

УДК 577.1 (076.)

ББК 28.072 я7

М 18

Рецензенты:

Доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой
биохимии Российского государственного медицинского
университета (г. Москва)

А.А. Терентьев

Доктор биологических наук, зав. лабораторией
микросомального окисления Научно-исследовательского
института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
Российской академии медицинских наук (г. Москва)

И.И. Карузина

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Владимирского государственного университета

Маленюк, Е. Б. Практикум по биохимии. В 2 ч. Ч. 2. Дина-
М18 мическая биохимия / Е. Б. Маленюк, Е. А. Запруднова ; Владим. гос.
ун-т. – Владимир : Ред.-издат. комплекс ВлГУ, 2005. – 44 с. – ISBN
5-89368-545-8.

Содержит основные теоретические понятия динамической биохимии, а также сведения по проведению лабораторных работ по курсу динамической биохимии.

Предназначено для студентов специальности 011600 – биология дневной формы обучения. Может представлять интерес для преподавателей и учащихся старших классов лицеев, колледжей и общеобразовательных школ.

Табл. 4. Библиогр. : 9 назв.

УДК 577.1 (076.)

ББК 28.072 я7

ISBN 5-89368-545-8

© Владимирский государственный
университет, 2005

Введение

Биохимия как наука в целом и динамическая биохимия, в частности, на протяжении всей своей истории ищут ответ на два главных вопроса:

1. *Каким образом клетки извлекают энергию и восстановительные эквиваленты из окружающей среды?*

2. *Каким образом клетки синтезируют строительные блоки своих макромолекул?*

В настоящее время известно, что эти процессы осуществляются высокоинтегрированной системой химических реакций, составляющих в совокупности *метаболизм*, или *обмен веществ*.

Даже у такого простого организма, как *E. coli* насчитывается по меньшей мере тысяча различных химических реакций. Упорядочение этих реакций на первый взгляд кажется недостижимым. Однако при более глубоком анализе оказывается, что метаболизм представляет собой согласованную систему явлений со множеством общих мотивов. Число реакций метаболизма велико, но число *видов* этих реакций относительно мало. Кроме того, центральную роль во всех формах жизни играет группа молекул общим числом около ста. Более того, существуют общие механизмы регуляции метаболических путей.

Обычно процессы метаболизма делят на *катаболические* и *анаболические*. Катаболизм (от греч. – вниз) относится к последовательности реакций расщепления, анаболизм (от греч. – вверх) – к последовательности реакций синтеза. Хотя катаболические и анаболические пути во многих отношениях различаются, они тесно связаны друг с другом. Более того, именно взаимосвязанные характеристики этих реакций составляют суть их различий.

Процессы поддержания гомеостаза и развития биологических систем обеспечиваются сложной системой химических реакций за счет энергии, которая генерируется в организме в результате окисления «топливных мо-

лекул». Последние, в свою очередь, образуются в результате ферментативного гидролиза в желудочно-кишечном тракте поступающей в организм пищи (гетеротрофы) или в результате фотосинтеза (автотрофы). В соответствии с основными положениями химической термодинамики организм существует в соответствии с генетической программой за счет притока свободной энергии Гиббса (ΔG) и увеличения энтропии (ΔS). Свободная энергия в приложении к биохимическим системам служит мерой химической стабильности таких систем. Энтропия – логарифмическая функция вероятности состояния – характеризует степень неупорядоченности процесса, а следовательно, возможность его спонтанного протекания; может быть выражена для реакции $A \rightarrow B$ через отношение вероятностей этих двух состояний:

$$\Delta S = R \ln \frac{P_B}{P_A},$$

где P_A и P_B – вероятности состояний A и B соответственно.

Самопроизвольно эта сложная стратегия реализуется за счет сопряжения эндэргонических процессов с экзэргоническими, и суммарный итог должен характеризоваться отрицательным значением изменения свободной энергии ($\Delta G < 0$).

Количественная характеристика химического процесса – стандартное изменение свободной энергии (ΔG^0) – изменение энергии Гиббса при протекании реакции в стандартных условиях (активность растворителя равна 1, концентрации веществ – 1 моллю):

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[B]}{[A]},$$

где R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура.

Сильное влияние на величину ΔG оказывает рН, поэтому в биохимии принято пользоваться ΔG^0 , что соответствует стандартному состоянию с концентрацией веществ, равной 1 моллю, и рН = 7, $t = 25$ °С.

Окислительно-восстановительные процессы удобно описывать не через ΔG^{0t} , а посредством изменения окислительно-восстановительного потенциала ΔE^{0t}

$$\Delta E^{0t} = \Delta G^{0t} / nF,$$

где n – число e^- , переносимых от восстановителя к окислителю, F – число Фарадея.

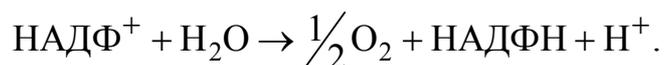
ΔE^0 определяется по разности E^0 для сопряженной пары окислитель – восстановитель.

Энергетические потребности живых систем обеспечиваются, главным образом, в ходе экзергонического процесса гидролиза одной из пирофосфатных связей АТФ:



и, следовательно, основной задачей энергетической системы клетки является регенерация АМФ и АДФ до АТФ, так как значение АТФ как универсального аккумулятора химической энергии определяется высокой величиной $\Delta G^{0'}$ гидролиза пирофосфатных связей (-31 кДж/моль).

Это осуществляется в процессе фотосинтеза, где световая энергия используется для переноса \bar{e} от молекулы воды на НАДФ⁺:



НАДФH используется для фосфорилирования АДФ. Это создает необходимые условия для реакций синтеза углеводов.

Животные и некоторые микроорганизмы в качестве энергии используют процесс окисления органических соединений, поступающих к ним с пищей. Основным субстратом реакций окисления является глюкоза, которая в отсутствие O_2 в процессе гликолиза превращается в лактат или этанол. В аэробных условиях органические кислоты и спирты переводятся в активную форму уксусной кислоты – ацетил-КоА, который окисляется до CO_2 и H_2O в цикле трикарбоновых кислот. В системе этих ферментативных реакций роль окислителя выполняет НАД⁺.

Энергия, накопленная в виде восстановительных эквивалентов (НАДH), используется в системе сопряженных реакций окислительного фосфорилирования для синтеза АТФ.

Цель динамической биохимии – описать некоторые общие принципы и мотивы метаболизма, процессы обмена конкретных биомолекул, а также энергетику взаимосвязанных реакций обмена.

В соответствии с этой целью во 2-й части практикума даются теоретические основы и практические задания для усвоения механизмов основных этапов пластического и энергетического обменов.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Тема I. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Углеводный обмен в организме человека складывается в основном из следующих процессов:

1. Расщепление в желудочно-кишечном тракте до моносахаридов поступающих с пищей полисахаридов и дисахаридов. Всасывание моносахаридов из кишечника в кровь.
2. Синтез и распад гликогена в тканях, прежде всего в печени.
3. Анаэробное и аэробное расщепление глюкозы.
4. Взаимопревращение гексоз.
5. Аэробный метаболизм пирувата.
6. Глюконеогенез (образование углеводов из неуглеводных продуктов).

В среднем в сутки взрослому человеку необходимо потребить 450 – 500 г углеводов. Из пищевых углеводов человек потребляет около 80 % крахмала, 15 % дисахаридов (сахароза, лактоза) и около 5 % моносахаридов (глюкоза, фруктоза, пентозы).

Расщепление крахмала (и гликогена) начинается в ротовой полости при $\text{pH} = 6,8 - 7,2$ под действием α -амилазы слюны. Образовавшиеся декстрины и частично мальтоза попадают в желудок, где действие α -амилазы слюны прекращается вследствие сильно кислой реакции ($\text{pH} = 1,5 - 2,5$). Расщепление продолжается в двенадцатиперстной кишке при $\text{pH} = 7,8 - 8,4$ под действием α -амилазы панкреатической. Образовавшиеся дисахариды – мальтоза и изомальтоза, а также поступившие дисахариды с пищей – сахароза и лактоза – расщепляются в тонком кишечнике под действием мальтазы, сахаразы и лактазы соответственно.

В крови содержится в норме только глюкоза, так как галактоза и фруктоза изомеризуются под действием изомераз в глюкозу.

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ И СВОЙСТВ ЗАПАСНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

1. Кислотный гидролиз крахмала

Оборудование и реактивы: 0,1%-ный раствор крахмала, 2 н. раствор серной кислоты, 2 н. раствора сульфата меди, 2 н. раствора гидроксида натрия, йод, пипетки, пробирки большие и маленькие, водяная баня.

Ход работы

В большую пробирку с пипеткой помещают 1 мл 0,1%-ного раствора крахмала и 20 капель 2 н. раствора серной кислоты.

Нагревают на водяной бане в течение 10 мин, отбирая пипеткой каждые 2 мин в маленькие пробирки 3 – 4 капли гидролизата и добавляя в них по 1 капле йода.

Обращают внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. К последней пробе в большой пробирке добавляют 2 капли 2 н. раствора сульфата меди, а затем по каплям 2 н. раствора гидроксида натрия до образования растворимого темно-синего соединения.

Далее полученный раствор нагревают (реакция Троммера). Появляется желто-красное окрашивание (положительная реакция Троммера). По результатам реакций сделать заключение о строении крахмала.

2. Выделение гликогена из дрожжей

Гликоген служит резервным углеводом не только для животных, но и для многих других организмов, в частности дрожжей, где он накапливается до 30 % в сухом веществе, если дрожжи растут на крепком растворе сахара.

Полагают, что в организме гликоген существует в двух формах: прочно связанной с белками и трудно извлекаемой из ткани и менее прочно связанной с белками и легко экстрагируемой горячей водой и разбавленными растворами трихлоруксусной кислоты.

Существуют два метода выделения гликогена. Один из них заключается в том, что исследуемую ткань обрабатывают 30%-ным раствором гидроксида калия на кипящей водяной бане. При такой жесткой обра-

ботке ткани распадаются, большинство веществ гидролизуются, но гликоген не изменяется и при добавлении спирта выпадает в осадок, однако относительная молекулярная масса гликогена при такой обработке значительно уменьшается.

Другой метод сводится к извлечению гликогена 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Такая обработка меньше отражается на относительной молекулярной массе гликогена, но в этом случае трудно извлечь полностью гликоген, связанный с белком. Для получения нативного гликогена предпочтительнее пользоваться вторым методом.

Оборудование и реактивы: пивные дрожжи, 20%-ный раствор сахарозы, 10%-ная ТХУ, кварцевый песок, 5%-ная ТХУ, 65%-ный раствор этилового спирта, 96%-ный раствор этилового спирта, эфир, воронка Бюхнера, ступка с пестиком, центрифуга, водяная баня, коническая колба, стеклянная палочка, бюксы, складчатый фильтр.

Ход работы

10 г пивных дрожжей, отмытых от суслу и отфильтрованных на воронке Бюхнера до плотного состояния, размешивают в 200 мл 20%-ного раствора сахарозы и оставляют при 25 °С на 3 ч. Начинается интенсивное брожение, в процессе которого в дрожжевых клетках накапливается гликоген.

Затем процесс прерывают, дрожжи быстро отделяют центрифугированием и растирают в предварительно охлажденной ступке в течение 10 мин с 15 мл охлажденной до 0 °С 10%-ной трихлоруксусной кислотой с добавлением 5 г кварцевого песка. Смесь центрифугируют 5 мин при 3000 г. Кислый экстракт сливают в коническую колбу на 200 мл и хранят при температуре 0 – 4 °С, а осадок переносят в ступку и снова экстрагируют 10 мл охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Эту операцию повторяют трижды. Вместо центрифугирования остаток дрожжей можно отсасывать на воронке Бюхнера. Все экстракты собирают в коническую колбу и, если раствор содержит твердые частицы, фильтруют, а фильтр промывают двумя порциями по 3 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты. При высоком содержании гликогена экстракт опалесцирует.

К экстракту прибавляют двойной объем этанола, перемешивают и оставляют при 0 °С на 30 мин, после чего осадок (гликоген) отделяют центрифугированием при 3000 г в течение 5 – 10 мин. Надосадочную жидкость

сливают, а осадок гликогена для его очистки растворяют в 3 объемах подогретой воды, размешивая его стеклянной палочкой. Затем приливают двойной объем (по отношению к взятой воде) спирта, оставляют на 30 мин в холодильнике, после чего центрифугируют. Осадок гликогена дважды промывают 5 мл 65%-ного раствора спирта, хорошо размешивая и каждый раз отделяя центрифугированием. После этого гликоген промывают 5 мл 96%-ного спирта и, наконец, 10 мл эфира. Гликоген количественно переносят во взвешенный бюкс, просушивают в сушильном шкафу при 80 °С и взвешивают.

3. Выделение гликогена из печени

Оборудование и реактивы: печень животного, 5%-ный раствор ТХУ, дистиллированная вода, складчатый фильтр, ступка с пестиком, раствор Люголя.

Ход работы

0,5 г печени животного помещают в ступку, добавляют 3 мл 5%-ного раствора ТХУ и растирают пестиком 10 мин. Затем к экстракту добавляют 5 мл дистиллированной воды, суспензию перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, смоченный водой.

С фильтратом проводят реакцию с раствором Люголя.

Лабораторная работа № 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ КРЕЦЕЛИУСА – СЕЙФЕРТ

Важное значение для организма имеет поддержание глюкозы в крови на определенном постоянном уровне (3,3 – 5,5 ммоль/л в цельной крови или 3,8 – 6,1 ммоль/л в плазме), так как глюкоза является основным энергетическим субстратом для многих органов и тканей, особенно для нервной ткани.

Гормоном, снижающим содержание глюкозы в крови, является инсулин. Все остальные гормоны (адреналин, глюкагон, кортизол, тироксин и др.) повышают уровень глюкозы в крови.

При ряде состояний можно наблюдать повышение содержания сахара в крови – гипергликемию, а также понижение концентрации сахара – гипогликемию.

Гипергликемия является довольно частым симптомом при различных заболеваниях, прежде всего связанных с поражением эндокринной системы (при недостаточности инсулина, гипофизарных заболеваниях, опухолях коры надпочечников, гиперфункции щитовидной железы).

Гипогликемия нередко связана с понижением функций тех эндокринных желез, повышение функции которых приводит к гипергликемии (при гипофизарной кахексии, аддисоновой болезни, гипотиреозе), а также при повышенной продукции инсулина.

Оборудование и реактивы: капиллярная кровь или другая биологическая жидкость, дистиллированная вода, пикриновая кислота, раствор NaOH, центрифуга, водяная баня, ФЭК.

Принцип метода: в присутствии сахара пикриновая кислота в щелочном растворе восстанавливается при высокой температуре в пикраминную кислоту.

Ход работы

0,2 мл капиллярной крови (или другой биологической жидкости) внести в 1,8 мл дистиллированной воды. Осадить белок, прибавляя 1 мл пикриновой кислоты. Тщательно встряхнуть, центрифугировать 10 мин при 2000 об/мин. 1 мл прозрачного центрифугата перенести в другую пробирку. Непосредственно перед кипячением добавить 0,1 мл раствора NaOH. Кипятить на водяной бане 5 мин. Охладить под струей водопроводной воды. Аналогично обработать 0,2 мл стандарта и 0,2 мл дистиллированной воды (контроль). Колориметрировать на ФЭКе при 510 нм (синий светофильтр) в кювете 5 мм против контроля.

Расчет

$$A = E_o / E_{ст} \cdot 5,5,$$

где A – искомая величина сахара (в ммоль/л);

E_o – оптическая плотность опыта;

$E_{ст}$ – оптическая плотность стандарта;

5,5 – концентрация глюкозы в стандарте.

Сделать вывод о содержании глюкозы в крови.

Лабораторная работа № 3

ОРТОТОЛУИДИНОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

Оборудование и реактивы: капиллярная кровь, 3%-ный раствор ТХУ, ортотолуидиновый реактив, водяная баня, центрифуга, ФЭК, растворы глюкозы.

Ход работы

К 0,9 мл 3%-ного раствора ТХУ добавить 0,1 мл крови. Тщательно перемешать. Центрифугировать 20 мин при 2000 об/мин. К 0,5 мл центрифугата добавить 4,5 мл ортотолуидинового реактива, перемешать, выдержать 8 мин (точно!) в кипящей водяной бане, охладить. Аналогично обработать стандартные растворы глюкозы. Колориметрировать на ФЭКе при 600 – 650 нм (красный светофильтр) в кювете 10 мм против дистиллированной воды.

Расчет

$$C_o = \frac{E_o C_{ст}}{E_{ст}}$$

где C_o – концентрация глюкозы в опытной пробе (в ммоль/л);

E_o – оптическая плотность опытной пробы;

$C_{ст}$ – концентрация глюкозы в стандарте;

$E_{ст}$ – оптическая плотность стандарта.

Сделать вывод о содержании глюкозы в крови.

Контрольные вопросы по теме

1. Перечислите общие положения об обмене веществ. Что называют катаболизмом и анаболизмом? В чем заключается взаимосвязь между обменами разных групп веществ?
2. Назовите процессы, которые включает в себя обмен углеводов.
3. Какой процесс называется гликолизом? Перечислите основные реакции, ферменты, лимитирующие стадии. В чем заключается биологическая роль гликолиза?
4. Анаэробный распад углеводов. Виды брожения.

5. Дайте определение процесса гликогенолиза. Назовите основные реакции, ферменты, значение.
6. Что такое глюконеогенез? Основные реакции, ферменты, значение.
7. Чем отличается синтез гликогена от его распада? При ответе используйте знания об основных реакциях и ферментах синтеза гликогена.
8. Пентозофосфатный путь или прямое окисление глюкозы. Биологическая роль. Стадии, ферменты.
9. Охарактеризуйте основные способы регуляция процесса гликолиза.
10. К чему может привести переизбыток углеводов?

Контрольные задачи по теме

1. Дисахарид лактоза, состоящий из галактозы и глюкозы, может существовать в двух аномерных формах, для обозначения которых используют буквы α и β . Эти аномеры значительно различаются по свойствам. Так, например, β -аномер слаще на вкус и обладает лучшей растворимостью по сравнению с α -аномерами; из-за этого при длительном хранении мороженого в холодильнике может произойти кристаллизация α -аномера, и тогда мороженое становится рассыпчатым.
Нарисуйте проекционные формулы Хеуорса двух аномерных форм лактоз.
Нарисуйте проекционные формулы Хеуорса для всех веществ, образующихся в результате гидролиза α -аномера до галактозы и глюкозы. Сделайте то же для β -аномера.
2. Дисахарид лактоза может существовать в двух аномерных формах, у другого дисахарида – сахарозы – этого обнаружено не было. Почему?
3. Водный раствор, содержащий 0,388 г сахара в 100 мл, имеет осмотическое давление, равное 380 мм рт. ст. при температуре 10 °С. Определите молекулярную массу сахара.
4. Используя нумерацию реакции в процессе катаболизма глюкозы, укажите:
 - а) окислительно-восстановительные реакции, протекающие в анаэробном гликолизе; напишите вторую из этих реакций формулами, укажите фермент и кофермент;

б) реакции сопряжения с синтезом АТФ без участия ЦПЭ; напишите первую из этих реакций формулами, укажите фермент.

5. Чистая целлюлоза представляет собой прочное, волокнистое, совершенно нерастворимое в воде вещество. Гликоген же легко диспергируется в горячей воде, образуя мутный раствор. Какими особенностями строения обусловлены различия в свойствах этих двух полисахаридов? Какое биологическое значение имеют особенности этих свойств?
6. Сопоставьте два утверждения или показателя (обозначены буквами А и Б), приведенные в каждом пункте задания, и дайте ответ в форме: $A > B$; $A < B$; $A = B$.
 1. А. Количество глюкозы, полученной при гидролизе одного моля лактозы. Б. Количество глюкозы, полученной при гидролизе одного моля мальтозы.
 2. А. Число α -1,4-гликозидных связей в молекуле гликогена. Б. Число α -1,6-гликозидных связей в молекуле гликогена.
 3. А. Средняя длина 1,4-полиглюкозидных фрагментов в молекуле гликогена. Б. Средняя длина 1,4-полиглюкозидных фрагментов в молекуле крахмала.

Тема II. ОБМЕН ЛИПИДОВ

Липиды являются обязательной составной частью сбалансированного пищевого рациона человека. В среднем в организм взрослого человека с пищей ежедневно поступает около 80 г жиров животного и растительного происхождения.

Переваривание липидов

В полости рта жиры не подвергаются расщеплению из-за отсутствия специфических ферментов. У взрослых людей жиры проходят через желудок также без особых изменений, поскольку содержащаяся в небольшом количестве в желудочном соке взрослого человека липаза малоактивна. Хотя в желудке взрослого человека не происходит заметного переваривания жиров пищи, все же там отмечается частичное разрушение липопротеидных комплексов пищи, что делает жиры более доступными для последующего воздействия на них липазы панкреатического сока.

Расщепление жиров, входящих в состав пищи, происходит преимущественно в верхних отделах тонкого кишечника, где имеются благоприятные условия для эмульгирования жиров. Наиболее мощное эмульгирующее действие на жиры оказывают соли желчных кислот, попадающие в двенадцатиперстную кишку с желчью в виде натриевых солей, большая часть которых конъюгирована с глицином и таурином. Желчные кислоты представляют собой основной конечный продукт обмена холестерина. В желчи человека в основном содержатся холевая (3,7,12-тригидроксихолановая), дезоксихолевая (3,12-дигидроксихолановая) и хенодезоксихолевая (3,7-дигидроксихолановая) кислоты. Кроме того, в желчи человека в малых количествах содержатся литохолевая (3-гидроксихолановая) кислота, а также аллохолевая и уредезоксихолевая кислоты – стереоизомеры холевой и хенодезоксихолевой кислот. Соли желчных кислот резко уменьшают поверхностное натяжение на поверхно-

сти раздела жир/вода, благодаря чему они не только облегчают эмульгирование, но и стабилизируют уже образовавшуюся эмульсию. Желчные кислоты выполняют также важную роль в качестве своеобразного активатора панкреатической липазы, под влиянием которой происходит расщепление жира в кишечнике.

Основными продуктами, образующимися в кишечнике при расщеплении пищевых жиров, являются жирные кислоты, моноглицериды и глицерин.

Промежуточный обмен липидов включает следующие основные процессы: расщепление триглицеридов в тканях с образованием высших жирных кислот и глицерина, мобилизацию жирных кислот из жировых депо и их окисление, образование ацетоновых (кетоновых) тел, биосинтез высших жирных кислот, триглицеридов, глицерофосфолипидов, сфинголипидов, глицерофосфолипидов, сфинголипидов, холестерина и т.д.

В жировой ткани содержится несколько липаз, из которых наибольшее значение имеют триглицеридлипаза, диглицеридлипаза и моноглицеридлипаза. В результате их действия образуются конечные продукты липолиза – глицерин и свободные жирные кислоты, которые поступают в кровяное русло. В органах и тканях жирные кислоты подвергаются либо β -окислению, либо часть их используется на синтез триглицеридов.

Лабораторная работа № 4

ОМЫЛЕНИЕ ЖИРОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРОДУКТОВ ОБМЕНА ЛИПИДОВ В МОЧЕ

1. Омыление жиров

Оборудование и реактивы: касторовое масло, 35%-ный раствор гидроксида натрия, дистиллированная вода, фарфоровая чашка, электроплитка.

Ход работы

В небольшую фарфоровую чашечку помещают 0,5 мл касторового масла и 4 капли 35%-ного раствора гидроксида натрия. Стеклопалочкой хорошенько размешивают щелочь с маслом до получения однородной эмульсии. Затем ставят чашечку на электрическую печь и при незначи-

тельном подогревании продолжают помешивать, пока не получится однородная прозрачная слегка желтоватая жидкость. Затем добавляют 2 мл дистиллированной воды и вновь нагревают, тщательно перемешивая до полного упаривания воды. Снимают чашечку с электрической печки.

Получится кусочек твердого белого мыла.

2. Обнаружение желчных кислот в моче

Оборудование и реактивы: моча, сера в порошке, 5%-ный раствор сахарозы, серная кислота концентрированная, йод, пробирки.

а) проба Гея

Сущность реакции: желчные кислоты являются поверхностно-активными веществами, снижающими поверхностное натяжение мочи, поэтому порошок серы, помещенный на поверхность мочи, тонет.

Ход работы

В пробирку наливают 3 – 5 мл мочи, добавляют одну лопаточку порошка серы. НЕ взбалтывать!

В присутствии желчных кислот в моче порошок серы тонет.

б) проба Петенкоффера

Сущность реакции: проба основана на образовании окрашенного продукта при взаимодействии желчных кислот и оксиметилфурфурола. Последний образуется из сахарозы при действии концентрированной серной кислоты.

Ход работы

В пробирку наливают 5 мл мочи, добавляют 10 капель 5%-ного раствора сахарозы и осторожно, по стенке пробирки, прибавляют 10 капель концентрированной H_2SO_4 . Не взбалтывать! Оставляют на 10 – 15 мин пробирку в штативе. При наличии в моче желчных кислот на границе раздела жидкостей образуется желто-фиолетовое кольцо.

в) унифицированная проба Розина

В пробирку наливают 4 – 5 мл мочи и осторожно, по стенкам пробирки, наслаивают раствор йода. Появление на границе между жидкостями зеленого кольца говорит о наличии билирубина.

Лабораторная работа № 5

ИЗУЧЕНИЕ ОБМЕНА ХОЛЕСТЕРИНА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Холестерин является одним из основных липидов. Существует в организме в свободном состоянии и в виде эфиров с высшими жирными кислотами (олеиновой, линолевой и линоленовой и др.).

Важнейшее значение холестерина заключается в том, что он присутствует как обязательный компонент мембран всех клеток.

Не менее важное значение холестерина в том, что он используется в качестве предшественника при биосинтезе стероидных гормонов (глюко- и минералокортикоидов, половых), витамина D₃, а также желчных кислот.

В организме человека массой 70 кг имеется 140 – 150 г холестерина. Наибольшее содержание отмечают в нервной ткани, особенно в миелине (22 – 25 % от общего количества), 20 – 22 % находятся в соединительной ткани (включая жировую и тканевую жидкости), 21 % – в мышцах, 11 % – в коже, 8 % – в крови, 4 % – в печени.

Экзогенный холестерин поступает в организм только в составе продуктов животного происхождения (яйца, мясо, сливочное масло, молоко, печень). Продукты растительного происхождения не содержат холестерина.

В организме человека нет ферментов, разрушающих стерановое кольцо, выведение холестерина осуществляется в форме желчных кислот, образующихся в печени и поступающих в двенадцатиперстную кишку в составе желчи. Большое количество свободного холестерина в толстом кишечнике превращается в копростерин под действием кишечных бактерий и выводится с фекалиями.

Одним из показателей, характеризующих состояние обмена холестерина, является его количественное содержание в плазме крови. У взрослых здоровых людей оно равно 3,9 – 6,5 ммоль/л (1,5 – 2,5 г/л, 150 – 250 мг/дл).

Оценивая уровень холестерина, нужно учитывать, что в связи с проблемами атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС) в последние годы в норме его уровень в плазме составляет 3,6 – 6,7 ммоль/литр.

1. Определение общего холестерина в крови по методу Илька

Оборудование и реактивы: ледяная уксусная кислота, серная кислота, уксусный ангидрид, холестерин, хлороформ, абсолютный спирт, негемолизированная сыворотка.

Определение общего холестерина в сыворотке крови прямым методом основано на реакции Либермана – Бурхарда (метод Илька).

Принцип метода: холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот дает зеленое окрашивание.

1. Рабочий реактив представляет собой смесь одной части ледяной уксусной кислоты и 1/5 части уксусного ангидрида.

Ввиду того что реакция идет с выделением тепла, сначала смешивают уксусную кислоту с уксусным ангидридом, а затем при постоянном охлаждении, помешивая, очень медленно добавляют серную кислоту. Полученная смесь должна быть бесцветной или слегка желтоватой. Хранят в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

2. Стандартный раствор холестерина: 0,180 г холестерина, взвешенного с точностью до 0,0002 г, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ в 2,5 см³ хлороформа и доводят до метки абсолютным спиртом. Приготовленный раствор хранят в холодильнике в посуде из темного стекла с притертой пробкой и с дополнительной герметизацией парафином. 1 см³ приготовленного раствора содержит 1,8 мг холестерина.

3. Мерная колба, пробирки, холодильник, ФЭК.

Ход работы

В химически чистой пробирке к 2,1 мл рабочего реактива добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки. Сыворотку добавляют медленно, так чтобы она стекла по стенке пробирки. Пробирку энергично встряхивают 10 – 12 раз и помещают в термостат на 20 мин при температуре 37 °С. Колориметрируют на ФЭКе при длине волны 630 – 690 нм (красный фильтр) в кювете с толщиной рабочего слоя 0,5 см против рабочего реактива.

Расчет производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из стандартного раствора холестерина готовят ряд разведений (табл. 1).

Рабочие стандартные растворы холестерина обрабатывают так, как опытные пробы, энергично встряхивают и помещают в термостат, после измеряют при той же длине волны.

Таблица 1

Пробирка	Стандартный холестерин, мл	Рабочий реактив, мл	Холестерин	
			мг	мг%
1	0,05	2,15	0,09	90
2	0,1	2,1	0,18	180
3	0,15	2,05	0,27	270
4	0,2	2,0	0,36	360
5	0,25	1,95	0,45	450

Норма 116 – 242 мг%.

Лабораторная работа № 6

МЕТАБОЛИЗМ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА В МОЧЕ

Под термином «кетонные или ацетоновые тела» подразумевают ацетоуксусную кислоту ($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COOH}$), β -гидроксимасляную кислоту, или β -гидроксипутират ($\text{CH}_3\text{CH(OH)CH}_2\text{COOH}$), и ацетон (CH_3COCH_3).

Ацетон в крови в норме присутствует в крайне низких концентрациях, образуется в результате спонтанного декарбоксилирования ацетоуксусной кислоты и, по-видимому, не имеет определенного физиологического значения.

Кетонные тела образуются в печени.

1. Проба Либена

Оборудование и реактивы: моча, раствор Люголя, 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Принцип метода: реакция основана на свойстве ацетона превращаться в йодоформ в присутствии йода в щелочной среде.

Ход работы

К 1 мл исследуемой мочи добавляют несколько капель раствора Люголя (йод в растворе йодистого калия) и несколько капель 10%-ного раствора гидроксида натрия. При наличии ацетона в моче появляется помутнение за счет образования йодоформа, имеющего характерный запах.

2. Проба Легалья

Оборудование и реактивы: моча, нитропруссид натрия, 10%-ный гидроксид натрия, уксусная кислота концентрированная.

Принцип метода: реакция основана на том, что ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом натрия комплексные анионы оранжево-красного цвета, переходящего в вишнево-красный при подкислении концентрированной уксусной кислотой.

Ход работы

К 1 мл мочи добавляют несколько кристаллов нитропруссид натрия и 3 – 4 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия. При кетонурии появляется оранжевое окрашивание, которое превращается в вишневое при добавлении 5 – 8 капель концентрированной уксусной кислоты.

3. Проба Герхарда

Оборудование и реактивы: моча, хлорное железо.

Принцип метода: фенольная форма ацетоуксусной кислоты, взаимодействуя с хлорным железом, образует комплексное соединение вишнево-красного цвета.

Ход работы

К 1 мл мочи добавляют несколько капель хлорного железа. При наличии в моче ацетоната появляется вишнево-красное окрашивание.

4. Модифицированная проба Ротеры

Реактивы: раствор нитропруссид натрия 50 г/л готовят перед употреблением; сульфат аммония; 25%-ный водный раствор аммиака.

Принцип метода: нитропруссид натрия в щелочной среде реагирует с кетоновыми телами с образованием комплекса красно-фиолетового цвета.

Ход работы

Приблизительно 200 мг сухого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 капель мочи и 2 капли раствора нитропруссид натрия тщательно смешивают в пробирке, а затем на эту смесь осторожно наслаивают 10 – 15 капель раствора NH_4OH . При наличии кетоновых тел на границе раздела в течение 3 – 5 мин образуется красно-фиолетовое кольцо, интенсивность окраски которого позволяет ориентировочно судить о концентрации кетоновых тел в моче (табл. 2).

Таблица 2

Интенсивность окраски	Обнаруживаемые вещества, г/л	
	Ацетоуксусная кислота	Ацетон
Следы	0,05	0,2
Умеренная	0,3	2,5
Интенсивная	0,8	8

Лабораторная работа № 7

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ КРОВИ (ПО БАХУ И ЗУБКОВОЙ)

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является свободно-радикальным процессом, инициация которого происходит при образовании активных форм кислорода – супероксиданиона $\text{O}_2^{\bullet-}$, гидроксильного радикала OH^{\bullet} , гидропероксидного радикала HO_2^{\bullet} , синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, гипохлоритного иона ClO^- .

Основными субстратами ПОЛ являются полиненасыщенные высшие жирные кислоты, находящиеся в структуре фосфолипидов мембран. Сильнейшим катализатором процессов являются ионы металлов (Fe^{2+}). ПОЛ – это физиологический процесс, который имеет важное значение для организма, так как регулирует проницаемость мембран, влияет на деление и рост клеток, начинает фагоцитоз, является путем биосинтеза некоторых биологически активных веществ (простагландинов, тромбоксанов, лейкот-

риенов). Контроль за физиологическим уровнем ПОЛ осуществляет мощная антиоксидантная система, включающая неферментные антиоксиданты (α -токоферол, аскорбиновая кислота, β -каротин, мочевая кислота, убихинон), а также антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, церулоплазмин). Антиоксиданты способны прекращать ПОЛ или нейтрализовать его продукты. Снижение активности антиоксидантов или высокая активность прооксидантов могут привести к неконтролируемому ПОЛ, повреждению клеточных структур и гибели клетки.

Интенсификация ПОЛ приводит к развитию многих патологических процессов: последствий радиационных поражений, осложнений при гипероксигенации и гипоксии, опухолей, атеросклероза.

Каталаза – антиоксидальный фермент, гемопrotein, разлагает пероксид водорода на воду и кислород.

Активность каталазы выражается каталазным числом – количеством миллиграммов перекиси водорода, которое может разложить 1 мкл крови. В норме каталазное число равно 10 – 16 ед. Активность каталазы снижается при некоторых заболеваниях печени. Существует редкое наследственное заболевание – акаталазия, связанное с отсутствием каталазы в организме. Клинические проявления наблюдаются со стороны слизистой полости рта – альвеолярная пиорея и пародонтоз. Проявлений со стороны крови не наблюдается, так как пероксид водорода может также разлагаться глутатионпероксидазой.

Оборудование и реактивы: дистиллированная вода, кровь, 1%-ный раствор перекиси водорода, 10%-ный раствор серной кислоты, 0,1 ммоль/л раствор перманганата калия, пробирки, колбы, водяная баня.

Принцип метода: раствором перманганата калия оттитровывают перекись водорода, оставшуюся после действия каталазы. Общее количество взятой в опыт перекиси водорода определяют в контрольной пробе, поставленной в тех же условиях, что и опыт, но с каталазой, денатурированной при кипячении. По разности двух титрований определяют количество перекиси водорода, разложенное каталазой.

Ход работы

В мерную колбу на 100 мл наливают 10 мл дистиллированной воды, вносят туда 0,1 мл исследуемой крови, предварительно обтерев кончик пипетки от остатков крови. Доливают колбу до метки водой и перемешивают содержимое; этот основной раствор крови (1:1000) используют для определения активности каталазы.

В две колбы наливают по 7 мл дистиллированной воды и отмеряют в них по 1 мл основного раствора крови. Содержимое контрольной пробы кипятят 2 – 3 мин. В обе колбы вносят по 2 мл 1%-ного раствора перекиси водорода и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем приливают в каждую пробу по 5 мл 10%-ного раствора серной кислоты и оттитровывают содержимое их 0,1 ммоль/л раствором перманганата калия до появления розового цвета.

Расчет

1 мл 0,1 ммоль/л раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг перекиси водорода. Умножая эту величину на разность в результатах титрования контроля и опыта, получают количество миллиграммов перекиси водорода, которое было разложено в 1 мкл крови.

Контрольные вопросы по теме

1. Дайте общую характеристику обмена липидов. В чем заключается роль желчных кислот в процессе переваривания и всасывания липидов?
2. Назовите типы реакций, имеющих место в ходе β -окисления высших жирных кислот (ВЖК). От чего зависит количество циклов окисления?
3. Перечислите последовательность реакций биосинтеза ВЖК. Что из себя представляет синтетаза ВЖК, АПБ? Как осуществляется регуляция синтеза ВЖК?
4. Охарактеризуйте особенности синтеза и распада непредельных ВЖК.
5. Энергетика окисления ВЖК. Стехиометрия окисления ВЖК.
6. Перечислите последовательность реакций биосинтеза и распада фосфолипидов.

7. Перечислите последовательность реакций биосинтеза и распада триацилглицеридов.
8. Перечислите последовательность реакций биосинтеза и распада сфинголипидов и гликолипидов.

Контрольные задачи по теме

1. Напишите структурную формулу фосфатидилхолина.
 - Какой суммарный заряд имеет эта молекула при $\text{pH} = 7$?
 - Какая группа фосфотидилхолина в мембране может взаимодействовать с периферическими белками?
 - За счет каких сил происходит это взаимодействие?
2. Жирные кислоты с 18 углеродными атомами имеют следующие точки плавления: стеариновая кислота – $69,6^\circ\text{C}$; линолевая кислота – 5°C ; линоленовая кислота – 11°C . Какими структурными особенностями определяется та или иная температура плавления этих кислот? Объясните молекулярную основу определенной направленности в изменении температуры плавления.
3. Некоторые из применяемых в кулинарии жиров, например сливочное масло, быстро портятся при хранении на воздухе при комнатной температуре, тогда как свойства твердых жиров типа маргарина в аналогичных условиях меняются мало. Почему?
4. В процессе приготовления майонеза лецитин из яичных желтков переходит в растительное масло, что стабилизирует соус и не позволяет расслаиваться. Объясните, почему это происходит?
5. Как будут заряжены при $\text{pH} = 7,0$: а) лецитин (фосфатидилхолин); б) кефалин (фосфатидилэтанолламин); в) фосфатидилсерин?
6. Какая часть молекулы триацилглицерола содержит больше биологически доступной энергии (в расчете на 1 атом углерода): остаток жирных кислот или остаток глицерина? Ответ объясните.
7. Выберите правильный ответ.

Высшие жирные кислоты в процессе их обмена разрушаются преимущественно путем: а) восстановления; б) ω -окисления; в) декарбокислирования; г) β -окисления.

Тема III. ОБМЕН БЕЛКОВ

В сутки взрослому человеку в среднем необходимо потребить 100 г белка. За сутки распадается и вновь синтезируется 400 г белка, обновляются все белки за 35 дней.

О состоянии белкового обмена в организме судят по азотистому балансу – количественному соотношению вводимого азота в составе всех продуктов и выводимого азота в течение суток:

- азотистое равновесие: количество вводимого азота в сутки равно количеству выводимого азота,
- положительный азотистый баланс: количество вводимого азота больше количества выводимого азота в сутки,
- отрицательный азотистый баланс: количество вводимого азота меньше количества выводимого азота в сутки.

Поскольку белки организмов отличаются строгой видовой и тканевой специфичностью, живой организм обладает способностью использовать вводимый белок только после его полного гидролиза до аминокислот, из которых организм строит свойственные ему специфические белки. Поэтому белки, поступающие с пищевыми продуктами, подвергаются перевариванию в желудочно-кишечном тракте человека под действием протеолитических ферментов.

В желудке белки расщепляются под действием фермента пепсина (эндопептидаза) при $\text{pH} = 1,5 - 2,5$ в присутствии соляной кислоты. Образовавшиеся высокомолекулярные полипептиды поступают в двенадцатиперстную кишку и при $\text{pH} = 7,8 - 8,4$ подвергаются действию трипсина, химотрипсина, эластазы (эндопептидазы) и карбоксипептидаз А и В (экзопептидазы). В результате действия всех ферментов образуются олиго-, ди- и трипептиды, а также свободные аминокислоты, которые поступают в тонкий кишечник, где при $\text{pH} = 7,8 - 8,4$ под действием амино-, ди-, три- и олигопептидаз (экзопептидазы) происходит расщепление их до свободных аминокислот.

Всасывание аминокислот через мембрану тонкого кишечника происходит с участием глутатиона под действием фермента, находящегося на мембране слизистой кишечника γ -глутамилтрансферазы. Аминокислота образует комплекс с глутатионом, который проходит через мембрану, где распадается на свободную аминокислоту и глутатион, который регенирируется с затратой трех молекул АТФ. Всасывание протекает против градиента концентраций (симпорт). Аминокислоты поступают в кровь воротной вены, затем в печень, где подвергаются ряду превращений.

Лабораторная работа № 8

АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Желудочный сок является секретом желез слизистой оболочки желудка, представляет собой бесцветную жидкость с сильноокислой реакцией ($\text{pH} = 1,5 - 2,5$), объемом 2 – 2,5 л в сутки. Желудочный сок человека в норме содержит воду, соляную кислоту, пепсин, муцин, белки, хлорид натрия, кислореагирующие фосфаты и ряд других веществ, а при патологии – молочную кислоту и летучие жирные кислоты.

Для оценки содержания всех кислых продуктов в желудочном соке определяют биохимический показатель, показывающий кислотность желудочного сока, которая выражается в количестве миллилитров 0,1 н. раствора гидроксида натрия, идущего на нейтрализацию 100 мл профильтрованного желудочного сока.

Различают следующие виды кислотности:

- общая кислотность, 40 – 60 титрационных единиц (титр. ед.), обусловлена совокупностью всех кислореагирующих веществ;
- свободная HCl , обусловлена наличием свободной HCl , которая составляет 20 – 40 титр. ед.;
- связанная HCl – комплекс HCl с белками и продуктами их переваривания, который составляет 15 – 20 титр. ед.

Повышенная кислотность может указывать на язвенную болезнь желудка и гиперацидный гастрит.

Пониженная кислотность встречается при гипоацидном гастрите, часто при раке желудка.

1. Качественные реакции на свободную соляную кислоту в желудочном соке

Оборудование и реактивы: индикаторная бумага конго, парадиметиламиноазобензол, соляная кислота, желудочный сок, стеклянная палочка, пробирки.

Нормальный желудочный сок всегда содержит свободную соляную кислоту. Ее можно обнаружить по сильноокислой реакции (рН ниже 3,0). Для открытия свободной соляной кислоты обычно пользуются индикаторами: конго красным (зоны перехода окраски рН = 3,0 – 5,2), парадиметиламиноазобензолом (зоны перехода окраски рН = 2,9 – 4,2).

Ход работы

На красную бумагу конго наносят стеклянной палочкой каплю раствора соляной кислоты. Развивается синее окрашивание.

Проделывают эту реакцию с желудочным соком. Синее окрашивание указывает на присутствие свободной соляной кислоты.

Несколько капель раствора соляной кислоты помещают в пробирку и добавляют 1 – 2 капли индикатора парадиметиламиноазобензола. Наблюдается появление красного окрашивания.

Проделывают эту реакцию с желудочным соком. В присутствии свободной соляной кислоты развивается красное окрашивание. Органические кислоты могут давать с индикатором оранжевый цвет.

2. Качественная реакция на молочную кислоту в желудочном соке

Оборудование и реактивы: фенол, хлорное железо, молочная кислота, желудочный сок, соляная кислота, пробирки.

Ход работы

К 15 мл фенола добавляют несколько капель хлорного железа и взбалтывают. Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет. Реактив разводят водой до слабо-фиолетовой окраски.

В три пробирки помещают по 2 мл этого реактива, затем в 1-ю пробирку – раствор молочной кислоты по каплям, во 2-ю – желудочный сок, в

3-ю – раствор соляной кислоты. В 1-й пробирке появляется зелено-желтое окрашивание, во 2-й – оно появляется только в том случае, если в желудочном соке присутствует молочная кислота, в 3-й – раствор обесцвечивается.

Молочная кислота является патологической составной частью желудочного сока (например при раке желудка). Кроме того, при отсутствии соляной кислоты в желудке развиваются процессы брожения (под влиянием микроорганизмов), что также приводит к появлению молочной кислоты.

3. Определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты в одной пробе желудочного сока

Оборудование и реактивы: профильтрованный желудочный сок, парадиметиламиноазобензол, фенолфталеин, 0,1 н. раствор едкого натра.

Принцип метода. Раздельное титрование желудочного содержимого в одной пробе достигается путем применения индикаторов с разными зонами перехода окраски.

Ход работы

Отмеривают пипеткой в колбу 10 мл профильтрованного желудочного сока. Добавляют 1 – 2 капли парадиметиламиноазобензола и 2 капли фенолфталеина. Титруют 0,1 н. раствором едкого натра до желтовато-красноватого окрашивания (первый пункт, рН = 2,9), далее продолжают титрование до лимонно-желтого цвета (второй пункт, рН = 4,0), наконец, продолжают титрование до появления розового окрашивания (третий пункт, рН = 8,0).

Первый пункт соответствует свободной соляной кислоте, так как при рН = 2,9 оттитровывается практически вся свободная соляная кислота (99 %). Среднее арифметическое между вторым и третьим пунктами титрования считают соответствующим общей соляной кислоте. Третий пункт соответствует общей кислотности желудочного сока.

Исходя из полученных данных, строят график титрования желудочного содержимого, откладывая на оси абсцисс количество миллилитров, пошедших на титрование 0,1 н. раствора едкого натра, а на оси ординат – значение рН среды. Находят по графику числовые значения для общей кислотности, связанной, свободной или общей соляной кислоты. Затем пересчитывают полученные цифры на 100 мл желудочного сока.

Пример На титрование затрачено 0,1 н. NaOH:

до первого пункта – 4,1 мл,

до второго – 4,44 мл,

до третьего – 6,36 мл.

Среднее арифметическое между вторым и третьим пунктом равно 5,40 мл.

Следовательно, свободная HCl – $4,1 \cdot 10 = 41$, общая HCl – $5,4 \cdot 10 = 54$, связанная HCl – $54 - 41 = 13$, общая кислотность – $6,36 \cdot 10 = 63,6$.

Сделайте вывод о характере исследованного желудочного сока.

Лабораторная работа № 9

КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

«Отслужившие» в организме белки подвергаются разрушению под влиянием особых (протеолитических) ферментов, в результате чего образуются так называемые компоненты остаточного азота. Остаточный азот крови – азот небелковых азотистых компонентов в сыворотке крови. В состав остаточного азота крови входит главным образом азот конечных продуктов обмена простых и сложных белков: мочевины – 85 %, креатинина, мочевой кислоты, индикана, аминокислот, солей аммония – 15 %. Так как 85 % остаточного азота составляет азот мочевины, в клинико-биохимических лабораториях исследуют не суммарный «остаточный азот», а количество мочевины. В норме азот мочевины составляет 2,9 – 8,9 ммоль/л, мочевина сыворотки крови – 2,5 – 8,3 ммоль/л. В суточной моче содержание мочевины составляет 330 – 590 ммоль/л.

Уровень мочевины в крови и моче зависит от соотношения процессов ее синтеза и выведения из организма.

Незначительное изменение содержания мочевины в крови (снижение или увеличение) может наблюдаться при потреблении пищи со слишком малым или чрезмерно большим количеством белка.

Выраженное повышение концентрации мочевины в крови отмечается у больных с нарушением выделительной функции почек, а также у пациентов, страдающих заболеваниями, при которых происходит усиленный распад белка, а значит, и повышенное образование мочевины.

Мочевина, относительно легко проходя через плазматическую мембрану клеток и будучи осмотически активным веществом, увлекает в клетки паренхиматозных органов связанную с ней воду. Это приводит к увеличению объема клеток (клеточной гипергидратации) и нарушению функционального состояния жизненно важных органов и тканей.

Поскольку мочевина образуется в печени, при тяжелых поражениях этого органа (декомпенсированном циррозе; отравлениях фосфором, мышьяком и другими гепатотропными, печеночными ядами) концентрация мочевины в крови может быть снижена. Отмечено падение концентрации мочевины в крови при беременности, что, по-видимому, связано с повышением утилизации белка из организма матери.

В результате обмена белков в организме во всех тканях постоянно образуется аммиак. Источники аммиака в организме:

1. Аминокислоты.
2. Амиды АК: глутамин, аспарагин.
3. Биогенные амины.
4. Пуриновые нуклеотиды.
5. Пиримидиновые основания.

Аммиак является токсичным веществом для организма, особенно для центральной нервной системы. Существует 5 путей обезвреживания аммиака:

1. Биосинтез мочевины в печени.
2. Восстановительное аминирование в тканях.
3. Образование амидов кислот в тканях.
4. Образование пиримидиновых оснований в цитозоле клеток.
5. Образование аммонийных солей в почках.

Основной путь обезвреживания аммиака в организме – биосинтез мочевины в печени (орнитинный цикл). В биосинтезе мочевины на первом этапе принимает участие карбоамидфосфатсинтетаза 1, локализованная только в митохондриях клеток печени.

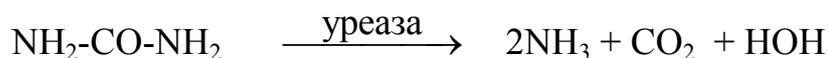
Биосинтез мочевины осуществляется в 5 этапов: 1-й и 2-й этапы биосинтеза проходят в митохондриях клеток печени; 3-й, 4-й и 5-й – цитозоле печени.

Биологическое значение цикла мочевины:

1. Обезвреживание аммиака в организме.
2. Регуляция азотистого баланса в организме: при поступлении большого количества белка в организм скорость цикла возрастает.
3. Поставляет фумарат в ЦТК.
4. Осуществляет биосинтез заменимых аминокислот через оксалоацетат.
5. Поставляет оксалоацетат для биосинтеза глюкозы.

1. Ферментативный метод определения мочевины в сыворотке крови и моче

Принцип метода: уреаза гидролизует мочевины с образованием аммиака и углекислого газа. Возникший аммиак определяют по цветной реакции салицилата натрия со щелочным раствором гипохлорита натрия.



Реактивы

1. Раствор I: уреаза в буфере: 20 мг уреазы (активность 5 МЕ/мг) растворяют в 10 мл буфера. Для изготовления раствора с pH = 6,7 0,5 г трилона Б растворяют в 30 – 40 мл дистиллированной воды, доводят pH до 6,7 раствором гидроксида натрия, а объем – до 50 мл дистиллированной водой. Перед работой разводят дистиллированной водой в отношении 1:4. Раствор стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике.

2. Раствор II: 24 г салицилата натрия и 0,5 г нитропруссиды натрия (**ЯД!**) растворяют в 400 мл дистиллированной воды. Раствор устойчив в темноте при +5 °С не менее 14 дней.

3. Раствор III: гипохлорит натрия (0,2 ммоль/л) в растворе гидроксида натрия (3 ммоль/л). 20 мл полученного раствора разбавляют дистиллированной водой до 400 мл. Раствор устойчив при + 5 °С не менее месяца.

4. Раствор IV: Стандартный раствор мочевины (15 ммоль/л).

Ход работы

Приготовить растворы в трех пробирках (табл. 3).

Таблица 3

В пробирки пипетируют, мл	Пробирка 1. Проба	Пробирка 2. Стандарт	Пробирка 3. Раствор сравнения
Сыворотка (моча)	0,02	-	-
Раствор IV	-	0,02	-
Раствор I	0,50	0,50	0,50

Перемешать и инкубировать 10 мин при 37 °С.

Далее добавить (табл. 4)

Таблица 4

В пробирки пипетируют, мл	Пробирка 1. Проба	Пробирка 2. Стандарт	Пробирка 3. Раствор сравнения
Раствор II	2,0	2,0	2,0
Раствор III	2,0	2,0	2,0

Немедленно по добавлении раствора III перемешать, через 15 мин (25 °С) снова перемешать и измерить оптическую плотность пробы A_1 и стандарта A_2 против раствора сравнения. Фотометрировать при длине волны 540 – 560 нм, кювета с толщиной слоя 1 см.

Расчет

$$C_{\text{мочевины}} (\text{моль/л}) = 15 \frac{A_1}{A_2}.$$

Примечание. Мочу разводят дистиллированной водой 1:99 (результат умножают на 100). У проб с содержанием мочевины свыше 33 ммоль/л анализ повторяют с пробой, разведенной водой 1:1 (результат умножают на 2).

Сделать вывод о содержании мочевины в крови и моче и об их соотношении.

Контрольные вопросы по теме:

1. Перечислите основные этапы обмена белков. Назовите ферменты гидролиза белков. Каким образом прорисходит переваривание и всасывание продуктов гидролиза белков?
2. Дайте определение основных путей распада аминокислот в организме: дезаминирования, трансаминирования, декарбоксилирования.
3. Какой процесс называют декарбоксилированием аминокислот? Что такое биогенные амины, в чем заключается их физиологическая роль?
4. В чем заключается роль глутаматдегидрогеназы в обмене аминокислот?
5. Определите стратегию разрушения белков и аминокислот.
6. Какой метаболический путь называют циклом мочевины? Укажите его роль, связь с другими метаболическими путями.
7. Каким образом в организме высших животных и человека обезвреживается аммиак?

Контрольные задачи по теме

1. Смесь аминокислот, содержащая валин, лейцин, аспарагиновую кислоту, лизин, гистидин, серин, была подвергнута фракционированию методом электрофореза при $pH = 6,2$. Какие аминокислоты будут перемещаться к катоду, аноду или останутся на линии старта?
2. Какова минимальная молекулярная масса рибонуклеазы, если массовые концентрации лейцина и изолейцина в ней будут соответственно равны 1,6 и 2,48?
3. В белковом растворе обнаружено содержание общего азота 3,5 % и 19,9 % белка. Что можно сказать о природе исследуемого белка?
4. Концентрации триптофана, тирозина в глютенине пшеницы соответственно равны 1,68 и 4,5. По этим данным вычислите минимальную молекулярную массу глютенина и количество указанных аминокислот (в молях).
5. В пробе молочного продукта установлено 18 % белка и 0,28 % аминного азота. Какой процент от белкового азота составляет аминный? В каком молочном продукте может содержаться такое количество белка?
6. Изобразите белок во вторичной структуре. Укажите стрелкой, какие связи рвутся при гидролизе, а какие – при денатурации белка.
7. Составьте тетрапептид, состоящий из двух заменимых и двух незаменимых аминокислот. Дайте ему название и укажите стрелкой место действия протеаз. Каков генетический код этого тетрапептида?

Тема IV. БИОЭНЕРГЕТИКА

Жизнь и рост клетки зависят от пищи не только как источника углерода, азота, серы, фосфора и других биологически необходимых элементов, но также как источника энергии. В отсутствие источника энергии клетку можно сравнить с неработающей машиной – она не может синтезировать многочисленные соединения, необходимые для ее жизнедеятельности, не способна к активному мембранному транспорту и не в состоянии двигаться и выполнять специальные физиологические функции, например участвовать в сокращении мышц, передавать нервные импульсы и т.п.

Описанием энергетики любой системы – живой или неживой, органической или неорганической, химической, физической или биологической в общем случае занимается *термодинамика*, которая рассматривает изменение энергии по мере изменения состояния системы.

Биоэнергетика, или биохимическая энергетика, занимается описанием энергетики биологических систем.

Стадии извлечения энергии из пищевых продуктов

1. Переваривание и всасывание. Крупные молекулы пищи расщепляются на более мелкие компоненты:

белки → аминокислоты

полисахариды → ди- и моносахара

жиры → глицерин и жирные кислоты

На этой стадии не происходит высвобождения биологически полезной энергии.

2. Промежуточный обмен. В процессах гликолиза, β -окисления высших жирных кислот, а также дезаминирования, переаминирования и декарбоксилирования аминокислот многочисленные малые молекулы распадаются до нескольких простых компонентов, играющих центральную роль в метаболизме. На этой стадии происходит образование АТФ, но в значительно меньшем количестве, чем при полном окислении образующихся продуктов на следующей стадии.

3. Конечный путь распада – терминальное окисление. Эта стадия включает окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты (ПВК), цикл Кребса и окислительное фосфорилирование. Большая часть АТФ, генерируемого при расщеплении пищевых веществ, образуется на этой стадии.

Лабораторная работа № 10

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ (ПО УМБРАЙТУ)

Пировиноградная кислота является одним из центральных метаболитов углеводного обмена. Она образуется в процессе распада глюкозы и гликогена в тканях, при окислении молочной кислоты, а также в результате превращений ряда аминокислот. При окислительном декарбоксилировании ПВК образуется ацетил-КоА, который вступает в цикл Кребса. ПВК является одним из основных субстратов глюконеогенеза. Наиболее резкое повышение концентрации пирувата отмечается при мышечной работе (до 5 мг/100 мл), В₁-витаминной недостаточности, паренхиматозных заболеваниях печени, сахарном диабете, сердечной декомпенсации, токсикозах. Повышенное содержание ПВК токсично для организма.

Содержание пирувата в крови здорового человека колеблется от 0,4 до 1,2 мг в децилитре крови (0,05 – 0,14 ммоль/л), а в моче – от 10 до 25 мг в суточном диурезе.

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

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

Оборудование и реактивы: 10%-ный раствор ТХУ, кровь, 0,1%-ный раствор 2,4-ДНФГ, толуол, 2,5%-ный раствор щелочи, микропипетка, пробирки, ФЭК, дистиллированная вода, пировиноградная кислота для стандартных растворов.

Ход работы

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

Расчет

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

Лабораторная работа № 11

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКРОЭРГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЫШЦ (АТФ И КРЕАТИНФОСФАТА)

В результате процессов диссимиляции происходит освобождение энергии, заключенной в молекулах сложных органических соединений, которая трансформируется в энергию АТФ и других макроэргических соединений. К макроэргическим относятся соединения, при гидролизе которых выделяется энергия не менее 7 ккал/моль (21 кДж/моль). Богатой энергией связью, кроме АТФ, обладают УТФ, ЦТФ, ГТФ, ТТФ, креатинфосфат, некоторые тиозефире (например ацил-КоА), фосфоенолпируват, 1,3-дифосфоглицерат и некоторые другие соединения.

В мышечной ткани содержится два макроэргических соединения – АТФ и креатинфосфат, которые обеспечивают по мере надобности мышцу большим количеством энергии. Основным путем образования АТФ в тка-

нях является окислительное фосфорилирование в процессе тканевого дыхания. Креатинфосфат образуется в мышце при участии АТФ в состоянии покоя и служит резервом высокоэнергетического фосфата для синтеза АТФ из АДФ при активной мышечной работе. Метод основан на том, что два последних остатка фосфорной кислоты в АТФ, богатые энергией, так же, как и фосфатный остаток в креатинфосфате, легко отщепляются при непродолжительном гидролизе в кислой среде – так называемый лабильно связанный фосфор. Сравнение содержания неорганического фосфора в пробах до гидролиза и после дает представление о количестве лабильно связанного фосфора, которое приходится на долю макроэнергетических соединений мышечной ткани. Количество фосфора определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты.

Оборудование и реактивы: мышцы животного, 10%-ный раствор ТХУ, стеклянная палочка, мерная колба, дистиллированная вода, водяная баня, 1 моль/л соляной кислоты, 1 моль/л NaOH, 2,5%-ный молибдат аммония, 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты, ФЭК, бюретка, складчатый фильтр.

Ход работы

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

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

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

Дальнейшие процедуры обязательно проводят одновременно с опытной и контрольной пробами. Из обеих пробирок отбирают по 5 мл жидкости, переносят в две другие пробирки и добавляют в каждую из последних по 0,5 мл 2,5%-ного молибдата аммония, 0,5 мл 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты и по 2 мл дистиллированной воды. Смесь в каждой пробирке быстро перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре 10 мин.

Контрольную и опытную пробы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром против воды. В опытной пробе определяемый неорганический фосфор представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и фосфатных солей, присутствующих в тканях, в контрольной пробе – только фосфатные соли.

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

Расчет

Рассчитывают количество лабильно связанного фосфора в миллиграммах на 100 г сырой ткани, учитывая разведение по формуле:

$$x = A \cdot 3,34 \cdot 100,$$

где x – содержание макроэргических соединений в пересчете на 1 мг АТФ в 100 г сырой ткани (мг/100 г);

A – содержание АТФ в пробе, мг;

3,34 – коэффициент пересчета на 1 г ткани с учетом разведения растворов.

Лабораторная работа № 12

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ

Конечным продуктом гликолиза является молочная кислота. В анаэробных условиях гликолиз – единственный процесс в животном организме, поставляющий энергию. Именно благодаря процессу гликолиза организм человека и животных определенный период времени может осуществлять ряд физиологических функций в условиях недостаточности кислоро-

да. В тех случаях, когда гликолиз протекает в присутствии кислорода, говорят об аэробном гликолизе. В процессе анаэробного гликолиза образуются 2 молекулы АТФ, а в процессе аэробного также за счет дальнейшего окисления пирувата – 38 молекул.

В хорошо артериализованной крови содержание молочной кислоты должно быть ниже 1 ммоль/л.

Принцип метода. Из молочной кислоты в присутствии серной, фосфорной кислот и солей меди образуется уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом ($C_6H_5C_6H_4OH$), дает фиолетово-окрашенные продукты. Реакция очень чувствительна, поэтому надо строго выдерживать все условия выполнения исследования.

Оборудование и реактивы: кровь, 5%-ный раствор ТХУ, медный купорос, фосфорная кислота, серная кислота концентрированная, раствор параоксидифенила в диметилформамиде, молочная кислота, водяная баня, пробирки, ФЭК.

Ход работы

0,02 мл крови выливают в 1 мл 5 %-ного ТХУ, через несколько минут центрифугируют. К 0,2 мл безбелкового фильтрата прибавляют 0,1 мл смеси медного купороса и фосфорной кислоты и 2,5 мл концентрированной серной кислоты. Энергично встряхивают и точно через 3 мин ставят ровно на 3 мин в кипящую водяную баню, затем еще 3 мин охлаждают в ледяной воде. Добавляют 1 каплю раствора параоксидифенила в диметилформамиде, эта капля должна сразу попасть в центр пробирки; встряхивают и оставляют стоять 10 мин при комнатной температуре. После этого нагревают на кипящей водяной бане 1,5 мин, охлаждают в воде и фотометрируют при длине волны 565 нм.

Одновременно ставят холостой опыт, в котором вместо безбелкового фильтрата берут 5%-ный раствор ТХУ, и калибровочные опыты, в которые берут растворы ТХУ, содержащие в 0,2 мл 2 – 20 нмоль молочной кислоты. Их обрабатывают так же, как опытные. Окраска калибровочной пробы, в которую взято 2 нмоль молочной кислоты, соответствует пробе с содержанием 0,5 ммоль/л; следовательно, окраска пробы, содержащей 20 нмоль, соответствует концентрации 5 ммоль/л.

Контрольные вопросы по теме

1. Перечислите основные принципы термодинамики применительно к живому организму. Как происходит утилизация энергии в организме?
2. Какие соединения называют макроэргическими, в чем заключаются их свойства и особенности? Что такое экзергонические и эндергонические реакции? Смысл сопряжения.
3. Понятие о биологическом дыхании. Дыхательная (транспортная) цепь электронов.
4. Явление сопряжения окисления с фосфорилированием. Синтез АТФ.

Контрольные задачи по теме

1. Рассчитайте число молекул АТФ, образующихся при полном окислении до CO_2 и H_2O одной молекулы следующих субстратов:
 - а) сахарозы;
 - б) ацетил-КоА.
2. Рассчитайте число молекул АТФ, образующихся при полном окислении до CO_2 и H_2O одной молекулы следующих субстратов:
 - а) фруктозо-6-фосфат;
 - б) ацетил-КоА.
3. Каков выход АТФ при полном окислении клеточным гомогенатом каждого из следующих субстратов, если принять, что гликолиз, ЦТК и окислительное фосфорилирование полностью активны:
 - а) фосфоенолпируват; б) ФАДН₂; в) ПВК; г) НАДН; д) фруктозо-1,6-бифосфат; е) глюкоза?
4. Почему выход АТФ при полном окислении капроновой кислоты выше, чем при полном окислении глюкозы, хотя капроновая кислота и глюкоза имеют по 6 углеродных атомов?
5. Как работает цикл Кребса во время марафона? Какие включаются механизмы?
6. Объясните, почему окисление ацетил-КоА в цикле Кребса является аэробным, ведь кислород не принимает участия в нем в качестве реагента.
7. Какой фермент катализирует реакцию окисления пирувата в ацетил-КоА, при недостатке какого витамина активность фермента снижается?

Библиографический список

1. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М. : Медицина, 1983. – 707 с.
2. Лабораторные методы исследования в клинике / под ред. В. В. Менъшикова. – М. : Медицина, 1987. – 382 с.
3. *Камышников, В. С.* Клинико-биохимическая лабораторная диагностика : справочник : в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск : Инерпрес-сервис, 2003. Т. 1. – 495 с. – ISBN 985-482-018-1 ; Т. 2 – 463 с. – ISBN 985-482-019-X.
4. *Марри, Р.* Биохимия человека : в 2 т. / Р. Марри [и др.]. – М. : Мир, 1993. Т. 1. – 317 с., Т. 2. – 414 с.
5. Медицинская и лабораторная диагностика : программы и алгоритмы. / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1997. – 350 с.
6. *Николаев, А. Я.* Биологическая химия / А. Я. Николаев. – М. : Медицина, 1998. – 310 с.
7. *Пустовалова, Л. М.* Практикум по биохимии / Л. М. Пустовалова. – Ростов н/Д : Феникс, 1999. – 541 с. – ISBN 5-222-00829-0.
8. *Страйер, Л.* Биохимия : в 3 т. / Л. Страйер. – М. : Мир, 1985. Т. 1. – 168 с., Т. 2. – 218 с., Т. 3. – 396 с.
9. *Филиппович, Ю. Б.* Практикум по общей биохимии / Ю. Б. Филиппович. – М. : Высш. шк., 1983. – 311 с.

Оглавление

Введение	3
Лабораторные работы	6
Тема I. <i>Обмен углеводов</i>	6
Лабораторная работа № 1. <i>Изучение строения и свойств запасных полисахаридов растений и животных</i>	7
Лабораторная работа № 2. <i>Определение сахара в биологических жидкостях методом Крецелиуса – Сейферт</i>	9
Лабораторная работа № 3. <i>Ортотолуидиновый метод определения глюкозы</i>	11
Тема II. <i>Обмен липидов</i>	14
Лабораторная работа № 4. <i>Омыление жиров. Определение некоторых продуктов обмена липидов в моче</i>	15
Лабораторная работа № 5. <i>Изучение обмена холестерина в организме человека</i>	17
Лабораторная работа № 6. <i>Метаболизм кетоновых тел. Качественные реакции на кетоновые тела в моче</i>	19
Лабораторная работа № 7. <i>Перекисное окисление липидов. Количественное определение активности каталазы крови (по Баху и Зубковой)</i>	21
Тема III. <i>Обмен белков</i>	25
Лабораторная работа № 8. <i>Анализ желудочного сока</i>	26
Лабораторная работа № 9. <i>Конечные продукты белкового обмена</i>	29
Тема IV. <i>Биоэнергетика</i>	34
Лабораторная работа № 10. <i>Количественное определение пировиноградной кислоты в крови колориметрическим методом (по Умбрайту)</i>	35
Лабораторная работа № 11. <i>Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата)</i>	36
Лабораторная работа № 12. <i>Количественное определение молочной кислоты в крови</i>	38
Библиографический список	41

Учебное издание

МАЛЕНЮК Евгений Борисович
ЗАПРУДНОВА Елена Александровна

Практикум по биохимии

Ч. 2. Динамическая биохимия

Редактор Р. С. Кузина
Корректор Е.В. Афанасьева
Компьютерная верстка С. В. Павлухиной

ЛР № 020275. Подписано в печать 20.04.05.

Формат 60x84/16. Бумага для множит. техники. Гарнитура Таймс.
Печать на ризографе. Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,59. Тираж 150 экз.

Заказ

Редакционно-издательский комплекс
Владимирского государственного университета.
600000, Владимир, ул. Горького, 87.