

Лекция 1. Белки. Биохимические исследования белков и показателей азотистого обмена

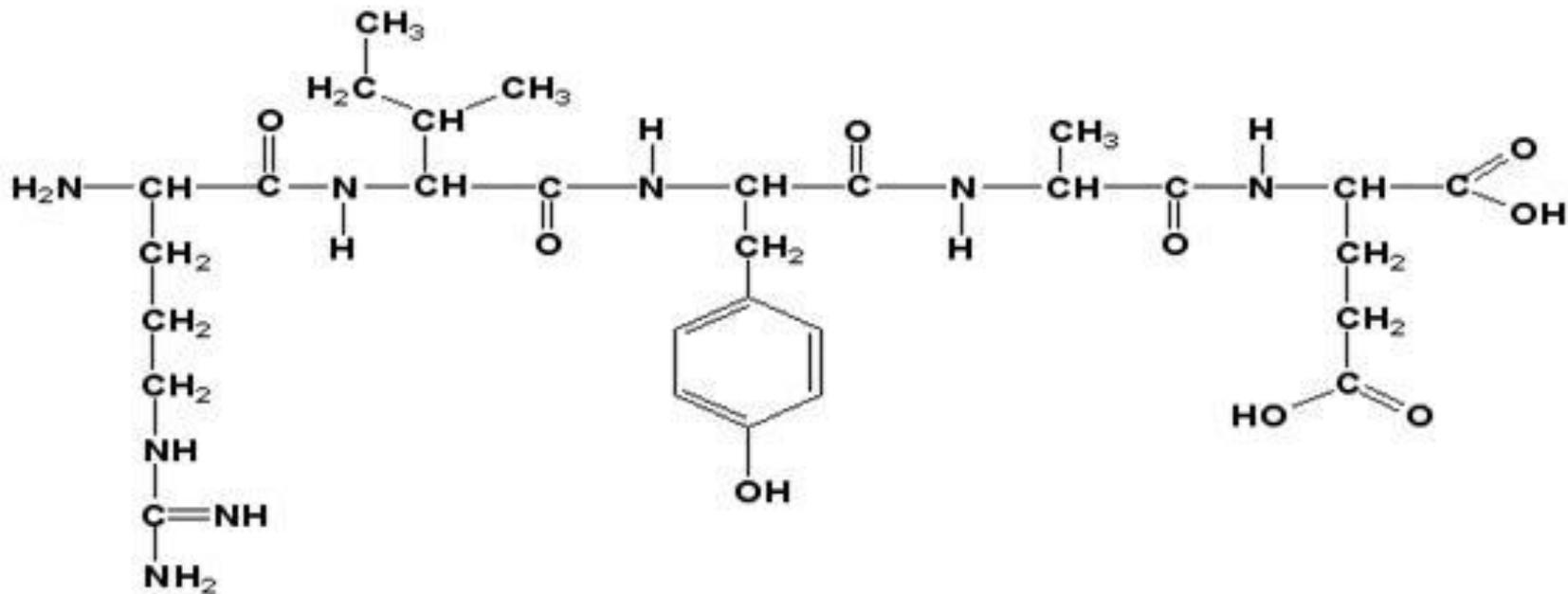
- ***План:***
- Белки: определение, строение, биологические функции.
- Метаболизм белков.
- Белковые фракции сыворотки крови.
- Подходы, используемые в КЛД для оценки состояния белкового обмена: исследование общего белка, определение белковых фракций, определение специфических белков, определение аминокислот и продуктов метаболизма белков в сыворотке крови
- Показатели азотистого обмена. Лабораторная диагностика

Белки – высокомолекулярные биологически активные азотсодержащие соединения, структурными компонентами которых являются аминокислоты.

- **Функции белков:**

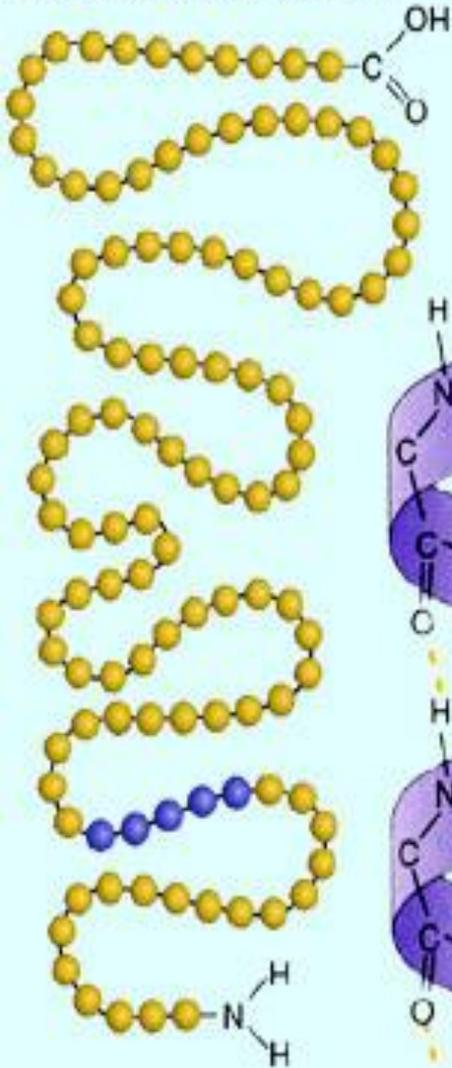
- 1. Каталитическая – алкогольдегидрогеназа, ацетилхолинэстераза.
- 2. Трофическая – овальбумин, казеин, глютелин.
- 3. Транспортная – гемоглобин, церуллоплазмин, трансферрин, альбумин.
- 4. Защитная – иммуноглобулины, острофазовые белки, белки слизи.
- 5. Сократительная – миозин, актин, тропомиозин.
- 6. Структурно-опорная – коллаген, эластин.
- 7. Гормональная – инсулин, тропные гормоны.
- 8. Генно-регуляторная – гистоны, протамины.
- 9. Рецепторная – гликопротеины.

Полярные (гидрофильные)			Неполярные (гидрофобные)
Полярные незаряженные	Полярные отрицательно заряженные	Полярные положительно заряженные	
серин треонин цистеин тирозин аспарагин глутамин	аспарагиновая кислота глутаминовая кислота	лизин аргинин гистидин	глицин аланин валин лейцин изолейцин метионин фенилаланин триптофан пролин

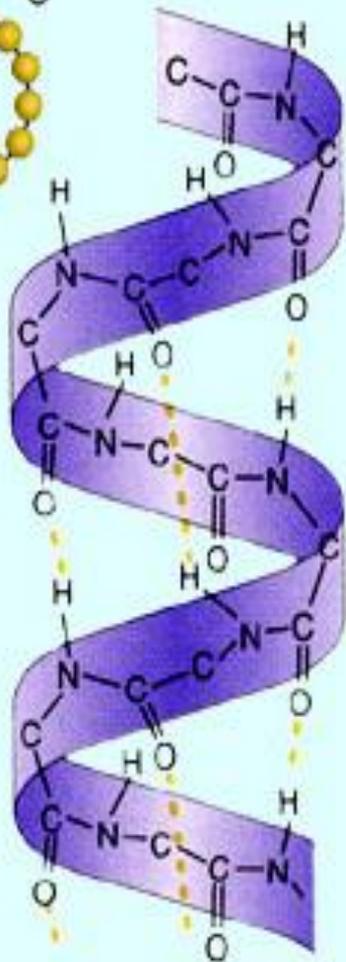


Уровни организации белковой молекулы

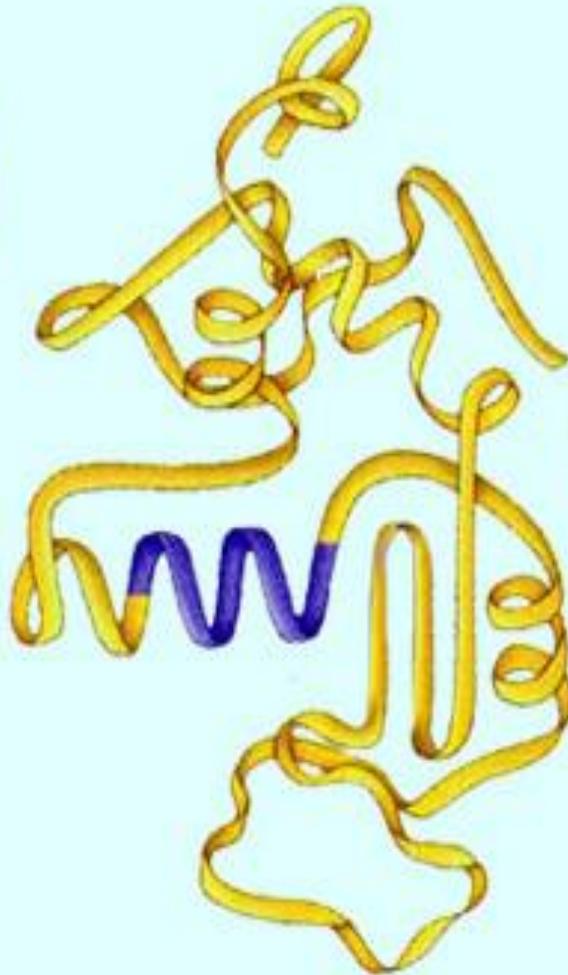
Первичная структура
(цепочка аминокислот)



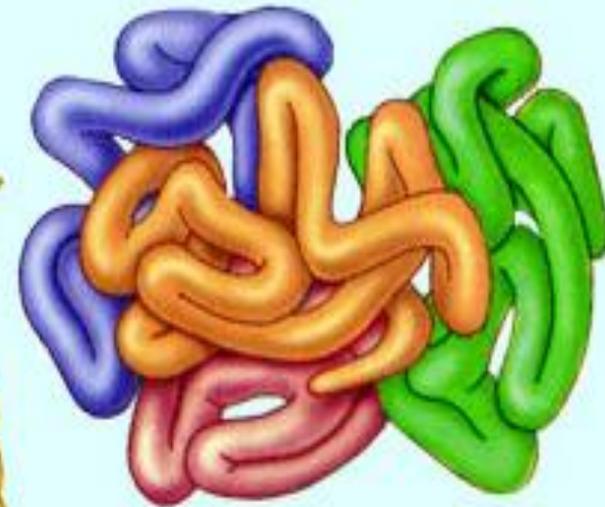
Вторичная структура
(α -спираль)



Третичная структура



Четвертичная структура
(клубок белков)



Обмен белков

Катаболизм
белков тканей

Белки пищи

Синтез
из углеводов

Фонд
свободных
аминокислот

Белки
тканей

Азотосодержащие
соединения

Биогенные
амины

Гормоны
Нуклеотиды
Гем
Креатин и др.

NH_3 → мочевины

с-кето кислоты

$\text{CO}_2\text{H}_2\text{O}$
АТФ

Глюкоза
Кетоновые тела

Белковые фракции сыворотки крови

Группа	Белки	Концентрация в сыворотке крови, г/л	Функция
Альбумины	Транстиретин	0,25	Транспорт тироксина и трийодтиронина
	Альбумин	40	Поддержание осмотического давления, транспорт жирных кислот, билирубина, жёлчных кислот, стероидных гормонов, лекарств,

α_1 -Глобулины	α_1 -Антитрипсин	2,5	Ингибитор протеиназ
	ЛПВП	0,35	Транспорт холестерина
	Протромбин	0,1	Фактор свёртывания крови II
	Транскортин	0,03	Транспорт кортизола, кортикостерона, прогестерона
	Кислый гликопротеин α_1 -	1	Транспорт прогестерона
	Тироксинсвязывающий глобулин	0,02	Транспорт тироксина и трийодтиронина
α_2 -Глобулины	Церулоплазмин	0,35	Транспорт ионов меди, оксидоредуктаза
	Антитромбин III	0,3	Ингибитор плазменных протеаз
	Гаптоглобин	1	Связывание гемоглобина
	α_2 -Макроглобулин	2,6	Ингибитор плазменных протеиназ, транспорт цинка

	Ретинолсвязывающий белок	0,04	Транспорт ретинола
	Витамин D связывающий белок	0,4	Транспорт кальциферола
β-Глобулины	ЛПНП	3,5	Транспорт холестерина
	Трансферрин	3	Транспорт ионов железа
	Фибриноген	3	Фактор I свёртывания крови
	Транскобаламин	25×10^{-9}	Транспорт витамина B ₁₂
	Глобулин связывающий белок	20×10^{-6}	Транспорт тестостерона и эстрадиола
	C-реактивный белок	<0,01	Активация комплемента
γ-Глобулины	IgG	12	Поздние антитела
	IgA	3,5	Антитела, защищающие слизистые оболочки
	IgM	1,3	Ранние антитела
	IgD	0,03	Рецепторы В-лимфоцитов
	IgE	<0,01	Реагин

Исследование общего белка

- Материал – сыворотка крови без гемолиза и примеси фибриногена (до исследования можно хранить 3 суток при +3+4, 3 недели при - 20, моча).

Таблица 4-9. Референтные пределы общего белка в сыворотке крови

Возраст	г/л
<1 года	44-73
1-2 года	56-75
2-14 лет	60-80
>14 лет	65-85

Методы определения общего белка в сыворотке крови основаны на различных принципах:

- спектрофотометрические – на определении поглощения при 280 нм,
- фотометрические – на измерении окрашенных продуктов реакции,
- рефрактометрические – на определении коэффициентов рефракции или преломления света.



Методы определения белковых фракций крови

- **Электрофорез** – электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых растворов) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля. Распространен электрофорез на пластинках с агарозным и полиакриламидным гелем, на бумаге (ацетат-целлюлозы).
- Результатом проведения электрофореза является электрофореграмма.

Например, у здорового человека относительное содержание белковых фракций при определении их в сыворотке крови методом электрофореза на бумаге, следующее:

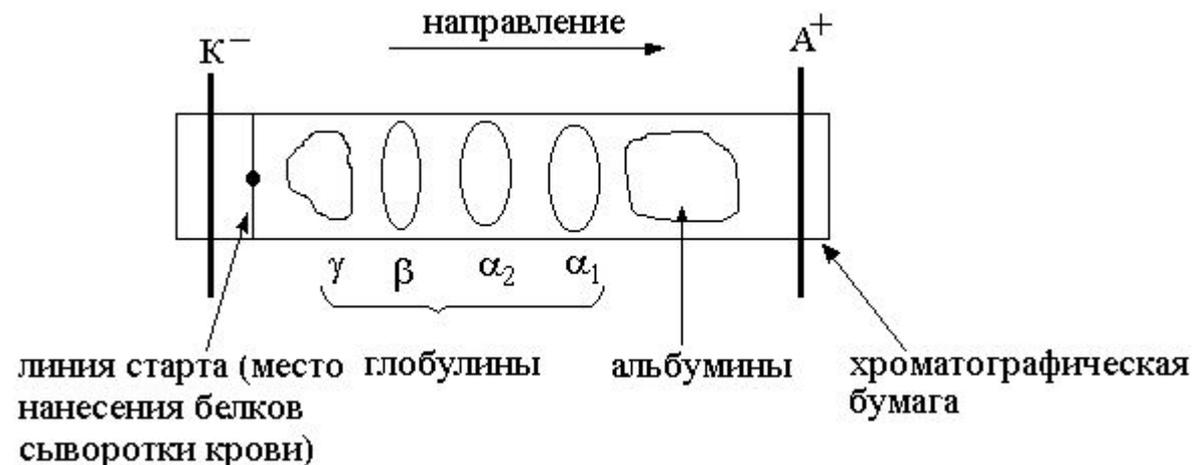
альбумины - 55-65%,

α_1 -глобулины 3-6%,

α_2 -глобулины 7-10%,

β -глобулины - 7-12%,

γ -глобулины - 13-19%.



Пример электрофореграммы

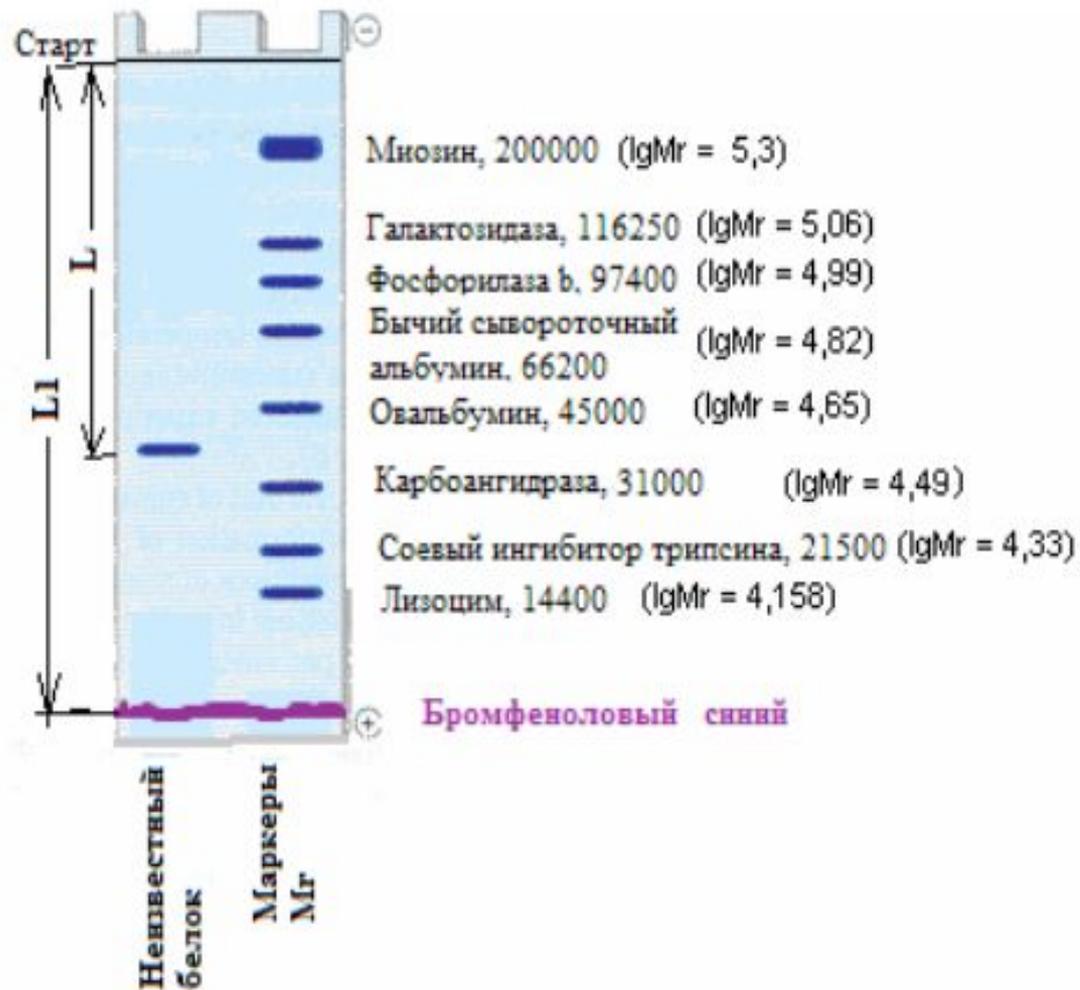


Рис. 21 Электрофореграмма, проявленная с использованием кумаси ярко-синего

Определение специфических белков.

- **Турбидиметрия** - Принцип метода основан на измерении интенсивности света определённой длины волны, прошедшего через кювету содержащую коллоидный раствор, чаще всего через суспензию,

Нефелометрия - метод исследования и анализа белка по интенсивности светового потока, рассеиваемого взвешенными частицами данного вещества. Для измерения интенсивности рассеянного света используются специальные приборы — [нефелометры](#). Их действие основано на уравнивании двух световых потоков: одного от рассеивающей взвеси, другого от матового или молочного стеклянного рассеивателя прибора.

Автоматический биохимический анализатор CA-270

(компания FURUNO ELECTRIC CO., LTD, Япония)



Область применения
Клиническая химия (ферменты, субстраты, липиды, электролиты)
Иммунотурбидиметрия
Специфические белки

Производительность – 270 биохимических тестов в час для моно и би



Определение специфических

- **ИММУНОКОЛОРИМЕТРИЯ**
Принцип метода
Определение белка иммуноколориметрическим методом основано на его взаимодействии с IgG, покрывающим частицы коллоидного золота. В результате реакции антиген – антитело происходит агглютинация с образованием окрашенного коллоида, приводящая к увеличению оптической плотности при 600 нм пропорционально концентрации белка в образце

- **Иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA)** — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала



Показатели азотистого обмена. Лабораторная диагностика

- Определение мочевины
- газометрические;
- прямые фотометрические;
- ферментативные

Референтные величины содержания мочевины (азота мочевины) в моче

Показатель	Содержание мочевины	
	ммоль/сут	г/сут
Мочевина	430–710	24–40
Азот мочевины	430–710	12–20

- Креатинин
- Колориметрические
- Ферментативные:

Референтные величины содержания креатинина в сыворотке крови

Возрастная группа	Содержание креатинина в сыворотке	
	ммоль/л	мг/дл
Новорожденные	27–88	0,3–1,0
Дети до 1 года	18–35	0,2–0,4
Дети от 1 года до 12 лет	27–62	0,3–0,7
Подростки	44–88	0,5–1,0
Взрослые: мужчины	62–132	0,7–1,4
Женщины	44–97	0,5–1,1

Мочевая кислота

Референтные величины содержания мочевой кислоты в моче

Вид диеты	Содержание мочевой кислоты	
	мг/сут	ммоль/сут
Обычная диета	250–750	1,48–4,43
Беспуриновая диета:		
– мужчины	До 420	До 2,48
– женщины	До 400	До 2,36
Диета с низким содержанием пуринов:		
– мужчины	До 480	До 2,83
– женщины	До 400	До 2,36
Диета с высоким содержанием пуринов	До 1000	До 5,90

- **Колориметрические** — все эти методы недостаточно специфичны и основаны на:
 - способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорновольфрамную и мышьяковолибденовую кислоты, железосинеродистый калий;
 - прямом фотометрическом определении концентрации мочевой кислоты по реакции Фолина-Дениса;
 - исследовании содержания по фенолгипохлоритной реакции.
- **Энзиматические** — определение концентрации мочевой кислоты по расщеплению ее уриказой до аллантаина, CO_2 и H_2O_2 . Результаты реакции учитываются:
 - по количеству потребленного кислорода;
 - регистрацией величины снижения абсорбции мочевой кислоты при 293 нм;
 - определением образовавшейся перекиси водорода. Последняя при участии каталазы окисляет метанол до формальдегида, определяемого дополнительной реакцией;
 - по флуоресценции образовавшихся продуктов после добавления флюорофора;
 - с помощью потенциометрического электрода с иммобилизованной уриказой;
 - образовавшаяся перекись водорода в присутствии каталазы вступает в реакцию с этанолом, образуется ацетальдегид, который восстанавливается НАДН, что сопровождается уменьшением светопоглощения при 340 нм.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Белки - белки

