

## ЗАНЯТИЕ 1 (2 семестр)

**Тема:** Определение концентрации общего белка сыворотки крови (рефрактометрически и фотометрически биуретовым методом)

### Теоретический материал:

1. Строение, классификация белков.
2. Функции белков в организме животных
3. переваривания белков у моногастричных и полигастричных животных.
4. Преобразование аминокислот в толстом отделе кишечника
5. Преобразование аминокислот в тканях

### Лабораторная работа:

**Определение концентрации общего белка сыворотки крови (рефрактометрически и фотометрически биуретовым методом)**

**Определение общего белка сыворотки крови биуретовым методом**

Принцип методы:

Белок сыворотки крови образует комплекс фиолетовой окраски с солями меди в щелочной среде, интенсивность которого пропорциональна концентрации белка в образце.

В состав биуретового реактива входят следующие компоненты:

- йодид калия – 30 ммоль/л
- калий-натрий виннокислый – 32 ммоль/л
- сульфат меди – 18 ммоль/л
- гидроксид натрия 200 ммоль/л

### Ход работы

В пробирку внести 5 мл биуретового реактива и добавить 0,1 мл сыворотки или плазмы крови. Инкубировать 10 минут при комнатной температуре. Затем провести колориметрирование на ФЭКе опытной пробы против биуретового реактива в кюветах на 10 мм при длине волны 530-570 нм. Расчёт концентрации белка производят по формуле:

$$C = E \times 150 \text{ г/л,}$$

Где E – величина оптической плотности,

150 – коэффициент пересчёта

Эта же пробы сыворотки исследуется другим методом – рефрактометрическим (с помощью рефрактометра ИРФ-54).

Принцип метода: луч света, проходя из одной среды в другую, меняет своё направление – преломляется. Отношение синуса угла падения к синусу угла преломления носит название показателя преломления. В сыворотке крови величина рефракции зависит главным образом от количества белков.

### Контрольные вопросы:

#### 1. Что такое общий белок сыворотки крови?

*Это измерение концентрации суммарного белка (альбумины + глобулины) в жидкой части крови, результаты которого характеризуют обмен белков в организме.*

#### 2. Что такое сыворотка крови?

*плазма крови, лишённая фибриногена. Сыворотки получают либо путём естественного свёртывания плазмы (нативные сыворотки), либо осаждением фибриногена ионами кальция. В сыворотках сохранена большая часть антител, а за счёт отсутствия фибриногена резко увеличивается стабильность.*

### 3. Концентрация общего белка в сыворотке крови млекопитающих. Роль общего белка сыворотки крови в организме?

*Общий белок сыворотки крови является лабораторным показателем, отражающим состояние гомеостаза. Благодаря им поддерживается вязкость и текучесть крови и формируется ее объем в сосудистом русле, а концентрация белка обеспечивает плотность плазмы крови, что позволяет форменным элементам удерживаться во взвешенном состоянии. Белки сыворотки крови осуществляют транспортные (связывание гормонов, минеральных компонентов, липидов, пигментов и т. п.) и защитные (иммуноглобулины, опсонины, белки острой фазы и др.) функции, участвуют в регуляции кислотно-щелочного состояния организма, являются регуляторами свертываемости крови и антителами. Поэтому содержание общего белка является очень важным диагностическим параметром при целом ряде заболеваний, особенно связанных с выраженными нарушениями метаболизма.*

#### **Гиперпротеинемия**

**Относительная гиперпротеинемия** связана с уменьшением содержания воды в сосудистом русле, к чему могут приводить следующие состояния:

- тяжелые ожоги;
- генерализованный перитонит;
- непроходимость кишечника;
- неукротимая рвота;
- профузный понос;
- несахарный диабет;
- хронический нефрит;
- усиленное потоотделение;
- диабетический кетоацидоз.

**Абсолютная гиперпротеинемия** встречается редко. При этом увеличение общего белка в сыворотке крови может быть связано с синтезом патологических белков (парапротеинов), повышением синтеза иммуноглобулинов или усиленном синтезе белков острой фазы воспаления.

- аутоиммунных заболеваниях;
- острых и хронических инфекциях;
- саркоидозе;
- циррозе печени без выраженной печеночно-клеточной недостаточности.

#### **Гипопротеинемия**

**Относительная гипопротеинемия**, как правило, связана с увеличением объема воды в кровеносном русле и наблюдается при следующих состояниях:

- водной нагрузке («водном отравлении»);
- прекращении отделения мочи (анурии);
- уменьшении диуреза (олигурии);
- внутривенном введении больших количеств раствора глюкозы больным с нарушенной выделительной функцией почек;
- сердечной декомпенсации;

**Абсолютная гипопротеинемия**, как правило, связана с гипоальбуминемией.

- подавлении биосинтеза белка, сопровождающем хронические воспалительные процессы в печени (гепатиты, циррозы печени, интоксикации, атрофия печени);
- недостаточном поступлении белка в организм (голодание, недоедание);

- *повышенном распаде белка в организме (злокачественные новообразования, обширные ожоги, гиперфункция щитовидной железы (тиреотоксикоз), состояния после операции, длительная лихорадка, травмы, длительное лечение кортикостероидами);*
- *повышенной потере белка (нефротический синдром, гломерулонефрит, сахарный диабет, длительный (хронический) понос, кровотечения);*
- *перемещении белка в «третьи» пространства (асцит, плеврит).*

#### Вопросы для самоподготовки:

1. Строение и характеристика аминокислот
2. Незаменимые и заменимые аминокислоты
3. Строение, классификация белков.
4. Функции белков в организме животных
5. Переваривания белков у моногастричных и полигастричных животных
6. Преобразование аминокислот в толстом отделе кишечника.
7. Переаминирование аминокислот
8. Декарбоксилирование аминокислот
9. Дезаминирование аминокислот

#### 1. Строение, классификация белков.

**Белки** - высокомолекулярные органические соединения, построенные из остатков аминокислот. Они составляют структурную и функциональную основу любого живого организма, так как с их деятельностью связано само существование живой материи.

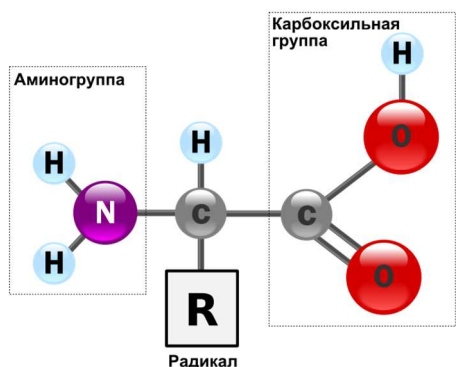
#### Химическое строение белков

Содержание белков в различных клетках может колебаться от 50 до 80%. Кроме С, О, Н, N, в состав белков могут входить S, P, Fe. Белки построены из мономеров, которыми являются аминокислоты. Поскольку в состав молекул белков может входить большое число аминокислот, то их молекулярная масса бывает очень большой.

В клетках разных живых организмов встречается свыше 170 различных аминокислот, но бесконечное разнообразие белков создается за счет различного сочетания всего 20 аминокислот.

Молекула аминокислоты состоит из двух одинаковых для всех аминокислот частей, одна из которых является аминогруппой ( $-\text{NH}_2$ ) с основными свойствами, другая —

карбоксильной группой ( $-\text{COOH}$ ) с кислотными свойствами. Часть молекулы, называемая радикалом (R), у разных аминокислот имеет различное строение.



Наличие в одной молекуле аминокислоты и основной, и кислотной групп обуславливает их амфотерность и высокую реактивность. Через эти группы происходят соединения аминокислот при образовании белка. В ходе реакции полимеризации выделяется молекула воды, а освободившиеся электроны образуют ковалентную связь, которая

получила название пептидной — образуется пептид (греч. *peptos* — сваренный). К свободным карбоксильной и аминогруппе могут присоединяться другие аминокислоты, удлиняя «цепь», называемую полипептидной. На одном конце такой цепи всегда будет

группа NH<sub>2</sub> (этот конец называется N-концом), а на другом конце — группа COOH (этот конец получил название C-конца) (рис. 13).

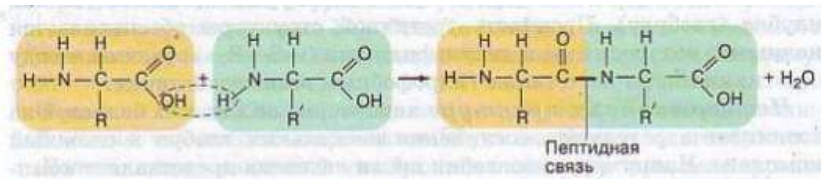


Рис. 13. Схема образования пептидной связи

Полипептидные цепи белков бывают очень длинными и включают самые различные комбинации аминокислот. В состав белка может входить не одна, а две полипептидные цепи и более. Так, в молекуле инсулина — две цепи, а иммуноглобулины состоят из четырех цепей.

Олигопептиды – до 10 амк; Полипептиды – более 10 амк: Белок – более 50 амк

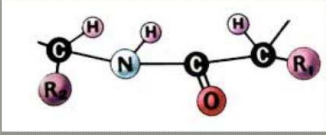
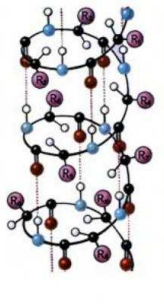

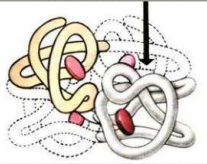
Аминокислоты		Аминокислоты	
Заменимые	Незаменимые	Заменимые	Незаменимые
Гликокол	Валин	Гликокол	Валин
Аланин	Лейцин	Аланин	Лейцин
Цистеин (цистин)	Изолейцин	Цистеин (цистин)	Изолейцин
Глутаминовая кислота	Треонин	Глутаминовая кислота	Треонин
Аспарагиновая кислота	Метионин	Аспарагиновая кислота	Метионин
Тирозин	Фенилаланин	Тирозин	Фенилаланин
Пролин	Триптофан	Пролин	Триптофан
Серин	Лизин	Серин	Лизин
Аспарагин	Гистидин	Аспарагин	Гистидин
Глютамин	Аргинин	Глютамин	Аргинин
			Условно незаменимые

## КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ



Рис. 9. Классификация белков

## Уровни организации

<h3>Первичная структура белка</h3>  <ul style="list-style-type: none"><li>• Полипептидная цепь из последовательно соединенных аминокислотных остатков</li></ul> <p><b>Связи:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• пептидные</li></ul>	<h3>Вторичная структура белка</h3>  <p>Полипептидная нить закручена в спираль</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\alpha</math>-спираль – из одной полипептидной цепи</li><li>• <math>\beta</math>-спираль – из нескольких полипептидных цепей</li></ul> <p><b>Связи:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• водородные</li></ul>
<h3>Третичная структура белка</h3>  <ul style="list-style-type: none"><li>• Нить аминокислот свёртывается и образует клубок или фибрилу, специфичную для каждого белка.</li></ul> <p><b>Связи:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• водородные</li><li>• дисульфидные</li><li>• гидрофобное взаимодействие</li></ul>	<h3>Четвертичная структура белка</h3>  <ul style="list-style-type: none"><li>• молекулы белков четвертичной структуры состоят из нескольких макромолекул белков третичной структур, свёрнутых в клубок вместе</li></ul> <p><b>Связи:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ионные</li><li>• Водородные</li><li>• Гидрофобные связи</li></ul>

## 2. Функции белков в организме животных

1. Структурная функция (фибриллярные белки)
2. Каталитическая функция (ферменты)
3. Защитная функция (иммуноглобулин)
4. Регуляторная функция (цитокнины)
5. Транспортная функция (транспортные белки)
6. Запасная (резервная) функция белков
7. Моторная и сократительные функции
8. Рецепторная функция (клеточный рецептор)
9. Также белки играют важную роль в обмене веществ

*Интересно знать! В плазме некоторых антарктических рыб содержатся белки со свойствами антифриза, предохраняющие рыб от замерзания, а у ряда насекомых в местах прикрепления крыльев находится белок резилин, обладающий почти идеальной эластичностью. В одном из африканских растений синтезируется белок монеллин с очень сладким вкусом.*

## Физические свойства

Строение белка клетки весьма специфично и зависит от выполняемой функции. А вот физические свойства всех пептидов схожи и сводятся к следующим характеристикам.

1. Вес молекулы - до 1000000 Дальтон.
2. В водном растворе формируют коллоидные системы. Там структура приобретает заряд, способный варьироваться в зависимости от кислотности среды.
3. При воздействии жестких условий (облучение, кислота или щелочь, температура и так далее) способны переходить на другие уровни конформаций, то есть денатурировать. Данный процесс в 90% случаев необратим. Однако существует и обратный сдвиг - ренатурация.

### **3. Переваривания белков у моногастричных и полигастричных животных.**

**Переваривание белков.** В ЖКТ белки подвергаются расщеплению до аминокислот и простатических групп.

- В *ротовой полости* корма, содержащие белки, механически измельчаются, смачиваются слюной и образуют пищевой ком, который по пищеводу поступает в желудок (у жвачных - в преджелудки и сычуг, у птиц - в железистый и мышечный желудки). В составе слюны нет ферментов, способных расщеплять белки корма. Пережеванные кормовые массы поступают в желудок (у жвачных в сычуг), перемешиваются и пропитываются желудочным соком.
- *Желудочный сок.* У человека в течение суток образуется около 2 л, у крупного рогатого скота - 30, у лошади - 20, у свиньи - 4, у собаки - 2-3, у овцы и козы - 4 л желудочного сока. В состав желудочного сока входит 99,5% воды и 0,5% плотных веществ. Основным ферментом желудочного сока является пепсин, а кислотой, создающей условия для его каталитического действия, - соляная. В образовании пепсина участвуют главные клетки желез дна желудка, в образовании соляной кислоты - обкладочные.

Соляная кислота создает необходимую кислотность для каталитического действия ферментов. Так, у человека рН желудочного сока равен 1,5-2,0, у крупного рогатого скота - 2,17-3,14, у лошади - 1,2-3,1, у свиньи - 1,1-2,0, у овцы - 1,9-5,6, у птиц - 3,8. Соляная кислота создает также условия для превращения пепсиногена в пепсин, ускоряет расщепление белков на составные части, их денатурацию, набухание и разрыхление, препятствует развитию в желудке гнилостных и бродильных процессов, стимулирует синтез гормонов кишечника и др.

Реннин (химозин, или сычужный фермент) вырабатывается у молодых жвачных железами слизистой оболочки сычуга. Синтезируется в виде прореннина, который при значении  $pH < 5$  превращается в реннин. Под его влиянием казеиноген молока превращается в казеин.

В *желудке* происходит гидролитическое расщепление большинства белков корма. Так, нуклеопротеиды под влиянием соляной кислоты и пепсина распадаются на нуклеиновые кислоты и простые белки. Здесь же происходит расщепление и других протеидов. Часть белков расщепляется другими протеолитическими ферментами желудочного сока, например, коллагены - желатиназой, казеины - реннином.

Желудочная секреция стимулируется гормоноидами слизистой оболочки пищевого канала: гастрином (в привратнике), энтерогастрином (в кишках), гистамином (в желудке) и др.

*Особенности переваривания белков у жвачных.* У жвачных пищевой ком из пищевода поступает в преджелудки, где подвергается дополнительной механической переработке,



при жвачке возвращается в ротовую полость, снова измельчается, затем попадает в рубец, сетку, книжку и сычуг, где завершается первый этап пищеварения.

В преджелудках происходит химическая переработка веществ корма под влиянием ферментов бактерий, инфузорий и грибов, симбиотирующих там. Ферменты действуют аналогично трипсину, расщепляя пептидные связи.

Замечательной особенностью пищеварения в преджелудках является синтез белков микроорганизмами из небелковых веществ корма и продуктов его переработки. Основная масса растительных кормов представлена углеводами, и прежде всего клетчаткой. Клетчатка в преджелудках под влиянием микробных ферментов целлюлазы и целлобиазы расщепляется до  $\alpha$ -D(+)-глюкозы и  $\beta$ -D(+)-глюкозы.

Монозы подвергаются различным видам брожения, что приводит к образованию низкомолекулярных жирных кислот. Так, при молочнокислом брожении, вызываемом *Bact. lactis*, из глюкозы образуется молочная кислота:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3 \rightarrow CHOH - COOH$ . При маслянокислом брожении, вызываемом бактериями рода *Clostridium*, образуется масляная кислота:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3 - CH_2 - CH_2 - COOH + 2H_2 + 2CO_2$  и т. д. Количество летучих жирных кислот в рубце коровы может достигать 7 кг в сутки.

Часть этих кислот идет на синтез молочного жира, гликогена и других веществ (рис. 22), часть - служит материалом для синтеза микрофлорой аминокислот и собственного белка.

Синтез микрофлорой аминокислот в преджелудках жвачных происходит за счет безазотистых продуктов брожения и аммиака. Источником аммиака являются продукты расщепления мочевины, аммонийных солей и других азотсодержащих добавок к рационам. Так, мочевина под влиянием фермента уреазы, продуцируемого микрофлорой рубца, расщепляется до аммиака и углекислого газа.

Источником безазотистых продуктов чаще всего служат кетокислоты, которые образовались из кислот жирного ряда (см. выше). Этот биосинтез носит обычно характер восстановительного аминирования.

Из аминокислот микроорганизмы синтезируют белки, необходимые для своего существования. В зависимости от рациона в рубце коров может синтезироваться 300-700 г бактериального белка в сутки.

Из преджелудков кормовые массы поступают в сычуг, где под влиянием кислого сычужного сока микроорганизмы гибнут, а их белки расщепляются до аминокислот.

- Из желудка (сычуга) кормовые массы мелкими порциями поступают в *тонкую кишку*, где завершается расщепление белков. В нем участвуют протеолитические ферменты секрета поджелудочной железы и кишечного сока. Эти реакции протекают в нейтральной и слабощелочной среде (рН 7-8,7). В тонкой кишке гидрокарбонаты секрета поджелудочной железы и кишечного сока нейтрализуют соляную кислоту:  $HCl + NaHCO_3 \rightarrow NaCl + H_2CO_3$  (угольная кисл.).

Около 30% пептидных связей белков расщепляется трипсином. Он выделяется в виде неактивного трипсиногена и под влиянием фермента слизистой оболочки кишок энтерокиназы превращается в активный трипсин.

Почти 50% пептидных связей расщепляется химо-трипсином. Он выделяется в виде химо-трипсиногена, который под влиянием трипсина превращается в химо-трипсин. Остальные пептидные связи расщепляются пептидазами кишечного сока и сока поджелудочной железы - карбоксипептидазами и аминопептидазами.

В составе сока поджелудочной железы есть коллагеназа (расщепляет коллаген) и эластаза (гидролизует эластин). Деятельность ферментов активируется микроэлементами:  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и др.

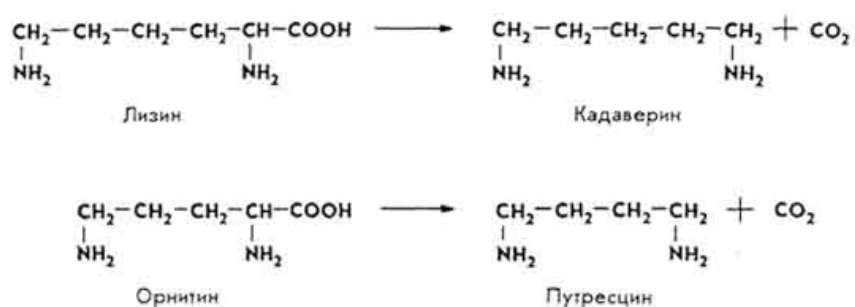
Переваривание белков происходит в полости кишок и на поверхности слизистой оболочки (пристеночное пищеварение).

В полости кишок расщепляются белковые молекулы, а на поверхности слизистой оболочки - их "обломки": альбумозы, пептоны, полипептиды, трипептиды и дипептиды.

#### 4. Преобразование аминокислот в толстом отделе кишечника

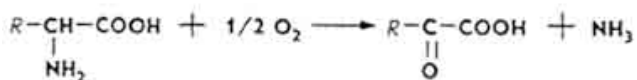
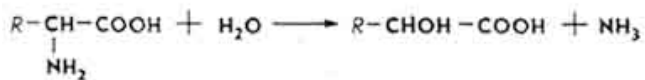
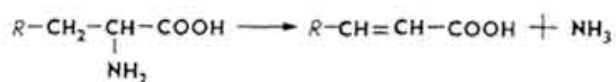
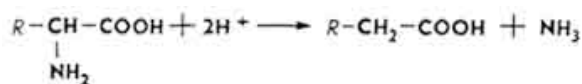
Белки и их производные, не подвергшиеся расщеплению в тонкой кишке, в дальнейшем в *толстой кишке* подвергаются гниению. Гниение - многоступенчатый процесс, на отдельных этапах которого участвуют различные микроорганизмы: анаэробные и аэробные бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, инфузории и др. Под влиянием бактериальных пептид-гидролаз сложные белки расщепляются на протеины и простетические группы. Протеины, в свою очередь, гидролизуются до аминокислот, а они подвергаются дезаминированию, декарбоксилированию, внутримолекулярному расщеплению, окислению, восстановлению, метилированию, деметилированию и т. д. Возникает ряд ядовитых продуктов, которые всасываются через слизистую оболочку кишок в кровеносную и лимфатическую системы и разносятся по всему организму, отравляя его органы, ткани и клетки.

Так, при гниении в толстой кишке аминокислоты подвергаются декарбоксилированию, что приводит к образованию ядовитых аминов, например трупных ядов - кадаверина и путресцина.



При дезаминировании (восстановительном, внутримолекулярном, гидролитическом, окислительном) образуются аммиак, насыщенные и ненасыщенные карбоновые кислоты, оксикислоты и кетокислоты.





Эти процессы обычно протекают сопряженно и поэтапно, что в итоге приводит к возникновению самых различных продуктов гниения. Так, при гнилостном разложении циклических аминокислот образуются следующие фенолы. Тирозин-крезол-фенол. При гнилостном разложении триптофана образуются скатол и индол. При гнилостном разложении цистина и цистеина образуются меркаптаны, сероводород, метан, углекислый газ.

Процессы гниения белков интенсивно развиваются при кормлении животных недоброкачественными кормами, нарушении режима кормления, при заболеваниях пищевого канала (атонии преджелудков, запорах), инфекционных (колибациллезе) и инвазионных (аскаридозе) болезнях. Это отрицательно сказывается на состоянии здоровья и продуктивности животных.

## 5. Преобразование аминокислот в тканях

**Всасывание белков.** Белки всасываются в виде аминокислот, низкомолекулярных пептидов и простетических групп. У новорожденных животных всасывается часть нерасщепленных белков молозива и молока. Место всасывания - микроворсинки ворсинок эпителия слизистой оболочки тонкой кишки. Аминокислоты проникают в клетку через субмикроскопические каналы микроворсинок и экзоплазматическую мембрану благодаря процессам диффузии, осмоса, с помощью белковых переносчиков.

В процессах всасывания важное место принадлежит натриевому насосу, так как хлорид натрия ускоряет всасывание. Расходуемую при этом химическую энергию обеспечивают митохондрии.

Аминокислота диффундирует в межклеточное пространство и поступает в кровеносную или лимфатическую системы ворсинок, а ионы  $\text{Na}^+$  возвращаются к поверхности клетки и взаимодействуют с новыми порциями аминокислот. Эти процессы регулируются нервной и гуморальной системами.

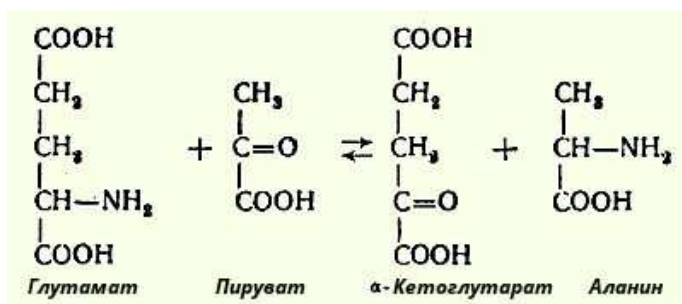
В толстой кишке всасываются продукты гниения: фенол, крезол, индол, скатол и др.

Промежуточный обмен. Продукты всасывания белков через систему воротной вены поступают в печень. Оставшиеся в крови после прохождения через печень аминокислоты из печеночной вены попадают в большой круг кровообращения и разносятся к отдельным органам, тканям и клеткам. Некоторая часть аминокислот из межклеточной жидкости поступает в лимфатическую систему, затем большой круг кровообращения.

В плазме крови содержится определенное количество аминокислот и полипептидов. Их содержание возрастает после приема корма.

Большая часть аминокислот расходуется на биосинтез белков, часть - на биосинтез биологически активных веществ (небелковых гормонов, пептидов, аминов и др.), часть, дезаминируясь, используется в качестве энергетического сырья и материала для биосинтеза липидов, углеводов, нуклеиновых кислот и др.

Переаминирование (трансаминирование) – перенос аминогруппы от аминокислоты на кетокислоту с образованием новой аминокислоты и новой кетокислоты.



**Вопросы для самоподготовки:**

1. Аммиак, источники образования аммиака в организме животных
2. Обезвреживание аммиака
3. Орнитиновый цикл
4. Роль печени в метаболизме аммиака
5. Роль почек в выведении мочевины из организма