



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 2

*Обмен белков, обмен липидов,
биохимия крови, печени, мочи, слюны.*

*Основные константы
биологических жидкостей человека*

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

**КРАСНОДАР
2016**



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 1

*Обмен белков, обмен липидов,
биохимия крови, печени, мочи, слюны.
Основные константы
биологических жидкостей человека*

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

**КРАСНОДАР
2016**

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, 2016.

Раздел I

ОБМЕН И ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТ. БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКА. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Цель изучения раздела: Уметь применять знания об основных путях превращений аминокислот для характеристики функционального состояния органов и тканей, для распознавания причин метаболических нарушений.

Изучить основные пути дезинтеграции белка и роль в этом процессе пищеварительных соков.

Освоить методику анализа желудочного сока. Научиться определять в крови основные метаболиты обмена аминокислот.

Уметь использовать полученные данные с целью диагностики заболеваний.

Уметь применять знания основ молекулярной генетики для объяснения механизмов клеточной дифференцировки, онтогенеза, процессов адаптации для решения вопросов диагностики наследственных болезней.

Основные вопросы раздела:

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

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

Для обмена белков характерно:

- неспособность организма собирать углеродные скелеты ряда аминокислот (незаменимые аминокислоты), они должны поступать с пищей в составе полноценных белков;
- сохранение постоянного баланса аминокислот в тканях при значитель-

- ном колебании содержания их в пище;
- постоянное обновление белков, скорость которого определяется локализацией молекулы, функцией, строением, возрастом организма (динамическое состояние);
 - чрезвычайная разветвленность метаболических путей превращения аминокислот в тканях.

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

В переваривании белков участвует две группы протеолитических пищеварительных ферментов:

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

Для протеолитических ферментов характерно:

- выделяются железами пищеварительной системы в неактивном состоянии (в форме проферментов),
- имеют единый механизм активации – частичный протеолиз – отщепление одного или нескольких пептидов от молекулы с образованием активного фермента,
- наличие субстратной специфичности,
- независимость действия.

Конечными продуктами гидролитического расщепления белков являются свободные аминокислоты, подвергающиеся активному транспорту через мембрану энтероцита в кровь.

Катаболизм аминокислот – внутриклеточный процесс, в котором выделяют два варианта:

1. Общие пути катаболизма, в результате которых все аминокислоты могут первично терять α -аминогруппу (дезаминирование, трансаминирование) или α -карбоксыльную группу (декарбоксилирование).
2. Индивидуальные пути катаболизма, при которых имеют место первичные превращения аминокислоты по радикалу (трансметилирование, де- и транссульфирование, гидроксилирование и др.).

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

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

1. на обезвреживание аммиака расходуется α -кетоглутаровая кислота, это приводит к выключению ее из цикла трикарбоновых кислот, блокаде ЦТК и развитию гипохромицистического состояния,
2. повышенная концентрация аммиака в крови (гипераммониемия) приводит к нарушению кислотно-основного состояния, развивается алкалоз,
3. нарушается синтез медиаторов, нарушается проведение нервных импульсов, страдает нервная система,
4. изменяется концентрация в крови катионов натрия и калия, нарушается электролитный баланс.

Поскольку аммиак очень токсичен, его необходимо повсеместно обезвреживать с образованием транспортных форм (глутамата, глутамина, амидированных карбоксильных групп белков плазмы крови), которые затем направляются в печень или в почки, где осуществляется окончательное обезвреживание аммиака с образованием менее токсичных форм его выведения – мочевины, аммонийных солей.

При катаболизме сложных белков распад простетических групп приводит к образованию других азотсодержащих конечных продуктов (желчных пигментов, мочевой кислоты).

Высокая степень разветвленности метаболических путей превращения аминокислот вовлекает в процесс множество высокоспецифичных ферментных систем, генетические дефекты которых обуславливают появление большого количества наследственных нарушений аминокислотного обмена, проявляющихся тяжелыми наследственными болезнями.

Работа 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА В ОДНОЙ ПОРЦИИ (по Михаэлису)

Цель работы: научиться титровать желудочный сок, рассчитывать все виды кислотности, уметь делать заключение о функциональном состоянии желудка по анализу сока.

В желудочном соке в норме присутствует свободная соляная кислота, которая создает кислую среду в желудке, активирует пепсиноген и создает рН-оптимум для действия пепсина, денатурирует пищевые белки, регулирует работу привратника и обладает бактерицидным действием. Часть соляной кислоты связывается с белками и продуктами их гидролиза, это связанная HCl, со свободной она образует общую HCl.

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

Порядок выполнения работы:

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

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

Первый пункт – оттитрована свободная соляная кислота, второй пункт – нужен для расчета, третий пункт – оттитрована общая кислотность. Таким образом титруется свободная соляная кислота и общая кислотность, остальные виды находятся методом расчета. Например, на титрование 5 мл желудочного сока израсходовано щелочи:

- I пункт – 2,0 мл 0,1 н. NaOH
- II пункт – 2,5 мл 0,1 н. NaOH
- III пункт – 2,7 мл 0,1 н. NaOH

Кислотность рассчитывается в ммоль/л желудочного сока.

1. Свободная HCl

$$X = \frac{I_{п.} \cdot 1000 \cdot 0,1}{5} = \frac{2,0 \cdot 1000 \cdot 0,1}{5} = 40 \text{ ммоль/л,}$$

где X – искомая кислотность,

I_{п.} – мл щелочи на титрование, (также: II_{п.} и III_{п.} титрования)

0,1 – молярность NaOH,

1000 – пересчет на л,

5 – объем титруемой пробы

2. Общая кислотность

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

Эмпирически Михаэлисом установлено, что полусумма второго и третьего пунктов титрования соответствует общей соляной кислоте.

3. Общая HCl

$$\begin{aligned} \text{Общая HCl} &= \frac{II_{п.} + III_{п.}}{2} \cdot \frac{1000 \cdot 0,1}{5} \\ &= \frac{(2,5 + 2,7) \cdot 1000 \cdot 0,1}{2 \cdot 5} = 52 \text{ ммоль/л,} \end{aligned}$$

4. Связанная HCl – это разность между общей и свободной соляной кислотой:

$$X = 52 - 40 = 12 \text{ ммоль/л}$$

5. Прочие кислореагирующие продукты находятся по разности между общей кислотностью и общей соляной кислотой.

$$X = 54 - 52 = 2 \text{ ммоль/л}$$

Оттитровать 3 желудочных сока, данные занести в таблицу:

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

Рассчитать все виды кислотности и занести в таблицу:

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

Сделать заключение о характере секреции.

Свободную соляную кислоту принято рассчитывать и в г/%, при этом следует исходить из того, что 1 мл 0,1н. гидроксида натрия эквивалентен 1 мл 0,1н. соляной кислоты; 1 мл 0,1н. НСl содержит 0,00365 г.

Диагностическое значение:

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

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

Работа 2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕПСИНА В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ (ПО ПЯТНИЦКОМУ Н. П.)

Цель работы: научиться определять активность пепсина в различных образцах желудочного сока по молокосвертывающему действию с диагностической целью.

Пепсин, протеолитический фермент, способен гидролизировать белки при рН 1,5-2,5, а при рН 5,0 – створаживать казеиноген молока за счет превращения его в казеин (в основе превращения лежит также гидролиз пептидных связей).

За единицу активности фермента принимают такое его количество, которое створаживает 5 мл молочно-ацетатной смеси рН 5,0 (смесь равных объемов молока и 1н. ацетатного буфера рН 5,0) при 25°С за 60 секунд. 100 единиц Пятницкого соответствует 1 мг фермента. В норме желудочный сок содержит 20-40 ед/мл (0,2-0,4 мг/мл, или 0,2-0,4 г/л) пепсина.

Порядок выполнения работы:

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

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

$$X = \frac{60 \cdot 10}{t}, \text{ где}$$

60 сек. – стандартное время створаживания,

t – полученное время створаживания (в сек.),

10 – расчет на 1 мл желудочного сока.

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

Работа 3. ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

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

А. Открытие молочной кислоты. Оно основано на реакции Уфельмана (способности молочной кислоты давать желто-зеленое окрашивание с раствором фенола в присутствии хлорида железа (III)).

Порядок выполнения работы:

В пробирку внести 20 капель 1% раствора фенола, добавить 2 капли 1% раствора хлорида железа (III), раствор окрашивается в фиолетовый цвет фенолята железа $(C_6H_5O)_3 Fe$. Добавить по каплям желудочный сок, содержащий молочную кислоту. При наличии последней фиолетовая окраска переходит в желто-зеленую за счет образования лактата железа.

Молочная кислота, как правило, обнаруживается при ахлоргидрии, когда за счет микробов в желудке сбразиваются полисахаридные комплексы муцина.

В. Открытие крови бензидиновой пробой. Реакция основана на окислении бензидина атомарным кислородом, высвобождающимся из перекиси водорода под действием пероксидазы крови.

Порядок выполнения работы:

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

Развивается сине-зеленое окрашивание за счет появления парахинондиимида.

Данные оформить в виде протокола произвольной формы.

Возрастная характеристика процессов переваривания и всасывания белков

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

Новорожденный	– 2,2 г/кг массы тела
Грудной	– 2,9 г/кг
Дошкольник	– 2,0 г/кг
Школьник	– 1,5-2,0 г/кг
Взрослый	– 1,0-1,5 г/кг

2. У ребенка выше потребность в незаменимых, особенно остродефицитных, аминокислотах (МЕТ, ЛЕЙ, ТРИ).

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

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

5. Основное переваривание белков идет в тонкой кишке, но, чем моложе ребенок, тем слабей этот процесс. Активность протеиназ у ребенка низкая, с возрастом она растет.

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

7. Высокая степень всасываемости белков:

Новорожденный	– 84%
Грудной	– 78%
Дошкольник	– 73%
Взрослый	< 70%

Работа 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ

Цель работы: освоить метод количественного определения аминотрансфераз в сыворотке крови. Уметь объяснить значение данного диагностического теста.

Аминотрансферазы – ферменты, катализирующие межмолекулярный перенос аминокислоты с аминокислоты на кетокислоту. Наибольшее значение имеет определение активности 2-х ферментов: аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ). Эти ферменты обладают высокой каталитической активностью, широко распространены в различных органах и тканях: сердечная мышца, печень, почки, скелетная мускулатура, т.п.

А. С использованием стандартных реактивов

Принцип метода: основан на способности образующейся в результате реакции пировиноградной кислоты давать с 2,4-динитрофенилгидразином динитрофенилгидрозон пировиноградной кислоты коричнево-фиолетового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна количеству высвободившейся в ходе реакции пировиноградной кислоты.

Порядок выполнения работы:

В две пробирки налить по 10 капель субстратно-буферного раствора для определения АсАТ (при определении АсАТ) или субстратно-буферной смеси для определения АлАТ (при определении АлАТ). В опытную пробирку добавить 10 капель сыворотки крови и инкубировать обе пробирки в суховоздушном термостате при 37° в течение 30 минут. Внести в контрольную пробирку 10 капель сыворотки. В обе пробирки добавить по 10 капель 2,4-динитрофенилгидразина и оставить на 20 минут при комнатной температуре. Затем в обе пробирки добавить по 5 мл 0,4н. раствора NaOH. Перемешать и оставить на 10 минут для развития окраски.

Фотоколориметрировать в кювете толщиной 1 см опыт против контроля при зеленом светофильтре.

Расчет активности произвести по формуле:

$$X = E \gg 133 = \text{ед/мл},$$

где: X – активность фермента

E – экстинкция

133 – коэффициент пересчета

1 мкг ПВК = 0,015 ед. Е; отсюда 1 ед. Е = 133 мкг ПВК.

В сыворотке крови здоровых людей активность АсАТ равна 5-40 ед/мл (0,1-0,5 мкМ/мл), АлАТ 5-30 ед/мл (0,1-0,7 мкМ/мл) за 30 минут.

Б. Унифицированный метод

1. Определение активности аспаратаминотрансферазы (АсАТ)

Принцип метода: основан на определении скорости образования НАД за счет окисления НАДН+Н. В результате реакции уменьшается оптическая плотность раствора.

Химизм: α -кетоглутарат + аспарат \leftrightarrow глутамат + оксалоацетат.

оксалоацетат + НАДН+Н \leftrightarrow малат + НАД

Уменьшение концентрации НАДН+Н пропорционально активности АсАТ.

Порядок выполнения работы:

В чистую пробирку внести 20 капель рабочего раствора для определения АсАТ, добавить 2 капли (точно) сыворотки, крови и инкубировать 3 минуты при 37° С. Определить экстинкцию на ФЭК-М при толщине кюветы 3 мм против дистиллированной воды при зеленом светофильтре.

Расчет: активность АсАТ = $E/3 \times F$ мккат/л,
где E – показание прибора,
 F – коэффициент пересчета, равный 29,
 3 – пересчет на 1 минуту.

В норме активность АсАТ – 0,1-0,7 мккат/л. Активность можно рассчитывать в условных единицах, в этом случае коэффициент равен 1750. Норма – 5-40ед/л.

2. Определение активности аламинаминотрансферазы (АлАТ)

Принцип метода: основан на определении скорости образования НАД за счет окисления НАДН+Н. В результате реакции уменьшается оптическая плотность раствора.

Химизм: α -кетоглутарат + аланин \leftrightarrow пируват + глутамат
пируват + НАДН+Н \leftrightarrow лактат + НАД

Уменьшение концентрации НАДН+Н пропорционально активности АлАТ.

Порядок выполнения работы:

В чистую пробирку внести 20 капель рабочего раствора для определения АлАТ, добавить 2 капли (точно) сыворотки крови и инкубировать 3 минуты при 37° С. Определить экстинкцию на ФЭК-М при толщине кюветы 3 мм против дистиллированной воды при зеленом светофилтре.

Расчет: активность АлАТ = $E/3 \times F$ мккат/л,
где E – показание приборы,
 F – коэффициент пересчета, равный 29,
 3 – пересчет на 1 минуту.

В норме активность АлАТ = 0,1-0,7 мккат/л. Активность можно рассчитывать в условных единицах, в этом случае коэффициент равен 1750. Норма- 5-30 ед/л. Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Диагностическое значение: Определение активности АсАТ и АлАТ широко используется для диагностики болезней печени и заболеваний сердца. При болезни Боткина (еще в преджелтушный период) значительно возрастает активность АлАТ. Изменения активности, как правило, отражают тяжесть поражения печеночной паренхимы. Увеличивается активность АлАТ при обострении хронического гепатита, при токсическом поражении паренхимы печени.

Изменение активности аспаратаминотрансферазы характеризует поражение сердечной мышцы. При инфаркте миокарда активность повышается уже через 4-6 часов и держится высокой в течение 3-7 дней. (Это особенно важно при инфарктах, не диагностируемых на ЭКГ). Повышается активность АсАТ при гипертонических кризах.

Работа 5. ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО АМИННОГО АЗОТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

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

Принцип метода количественного определения основан на способности нингидрина взаимодействовать с продуктами деградации аминокислот и давать сложный комплекс сине-фиолетового цвета. Интенсивность развивающегося окрашивания пропорциональна количеству свободных аминокислот. Определение проводится в 3 этапа:

1. Осаждение белков, при этом сыворотка освобождается от α -аминного азота белковых молекул.
2. Реакция свободных аминокислот с нингидрином.
3. Электрофотокolorиметрия и расчет.

Порядок выполнения работы:

В центрифужную пробирку внести 10 капель сыворотки крови и добавить 10 капель 0,04 н. уксусной кислоты (сдвиг pH сыворотки к ИЭТ). Пробирку поместить в кипящую водяную баню на 5 минут для осаждения белков, охладить.

К содержимому пробирки добавить 1 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать и профильтровать в чистую пробирку с меткой на 5 мл через бумажный фильтр, смоченный несколькими каплями дистиллированной воды. Пробирку дважды промыть дистиллированной водой по 1 мл и промывные воды отфильтровать в ту же пробирку.

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

Пробирку охладить, добавить до метки дистиллированной воды и через 5 минут колориметрировать на ФЭКе против дистиллированной воды при зеленом светофильтре и рабочей длине кюветы 5 мм. По калибровочной таблице, построенной по стандартному раствору аланина, найти содержание свободных аминокислот в мкг в пробе и в мг/л.

В норме содержание свободных аминокислот по этой методике составляет 20-43 мг/л.

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

ЭКСТ.	МКГ	МГ/Л									
0,005	6,30	12,6	0,130	12,39	24,8	0,255	18,48	37,0	0,380	24,50	49,0
0,010	6,58	13,2	0,135	12,60	25,2	0,260	18,76	37,5	0,385	24,78	49,6
0,015	6,79	13,6	0,140	12,88	25,8	0,265	18,97	37,9	0,390	25,06	50,1
0,020	7,00	14,0	0,145	13,09	26,2	0,270	19,18	38,4	0,395	25,27	50,5
0,025	7,28	14,6	0,150	13,37	26,7	0,275	19,38	38,8	0,400	25,48	51,0
0,030	7,49	15,0	0,155	13,65	27,3	0,280	19,67	39,3	0,405	25,76	51,5
0,035	7,77	15,5	0,160	13,67	27,7	0,285	19,88	39,8	0,410	26,04	52,1
0,040	7,98	16,0	0,165	14,07	28,1	0,290	20,16	40,3	0,415	26,25	52,5
0,045	8,26	16,5	0,170	14,28	28,6	0,295	20,37	40,7	0,420	26,46	52,9
0,050	8,54	17,1	0,175	14,56	29,2	0,300	20,65	41,3	0,425	26,70	53,4
0,055	8,75	17,5	0,180	14,84	29,7	0,305	20,86	41,7	0,430	27,02	54,0
0,060	8,96	17,9	0,185	15,05	30,1	0,310	21,14	42,3	0,435	27,23	54,5
0,065	9,24	18,5	0,190	15,26	30,5	0,315	21,35	42,7	0,440	27,44	54,9
0,070	9,52	19,0	0,195	15,54	31,1	0,320	21,56	43,1	0,445	27,65	55,3
0,075	9,73	19,5	0,200	15,82	31,6	0,325	21,84	43,7	0,450	27,93	55,9
0,080	9,94	19,9	0,205	16,03	32,1	0,330	22,12	44,2	0,455	28,14	56,3
0,085	10,22	20,4	0,210	16,24	32,5	0,335	22,33	44,7	0,460	28,42	56,8
0,090	10,43	20,9	0,215	16,52	33,0	0,340	22,61	45,2	0,465	28,70	57,4
0,095	10,71	21,4	0,220	16,73	33,5	0,345	22,82	45,6	0,470	28,93	57,8
0,100	10,92	21,8	0,225	17,06	34,0	0,350	23,00	46,2	0,475	29,13	58,2
0,105	11,20	22,4	0,230	17,22	34,4	0,355	23,31	46,6	0,480	29,40	58,8
0,110	11,71	22,8	0,235	17,50	35,0	0,360	23,52	47,0	0,485	29,68	59,4
0,115	11,69	23,4	0,240	17,75	35,6	0,365	23,80	47,6	0,490	29,89	59,8
0,120	11,90	23,8	0,245	17,99	36,0	0,370	24,08	48,2	0,495	30,10	60,2
0,125	12,8	24,4	0,250	18,20	36,4	0,375	24,29	48,6	0,500	30,38	60,8

Диагностическое значение теста:

Увеличение содержания свободных аминокислот в крови имеет место при деструктивных состояниях: печеночной коме, острой желтой атрофии печени, при отравлениях (фосфором, фенилгидразином, CCl_4 , хлороформом), при квашиоркоре, тяжелых ожогах, шоке, истощающих поносах, после кровотечений.

Уменьшение уровня аминокислот характерно для почечных поражений, для гиперпродукции инсулина, гормона роста, андрогенов.

Работу оформить в виде таблицы:

Показания ФЭК	Содержание аминного азота в пробе, мг/л	Вывод

Работа 6. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Цель работы: научиться количественно определять содержание мочевой кислоты в сыворотке крови, знать диагностическое значение изменений ее концентрации.

Принцип метода основан на определении способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорновольфрамный реактив (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов. Интенсивность развивающегося окрашивания пропорциональна содержанию мочевой кислоты.

Порядок выполнения работы

В центрифужную пробирку внести 1 мл сыворотки крови, добавить 1 мл дистиллированной воды и 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Перемешать и оставить на 30 минут при комнатной температуре. Отцентрифугировать образующийся осадок в течение 10 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость слить в чистую пробирку.

К 1,5 мл центрифугата добавить 14 капель насыщенного раствора бикарбоната натрия и 1 каплю реактива Фолина (опытная проба).

Параллельно опытной поставить стандартную пробу: в чистую пробирку внести 0,5 мл стандартного раствора мочевого кислоты (0,5 ммоль/л), добавить 0,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Тщательно перемешать, добавить 14 капель насыщенного раствора бикарбоната натрия и 1 каплю реактива Фолина. Перемешать. Обе пробирки оставить на 10 минут для развития окраски. Проколориметрировать обе пробирки на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре в кювете с рабочей длиной 5 мм при красном светофильтре против дистиллированной воды.

Рассчитать содержание мочевого кислоты (в ммоль/л) по формуле:

$$C_{\text{опыт}} = C_{\text{стандарт}} \cdot \frac{E_{\text{опыт}}}{E_{\text{стандарт}}}, \text{ где}$$

$C_{\text{опыт}}$ – концентрация мочевого кислоты в стандартном растворе

$C_{\text{стандарт}}$ – концентрация мочевого кислоты в сыворотке крови

$E_{\text{опыт}}$ – экстинкция опытной пробы

$E_{\text{стандарт}}$ – экстинкция стандартной пробы

Данные оформить в виде протокола.

Расчет можно производить по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору мочевого кислоты.

Диагностическое значение метода: содержание мочевой кислоты в норме у мужчин составляет 0,3-0,5 ммоль/л, у женщин – 0,2-0,4 ммоль/л. Уровень мочевой кислоты увеличивается в сыворотке крови (гиперурикемия) при повышенном распаде клеток, особенно содержащих крупные ядра, при неконтролируемом биосинтезе пуриновых мононуклеотидов, при высоком содержании в пище мононуклеотидов, при нарушении выведения с мочой, при всех формах подагры. Гипоурикемия наблюдается при ряде злокачественных новообразований.

Работа 7. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНИЛПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

Цель работы: научиться количественно определять фенилпировиноградную кислоту (ФПВК) в моче, уметь объяснить причины ее появления.

Фенилпировиноградная кислота – патологический продукт обмена фенилаланина, который появляется в крови и моче при отсутствии фенилаланингидроксилазы, что нарушает нормальное превращение фенилаланина в тирозин.

Принцип метода определения основан на способности фенилпировата образовывать с ионами трехвалентного железа комплексное соединение зеленого цвета.

Порядок выполнения работы:

1,0 мл мочи развести в 10 раз. К 5 мл разбавленной мочи добавить 10 капель 10% цитрата железа и 10 капель 10% лимонной кислоты. Смесь оставить на 5 минут для развития окраски. Раствор колориметрировать на ФЭКе при красном светофильтре в кювете с рабочей длиной 5 мм против контроля (разбавленная в 10 раз моча).

Рассчитать содержание пировиноградной кислоты, используя стандартную кривую, построенную по растворам фенилпировиноградной кислоты с известной концентрацией, найти содержание ФПВК в исследуемой моче.

Расчет

$$X = \frac{a \cdot v}{0,5}, \text{ где}$$

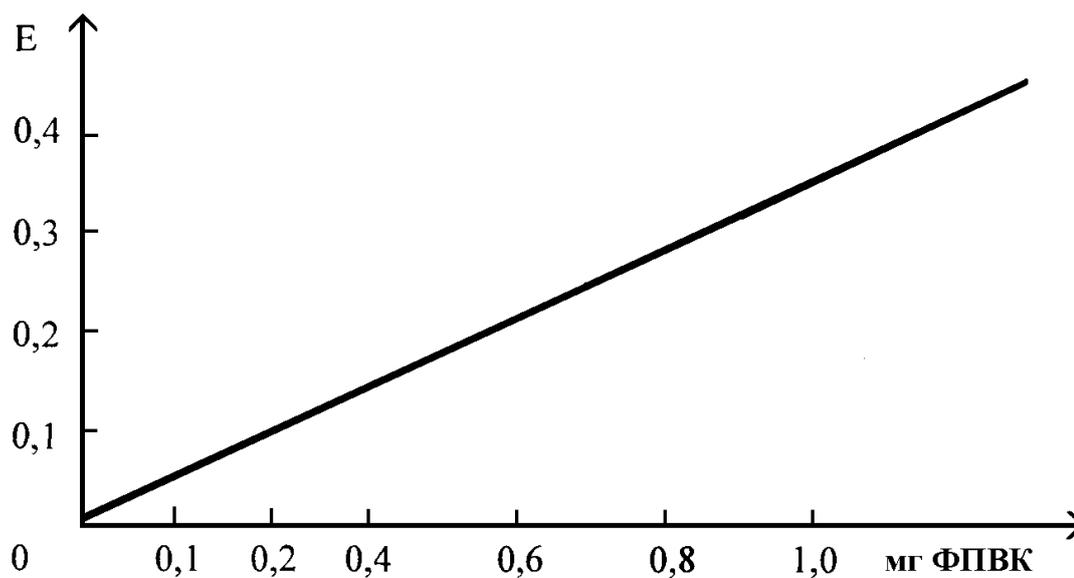
а – содержание ФПВК в пробе по кривой,

в – суточный диурез (1200-1500 мл),

0,5 – объем пробы (неразбавленной мочи).

В норме фенилпировиноградная кислота в моче отсутствует, при фенилкетонурии количество может достигать 500-1000 мг/сутки.

Кривая для определения ФПВК в моче



Работа 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КСАНТУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

Цель работы: освоить метод количественного определения ксантуреновой кислоты в моче. Научиться использовать тест для диагностики врожденных нарушений обмена аминокислот.

Ксантуреновая кислота – продукт обмена триптофана, появляющийся в моче в значительных количествах при нарушении обмена этой аминокислоты.

Принцип метода основан на определении интенсивности зеленого окрашивания, возникающего при взаимодействии ксантуреновой кислоты с железоаммониевыми квасцами.

Порядок выполнения работы:

В две пробирки с метками на 10 мл внести по 1 мл насыщенного раствора NaHCO_3 , добавить по 5 капель 0,425% раствора железоаммониевых квасцов и встряхнуть до исчезновения образующейся мути. Затем в одну (опытную) добавить 20 капель исследуемой подщелоченной мочи и перемешать. К полученной смеси добавить 5 мл дистиллированной воды и 1 каплю фенолфталеина, раствор окрашивается в розовый цвет. Добавить 1,0н р-р HCl (по каплям) до исчезновения розовой окраски. Получившуюся смесь довести дистиллированной водой до 10 мл, энергично встряхнуть и через 4-5 минут измерить экстинкцию на ФЭКе при красном светофильтре.

Контроль готовят также, но вместо мочи добавляют дистиллированную воду. При расчёте пользуются калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору ксантуреновой кислоты.

Для расчета использовать стандартную кривую и формулу:

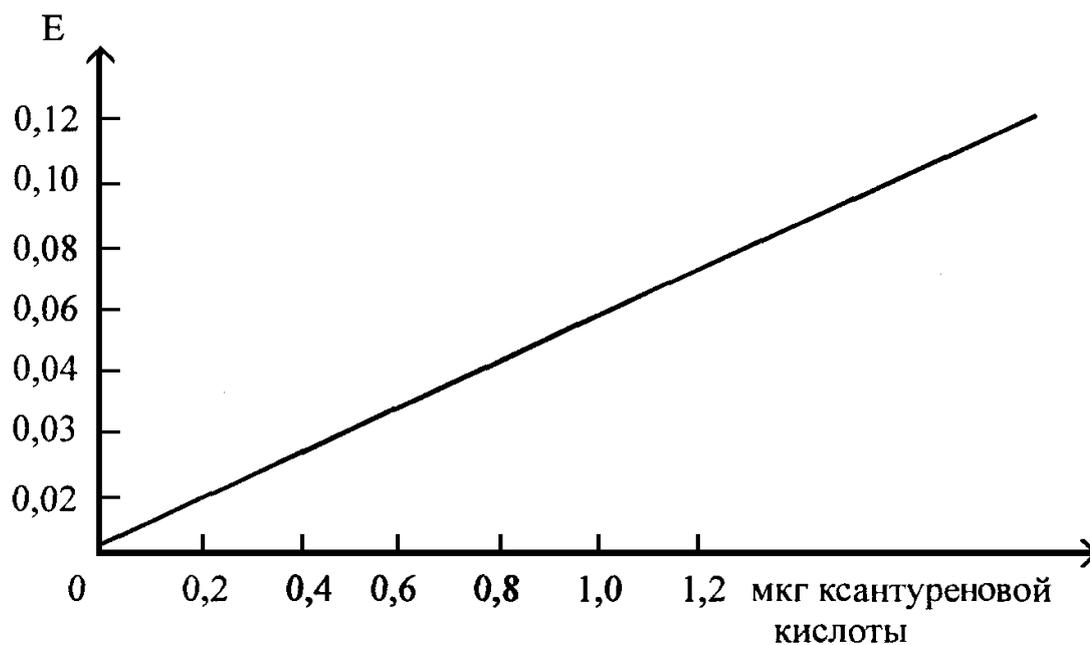
$$X = \frac{A \cdot 10 \cdot B}{1000}, \text{ где}$$

- X – количество мг ксантуреновой кислоты, выделенной с мочей за сутки,
- A – количество мкг ксантуреновой кислоты, найденное по калибровочной кривой,
- B – общий объем суточной мочи (1200-1500 мл),
- 10 – разведение мочи,
- 1000 – коэффициент для пересчета в мг.

Содержание ксантуреновой кислоты в моче **в норме** 0-30 мг.

Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Кривая для определения ксантуреновой кислоты в моче



Клиническое значение: Появление в крови и моче ксантуреновой кислоты – следствие дефекта фермента кинурениназы, превращающей окскинуридин в 3-оксиантралиловую кислоту. При отсутствии этого фермента кинуренин превращается нетипично, в ксантуреновую кислоту. Дефект фермента может быть врожденным, а может быть следствием авитаминоза В₆. Заболевание проявляется кожными высыпаниями (крапивницей), может протекать в форме астмы.

Работа 9. СКРИНИНГ-ТЕСТЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА АМИНОКИСЛОТ

Цель работы: научиться обнаруживать в моче патологические продукты обмена аминокислот, характеризующие наследственные нарушения метаболизма.

А. Обнаружение фенилпировиноградной кислоты в моче

Принцип: фенилпировиноградная кислота с ионами трехвалентного железа дает комплексное соединение сине-зеленого цвета.

Порядок выполнения работы:

К 10 каплям мочи добавить 10 капель 10% FeCl_3 . При наличии в моче фенилпировиноградной кислоты развивается сине-зеленое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству патологического продукта.

Б. Обнаружение гомогентизиновой кислоты

Принцип: гомогентизиновая кислота, накапливающаяся в крови и появляющаяся в моче при нарушении обмена тирозина, дает голубое окрашивание при взаимодействии с солями трехвалентного железа.

Порядок выполнения работы:

К 2-3 мл мочи добавить 3-4 капли треххлористого железа. Развивается голубое окрашивание, при добавлении 3-4 капель 10% гидроксида натрия переходящее в коричневое.

Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Работа 10. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ КРОВИ УРЕАЗНЫМ МЕТОДОМ

Цель работы: освоить методику количественного определения мочевины в крови, уметь объяснить причины отклонения данной константы.

Принцип метода основан на определении количества аммиака, высвобождающегося при разложении мочевины сыворотки или цельной крови под действием уреазы, колориметрическим методом с использованием реактива Несслера.

Порядок выполнения работы:

В две пробирки налить по 1,5 мл дистиллированной воды и по 10 капель препарата уреазы.

В одну (опытную) добавить 2 капли сыворотки крови, во вторую (стандарт) – 2 капли раствора мочевины с концентрацией 5 ммоль/л (30 мг%). Содержимое обеих пробирок встряхнуть и поместить в термостат при 37°C на 20 минут. При этом идет ферментативный гидролиз мочевины.

Вынуть пробирки из термостата, охладить, добавить в обе по 4 капли 7,5% раствора сернокислого цинка, по 4 капли 1,5% раствора гидроксида натрия и профильтровать через фильтры, смоченные дистиллированной водой.

В чистые пробирки отмерить по 12 капель фильтрата (в одну – опыт, в другую – стандарт), добавить по 2,5 мл 0,2% раствора сегнетовой соли и по 10 капель реактива Несслера, перемешать.

Проколориметрировать опытную и стандартную пробирки на ФЭЖе при синем (№ 4) светофильтре в кювете с рабочей длиной 5 мм против контроля.

Приготовление контроля:

В пробирку внести 1,5 мл дистиллированной воды, 2,5 мл 0,2% раствора сегнетовой соли и 10 капель реактива Несслера.

Рассчитать содержание мочевины в сыворотке крови по формуле:

$$X = \frac{E_o}{E_c} \cdot 5 \text{ ммоль/л} \cdot 2, \text{ где}$$

X – содержание мочевины в сыворотке крови в ммоль/л,

E_o – экстинкция опытной пробирки,

E_c – экстинкция стандартной пробирки,

2 – коэффициент пересчета,

5 ммоль/л – содержания мочевины в стандартном растворе.

В норме содержание мочевины в сыворотке крови колеблется в пределах 3,3-8,3 ммоль/л.

Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Диагностическое значение имеет повышение концентрации мочевины, которое встречается при хронических поражениях почек, усиленном распаде белков в тканях, непроходимости кишечника, закупорке мочевыводящих путей. Снижение уровня мочевины встречается при голодании, безбелковой диете, ферментных дефектах мочевинообразования.

Работа 11. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕАТИНИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Цель работы: освоить методику колориметрического определения креатинина в сыворотке крови, знать диагностическое значение данного биохимического теста.

Принцип метода основан на способности креатинина реагировать в щелочной среде с пикриновой кислотой с образованием окрашенных в оранжевый цвет продуктов. Интенсивность развивающегося окрашивания пропорциональна количеству креатинина.

Порядок выполнения работы:

В пробирку внести 20 капель сыворотки крови, добавить 3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты, перемешать и поместить на 20 минут в кипящую баню (осаждение белков). Охладить и профильтровать содержимое в чистую пробирку с меткой на 5 мл, добавить 2 капли 10% раствора гидроксида натрия и довести общий объем смеси до метки дистиллированной водой.

Параллельно опытной ставится контрольная проба:

1,5 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты, 2 капли 10% NaOH, объем смеси довести дистиллированной водой до 5 мл.

Опытную и контрольную пробирки проколориметрировать на ФЭЖе против дистиллированной воды в кювете с рабочей длиной 1 см при синем сфетофилт্রে.

Расчитать содержание креатинина по формуле:

$$X = \frac{E_o}{E_k} \cdot 88,4 \text{ ммоль/л, где}$$

E – показатель экстинкции опытной пробы,

E_k – показатель экстинкции контрольной пробы,

88,4 – коэффициент пересчета в ммоль/л.

В норме содержание креатинина в сыворотке крови составляет 53-106 ммоль/л.

Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Диагностическое значение: содержание креатинина в сыворотке крови резко возрастает при почечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, акромегалии, при избытке в пище белков животного происхождения.

Раздел II

ОБМЕН И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБМЕНА АМИНОКИСЛОТ, УГЛЕВОДОВ И ЛИПИДОВ

Цель изучения раздела: Изучить строение, функции и метаболизм простых и сложных липидов, регуляцию метаболических процессов, уметь применять полученные данные для объяснения механизмов адаптации организма к меняющимся условиям среды, биохимических основ ряда заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ. Уметь определять ряд биохимических показателей липидного обмена в сыворотке крови.

Основные вопросы раздела:

1. Основные липиды тканей человека, строение, функции.
2. переваривание и всасывание липидов в желудочно-кишечном тракте. Нарушение процессов. Транспорт липидов кровью.
3. Метаболизм нейтрального жира, регуляция процессов, нарушения.
4. Метаболизм холестерина, регуляция процесса. Биохимия атеросклероза и желчнокаменной болезни.
5. Метаболизм фосфолипидов и гликолипидов в норме и при патологии.

Липиды – органические вещества биологической природы, разные по химическому составу, строению, свойствам, функциям, плохо растворимые или нерастворимые в воде и растворяющиеся в неполярных растворителях.

Главными признаками липидов являются: биологическое происхождение, высокая степень гидрофобности и наличие в большинстве молекул алкильных радикалов. Основное количество липидов в клетках находится в виде эфиров различных спиртов (циклических и ациклических, одноатомных и многоатомных).

Липиды дифильны. У одних классов преобладают гидрофобные свойства, они не растворяются в воде, находятся в аполярной фазе клетки и выполняют резервные функции. Другие липиды имеют выраженную дифильность, растворяются в воде и выполняют структурные функции.

Биологическая роль липидов:

- непосредственный источник энергии для клетки,
- резервная форма энергии,

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

По химическому составу выделяют три группы липидов:

- простые липиды – сложные эфиры спиртов и высших жирных кислот (нейтральные жиры, воска, стериды),
- сложные липиды, в состав которых помимо остатков жирных кислот и спиртов входят дополнительные компоненты, в зависимости от которых такие липиды подразделяют на фосфолипиды, гликолипиды и протеолипиды,
- предшественники и производные липидов. Эту группу соединений называют неомыляемыми липидами. Она включает свободные жирные кислоты, холестерин, желчные кислоты, жирорастворимые витамины, кетонные тела.

Для **жирных кислот** тканей человека характерно:

- неразветвленная цепь углеродных атомов,
- длинная цепь углеродных атомов (C_{12} , - C_{24} , чаще C_{16} , C_{18} и C_{24}),
- наличие одной карбоксильной группы (монокарбоновые).

Жирные кислоты могут быть предельными (насыщенными) и непредельными, как моно-, так и полиненасыщенными.

Если жирные кислоты непредельны, то

- они всегда цис-изомеры,
- первая двойная связь находится в положении C_{9-10} , остальные – ближе к метильному концу.

Особая роль отводится полиненасыщенным жирным кислотам: линолевой ($C_{17}H_{31}COOH$, ω_6 -жирной кислоте) и линоленовой ($C_{17}H_{29}COOH$, ω_3 -жирной кислоте), которые не синтезируются в организме человека и являются незаменимыми факторами питания.

Суточная потребность в липидах составляет 0,7-1,0 г/кг массы.

Поступающие с пищей липиды животного (жиры) и растительного (масла) происхождения (99% пищевых жиров – нейтральный жир) подвергаются гидролизу в пищеварительном канале с участием 4 типов липаз: язычной, желудочной, панкреатической и кишечной. Степень гидролиза зависит от степени эмульгирования жира и активности фермента. Всасываются липи-

ды через мембрану энтероцита в лимфу или кровь в трех формах: капелек эмульсии, мицелл или молекул ресинтезированного энтероцитом нейтрального жира. В процессах переваривания и всасывания липидов важная роль отводится желчным кислотам, синтезируемым в печени из холестерина. Транспортными формами липидов являются:

- хиломикроны,
- транспортные липопротеины различной плотности,
- свободные жирные кислоты под коллоидной защитой альбуминов.

Общее содержание липидов в крови колеблется в пределах 4,0-8,0 г/л.

Повышение содержания общих липидов крови – гиперлипидемия, которая может быть как наследственной, так и вторичной.

Главный путь катаболизма жирных кислот в тканях – процесс β -окисления, он имеет место в матриксе митохондрий большинства клеток и выполняет как энергетическую (синтез восстановленных форм коферментов, водород с которых передается в дыхательную цепь, а энергия окисления идет на окислительное фосфорилирование и синтез АТФ), так и пластическую функции (образование ацетил-КоА, который обеспечивает синтез холестерина, желчных кислот, кетоновых тел, стероидных гормонов и других соединений).

Нарушения обмена липидов приводят к тяжелым заболеваниям, таким как гиперлипидотеинемии, атеросклероз и его осложнения, желчнокаменная болезнь.

Работа 12. КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ

Цель работы: научиться открывать в сыворотке крови суммарно липопротеины.

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

Порядок выполнения работы:

Каплю сыворотки нанести на фильтровальную бумагу, высушить при температуре не выше 90°C. Поместить бумагу в чашку Петри, залить раствором судана и оставить на 60 минут. После этого достать бумагу, дать стечь реактиву. Спиртовым раствором в чистой чашке Петри промыть бумагу. На месте нанесения сыворотки крови заметно розовое пятно окрашенных липопротеинов и хиломикронов. Данные оформить в виде протокола.

Работа 13. **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ (НЕЭТЕРИФИЦИРОВАННЫХ) ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (НЭЖК)**

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

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

Порядок выполнения работы:

Отмерить 10 капель сыворотки крови, внести 2 мл изопропилового спирта и тщательно перемешать в течение 2-х минут. Добавить 1-2 капли фенолфталеина и оттитровать смесь из бюретки 0,01 н. раствором КОН в до устойчивого слабо-розового цвета.

Расчет:

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

0,56 – грамм эквивалент КОН,

A – количество мл щелочи, пошедшее на титрование НЭЖК,

2 – коэффициент для пересчета на 1 мл сыворотки,

1000 – переход к 1 литру.

Оформить в виде протокола.

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

Диагностическое значение: Это транспортная форма жира, направляемого из жировых депо к работающим органам. Она является основным

показателем активности процесса мобилизации жира. При голодании количество НЭЖК резко возрастает за счет мобилизации. Уровень НЭЖК у детей выше.

Работа 14. **РОЛЬ АЛЬБУМИНОВ В ТРАНСПОРТЕ
ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

Цель работы: уяснить, что одной из транспортных форм жира является коллоидная защита свободных жирных кислот альбуминами плазмы.

Принцип метода: альбумины сыворотки крови обволакивают свободные жирные кислоты сыворотки, обеспечивая им коллоидную защиту. В виде таких соединений НЭЖК удерживаются в растворе и транспортируются в организме.

Порядок выполнения работы:

В две пробирки внести по 5 капель раствора мыла, в 1-ю добавить 10 капель раствора белка, во 2-ю – столько же воды. Затем во вторую пробирку ввести по каплям НС1 (2% раствор) до появления осадка жирных кислот (избыток кислоты вводить не следует!). В пробирку с белком добавить столько же кислоты. Видно, что жирные кислоты не выпали в осадок, раствор остается прозрачным. НЭЖК образуют с альбумином комплексное соединение. Данные оформить в виде протокола.

Работа 15. ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ ЖИРОВ

Цель работы: уяснить, что поверхностно-активные вещества, адсорбируясь на поверхности раздела двух фаз, обеспечивают образование стойкой эмульсии. Поверхностная активность веществ различна.

Принцип метода основан на выраженной дифильности поверхностно-активных веществ. Эмульгаторы поворачиваются гидрофобными участками к липидам, гидрофильными к воде, образуя на границе двух фаз тонкую пленку, препятствующую слиянию капелек жира. Чем выраженнее поверхностная активность, тем тоньше получаемая эмульсия.

Порядок выполнения работы:

В 5 пробирок налить по 3 капли растительного масла. Добавить в 1-ю пробирку 20 капель дистиллированной воды, во 2-ю – 20 капель желчи, разведенной в 2 раза, в 3-ю – 20 капель 1% раствора белка, в 4-ю – 20 капель 1% р-ра мыла, в 5-ю – 20 капель 1% раствора бикарбоната натрия. Пробирки тщательно встряхнуть и оставить на 5 минут при комнатной температуре. Через 5 минут внимательно изучить степень сохранения эмульсии.

эмульгатор \ жир	Вода	Белок	Желчь	Сода	Мыло
Растительное масло					

Полученные данные занести в таблицу, оценив качественно степень дисперсности эмульсии.

Сделать вывод о поверхностной активности исследуемых веществ.

Работа 16. **КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ**

Цель работы: научиться качественно по цветной реакции обнаруживать наличие желчных кислот в биологическом материале.

Принцип метода основан на способности желчных кислот давать пурпурное окрашивание с оксиметилфурфуролом, который образуется из фруктозы в присутствии концентрированной серной кислоты (реакция Петтенкофера).

Порядок выполнения работы:

На сухое предметное стекло, под которое подложен лист белой бумаги, нанести 1 каплю разведенной в 2 раза желчи, 1 каплю 20% раствора сахарозы и хорошо перемешать стеклянной палочкой. Рядом нанести 3 капли концентрированной H_2SO_4 .

Через некоторое время на месте слияния капель наблюдается развитие красноватой окраски, которая через несколько минут переходит в красно-фиолетовую.

В норме желчные кислоты выделяются с желчью в просвет кишечника и участвуют в процессах эмульгирования жира, активируют поджелудочную липазу, принимают участие во всасывании липидов. При нарушении работы привратника желчь может забрасываться в желудок. Желчные кислоты являются патологической составной частью желудочного сока.

Данные оформить в виде протокола.

Работа 17. **КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ЛИПАЗЫ**

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

Принцип метода: об активности липазы можно судить по количеству свободных жирных кислот, выделившихся в единицу времени при гидролизе нейтрального жира. Количество жирных кислот определяется титрованием 0,05 н. раствором гидроксида натрия.

Скорость ферментативной реакции при прочих равных условиях зависит от концентрации фермента и субстрата. С увеличением времени воздействия фермента на субстрат глубина гидролиза возрастает, свидетельством чего является нарастание количества продуктов реакции в реакционной смеси.

Порядок выполнения работы:

В 6 пробирок налить по 1 мл молока и по 2 капли раствора липазы (строго соблюдать количество). В 1-ю пробирку добавить 1 каплю 1% раствора фенолфталеина и содержимое немедленно оттитровать 0,05н. раствором NaOH до устойчивого розового цвета. Остальные 5 пробирок оставить при комнатной температуре и через каждые 10 минут поочередно оттитровать 0,05н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина.

Изобразить графически процесс гидролиза жиров под действием фермента липазы, откладывая на оси абсцисс время взаимодействия фермента и субстрата, на оси ординат – количество щелочи, пошедшее на каждое титрование.

Сделать заключение по обнаруженной закономерности.

Работа 18. ВЛИЯНИЕ ЖЕЛЧИ НА АКТИВНОСТЬ ЛИПАЗЫ

Цель работы: уяснить биологическую роль желчных кислот в эмульгировании и гидролизе нейтрального жира.

Порядок выполнения работы:

В 2 колбы на 50 мл внести по 20 мл молока, разбавленного в 5 раз, добавить по 2 мл вытяжки липазы (глицериновый экстракт поджелудочной железы). В опытную колбу добавить 1 мл желчи, в контрольную 1 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать.

Из обеих колб сразу же отобрать по 2 мл смеси, перенести в чистые стаканчики, добавить по 2 капли фенолфталеина и оттитровать из бюретки 0,01н. раствором гидроксида натрия до устойчивого слабозащитного окрашивания. При этом оттитровываются свободные жирные кислоты, присутствующие в молоке. Оставшуюся смесь поставить в термостат (+ 37°C).

Через 15, 30, 45, 60 минут повторно сделать заборы проб из опытной и контрольной колб (по 2 мл), оттитровать 0,01 н. раствором гидроксида натрия.

Данные занести в таблицу.

Время инкубации в мин.	Объем 0,01 н. NaOH, пошедшего на титров, (в мл)	
	опытная проба (с желчью)	контрольная проба (без желчи)
Исходное		
15		
30		
45		
60		

По результатам построить графики, где на оси абсцисс отложить время в минутах, на оси ординат – мл щелочи, пошедшей на титрование. Сравнить активность липазы в присутствии желчи и без, сделать вывод о роли желчных кислот в переваривании липидов.

Работа 19. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ ЛИПИДОВ КРОВИ ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

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

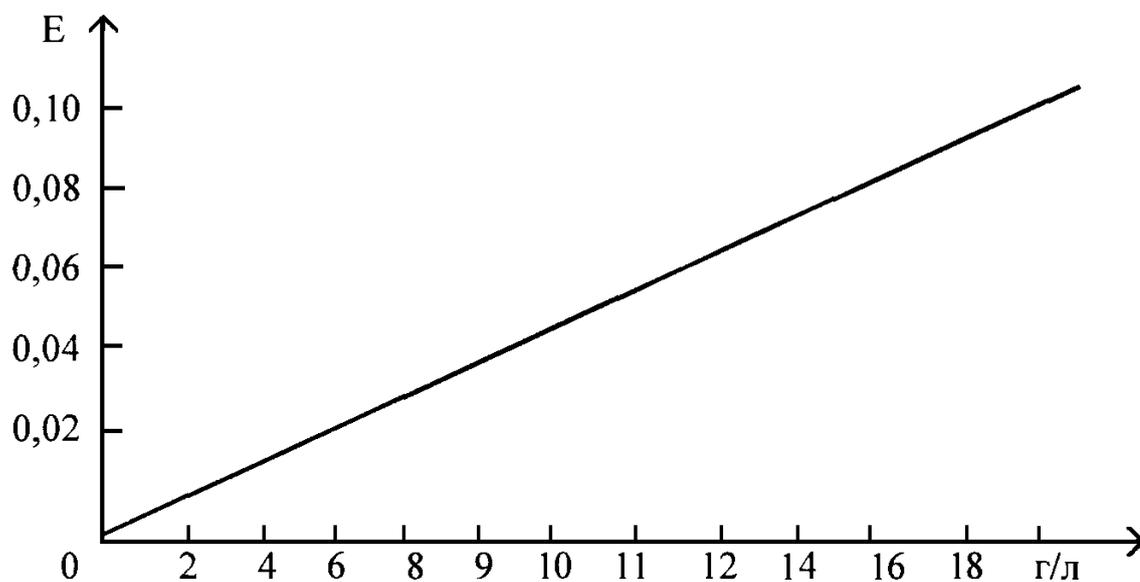
Принцип метода основан на измерении оптической плотности жировой эмульсии, образующейся при взаимодействии серной кислоты с экстрактом липидов сыворотки крови.

Порядок выполнения работы:

В пробирку налить 2 капли (0,1 мл) сыворотки крови, добавить 2 мл смеси Блюра (смесь этанола и эфира в соотношении 3:1), встряхнуть и поместить пробирку в водяную баню (с t не выше 80°C), довести содержимое до кипения. После охлаждения под струей холодной воды содержимое отфильтровать через бумажный фильтр, смоченный водой, в чистую пробирку. К общему объему фильтрата добавить 5 мл 1 % раствора серной кислоты и поставить в кипящую баню на 1 мин. Охладить и через 30 мин. опре-

делить оптическую плотность раствора на ФЭК-М при красном свето-
фильтре с рабочей длиной кюветы 5 мл против дистиллированной воды.

Определить содержание общих липидов в данной сыворотке, пользу-
ясь калибровочной кривой.



Данные оформить в виде протокола.

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

Как физиологическое явление увеличение содержания липидов в крови (гиперлипемия) наступает через 1⁴ ч после приема пищи. Концентрация липидов крови увеличивается при сахарном диабете (до 10-20 г/л), липоидном нефрозе (до 10-50 г/л), циррозе печени, ожирении, атеросклерозе, ишемической болезни сердца, гипотиреозе, панкреатите.

**Работа 20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ β -ЛИПОПРОТЕИ-
НОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ (по Бурштейну)**

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

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

Порядок выполнения работы:

В 2 пробирки (опытная и контрольная) внести по 2 мл 0,025 М СаС1 добавить по 0,2 мл (4 капли) сыворотки и тщательно перемешать. В опытную пробирку добавить 1 каплю 1% гепарина, перемешать и строго через 4 минуты измерить экстинкцию опытной и контрольной пробирки при красном светофильтре и толщине кювет 5 мм.

Рассчитать содержание β -липопротеинов в сыворотке по формуле:

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

D_2 – экстинкция опытной пробы,

D_1 – экстинкция контрольной пробы,

10 – эмпирический коэффициент.

Сделать заключение о содержании β -липопротеинов.

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

Уменьшение β -липопротеинов имеет место при плазмоцитоме.

Работа 21. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

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

А. Количественное определение общего холестерина сыворотки крови по методу Илька

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

Порядок выполнения работы:

В чистую, сухую (обязательно) пробирку внести из бюретки 2 мл реакционной смеси (работа проводится под вытяжным шкафом) и осторожно по стенке добавить 2 капли сыворотки крови. Осторожно, под вытяжным шкафом встряхнуть содержимое и добавить еще 3-4 капли концентрированной серной кислоты. Встряхнуть до растворения осадка белка. Пробирку перенести в штатив и поместить в термостат при 37°C на 20 минут для развития окраски. Колориметрировать на ФЭКе при красном светофильтре и толщине кюветы 5 мм против реакционной смеси.

Содержание холестерина в пробе определяется по таблице пересчета.

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

Таблица пересчета для определения содержания холестерина
методом Илька

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

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

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

Порядок выполнения работы:

В сухую пробирку внести 4 капли сыворотки крови, добавить 4 капли ледяной уксусной кислоты, затем 20 капель сульфосалициловой кислоты, 3 мл уксусного ангидрида (из бюретки). Не размешивая смесь, оставить пробирку при комнатной температуре на 10 минут для охлаждения.

Через 10 минут к смеси добавить 8 капель концентрированной серной кислоты и перемешать содержимое пробирки. Поставить пробу в темноту (можно в термостат) при температуре 20°C на 30 минут для развития окраски. Параллельно ставится контрольная проба (две на группу). Порядок выполнения тот же, но вместо 4 капель сыворотки крови внести 4 капли дистиллированной воды.

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

Расчет: количество общего холестерина рассчитывается по формуле:

$$X = \frac{E \cdot 667}{38,7}, \text{ где}$$

E – экстинкция раствора,

667 – эмпирический коэффициент,

38,7 – пересчет на ммоль/л.

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

В. Определение холестерина в сыворотке крови методом Златкис-Зака

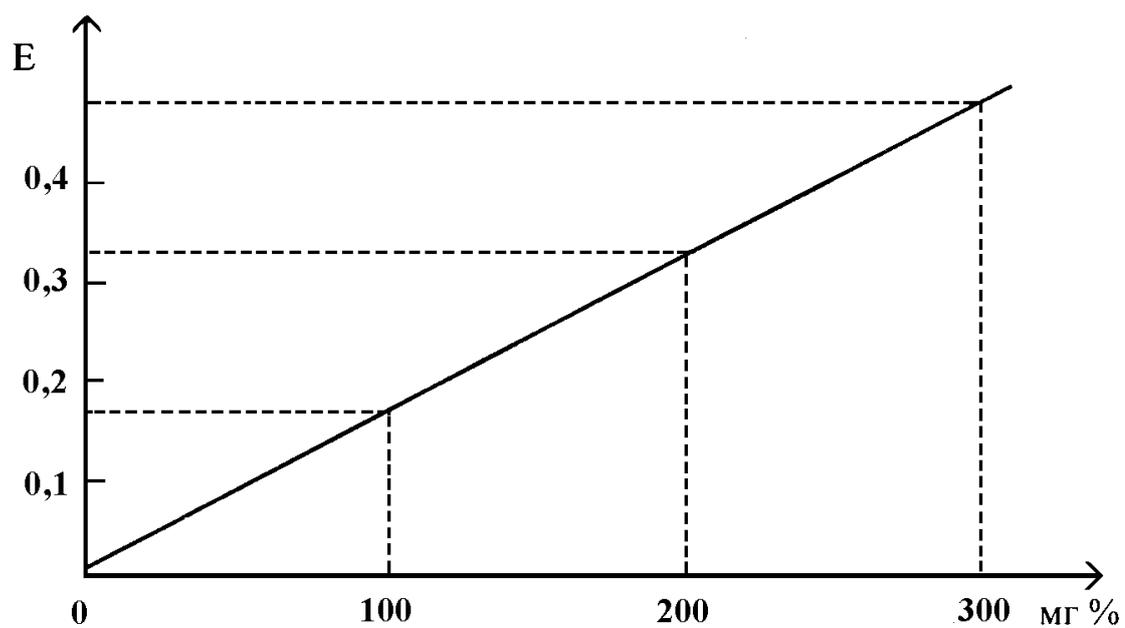
При действии CH_3COOH и H_2SO_4 на холестерин в присутствии FeCl_3 образуется красно-фиолетовое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна концентрации холестерина.

Порядок выполнения работы:

Используются только сухие пробирки.

К 1 капле сыворотки крови прилейте осторожно 2,5 мл рабочего раствора хлорного железа (рабочий раствор), содержащего концентрированную уксусную и серную кислоты. Закройте пробкой содержимое пробирки, тщательно перемешайте и оставьте при комнатной температуре на 30 минут. Прокolorиметрируйте опыт на ФЭКе против дистиллированной воды при зеленом светофилтре в кювете шириной 0,5 см.

Расчет проводите по калибровочному графику:



Содержание холестерина в норме 120-250 мг%. Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Г. Определение общего холестерина в крови с использованием стандартного набора реактивов Принцип метода: холестерин под действием холестеринокси-азазы в присутствии кислорода воздуха превращается в холестенон с высвобождением пероксида водорода. Пероксид при взаимодействии с 4-аминоантипирином в присутствии фенола дает соединение красного цвета. Интенсивность развивающейся окраски пропорциональна содержанию холестерина.

Порядок выполнения работы:

В 2 пробирки (опытная и стандартная) внести по 20 капель рабочего реагента. В одну пробирку (опытную) добавить 1 каплю сыворотки крови, в другую (стандартную) - 1 каплю стандартного раствора холестерина с концентрацией 2,6 ммоль/л. Оставить реакционную смесь на 20 минут при комнатной температуре для развития окраски (или поместить на 10 минут в термостат при 37°C).

Определить интенсивность окраски на ФЭК-М при зеленом свето-фильтре ($\lambda = 500$ нм) и толщине кюветы 3 мм. Стандартную и опытную пробирку колориметрировать против контроля (рабочий раствор реагента).

Рассчитать концентрацию холестерина по формуле:

$$X = \frac{E_{\text{опыт}}}{E_{\text{стандарт}}} \cdot 2,6 \text{ ммоль/л}$$

Содержание холестерина в норме – 2,9-5,2 ммоль/л.

Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Диагностическое значение: В норме содержание общего холестерина составляет в среднем 2,9 - 6,5 ммоль/л в зависимости от пола, возраста, характера питания. Из этого количества 70% составляет этерифицированный и 30% - свободный холестерин.

Увеличение содержания холестерина в крови (гиперхолестеринемия) наблюдается при атеросклерозе, сахарном диабете, липоидном нефрозе, микседеме, при механической желтухе, наследственных нарушениях липидного обмена.

Гипохолестеринемия характерна для анемии, туберкулеза, гипертиреоза, голодания, раковой кахексии, паренхиматозной желтухи.

Работа 22. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В ЛПВП И РАСЧЕТ ИНДЕКСА АТЕРОГЕННОСТИ ПО МЕТОДУ Е.А. БОРОДИНА

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

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

Порядок выполнения работы:

Внести в центрифужную пробирку 1 мл сыворотки крови, добавить 2 капли 0,5 М $MgCl_2$, приготовленного на 4% растворе фосфорновольфрамовой кислоты, и оставить на 30 минут для осаждения фракций липопротеинов. Отцентрифугировать содержимое пробирки в течение 10 минут при 3000 об/мин. Слить надосадочную жидкость.

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

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

Расчет индекса атерогенности

$$ИА = \frac{X_{C_{общ}} - X_{C_{ЛПВП}}}{X_{C_{ЛПВП}}}$$

Данные оформить в виде протокола.

Диагностическое значение метода: Индекс атерогенности используется как тест вероятности развития атеросклероза. Эта величина в норме у взрослых составляет 2,0-3,5. При атеросклерозе и его осложнениях она всегда превышает 4,0, в тяжелых случаях патологии этот показатель достигает величин 5,0 и даже 6,0.

Работа 23. ОБНАРУЖЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ

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

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

А. Проба Легалья на ацетон

Порядок выполнения работы:

В пробирку внести около 2 мл патологической мочи, добавить 3-4 капли 10% раствора гидроксида натрия и 3 капли нитропруссид натрия. Появляется красно-бурое окрашивание. Подкислить смесь концентрированной уксусной кислотой. Окрашивание становится ярко-красным.

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

Б. Проба Герхарда на ацетоуксусную кислоту

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

Порядок выполнения работы:

В пробирку к 5 мл патологической мочи добавить по каплям 10% р-р хлорида железа (III). Образуется желто-белый осадок феррифосфатов. Раствор добавлять до тех пор, пока осадок прекратит образовываться.

В присутствии ацетоуксусной кислоты развивается красное окрашивание. Осадок отфильтровывают через воронку с фильтром, смоченным водой. Фильтрат получается прозрачным и окрашенным в цвет красного вина. Фильтрат мочи, не содержащий ацетоуксусную кислоту, окрашивается в красно-желтый цвет.

Для сравнения проделать реакцию с нормальной мочой.

Данные опыта записать в виде протокола произвольной формы.

Диагностическое значение: Кетоновые тела (ацетон, β -гидроксимасляная и ацетоуксусная кислоты) являются нормальными метаболитами липидного обмена. Они образуются в печени и отправляются током крови в мышцы, где подвергаются дальнейшему окислению.

Содержание их в крови в норме колеблется до 30 мг/л. При сахарном диабете, голодании содержание кетоновых тел резко возрастает (кетонемия), как следствие, они появляются в моче (кетонурия).

Склонность к кетозу у детей обусловлена:

1. Сверхобразованием кетоновых тел в печени, поскольку большой процент энергозатрат ребенок первых лет жизни покрывает за счет окисления липидов, образуется большое количество активной уксусной кислоты, идущей на синтез кетоновых тел.
2. Окисление кетоновых тел в мышцах ребенка ослаблено, поскольку преобладают анаэробные процессы, активность ферментов аэробного окисления снижена.
3. Часты транзиторные кетонемии и кетонурии, детский организм легче переносит эти отклонения, он более резистентен к кетозу.

Липидный состав диеты ребенка

Основным компонентом диеты должны быть жиры молока, они высокоэмульгированы, легче перевариваются и полней усваиваются организмом ребенка. У детей значительно выше потребность в эссенциальных ω_3 - и ω_6 -жирных кислот, поскольку у них интенсивней процессы биосинтеза как клеток, так и эйкозаноидов.

Особенности переваривания и всасывания липидов в постнатальном периоде

1. Потребность в липидах у детей выше, чем у взрослых, поскольку большой процент затрат энергии покрывается липидами:
до 4 лет – 3,5-4,0 г/кг массы тела
4-11 лет – 2,0-2,5 г/кг
взрослый – 1,0-1,5 г/кг
2. Главный пищевой жир ребенка первого года жизни – жир молока, он эмульгирован, в его составе много короткоцепочных жирных кислот, он легко расщепляется в желудке язычной липазой.
3. У ребенка интенсивно желудочное переваривание липидов, где гидролизуется до 30% пищевых жиров язычной липазой, которая очень активна у грудных детей.
4. Всасывание короткоцепочных жирных кислот, высвобождающихся при гидролизе триацилглицеринов молока, осуществляется стенкой желудка в воротную вену.

Бурая жировая ткань – зона метаболизма, где окисление липидов сопровождается выделением больших количеств тепла. У новорожденных в бурой жировой ткани метаболизм очень интенсивен. Эта ткань хорошо кровоснабжается, содержит много митохондрий, богатых ферментами тканевого дыхания, активно поглощает кислород и интенсивно окисляет глюкозу и жирные кислоты. Активность АТФ-синтетазы в этой ткани очень

низкая, поэтому окисление и фосфорилирование в ней не являются сопряженными процессами. В бурой жировой ткани имеет место только субстратное фосфорилирование (гликолитическое, а также тиокиназная реакция ЦТК). Основное количество высвобождаемой в ходе окисления энергии превращается в тепло. В митохондриях бурой жировой ткани присутствует белок термогенин, который осуществляет транспорт протонов через внутреннюю мембрану митохондрий по градиенту концентрации и рассеивает протонный градиент. Синтез АТФ при этом не происходит. Бурая жировая ткань выполняет терморегуляторную функцию. Процесс протекает особенно активно при угрозе нарушения теплового баланса.

Сахарный диабет — заболевание, развивающееся вследствие абсолютной или относительной недостаточности инсулина, что приводит к нарушению утилизации углеводов, расстройствам липидного и белкового обменов, проявляется гипергликемией и поражением сосудов.

Выделяют инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД), диабет I типа, и инсулиннезависимый (ИНСД) или диабет II типа.

У детей значительно чаще встречается диабет I типа. Причины:

1. Деструкция или нарушение клеточной дифференцировки β -клеток островкового аппарата железы.
2. Вирусные инфекции, избирательно поражающие β -клетки, вызывая их лизис.
3. Травмы и заболевания поджелудочной железы (избыточное отложение железа при идиопатическом гемохроматозе, токсическое воздействие на железу ядов и лекарств и др.)

Все это приводит к дефициту инсулина.

Особенности течения сахарного диабета у детей:

1. Острое начало, злокачественное течение, раньше возникают как острые, так и поздние осложнения, они выражены резко.
2. Быстро развиваются и нарастают патологические симптомы, снижается иммунитет вследствие расстройств белкового синтеза, нарастает дегидратация, появляется сухость кожи, часто возникают грибковые и гнойничковые заболевания.
3. Быстро и часто развиваются угрожающие для жизни симптомы: диабетический кетоацидоз, гиперосмолярная или смешанная кома.
4. Требуется лечение введением инсулина.

Сахарный диабет II типа у детей встречается крайне редко, выявляется чаще случайно, поскольку течет практически бессимптомно, заболевание развивается медленно.

Раздел III.
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ
Г л а в а 1.

БИОХИМИЯ КРОВИ

Цель изучения раздела: изучить химический состав и биологические функции крови. Научиться определять отдельные биохимические компоненты крови, отражающие состояние обменных процессов в организме. Научиться объяснять результаты биохимических анализов крови.

Основные вопросы раздела:

1. Кровь, понятие, физиологические функции.
2. Минеральный состав крови.
3. Органические вещества крови: азотсодержащие и безазотистые.
4. Транспорт кислорода и двуокиси углерода кровью.
5. Свертывающая, противосвертывающая и фибринолитическая системы крови.

Кровь – жидкая ткань, осуществляющая в организме интеграцию биохимических процессов, протекающих в клетках, в единую систему. Это вязкая, непрозрачная жидкость красного цвета со слабощелочной реакцией (рН 7,36-7,42) и удельной плотностью 1,050-1,060.

Функции крови многочисленны:

- а) транспортная: через кровь осуществляется транспорт газов, питательных веществ, шлаков к органам выделения, лекарственных веществ;
- б) защитная, она обеспечивает защиту от возбудителей инфекции и токсинов за счет иммуноглобулинов и лейкоцитов, защищает организм от кровопотерь и внутрисосудистого тромбообразования, обеспечивает коллоидную защиту плохорастворимым веществам;
- в) регуляторная, обеспечивает постоянство внутренней среды организма (гомеостаз) и др.

Кровь состоит из плазмы и взвешенных в ней клеток: эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов. На долю крови приходится у взрослого человека 1/13 веса тела.

Химический состав крови представлен водой (81%) и плотным остат-

ком (19%). В состав плотного остатка входят как органические, так и минеральные вещества.

Органические вещества крови включают азотсодержащие соединения (белки и остаточноазотную фракцию, представленную конечными продуктами азотистого обмена, метаболитами и биологически активными низкомолекулярными азотсодержащими соединениями) и безазотистые соединения (липиды, углеводы).

Минеральный состав крови представлен катионами натрия, калия, кальция, железа и анионами: хлоридами, бикарбонатами, неорганическими фосфатами, сульфатами. Минеральные вещества обеспечивают поддержание осмотического давления, кислотно-основного состояния, выполняют специфические функции.

Химический состав крови отражает состояние обмена веществ в организме. Заболевания сопровождаются изменениями содержания в крови тех или иных химических веществ, поэтому биохимические исследования крови широко используются в клинике с целью диагностики заболеваний, оценки эффективности проводимого лечения и прогнозирования исхода болезни.

Работа 24. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИДОВ КРОВИ ПО МЕТОДУ БАНТА

Цель работы: освоить методику количественного определения хлоридов крови. Уметь применять тест для характеристики состояния водно-электролитного обмена.

Принцип метода основан на титровании хлоридов крови раствором азотнокислого серебра в присутствии индикатора бихромата калия.

Порядок выполнения работы:

Микропипеткой отмерить 0,1 мл крови (взять из пальца, соблюдая все правила асептики) или цитратной (2 капли) и осторожно, без потерь, перенести на полоску фильтровальной бумаги размером 2х3 см. Пипетку сразу же тщательно промыть цитратом натрия.

После того, как кровь подсохнет на воздухе (поверхность бумаги станет матовой), опустить полоску в стакан с 2 мл спирта и оставить для экстракции хлоридов на 10 минут, периодически взбалтывая.

Не вынимая полоски, внести в стаканчик 2-3 капли 5% раствора бихромата калия (индикатор). Раствор приобретает светло-желтую окраску. Оттитровать 0,01н. раствором нитрата серебра до появления мяско-красного цвета.

Рассчитать количество хлоридов, исходя из того, что 1 мл 0.01 н. AgNO_3 эквивалентен 0,5846 мг NaCl .

При пересчете в единицы системы СИ можно пользоваться формулой:

$$A = X \cdot 100 \text{ ммоль/л, где}$$

X – количество мл 0,01 н. AgNO_3 , пошедшее на титрование хлоридов в 0,1 мл крови,

100 – коэффициент пересчета.

Данные оформить в виде протокола произвольной формы, сделать заключение о содержании хлоридов в данном образце крови.

Клинико-диагностическое значение. В крови здорового человека в норме содержится 95-103 ммоль/л в пересчете на NaCl . Гиперхлоремия имеет место при задержке выведения хлоридов (поражении почек, сердечная декомпенсация), приеме больших доз хлоридов, лечении минералокортикоидами.

Гипохлоремия возникает при повышенной потере хлоридов (поносы, рвота, фистулы желудка), при поступлении в организм большого количества воды (водная интоксикация), при нефрозах (из-за нарушения реабсорбции хлоридов в почках), при отеках, дыхательном ацидозе.

Работа 25. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Цель работы: освоить метод количественного определения кальция в сыворотке крови, уметь применить тест с диагностической целью.

Принцип метода основан на способности кальция сыворотки крови давать в щелочной среде с раствором глиоксаль-бис-2-оксипиридина комплексное соединение красного цвета. Интенсивность развивающегося окрашивания пропорциональна содержанию кальция.

Порядок выполнения работы:

В чистую пробирку внести 1 мл дистиллированной воды, добавить 1 каплю сыворотки крови и 10 капель гидроксида натрия (0,4 моль/л). Раствор перемешать и оставить на 10 минут при комнатной температуре. Через 10 минут внести из бюретки 2 мл рабочего раствора и перемешать. Через 5 минут определить интенсивность развивающегося окрашивания на ФЭКе при зеленом светофильтре (№ 6) и толщине кюветы 1 см против рабочего раствора.

Для сравнения параллельно опыту ставится проба с эталонным раствором кальция.

К 1 мл эталонного раствора добавить 10 капель гидроксида натрия, через 10 минут - 2 мл рабочего раствора. Определить оптическую плотность.

Содержание кальция в крови рассчитать по формуле:

$$X = \frac{A}{B} \cdot 2,5 \text{ ммоль/л, где}$$

A – оптическая плотность опытной пробы

B – оптическая плотность эталонного раствора,

2,5 – содержание Са в эталонном растворе.

Данные оформить в виде протокола.

Работа 26. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТИТРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Цель работы: научиться определять количество кальция в сыворотке крови титрометрическим методом, уметь применять тест с диагностической целью.

Принцип метода основан на способности индикатора мурексида образовывать с ионами кальция в щелочной среде комплексное соединение, окрашенное в красно-фиолетовый или бледно-розовый цвет (в зависимости от концентрации). При титровании раствором более сильного комплексообразователя этот комплекс разрушается, и связанный мурексид освобождается, что приводит к появлению его исходной окраски (фиолетовой или бледно-сиреневой).

Порядок выполнения работы:

В колбу или стаканчик для титрования внести 50 мл дистиллированной воды, 10 капель 9 н.раствора NaOH и прибавить несколько крупинок мурексида. Тотчас появляется бледно-сиреневая окраска, обусловленная цветом самого индикатора. Объем пробы делят пополам: одну часть оставляют в качестве эталона окраски мурексида, а вторую используют для постановки опыта. Для этого ко второй части раствора добавляют 1 мл (20 капель) сыворотки крови, что приводит к появлению бледно-розового окрашивания, обусловленного образованием мурексидно-кальциевого комплекса. Смесь немедленно титруют раствором трилона Б до возвращения исходной окраски индикатора (конец титрования устанавливают сравнением окраски опытной и эталонной проб).

Расчет ведут по формуле:

$$X = 7,2 \cdot A, \text{ мг\%, где}$$

A – количество мл трилона Б, пошедшего на титрование.

Для выражения результатов в ммоль/л найденную величину (X мг%) умножают на 10 (переход к 1 литру) и делят на 40 (молярная масса Ca).

Клинико-диагностическое значение: в норме содержание кальция в сыворотке крови составляет 9-11 мг% (2,25-2,75 ммоль/л), у новорожденных уровень кальция колеблется в пределах 1,9-3,4 ммоль/л.

Гиперкальциемия имеет место при гиперпаратиреозе, злокачественных опухолях с метастазированием в кости, гипервитаминозе Д, лейкозах, сердечной недостаточности, акромегалии и других поражениях.

Гипокальциемия возникает при тяжелых формах рахита, остеомалации, хронических заболеваниях почек, черепно-мозговых травмах, хроническом гипопаратиреозе, патологическом течение беременности.

Работа 27. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАГНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Цель работы: освоить унифицированный метод количественного определения магния в биологических жидкостях. Знать клинико-диагностическое значение константы.

Принцип метода основан на способности магния с раствором Магона (1-оксиазо-2-нафтол-3-2,4-диметил-карбоксианилида) образовывать в щелочной среде окрашенный комплекс.

Интенсивность окрашивания пропорциональна содержанию магния в сыворотке крови.

Порядок выполнения работы:

Ставится 3 пробирки: опытная, контрольная и стандартная. В сухую пробирку внести каплю сыворотки крови, добавить 2 мл рабочего раствора реактива Магона и содержимое пробирки перемешать. Параллельно поставить контроль. В контрольной пробирке к 1 капле дистиллированной воды добавить 2 мл рабочего раствора реактива. Стандартная: к 1 капле стандартного раствора магния добавить 2 мл рабочего раствора Магона.

Проколориметрировать в кюветах 0,5 см на ФЭК-М при синем свето-фильтре опытную и стандартную пробирки против контрольной.

Количество магния в сыворотке крови определить по формуле:

$$X = \frac{A}{B} \cdot 0,823 \text{ ммоль/л, где}$$

A – оптическая плотность опытной пробы,

B – оптическая плотность стандартной пробы.

Данные оформить в виде протокола.

Клинико-диагностическое значение. Содержание магния в сыворотке крови составляет 0,75-1,25 ммоль/л (1,6 -2,3 мг%). Магний относится к незаменимым факторам питания. Суточная потребность составляет 0,2-0,3 г/сутки. Содержится магний внутриклеточно и участвует в создании внутриклеточного осмотического давления.

Роль магния:

1. Составной компонент костей скелета и зубов.
2. Активатор ряда ферментных систем (гликолиза, β -окисления жирных кислот, метаболизма фосфолипидов, аминокислот).
3. Участвует в репарации ДНК.

Основные пути выведения магния: почки и кишечник. В плазме крови магний присутствует в 2-х формах: ионизированный магний – 80% и связанный с белками – 20%.

Нарушения обмена магния: в клинической практике чаще встречается гипомагниемия ($< 0,75$ ммоль/л). Она имеет место при избыточной потере магния (при диарее) или при недостатке его в пище, при токсикозе беременных, раке, хронической сердечной недостаточности. Проявляются нарушением нервномышечного тонуса (мышечная дрожь, тетания), спутанностью сознания.

Гипермагниемия (больше 1,25 ммоль/л) имеет место при хронической почечной недостаточности, при атеросклерозе.

Работа 28. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Цель работы: ознакомиться на практике с унифицированным методом количественного определения железа в биологических жидкостях. Знать клинико-диагностическое значение теста.

Принцип метода основан на способности восстановленного железа (Fe^{2+}) после осаждения белков давать со специальным реактивом устойчивый комплекс красного цвета. Интенсивность развивающегося окрашивания пропорциональна содержанию железа.

Порядок выполнения работы:

К 1 мл сыворотки крови добавить из бюретки 1 мл осадителя белков (смесь тиогликолевой, трихлоруксусной и соляной кислот. Смесь ядовита!).

Содержимое пробирки перемешать и оставить на 5 минут для осаждения. Затем отцентрифугировать в течение 10 минут при 3 тыс. оборотов. Центрифугат слить в чистую пробирку. В другую пробирку отмерить 20 капель центрифугата, добавить 20 капель реактива для определения железа и через 10 минут фотометрировать против осадителя белков при толщине кюветы 0,5 см при зеленом светофильтре.

Параллельно опытной ставится проба с эталонным раствором железа: к 10 каплям эталонного раствора добавить 10 капель осадителя белков и 20 капель реактива.

Рассчитать содержание железа в сыворотке крови по формуле:

$$X = \frac{A}{B} \cdot 17,9 \text{ ммоль/л, где}$$

A – оптическая плотность опытной пробы,

B – оптическая плотность стандартной пробы,

17,9 – коэффициент пересчета.

Клинико-диагностическое значение. В норме содержание железа составляет 11-25 мкмоль/л сыворотки крови. Повышение уровня железа (гиперсидерия) имеет место при гемолитической анемии, острых и хронических инфекциях, циррозе печени, злокачественных новообразованиях, гемолитической желтухе, уремии.

Снижение уровня железа (гипосидерия) имеет место при недостаточном поступлении железа с пищей, острых и хронических кровопотерях, при беременности.

Работа 29. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО МЕТОДУ АССЕЛЯ

Цель работы: научиться определять небелковый азот сыворотки крови. Знать содержание остаточного азота в сыворотке крови в норме и возможные причины отклонений.

Принцип метода колориметрического определения остаточного азота с реактивом Несслера основан на цветной реакции между аммиаком, образующимся при сжигания безбелкового фильтрата крови, и реактивом Несслера с образованием продуктов желто-оранжевого цвета.

Работа проводится в три этапа:

1. Осаждение белков и получение безбелкового фильтрата крови.
2. Минерализация безбелкового фильтрата крови.
3. Колориметрическое определение остаточного азота.

Порядок выполнения работы:

I. Осаждение белков. Отмерить в центрифужную пробирку 3 мл осадителя белков (ТХУК), микропипеткой из пальца взять 0,2 мл крови (с соблюдением всех правил асептики), или отмерить 4 капли цитратной крови и перенести ее в центрифужную пробирку с осадителем. Микропипетку тщательно промыть цитратом. Жидкость перемешать, через 10 минут отцентрифуговать в течение 5 минут при 3000 оборотов. Осторожно, не замутив осадка, слить центрифугат в другую пробирку.

II. Минерализация. Отмерить в 2 обыкновенные пробирки по 1 мл центрифугата (опыт), а в 2 другие по 1 мл дистиллированной воды (контроль). В каждую пробирку добавить по 3 капли концентрированной серной кислоты и выпарить на песчаной бане до обесцвечивания жидкости. Для ускорения процесса сжигания можно добавить 2-3 капли пергидроля (осторожно, пробирку держать от себя!).

III. Титрование. После сжигания добавить во все пробирки по 7 мл дистиллированной воды, по 3 мл 10% NaOH и 10 капель реактива Несслера. Жидкость в опытных пробирках окрашивается. Контрольные пробирки остаются практически бесцветными.

Из микробюретки стандартным раствором сульфата аммония оттитровать контрольную пробирку до получения окраски, одинаковой по интенсивности с опытной пробиркой.

По количеству стандартного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, пошедшего на титрование контроля, определить количество остаточного азота, содержащегося в опыте. (1 мл стандартного раствора соответствует 0,05 мг азота).

Расчет остаточного азота в ммоль/л аммиака проводят по формуле:

$$X = A \cdot 43,9 \text{ ммоль/л, где}$$

X – содержание остаточного азота в образце крови.

A – мл сернокислого аммония, пошедшего на титрование,
43,9 – коэффициент пересчета.

Данные оформить в виде протокола.

Клинико-диагностическое значение метода:

В норме содержание остаточного азота крови составляет 14-25 ммоль/л. Во фракцию остаточного азота входят промежуточные и конечные продукты обмена белков: мочевины, мочевая кислота, креатин, креатинин, билирубин, индикан, аммиак, аминокислоты, полипептиды, нуклеотиды.

Главным компонентом является мочевины, она составляет 50% остаточноазотной фракции.

Остаточный азот крови характеризует состояние выделительной функции почек и мочевинообразующей функции печени.

Повышение остаточноазотной фракции (азотемия) бывает 2-х типов: продукционная, обусловленная сверхобразованием азотистых шлаков, и ретенционная, вызванная задержкой в организме вследствие почечной недостаточности.

Азотемия имеет место при поражении почек, печени, усиленном распаде тканевых белков, поражении мочевыводящих путей, при обширных ожогах, сгущении крови, при расстройствах водно-электролитного обмена.

Уменьшение остаточного азота крови наблюдается при тяжелой почечной недостаточности, голодании, беременности.

Работа 30. КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ БИЛИРУБИНА ДИАЗОРЕАКЦИЕЙ ЭРЛИХА

Цель работы: уметь открывать присутствие билирубина в сыворотке крови.

Принцип метода основан на способности прямого билирубина давать с диазореактивом Эрлиха розовое окрашивание.

Порядок выполнения работы:

В пробирку внести 20 капель сыворотки крови и добавить 5 капель диазореактива Эрлиха. При наличии прямого (связанного с глюкуроновой кислотой или сульфатом) билирубина сыворотка приобретает розовое окрашивание.

При отсутствии окраски внести в пробирку 20 капель сыворотки крови, добавить 2 мл спирта, тщательно встряхнуть для осаждения белков и отцентрифугировать осадок. К надосадочной жидкости добавить 5 капель диазореактива Эрлиха, и смесь приобретает розовое окрашивание (открытие «непрямого» свободного билирубина).

Оформить полученные данные.

Диагностическое значение: В норме в крови качественной реакцией открываются только «непрямой» билирубин. Появление «прямого» конъюгированного билирубина свидетельствует о поражении печени (паренхиматозная или обтурационная желтуха)

Работа 31. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Цель работы: освоить метод количественного определения билирубина в сыворотке крови. Знать клинико-диагностическое значение метода.

Принцип метода основан на цветной реакции, которую дает билирубин с диазореактивом Эрлиха. Интенсивность развивающегося розового окрашивания пропорциональна количеству билирубина в сыворотке крови.

Порядок выполнения работы:

Приготовить 6 чистых пробирок, в 1-ю налить 2 мл сыворотки крови, во все остальные по 1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Из первой пробирки перенести во 2-ю 1 мл сыворотки, тщательно перемешать и 1 мл раствора перенести в 3-ю пробирку и так до 6-й пробирки, из которой 1 мл смеси вылить.

Во все пробирки добавить по 20 капель спирта, тщательно встряхнуть и добавить по 20 капель диазореактива Эрлиха. Перемешать и наблюдать окраску. Пробирка, дающая едва заметное розовое окрашивание, содержит 0,16 мг% билирубина.

Рассчитать содержание билирубина в данном образце крови по формуле:

$$X = A \cdot 0,16 \cdot 17,1 \text{ мкмоль/л, где}$$

X – содержание билирубина в образце крови.

A – разведение сыворотки в пробирке, где улавливается розовое окрашивание.

0,16 и 17,1 – коэффициенты пересчета.

Пример расчета: розовое окрашивание улавливается в четвертой пробирке, где разведение сыворотки в 8 раз. Содержание билирубина:

$$8 \cdot 0,16 \cdot 17,1 = 22,7 \text{ мкмоль/л}$$

Данные оформить в виде протокола.

Работа 32. **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО («ПРЯМОГО» И «НЕПРЯМОГО») БИЛИРУБИНА ПО МЕТОДУ ЕНДРАШИКА и соавт.**

Цель работы: освоить метод определения общего билирубина с диазореактивом Эрлиха. Содержание «непрямого» билирубина определяется по разнице между общим билирубином и «прямым».

Порядок выполнения работы:

В 3 пробирки внести по 10 капель сыворотки крови, разведенной 0,9% раствором хлорида натрия 1:1. В одну пробирку (определение «прямого» билирубина) добавить 2 мл 0,9% хлорида натрия и 5 капель диазореактива Эрлиха. Встряхнуть и оставить на 20 минут для развития окраски.

Во вторую пробирку добавить 2 мл кофеинового реактива и 5 капель диазореактива Эрлиха (определение общего билирубина). В третью пробирку (контроль) добавить 2 мл кофеинового реактива и 5 капель 0,9% хлорида натрия. Все пробирки встряхнуть и оставить на 20 минут при комнатной температуре для развития окраски.

Проколориметрировать первую и вторую пробирки на ФЭК-М при зеленом светофильтре против контроля. Если окрашивание в пробирках очень слабое, добавить во все пробирки по 3 капли 30% гидроксида натрия.

Рассчитать содержание общего (пробирка № 2) и «прямого» (пробирка №1) билирубина. Разница между общим и «прямым» билирубином – это «непрямой» билирубин сыворотки крови.

Расчет ведется по формуле:

$$X = A \cdot 11,5 \cdot 17,1 \text{ ммоль/л, где}$$

A – показатель экстинкции,

11,5 и 17,1 – коэффициенты пересчета.

Оформить полученные данные.

Клинико-диагностическое значение:

В норме содержание общего билирубина в сыворотке крови колеблется в пределах 1,7-20,5 мкмоль/л, 75% приходится на «непрямой» билирубин, его иногда называют «свободным».

Гипербилирубинемия имеет место при всех видах желтух: гемолитической, паренхиматозной, обтурационной, при физиологической новорожденных.

При физиологической желтухе новорожденных и всех типах гемолитических желтух в сыворотке растет содержание «непрямого» билирубина, который в мочу не попадает.

При печеночных желтухах в крови появляется «прямой» билирубин за счет нарушения целостности паренхимы печени. В моче появляется билирубин.

При механических желтухах в сыворотке увеличивается содержание как «непрямого», так и «прямого» билирубина. В моче также появляется билирубин.

Активные формы кислорода (АФК)

АФК - группа стабильных промежуточных продуктов восстановления кислорода, обладающая высокой химической активностью. Эти продукты образуются в клетке как ферментативным (в основном), так и неферментативным путем при неполном (одно-, двух- и трехэлектронном) восстановлении кислорода. Доля активных форм кислорода в организме невелика, не более 2-5% потребляемого в сутки кислорода переходит в активные формы.

К активным формам кислорода относят:

$^1\text{O}_2$ – синглетный кислород, у него, в отличие от молекулярного (представляющего собой бирадикал с двумя неспаренными электронами с параллельными спинами, которые располагаются на разных орбиталях), все электроны спарены. Молекула активна, но неустойчива.

$\text{O}_2^{\bullet -}$ – супероксидный анион-радикал (супероксидный кислород), продукт одноэлектронного восстановления кислорода;

HO^\bullet – гидропероксидный радикал;

H_2O_2 – пероксид водорода;

HO^\bullet – гидроксидный радикал.

Окислительная способность АФК:



АФК возникают в организме при взаимодействии кислорода с металлопротеинами, содержащими катионы металлов в низших степенях окисления (гемоглобин, цитохромы), получая от них электроны; при радиолизе воды, при переносе электронов по дыхательной цепи (на стадии убихинона).

АФК выполняют важнейшие функции в поддержании гомеостаза организма, участвуют в биосинтезе иодтиронинов, катехоламинов, простагландинов, окислительном разрушении ксенобиотиков, в реализации бактерицидного действия фагоцитов. Активные формы кислорода вызывают перекисное окисление липидов биологических мембран (ПОЛ). ПОЛ увеличивает полярность жирных кислот, они вытесняются на поверхность мембраны. Это меняет проницаемость биологических мембран, способствует их обновлению. При усилении процессов ПОЛ нарушается структура и функция белков, нуклеиновых кислот, клетка гибнет. Являясь активными окислителями, АФК представляют серьезную опасность для клетки. Отщепляя электроны от многих соединений, они превращают их в свободные

радикалы и инициируют цепные окислительные реакции. С токсическим действием АФК, прямым или опосредованным через ПОЛ, связано возникновение многих заболеваний и патологических синдромов (атеросклероз, некроз тканей, хронические воспаления, дегенеративные процессы в сетчатке и хрусталике глаза, в нервной системе).

В противовес активным формам кислорода (они образуют оксидантную систему) в организме работает антиоксидантная система (АОС).

АОС – комплекс веществ, обеспечивающих защиту клеток от активных форм кислорода. Она представлена ферментативным компонентом (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы) и неферментативным (жирорастворимые витамины, особенно Е и К, витамин С, глутатион, билирубин и др). Ферменты АОС устраняют активные формы кислорода, разрушая их, а неферментативные компоненты улавливают свободные электроны, инактивируют АФК и прерывают цепные реакции неконтролируемого перекисного окисления липидов.

Г л а в а 2.

БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ

Цель изучения раздела: изучить химический состав печеночной ткани, биологические функции, роль печени в метаболизме белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот. Освоить основные лабораторные методы диагностики различных типов печеночной патологии. Уметь объяснять результаты биохимических тестов, используемых в клинической практике.

Основные вопросы раздела:

1. Биологические функции печени.
2. Роль печени в метаболизме основных классов органических соединений.
3. Детоксикационная функция печени, обезвреживание эндогенных и чужеродных веществ печенью, типы химических реакций обезвреживания.
4. Основные типы печеночной патологии, биохимические методы их диагностики.

Печень – «центральная биохимическая лаборатория» организма, выполняющая ряд жизненно важных функций, главными из которых являются белоксинтезирующая, дезинтоксикационная, депонирующая и экскреторная.

Нарушение этих функций приводит к изменению гомеостаза, следствием чего является нарушение химического состава крови: изменяется концентрация метаболитов, активность ряда ферментов, страдает гемостаз, появляются необезвреженные эндогенные и чужеродные вещества.

Болезни печени включают группу заболеваний, различных по этиологии, патогенезу, морфологическим изменениям, клиническим проявлениям. Несмотря на разнородность этих нарушений клинико-биохимические сдвиги имеют много общего. Выделяют 4 типа печеночной патологии:

Синдром раздражения печеночного ретикулоэндотелия (воспалительный синдром). Для него характерно:

- увеличение в сыворотке крови глобулиновых фракций (белки "острой фазы") и снижение содержания альбуминов (подавление синтеза гепатоцитом за счет интоксикации) без изменения содержания общего белка крови,
- положительные пробы коллоидной устойчивости (сулемовая, кадмиевая, лента Вельтмана, тимоловая). Это обусловлено характерными

количественными изменениями глобулиновых фракций, уменьшением содержания альбуминов и увеличением содержания грубодисперсных подфракций глобулиновых белков.

Синдром нарушения целостности гепатоцита (синдром цитолиза).

Повреждение клетки приводит к быстрому выбросу в кровь ее компонентов. Для этого синдрома характерно:

- повышение в сыворотке крови активности печеночно специфических ферментов-АЛТ и АСТ при уменьшении коэффициента де Ритиса, альдолазы, глутаматдегидрогеназы, карбамоилфосфаттрансферазы, фруктозе-1-фосфатаальдолазы и др.,
- гипербилирубинемия в основном за счет смешанного билирубина (свободного и конъюгированного),
- снижение содержания альбуминов, падение коэффициента А/Г,
- повышение в сыворотке содержания железа.

Синдром холестаза (экскреторно-биллиарный, застоя желчи).

Для этого синдрома характерно:

- повышение в сыворотке крови активности щелочной фосфатазы,
- гипербилирубинемия, в основном за счет прямого, конъюгированного билирубина,
- гиперхолестеринемия, увеличение в крови содержания ЛПНП и снижение концентрации ЛПВП.

Синдром гепатоцеллюлярной недостаточности. Для него характерно:

- снижение активности холинэстеразы,
- гипопротеинемия и диспротеинемия со значительной гипоальбуминемией,
- снижение содержания протромбина и других плазменных факторов свертывания крови,
- гипербилирубинемия смешанного типа,
- гипохолестеринемия, уменьшение содержания этерифицированного холестерина.

При тяжелой печеночной патологии нарушается мочевинообразующая функция печени, возникает гипераммониемия, резко нарушаются процессы гемокоагуляции.

Разработаны многочисленные биохимические тесты, позволяющие диагностировать различные типы печеночной патологии.

Работа 33. ТИМОЛОВАЯ ПРОБА

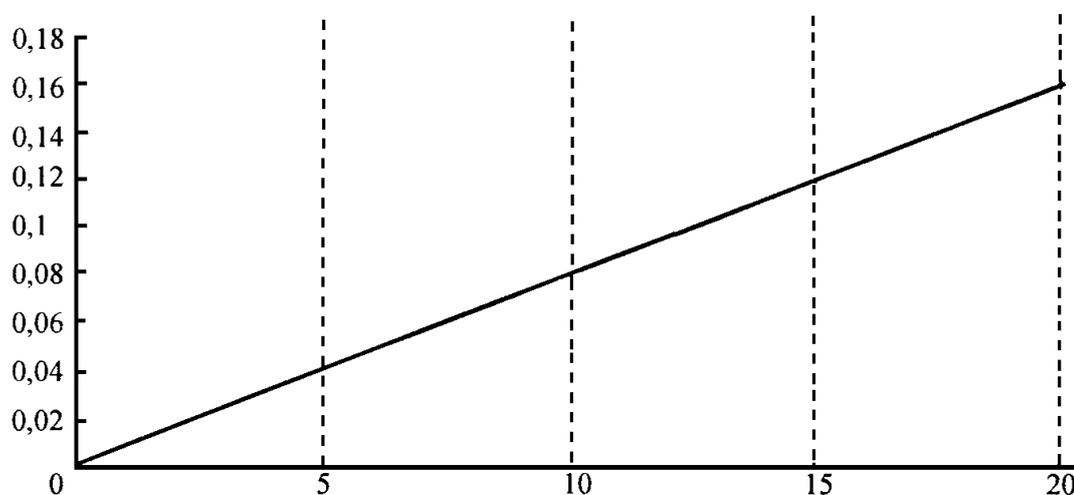
Принцип метода основан на способности сывороточных глобулинов осаждаться при рН 7,55 тимоловым реактивом и вызывать помутнение реакционной смеси, интенсивность которого зависит от стабильности глобулиновых белков.

Порядок выполнения работы:

В 2 пробирки (опытная и контрольная) внести по 3 мл тимолового реактива. В опытную пробирку добавить 1 каплю сыворотки крови, в контрольную - 1 каплю физиологического раствора.

Содержимое обеих пробирок перемешать и оставить на 30 минут для осаждения белков. Измерить оптическую плотность опытной пробы против контроля при красном светофильтре и толщине кюветы 0,5 см.

По стандартной кривой рассчитать единицы помутнения.



Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Диагностическое значение: В норме тимоловая проба составляет 0-5 единиц помутнения, что считается отрицательной тимоловой пробой.

Диагностическое значение имеет увеличение показателя помутнения (положительная тимоловая проба). Тимоловая проба – это тест, позволяющий диагностировать «синдром воспаления», сопровождающий многие поражения печеночной паренхимы. Проба в 90-100% случаев положительна при токсическом, инфекционном, вирусном гепатите, причем еще в преджелтушной стадии и при безжелтушных формах течения заболевания. Чем тяжелее поражение печени, тем выше показатель помутнения при тимоловой пробе.

Положительная тимоловая проба обусловлена количественным изменением соотношения глобулиновых фракций плазменных белков или уменьшением количества альбуминов. При этом за счет поражения печени меняется и коллоидная устойчивость всех типов плазменных белков.

Работа 34. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ (ЩФ) СЫВОРОТКИ КРОВИ

Принцип метода основан на способности фермента гидролизовать эфир пара-нитрофенилфосфат с высвобождением пара-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна активности фермента.

Порядок выполнения работы:

К 1 мл рабочего раствора, содержащего пара-нитрофенилфосфат, добавить 2 капли сыворотки крови и инкубировать в течение 4 минут при температуре 37°C. Определить интенсивность развившегося желтого окрашивания колориметрированием при фиолетовом светофильтре и толщине кюветы 3 мм. **Расчет активности:**

$$E_{оп.} \cdot 2764/4 = E_{оп.} \cdot 691 \text{ ед/л/мин, где}$$

$E_{оп.}$ – оптическая плотность реакционной смеси,

4 – время инкубации в минутах,

2764 – фактор пересчета.

Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Диагностическое значение: В норме активность щелочной фосфатазы колеблется в пределах 100-120 ед/л/мин у взрослых и 120-300 ед/л/мин у детей первых 3 лет жизни.

Резкое увеличение активности имеет место при холестазах, при циррозе печени, механической желтухе, первичных и метастазированных опухолях печени. Повышается активность ЩФ при заболеваниях, сопровождающихся повреждением паренхимы печени: вирусных гепатитах, туберкулезе, лимфогранулематозе.

Вторая группа заболеваний, вызывающих повышение активности фермента - поражение костной ткани: рахит, распад костной ткани, остеосаркомы, а также при метастазах опухолей в костную ткань

Работа 35. ОПРЕДЕЛЕНИЕ В МОЧЕ СВОБОДНЫХ И АЦЕТИЛИРОВАННЫХ ФОРМ СУЛЬФАНИЛАМИДОВ

Цель работы: научиться определять количество общего и свободного сульфаниламида в моче и с помощью этого анализа оценивать способность печени к биотрансформации лекарственных средств.

Принцип метода основан на способности свободных (неконъюгированных) сульфаниламидных препаратов образовывать окрашенный комплекс с нитритом натрия, ацетатом натрия и резорцином.

Порядок выполнения работы:

В две пробирки налить по 1 мл исследуемой мочи, а в третью –1 мл дистиллированной воды (контроль). Во все пробирки добавить по 1,5 мл дистиллированной воды и по 5 капель 10% соляной кислоты.

1-ю пробирку, в которой будет определяться, общее количество сульфаниламида, выделяемого с мочой, поставить на 15 минут в кипящую водяную баню для гидролиза ацетилированной формы. Пробирку охладить. Во все три пробирки добавить по 2 капли 0,5% нитрита натрия, перемешать и оставить на 10 минут. Затем во все пробирки долить по 1,5 мл насыщенного раствора ацетата натрия и по 5 капель 0,5% раствора резорцина. Содержимое пробирок тщательно перемешать и оставить на 15 минут для развития окраски. На фотоэлектроколориметре (ФЭКе) измерить экстинкцию растворов в 1-ой (E_1 , – общий сульфаниламид) и 2-ой (E_2 – свободный сульфаниламид) пробирках против контроля (3-я пробирка) при синем светофильтре и рабочей толщине кювет 0,5 мм.

Расчет содержания ацетилированной формы сульфаниламида:

$$X = \frac{(E_1 - E_2) \cdot 100}{E_1}, \text{ где}$$

X – содержание ацетилированной формы сульфаниламидного препарата, %,

E_1 – общий сульфаниламид,

E_2 – свободный сульфаниламид.

Клинико-диагностическое значение: по количеству ацетилированного препарата оценивают детоксикационную функцию печени, поскольку конечной стадией биотрансформации сульфаниламидных препаратов является их конъюгация и образование ацетилированных производных.

Канцерогенез – механизм возникновения и развития опухоли. В основе злокачественного перерождения лежит неконтролируемая клеточная пролиферация, сопровождающаяся нарушением клеточной дифференцировки. Причина этих нарушений – структурные изменения в регуляторных генах ДНК, кодирующих белки, которые регулируют рост, деление и гибель клетки. Мутации регуляторных генов приводят к синтезу белков с утраченной регуляторной функцией, к синтезу онкобелков.

Причина онкогенеза (в 80% случаев) – воздействие мутагенных факторов. Факторы, вызывающие изменение генетической программы, называются канцерогенными, их 3 группы:

- 1) физические – R-лучи, УФ-лучи, γ -лучи;
- 2) биологические – онковирусы;
- 3) химические – полициклические ароматические углеводороды, ароматические амины, нитрозамины, афлотоксины, митотоксины, некоторые неорганические вещества и др.

Канцерогенез, обусловленный химическими веществами, – химический канцерогенез. Проканцероген – химическое вещество, не обладающее канцерогенным действием, способное в ходе реакций обезвреживания в печени приобретать канцерогенные свойства.

Механизм действия химических канцерогенов:

- 1) встраиваются между цепями ДНК и нарушают процесс транскрипции;
- 2) связываются с азотистыми основаниями ДНК, вызывают их модификацию;
- 3) связывают регуляторные белки, ингибируют ферментные системы транскрипции;
- 4) метилируют азотистые основания ДНК, нарушают репликацию.

Последствия повреждения ДНК – трансформация нормальной клетки в опухолевую. Этапы трансформации:

- 1) инициация: повреждение ДНК имеет место в одной клетке, что может привести к репарации, апоптозу или дальнейшей трансформации,
- 2) промоция опухоли – идет усиленный апоптоз, погибшие клетки замещаются в основном опухолевыми,
- 3) прогрессия – идет размножение только опухолевых клеток, злокачественно перерожденная клетка меняет форму, не подчиняется правилу контактного торможения, в ней изменяется метаболизм, появляется способность к инвазии и метастазированию.

Г л а в а 3.

БИОХИМИЯ МОЧИ

Цель изучения раздела: изучить химический состав мочи в норме, научиться определять патологические составные части мочи и объяснить причину их появления. Уяснить значение биохимического анализа мочи для характеристики функционального состояния почек, характеристики метаболических процессов в тканях в норме, для выяснения характера патологического процесса в тканях, для суждения о природе заболевания и эффективнее™ лечения.

Основные вопросы раздела:

1. Моча – как показатель поддержания гомеостаза в организме.
2. Химический состав мочи в норме.
3. Патологические компоненты мочи.

Моча – биологическая жидкость, вырабатываемая почками. С мочой из организма удаляются конечные продукты обмена веществ (шлаки), избыток воды и солей, токсические вещества, поступающие в организм извне или образующиеся в ходе метаболизма. Образование и отделение мочи является составной частью поддержания гомеостаза организма. Моча здорового человека прозрачна, цвет ее колеблется от соломенно-желтого до темно-желтого. Интенсивность окраски зависит от плотности мочи и величины суточного диуреза. С мочой в норме выделяется около 150 различных химических веществ: органических (мочевина, мочева кислота, креатинин, аминокислоты, гиппуровая кислота, органические сульфаты, пигменты, витамины и др.) и минеральных (натрий, калий, кальций, магний, аммиак, хлориды, бикарбонаты, фосфаты, неорганические сульфаты и др.).

При нарушении функции почек при метаболических расстройствах в тканях в моче появляются в доступных для определения лабораторными методами количествах: глюкоза (глюкозурия), фруктоза (фруктозурия), белки (протеинурия), кетоновые тела (кетонурия), билирубин (билирубиноурия), кровь (гематурия). Кроме того, при наследственных нарушениях обмена веществ в моче могут появляться гомогентизиновая и фенилпировиноградная кислоты, порфирины и др. нетипичные продукты. С мочой выводятся токсические вещества, попадающие в организм извне.

Работа 36. ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH МОЧИ

Цель работы: научиться определять pH мочи. Принцип метода основан на изменении окраски индикаторной бумаги в зависимости от реакции среды мочи.

Порядок выполнения работы:

На полоску индикаторной бумаги нанести 1-2 капли исследуемой мочи. Сравнить развивающуюся окраску с эталонной шкалой и записать pH исследуемой мочи.

Клинико-диагностическое значение:

pH мочи зависит от характера диеты и колеблется в пределах 5,0-7,0 в норме. При сахарном диабете, голодании, лихорадочных состояниях pH сдвигается в кислую сторону, а при воспалении мочевыводящих путей, сильной рвоте – в щелочную.

Работа 37. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРАЦИОННОЙ КИСЛОТНОСТИ МОЧИ ПО МЕТОДУ ФОЛИНА

Цель работы: научиться определять титрационную кислотность мочи для характеристики суммарного выделения кислых шлаков.

Принцип работы основан на титрометрическом определении суммарного количества кислореагирующих продуктов мочи.

Порядок выполнения работы:

В стаканчик на 100 мл отмерить 10 мл мочи и 1-2 капли фенолфталеина, жидкость хорошо перемешать и затем оттитровать 0,1н раствором гидроксида натрия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 1

мин. Кислотность мочи выражается количеством мл 0,1 н раствора едкого натра, необходимого для нейтрализации кислореагирующих веществ, содержащихся в моче, собранной за сутки.

Расчет титрационной кислотности проводится по формуле:

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

A - мл 0,1 н. NaOH на титрование пробы,

B - суточное количество мочи,

10 - объем титруемой пробы мочи.

Выражается титрационная кислотность мочи в титрационных единицах.

Данные оформить в виде протокола.

Клинико-диагностическое значение: Общее количество кисло реагирующих веществ мочи составляет в норме 200-500 ТЕ, в зависимости от состава пищи. При мясной диете титрационная кислотность мочи возрастает, приближаясь к 500 ТЕ, а при растительной – падает. При голодании, сахарном диабете, поражении почек титрационная кислотность резко возрастает и достигает 800-1000 ТЕ, а при введении в организм больших количеств бикарбоната натрия снижается до 100 ТЕ.

Работа 38. **КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ МОЧИ**

Цель работы: научиться открывать в моче присутствие белка, сахара, кетоновых тел, желчных пигментов, крови. Уметь количественно определять содержание в моче глюкозы и белка.

Знать причины появления патологических компонентов в моче, диагностическое и прогностическое значение.

А. Качественное определение белка в моче.

Принцип основан на способности белка осаждаться из раствора при определенных условиях.

Порядок выполнения работы:

Проба кипячением:

Профильтрованную мочу (20 капель) нагреть до кипения в пробирке. Образовавшийся при этом осадок представляет собой белок или фосфаты. К горячему раствору добавить 1-2 капли 1% раствора уксусной кислоты. Если осадок растворяется при подкислении мочи, он образован фосфатами; если это белок, осадок свертывается и оседает на дно пробирки.

Проба Геллера:

В пробирку налить 20 капель концентрированной азотной кислоты и затем осторожно наслоить примерно равный объем профильтрованной мочи из пипетки по стенке пробирки так, чтобы жидкости не смешивались. Необходимо наслаивать мочу на $\text{H}^+\text{Ю}_3$, а не наоборот, так как азотная кислота имеет большой удельный вес. При наличии белка в моче на границе раздела появляется осадок в виде кольца.

Б₁. Количественное определение белка в моче по методу Робертса-Стольников-Бранберга

Принцип основан на способности белка осаждаться из раствора концентрированной азотной кислотой, в избытке кислоты осадок белка не растворяется.

Порядок выполнения работы:

В пробирку налить 20-30 капель концентрированной азотной кислоты с хлористым натрием, туда же осторожно по стенке слегка наклоненной пробирки наслоить из пипетки профильтрованную мочу.

Моча благодаря меньшему удельному весу, наслаивается на кислоту. На границе раздела жидкостей при наличии белка появляется белое колечко, толщина и быстрота появления которого зависит от количества белка.

Экспериментально установлено, что растворы, содержащие 0,033 г/л белка, дают мутное белое колечко в конце 2-й, начале 3-й минуты после наслаивания.

Если колечко появилось непосредственно после наслаивания мочи, то повторяют эту реакцию с мочой, предварительно сделав разведение. Путем последовательного разведения мочи и наслаивания ее на азотную кислоту достигают такого максимального разведения мочи, при котором кольцо появляется между 2-й и 3-й минутой. Это соответствует наличию 0,033 г/л белка. Умножая эту цифру на разведение мочи, получают содержание белка в моче.

Например, колечко появилось через 2 минуты, когда моча была разведена в 30 раз, следовательно, белка содержится $0,033 \cdot 30 = 0,99$ г/л.

Данные оформить в виде протокола.

Б₂. Количественное определение белка в моче пробой с сульфосалициловой кислотой

Принцип основан на способности сульфосалициловой кислоты осаждать белок в низких концентрациях с образованием суспензии, вызывающей помутнение раствора.

Порядок выполнения работы:

Мочу профильтровать через воронку с бумажным фильтром, индикаторной бумагой проверить рН. Если реакция среды щелочная, подкислить соляной или уксусной кислотой.

При заведомо высокой концентрации белка (качественное открытие) мочу предварительно развести в 2-10 раз.

В 2 чистые пробирки (опытная и контрольная) налить по 1 мл подготовленной мочи. В опытную пробирку добавить 3 мл 3% раствора сульфосалициловой кислоты, а в контрольную – 3 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Обе пробирки оставить при комнатной температуре на 5 минут (идет реакция осаждения) и проколориметрировать содержимое опытной пробирки на ФЭКе при рабочей длине кюветы 5 мм при красном светофильтре против контрольной.

По калибровочной таблице определить содержание белка в исследуемой моче. Если моча была предварительно разведена, полученные данные умножить на разведение.

Полученные результаты оформить в виде протокола, сделать вывод.

Таблица для определения белка с сульфосалициловой кислотой (N – в моче белок отсутствует)

Е _{оп}	г/л	Е _{оп}	г/л	Е _{оп}	г/л	Е _{оп}	г/л
0,01	0,025	0,33	0,64	0,65	1,26	0,97	1,90
0,02	0,050	0,34	0,66	0,66	1,28	0,98	1,92
0,03	0,075	0,35	0,68	0,67	1,30	0,99	1,94
0,04	0,10	0,36	0,70	0,68	1,32	1,0	1,96
0,05	0,12	0,37	0,72	0,69	1,34	1,1	1,98
0,06	0,14	0,38	0,74	0,70	1,36	1,2	2,0
0,07	0,16	0,39	0,75	0,71	1,38	1,3	2,2
0,08	0,18	0,40	0,76	0,72	1,40	1,4	2,4
0,09	0,20	0,41	0,78	0,73	1,42	1,5	2,6
0,10	0,22	0,42	0,80	0,74	1,44	1,6	2,8
0,11	0,24	0,43	0,82	0,75	1,46	1,7	3,0
0,12	0,25	0,44	0,84	0,76	1,48	1,8	3,2
0,13	0,26	0,45	0,86	0,77	1,50	1,9	3,4
0,14	0,28	0,46	0,88	0,78	1,52	2,0	3,6
0,15	0,30	0,47	0,90	0,79	1,54	2,1	3,8
0,16	0,32	0,48	0,92	0,80	1,56	2,2	4,0
0,17	0,34	0,49	0,94	0,81	1,58	2,3	4,2
0,18	0,35	0,50	0,96	0,82	1,60	2,1	4,4
0,19	0,36	0,51	0,98	0,83	1,62	2,5	4,6
0,20	0,38	0,52	1,00	0,84	1,64	2,6	4,8
0,21	0,40	0,53	1,02	0,85	1,66	2,7	5,0
0,22	0,42	0,54	1,04	0,86	1,68	2,8	5,2
0,23	0,44	0,55	1,06	0,87	1,70	2,9	5,4
0,24	0,46	0,56	1,08	0,88	1,72	3,0	5,6
0,25	0,48	0,57	1,10	0,89	1,74	3,1	5,8
0,26	0,50	0,58	1,12	0,90	1,76	3,2	6,0
0,27	0,52	0,59	1,14	0,91	1,78	3,3	6,2
0,28	0,54	0,60	1,16	0,92	1,80	3,4	6,4
0,29	0,56	0,61	1,18	0,93	1,82	3,5	6,6
0,30	0,58	0,62	1,20	0,94	1,84	3,6	6,8
0,31	0,60	0,63	1,22	0,95	1,86	3,7	
0,32	0,62	0,64	1,24	0,96	1,88	3,8	

Клинико-диагностическое значение:

В нормальной моче белок присутствует в количествах, которые обыч-

ными методами лабораторной диагностики не открываются. Если белок в моче обнаруживается даже в следовых количествах – это протеинурия, которая может быть как функциональной, так и патологической. В мочу чаще попадают белки сыворотки крови (альбумины), поэтому иногда это явление называют альбуминурией.

Почечные протеинурии возникают при остром гломерулонефрите, нефротическом синдроме, токсикозе беременных, нарушениях почечного кровоснабжения, при сердечной недостаточности. Внепочечные протеинурии связаны с поражением мочевыводящих путей, предстательной железы, имеют место при анемиях, заболеваниях печени.

Функциональные протеинурии встречаются у детей раннего возраста, при длительном стоянии (ортостатическая), ходьбе (маршевая).

В₁. Качественное определение глюкозы в моче (Реакция Фелинга)

Принцип основан на способности глюкозы восстанавливать при нагревании в щелочной среде гидроксид меди (II) (голубого цвета) в гидроксид меди (I) (желтого цвета) и оксид меди (I) (красного цвета).

Порядок выполнения работы:

В пробирку внести 20 капель мочи, содержащей глюкозу, и добавить 15-20 капель реактива Фелинга. Пробирку нагреть до кипения и прокипятить в течение 1 минуты, появляется красный осадок оксида меди (I).

Для сравнения проделать реакцию с нормальной мочой.

В₂. Обнаружение сахара в моче с помощью индикатора бумаги «Глюкотест»

Принцип основан на специфическом окислении глюкозы с помощью фермента глюкооксидазы. Высвобождающийся пероксид водорода разлагается пероксидазой и окисляет краситель. Изменение окраски сравнивается с готовой шкалой.

Этот метод позволяет не только обнаруживать глюкозу в моче, но и определить предварительно ее содержание в пределах 1-20 г/л.

Порядок выполнения работы:

В пробирку налить 5-7 мл исследуемой мочи и погрузить в нее окрашенную часть полоски «Глюкотест». Вытащить полоску, положить на чашку Петри и оставить для развития окраски на 2 минуты. Сравнить развивающуюся окраску со стандартной шкалой.

Содержимое глюкозы определить по стандартной шкале.

Сделать заключение.

Г. Количественное определение глюкозы в моче по методу Альтгаузена

Принцип основан на способности глюкозы в щелочной среде при нагревании разрушаться с образованием окрашенных продуктов. Интенсивность развивающегося окрашивания пропорциональна количеству глюкозы, присутствующей в моче.

Порядок выполнения работы:

В пробирку отмерить 4 мл мочи и добавить 20 капель 10% гидроксида натрия. Прокипятить в течение одной минуты и оставить на 10 минут при комнатной температуре для развития окраски.

Интенсивность окрашивания сравнить со стандартной шкалой, представляющей собой таким же образом обработанную мочу, содержащую 5; 10; 15; 20; 30; 40 г/л сахара.

Сделать заключение о содержании сахара в исследуемой моче.

Клинико-диагностическое значение:

В нормальной моче сахар присутствует в количестве 0,20. г/л, что ниже разрешающей способности обычных лабораторных методов диагностики.

Если доступными лабораторными методами в моче обнаружен сахар, это глюкозурия. Различают глюкозурию гипергликемическую и почечную.

При гипергликемической глюкозурии причиной появления сахара в моче является значительная гипергликемия, превышающая порог почечной проницаемости для глюкозы (8-10 ммоль/л). При почечной глюкозурии нарушается способность почки реабсорбировать глюкозу из первичной мочи (ренальный диабет).

При ряде лизосомных болезней, обусловленных врожденными ферментопатиями, в моче могут появиться другие моносахара: фруктоза, галактоза, нейраминовая кислота и др.

Д. Качественное обнаружение в моче крови и кровяных пигментов (бензидиновая проба)

Принцип основан на способности пероксидазы и каталазы крови разрушать перекись водорода до атомарного кислорода, который окисляет бензидин в п-хинондиимид сине-зеленого цвета.

Порядок выполнения работы:

В пробирку налить 20 капель мочи, в которой ожидается присутствие крови, добавить 20 капель раствора бензидина в уксусной кислоте и 5-6 капель пероксида водорода. При наличии кровяных пигментов моча окрашивается в сине-зеленый цвет. Для сравнения сделать пробу с нормальной мочой. Данные оформить в виде протокола.

Клинико-диагностическое значение:

Кровь в моче (гематурия) появляется при нарушении целостности кровеносных сосудов почки и мочевыводящих путей.

При тяжелых инфекционных заболеваниях, отравлениях гемолитическими ядами, ожогах, гемолитических анемиях происходит разрушение эритроцитов, переход гемоглобина в плазму, гемоглобин появляется в моче (гемоглобинурия).

Е. Качественное обнаружение желчных пигментов в моче

Е₁. Проба Родина

Принцип основан на окислении билирубина мочи в биливердин под действием различных реагентов.

Порядок выполнения работы:

В пробирку налить 3 мл мочи и осторожно, по стенке наслоить 10-15 капель 1% раствора йода. Если в моче присутствуют желчные пигменты, то на границе раздела появляется зеленое кольцо биливердина.

Для сравнения проделать пробу с нормальной мочой.

Е₂. Проба Розенбаха

Порядок выполнения работы:

Через маленький фильтр профильтровать 2-3 мл мочи. В конус фильтра внести 1-2 капли концентрированной азотной кислоты.

При наличии в моче желчных пигментов появляются на фильтре окрашенные кольца: фиолетовое, синее, зеленое, красное, желтое.

Первым появляется зеленое кольцо.

Для сравнения проделать пробу с нормальной мочой. Данные оформить в виде протокола.

Клинико-диагностическое значение:

В нормальной моче желчные пигменты лабораторными методами диагностики не обнаруживаются. Желчные пигменты обнаруживаются в моче при паренхиматозной и обтурационной желтухах, когда появляется сообщение между печеночными ходами и кровеносными сосудами вследствие нарушения целостности печеночных клеток или, изменения проницаемости их мембран. В кровь попадает «прямой» (связанный) билирубин. Этот билирубин фильтруется в мочу. Развивается билирубинурия.

Ж. Обнаружение кетоновых тел в моче

Принцип основан на способности кетоновых тел (ацетон, ацетоуксусная, β -гидроксимасляная кислоты) давать цветные реакции с различными реагентами. (Смотри работу № 23)

Клинико-диагностическое значение:

Кетоновые тела в норме образуются в печени здоровых людей из ацетил-КоА. Током крови они поставляются к мышцам, где подвергаются окислению. Обычными методами лабораторной диагностики в моче кетоновые тела не обнаруживаются, т. к. их выведение у здоровых людей не превышает 20-50 мг/сутки. Резкое увеличение кетоновых тел в моче (кетонурия) характерно для сахарного диабета, поскольку при этом активируется кетогенез и развивается кетонемия.

Кетоновые тела определяются в моче при голодании, кахексии, в послеоперационном периоде, при гликогенозах и интоксикациях.

4. БИОХИМИЯ СЛЮНЫ

Цель изучения раздела: усвоить химический состав слюны и ее роль в процессах жизнедеятельности. Уметь находить взаимосвязь между нарушением химического состава слюны и возможными патологическими процессами в полости рта и зубной ткани.

Научиться самостоятельно проводить химический анализ смешанной слюны.

Основные вопросы раздела:

1. Химический состав слюны.
2. Роль слюны в процессах жизнедеятельности.
3. Взаимосвязь между патологическими процессами в ротовой полости и химическим составом слюны.

Слюна – это секрет слюнных желез, выделяющийся в полость рта и участвующий в пищеварении. В выполнении биологических функций участвует смешанная слюна, представляющая собой смесь секретов слюнных желез, микрофлоры полости рта и продуктов ее жизнедеятельности, слущенных эпителиальных клеток слизистой полости рта.

Ежесуточно у взрослого человека выделяется до 2 л слюны. Смешанная слюна вязкая (за счет гликопротеинов), мутная (за счет микрофлоры и слущенных эпителиальных клеток) биологическая жидкость, рН которой зависит от состояния полости рта и характера пищи (при растительной пище рН слюны сдвигается в щелочную, а животной – в кислую сторону)

Вода	Плотный остаток (0,5%)		
	Органические вещества	Минеральные вещества	
99,5%	Белок (ферменты): амилаза, мальтаза, лизоцим	Анионы Хлориды	Катионы Натрий
	Остаточный азот	Фосфаты	Калий
	Моносахара	Бикарбонаты	Магний
	Липиды	Бромиды	Кальций
	Витамины	Фториды	и др.
	Гормоны	Роданиды	

Белки слюны представлены: ферментами, альбуминами, иммуноглобулинами (А, М), гликопротеинами. В слюне есть особые белки, которые индуцируют отложение фосфорнокальциевых солей на зубах; кальций связывающий белок и белок с высоким сродством к гидроксиапатиту. Эти белки способствуют образованию зубного налета и зубного камня.

Биологическая роль слюны

1. Смачивание пищи и облегчение проглатывания пищевого комка.
2. Растворение компонентов пищи, что обеспечивает их воздействие на пищеварительные анализаторы.
3. Первоначальная химическая обработка углеводов за счет амилазы.
4. Химическая защита полости рта от токсического действия микробов (за счет лизоцима).
5. Механическая защита полости рта (муцины, жидкая часть).
6. Двусторонний транспорт веществ между слизистой полости рта, зубами и слюной.
7. Слюна – основной источник поступления в эмаль зуба Са, Р и других минеральных веществ.

Работа 39. ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ

Цель работы: научиться самостоятельно проводить химический анализ смешанной слюны.

1. Определение рН слюны.

Принцип метода основан на способности универсальной индикаторной бумаги изменять окраску в зависимости от рН биологической жидкости.

Порядок выполнения работы:

На полоску универсальной индикаторной бумаги нанести несколько капель неразбавленной собственной слюны. Сравнить развивающуюся окраску с эталонной шкалой. Сделать заключение о рН данной слюны.

2. Качественное обнаружение белка в слюне биуретовой реакцией.

Принцип метода основан на способности белка в щелочной среде при взаимодействии с ионами меди давать сине-фиолетовое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию белка.

Порядок выполнения работы:

В пробирку внести 15-20 капель неразбавленной слюны, добавить 1 каплю 1% сульфата меди, 4-5 капель 10% гидроксида натрия. Записать результат.

3. Обнаружение муцинов в слюне

Принцип метода основан на способности муцинов выпадать в осадок в кислой среде.

Порядок выполнения работы:

В пробирку внести 2-3 мл неразбавленной слюны, добавить 10—15 капель 1% уксусной кислоты. Тщательно встряхнуть. Выпадает осадок. Профильтровать через влажный фильтр.

Осадок на фильтре – муцин слюны (фильтрат сохранить до следующего опыта).

4. Открытие в слюне хлоридов.

Принцип метода основан на способности ионов хлора образовывать с нитратом серебра нерастворимый осадок.

Порядок выполнения работы:

К фильтрату, полученному в предыдущем опыте, добавить по каплям раствор нитрата серебра. Результаты опыта записать.

5. Открытие в слюне роданидов.

Принцип метода основан на способности роданистых солей давать розовое окрашивание с хлоридом железа (III).

Порядок выполнения работы:

На полоску фильтровальной бумаги, обработанную хлоридом железа (III) нанести 1-2 капли неразбавленной слюны.

При наличии в слюне роданидов появляется розовое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию роданидов.

Сравните содержание роданидов (по окраске бумаги) в слюне курящих и некурящих.

5. Качественное открытие амилазы в слюне.

Принцип метода основан на способности фермента гидролизовать крахмал и превращать его через декстрины в мальтозу.

Порядок выполнения работы:

В пробирку внести 20-30 капель 0,5% раствора крахмала, добавить несколько капель неразведенной слюны и оставить при комнатной температуре на 10 минут. Через 10 минут добавить в реакционную смесь 2-3 капли реактива Люголя.

Для сравнения проделать реакцию с исходным раствором крахмала.

Данные записать, сделать заключение.

Сделать заключение о химическом составе собственной слюны. Теоретически обосновать возможность нарушений биохимических процессов в ротовой полости при изменениях химического состава слюны.

Биохимические показатели биологических жидкостей человека

Показатель	Биолог. жидкость	Норма	Повышенное	Пониженное
1	2	3	4	5
Аминный азот	Сыворотка крови	0,2-0,43 г/л	Печеночная кома, отравление фосфором, хлороформом, квашниоркор, тяжелый сахарный диабет, после кровотечения	Нефрозы, после введения инсулина, гормона роста, андрогенов
Общий белок	— « —	65-80 г/л	Дегидратация, ожоги, рвота, миеломная болезнь	Голодание, тиреотоксикоз, поражение печени, поражение почек
Альбумины	— « —	40-50 г/л	Дегидратация, гиперпротеинемия	Гипопротеинемия, поражение почек, поражение печени, наследственные дефект, токсикоз беременности, ожоговая болезнь, квашниоркор, голодание
Глобулины (сум- Фракции глобулинов α_1 , α_2 - β - γ -	— « — — « —	20-35 г/л 2-5 г/л 4-7 г/л	Коллагенозы, поражение почек Острые воспалительные, некротические заболевания коллагенозы, метастазирование опухолей	Некроз печени, нефротический синдром Гепатиты, некрозы печени, гипотиреозы
Альбумино-глобулиновый коэффициент	Сыворотка крови	1,6-2,0	Атеросклероз, ожирение, нефротический синдром, инфаркт миокарда, гипотиреоз	Острые заболевания печени, анемия, цирроз печени
Остаточный азот	— « —	14-25 моль/л	Хронические воспаления, деструкция ткани, онкозаболевания, белковая недостаточность, голодание, цирроз печени, обтурационная желтуха	Иммунодефицитные заболевания, интоксикация кортикостероидами, врожденный дефект, отравление бензолом, метастазы опухоли в кости.
Мочевина	— « —	3,3-8,3 моль/л	Поражение печени, почек	Поражение печени, почек
Мочевина	Моча	330-580 ммоль/л	Неукротимая рвота, обширные ожоги, нарушение выделительной функции почек, туберкулез, поражение мочевыводящих путей	Тяжелая печеночная недостаточность, голодание, поздние сроки беременности, малобелковая диета
Мочевина	Моча	330-580 ммоль/л	Хронические поражения почек, злокачественные опухоли мочевыводящих путей, отравление сулемой, усиленный распад белков, непроходимость кишечника	Малобелковая диета, поздние сроки беременности, врожденные дефекты ферментных систем мочеобразования
Мочевина	Моча	330-580 ммоль/л	Злокачественная анемия, отравление фосфором, хинином, гиперпротеиновая диета	Уремия, нефрит, ацидоз, поражение печени (цирроз, атрофия, паренхиматозная желтуха)

1	2	3	4	5
Глюкоза	Кровь	3,3-5,5 ммоль/л	Сахарный диабет, стероидный диабет, острый панкреатит, опухоли мозга, гиперфункция щитовидной железы, гипофиза, эмоциональное возбуждение	Передозировка инсулина, поражение почек (ренальный диабет), отравление фосфором, бензолом, гиперпродукция инсулина, недостаточность функции щитовидной железы, коры надпочечников, голодание.
Порог почечной пропускной способности для глюкозы	Кровь	8,0-10,0 ммоль/л		Ренальный диабет
Гликопротеины	Сыворотка крови	1,2-1,6 г/л	Туберкулез легких, пневмония, плеврит, острый ревматизм, сахарный диабет, онкозаболевания, подагра, инфаркт миокарда	
Сиаловые кислоты	— « —	0,55-0,79 г/л	Опухоли мозга, инфаркт миокарда, онкозаболевания, туберкулез, остеомиелит, нефроз	Пернициозная анемия, дегенеративные процессы в нервной ткани, гемохроматоз
Кетоновые тела	— « —	до 30 мг/л	Голодание, сахарный диабет, диабетическая кома, гипертироз, поражение печени, безуглеводная диета, гликогенозы, алкалозы	
Общие липиды	— « —	4,0-8,0 г/л	Ожирение, алкоголизм, гипотиреоз, цирроз печени, панкреатит, обтурационная желтуха, гликогенозы, сахарный диабет, нефрит	Голодание, гипертиреоз, острые инфекции, пернициозная анемия
Общий холестерин	— « —	2,9-5,2 ммоль/л	Атеросклероз, сахарный диабет, миелиодный нефроз, микседема, механическая желтуха, наследственные нарушения обмена холестерина	Анемия, туберкулез, гипертиреоз, паренхиматозная желтуха, раковая кахексия, голодание
Билирубин общий	— « —	1,7-20,5 мкмоль/л	Гемолитическая анемия, инфекционный гепатит, физиологическая желтуха новорожденных, рак желчного пузыря, обтурационная желтуха, абсцесс печени, хронический гепатит, рак желчного пузыря	Прием барбитуратов и витамина С
Калий	Плазма крови	3,8-4,6 ммоль/л	Гиперальдостеронизм, ацидоз, ожоги, гипоксия, травматический токсикоз, анурия	Неукротимая рвота, профузные поносы, применение мочегонных средств
Натрий	— « —	130-170 ммоль/л	Избыточное поступление с пищей, гиперальдостеронизм, респираторный ацидоз, неукротимая рвота	Недостаток Na в пище, почечная недостаточность, гипоальдостеронизм, применение диуретиков, неукротимая рвота, ожоги, сердечная недостаточность

1	2	3	4	5
Кальций общий	Сыворотка крови	2,25-2,75 ммоль/л	Гипервитаминоз Д, гиперпаратиреоз, лейкозы, карцинома скелета, наследственная гиперкальциемия, разрушения костной ткани	Гипопаратиреоз, наследственная тетания, гиповитаминоз Д, хроническая почечная недостаточность
Фосфор неорганический	— « —	0,7-1,4 ммоль/л	Наследственная тетания, гипервитаминоз Д, гипопаратиреоз, хронические поражения почек	Отравление алкоголем, поражение гипофиза, гиповитаминоз Д, генетич. деф.
pH	Кровь	7,36-7,42	Алкалоз	Ацидоз
Хлориды	Кровь	95-103 ммоль/л	Дегидратация, сердечная недостаточность, алкалоз, травмы мозга, передозировка кортикостероидов	Стеноз привратника, бессолевая диета, перегревание, усиленное потоотделение, язвенный колит
Буферные основания (БО)	Плазма крови	44-54 ммоль/л	Неукротимая рвота, острая печеночная недостаточность, печеночная кома, травмы центральной нервной системы, сепсис, гипокалиемия, введение стероидных гормонов, гипервентиляция легких	Гипоксия, гиповентиляция легких, острая и хроническая почечная недостаточность, дегидратация организма, сахарный диабет, диабетическая кома, голодание, тяжелая адреналиновая недостаточность
Стандартный бикарбонат (СБ)	— « —	21-25 ммоль/л		
Сдвиг буферных	— « —	±2,5 ммоль/л	Алкалоз	Ацидоз
Креатинин	Моча	4,4-17,4 ммоль/сутки	Сахарный диабет, гипотиреоз, гипофункция половых желез, инфекционные заболевания	Гипертиреоз, мышечная дистрофия, врожденная миотомия, заболевание почек
Общая кислотность	Желуд. сок	40-60 ммоль/л	Гиперацидные гастриты, язва желудка и 12-перстной кишки	Гипоацидные и анацидные гастриты, опухоли желудка, неукротимая рвота
Свободная НС1	Желуд. сок	20-40 ммоль/л		
Связанная НС1	— « —	10-12 ммоль/л		
Пепсин	— « —	0,2-0,4 мг/мл		
Амилаза	Сыворотка крови	3,3-8,9 мг/сек/л или 12-32 мг/час/мл	Острый панкреатит, вирусный гепатит, рак поджелудочной железы, почечная недостаточность, поражение слюнных желез, отравление салицилатами, фурацидом	Некроз поджелудочной железы

1	2	3	4	5
Холинэстераза	– « –	160-340 мкмоль/мл/час	Гипертоническая болезнь, язвенная болезнь желудка, миома матки, нефрозы	Поражение печени, отравление фосфоорганическими соединениями, генетический дефект, рак печени
Альдолаза	– « –	3-8 ед.	Инфаркт миокарда, гемолитическая анемия, хронические заболевания печени, острый панкреатит, инфекционный гепатит, послеоперационные состояния	
Глутамикоаспарагиновая трансаминаза АсАТ (ГОТ)	– « –	0,1-0,45 ммоль ПВК/л (5-40 ед/л)	Инфаркт миокарда, алкогольная интоксикация, гепатиты, жировая дистрофия печени, острый панкреатит, токсические поражения печени	
Глутамикоаланиновая трансаминаза АлАТ(ГПТ)	– « –	0,1-0,7 ммоль/л (5-35 ед/л)	Инфекционный гепатит, хронический гепатит, инфекционный мононуклеоз, дистрофия печени	
Щелочная фосфатаза	– « –	0,5-1,3 ммоль НР/л/ч	Гиперпаратиреоз, остеомаляция, саркома остеогенная, хронический гепатит, жировое перерождение печени, цирроз печени, отравление барбитуратами, салицилатами, сульфаниламидами	Гипотиреоз, гипофизарная карликовость, белковое голодание, авитаминоз С
Кислая фосфатаза	– « –	0,05-0,13 ммоль НР/л/ч	Гиперпаратиреоз, метастазы опухолей в кости, лимфогранулематоз, карцинома желудка, предстательной железы, молочной железы	

Основные биохимические показатели в педиатрии

Показатель	Единицы измерения	Возраст			
		новорожденный	грудной	от 1 до 4 лет	старше 4 лет
Общий белок	г/л	47-65	50-72	61-75	62-78
γ-глобулины	г/л	9-10	6,5-8,5	8-11	10-18
Мочевина	ммоль/л	до 7,0	до 8,0	до 8,3	до 8,3
Креатинин	мкмоль/л	27-88	18-35	27-62	53-106
Мочевая кислота	ммоль/л	<0,34	<0,22	<0,15	<0,4
Глюкоза	ммоль/л	0,3-3,3	0,7-4,2	1,8-5,4	3,3-5,5
Общие липиды	г/л	1,4-4,5	4,0-6,0	4,9-8,2	4-8
Триглицериды	г/л	0,4-1,4	0,3-1,7	0,4-2,0	0,13-1,6
НЭЖК	г/л	1,3-1,4	0,6-1,3	0,3-0,6	0,45
Холестерин общий	ммоль/л	1,3-4,4	1,6-4,9	2,6-6,0	5,2±1,2
Калий	ммоль/л	3,6-6,1	3,6-5,8	3,1-5,1	3,7-5,4
Кальций	ммоль/л	1,9-2,5	2,1-2,7	2,3-2,75	2,2-2,55
Натрий	ммоль/л	132-147	128-143	132-145	146-157
Хлориды	ммоль/л	95-116	93-112	96-111	95-110
Железо сыворотки крови	ммоль/л	6,4-33	7,7-33	11-28	11-28
Билирубин	нмоль/л	30-100	1,7-17	1,7-20,5	1,7-20,5
Тироксин (Т4)	мг/л	80-240	55-210	75-220	66-175
Тироксин-связывающий глобулин	мкат/л	18	18-32	16-32	1-3-26
Щелочная фосфатаза	мкат/л	до 7	до 8	до 8	2,4-22,5

ПЕРЕЧЕНЬ ПРАКТИЧЕСКИХ НАВЫКОВ:

Студент в ходе изучения курса биохимии должен освоить:

1. Правила забора биоматериала для анализа, условия и сроки хранения проб.
2. Правила работы в биохимической лаборатории, требования к чистоте посуды, химических реактивов, уметь приготовить простейшие реактивы для анализа.
3. Уметь открывать качественно в биологических жидкостях присутствие белка, глюкозы, кетоновых тел, крови, молочной кислоты, желчных пигментов.
4. Уметь количественно определять в крови содержание глюкозы, холестерина, свободного и конъюгированного билирубина, остаточного азота, мочевины, креатинина, кальция, хлоридов, магния, сиаловых кислот, гликопротеинов, фенилпировиноградной и ксантуреновой кислот.
5. Владеть техникой скрининг-тестов и экспресс-методами биохимии.
6. Уметь провести биохимический анализ желудочного сока с расчетом всех видов кислотности, определением активности пепсина, обнаружением патологических составных частей с последующим обоснованным заключением.
7. Владеть навыками выделения, очистки и разделения белков и ферментов, освоить основы ферментативного метода анализа.
8. Уметь работать с аппаратурой: термостатами водяными и воздушными, центрифугой, фотоэлектроколориметром, рН-метром, рефрактометром, спектрофотометром.
9. Знать основные биохимические константы и причины, способные приводить к отклонению основных биохимических показателей биологических жидкостей.
10. Уметь использовать полученные теоретические знания для решения конкретных практических ситуационных задач.

Использованная литература

1. **Алейникова Т.П., Рубцова Г.В.** Биохимия. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1988.– 239 с.
2. **Пустовалова Л.М.** Практикум по биохимии для студентов вузов. – Ростов-на-Дону: Феникс, 1999. – 541 с.
3. **Камышников В.С.** Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: Медпресс-информ, 2004. – 911с.
4. **Бышевский А.Ш., Терсенов О.А.** Биохимия для врача. – Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994. – 383 с.
5. **Клиническая биохимия** / Под ред. член-корр. РАН В.А. Ткачука. – М: ГЭОТАР-МЕД, 2006. – 566 с.
6. **Хейль В., Коберштейн Р., Цавта Б.** Референтные пределы у взрослых и детей. – М.: Лабпресс, 2001. – 176 с.
7. **Чиркин А.А.** Клинический анализ лабораторных данных. – М.: Медицинская литература, 2004. – 380 с.
8. **Медицинские и лабораторные технологии.** Справочник / Под редакцией проф. А.И. Карпищенко. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. В 2-х т.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Раздел I	Обмен и функции аминокислот. Биосинтез нуклеиновых кислот и белка. Основы молекулярной генетики	3
Работа 1.	Определение кислотности желудочного сока в одной порции (по Михаэлису).....	6
Работа 2.	Количественное определение пепсина в желудочном соке (по Пятницкому Н.П.)	9
Работа 3.	Патологические составные части желудочного сока	10
Возрастная характеристика процессов переваривания и всасывания белков.....		12
Работа 4.	Определение активности аминотрансфераз	13
Работа 5.	Определения свободного аминного азота в сыворотке крови	17
Работа 6.	Количественное определение мочевой кислоты в сыворотке крови	19
Работа 7.	Количественное определение фенилпировиноградной кислоты в моче	21
Работа 8.	Определение ксантуреновой кислоты в моче	23
Работа 9.	Скрининг-тесты для выявления наследственных нарушений обмена аминокислот	25
Работа 10.	Количественное определение мочевины крови уреазным методом	26
Работа 11.	Количественное определение креатинина в сыворотке крови	27
Раздел II	Обмен и функции липидов. Взаимосвязь обмена аминокислот, углеводов и липидов.....	29
Работа 12.	Качественное открытие липопротеинов.....	32
Работа 13.	Определение свободных (неэтерифицированных) жирных кислот в сыворотке крови (НЭЖК).....	33
Работа 14.	Роль альбуминов в транспорте высших жирных кислот	34
Работа 15.	Эмульгирование жиров	35
Работа 16.	Качественные реакции на жёлчные кислоты	36
Работа 17.	Кинетика действия липазы	37
Работа 18.	Влияние желчи на активность липазы.....	38
Работа 19.	Определение общих липидов крови турбидиметрическим методом	39
Работа 20.	Определение содержания β -липопротеиновсыворотки крови (по Бурштейну).....	41
Работа 21.	Количественное определение общего холестерина в сыворотке крови	42

Работа 22.	Определение холестерина в ЛПВП и расчет индекса атерогенности по методу Е.А. Бородина	47
Работа 23.	Обнаружение кетоновых тел	48
Раздел III	Функциональная биохимия.....	52
Глава 1.	Биохимия крови	
Работа 24.	Количественное определение хлоридов крови по методу Банга	53
Работа 25.	Количественное определение кальция в сыворотке крови	55
Работа 26.	Количественное определение кальция в сыворотке крови титриметическим методом	56
Работа 27.	Количественное определение магния в сыворотке крови	58
Работа 28.	Количественное определение железа в сыворотке крови	60
Работа 29.	Количественное определение остаточного азота в сыворотке крови по методу Асселя	62
Работа 30.	Качественное открытие билирубина диазореакцией Эрлиха	64
Работа 31.	Количественное определение билирубина в сыворотке крови	65
Работа 32.	Определение общего («прямого» и «непрямого») билирубина по методу Ендрашика и соавт.....	66
Глава 2.	Биохимия печени	71
Работа 33.	Тимоловая проба	73
Работа 34.	Количественное определение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) сыворотки крови	74
Работа 35.	Определение в моче свободных и ацетилированных форм сульфаниламидов	75
Глава 3.	Биохимия мочи.....	78
Работа 36.	Определение рН мочи	79
Работа 37.	Определение титрационной кислотности мочи по методу Фолина	79
Работа 38.	Качественное открытие и количественное определение патологических компонентов мочи.....	81
Глава 4.	Биохимия слюны.....	92
Работа 39.	Изучение химического состава смешанной слюны	93
	Биохимические показатели биологических жидкостей человека.....	96
	Основные биохимические показатели в педиатрии.....	100
	Перечень практических навыков	101
	Использованная литература.....	102

**Корочанская Светлана Петровна,
Сторожук Петр Григорьевич,
Быков Илья Михайлович**

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

ЧАСТЬ 2

Обмен белков, обмен липидов, биохимия крови, печени, мочи, слюны.

Основные константы биологических жидкостей человека

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.

