мальтозы.

Порядок выполнения работы

В пробирку налить 3 мл 0,1 % раствора крахмала, добавить 3-5 капель неразбавленной слюны. Через 5 мин. отлить в чистую пробирку 0,5 мл смеси, добавить 1 каплю реактива Люголя.

Что наблюдается? Через 10—15 мин повторить определение. Как изменился цвет? О чем свидетельствует изменение цвета?

С оставшейся смесью проделать реакцию Фелинга на обнаружение восстанавливающих Сахаров: 10 капель смеси + 5 капель реактива Фелинга, прокипятить. Что наблюдается? Провести реакции Люголя и Фелинга с исходным раствором крахмала.

Данные занести в табл. 10. Сделать вывод.

Работа 18.2. Открытие пепсина

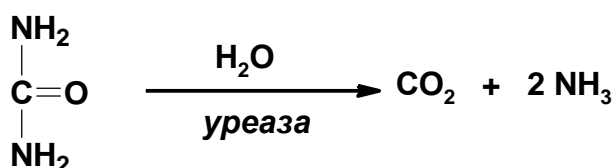
Пепсин – фермент желудочного сока, обладающий молокосвертывающим действием.

Порядок выполнения работы

В две пробирки налить по 5 мл молочно-ацетатной смеси с pH 5,0. В одну добавить 2 капли 0,1 н. соляной кислоты, в другую - 2 капли раствора пепсина. В какой пробирке происходит свертывание молока? Результаты занесите в табл. 10.

Работа 18.3. Открытие уреазы

Уреаза – фермент, расщепляющий мочевины на CO₂ и NH₃. Соевая мука богата этим ферментом.



Порядок выполнения работы

В пробирку налить 2 мл раствора мочевины, прибавить щепотку соевой муки и 5 капель фенолфталеина. Поставить на 5-10 минут. Что наблюдается? Почему появляется окраска?

Работа 18.4. Открытие каталазы

Каталаза – фермент, разрушающий перекись водорода с высвобождением молекулярного кислорода и воды.

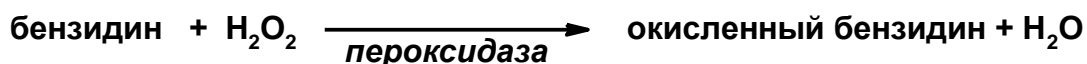


Порядок выполнения работы

Налить в пробирку 2 мл перекиси водорода, добавить 1-2 капли цитратной крови. Что происходит? Почему?

Работа 18.5. Открытие пероксидазы

Пероксидазы – ферменты, переносящие водород от какого-либо вещества на перекись водорода, с разрушением последней.



Порядок выполнения работы

В пробирку налить 10 капель бензидина, добавить 10 капель перекиси водорода и 2 капли раствора крови. Что наблюдается и почему?

Работа 18.6. Открытие липазы

Липаза – фермент, гидролизующий нейтральные жиры до глицерина и свободных жирных кислот, сдвигающих реакцию среды реакционной смеси в кислую сторону.

Порядок выполнения работы

В 2 пробирки налить по 10 капель молока. В одну пробирку добавить 5 капель вытяжки из поджелудочной железы, во вторую – 5 капель дистиллированной воды. В обе пробирки внести по 1 капле фенолфталеина и добавить по каплям 1 % раствор карбоната натрия до появления бледно-розовой окраски (рН 8,0, нельзя приливать избыток карбоната натрия), пробирки поместить в термостат при 38°C на 10 мин. Какие изменения наступили? Почему?

Данные занести в табл. 10.

Таблица 10

Фермент	Источник фермента	Субстрат	Химизм реакции	Что свидетельствует о присутствии фермента

Общий вывод:

Работа 19. Термолабильность ферментов

Цель работы: на практике усвоить, что ферменты относятся к термолабильным соединениям, теряющим при нагревании биологические свойства (каталитические функции).

Метод основан на потере амилазы слюны при кипячении способности гидролизовать α -гликозидные связи крахмала.

Порядок выполнения работы

В мерной пробирке развести собственную слюну в 5 раз. В чистую пробирку отлить часть слюны, прокипятить в течение 5 минут и охладить. В 3 пробирки налить по 10 капель 1% раствора крахмала, в первую добавить 10 капель некипяченой разбавленной слюны, во вторую – прокипяченной, в третью – дистиллированной воды (контроль). Все три пробирки поместить в термостат на 10 минут ($T=37^{\circ}\text{C}$). После инкубации содержимое каждой пробирки разделить пополам, с одной частью реакционной смеси проделать реакцию Фелинга на продукты гидролиза крахмала, с другой – реакцию Люголя на крахмал.

Реакция Фелинга: к реакционной смеси каждой из трех пробирок прилить равный объем реактива Фелинга и прокипятить. Что наблюдается?

Реакция Люголя: ко второй половине реакционной смеси (во все 3 пробирки) добавить по 1-2 капли реактива Люголя.

Что наблюдается?

Данные занести в табл. 11.

Таблица 11

Субстрат	Фермент	Реакция Люголя	Реакция Фелинга	Выводы
Крахмал	амилаза некипяченая			
Крахмал	амилаза прокипяченая			
Крахмал	вода			

Работа 20. Специфичность ферментов

Цель работы: на практике уяснить, что ферменты обладают способностью превращать только строго определенные субстраты.

Метод основан на способности амилазы слюны гидролизовать только α -гликозидные связи в полисахариде – крахмале, а сахаразы – на способности гидролизовать β -фруктозидную связь в дисахариде сахарозе.

Порядок выполнения работы

В 2 пробирки налить по 5 капель слюны, разбавленной в 5 раз (источник амилазы), в 2 другие пробирки налить по 5 капель 1% раствора сахаразы. В одну пробирку со слюной и в 1 пробирку с сахаразой добавить по 10 капель 1% раствора крахмала, во вторые пробирки (со слюной и сахаразой) добавить по 10 капель 1% раствора сахарозы. Поместить все 4 пробирки (со слюной и сахаразой) в термостат на 10 минут при температуре 37°.

Проделать со всеми пробирками реакцию Фелинга (прилить равный объем реактива Фелинга и прокипятить). Что наблюдается?

Данные занести в табл. 12.

Таблица 12

Фермент	Субстрат	Наблюдаемое окрашивание	Выводы
Амилаза	Крахмал		
Амилаза	Сахароза		
Сахараза	Крахмал		
Сахар аза	Сахароза		

Работа 21. Влияние реакции среды на активность ферментов

Цель работы: на практике уяснить, что фермент проявляет максимальную активность только при строго определенном значении рН среды, называемом оптимумом-рН. Сдвиг в обе стороны приводит к ослаблению активности или ее исчезновению (**кислотная или щелочная денатурация фермента**).

Порядок выполнения работы

В 6 чистых пробирок внести по 2 мл буферного раствора с различным значением рН: 6,0; 6,4; 6,8; 7,2; 7,6; 8,0. Во все пробирки добавить по 20 капель 0,5% раствора крахмала и по 20 капель (в последнюю очередь) слюны, разведенной в 50 раз. Пробирки тщательно встряхнуть и через 2-3 минуты из 4-й пробирки отобрать 3-4 капли смеси в чистую пробирку и добавить 1 каплю реактива Люголя. Какой цвет наблюдается? Если появилось красно-бурое окрашивание, сразу во все пробирки прибавить по 1-2 капли раствора Люголя, тщательно встряхнуть.

Данные занести в табл. 13.

Если смесь, отобранная из 4-й пробирки, окрасилась в синий или фиолетовый цвет (гидролиза нет или слабый), через 3-4 минуты пробу повторить, и так делать, пока жидкость не будет окрашиваться в красно-бурый цвет (эритродекстрины). На этом можно опыт закончить.

Таблица 13

№ №	рН	Наблюдаемое окрашивание	Продукт реакции	Выводы
1	6,0			
2	6,4			
3	6,8			
4	7,2			
5	7,6			
6	8,0			

**Работа 22. Влияние активаторов и ингибиторов
на активность амилазы слюны**

Цель работы: на практике усвоить, что активность фермента зависит от присутствия в среде эффекторов.

Порядок выполнения работы

В три пробирки налить по 10 капель 1% раствора крахмала, добавить по 10 капель слюны, разведенной в 50 раз. В первую пробирку добавить 3 капли 1 % раствора хлорида натрия, во вторую – 2 капли 1 % раствора сульфата меди и в третью – 2 капли дистиллированной воды (контроль). Тщательно встряхнуть и спустя 1-2 мин из контрольной пробирки отобрать 3-4 капли жидкости и проделать реакцию Люголя. Если в пробирке появились эритродекстрины (красно-бурое окрашивание), реактив Люголя добавить во все три пробирки, тщательно встряхнуть и данные занести в табл. 14. Если гидролиз до стадии эритродекстринов не дошел, пробу повторить через 3-4 минуты. При появлении в среде эритродекстринов, реактив Люголя внести во все 3 пробирки.

Таблица 14

Эффектор	Реакция Люголя (цвет)	Продукт реакции	Выводы
1. NaCl			
2. CuSO ₄			
3. Вода			

Работа 23. Количественное определение активности амилазы слюны

Цель работы: освоить на практике методику количественного определения активности амилазы слюны. Знать активность амилазы слюны в норме и диагностическое значение отклонений активности фермента при патологических состояниях.

Принцип метода состоит в определении наименьшего количества амилазы (при максимальном разведении слюны), полностью расщепившей добавленный крахмал. Амилазная активность выражается количеством мл 0,1% раствора крахмала, которое расщепляется 1 мл неразведенной слюны при температуре 38°C за 30 мин.

Порядок выполнения работы

В 10 чистых пробирок налить по 1 мл (20 капель) дистиллированной воды. В первую пробирку добавить 1 мл слюны, предварительно разведенной в 10 раз, перемешать и 1 мл смеси перенести во вторую пробирку. Смесь перемешать и 1 мл перенести в третью пробирку и т.д. до 10-й пробирки. Из 10-й пробирки 1 мл смеси вылить. Во все пробирки добавить еще по 1 мл воды и по 2 мл 0,1% раствора крахмала, перемешать и поставить штатив с пробирками в термостат на 30 мин при температуре 38°C. Через 30 мин охладить пробирки под водопроводной водой и добавить по 1 капле реактива Люголя. Перемешать. Расчет активности вести по последней пробирке, в которой жидкость имеет желтоватый цвет (ахродекстрины). Данные занести в табл. 15.

Таблица 15

№ проб.	Разведение слюны	Окраска с реактивом Люголя	Продукт реакции	Расчет активности, выводы
1.	20			
2.	40			
3.	80			
4.	160			
5.	320			
6.	640			
7.	1280			
8.	2560			
9.	5120			
10.	10240			

Пример расчета. Последняя желтая пробирка – четвертая, где разведена слюна в 160 раз, следовательно 1/160 мл неразведенной слюны расщепила 2 мл 0,1 % раствора крахмала, 1 мл расщепит X мл.

$$X = \frac{2 \cdot 1 \cdot 160}{1} = 320 \text{ мл}$$

Амилазная активность равна 320 амилаклатических единиц.

Активность амилазы слюны в норме составляет 160-320 ед. Этот метод широко используется для определения амилазной активности сыворотки крови и мочи (амилазу мочи называют диастазой).

Диагностическое значение. Амилазная активность слюны резко возрастает при воспалении околоушной слюнной железы.

Рассчитать активность, сделать вывод.

Работа 24. Количественное определение активности амилазы в сыворотке крови

Цель работы: освоить простой метод определения сывороточной амилазы, знать нормальные величины активности амилазы сыворотки крови и диагностическое значение отклонений.

Принцип метода состоит в определении промежуточных продуктов гидролиза крахмала, появляющихся в реакционной смеси под действием амилазы крови на крахмал.

Порядок выполнения работы

В пробирку внести 2 капли сыворотки крови и прогреть (в руке) в течение 1-2 мин. Добавить 5 капель 0,1% раствора крахмала и поместить в термостат на 15 мин. По истечении срока инкубации тщательно встряхнуть пробирки и добавить 1 каплю 0,5 н. раствора йода. Развивается окраска. Количество глюкозы, соответствующее количеству расщепленного крахмала, найти по табл. 16.

Таблица 16

Окраска	Глюкоза в мг	Выводы
Голубая	20	
Голубовато-зеленая	25-35	
Цвет желчи	35-40	
Желтая	40-60	
Оранжево-красная	70	

В норме активность амилазы крови соответствует 25-40 мг высвободившейся глюкозы.

Диагностическое значение: гиперамилаземия чаще всего наблюдается при остром панкреатите, когда активность фермента в крови и моче возрастает в 10-30 раз.

При хроническом панкреатите, раке поджелудочной железы активность фермента возрастает, но не достигает высоких цифр. При перитонитах повышение активности обусловлено развитием образующих амилазу бактерий.

Гипоамилаземия наблюдается при поражениях печени, обширных ожогах кожи, сахарном диабете.

Работа 25. Количественное определение активности трипсина в соке поджелудочной железы

Цель работы: освоить метод количественного определения фермента, знать клинико-диагностическое значение теста.

Метод основан на способности трипсина гидролизовать синтетический субстрат бензоиларгинин-пара-нитроанилид с образованием окрашенного продукта – пара-нитроанилина. Интенсивность развивающегося окрашивания пропорциональна концентрации выделившегося продукта.

Порядок выполнения работы

Дуоденальное содержимое разбавить в 10 раз, для чего к 1 мл дуоденального содержимого добавить 9 мл 0,14 н. раствора хлорида натрия.

В опытную пробирку отмерить 0,25 мл разведенного дуоденального содержимого (5 капель), добавить 2 мл синтетического субстрата (БАПНА) с концентрацией 20 мг% и инкубировать в термостате в

течение 30 минут при температуре 38°C. Затем добавить 0,5 мл 0,5н. раствора соляной кислоты (подавить реакцию). Интенсивность окраски определить на ФЭК-М в кювете толщиной 5 мм при синем светофильтре (№3) против дистиллированной воды по правому барабану.

Параллельно опытной ставится контрольная проба: 5 капель разбавленного дуоденального содержимого + 0,5 мл 0,5 н. соляной кислоты и 2 мл раствора субстрата (строго соблюдать порядок добавления реактивов).

Расчет активности проводится по формуле:

$$X = \frac{E_{\text{оп}} - E_{\text{контр}}}{1} \cdot 166,7 \text{ милли ед}$$

Оформить в виде протокола.

Клиническое значение: в норме активность трипсина колеблется в пределах 100-150 миллиединиц. При поражении поджелудочной железы активность фермента падает, в тяжелых случаях хронического панкреатита трипсин может полностью отсутствовать.

Работа 26. Количественное определение активности химотрипсина

Цель работы: освоить методику определения кишечной эндопептидазы химотрипсина в кишечном содержимом.

Метод основан на способности химотрипсина створаживать молочноацетатную смесь (МАС) при pH 5,0 и температуре 37°C.

Порядок выполнения работы

В пробирку внести 10 капель разбавленного (в 20-100 раз) кишечного сока, добавить 5 мл МАС и по секундомеру засечь время. Следить за появлением хлопьев казеина на стенке пробирки. Отметить время появления первых хлопьев.

Расчет активности произвести по формуле:

$$A = \frac{600 \cdot V}{X \cdot a}, \text{ где}$$

V – разбавление сока;

X – время сворачивания;

a – объем пробы в мл (5).

10 ед. соответствует 1 мг.

Оформить в виде протокола.

В норме активность фермента составляет 0,8-1,2 мг/мл. **Диагностическое значение:** активность фермента изменяется при поражении функции поджелудочной железы (чаще снижается).

Работа 27. Определение активности альдолазы крови

Цель работы: освоить методику количественного определения альдолазы крови. Научиться применять этот тест для диагностики заболеваний печени.

Метод основан на способности расщепления альдолазой крови фруктозо-1,6-дифосфата, продукты гидролиза которого (триозофосфаты) образуют с 2,4-динитрофенилгидразином гидразон, имеющий в щелочной среде слабофиолетовое окрашивание. По интенсивности развивающейся окраски судят об активности фермента.

Порядок выполнения работы

1. В центрифужную пробирку внести 3 капли сыворотки крови и добавить 5 капель смеси реактивов № 1 (с фруктозодифосфатом).
2. Перемешать и инкубировать в термостате 60 минут при 38°C (опыт).
3. В другой центрифужной пробирке приготовить таким же способом контроль, заменив смесь реактивов № 1 смесью № 2 (без фруктозодифосфата). Поставить в термостат на 60 минут.
4. После инкубации добавить в опытную пробирку и контрольную по 8 капель 10% раствора трихлоруксусной кислоты, затем в контрольную 1 каплю фруктозодифосфата. Встряхнуть и центрифугировать 10 минут при 2000 об/мин.
5. Слить центрифугат из опытной и контрольной в сухие пробирки и добавить по 16 капель 3% раствора гидроксида натрия, а через 10 минут – по 15 капель раствора 2,4-динитрофенилгидразина.
6. Поместить обе пробирки в термостат на 10 минут при 38°C. Добавить по 4 мл 3% раствора едкого натра. Фотоколориметрировать опытную и контрольную пробирки на ФЭК в кювете толщиной 5 мм против дистиллированной воды при зеленом светофильтре.
7. Активность альдолазы крови выражают в условных единицах экстинции (цифру, полученную в контроле, вычесть из опыта).

$$A = (E_{\text{оп}} - E_{\text{к}}) \cdot 100, \text{ где}$$

$E_{\text{оп}}$ – экстинция опытной пробирки;

$E_{\text{к}}$ – экстинция контрольной.

Оформить в виде протокола.

Норма активности фермента альдолазы в сыворотке крови человека составляет 1-8 ед.

Диагностическое значение: при острых инфекционных и токсических поражениях печени, инфаркте миокарда, мышечной дистрофии активность альдолазы крови резко возрастает. Резкая гиперальдолаземия имеет место при отравлениях четыреххлористым углеродом и др. токсическими веществами, при болезни Боткина (до 100 ед.).

Работа 28. Количественное определение холинэстеразы в сыворотке крови

Цель работы: освоить методику количественного определения холинэстеразы, знать клинико-диагностическое значение теста.

Метод основан на определении сдвига рН среды реакционной смеси, обусловленного высвобождением уксусной кислоты при расщеплении ацетилхолина холинэстеразой крови.

Порядок выполнения работы

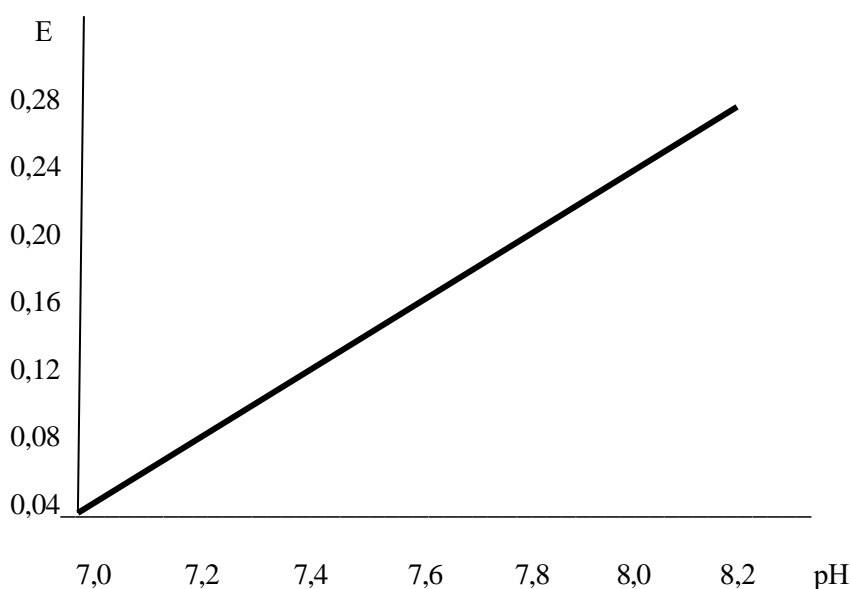
В две пробирки внести по 1 мл вероналового буфера рН 8,4 и по 2 капли сыворотки крови. В одну (опытную) добавить 10 капель раствора ацетилхолина, в другую (контрольную) – 10 капель дистиллированной воды.

Обе пробирки поставить в термостат на 30 минут при 37°C. После инкубации в обе пробирки внести по 3,5 мл дистиллированной воды и по капле индикатора фенолового красного.

Интенсивность развивающегося окрашивания проколориметрировать на ФЭК при зеленом светофильтре в кювете на 10 мм, против дистиллированной воды.

Измерив экстинцию опытной и контрольной проб, по стандартной кривой определить рН растворов и вычислить изменения рН (ΔpH) в ходе инкубации. Эта величина характеризует активность фермента.

Стандартная кривая



Оформить в виде протокола. Сделать вывод.

В норме ΔpH равно $0,76 \pm 0,23$ на 0,1 мл сыворотки крови.

Клиническое значение: поскольку холинэстераза крови синтезируется печенью, все поражения печени (гепатиты, злокачественные образования, циррозы) сопровождаются гипохолинэстеразией. Чем тяжелее и распространеннее патологический процесс, тем ниже активность холинэстеразы. Гиперхолинэстеразия имеет место при нефрозах.

ГОРМОНЫ

Работа 29. Качественное открытие инсулина **Цель работы:** качественными реакциями доказать белковую природу инсулина.

Порядок выполнения работы

Работа 29.1. Биуретовая реакция

К 10 каплям раствора инсулина добавить 1 каплю 1% раствора сульфата меди и 5 капель 10% раствора гидроксида натрия. Образуется комплексное соединение с пептидной группировкой. Какое окрашивание характерно для белков?

Работа 29.2. Реакция Фоля

К 5 каплям раствора инсулина добавить 5 капель реактива Фоля и прокипятить. Пробирку поставить на 4-5 минут. Что наблюдается?

Работа 29.3. Реакция Миллона

К 5 каплям раствора инсулина добавить 3 капли реактива Миллона. Что наблюдается? Данные занести в табл 17.

Работа 30. Обнаружение йода в тироксине

Цель работы: доказать, что тироксин является йодосодержащим гормоном.

Метод основан на способности йода, высвободившегося при гидролизе тироксина, давать с крахмалом синее окрашивание.

Порядок выполнения работы

В работе используется гидролизат, полученный путем кипячения таблеток тиреоидина, растертых в порошок, в щелочной среде.

К 10 каплям гидролизата добавить по каплям 10% серную кислоту до

появления кислой среды по реакции на лакмус (лакмусную бумажку поместить в пробирку). Добавить 3 капли 1% раствора крахмала и 5 капель 2% раствора йодада калия (KIO_3).

Что наблюдается? Данные занести в табл. 17.

Работа 31. Качественное открытие адреналина

Цель работы: научиться качественно обнаруживать присутствие адреналина.

Принцип состоит в способности адреналина давать с хлористым железом соединение типа фенолятов за счет пирокатехинового кольца, диазореакцию с образованием азокрасителя.

Порядок выполнения работы

Реакция с хлоридом железа. В пробирку внести 3 капли раствора адреналина и добавить 1 каплю 1% хлорида железа (III). Что наблюдается? Добавить 1 каплю 10% гидроксида натрия. Как изменился цвет?

Диазореакция. В пробирку внести 2 капли адреналина, добавить 2 капли 10% KIO_3 и 2 капли 10% уксусной кислоты. Что наблюдается? Данные занести в табл 17.

Работа 32. Обнаружение 17-кетостероидов в моче

Цель работы: научиться обнаруживать в моче присутствие 17-кетостероидов.

Метод основан на способности 17-кетостероидов реагировать в щелочной среде с м-динитробензолом с образованием продуктов конденсации розово-фиолетового цвета.

Порядок выполнения работы

В пробирку внести 10 капель мочи и 10 капель 2% спиртового раствора м-динитробензола (м-динитробензол добавлять медленно, по стенке пробирки). Пробирку не встряхивать и так же медленно по стенке добавить 3 капли 30% спиртового раствора гидроксида натрия. В какой цвет окрашивается верхний слой жидкости? Данные занести в табл 17.

Таблица 17

Открываемый гормон	Химическая природа	Качественная реакция	Принцип метода	Характер развивающегося окрашивания

Сделать вывод

РАЗДЕЛ III

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН.

ОБМЕН И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ

Цель изучения раздела: изучить основные этапы энергетического обмена, пути трансформации энергии в живой клетке в норме и при патологиях. Изучить основные пути катаболизма и анаболизма простых и сложных углеводов, уметь применять сведения о составе, метаболизме и функциях углеводов, механизмах регуляции их обмена для анализа симптомов заболеваний, возникающих при нарушении обмена углеводов.

Основные вопросы раздела

1. Макроэргические соединения и их значение для живой клетки.
2. Окислительно-восстановительные процессы и их роль.
3. Общие пути катаболизма как основной источник энергии в живой клетке. Взаимосвязь обмена веществ и энергии.
4. Регуляция энергетического обмена.
5. Основные углеводы тканей человека. Биологические функции углеводов.
6. Катаболизм глюкозы в живой клетке.
7. Биосинтез глюкозы.
8. Обмен гликогена.
9. Гормональная регуляция обмена углеводов. Нарушения обмена углеводов.

Обмен веществ – это способность организма принимать, перерабатывать и усваивать пищу на клеточном уровне. В ходе обмена веществ химические компоненты пищи переходят в химические структуры клетки и энергию, необходимую организму для выполнения различных функций.

Метаболизм – это совокупность химических и физических процессов, происходящих в клетке и обеспечивающих жизнедеятельность организма во взаимодействии с внешней средой. По направленности в метаболизме различают анаболизм и катаболизм.

Катаболизм – совокупность химических ферментативных процессов распада сложных веществ до относительно простых энергостабильных продуктов. Основными конечными продуктами катаболизма являются

диоксид углерода, вода, аммиак и некоторые другие вещества. Выделяют три стадии катаболизма по Кребсу:

1. гидролитическое расщепление полимерных соединений (белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот) до мономеров (аминокислот, моносахаров, глицерина, жирных кислот, пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований);
2. образование ключевых продуктов метаболизма в ходе дальнейшей дезинтеграции (ацетил-КоА, пировиноградной кислоты, α -кето-глутаровой кислоты, оксалоацетата и фумаровой кислоты);
3. заключительная стадия, в ходе которой образуется вода, диоксид углерода и выделяется энергия, основная масса которой аккумулируется в полезной форме.

В ходе реакций катаболизма пищевые вещества превращаются в субстраты окисления. Катаболизм – *экзэргонический*, идущий с выделением энергии, процесс.

Анаболизм – совокупность химических процессов, направленных на образование и обновление клеток и тканей. Это поэтапный ферментативный синтез сложных веществ из относительно простых, процесс, идущий с затратой энергии, *эндэргонический*.

Значение метаболизма:

1. снабдить клетку всеми видами энергии;
2. снабдить клетку строительными блоками;
3. обеспечить образование и обновление клеточных структур.
4. осуществить распад и синтез функционально активных молекул.

Метаболизм – это совокупность химических превращений вещества внутри клетки от момента его поступления до образования конечных продуктов, что обеспечивает рост, самообновление организма, выполнение им многочисленных функций.

Совокупность различных химических реакций, постоянно протекающих в клетке, формирует метаболические пути – последовательные превращения одних соединений в другие. Структура метаболических путей в клетке крайне разнообразна. Метаболические пути бывают линейные, когда субстрат в ходе ферментативных реакций превращается в конечный продукт, и разветвленные, если из одного субстрата образуется несколько продуктов в ходе различных по направлениям реакций в зависимости от потребностей клетки. Встречаются циклические метаболические пути (цикл трикарбоновых кислот Кребса) и спиральные (окисление жирных кислот).

Индивидуальность метаболизма каждого организма определяется набором ферментов, синтез которых закодирован в геноме. Метаболические пути в клетке согласованы между собой по месту, времени, интенсивности и обеспечиваются сложными и многообразными механизмами регуляции.

Основными звеньями *регуляции метаболизма* являются:

1. количество фермента, которое зависит от соотношения скорости его биосинтеза и распада;
2. активность ферментов метаболизма, которая обеспечивается регуляцией компонентами клетки, аллостерической регуляцией, химической модификацией, частичным протеолизом;
3. компартментализация ферментов (строгая локализация определенных ферментов в различных клеточных органеллах). Субклеточная локализация ферментов способствует упорядоченности биохимических процессов, увеличивает скорость метаболизма благодаря обеспечению доступности молекул субстрата и фермента;
4. состояние депо энергии.

Макроэргические соединения – это соединения, имеющие макроэргическую связь. **Макроэргическая связь** является непрочной, богатой энергией химической связью, при расщеплении которой:

- а) выделяется не менее 5 ккал/моль энергии,
- б) энергия этой связи превращается в полезную работу (энергию синтеза химических соединений, транспорта веществ через мембраны против градиента концентрации, мышечное сокращение и др.), минуя стадию тепла.

Есть два типа макроэргических соединений: производные фосфорной кислоты (карбоксилфосфатные, аминокислотные, енолфосфатные и пирогликолевые соединения) и тиоэфирные. Универсальной «энергетической валютой клетки» является АТФ. Макроэргические соединения устанавливают взаимосвязь между анаболизмом и катаболизмом.

Главный путь высвобождения энергии в живой клетке – реакции аэробного окисления пищевых веществ (окисление водорода субстрата кислородом воздуха до воды). Окисление бывает фосфорилирующим, при котором часть высвобождающейся энергии накапливается в полезной для организма форме – форме химических макроэргических соединений, и свободным, при котором энергия рассеивается в форме тепла (бесполезная энергия). Основное количество полезной энергии высвобождается на заключительном этапе катаболизма в ходе тканевого дыхания.

Тканевое дыхание – завершающий этап биологического окисления, при этом более 90% поглощаемого кислорода восстанавливается до воды за счет присоединения 4-х электронов и 4-х протонов: $O_2 + 4H^+ + 4e^- = 2H_2O$. Процесс катализируется ферментами дыхательной цепи.

Дыхательная цепь – система последовательно пространственно расположенных на внутренней мембране митохондрий дыхательных ферментов, обеспечивающих транспорт протонов и электронов от окисляемого субстрата на кислород. Выделяют три группы дыхательных ферментов: НАД-зависимые дегидрогеназы – первичные акцепторы протонов и электронов; ФАД-зависимые дегидрогеназы (вторичные акцепторы) и цитохромы, обеспечивающие транспорт электронов. Связующим звеном между дегидрогеназами и трансэлектроназами является липофильная молекула убихинона (КоQ). Источником протонов и электронов для дыхательной цепи служит цикл трикарбоновых кислот Кребса, которым завершаются общие пути катаболизма пищевых веществ.

Тканевое дыхание является высоко эргоническим процессом, большая часть выделяющейся при этом энергии используется для создания протонного потенциала ($\Delta\mu H^+$ -потенциал), который затем, в ходе окислительного (сопряженного) фосфорилирования с участием H^+ -АТФ-синтетазы митохондриальной мембраны, идет на синтез АТФ. В дыхательной цепи три этапа сопряжения окисления и фосфорилирования, что приводит к синтезу 3 молекул АТФ при передаче в дыхательную цепь одной пары протонов и электронов. **Коэффициент окислительного фосфорилирования P/O** – это отношение количества неорганического фосфата, используемого на фосфорилирование АДФ с образованием АТФ, к количеству атомов кислорода, поглощенного в ходе тканевого дыхания. Помимо синтеза полезной энергии тканевое дыхание выполняет и терморегуляторную функцию, при угрозе падения температуры тела процессы окисления и фосфорилирования могут разобщаться, и энергия окисления расходуется на выработку тепла.

Разобщение – это нарушение избирательной проницаемости внутренней мембраны митохондрий для протонов водорода. При разобщении они распределяются по градиенту концентрации, протонный потенциал не создается. Это приводит к гипозэнергетическому состоянию и, в конечном итоге, к гибели клетки.

Веществами, широко распространенными в природе, являются **углеводы**, поступающие в организм человека в составе животной и растительной пищи в форме полимеров (крахмал, гликоген), дисахаридов

(лактоза, сахароза) и моносахаридов (глюкоза, фруктоза, пентозы). Являясь по структуре альдегидо- или кетоспиртами, они обладают восстанавливающими свойствами и выполняют целый ряд жизненно важных функций.

1. Углеводы – основной источник энергии в организме человека. 60% энергетических затрат взрослого человека и 40% – ребенка покрываются за счет аэробного и анаэробного окисления углеводов.

2. Углеводы – резервная форма энергии. Полисахарид гликоген за счет высокополимерной, разветвленной структуры молекулы способен концентрировать значительные количества энергии в печени и мышцах, не обладая при этом осмотическим эффектом.

3. Углеводы выполняют структурную роль, т. к. глюкозаминогликаны являются структурными компонентами соединительной ткани, обеспечивая ее прочность, упругость и нормальную проницаемость.

4. Углеводы выполняют защитную функцию. Гликопротеины входят в состав муцинов и мукоидов, являются факторами групповой принадлежности крови, участвуют в поддержании иммунитета, входят в состав клеточных рецепторов.

5. Углеводы выполняют регуляторные функции, поскольку входят в состав таких соединений как нуклеотидные коферменты, нуклеиновые кислоты, гормоны.

Основным углеводом, участвующим в метаболизме, является **глюкоза**.

Центральная роль молекулы глюкозы в углеводном обмене обусловлена:

1. Высокой растворимостью глюкозы.
2. Наличием реакционно-способной карбонильной группы в молекуле.
3. Оптимальной стабильностью пиранозного кольца.

Источники глюкозы для организма:

- животная и растительная пища;
- собственные резервные полисахариды (гликоген);
- другие моносахара (взаимопревращения);
- гликонеогенез (синтез глюкозы из неуглеводов).

Пути расходования глюкозы:

- анаэробное и аэробное окисление в тканях – 60-65%;
- превращение в липиды – 30%;
- синтез гликогена – 3%;
- превращения в другие моносахара – 5-7%.

Катаболизм глюкозы:

- дихотомический распад – анаэробный гликолиз и **аэробное** окисление;
- апотомическое окисление – пентозофосфатный путь.

Постоянный уровень глюкозы в крови – важное условие нормального течения процессов жизнедеятельности. В норме содержание глюкозы в крови составляет 3,3-5,5 ммоль/л. Падение ниже 3,3 ммоль/л – гипогликемия, увеличение содержания глюкозы в крови свыше 5,5 ммоль/л – гипергликемия. Как гипо-, так и гипергликемия сопровождаются метаболическими нарушениями в тканях, что приводит к различным патологическим состояниям. Если концентрация глюкозы в крови становится выше 8,0-10,0 ммоль/л, глюкоза появляется в моче (глюкозурия). Эту величину называют порогом почечной проницаемости для глюкозы.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Работа 33. Определение глюкозы в крови

глюкозооксидазным (ферментативным) методом

Цель работы: освоить унифицированный ферментативный метод определения глюкозы крови. Знать нормальное содержание глюкозы в крови, причины возможных отклонений.

Принцип метода: глюкоза крови способна окисляться кислородом воздуха под влиянием глюкозооксидазы с образованием перекиси водорода и глюконолактона. В ходе реакции образуется перекись водорода, которая дает индофеноловую реакцию аминокантипирина с хромогеном под действием пероксидазы. Количество образовавшегося красителя определяют электрофотокolorиметрически, оно пропорционально содержанию глюкозы в крови.

Порядок выполнения работы

В центрифужную пробирку внести 10 капель осадителя белков и добавить микропипеткой 0,1 мл крови (точно!). Встряхнуть и отцентрифугировать в течение 5 минут. Центрифугат слить в чистую пробирку. Отмерить 0,1 мл центрифугата, добавить 3 мл рабочего раствора реактивов (смесь ферментов, хромогена, антипирина) и поставить на 30 мин. в термостат при 37° для проведения окислительно-восстановительной реакции. Через 30 мин. фотометрировать при зеленом светофильтре и толщине кюветы 1 см против дистиллированной воды.

Параллельно опытной ставится проба с эталонным раствором глюкозы. К 0,1 мл эталонного раствора, содержащего 10 ммоль глюкозы в 1 литре, добавить 0,5 мл осадителя, отсюда взять 0,1 мл реакционной смеси, добавить 3 мл рабочего раствора. Дальнейшее определение ведется так же, как в опытной пробе.

Расчет результатов:

$$\text{глюкоза, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{эт}}} \cdot 10, \text{ где}$$

$E_{\text{оп}}$ – экситинкция опытной пробы;

$E_{\text{эт}}$ – экстинция эталонного раствора глюкозы;

10 – концентрация глюкозы в эталонном растворе.

Оформить в виде протокола. Сделать вывод.

В норме в цельной крови содержится 3,3-5,5 ммоль/л глюкозы.

Диагностическое значение имеет как сниженное, так и повышенное содержание глюкозы крови. Определение проводится натощак.

Работа 34. Определение глюкозы крови по цветной реакции с орто-толуидином

Цель работы: освоить унифицированный колориметрический метод количественного определения глюкозы крови и отклонения метаболических превращений ее в тканях.

Метод основан на способности глюкозы при нагревании с ортотолуидином в растворе уксусной кислоты давать сине-зеленое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна содержанию глюкозы в крови. Метод колориметрический.

Порядок выполнения работы

В центрифужную пробирку отмерить микропипеткой (точно!) 0,1 мл крови и добавить 10 капель трихлоруксусной кислоты (ТХУК). Содержимое пробирки перемешать и отцентрифугировать.

Надосадочную жидкость слить в чистую пробирку. В другую пробирку микропипеткой перенести 0,2 мл центрифугата, добавить 2 мл орто-толуидинового реактива, закрыть пробирку крышкой из фольги и поместить в кипящую водяную баню (под вытяжным шкафом) на 20 минут. Пробирки охладить под струей воды. Фотометрировать против раствора сравнения (орто-толуидиновый реактив) при рабочей длине кюветы 0,5 см и красном светофильтре.

Параллельно опытной пробирке ставится эталонная проба:

0,1 мл эталонного раствора глюкозы, содержащего 10 ммоль/л, 10 капель трихлоруксусной кислоты и 2 мл орто-толуидинового реактива. Нагреть в водяной бане 20 минут, охладить. Профотометрировать. Содержание глюкозы рассчитать:

$$X = \frac{A}{B} \cdot 10, \text{ где}$$

A – оптическая плотность пробы;

B – оптическая плотность эталона;

10 – содержание глюкозы в эталонном растворе.

Оформить в виде протокола. Сделать вывод.

Работа 35. Определение толерантности к глюкозе (метод сахарной нагрузки, или глюкозотолерантный тест)

Цель работы: научиться проводить углубленное исследование состояния углеводного обмена методом нагрузки сахарозой. Изучить типы сахарных кривых в норме и при патологии. Уметь по характеру сахарной кривой распознать тип нарушения обмена углеводов.

Гликемические кривые после нагрузки глюкозой дают более ценные сведения о состоянии углеводного обмена, чем однократное определение уровня сахара натощак. Наиболее распространена проба с однократной нагрузкой.

У обследуемого натощак определяют исходный уровень сахара в крови (по описанию в методике), затем дают 100 г сахара (50 г глюкозы) в стакане теплой воды. Через 30, 60, 90, 120, 150 и 180 минут повторно определяют уровень сахара в крови. На основании полученных данных строится кривая сахарной нагрузки, где на оси абсцисс откладывается время забора пробы, а на оси ординат — содержание глюкозы в ммоль/л и делается заключение.

Характеристика сахарных кривых:

1. Нормальная сахарная кривая.

- а) исходный уровень в норме;
- б) начиная с 30 минуты после нагрузки уровень сахара растет и достигает максимума к исходу 1 часа;
- в) начиная с 90 минуты отмечается падение уровня сахара в крови, к исходу 2 часа имеет место гипогликемическая фаза;
- г) к концу 3-го часа опыта уровень сахара достигает исходной величины;
- д) отдельные порции мочи сахара не содержат.

2. Гипергликемическая кривая.

- а) исходный уровень выше нормы или нормальный;
- б) начиная с 30 минуты сахар крови резко возрастает и достигает максимума на 2-3 часа;
- в) гипогликемическая фаза отсутствует;
- г) к концу 3-го часа уровень сахара всегда выше исходного уровня;
- д) отдельные порции мочи содержат сахар (глюкозурия).

3. Гипогликемическая сахарная кривая.

- а) исходный уровень сахара в крови ниже нормы;
- б) гипергликемическая фаза выражена слабо;
- в) резко выражена гипогликемическая фаза;

г) к концу 3-го часа сахар крови ниже исходного уровня.

Таким образом, для характеристики сахарных кривых имеет значение:

- 1) исходный уровень сахара в крови;
- 2) быстрота и высота его подъема;
- 3) характер и время возвращения к начальному уровню.

Для оценки гликемической кривой введен гипергликемический коэффициент Бодуэна:

$$K = \frac{B - A}{A} \cdot 100, \text{ где}$$

K – коэффициент,

A – уровень сахара в крови натощак,

B – максимальный уровень сахара в крови, после нагрузки.

Если этот коэффициент поднимается до 55-70% – это свидетельствует об избытке адреналина. Величины, превышающие 80% – показатель глубокого нарушения углеводного обмена.

Порядок выполнения работы

Студенты работают группами по 3—4 человека. У исследуемого натощак берут кровь из пальца (соблюдая все правила асептики, пользуясь стерильными иглами и индивидуальными микропипетками) и определяют исходный уровень сахара в крови (методикой, освоенной на предыдущем занятии). Затем исследуемый выпивает 100 г растворенного в воде сахара и строго замечает время. Через 30, 60 и 90 минут повторно определить уровень сахара в крови и полученные данные занести в таблицу. По данным гликемии построить сахарную кривую. Рассчитать коэффициент Бодуэна и сделать вывод о типе гликемической кривой. Можно построить кривую, определяя содержание глюкозы в опытных образцах крови.

Работа 36. Количественное определение сахара в моче по методу Альтгаузена

Цель работы: освоить колориметрический метод определения сахара в моче. Научиться рассчитывать дозу инсулина, исходя из потери больным сахара с мочой.

В основе метода лежит цветная реакция, образующаяся при нагревании раствора глюкозы с раствором едкой щелочи. В качестве стандартов используют растворы мочи с содержанием 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3% и 4% глюкозы после обработки их таким же образом, как и исследуемую мочу.

Порядок выполнения работы

В пробирку отмерить 4 мл мочи, добавить 20 капель гидроксида натрия и прокипятить в течение 1 минуты. Через 10 минут сопоставить цвет прокипяченной мочи с цветной шкалой. Определить процентное содержание сахара в моче.

Исходя из процентного содержания сахара в моче и суточного диуреза, рассчитать суточную потерю больным сахара.

Расчет дозы инсулина

Так, если в моче 3% сахара, а суточный диурез 4 л, больной теряет в сутки:

$$\begin{array}{ll} 100 \text{ мл мочи} & - 3 \text{ г сахара} \\ 4000 \text{ мл (сутки)} & - X \\ X = 120 \text{ г} \end{array}$$

Пример расчета дозировки инсулина: 1 единица инсулина способствует усвоению 3-5 г глюкозы (в среднем 4 г). Для усвоения 120 г нужно:

$$120 : 4 = 30 \text{ ед. инсулина}$$

С учетом того, что какое-то количество инсулина вырабатывается, для предотвращения гипогликемии больному вводится 80-85% рассчитанной дозы.

Работа 37. Определение сиаловых кислот в сыворотке крови по методу Гесса

Цель работы: освоить колориметрический метод определения сиаловых кислот. Уметь использовать тест для диагностики метаболических нарушений в тканях.

Нейраминовая кислота и ее ацилированные производные (сиаловые кислоты) – нормальные компоненты тканей и биологических жидкостей. Они присутствуют как в свободном виде (кровь, ликвор, слизистая оболочка желудка, щитовидная железа и др.), так и в составе олигосахаридных остатков гликопротеинов, где они занимают концевое положение и легко отщепляются под действием ферментов.

При инфекционных, аллергических и некротических процессах нарушается метаболизм, что приводит к деполимеризации гликопротеинов и сопровождается резким возрастанием содержания сиаловых кислот.

Метод основан на способности сиаловых кислот в присутствии концентрированных кислот при нагревании давать буровато-фиолетовую окраску, интенсивность которой пропорциональна содержанию сиаловых кислот.

Исследование идет в 3 этапа:

- 1) осаждение белков;
- 2) гидролиз безбелкового фильтрата с высвобождением сиаловых кислот из олигосахаридов;
- 3) колориметрия.

Порядок выполнения работы

В центрифужную пробирку внести 20 капель сыворотки крови, добавить 1 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты, встряхнуть. Для полноты осаждения белков и отщепления сиаловых кислот от гликопротеинов смесь поставить на 5 минут в кипящую баню. Охладить. Отцентрифугировать в течение 10 минут при 2,5 тыс. оборотов.

Надосадочную жидкость осторожно слить в чистую пробирку, Добавить (осторожно) 5 мл уксусно-сернокислотного реактива, закрыть пробирку ватной пробкой и поставить на 30 минут в кипящую баню для развития окраски.

После охлаждения смесь колориметрируют на фотоэлектроколориметре при желтом светофильтре в кювете с рабочей длиной 10 мм против контроля. Контролем служит уксусно-сернокислотный реактив.

Активность выражается в единицах экстинции, для этого показания ФЭКа умножают на 1000, или в мг%, для чего пользуются табл. 18.

Таблица 18

Содержание сиаловых кислот

экстин.	ед.	мг/л	экстин.	ед.	мг/л
0,01	10	50	0,11	110	531
0,02	20	100	0,12	120	562
0,03	30	150	0,13	130	593
0,04	40	200	0,14	140	624
0,05	50	250	0,15	150	655
0,06	60	300	0,16	160	686
0,07	70	350	0,17	170	717
0,08	80	400	0,18	180	748
0,09	90	450	0,19	190	779
0,10	100	500	0,20	200	810

Оформить в виде протокола. Сделать вывод.

В норме концентрация сиаловых кислот в сыворотке крови колеблется в пределах 620-730 мг/л (135-200 условных единиц).

Диагностическое значение имеет увеличение количества сиаловых кислот, оно бывает при опухолях головного мозга, инфаркте миокарда, туберкулезе, поражениях печени и других заболеваниях, протекающих с деструкцией соединительной ткани.

Снижение содержания сиаловых кислот характерно для дегенеративных процессов в центральной нервной системе, анемии, болезни Вильсона.

Работа 38. Определение общего количества гликопротеинов в сыворотке крови

Цель работы: освоить колориметрический метод определения гликопротеинов сыворотки крови, уметь устанавливать взаимосвязь между содержанием гликопротеинов и функциональным состоянием органов и тканей.

Гликопротеины – сложные белки, простетической группой которых являются олигосахара, связанные ковалентно с белком. В состав олигосахаридов входят гексозы, гексозамины, фруктоза, сиаловые кислоты. Основными представителями являются различные ферменты, гормоны, группоспецифические субстанции крови, муцины и т. д.

Метод основан на гидролитическом расщеплении гликопротеинов сыворотки крови при нагревании с концентрированной серной кислотой. Продукты гидролиза в присутствии триптофана дают сине-фиолетовое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству гликопротеинов.

Исследование идет в 3 этапа:

- 1) осаждение гликопротеинов;
- 2) гидролитическое расщепление олигосахаров;
- 3) колориметрическое определение продуктов гидролиза.

Порядок выполнения работы

В центрифужную пробирку внести 1 каплю сыворотки крови, добавить из бюретки 3 мл спирта и оставить на 5 минут при комнатной температуре для осаждения белков. Отцентрифугировать в течение 10 минут при 2,5 тыс. оборотов. Надосадочную жидкость слить в банку с притертой пробкой. Дальнейшую работу вести с осадком.

К осадку добавить 20 капель дистиллированной воды, тщательно встряхнуть, перелить в чистую обычную пробирку и внести 3 мл борно-серного реактива, смесь охладить под струей воды. Прибавить 1 мл раствора триптофана и очень осторожно перемешать. Поместить для гидролиза в кипящую баню на 20 минут, закрыть пробками. Охладить под струей водопроводной воды.

Оставить на 30 минут при комнатной температуре для развития окраски. Параллельно опыту ставится контроль: к 1 мл дистиллированной воды добавить 3 мл борно-серного реактива, 1 мл триптофана. Все остальные этапы те же, что и с опытной пробиркой.

Фотометрия: оптическую плотность измерить на ФЭКе при зеленом светофильтре и рабочей длине кюветы 5 мм против контрольной пробы.

Пользуясь формулой, определить содержание гексоз (маннозы) в пробе. Ответ выражается в мг% или г/л маннозы.

$$X = E \cdot 800 \text{ мг\%,}$$

E – показатель экстинции,

800 – коэффициент для пересчета количества гликопротеинов в мг маннозы, найденный эмпирически.

Оформить в виде протокола. Сделать вывод.

В норме содержание гликопротеинов составляет 120-160 мг% или 1,2-1,6 г/л.

Диагностическое значение имеет повышение уровня гликопротеинов. Оно встречается при туберкулезе, плевритах, пневмонии, диабете, инфаркте, злокачественных новообразованиях и др. Исследования в динамике позволяют судить о течении болезни и терапевтическом эффекте.

Работа 39. Открытие глюкозаминогликанов

Цель работы: освоить метод качественного открытия глюкозаминогликанов в моче.

Глюкозаминогликаны – гетерополисахариды, выполняющие структурную и защитную функции и имеющие сложное строение. Принцип качественного открытия основан на способности глюкозаминогликанов давать с толуидиновым синим пурпурное окрашивание.

Порядок выполнения работы

На полоску фильтрованной бумаги нанести 1-2 капли мочи и подсушить на воздухе. Опустить бумагу в раствор толуидинового синего на 2-3 секунды, дать стечь красителю. Избыток красителя отмыть 10% раствором уксусной кислоты. Характерное пурпурное окрашивание свидетельствует о присутствии в моче глюкозаминогликанов. Можно проводить определение в пробирке. В норме глюкозаминогликаны присутствуют в моче в небольших количествах.

Работа 40. **Качественное открытие ферментов ЦТК в митохондриях**

Цель работы: уметь обнаруживать митохондриальные дегидрогеназы ЦТК по производимому ими действию.

А. Качественное открытие сукцинатдегидрогеназы.

Дегидрогеназа янтарной кислоты окисляет янтарную кислоту в фумаровую с участием ФАД, входящего в состав сукцинатдегидрогеназы. В условиях опыта в качестве акцептора водорода выступает 2,6-дихлорфенолиндофенол, при присоединении водорода он переходит в восстановленную бесцветную форму.

Порядок выполнения работы

В 2 пробирки (опытную и контрольную) отмерить по 3 мл фосфатного буфера рН 7,4.

В опытную пробирку внести 10 капель янтарной кислоты (донор водорода), в контрольную – 10 капель дистиллированной воды.

В обе пробирки добавить по 20 капель 2,6-дихлорфенолиндофенола (акцептора водорода) и по 20 капель смеси митохондрий. Поставить обе пробирки на 20 мин. в термостат. Что наблюдаете? Объяснить. Сделать вывод.

Б. Качественное открытие малатдегидрогеназы

Принцип определения малатдегидрогеназы состоит в способности фермента катализировать окисление яблочной кислоты в ЩУК. В условиях опыта акцептором водорода является 2,6-дихлорфенолиндофенол, восстанавливающийся с образованием бесцветной формы.

Порядок выполнения работы

В 2 пробирки отмерить по 20 капель фосфатного буфера pH 7,4, добавить по 10 капель раствора яблочной кислоты (донора водорода) и по 10 капель 0,001 н. раствора дихлорфенолиндофенола (акцептора водорода).

В опытную пробирку добавить 10 капель суспензии митохондрий, в контрольную – 10 капель воды. Инкубировать 10 мин. при комнатной температуре.

Что наблюдается? Объяснить. Сделать выводы.

Работу оформить в виде протокола свободной формы.

Возрастные особенности течения обменных процессов у детей

1. Постепенное созревание биохимических систем, их динамичность. Онтогенез и клеточная дифференцировка не заканчиваются к моменту рождения, биохимические системы к моменту рождения не зрелы.
2. Высокая чувствительность к внешним воздействиям, легкая ранимость биохимических систем вследствие их незрелости.
3. Лабильность биохимических показателей биологических жидкостей, не специфичность, неадекватность степени метаболических расстройств.
4. Характерны для детей, особенно первого года жизни транзиторные (преходящие) состояния: физиологическая желтуха новорожденных, протеинурии, глюкозурии, кетонемии и кетоноурии.

Особенности биохимических показателей

1. Лабильность биохимических показателей, количественные сдвиги не адекватны силе сигнала.
2. Неспецифичность биохимических показателей: возможны качественные отклонения биохимических показателей, которые носят функциональный характер (глюкозурия, протеинурия).
3. Иные величины биохимических констант, каждая возрастная группа характеризуется своими численными величинами констант.

Транзиторные состояния периода новорожденности обусловлены несовершенством анатомических структур к моменту рождения ребенка, их незрелостью. Это функциональные, преходящие состояния, при которых структура не справляется с возложенными на нее функциями. Транзиторные состояния возникают при повышенной нагрузке на организм. Незрелость почечного фильтра, несовершенство систем регуляции приводят к тому, что почки в отсутствии патологии способны фильтровать в мочу белок, глюкозу, кетоновые тела. Транзиторные состояния нестабильны, они не требуют лечения. С возрастом по мере созревания биохимических систем и совершенствованием анатомических структур транзиторные состояния проходят.

Особенности углеводного обмена у детей

I. Особенности переваривания и всасывания углеводов

1. Потребность в углеводах на кг массы в целом у детей выше, чем у взрослых, поскольку выше затраты энергии как на пластические нужды, так и на выполнение функций. Однако по возрастным группам потребность в углеводах с возрастом увеличивается, так как с возрастом растет количество энергозатрат, покрываемых за счет окисления углеводов.

До 4 лет	–	10-12 г/кг массы тела
4-17 лет	–	12-15 г/кг
взрослый	–	5-7 г/кг

2. У новорожденных в кишечнике отсутствуют сахараза и мальтаза и высока активность лактазы. К 4-5 месяцам включается синтез мальтазы и сахаразы кишечной стенкой и уменьшается синтез лактазы. К году синтез мальтазы достигает величин взрослого, а лактаза становится адаптивным ферментом.

3. В желудке новорожденного и грудного ребенка рН не имеет резко кислых значений, т.к. ослаблен синтез соляной кислоты обкладочными клетками, желудочный сок не обладает бактерицидным действием, в желудке активны процессы брожения углеводов.

4. Кишечная стенка новорожденного и грудного ребенка проницаема для дисахаридов, возможно поступление их в кровь.

5. Процессы всасывания углеводов полнее, больший процент пищевых углеводов поступает в кровь.

6. Возможно поступление с молоком матери пищеварительных ферментов в пищеварительный канал ребенка, что улучшает и ускоряет переваривание пищевых веществ.

7. В желудке ребенка присутствует бифидус-фактор, обладающий бактерицидным действием.

II. Особенности обмена углеводов

1. У новорожденных и грудных детей преобладает анаэробный путь окисления глюкозы. Ферментные системы анаэробного гликолиза очень активны. Анаэробно окисляется:

Новорожденный	–	90% глюкозы
Грудной	–	69%
Взрослый	≈	30%

2. Основным источником глюкозы для плода являются материнская кровь и гликонеогенез. В анте- и неонатальном периодах преобладают процессы резервирования гликогена над его мобилизацией, особенно перед рождением.

3. К моменту рождения запасы гликогена в печени относительно выше, чем у взрослых. Они расходуются в первые часы после рождения. Затем эти запасы, как в печени, так и в мышцах ниже, чем у взрослых, накопление идет быстро, но очень интенсивно идет их расходование. Активны ферменты гликонеогенеза.

4. К моменту рождения практически отсутствует глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, низка активность ферментов ЦТК, аэробные процессы протекают слабо.

5. Часты алиментарные глюкозурии как результат слабости реабсорбции глюкозы и снижения порога почечной проницаемости для глюкозы.

6. Основным источником энергии во внутриутробном периоде являются углеводы, с первых часов постнатального периода – жиры.

Мальабсорбция – синдром, обусловленный расстройством переваривания и всасывания пищевых веществ в тонком кишечнике, сопровождающийся нарушением процессов метаболизма в тканях.

В основе мальабсорбции лежат генетически обусловленные или сформировавшиеся при стойком повреждении слизистой тонкой кишки дефекты ферментных систем.

Мальабсорбция бывает двух видов:

- 1) наследственная как результат генетического дефекта ферментов лактазы, мальтазы или сахаразы,
- 2) приобретенная – при нарушении функции тонкого кишечника.

При этом имеет место нарушение гидролиза лактозы, сахарозы или мальтозы (они не превращаются в мономеры) и недостаточная всасываемость продуктов их переваривания.

Нерасщепленные ферментами тонкой кишки дисахариды спускаются в толстый кишечник и подвергаются сбраживанию ферментами микрофлоры толстого кишечника. Клинически это проявляется чувством переполнения после приема пищи, содержащей дисахариды, вздутием живота, болями, жидким стулом. Недостаточное всасывание моносахаров приводит к гипознергетическому состоянию вследствие расстройства метаболизма.

Фруктоза и ее значение в обмене плода и новорожденного

1. Расщепление фруктозы в гликолитической цепи идет короче, чем глюкозы, требуется меньше ферментов, фруктоза расщепляется легче.
2. Фруктоза легче ассимилируется клеткой, поскольку переход ее через цитоплазматическую мембрану не требует инсулина.
3. Осмотический эффект фруктозы ниже, чем у глюкозы, ее накопление в клетке и крови не нарушает электролитный баланс.
4. Фруктоза уменьшает окисление белков и липидов, экономя их.
5. Все это обеспечивает фруктозе преимущества как энергетическому материалу и делает ее роль в обмене плода и новорожденного незаменимой.

К нарушениям обмена фруктозы относятся: ***эссенциальная фруктозурия и врожденная непереносимость фруктозы.***

Эссенциальная фруктозурия – доброкачественное нарушение обмена фруктозы. Это редкое бессимптомно текущее заболевание, при котором фруктоза накапливается в крови после приема ее с пищей, а затем выделяется с мочой. Причина – недостаточность фруктокиназы, которая превращает фруктозу во фруктозо-1-фосфат и включает фруктозу в метаболизм.

Врожденная непереносимость фруктозы – наследственное заболевание, вызываемое дефектом фермента фруктозо-1-фосфат-альдозазы. При этом накапливается фруктозо-1-монофосфорный эфир. Он обладает токсическим действием на клетки печени и почек, ингибирует ферменты гликогенолиза, развивается гипогликемия, поражение печени, желтуха, протеинурия.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Раздел I	Структура, свойства и функции белков.....	4
Работа 1.	Высаливание белков.....	7
Работа 2.	Осаждение белков солями тяжелых металлов.....	10
Работа 3.	Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами.....	10
Работа 4.	Осаждение белков органическими кислотами.....	11
Работа 5.	Кислотный гидролиз простого белка.....	13
Работа 6.	Хроматографическое разделение аминокислот.....	14
Работа 7.	Рефрактометрический метод определения концентрации белка.....	16
Работа 8.	Количественное определение концентрации веществ с помощью фотоэлектроколориметра.....	17
Работа 9.	Количественное определение концентрации веществ биуретовым методом.....	19
Работа 10.	Разделение и количественное определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге.....	20
Работа 11.	Количественное определение гемоглобина, растворенного в плазме.....	24
Работа 12.	Качественное исследование состава фосфопротеина.....	26
Работа 13.	Качественное исследование состава гликопротеина.....	26
Работа 14.	Качественное исследование состава нуклеопротеинов.....	27
Раздел II	Витамины, ферменты, гормональная регуляция процессов обмена веществ.....	29
	Витамины	
Работа 15.	Качественное открытие жирорастворимых витаминов.....	34
Работа 16.	Качественное открытие водорастворимых витаминов.....	35
Работа 17.	Количественное определение витамина С в биологических жидкостях и продуктах.....	39
	Ферменты	
Работа 18.	Качественное открытие ферментов.....	41
Работа 19.	Термолабильность ферментов.....	43
Работа 20.	Специфичность ферментов.....	45

Работа 21.	Влияние реакции среды на активность ферментов.....	46
Работа 22.	Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны.....	47
Работа 23.	Количественное определение активности амилазы слюны.....	47
Работа 24.	Количественное определение активности амилазы в сыворотке крови.....	49
Работа 25.	Количественное определение активности трипсина в соке поджелудочной железы.....	50
Работа 26.	Количественное определение активности химотрипсина.....	51
Работа 27.	Определение активности альдолазы крови.....	52
Работа 28.	Количественное определение холинэстеразы в сыворотке крови.....	54
Гормоны		
Работа 29.	Качественное открытие инсулина.....	55
Работа 30.	Обнаружение йода в тироксине.....	55
Работа 31.	Качественное открытие адреналина.....	56
Работа 32.	Обнаружение 17-кетостероидов в моче.....	56
Раздел III	Энергетический обмен Обмен и функции углеводов.....	58
Работа 33.	Определение глюкозы в крови глюкозо- оксидазным (ферментативным) методом.....	63
Работа 34.	Определение глюкозы крови по цветной реакции с орто-толуидином.....	65
Работа 35.	Определение толерантности к глюкозе (метод сахарной нагрузки, или глюкозотолерантный тест).....	66
Работа 36.	Количественное определение сахара в моче по методу Альтгаузена.....	68
Работа 37.	Определение сиаловых кислот в сыворотке крови по методу Гесса.....	69
Работа 38.	Определение общего количества гликопротеинов в сыворотке крови.....	71
Работа 39.	Открытие глюкозаминогликанов.....	73
Работа 40.	Качественное открытие ферментов ЦТК в митохондриях.....	74
Возрастные особенности течения обменных процессов у детей		76

Корочанская Светлана Петровна,
Сторожук Петр Григорьевич,
Быков Илья Михайлович

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

ЧАСТЬ 1

*Статика белков, витамины,
ферменты, гормоны, обмен углеводов*

Типография ГБОУ ВПО КубГМУ Минздравсоцразвития России
350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4
Тел/факс 268-36-84

Отпечатано в типографии методом цифровой печати

Подписано в печать 23.05.12

Тираж 700 экз.

