

МИНИСТЕРСТВО ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ УКРАИНЫ  
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА БИОХИМИИ И ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

## **Хромопротеины: структура, свойства и функции. Обмен гемоглобина и его нарушения**

учебно-методическое пособие по дисциплине «Биологическая химия»

для самостоятельной аудиторной и внеаудиторной

подготовки иностранных студентов

II курса медицинского и международного факультетов

специальностей: 7.12010001 «Лечебное дело»

7.12010002 «Педиатрия»;

III курса фармацевтического факультета

специальности 7.12020101 «Фармация»

ЗАПОРОЖЬЕ 2015

Учебно-методическое пособие «Хромопротеины: структура, свойства и функции. Обмен гемоглобина и его нарушения» для самостоятельной аудиторной и внеаудиторной подготовки иностранных студентов медицинского и фармацевтического факультетов утверждено на заседании Центрального методического совета ЗГМУ; **протокол № 6 от 20.05.2015 г.**

Авторы:

- Александрова Е.В. – д.хим.н., профессор кафедры биохимии и лабораторной диагностики ЗГМУ
- Беленький С.А. – к. мед. н., доцент кафедры биохимии и лабораторной диагностики ЗГМУ
- Швец В.Н. - д.биол.н., доцент кафедры биохимии и лабораторной диагностики ЗГМУ
- Крисанова Н.В. – к. б. н., доцент кафедры биохимии и лабораторной диагностики ЗГМУ
- Макоед О.Б. – к. б. н, доцент кафедры биохимии и лабораторной диагностики ЗГМУ
- Шкода А.С. - к.фарм.н., доцент кафедры биохимии и лабораторной диагностики ЗГМУ

Общая редакция: Александрова Е.В. – д.хим.н., профессор кафедры биохимии и лабораторной диагностики ЗГМУ

Рецензенты:

- Заведующий кафедрой медицинской биологии, паразитологии и генетики ЗГМУ, д.биол. н., доцент Приходько А.Б.
- Професор кафедры органической и биоорганической химии, д.фарм.н. Прийменко Б.А.

## Предисловие

Данное учебно-методическое пособие является дополнительным учебным материалом для самостоятельной аудиторной и внеаудиторной подготовки иностранных студентов II курса медицинского и международного факультетов и III курса фармацевтического факультета по специальностям 7.12010001 «Лечебное дело», 7.12010002 «Педиатрия» и 7.12020101 «Фармация».

Пособие содержит теоретическую информацию о хромопротеинах: их структуре, свойствах, функциях и обмене гемоглобина в организме человека в условиях нормы и при патологиях.. Пособие является полезным для иностранных студентов при подготовке ко всем видам контроля знаний, в том числе, к лицензионным министерским экзаменам «Крок-1» и «Крок-2». Необходимость издания пособия на русском языке обусловлена особенностями языковой подготовки иностранного контингента к обучению в ЗГМУ. Информация про дифференциальную диагностику нарушений обмена гемоглобина (порфирии, желтухи и другие нарушения пигментного обмена в печени) может быть востребована также начинающими практикующими врачами при постановке диагноза заболеваний у пациентов с нарушениями обмена гемопротеинов.

Авторы

## ГЛАВА 1.

### ХРОМОПРОТЕИНЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ

#### **Введение**

К хромопротеинам (от гр. *chroma* – краска) относят гетерогенные белки, окраска которых зависит от природы простетической группы. Например, гемопротейны окрашены в красный цвет, родопсины - в оранжевый, флавопротеины – в жёлтый, церулоплазмин – в голубой и т.д.

Хромопротеины широко распространены в животном (в основном, железопорфириносодержащие белки) и растительном (магнийпорфириносодержащие белки) мире. Белки, которые содержат железопорфириновые комплексы, имеют название гемопротейны.

#### **Гемопротейны**

Все гемопротейны содержат простетическую группу - гем. Их представителями являются гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза и пероксидазы. Благодаря гему, гемопротейны имеют красную окраску молекулы.

#### **Структура, свойства и функции гемоглобина.**

Гемоглобин входит в состав эритроцитов и заполняет большую часть их внутриклеточного пространства. Основная функция гемоглобина связана с транспортом газов (кислорода и углекислого газа) в крови человека. Кроме этого, гемоглобин участвует в поддержании кислотно-основного равновесия в организме человека и животных, образуя самую мощную гемоглобиновую буферную систему крови.

В настоящее время достаточно хорошо изучены структура и свойства гемоглобина. У взрослого человека в крови различают следующие физиологические типы гемоглобина:

1. Гемоглобин  $A_1$  ( $HbA_1$  – от англ. *adult* – взрослый), содержание которого составляет 96 % от общего содержания гемоглобина (Hb).

2. Гемоглобин A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) - содержание составляет до 2,5 %.

3. Фетальный гемоглобин (HbF от англ. *fetus* - плод) составляет 1,5 - 2 %.

HbF является главным гемоглобином у плода и у новорожденных, так как его содержание у новорожденных достигает до 80 %, но затем в первые три месяца после рождения он почти полностью заменяется на HbA.

На рис. 1 схематично представлена структура молекулы гемоглобина.

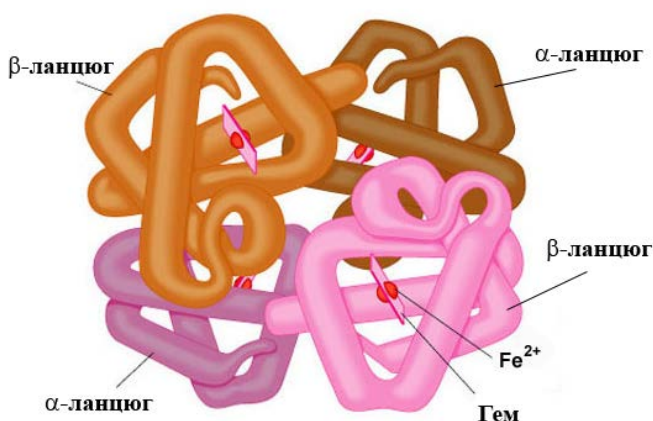


Рис. 1. Модель молекулы гемоглобина (HbA<sub>1</sub>) (ланцюг с укр. - цепь).

Молекула гемоглобина взрослого человека HbA<sub>1</sub> состоит из четырех полипептидных цепей, каждая из которых связана с одним гемом. Белковая часть молекулы гемоглобина имеет название "глобин".

В состав HbA<sub>1</sub> входят 2α- и 2β-цепи, которые являются продуктами экспрессии двух разных генов, и потому они имеют разную первичную структуру. В состав α-цепи входит 141, а в состав β-цепи - 146 аминокислотных остатков. Субъединицы гемоглобина, каждая содержит одну полипептидную цепь и один гем, по своей конформации напоминают структуру молекулы миоглобина (рис. 7). Схематично гемоглобин A<sub>1</sub> записывают так: HbA<sub>1</sub> = α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>. В гемоглобине A<sub>2</sub> вместо β субъединиц находятся δ-субъединицы: HbA<sub>2</sub> = α<sub>2</sub>δ<sub>2</sub>, а в фетальном гемоглобине - γ-субъединицы, то есть HbF = α<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>.

При образовании четвертичной структуры гемоглобина возникают многочисленные нековалентные связи между отдельными полипептидными цепями гемоглобина. Наибольшее их количество образуется между разными типами цепей ( $\alpha - \beta$ ,  $\alpha - \delta$ ,  $\alpha - \gamma$ ). Это преимущественно гидрофобные взаимодействия, которые возникают между радикалами некоторых аминокислот (лейцин, валин, фенилаланин и др.). Исследование структурной организации субъединиц молекулы гемоглобина в олигомерный белок проводилось с использованием раствора 8М мочевины или при резких изменениях pH. При этом молекула гемоглобина обратимо диссоциирует на две  $\alpha$ - и две  $\beta$ -цепи. Эта диссоциация обусловлена разрывом водородных связей. После удаления мочевины происходит автоматическая ассоциация исходной молекулы гемоглобина (рис.2)

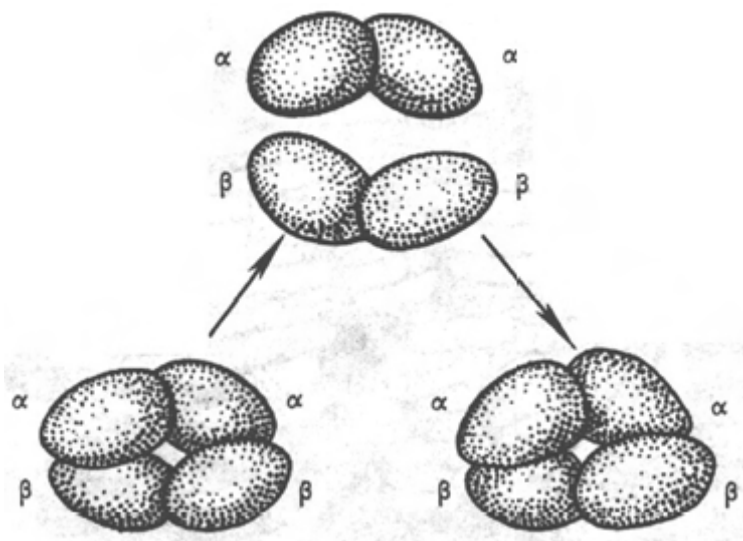


Рис. 2. Обратимая диссоциация молекулы гемоглобина при действии 8М раствора мочевины.

Небелковый компонент гемоглобина – гем. Основной структуры гема является протопорфирин. Протопорфирин состоит из четырех пиррольных колец, соединенных между собой  $\alpha$ -метиновыми мостиками ( $-\text{CH}=\text{}$ ). В зависимости от природы групп, которые находятся в боковых радикалах, порфирины имеют большое количество изомеров. Из возможных 15

изомеров протопорфиринов наиболее широко распространенным в биологических объектах является протопорфирин IX. Он содержит в боковых положениях 4 метильные, 2 винильные и 2 пропионильные группы (рис. 3 А). Хелатный комплекс протопорфирина IX с  $Fe^{2+}$  называется протогемом IX или гемом.

Катион железа, входящий в структуру гема, образует две ковалентные связи и две координационные связи с атомами азота пиррольных колец в плоскости протопорфиринового комплекса. Кроме этого, он участвует в образовании ещё двух координационных связей, которые расположены перпендикулярно плоскости протопорфиринового комплекса (рис. 3 Б).

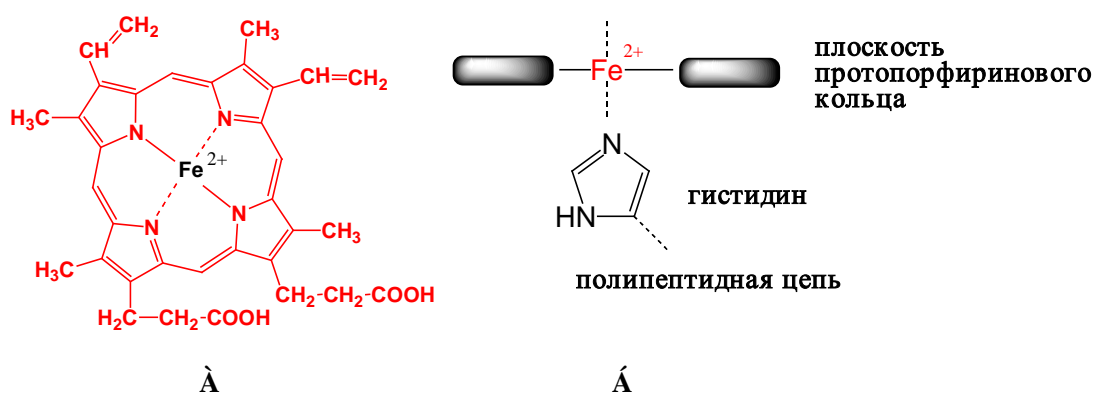


Рис. 3. Связи катиона железа в геме гемоглобина. А - вид сверху; Б - вид сбоку (координационная связь над плоскостью протопорфиринового кольца свободна).

Пятая координационная связь атома железа обеспечивает присоединение гема к остатку гистидина, который находится в полипептидной цепи глобина.

Шестая координационная связь катиона железа используется для присоединения к гему различных лигандов (молекулы кислорода, монооксида углерода или других соединений). Именно данная связь имеет специальное значение для обратимого связывания молекулы кислорода.





оксигемоглобина становится более компактной, чем молекула дезоксигемоглобина.

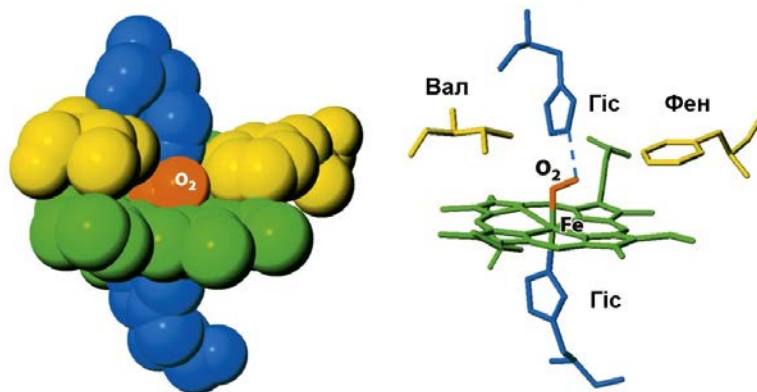


Рис. 6. Изменение конформации полипептидной цепи гемоглобина в результате присоединения кислорода к гему (Berg J.M. et al., 2006)

Изменение конформации полипептидных цепей при присоединении кислорода сопровождается изменением спектральных свойств белковой молекулы, а также её цвета: раствор дезоксигемоглобина имеет темно-красный цвет, а раствор оксигемоглобина - ярко-красный. Это явление объясняет отличие цвета венозной крови (обогащена дезоксигемоглобином) от цвета артериальной крови (обогащена оксигемоглобином).

Конформационная перестройка полипептидной цепи, возникающая при присоединении к гему одной молекулы кислорода, способствует резкому повышению сродства других трёх гемов молекулы гемоглобина к кислороду, облегчая его присоединение.

Процесс образования оксигемоглобина является обратимым и находится под контролем многих факторов. Особое значение среди них имеют концентрации  $H^+$ ,  $CO_2$ ,  $Cl^-$  и 2,3-дифосфоглицерата. При их возрастании снижается способность гемоглобина связывать кислород.

Оксигемоглобин является нестойким соединением, который распадается при снижении концентрации кислорода в окружающей среде. По этой причине образование оксигемоглобина происходит преимущественно в

капиллярах легких, для которых характерно высокое парциальное давление кислорода. При перемещении эритроцита из легких к другим (периферическим) тканям внутренних органов оксигемоглобин разрушается с высвобождением кислорода, так как парциальное давление кислорода здесь гораздо меньше, чем в легких.

Процесс распада оксигемоглобина с высвобождением кислорода в периферических тканях усиливается при повышении в них концентрации  $\text{H}^+$  (здесь рН ниже, чем в легких) и содержания в них углекислого газа. Последнее явление обусловлено в них интенсивно протекающими окислительно-восстановительными процессами, связанными с тканевым дыханием.

Регуляторное влияние углекислого газа и  $\text{H}^+$  на связывание и высвобождение кислорода гемоглобином объясняется *эффектом Бора*. В основе механизма эффекта Бора лежит явление обратимой взаимосвязи между процессами связывания кислорода и высвобождения  $\text{H}^+$  гемоглобином. Свойство гемоглобина обратимо связывать кислород и направленно транспортировать его от легких к тканям внутренних органов зависит от величины парциального давления кислорода ( $p\text{O}_2$ ) в окружающей среде (рис. 7).

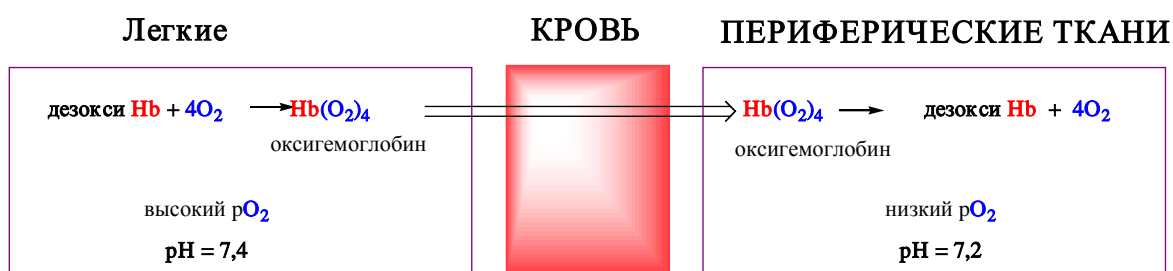
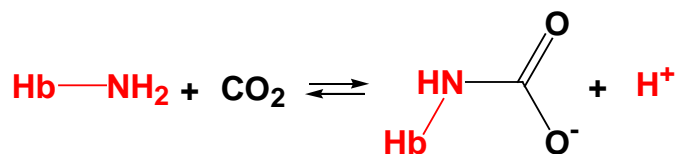


Рис. 7. Направленный транспорт кислорода между легкими и периферическими тканями.

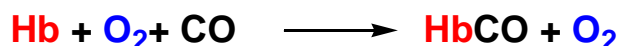
Следующим производным гемоглобина является *карбгемоглобин*, который образуется при взаимодействии Hb с углекислым газом. В данном

соединении  $\text{CO}_2$  присоединяется не к катиону железа  $\text{Fe}^{2+}$ , а к  $\text{NH}_2$ -группе цепей глобина:



Таким образом из тканей организма к легким транспортируется до 10 - 15 %  $\text{CO}_2$ . Реакция обратима - образование карбогемоглобина происходит в тканях организма, а его распад - в легких.

Ещё одним производным гемоглобина является *карбоксигемоглобин* ( $\text{HbCO}$ ) - соединение гемоглобина с угарным газом (монооксидом углерода). Данное соединение более стойкое, чем оксигемоглобин. Поэтому при одновременном вдыхании смеси кислорода и угарного газа преимущественно образуется карбоксигемоглобин:



То есть высокотоксичный угарный газ имеет большее сродство к гемоглобину, чем кислород. Реакция образования  $\text{HbCO}$  может стать обратимой только при условии наличия высоких концентраций кислорода. Если в воздухе содержится от 0,05 % до 1 %  $\text{CO}$ , то 95 % гемоглобина переходит в форму  $\text{HbCO}$ . Тяжёлое отравление угарным газом наступает тогда, когда в воздухе более 0,1 %  $\text{CO}$ .

При действии окислителей в гемоглобине может происходить окисление катиона  $\text{Fe}^{2+}$  в катион  $\text{Fe}^{3+}$ , что сопровождается образованием *метгемоглобина* (единственный  $\text{Hb}$ , содержащий катион  $\text{Fe}^{3+}$ ). Метгемоглобин также не способен связывать и переносить кислород, то есть его физиологическое действие аналогично действию карбоксигемоглобина. Незначительная концентрация метгемоглобина более безопасна, чем такая же концентрация  $\text{HbCO}$ . Поэтому некоторые стимуляторы образования метгемоглобина используют как антитоты для лечения отравлений

цианидами. Метгемоглобин может связывать до 30 % смертельной дозы HCN с образованием малотоксичного соединения *цианметгемоглобин*. Образованию метгемоглобина способствуют вещества: метиленовая синь, натрия нитрит и другие окислители, способные превратить катион  $Fe^{2+}$  гема в катион  $Fe^{3+}$ , что сопровождается переходом красного окрашивания раствора в коричневый (при кислых значениях pH).

В настоящее время для выявления отравления CO или образования метгемоглобина в крови пациентов используют спектральный анализ крови в диапазоне длин волн излучения 400-900 нм. Полосы поглощения  $HbO_2$  и  $HbCO$  имеют сходство и расположены соответственно в желтой и зеленой частях спектра, но при этом, у  $HbCO$  они смещены в сторону более коротких длин волн. Полоса поглощения метгемоглобина расположена в красной части спектра.

### *Миоглобин*

Миоглобин является одним из важных белков представленных в составе клеток скелетной мускулатуры и миокарда человека. Его основная функция связана с депонированием кислорода в мышцах. Очень богаты миоглобином скелетные мышцы морских животных, которые проводят много времени в движении под водой. Большое содержание миоглобина позволяет этим животным запасать значительную концентрацию кислорода, и тем самым, обеспечивать жизнедеятельность при длительном нахождении без кислорода под водой.

Молекула миоглобина состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 153 аминокислотных остатка, и связанного с ней одного гема. Полипептидная цепь в пространстве образует глобулярную структуру, внутри которой в гидрофобном «кармане» помещен гем (рис. 8). Присоединение гема к полипептидной цепи осуществляется через атом азота гистидинового остатка полипептидной цепи. Стабилизация связи протетической группы (гема) и полипептидной цепи происходит также за

счет взаимодействия тетрапиррольного кольца гема с неполярными аминокислотными радикалами, которые формируют гидрофобную полость.

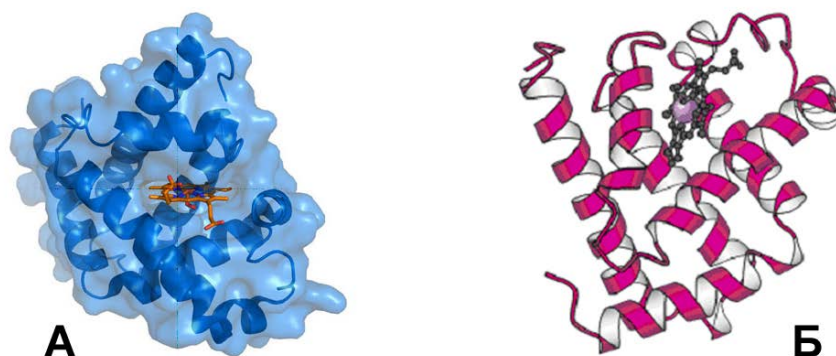


Рис. 8. Трехмерная структура молекулы миоглобина – А (красным цветом обозначено положение гема в молекуле) и её модель – Б (Berg J.M. et al., 2006)

Среднее содержание миоглобина (Mb) составляет 0,3% от массы тела взрослого человека и повышается в мышечной ткани при длительных физических нагрузках. Приблизительно также, как описывалось образование молекулы оксигемоглобина, происходит обратимое связывание молекулы кислорода с катином железа гема за счет шестой координационной связи с образованием молекулы оксимиоглобина (рис. 9).

Миоглобин связывает кислород  $O_2$  в 5 раз быстрее, чем гемоглобин и создает запас кислорода в мышце. Подобно гемоглобину миоглобин образует производные с угарным газом и с цианидами. За счет миоглобина мышцы приобретают красный цвет, а сам Mb (по данным спектральных исследований) имеет широкую полосу поглощения при длине волны 564 нм. Количество кислорода, которое связывается с миоглобином («процент насыщения»), зависит от концентрации кислорода в среде, окружающей миоглобин (эту концентрацию выражают как  $pO_2$  – парциальное давление кислорода).

В условиях кислородного голодания (например, при высокой физической нагрузке) кислород освобождается из комплекса с миоглобином

и поступает преимущественно в митохондрии мышечных клеток. Где осуществляется синтез АТФ за счет окислительного фосфорилирования.

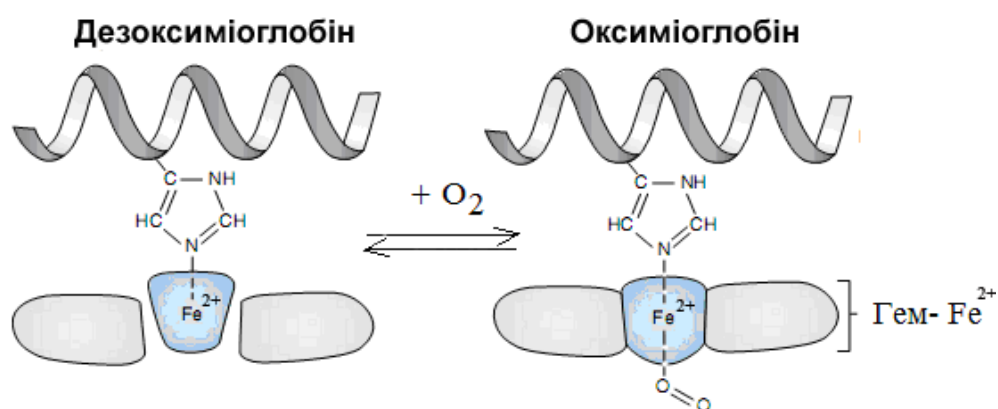


Рис. 9. Механизм присоединения кислорода к молекуле миоглобина (Smith C. et al., 2005, с изм.)

### **Цитохромы**

Среди гемопротеинов особое место занимают цитохромы. Они входят в состав цепей транспорта электронов митохондрий, эндоплазматического ретикулума и хлоропластов (у растений). Наличие простетической группы гема с катионом железа, который способен менять степень окисления, обеспечивает их участие в транспорте электронов по цепи. Большинство цитохромов подобно миоглобину содержат одну молекулу гема и одну полипептидную цепь.

Известно около 30 разных цитохромов, которые по спектрам поглощения делятся на группы *a*, *b*, *c*, *d* (рис. 10). Гемы этих цитохромов также являются производными протопорфирина IX. Особенности структуры гема обуславливают отличия в проявлении оптических свойств цитохромов и в значениях их редокс-потенциалов.

Кроме структуры боковых радикалов порфиринов, цитохромы отличает друг от друга строение белковой части и способ присоединения гема белков. В различных типах цитохромов гем по-разному соединяется с

полипептидной цепью. Например, цитохромы типа *c*, в отличие от других, содержат прочно связанный с аполипопротеином гем. Он ковалентно присоединяется за счет двух виниловых радикалов к сульфгидрильным группам цистеиновых остатков полипептидной цепи (рис. 10).

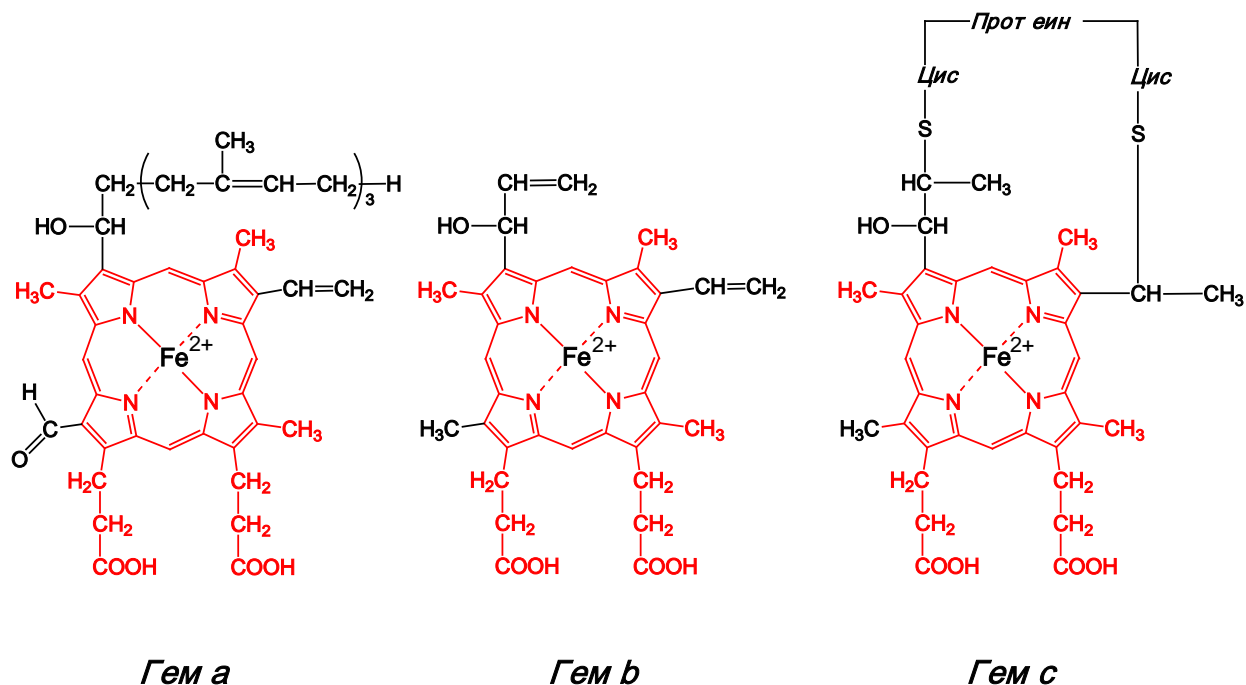


Рис. 10. Типы гемов, входящих в структуру цитохромов.

Цитохром *c* является компонентом дыхательной цепи митохондрий. Ниже представлена модель цитохрома *c*, созданная на основе детального изучения его третичной структуры (рис. 11).

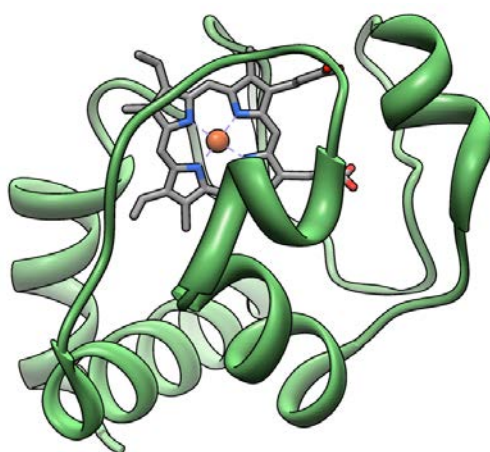


Рис. 11. Модель цитохрома *c* (Bushnell et al., 1990)

В эндоплазматическом ретикулуме печени содержится еще один широко распространенный цитохром - цитохром P450, названный так потому, что впервые был открыт в Филадельфии (Philadelphia), США, а комплекс его восстановленной формы с угарным газом CO имеет максимум поглощения при 450 нм. Цитохром P450 содержит протопем, который подобен цитохромам группы b, и участвует в обезвреживании гидрофобных чужеродных для организма молекул (ксенобиотиков). Он является терминальным компонентом микросомальной оксигеназной цепи, обеспечивающей окисление ксенобиотиков. Отдельные разновидности этого цитохрома задействованы в синтезе холестерина, стероидных гормонов и ненасыщенных высших жирных кислот.

В хлоропластах растений содержится представитель цитохромов - цитохром f. Он имеет исключительно растительное происхождение и играет важную роль в переносе электронов по электронотранспортной цепи фотосистемы II хлоропластов.

### ***Ферменты-гемопротеины***

Кроме цитохромов, гемоглобина и миоглобина к гемопротеинам относят также широко распространенные в животных и растительных организмах ферменты каталазу и пероксидазы, защищающие клетки тканей от повреждающего действия пероксида водорода (перекиси водорода).

Каталаза представляет собой один из наиболее активных ферментов, содержащихся в специальных внутриклеточных структурах - пероксисомах. Наибольшая активность этого фермента проявляется в эритроцитах крови.

Пероксидазы, в отличие от каталазы, кроме пероксида водорода катализируют распад органических пероксидов. Они широко распространены в различных внутриклеточных компартментах, в том числе, в митохондриях и цитозоле.

Завершая рассмотрение гемопротеинов, следует отметить их общее свойство - все они имеют характерный максимум поглощения света в



видимой области спектра. За счет этого их растворы приобретают также характерную окраску.

### Флавопротеины

Данные сложные белки имеют молекулы, в состав которых в качестве простетической группы входит производное рибофлавина - витамина В2. Рибофлавин состоит из трехциклического соединения изоалоксазина и спирта рибитола, откуда и происходит его название (рис. 12).

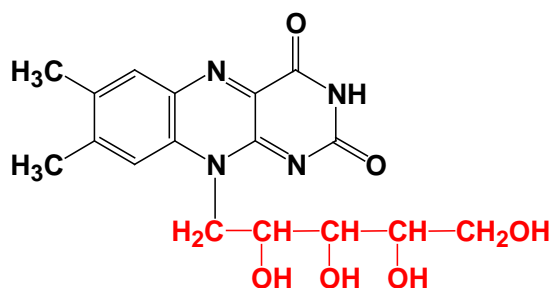


Рис. 12. Строение молекулы рибофлавина

Флавиновая простетическая группа может быть представлена в виде ФАД (флавинадениндинуклеотида) или ФМН (флавиномононуклеотида). С помощью ковалентных связей она присоединяется к полипептидной цепи белка. Остаток рибофлавина в составе простетической группы флавиновых дегидрогеназ имеет свойство акцептировать и отдавать ионы водорода и электроны. По этой причине флавиновые дегидрогеназы участвуют во многих окислительно-восстановительных процессах в клетке. Все флавиновые коферменты в окисленной форме окрашены в желто-оранжевый цвет и имеют характерные полосы поглощения с максимумом в области 370 и 450нм.

Большое количество флавиновых дегидрогеназ является мембраносвязывающими белками. Они принимают участие в транспорте электронов по дыхательной цепи митохондрий и электронотранспортной цепи

эндоплазматического ретикулаума (НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, НАДФН-зависимый флавопротеин микросомальной оксигеназной цепи и др.).

Следует отметить, что флавопротеины представляют собой очень сложно построенные молекулы белков. Кроме флавиновой группы, они содержат и другие небелковые компоненты. Так, в структуру сукцинатдегидрогеназы дополнительно входят еще три FeS-центра и гем типа b. На рис. 13 представлена структура молекулы сукцинатдегидрогеназы. Наряду с мембранозвязывающими встречаются также и растворимые флавиновые дегидрогеназы. Они локализуются в цитоплазме клеток. К ним относится широко распространенный фермент ксантиноксидаза, которая содержит ион молибдена, входящий в состав молибденоптерина.

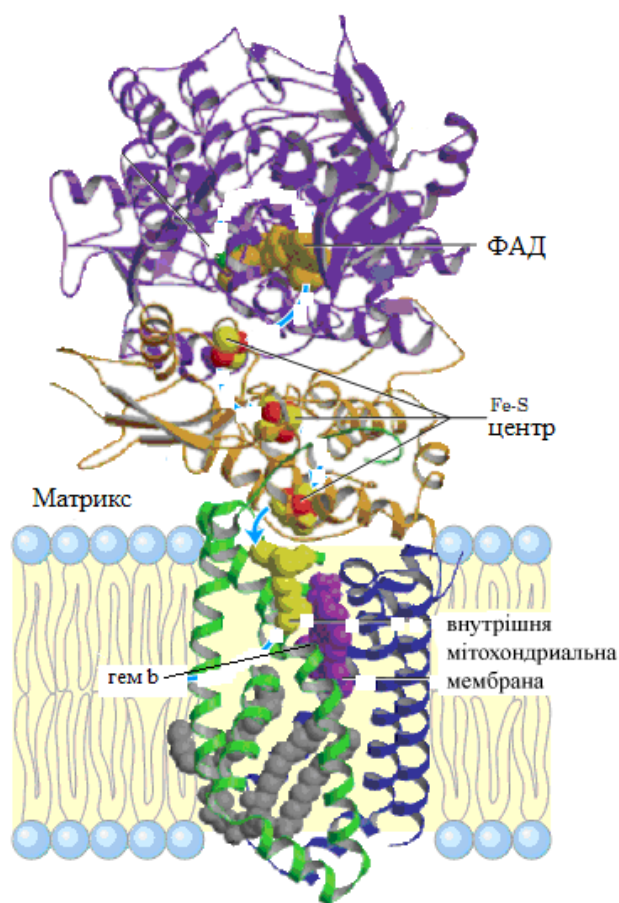


Рис. 13. Сукцинатдегидрогеназа митохондрий.

Молекула сукцинатдегидрогеназы состоит из четырех субъединиц: две встроены во внутреннюю митохондриальную мембрану и две обращены к митохондриальному матриксу. В качестве небелковых компонентов в молекулу входят : флавиновая простетическая группа – ФАД, 3 FeS- центра и гем типа b (Nelson D.L., Cox M.M., 2004)

### Ретинальпротеины

**Родопсины** – сложные белки, в которых апопротеин (опсин) связан с простетической группой, которая представлена цис-изомером ретиналя (альдегидной формой витамина А) (рис. 14 та 15):

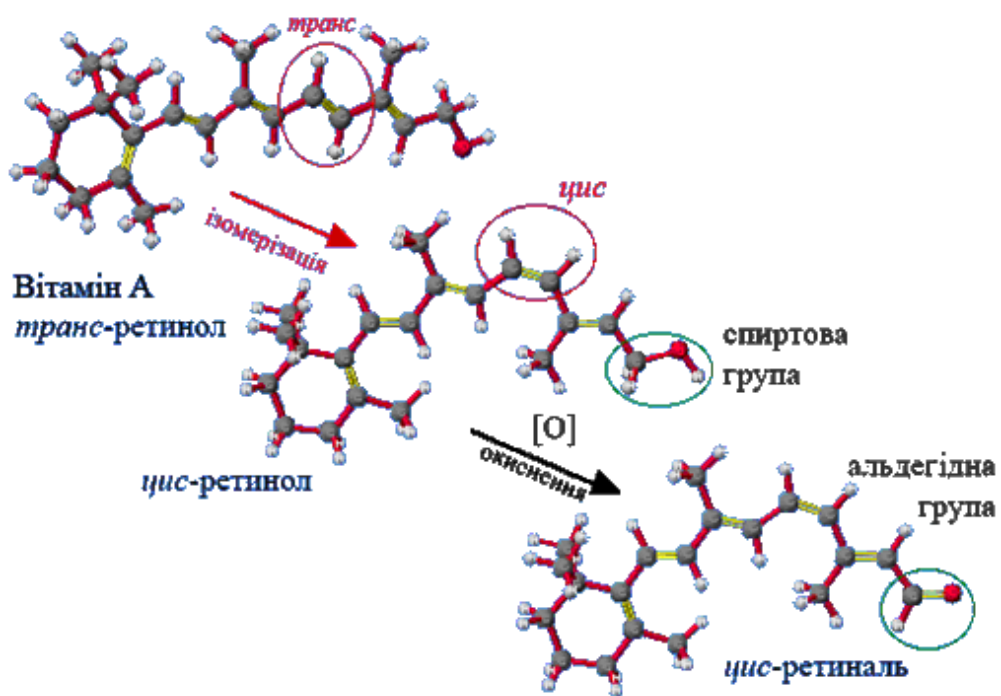


Рис. 14. Образование 11-цис-ретиная из витамина А

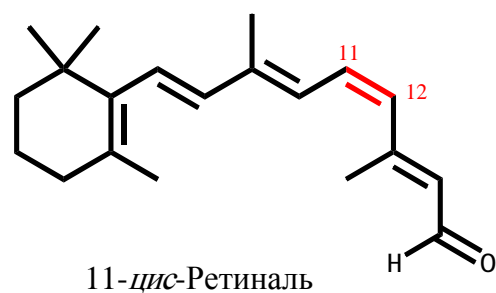


Рис. 15. Структура 11-цис-ретиная

Простетическая группа присоединяется к остатку лизина полипептидной цепи опсина, образуя при этом соединение типа основание Шиффа (рис. 16).

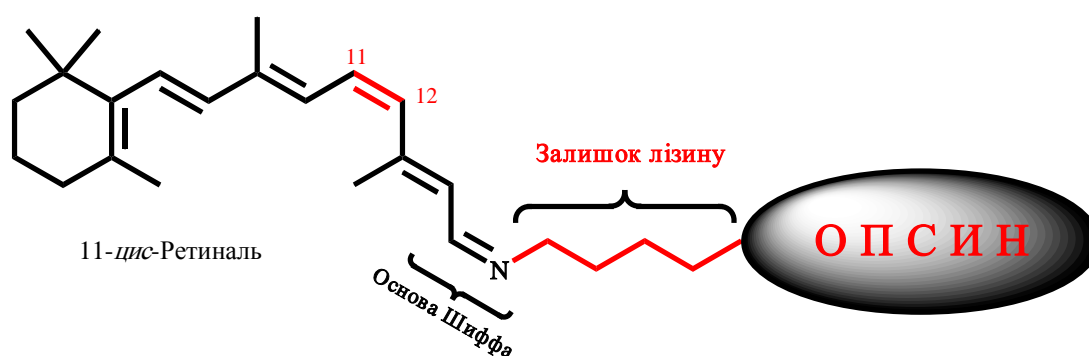


Рис.16 . Соединение 11-цис – ретиная с лизиновым остатком опсина путем образования шиффовой основы.

Сетчатка глаза человека содержит рецепторные клетки двух типов - палочки и колбочки. Палочки отличаются большой светочувствительностью, предназначены для зрения при малой освещенности (обеспечивают сумеречное и ночное зрение), и дают черно-белую картинку. Колбочки обеспечивают цветное и дневное зрение.

В палочках молекула родопсина жестко встроена в мембрану диска фоточувствительных клеток сетчатки глаза. Полипептидная цепь опсина заключена таким образом, что она образует 7 спиральных фрагментов, которые насквозь пересекают мембрану. При этом остаток ретиная оказывается в толще мембраны.

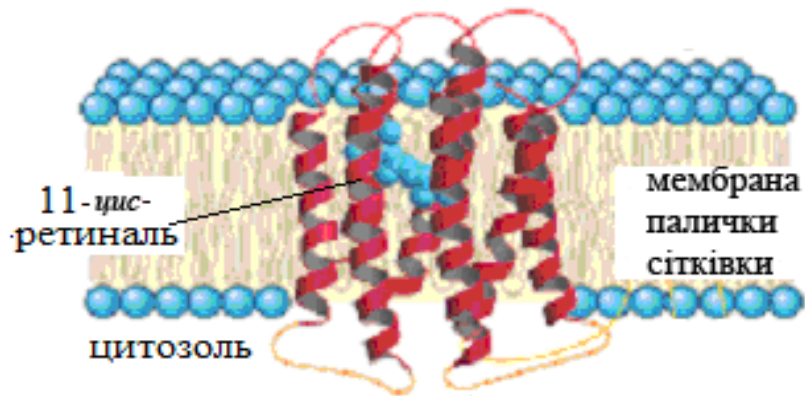


Рис.17. Расположение родопсина в мембране палочки сетчатки глаза. С центральной частью опсина в толще мембраны связан остаток 11-цис-ретиноаля (Nelson D.L., Cox M.M., 2004)

Под влиянием кванта света видимого участка спектра происходит изомеризация 11-цис-ретиноаля в транс-ретиноаль. Шиффова основа лизина с данным изомером ретиноаля существовать не может. Поэтому ретиноаль распадается на свободный опсин и транс-ретиноаль, что обуславливает его участие в процессе световосприятия. Родопсин окрашен в красный цвет, который ему придает цис-ретиноаль. При освещении родопсин обесцвечивается, поскольку образовывается транс-ретиноаль.

В специальных фоточувствительных клетках сетчатки глаза – колбочках, которые обеспечивают процесс цветного зрения, присутствуют 3 изомерные формы родопсина. Они являются продуктами экспрессии разных генов и поэтому отличаются друг от друга первичной структурой полипептидной цепи. Их характерным свойством является отличие в максимуме спектра поглощения компонентов невидимого света - синего, зеленого и красного (рис.18)

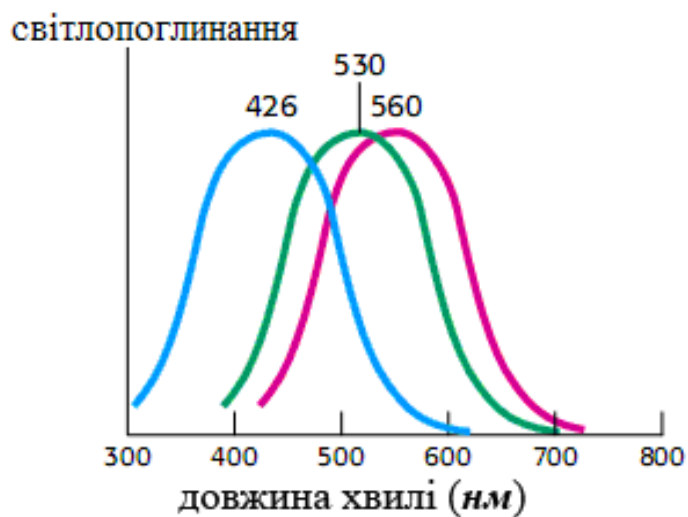


Рис. 18. Спектр поглинання трьох різних ізоформ родопсина колбочок сітчатки ока.

Відмінності в максимумі спектра поглинання дозволяють ізомерним формам родопсина розпадатися під впливом кванта світла з різною довжиною хвилі, що і лежить в основі кольорового світловосприяття.

## ГЛАВА 2. ОБМЕН ГЕМОГЛОБИНА И ЕГО НАРУШЕНИЯ

### Синтез гемоглобина

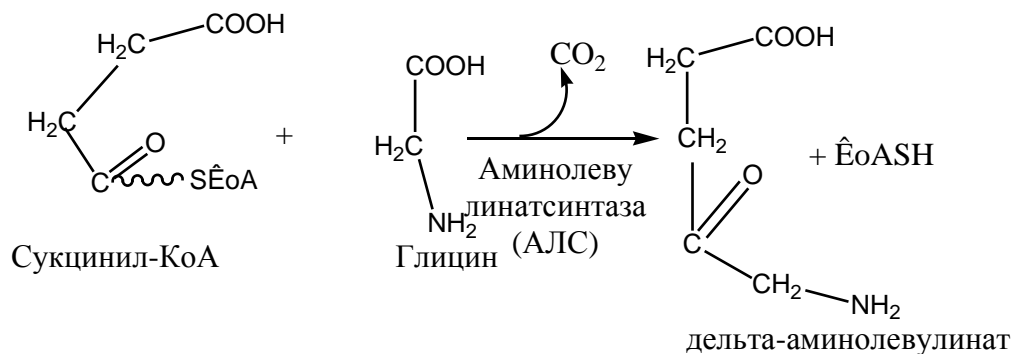
Синтез гемоглобина наиболее активно протекает в печени, красном костном мозге и осуществляется в два этапа. В одном из них происходит образование белкового компонента гемопротейна, а в другом – простетической группы - гема. Синтез белковой части происходит на рибосомах в цитоплазме гепатоцитов, при этом транслируются 2 альфа- и 2 бета-цепи, которые далее в пост-трансляционном процессинге присоединяют каждая по одному гему. Таким образом, происходит образование четырех субъединиц молекулы гемоглобина, которые потом объединяются в тетрамерную структуру.

Образование гема также происходит в гепатоцитах. Предшественниками его биосинтеза являются метаболит цикла трикарбоновых кислот – сукцинил-КоА, а также заменимая аминокислота глицин.

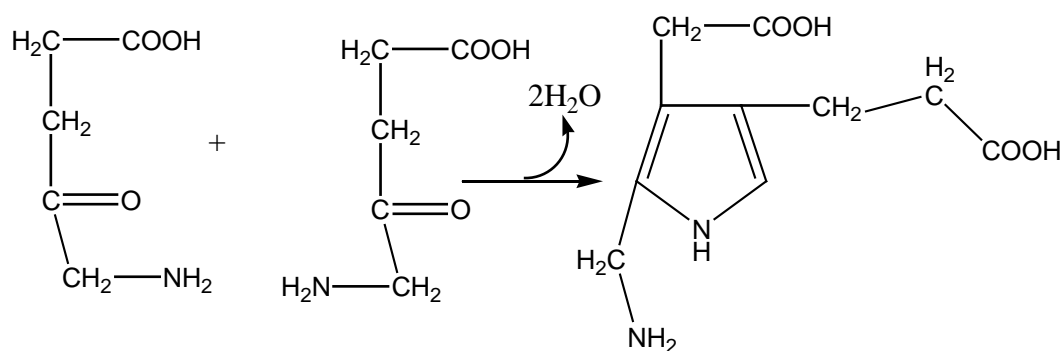
Образование гема в гепатоцитах представляет собой сложный многоступенчатый процесс, подверженный тонким механизмам регуляции, который состоит из четырех отдельных стадий:

1. синтез дельта - аминолевулиновой кислоты;
2. образование порфобилиногена;
3. синтез протопорфирина IX;
4. образование гема.

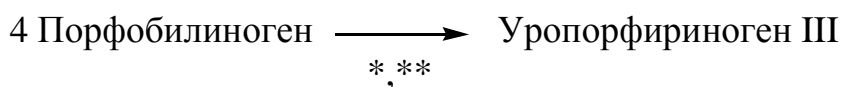
В первой стадии процесса, происходящей в митохондриях гепатоцитов, из сукцинил-КоА и глицина образуется дельта-аминолевулиновая кислота. Реакцию катализирует фермент дельта-аминолевулинатсинтаза (АЛС). АЛС является пиридоксаль-зависимым ферментом. Активность данного фермента лимитирует скорость течения всего процесса, поэтому данная реакция является главной по регуляции синтеза гема:



Продукт реакции транспортируется из митохондрий в цитозоль гепатоцита. Здесь, под влиянием порфобилиногенсинтазы из 2 молекул дельта-аминолевулиновой кислоты синтезируется молекула порфобилиногена:



На следующей стадии синтеза гема четыре молекулы порфобилиногена используются для образования линейного тетрапиррольного промежуточного продукта гидроксиметилбилана (\* - фермент уропорфириноген синтаза I). Затем следующий фермент уропорфириноген косинтаза III (\*\*\*) заканчивает превращение:



Генетический дефект уропорфириноген синтазы I у больных сопровождается интенсивным накоплением дельта-аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена в плазме крови, что приводит к развитию клинических симптомов острой перемежающейся порфирии Acute intermittent porphyria (см. ниже).



Генетический дефект фермента уропорфириноген косинтазы III (конгенитальная эритропоэтическая порфирия, Congenital erythropoetic porphyria) сопровождается у больных интенсивной экскрецией с мочой уропорфириногена I. Патология имеет ряд специальных клинических симптомов, главные из которых дерматиты и тяжелая форма гемолитической анемии.

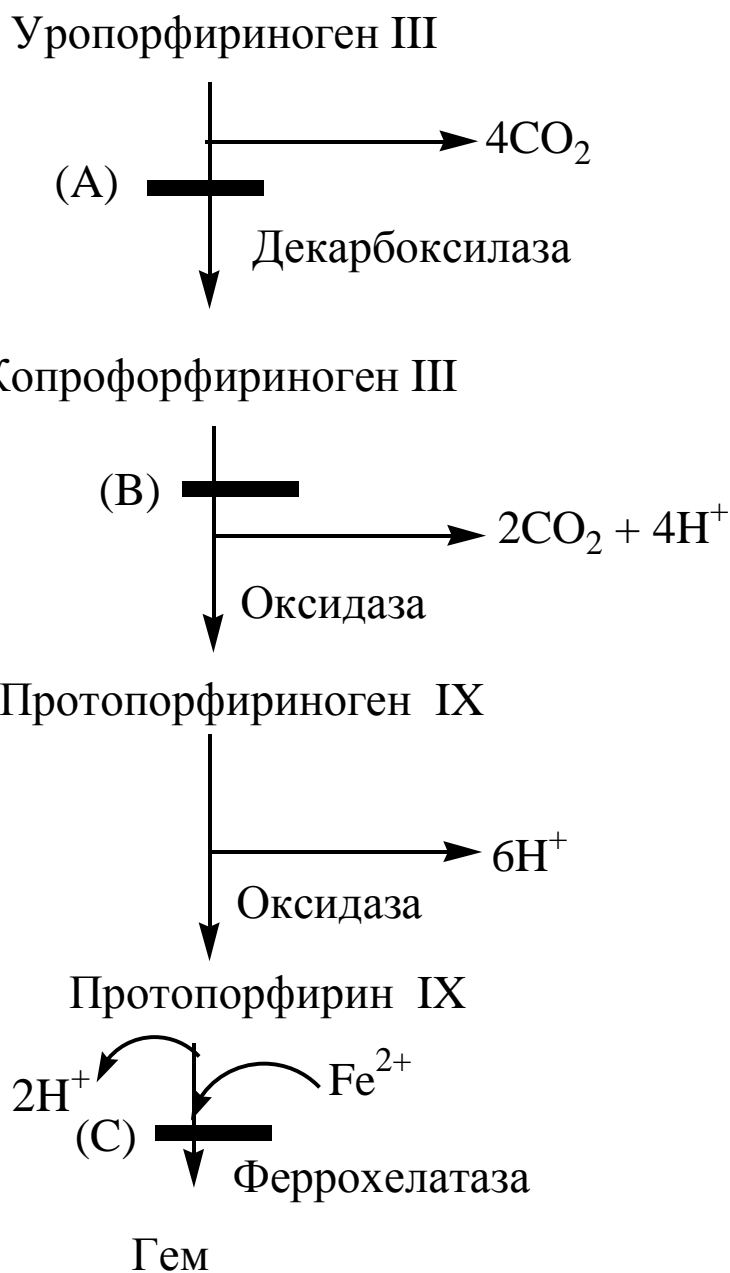


Схема 1. Превращение уропорфобилиногена III в гем.

Следующие четыре превращения имеют решающее значение для образования гема. Ферменты этих реакций могут также быть в дефиците у больных с генетическими нарушениями их синтеза. Повышенная фоточувствительность и дерматологические проблемы наблюдаются у больных с дефицитом декарбоксилазы (схема 1, А- Порфирия cutanea tarda).

Копропорфирия развивается у больных с генетическим нарушением фермента копропорфириноген оксидазы III (схема 1, В). У пациентов наблюдаются неврологические проблемы и повышенная фоточувствительность.

Нарушение (схема 1, С) синтеза феррохелатазы у больных носит название протопорфирия, при этом наблюдается повышенное депонирование железа в тканях больного с появлением дерматологических проблем и анемии.

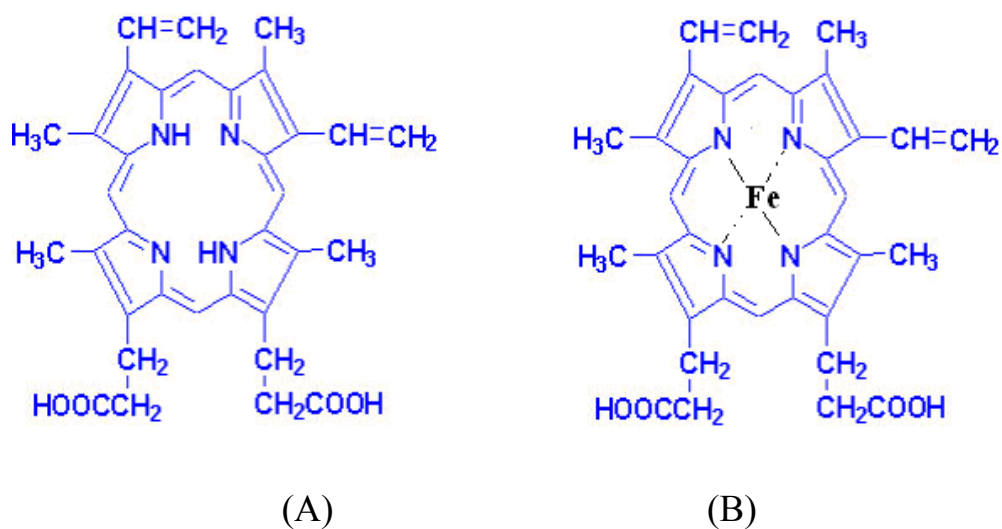


Рис.11. Структура протопорфирина IX (А) и гема (В).

Источником железа для синтеза гема в печени является белок ферритин. Он представляет собой довольно крупную по массе белковую

молекулу, в структуре которой существует большая внутренняя полость. Внутри нее может аккумулироваться до 4500 катионов железа.

Катионы железа поступают в гепатоциты из кишечника. Их транспорт в крови обеспечивается белком бета-глобулиновой фракции крови – трансферрином. Трансферрин представляет собой белок с небольшой молекулярной массой, на котором имеется 2 участка связывания атомов железа ( $\text{Fe}^{+3}$ ). Полипептидная цепь этого белка (апоферрин) синтезируется в гепатоцитах. На мембранах гепатоцитов имеются особые рецепторы, которые обладают способностью специфически связывать трансферрин крови. В результате связывания, он в комплексе с рецептором, путем эндоцитоза попадает внутрь клетки. Здесь освобождается связанное и ним железо, которое включается в ферритин. В свою очередь, освободившийся от атомов железа апоферритин, вновь выделяется из клетки печени в кровь, связывается с другими атомами железа и транспортирует их в печень.

В гепатоцитах образуются различные типы гема, которые могут использоваться не только для синтеза гемоглобина, но и синтеза цитохромов, выполняющих функцию переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий (цитохромы типа *b*, *c* и *a*) и оксигеназной микросомальной ред-окс цепи (цитохром  $\text{P}_{450}$ ). В этой связи, значение данного биосинтеза в печени не ограничивается его ролью в образовании небелковой части гемоглобина. Синтез гема имеет непосредственное отношение к энергетическому обеспечению гепатоцитов, а также к процессам модификации чужеродных и эндогенных токсичных соединений, попадающих в гепатоцит. Нарушение синтеза гема в печени будет сопровождать нарушения синтеза и биотрансформации стероидов, так как цитохром  $\text{P}_{450}$ -содержащие мультиферментные системы участвуют в данных метаболических путях и требуют наличия данной небелковой части.

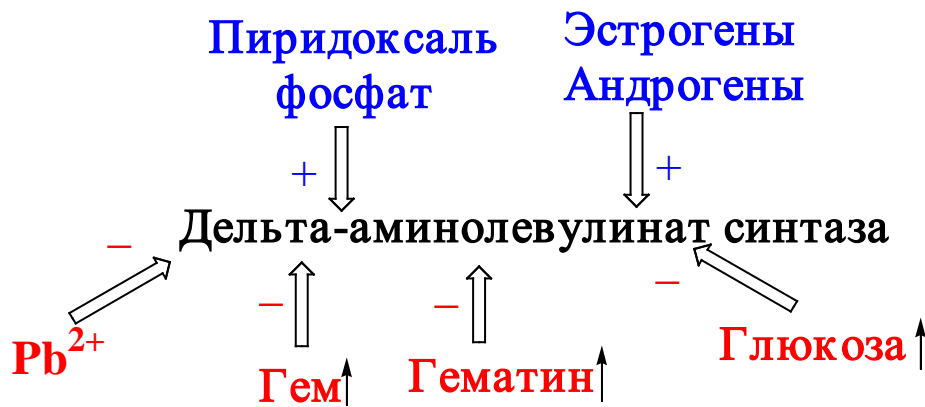


Схема 2. Регуляция ключевого фермента синтеза гема дельта-аминолевулинатсинтазы.

Процесс биосинтеза гема подвержен тонкому механизму регуляции. Дельта-аминолевулинатсинтаза является аллостерическим энзимом, который ингибируется по принципу отрицательной обратной связи конечным продуктом процесса – гемом. Активность данного фермента снижается при нагрузке глюкозой и гематином - продуктом распада пищевого гемоглобина. Все положительные эффекторы фермента указаны в схеме 2.

### **Порфирии - патологии нарушения синтеза гема**

Известна целая группа заболеваний, объединяющихся термином “порфирии”. Первичные порфирии обусловлены возникновением врожденных генетических дефектов энзимов, участвующих в метаболизме порфиринов (повышением активности синтазы дельта-аминолевулиновой кислоты). Вторичные порфирии могут возникать в процессе лечения некоторыми лекарственными препаратами, а также при интоксикациях гепатотропными ядами.

Клинически порфирии проявляются накоплением в организме (печени и эритроцитах) промежуточных продуктов синтеза гема - порфиринов. Причиной того служит усиление их образования или распада в печени. Повышение содержания порфиринов в крови сопровождается повышением

фоточувствительности кожи, возникновения аллергических реакций, поражение мышечной ткани и центральной нервной системы.

Приобретенные и наследственные нарушения синтеза гема, которые сопровождаются повышением содержания порфириногенов, продуктов их окисления в тканях, крови, а потом и моче - называются порфириями. При этих заболеваниях установлено снижение синтеза гема. В зависимости от локализации патологического процесса различают эритропоэтические и печеночные порфирии.

### ***Эритропоэтические порфирии***

Эритропоэтические порфирии – это наследственное нарушение обмена гемопротеидов в костном мозге. *Болезнь Гюнтера* – эритропоэтическая порфирия (наследуется по аутосомно-рецессивному типу). Наблюдается в одном поколении у нескольких детей. У родителей может быть обнаружено увеличенное содержание порфиринов в моче. Увеличена активность дельта-аминолевулинатсинтазы и понижение активности уропорфириноген-косинтазы. Накапливается избыток уропорфириногена в тканях и крови больного. Это приводит к сокращению продолжительности жизни эритроцита. Наблюдается гемолитическая анемия. Моча красного цвета. Через несколько дней или месяцев после рождения у ребенка наблюдаются рубцы, язвы и пузырьки на теле. У детей старшего возраста может наблюдаться потемнение зубов, отсутствие ногтей, волос.

### ***Острая перемежающаяся порфирия (первичная)***

Печеночные порфирии – это первичные или вторичные заболевания (обусловленные латентной чувствительностью синтеза гема в печени к токсическим агентам – барбитуратам, сульфаниламидам, стероидным гормонам). При всех формах порфирий проявляются повреждения кожи, у больных повышена чувствительность к солнечному излучению. Часто сопровождается симптомами со стороны нервной системы. При печеночных порфириях наблюдаются боли в

животе, конечностях, судорги, галлюцинации, психозы. Печеночную порфирию называют «королевской» болезнью, так как она наследовалась в королевских домах Ганновера и Пруссии, в семье Стюартов. Факторами, которые провоцируют приступы данной порфирии, может быть действие солнечного излучения или лекарственных препаратов (стероидных гормонов), которые индуцируют синтез аминолевулинат синтазы. У больных наблюдается боль в животе, моча розового цвета из-за накопления порфобилиногена. Патология наследуется по аутосомно – рецессивному типу. У больных повышена активность  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы и снижена активность уропорфириногенсинтазы. Аминолевулина накапливается в гипоталамусе и ингибирует  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ азу. поэтому нарушается мембранный транспорт, происходит демиелинизация нервных волокон, и развивается аксональная невропатия. Заболевание чаще проявляется у молодых женщин и девушек. У мужчин могут проявляться биохимические признаки болезни с отсутствием клинических симптомов (однако, латентная форма может перейти в тяжелую форму заболевания)

### **Аномальные типы гемоглобина - продукты нарушения синтеза полипептидных цепей гемоглобина**

Кроме физиологических типов гемоглобина существуют также аномальные, которые отличаются по составу полипептидных цепей и по аминокислотной последовательности полипептидных цепей. Такие формы гемоглобина обозначают большими буквами латинского алфавита по названию места (как правило), где впервые был открыт данный аномальный гемоглобин (HbS, HbC, HbM и т.д.). Патологические состояния, которые развиваются в организме человека при наличии таких форм гемоглобина имеют название *гемоглобинозы*. По механизму возникновения молекулярного дефекта гемоглобинозы делятся на *гемоглобинопатии* и *талассемии*.

*Гемоглинопатии* обычно обусловлены изменениями в первичной структуре полипептидных цепей гемоглобина (аминокислотные замены, делеции или вставки). Другая часть важных нарушений, связанных с аномалиями по гемоглобину – это талассемии (сопровождаются большей частью развитием гемолитической анемии в организме больного). Для талассемий характерно образование аномальной формы гемоглобина за счет снижения скорости синтеза либо полного отсутствия синтеза  $\alpha$ -цепей гемоглобина ( $\alpha$ -талассемии) либо  $\beta$ -цепей ( $\beta$ -талассемии), что приводит к снижению времени жизни эритроцитов и к гемолитической анемии иногда в очень тяжелой форме со смертельным исходом.

В крови человека в общей сложности открыто около 150 различных типов мутантных гемоглобинов. Появляются мутантные формы гемоглобинов в крови вследствие мутации генов. Обычно мутации делят на 3 класса в соответствии с топографией измененного участка молекулы. Если замена аминокислоты происходит на поверхности молекулы гемоглобина, то это мутация первого класса; подобные мутации обычно не сопровождаются развитием тяжелой патологии, и болезнь протекает бессимптомно; исключение составляет серповидно-клеточная анемия. При замене аминокислоты вблизи гема нарушается связывание кислорода – это мутация второго класса, сопровождающаяся развитием болезни. И наконец, если замена происходит во внутреннем участке молекулы гемоглобина, говорят о третьем классе мутации; подобные мутации приводят к нарушению пространственной структуры и соответственно функции гемоглобина. Аномальные гемоглобины, различающиеся по форме, химическому составу и величине заряда, были выделены при помощи электрофореза и хроматографии. Передающиеся по наследству изменения чаще всего являются результатом мутации единственного триплета, приводящей к замене одной какой-либо аминокислоты в полипептидных цепях молекулы гемоглобина на другую. В большинстве случаев происходит замена кислой аминокислоты на основную или нейтральную аминокислоты (табл.).

Поскольку это замещение осуществляется в обеих полипептидных цепях одной из пар ( $\alpha$  или  $\beta$ ), образовавшийся аномальный гемоглобин будет отличаться от нормального величиной заряда и соответственно электрофоретической подвижностью.

Таблица 1. Замены аминокислот в аномальных гемоглобинах человека

Тип гемоглобина	Состав полипептидных цепей	Нормальный остаток и его положение в цепи	Замена на
A1	$\alpha 2\beta 2$		
A2	$\alpha 2\delta 2$		
C	$\alpha 2\beta 2$	Глу 6 в $\beta$ -цепи	Лиз
D $\beta$	$\alpha 2\beta 2$	Лей 28 в $\beta$ -цепи	Глу
E	$\alpha 2\beta 2$	Глу 26 в $\beta$ -цепи	Лиз
F	$\alpha 2\gamma 2$		
G	$\alpha 2\beta 2$	Глу 43 в $\beta$ -цепи	Ала
GpH	$\alpha 2\beta 2$	Асп 68 в $\alpha$ -цепи	Лиз
H	$\beta 4$		
I	$\alpha 2\beta 2$	Лиз 16 в $\alpha$ -цепи	Асп
M	$\alpha 2\beta 2$	Вал 67 в $\beta$ -цепи	Глу
O	$\alpha 2\beta 2$	Глу 116 в $\alpha$ -цепи	Лиз
S	$\alpha 2\beta 2$	Глу 6 в $\beta$ -цепи	Вал

В табл. представлены некоторые типы аномальных гемоглобинов, составы их полипептидных цепей с указанием известной или вероятной локализации замены либо в  $\alpha$ -, либо в  $\beta$ -цепях. Замены необычной аминокислотой в аномальных гемоглобинах имеют место как в  $\alpha$ -, так и в  $\beta$ -цепях. Исключение составляет гемоглобин H, все четыре полипептида которого представлены  $\beta$ -цепями, идентичными по структуре  $\beta$ -цепям нормального гемоглобина A1. Следует указать, что некоторые мутации, вызывающие существенное изменение структуры и соответственно функции гемоглобина, оказываются летальными, и индивидуумы с подобным гемоглобином умирают в раннем возрасте. Однако при ряде мутаций замена аминокислот не вызывает заметного изменения функции гемоглобина, в этих



случаях болезнь протекает бессимптомно. В человеческой популяции насчитывают более 200 гемоглобинозов. Принято делить их на гемоглобинопатии, в основе развития которых лежит наследственное изменение структуры какой-либо цепи нормального гемоглобина (часто их относят также к «молекулярным болезням»), и талассемии, обусловленные наследственным нарушением синтеза какой-либо нормальной цепи гемоглобина. Различают также железодефицитные анемии. Классическим примером наследственной гемоглобинопатии является серповидно-клеточная анемия, широко распространенная в странах Южной Америки, Африки и Юго-Восточной Азии. При этой патологии эритроциты в условиях низкого парциального давления кислорода принимают форму серпа. Гемоглобин S, как показали Л. Полинг и др., отличается рядом свойств от нормального гемоглобина: в частности, после отдачи кислорода в тканях он превращается в плохо растворимую дезокси-форму и начинает выпадать в осадок в виде веретенообразных кристаллоидов, названных тактоидами. Последние деформируют клетку и приводят к массивному гемолизу. Болезнь протекает остро, и дети, гомозиготные по мутантному гену, часто умирают в раннем возрасте. Химический дефект при серповидно-клеточной анемии был раскрыт В. Ингремом и сводится к замене единственной аминокислоты, а именно глутаминовой, в 6-м положении с N-конца на валин в  $\beta$ -цепях молекулы гемоглобина HbS. Это результат мутации в молекуле ДНК, кодирующей синтез  $\beta$ -цепи гемоглобина. Все остальные аминокислоты располагаются в той же последовательности и в таком же количестве, как и в нормальном гемоглобине HbA: Одной этой замены оказалось достаточно не только для нарушения формы эритроцита, но и для развития тяжелой наследственной болезни – серповидно-клеточной анемии. Талассемии, строго говоря, не являются гемоглобинопатиями. Это генетически обусловленное нарушение синтеза одной из нормальных цепей гемоглобина. Если угнетается синтез  $\beta$ -цепей, то развивается  $\beta$ -талассемия; при генетическом дефекте синтеза  $\alpha$ -цепей развивается  $\alpha$ -талассемия. При  $\beta$ -талассемии в крови

наряду с HbA1 появляется до 15% HbA2 и резко повышается содержание HbF – до 15–60%. Болезнь характеризуется гиперплазией и разрушением костного мозга, поражением печени, селезенки, деформацией черепа и сопровождается тяжелой гемолитической анемией. Эритроциты при талассемии приобретают мишеневидную форму. Механизм изменения формы эритроцитов объяснить пока до конца не удалось.

### Распад гемоглобина в организме человека

В организме здорового человека с массой тела 70 кг каждый час разрушается около  $1-2 \times 10^8$  эритроцитов, что, в перерасчете на массу гемоглобина, подвергающегося распаду, составляет, примерно, 6 г гемоглобина в сутки. Белковая часть гемоглобина разрушается до аминокислот, которые вновь используются клетками для синтеза белков. Катионы железа гема пополняют запасы железа в составе белка печени **ферритина**, а порфириновое кольцо гема разрушается до специальных продуктов – **желчных пигментов (биливердин, билирубины и пигменты, образующиеся из билирубина в кишечнике)**.

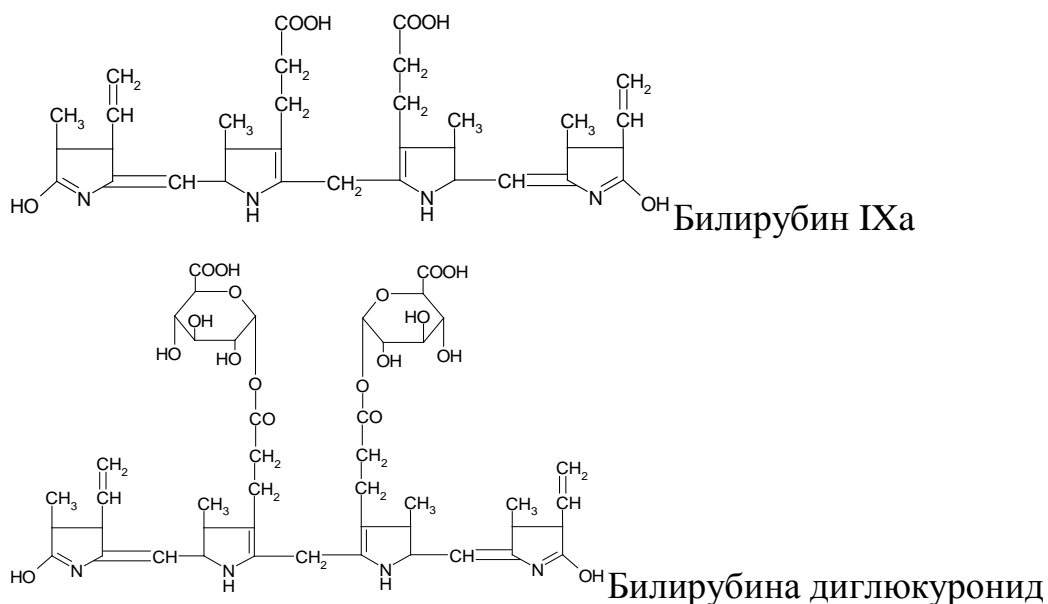


Рис.19. Структура токсичного билирубина IXa и нетоксичного диглюкуронида билирубина.

Распад гемоглобина начинается, преимущественно, в клетках Купфера (печень) и клетках ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) селезёнки (схема 3). Формирование промежуточных метаболитов распада гемоглобина (вердоглобин, биливердин, билирубин IXa) может происходить как в печени, так и в других органах, прежде всего в селезенке (схема 3), а конъюгация билирубина (образование диглюкуронида – только в гепатоцитах (схема 4)).

В качестве дополнительных источников билирубина выступают многочисленные гемопротеины, содержащиеся в значительных количествах во всех клетках тканей внутренних органов. Среди них особое место занимает белок скелетной мускулатуры и миокарда миоглобин, а также цитохромы.

Процесс превращения *свободного (непрямого) билирубина*, образующегося при разрушении эритроцитов и распаде гемоглобина в органах ретикулоэндотелиальной системы, в *связанный, конъюгированный или прямой билирубин* (билирубина диглюкуронид) в гепатоците (рис.20) осуществляется в три этапа (на рис.20 обозначены римскими цифрами):

I этап — захват билирубина (Б) печеночной клеткой после отщепления альбумина;

II этап — образование водорастворимого комплекса билирубин-диглюкуронида (Б-Г);

III этап— выделение образовавшегося связанного (прямого) билирубина (Б-Г) из печеночной клетки в желчные протоки.

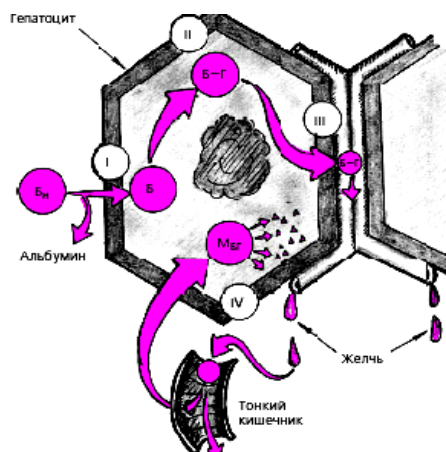


Рис. 20. Функция гепатоцита в формировании и секретиции прямого билирубина.  $B_n$  – свободный (непрямой) билирубин;  $B-G$  - билирубин-глюкуронид (связанный, или прямой билирубин);  $M_{62}$  – мезобилиноген (уробилиноген).

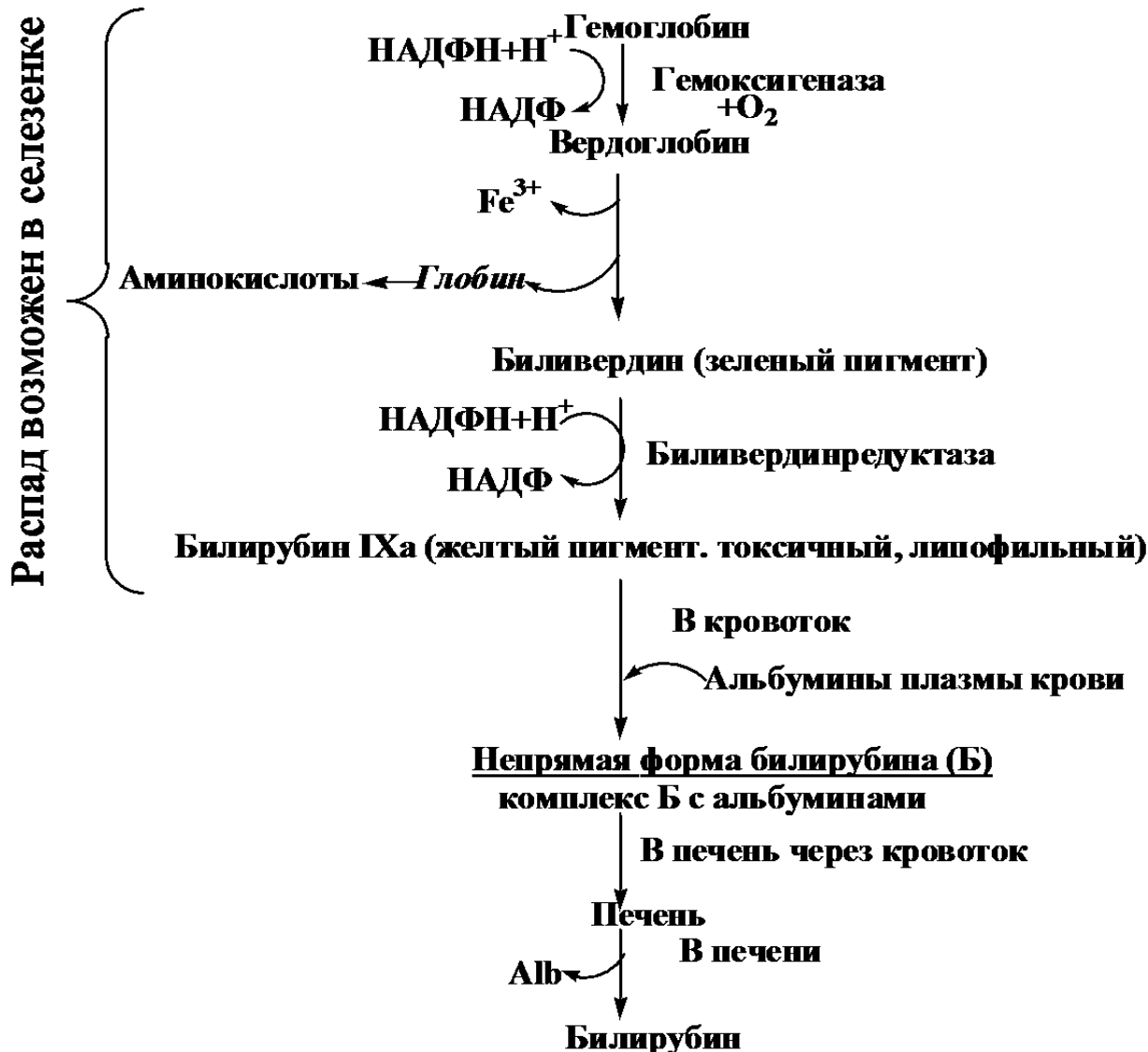


Схема 3. Образование неконъюгированного (непрямого) билирубина.

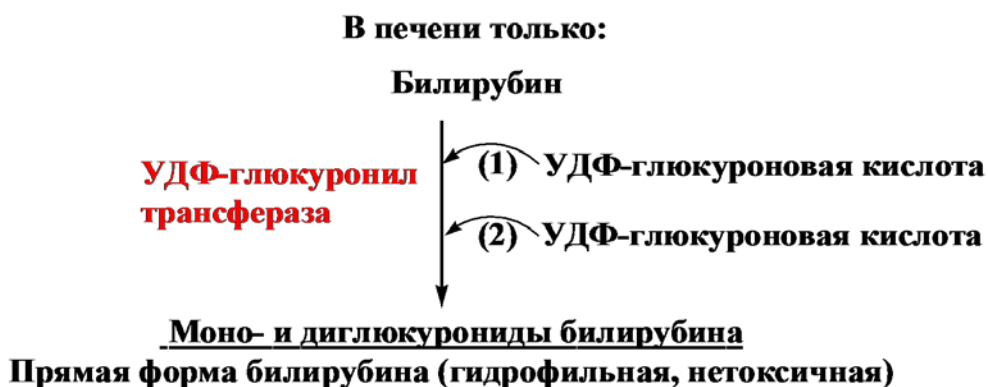
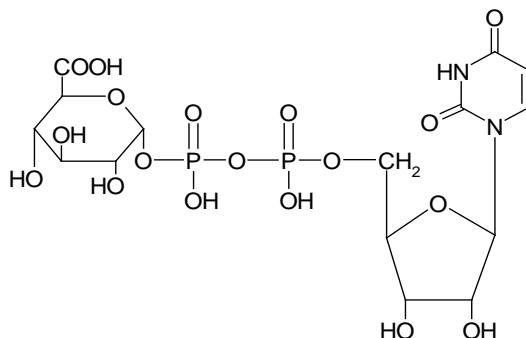


Схема 4. Конъюгация билирубина в паренхиме печени.

В качестве источника глюконовой кислоты в этой реакции используется УДФ-глюкуроновая кислота:



Фермент УДФ-глюкуронилтрансфераза, подобно другим ферментам печени, подвергается индукции некоторыми ксенобиотиками. К таковым относятся в частности, широко используемые в клинической практике препараты барбитурового ряда (снотворные и седативные), некоторые противосудорожные препараты других фармакологических групп, транквилизаторы и пр.

В отличие от свободного билирубина, его конъюгированная форма хорошо растворима в воде. Конъюгаты билирубина, преимущественно в форме диглюкуронидов (до 75%), выделяются в желчь. При этом их транспорт направлен в сторону большей концентрации, т.е. против концентрационного градиента. Он обеспечивается специальной энергозависимой системой активного транспорта, встроенной в клеточную мембрану гепатоцитов. Дальнейший метаболизм билирубина связан с поступлением его в желчные пути и кишечник. В нижних отделах желчевыводящих путей и тонком кишечнике под воздействием микрофлоры происходит постепенное восстановление билирубина до *мезобилиногена*. Часть мезобилиногена всасывается в кишечнике (*уробилиноген*) и по системе воротной вены вновь попадает в печень, где в норме происходит практически полное его разрушение до *пирролов* (схема 5).

Основное количество мезобилиногена из тонкой кишки поступает в толстую и здесь восстанавливается до *стеркобилиногена* при участии анаэробной микрофлоры (схема 5). Образовавшийся стеркобилиноген в нижних отделах толстой кишки (в основном в прямой кишке) окисляется до *стеркобилина* и выделяется с калом, определяя его окраску у здоровых людей. Лишь небольшая часть стеркобилиногена через геморроидальные вены попадает в систему нижней полой вены и в дальнейшем выводится с мочой (схема 5). Следовательно, в норме моча человека содержит лишь следы стеркобилиногена, не выявляющиеся клиническими лабораторными методами (за сутки его выделяется до 4 мг). К сожалению, до последнего времени в клинической практике стеркобилиноген, содержащийся в нормальной моче, продолжают называть уробилиногеном.



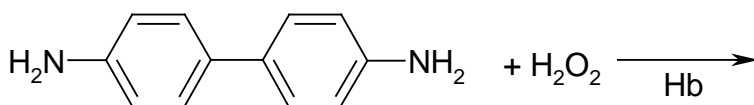
Схема 5. Превращение билирубина в кишечнике с образованием конечных продуктов в моче и кале.

При диагностике патологий пигментного обмена визуально оценивается интенсивность окраски мочи и кала больных, проводится количественное определение билирубинов (прямого, непрямого, общего) в плазме или сыворотке крови и уробилиногена в моче, иногда количественно определяется стеркобилин кала. При патологиях, сопровождающихся снижением концентрации эритроцитов (анемиях различной этиологии возникновения), обязательным тестом является определение концентрации гемоглобина, и в качестве дополнительных, концентрация железа в крови человека.

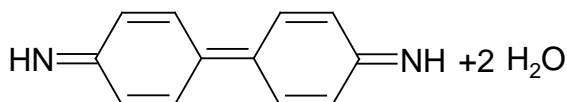
## Методы определения гемоглобина в биологических жидкостях

### *Качественная реакция на гемоглобин*

Открытие гема в молекуле гемоглобина проводится с помощью бензидиновой пробы. Проба основана на свойстве гемоглобина катализировать окисление бензидина перекисью водорода в дифенилхинондиимин. Последний, конденсируется с молекулой неокисленного бензидина с образованием окрашенного в сине-зеленый цвет продукта. Проба находит применение для выявления следов крови в судебно-медицинской экспертизе.



бензидин



Дифенилхинондиимин  
(сине-зеленая окраска)

Ход работы:

В одну пробирку вносится 1 мл разведенной в 5000 раз крови, а в другую – 1 мл воды. Обе пробирки помещаются на несколько минут на кипящую водяную баню. После охлаждения в них добавляется по 5 капель свежеприготовленного 3% спиртового раствора бензидина и 3% раствора перекиси водорода. В пробирке с разведенной кровью появляется характерное сине-зеленое окрашивание.

### ***Количественное определение гемоглобина в крови***

Гемоглобин окисляется в метгемоглобин при помощи железосинеродистого калия (красной кровяной соли). При его взаимодействии с ацетоциангидрином образуется окрашенный цианметгемоглобин, содержание которого определяется колориметрически.

Ход работы:

В пробирку наливается 5 мл трансформирующего раствора и 0,02 мл крови. Содержимое тщательно перемешивается и оставляется на 10 минут при комнатной температуре. После этого измеряется оптическая плотность окрашенной пробы на ФЭКе при 550 нм (зеленый светофильтр) в кювете толщиной 1 см против трансформирующего раствора.

Для расчета содержания гемоглобина строится калибровочная кривая, которая готовится в соответствии со следующей таблицей:

№ пробы	Стандартн. раствор (мл)	Трансформирующий раствор (мл)	Содержание гемоглобина (г/ 100 мл)
1	-	6	-
2	2	4	5
3	4	2	10
4	5	1	12,5

Для расчета используют формулу:



$$\frac{E_{оп} \cdot C \cdot K \cdot 0,001}{E_{ст}} \quad \text{г / 100 мл}$$

Где:

$E_{оп}$ - оптическая плотность опытной пробы;

$E_{ст}$  –оптическая плотность стандартной пробы;

$C$ - концентрация стандарта;

$K$ - коэффициент разведения крови (251);

0,001 – коэффициент пересчета в г / 100 мл.

Содержание гемоглобина в крови здоровых взрослых мужчин находится в пределах 132 – 164 г/л, а у женщин - 115 – 145 г/л. Уменьшение величины этого показателя является характерным проявлением анемий.

*Приготовление реактивов:*

1. Трансформирующий раствор: 0,5 мг ацетонциангидрина, 0,2 г красной кровяной соли и 1 г гидрокарбоната натрия растворяется в воде и общий объем доводится до 1000 мл.

2. Стандартный раствор гемоглобина: 60 мг кристаллического гемоглобина растворяется в 100 мл воды. Это соответствует содержанию 15 г гемоглобина в 100 мл крови при ее разведении в 251 раз (в соответствии с описанной выше методикой).

### ***Определение содержания железа в сыворотке крови***

Железо вступает в реакцию с бато-фенантролином с образованием окрашенного комплексного соединения. Интенсивность развивающейся окраски пропорциональна концентрации свободного железа в исследуемой пробе.

Ход работы:

В пробирку вносится 2 мл сыворотки крови, 2,5 мл дистиллированной воды и 1,5 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Проба интенсивно перемешивается и помещается на 15 минут на водяную баню с температурой 90 – 95 °С.

После извлечения из водяной бани проба центрифугируется при 2000 об/мин в течение 20 минут. 4 мл верхнего слоя переносится в новую пробирку. Сюда же добавляется 0,35 мл раствора ацетата аммония и 0,3 мл насыщенного раствора гидразина сульфата. После этого проводится измерение оптической плотности на ФЭКе с зеленым светофильтром (535 нм) в кювете толщиной 1 см. Далее, исследуемый раствор переливается в чистую пробирку и к нему прибавляется 0,4 мл раствора бато-фенантролина. Через 40 минут повторно определяется оптическая плотность.

Параллельно ставятся контрольная и стандартная пробы. Для приготовления контрольной пробы в пробирке смешивается 1 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты, 3 мл воды, 0,35 мл раствора ацетата аммония и 0,3 мл насыщенного раствора гидразина сульфата. Определяется оптическая плотность в кювете толщиной 1 см. После этого исследуемый раствор переливается в пробирку и к нему прибавляется 0,4 мл раствора бато-фенантролина. Через 40 минут повторно определяется оптическая плотность пробы.

Для приготовления стандартной пробы к 2 мл рабочего стандартного раствора (с концентрацией железа 2 мкг/мл) добавляется 1 мл дистиллированной воды, 1 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты, 3 мл воды, 0,35 мл раствора ацетата аммония и 0,3 мл насыщенного раствора гидразина сульфата. Определяется оптическая плотность в кювете толщиной 1 см. После этого исследуемый раствор переливается в пробирку и к нему прибавляется 0,4 мл раствора бато-фенантролина. Через 40 минут повторно определяется оптическая плотность.

Концентрация железа в сыворотке крови рассчитывается по формуле:

$$\frac{(A_{оп} - A_{к})}{(A_{ст} - A_{к})} \cdot 300 \quad \text{мкг железа в 100 мл}$$

Где:

Аоп – разность между первым и вторым показанием оптической плотности опытной пробы;

Ак – разность между первым и вторым показанием оптической плотности контрольной пробы;

Аст – разность между первым и вторым показанием оптической плотности стандартной пробы;

Для пересчета содержания железа в мкмоль/л, полученное при расчете по указанной формуле значение умножается на коэффициент 0,179.

В норме содержание железа в сыворотке крови находится в пределах от 12,5 до 30,4 мкмоль/л. У женщин величина этого показателя несколько ниже, чем у мужчин. Величина показателя может значительно понижаться у больных с железодефицитной анемией.

#### *Приготовление реактивов:*

1. Раствор сульфата аммония: 70 г ацетата натрия растворяется в 30 мл воды.
2. Насыщенный раствор гидразина сульфата готовится путем смешивания 2,5 г этой соли со 100 мл воды.
3. Раствор бато-фенантролина: 100 мг бато-фенантролина помещается в пробирку с 0,5 мл хлорсульфоновой кислоты. Смесь кипятится 30 секунд, после чего охлаждается и к ней добавляется 10 мл воды. После 20-минутного нагревания на кипящей водяной бане смесь переносится в 200 миллилитровую колбу, в которую приливается 100 мл воды. Значение pH приготовленного раствора доводится до 4 путем добавления 20% едкого натрия. Общий объем реактива доводится до 200 мл водой.
4. Стандартный раствор железа (100 мкг/мл, 1,8 ммоль/л). 0,7 г соли Мора растворяется в 5 мл 0,3 н раствора соляной кислоты. Объем раствора доводится до 1 л. Рабочий стандартный раствор (2 мкг/мл, 35,8 мкмоль/л) готовится путем разведения основного стандартного раствора подкисленной

водой (подкисление проводится при помощи серной кислоты из фиксанала из расчета 1 мл кислоты на 1 л воды).

## Методы определения билирубина и его метаболитов

### Определение билирубина в сыворотке крови

В клинической практике используются различные методы определения билирубина и его фракций в сыворотке крови. Наиболее распространенным из них является *метод Ендрашика-Грофа*. Он основан на взаимодействии билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой с образованием азопигментов. При этом *связанный билирубин* (билирубин-глюкуронид) дает быструю («прямую») реакцию с диазореактивом, тогда как реакция *свободного* (не связанного с глюкуронидом) *билирубина* протекает значительно медленнее. Для ее ускорения применяют различные вещества-акселераторы, например кофеин (метод Ендрашика-Клеггорна-Грофа), которые освобождают билирубин из белковых комплексов («непрямая» реакция). В результате взаимодействия с диазотированной сульфаниловой кислотой билирубин образует окрашенные соединения. Измерения проводят на фотоколориметре.

Ход работы:

В 2 пробирки вносится по 0,5 мл сыворотки крови, разведенной 0,9% раствором хлорида натрия в соотношении 1:1. В одну пробирку (определение прямого билирубина) добавляется 1,75 мл 0,9% раствора NaCl и 0,25 мл диазореактива Эрлиха. Во вторую пробирку добавляется 1,75 мл кофеинового реактива и 0,25 мл диазореактива Эрлиха (определение общего билирубина). Обе пробирки встряхиваются и оставляются на 20 мин при комнатной температуре.

Измеряется оптическая плотность проб в 1 и 2 пробирках на ФЭКе при зеленом светофильтре против воды в кюветах, толщиной 5 мм. Если окрашивание в пробах очень слабое, в пробирки добавляется по 3 капли 30% раствора NaOH. Содержание общего (пробирка N2) и прямого (пробирка N 1) билирубина рассчитывается по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика используются рабочие стандартные растворы билирубина, которые готовятся согласно данным таблицы:

N п/п	Рабочий стандарт раствор билирубина (мл)	Физ-раствор (мл)	мг билирубина в пробе 0,5 мл	Концентрация билирубина в крови (ммоль/ л)
1	0,05	0,45	0,005	17
2	0,10	0,40	0,010	34
3	0,15	0,35	0,015	51
4	0,20	0,30	0,020	68
5	0,25	0,25	0,025	85

Стандартные пробы обрабатываются так же, как и опытные. При построения калибровочной кривой на оси ординат откладываются значения оптической плотности, а абсцисс – концентрация билирубина.

Разница между общим и прямым билирубином - непрямым билирубин сыворотки крови.

В норме в сыворотке крови содержится 8,5–20,5 мкмоль/л общего билирубина, причем на долю свободного («непрямого») билирубина приходится около 75% билирубина (до 16,5 мкмоль/л).

### **Определение билирубина в моче**

У здорового человека с мочой выделяются минимальные количества связанного (прямого) билирубина, которые не определяются описанными ниже качественными реакциями.

Различные качественные методы обнаружения билирубина в моче основаны на превращении этого вещества под действием окислителей в биливердин, имеющий зеленую окраску, или билирубинпурины (красное окрашивание).

**Проба Розина.** В пробирку с 4-5 мл мочи осторожно по стенкам наливают 1% спиртовой раствор йода. При наличии в моче билирубина на границе мочи и раствора йода образуется зеленое кольцо.

В качестве окислителей используют также растворы трихлоруксусной кислоты (*проба Фуше*), диазотированную сульфаниловую кислоту (*проба Готфрида*) и другие окислители.

### **Определение уробилина в моче**

Определение уробилина в моче также основано на образовании окрашенных в розовый или красный цвет соединений при взаимодействии уробилина с HCl, сульфатом меди или реактивом Эрлиха (парадиметил-аминобензальдегидом).

**Проба Нейбауэра.** К 3-4 мл свежесобранной мочи добавляют 3-4 капли реактива Эрлиха (пара-диметилбензальдегида). Окрашивание мочи в красный цвет свидетельствует о диагностически значимом повышении концентрации уробилина в моче.

У здорового человека с мочой выделяется не более 5-6 мг уробилина в сутки, который не выявляется качественными реакциями.

**Положительная качественная реакция на уробилин свидетельствует:**

- о выходе в общий кровоток уробилиногена, что обычно наблюдается у пациентов с поражениями паренхимы печени
- об увеличенном образовании стеркобилиногена (при усиленном гемолизе) в кишечнике, в избыточном количестве через vena hemorrhoidalis поступающего в кровоток и попадающего в мочу в большей, чем в норме, концентрации.

**Проба Гмелина.** Проба основана на способности желчных пигментов окисляться концентрированной азотной кислотой с образованием окрашенных в различные цвета продуктов окисления: биливердина (зеленого цвета), билицианина (синего цвета), холелетина (желтого цвета) и др.

Проба Гмелина может проводиться в пробирке или на фильтровальной бумаге. Она дает возможность открыть билирубин в разведении мочи 1:80 000.

В пробирку наливается 1-2 мл концентрированной азотной кислоты, содержащей следы азотистой. Осторожно по стенке наслаивается равный объем исследуемой мочи. При наличии в моче желчных пигментов на границе раздела жидкостей появляются цветные кольца. Характерно наличие зеленого, синего, фиолетового, красного и желтого колец в указанной последовательности соответственно разным степеням окисления пигмента.

***Проба Розенбаха (проба на фильтровальной бумаге).*** 2 мл исследуемой мочи несколько раз фильтруется через небольшой бумажный фильтр. При наличии в ней желчных пигментов они частично задерживаются на фильтре. В центр фильтра, развернутого на предметном стекле и слегка подсушенного, стеклянной палочкой наносится капля концентрированной азотной кислоты. Появляются характерные цветные кольца. При этом зеленое кольцо всегда располагается снаружи.

Желчные пигменты (билирубин, биливердин и др.) отсутствуют в моче здорового человека. Они появляются в ней в виде щелочных солей при желтухах.

***Определение порфобилиногена в моче.*** При взаимодействии с р-метиламинобензальдегидом порфобилиноген образует окрашенные в красный цвет соединения. Продукты, имеющие красную окраску, образование которых не связано с порфобилиногеном, удаляются из реакционной смеси путем экстракции хлороформом и бутанолом.

Ход работы:

В пробирку вносится 2,5 мл мочи, 2, 5 мл реактива Эрлиха и 5 мл насыщенного раствора уксуснокислого натрия. Проводится интенсивное встряхивание. При наличие в моче порфобилиногена развивается

характерная красная окраска. Содержимое переносится в мерный цилиндр на 20 мл. Добавляется 10 мл смеси хлороформа с бутанолом (1:1). Проба интенсивно встряхивается, после чего оставляется до расслоения фаз. Верхний водный слой сохраняет при этом красную окраску.

В норме при помощи описанного метода порфобилиноген в моче не обнаруживается (0 – 2 мг/л).

*Приготовление реактива Эрлиха:* 1 г р-метиламинобензальдегида растворяется в 35 мл ледяной уксусной кислоты. Добавляется 8 мл концентрированной хлорной кислоты, после чего общий объем доводится до 50 мл.

### **Определение стеркобилина и билирубина в кале**

В норме у взрослого человека с калом выделяется за сутки около 300-500 мг стеркобилина, придающего испражнениям характерную коричневую окраску.

Стеркобилин является конечным продуктом восстановления билирубина, выделяющегося в кишечник из общего желчного протока. Эта реакция протекает под действием нормальной микробной флоры кишечника. Характерно, что у новорожденных и детей грудного возраста с калом выделяется неизменный билирубин, в связи с чем испражнения имеют характерный зеленоватый цвет.

*Качественное определение* стеркобилина в кале основано на реакции этого вещества с двуххлористой ртутью (сулемой), в результате которой образуется соединение, имеющее розовое окрашивание. Для этого комочек кала растирают в фарфоровой ступке с 3–4 мл раствора сулемы, закрывают крышкой и оставляют на сутки в вытяжном шкафу. При наличии стеркобилина эмульсия приобретает розовое или красноватое окрашивание. Если в кале присутствует неизменный билирубин, реакция с сулемой дает зеленоватое окрашивание.



**Количественное определение** стеркобилина в кале основано на цветной реакции с пара-диметиламинобензальдегидом с образованием комплекса, окрашенного в красный цвет. Интенсивность окраски, пропорциональная содержанию в кале стеркобилина, определяют спектрофотометрически. В настоящее время метод редко используется в клинической практике.

**Интерпретация результатов.** Определение стеркобилина в кале целесообразно только при исчезновении или уменьшении характерной коричневой окраски испражнений.

**Отсутствие или резкое уменьшение количества стеркобилина в кале** (ахоличный кал) чаще всего свидетельствует об обтурации общего желчного протока камнем, сдавлении его опухолью или резком снижении функции печени (например при остром вирусном гепатите).

**Увеличение количества стеркобилина в кале** возникает при массивном гемолизе эритроцитов (гемолитическая желтуха) или усиленном желчеотделении.

**Выявление в кале** взрослого человека **неизменного билирубина** указывает на нарушение процесса восстановления билирубина в кишечнике под действием микробной флоры. Наиболее частыми причинами этого нарушения являются:

- 1) подавление жизнедеятельности бактерий кишечника под влиянием больших доз антибиотиков (дисбактериоз кишечника)
- 2) резкое усиление перистальтики кишечника.

#### **Интерпретация результатов по исследованию желчных пигментов при дифференциальной диагностике желтух**

Оценка нарушений пигментного обмена нередко имеет решающее значение в дифференциальной диагностике желтух (паренхиматозной, механической и гемолитической).

**Паренхиматозная (печеночная) желтуха** возникает при поражении печёночной паренхимы у больных гепатитами, циррозом, раком и другими

заболеваниями печени. При этом происходит нарушение ранее описанных четырех процессов, протекающих в гепатоцитах (рис. 14. схемы 3,4).

Нарушение захвата свободного билирубина печеночной клеткой (I) и связывания его с глюкуроновой кислотой (II) ведет к увеличению в плазме крови **свободного (непрямого) билирубина (Бн)**. Нарушение выделения билирубин-глюкуронида (прямого билирубина) из печеночной клетки в желчные капилляры, обусловленное воспалением, деструкцией, некрозами и снижением проницаемости мембран гепатоцитов, приводит к регургитации желчи обратно в синусоиды и в общий кровоток и, соответственно, к увеличению содержания в крови **связанного (прямого) билирубина (Бп)**.

Наконец, нарушение функции гепатоцитов сопровождается также утратой способности печеночной клетки захватывать и метаболизировать всосавшийся в кишечнике **мезобилиноген (уробилиноген)**, который в больших количествах попадает в общий кровоток и выделяется с мочой в виде **уробилина** (рис.14).

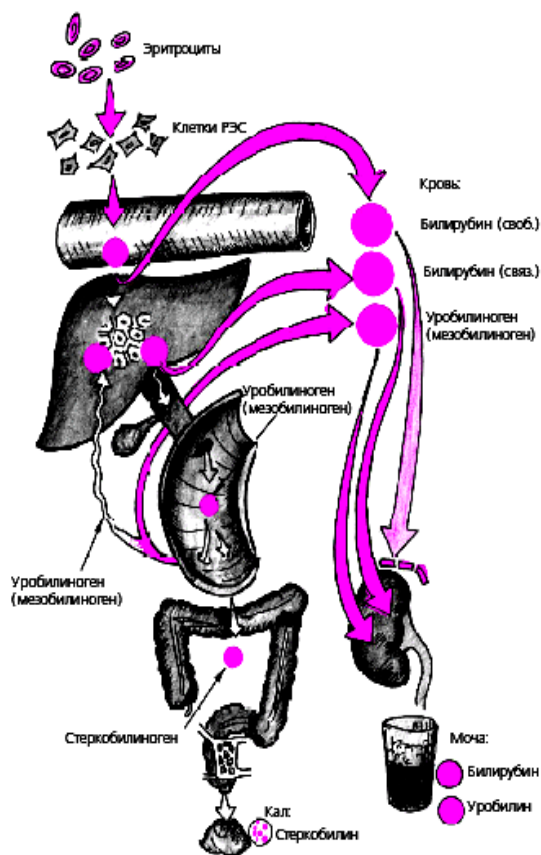


Рис.21. Изменение обмена желчных пигментов при паренхиматозной желтухе.

Таким образом, при паренхиматозной желтухе (рис. 21) в крови увеличено содержание как *свободного (непрямого)*, так и *связанного (прямого) билирубина*. Последний, являясь хорошо растворимым в воде соединением, легко проходит почечный барьер и появляется в моче, обуславливая ее темную окраску («цвет темного пива»). В моче также в больших количествах присутствует *уробилин* (производное *уробилиногена*, попавшего в общий кровоток). В кале содержание *стеркобилина* может быть несколько уменьшено в связи с нарушением выделения гепатоцитами желчи.

**Механическая (обтурационная, подпечёночная) желтуха** (рис. 22) развивается при обтурации внепеченочных желчевыводящих путей камнем или сдавлении общего желчного протока опухолью (рак головки поджелудочной железы, метастазы рака в лимфатические узлы ворот печени). В результате этого блокируется выделение желчи в кишечник и, соответственно, не образуется *уробилиноген* (*мезобилиноген* и *стеркобилиноген*).

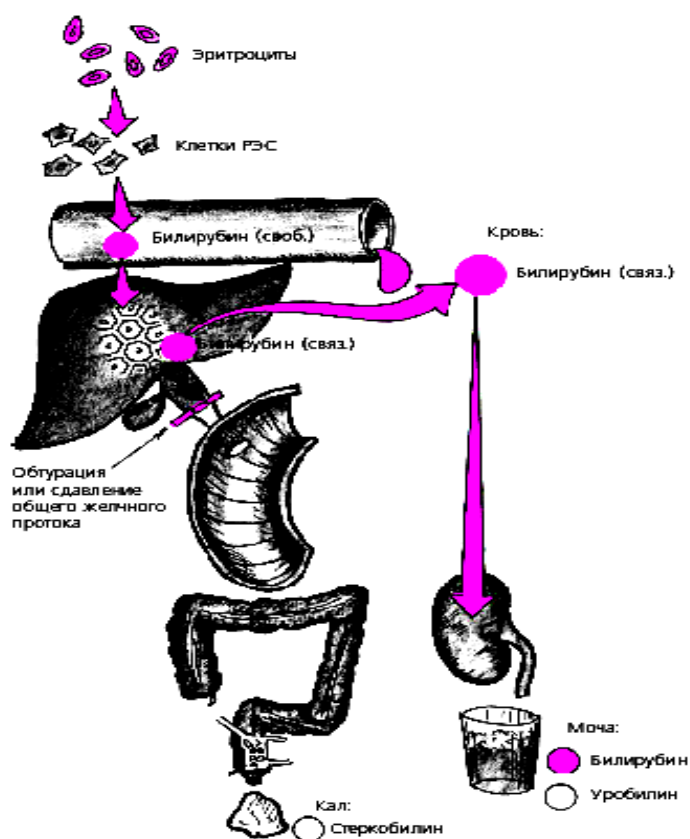


Рис. 22. Изменение обмена желчных пигментов при механической (обтурационной) желтухе.

При гемолитической (надпечёночной) желтухе (рис. 23) происходит образование в клетках РЭС избыточного количества свободного (непрямого) билирубина, который не успевает полностью метаболизироваться в печени, хотя функция гепатоцитов не нарушена, и они работают с повышенной нагрузкой. В результате в крови увеличивается содержание *свободного (непрямого) билирубина*, который не проходит почечный барьер и не попадает в мочу. Поскольку количество *связанного (прямого) билирубина*, выделяемого печенью в кишечник (и, соответственно, *стеркобилиногена*) также существенно увеличивается, в моче значительно повышен уровень *стеркобилиногена (уробилина)*, попадающего в общий кровоток через геморроидальные вены.

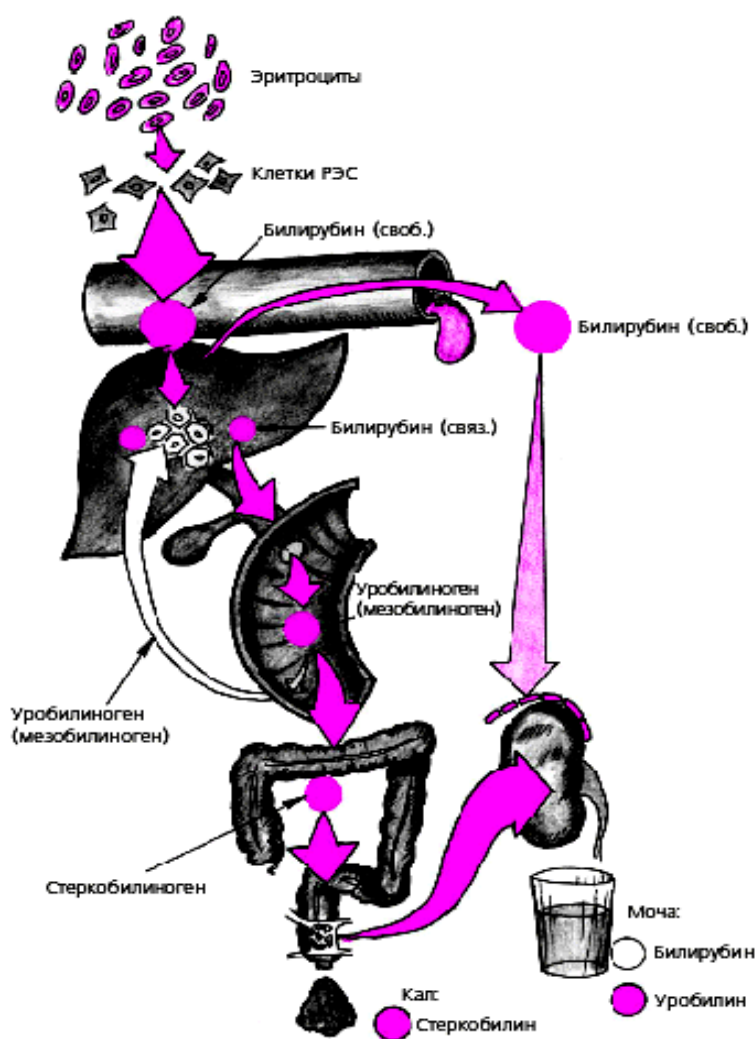


Рис.23. Изменение обмена желчных пигментов при гемолитической желтухе.

**Желтуха новорожденных (физиологическая желтуха).** Она возникает у 86% новорожденных в первую неделю после рождения. Желтуха новорожденных проявляется в повышении концентрации свободного билирубина в крови. Ее появление обусловлено тем, что на этом этапе постнатального развития в печени ребенка очень интенсивно происходят процессы обезвреживания стероидных гормонов, суть которых сводится к их конъюгации с УДФ-глюкуроновой кислотой. В результате этого, в печени возникают конкурентные взаимоотношения между стероидами и свободным билирубином за УДФ-глюкуроновую кислоту, как общий субстрат конъюгации.

В норме процесс конъюгации стероидных гормонов в печени у детей заканчивается к 5 дню жизни. В это время повышается скорость конъюгации билирубина и к 11 дню после рождения желтуха полностью исчезает. У недоношенных детей ее продолжительность может возрастать и достигать 1 – 1,5 месяцев.

Основные лабораторные признаки паренхиматозной, механической и гемолитической желтух представлены в таблице 2.

Таблица 2. Изменение показателей желчных пигментов в крови, моче и кале при различных типах желтух

Лабораторные признаки	Виды желтух		
	Паренхиматозная	Механическая	Гемолитическая
Билирубин в крови	Прямой и непрямой повышены	Прямой повышен	Непрямой повышен
Билирубин в моче	Имеется	Имеется	Отсутствует
Уробилин в моче	Имеется (мезобилиноген)	Отсутствует	Имеется (стеркобилиноген)
Стеркобилин в кале	Имеется, но может быть снижен	Отсутствует	Имеется

Следует иметь в виду, что нередко в клинической практике характер нарушений пигментного обмена может существенно отличаться от

приведенных выше стандартных лабораторных критериев различных видов желтух.

Так, при тяжелом поражении паренхимы печени, особенно в сочетании с выраженным холестазом, резко уменьшается выделение связанного (прямого) билирубина в кишечник и, соответственно, образование метаболитов билирубина (мезобилиногена, стеркобилиногена). Это приводит к значительному уменьшению содержания стеркобилина в кале (ахоличный кал) и уробилина в моче, что, наряду с резким возрастанием в крови уровня связанного билирубина, может напоминать нарушения пигментного обмена, характерные для механической желтухи.

Такая ситуация нередко возникает при остром вирусном гепатите (болезни Боткина) и других заболеваниях. Характерно, что, по мере восстановления функции печени и купирования холестаза, в моче у таких больных появляется уробилин, а в кале – стеркобилин. Соответственно выравниваются показатели связанного и несвязанного билирубина в крови.

Нередко, при относительно длительном течении заболеваний, сопровождающихся закупоркой желчного протока и развитием механической желтухи (желчнокаменная болезнь, рак головки поджелудочной железы), вторично поражается паренхима печени, что приводит к частичному нарушению захватывания и связывания непрямого билирубина и к повышению его содержания в сыворотке крови. Одновременно изменяются и другие лабораторные показатели, свойственные поражению паренхимы печени.

Особыми вариантами нарушения пигментного обмена являются так называемые **функциональные гипербилирубинемии (пигментные гепатозы)** – энзимопатии, связанные с наследственными нарушениями обмена билирубина, проявляющиеся хронической или перемежающейся желтухой без выраженного первичного изменения структуры и функции печени, без явных признаков гемолиза и холестаза. К ним относят:

- синдром Криглера-Найяра 1 и 2 типов;

- синдром Жильбера;
- синдром Мейленграхта;
- синдром Дубина-Джонсона;
- синдром Ротора;

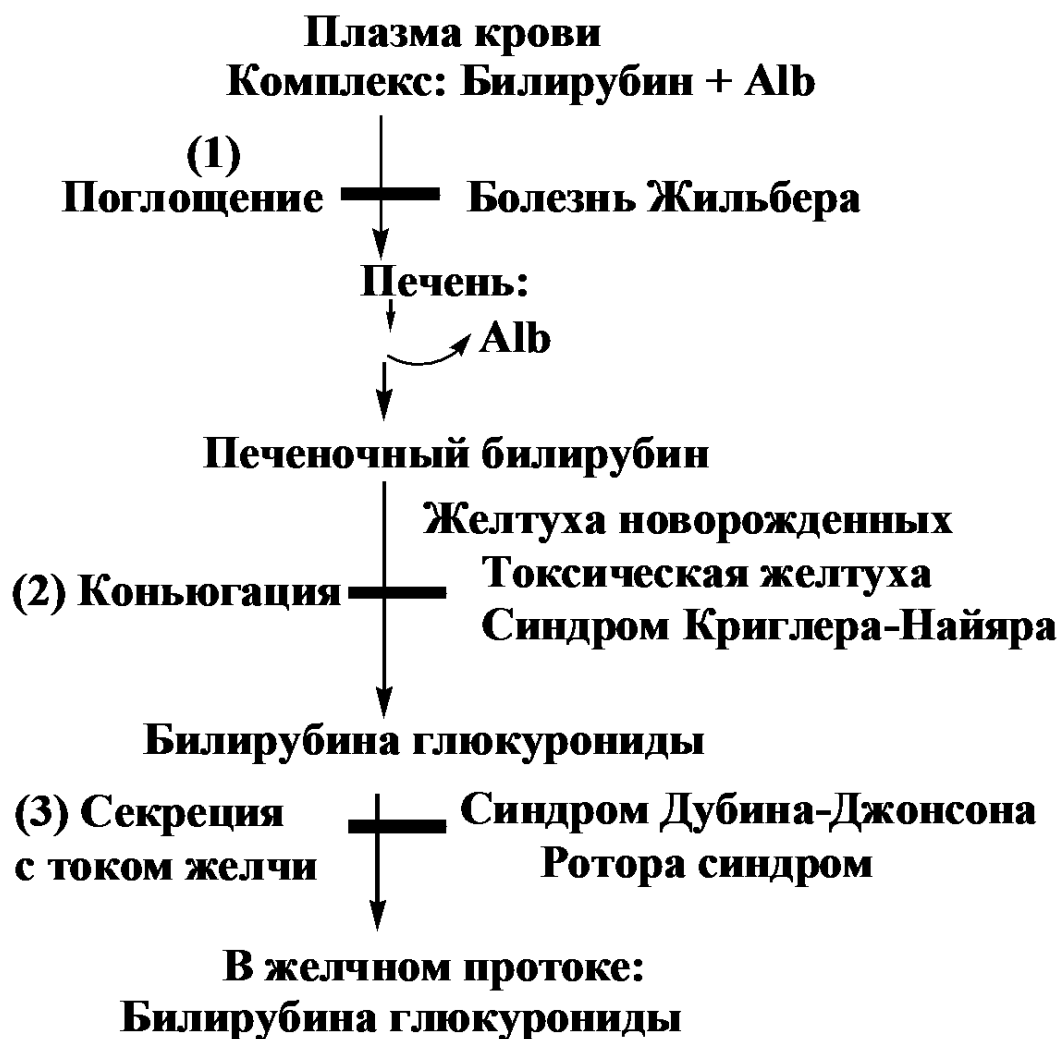


Схема 6. Генетические нарушения, обусловленные дефектами белков и ферментов, обеспечивающих поглощение непрямого билирубина клетками Купфера (1); конъюгацию билирубина УДФ-глюкуроновой кислотой (2) и секрецию прямого билирубина в желчный проток (3).

Нарушение обмена желчных пигментов при функциональных гипербилирубинемиях обусловлено генетическими дефектами ферментативных и белковых систем (схема б), обеспечивающих:

- **конъюгацию билирубина** УДФ-глюкуроновой кислотой – снижена (*синдромы Мейленграхта, Жильбера*) или отсутствует активность УДФ-глюкуронилтрансферазы (*синдром Криглера-Найяра*);

- **захват свободного билирубина** из кровотока (недостаточность специфической транслоказы), **его транспорт** (дефицит Y- и Z-протеинов-лигандов фермента глутатион-S-трансферазы, отвечающих за перенос билирубина к микросомам) и **конъюгацию** (недостаточность УДФ-глюкуронилтрансферазы) – *синдром Жильбера*;

- **секрецию связанного билирубина** в желчные протоки – несостоятельность АТФ-зависимой транспортной системы гепатоцитов (*синдром Дубина-Джонсона, Ротора*);

- **захват и секрецию связанного билирубина** (*синдром Ротора*);

Нарушение поглощения свободного билирубина и/или его конъюгации проявляется клиническими симптомами, напоминающими картину гемолитической желтухи, а нарушение секреции связанного билирубина по клиническим симптомам напоминает картину обтурации желчных протоков.

Кроме того, к функциональным гипербилирубинемиям также относят:

- синдром Люси-Дрисколл;
- синдром Аагенеса;
- синдром Байлера;
- первичную гипербилирубинемия.

**Синдром Люси-Дрисколл** – редкий вариант наследственной гипербилирубинемии, манифестирующийся в первые дни жизни у детей, находящихся на грудном вскармливании. Развивается выраженная гипербилирубинемия, возможна билирубиновая энцефалопатия. Нарушение конъюгации билирубина обусловлено наличием в молоке матери



*ингибитора УДФ-глюкуронилтрансферазы*, поэтому прекращение грудного вскармливания приводит к выздоровлению.

**Синдром Аагенеса** (норвежский холестаза) – нарушение пигментного обмена вследствие *гипоплазии лимфатических сосудов печени* и развития *холестаза*. Манифестация (перемежающаяся желтуха, которая сопровождается дефицитом витамина Е; из-за него возникают дегенеративные изменения ЦНС) обычно наступает в неонатальном периоде с возможными рецидивами у взрослых.

**Синдром Байлера** (злокачественный семейный холестаза) – крайне редкий вариант генетически обусловленной гипербилирубинемии из-за выраженного *перипортального фиброза, пролиферации желчных протоков* и *холестаза*. Заболевание развивается на первой неделе жизни ребенка и протекает с тяжелой желтухой (прямой билирубин в крови до 300 мкмоль/л), гепато- и спленомегалией. Прогноз неблагоприятный.

**Первичная гипербилирубинемия** – очень редкое заболевание, связанное с избыточным образованием билирубина в костном мозге вследствие преждевременного разрушения в нём незрелых предшественников эритроцитов (*неэффективный эритропоэз*). В периферической крови разрушение эритроцитов происходит с обычной скоростью.

ТЕСТЫ ДЛЯ ПРОВЕРКИ УСВОЕНИЯ  
ИНФОРМАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

1. Укажите белок, который не относится к классу гемопротеинов:
  - A. Миоглобин
  - B. Трансферрин
  - C. Гемоглобин
  - D. Потопорфирин
  - E. Каталаза
  
2. Принадлежность к классу белков «гемопротеины» определяется наличием в структуре молекулы белка:
  - A. Гема
  - B. Пиррольных колец
  - C. Протопорфирина IX
  - D. Альфа-полипептидных цепей
  - E. Бета-полипептидных цепей
  
3. Гемопроtein, участвующий в образовании кислорода и воды из перекиси водорода, имеет название:
  - A. Миоглобин
  - B. Трансферрин
  - C. Гемоглобин
  - D. Протопорфирин
  - E. Каталаза
  
4. Концентрация гемоглобина в эритроцитах крови зависит от обеспеченности организма витаминами:
  - A. B12
  - B. B9
  - C. B6

D. C

E. Все указанные в перечне

5. Больная 35 лет поступила в клинику с желтушностью кожи и склер. При лабораторном обследовании в крови найдено: общий билирубин – 99,5 мкмоль/л, свободный билирубин – 60,4 мкмоль/л, АлАТ – 3,6 ммоль/ч·л, тимоловая проба – 20 ед. В моче обнаружен билирубин. Предположительный диагноз больной:

- A. Гемолитическая желтуха
- B. Физиологическая желтуха
- C. Инфекционный гепатит, осложнённый обтурационной желтухой
- D. Жировая инфильтрация печени
- E. Сепсис

6. При лабораторном исследовании у пациента в сыворотке крови обнаружено: содержание общего билирубина – 180,2 мкмоль/л, концентрация неконъюгированного – 162,6 мкмоль/л. АлАТ в пределах нормы. Это наиболее характерно для:

- A. Синдрома Жильбера
- B. Хронического гепатита С
- C. Гемолитической желтухи, сопровождающей серповидно-клеточную анемию
- D. Физиологической желтухи
- E. Обтурационной желтухи.

7. В группе детей, которые ели сладкий сочный арбуз, у двоих появились признаки отравления: резкая слабость, головокружение, головная боль, рвота, одышка, тахикардия, синюшность губ, ушей, кончиков пальцев. Лабораторный анализ арбуза показал высокое содержание нитратов. Какой ведущий

механизм в патогенезе отравления только у двух детей?

- A. Блокада цитохромоксидазы
- B. Недостаточность супероксиддисмутазы
- C. Недостаточность мет-Hb-редуктазы
- D. Недостаточность глутатион-пероксидазы
- E. Недостаточность каталазы

8. В приемное отделение доставлен ребенок 1,5 лет с признаками отравления нитратами: стойкий цианоз, одышка, судороги. Какой патогенетический механизм лежит в основе этих симптомов?

- A. Образование метгемоглобина
- B. Образование оксигемоглобина
- C. Образование карбгемоглобина
- D. Образование карбоксигемоглобина
- E. Образование редуцированного гемоглобина

9. 52-летнюю пациентку на протяжении последних нескольких дней беспокоят приступы боли в правом подреберье после приема жирной пищи. Визуально определяется пожелтение склер и кожи, ахолический кал, моча "цвета пива". Присутствие какого вещества в моче пациентки обусловило темный цвет мочи при обтурационной желтухе?

- A. Кетоновых тел
- B. Глюкозы
- C. Стеркобилина
- D. Уробилина
- E. Билирубинглюкуронидов

10. У больного отмечается повышенная чувствительность кожи к солнечному свету. Его моча при длительном стоянии приобретает темно-красный цвет. Какая наиболее вероятная причина этого состояния?

- A. Порфирия
- B. Алкаптонурия
- C. Альбинизм
- D. Пеллагра
- E. Гемолитическая желтуха

11. После ремонта автомобиля в гаражном помещении водитель поступил в больницу с симптомами отравления выхлопными газами. Содержание какого вещества в крови будет повышено?

- A. Карбоскигемоглобин
- B. Карбгемоглобин
- C. Гликозилированный гемоглобин
- D. Оксигемоглобин
- E. Метгемоглобин

12. Употребление пациентом в течение длительного времени загрязненных овощей и фруктов привело к отравлению нитратами. Какое производное гемоглобина образовалось в крови данного больного?

- A. Hb CN
- B. Hb-OH
- C. Hb O<sub>2</sub>
- D. Hb CO
- E. Hb NHCOOH

13. У больного, страдающего врожденной эритропоэтической порфирией, отмечена светочувствительность кожи. Накоплением какого соединения в клетках кожи это обусловлено?

- A. Гем
- B. Уропорфириноген I
- C. Уропорфириноген II

D. Протопорфирин

E. Копропорфириноген III

14. При исследовании первичной структуры глобина обнаружена замена Глу(6) на Вал(6) в бета-цепях с N-конца. Для какой наследственной патологии это характерно?

A. Талассемия

B. Болезнь Минковского-Шоффара

C. Серповидноклеточная анемия

D. Гемоглобиноз

E. Фавизм

15. Больной 20-ти лет жалуется на общую слабость, головокружение, быструю утомляемость. В крови: Hb – 80 г/л. Микроскопический анализ: эритроциты измененной формы. Причиной этого состояния может быть:

A. Серповидноклеточная анемия

B. Острая перемежающаяся порфирия

C. Болезнь Аддисона

D. Перенхиматозная желтуха

E. Обтурационная желтуха

16. У пациента, обратившегося к врачу, наблюдается желтая окраска кожи, моча темная, кал темно-желтого цвета. Повышение концентрации какого вещества будет наблюдаться в сыворотке крови?

A. Мезобилирубин

B. Конъюгированный билирубин

C. Биливердин

D. Свободный билирубин

E. Вердоглобин

17. Человек болен сахарным диабетом, что сопровождается гипергликемией натощак более 7,2 ммоль/л. Уровень какого белка плазмы крови позволяет ретроспективно (за предыдущие 4-8 недель до обследования) оценить уровень гликемии?

- A. Гликозилированный гемоглобин
- B. Церулоплазмин
- C. С-реактивный белок
- D. Фибриноген
- E. Альбумин

18. Больная 48-ми лет поступила в клинику с жалобами на слабость, раздражительность, нарушение сна. Объективно: кожа и склеры желтого цвета. В крови повышено содержание общего билирубина с преобладанием прямого. Кал ахолический. Моча темного цвета. Какая желтуха наблюдается у больной?

- A. Синдром Жильбера
- B. Синдром Криглера – Найяра
- C. Гемолитическая
- D. Паренхиматозная
- E. Механическая

19. Мать обратилась к врачу по поводу того, что у ребенка 5-ти лет под действием солнечных лучей на коже появляются эритемы, везикулярная сыпь, кожный зуд. Лабораторные исследования обнаружили уменьшение содержания железа в сыворотке крови, увеличение выделения с мочой уропорфириногена I. Наиболее вероятной наследственной патологией у ребенка является:

- A. Копропорфирия
- B. Эритропоэтическая порфирия
- C. Печёночная порфирия

- D. Метгемоглобинемия
- E. Интермиттирующая порфирия

20. У больного 42-х лет появилась желтушность кожи, склер и слизистых оболочек. В плазме крови повышен уровень общего билирубина, в кале повышен стеркобилин, а в моче – уробилин увеличен. Какой вид желтухи у больного?

- A. Обтурационная
- B. Холестатическая
- C. Болезнь Жильбера
- D. Гемолитическая
- E. Паренхиматозная

21. Для лечения желтух показано назначение барбитуратов, которые индуцируют синтез УДФ – глюкуронилтрансферазы. Лечебный эффект при этом обусловлен образованием:

- A. Протопорфилина
- B. Биливердина
- C. Гема
- D. Непрямого ( неконъюгированого ) билирубина
- E. Прямого ( конъюгированого ) билирубина

22. У больного желтухой в крови повышенное содержание прямого билирубина и желчных кислот. В моче отсутствует стеркобилиноген. При какой желтухе возможно наличие этих признаков?

- A. Печеночная
- B. Гемолитическая
- C. Надпеченочная
- D. Паренхиматозная
- E. Механическая



23. Больной поступил в клинику с жалобами на общую слабость, нарушение сна. Кожа имеет жёлтый цвет. В крови: увеличено количество прямого билирубина, желчных кислот, кал ахоличный. Для какого состояния характерны эти изменения?

- A. Синдром Жильбера
- B. Хронический холецистит
- C. Механическая желтуха
- D. Надпочечная желтуха
- E. Гемолитическая желтуха

24. У больного с желтухой установлено: повышение в плазме крови содержания общего билирубина за счёт непрямого (свободного), в кале и в моче - высокое содержание стеркобилина, уровень прямого (связанного) билирубина в плазме крови в пределах нормы. О каком виде желтухи можно думать?

- A. Механическая
- B. Желтуха новорожденных
- C. Болезнь Жильбера
- D. Паренхиматозная
- E. Гемолитическая

25. Пациент 33 года, болеет 10 лет. Периодически обращается к врачу с жалобами на острые боли в животе, судороги, нарушение зрения. У его родственников наблюдаются подобные симптомы. Моча красного цвета. Госпитализирован с диагнозом - острая перемежающаяся порфирия. Причиной заболевания может быть нарушение биосинтеза такого вещества:

- A. Простагландины
- B. Инсулин
- C. Желчные кислоты

D. Коллаген

E. Гем

26. В 70-е годы 20-го века ученые установили, что причина тяжелой желтухи новорожденных является нарушение связывания билирубина в гепатоцитах. Какое вещество используется для образования конъюгата билирубина?

A. Мочевая кислота

B. Серная кислота

C. УДФ-глюкуроновая кислота

D. Пировиноградная кислота

E. Молочная кислота

27. У недоношенного младенца наблюдается желтуха. С недостатком у него какого фермента это связано?

A. Кислая фосфатаза

B. Каталаза

C. НАД<sup>+</sup> - дегидрогеназа

D. Щелочная фосфатаза

E. УДФ – трансглюкуронидаза

28. У больного 20-ти лет с желтухой установлено: повышение в плазме крови содержания общего билирубина за счет непрямого (свободного), в кале и моче – высокое содержание стеркобилина, уровень прямого (связанного) в плазме крови в пределах нормы. О каком виде желтухе можно подумать?

A. Механическая

B. Паренхиматозная (печеночная)

C. Желтуха новорожденных

D. Болезнь Жильбера

E. Гемолитическая

29. Мужчина 53-х лет обратился с жалобами на острую боль в правом подреберье. При осмотре врач обратил внимание на пожелтевшие склеры. Лабораторные анализы показали повышенную активность АЛТ и отрицательную реакцию на стеркобилин в кале. Для какого заболевания характерны такие симптомы?

- A. Хронический гастрит
- B. Гемолитическая желтуха
- C. Хронический колит
- D. Гепатит
- E. Желчекаменная болезнь

30. При дефиците феррохелатазы в крови больного увеличивается содержание:

- A. Протопорфирина IX
- B. Копропорфириногена
- C. Уропорфириногена I
- D. Сукцинил-КоА
- E. Глицина

31. Дефицит витамина В6 в организме человека приводит к развитию анемии, потому что:

- A. Снижается активность трансаминаз
- B. Снижается скорость эритропоэза
- C. Снижается секреция эритропоэтина
- D. Снижается активность дельта-аминолевулинатсинтазы
- E. Уменьшается концентрация субстратов синтеза гема

32. Положительная качественная реакция на уробилин в моче пациента может свидетельствовать о (об):

- A. Выходе в общий кровоток уробилиногена при поражении паренхимы печени
- B. Увеличенном образовании стеркобилиногена (при усиленном гемолизе) в кишечнике
- C. Закупорке желчных протоков
- D. Нарушении захвата неконъюгированного билирубина печенью
- E. Возможны причины A и B

33. Определение билирубина в моче проводится качественными реакциями:

- A. Розина
- B. Готфрида
- C. Фуше
- D. Криглера
- E. Используют реакции A, B, C

34. В норме в сыворотке крови содержится 8,5–20,5 мкмоль/л общего билирубина, причем на долю свободного («непрямого») билирубина приходится около 75% билирубина. У больного содержание прямого билирубина 12,5 мкмоль/л, общий билирубин в пределах нормы. Желтуха не наблюдается. Врач предполагает развитие у больного незначительного поражения:

- A. Паренхимы печени
- B. Системы захвата неконъюгированного билирубина
- C. Ферментативной системы конъюгации
- D. Белоксинтезирующей системы печени
- E. Любого из предложенных

35. Нарушение секреции связанного билирубина в желчные протоки, обусловленное несостоятельностью АТФ-зависимой транспортной системы гепатоцитов носит название:

- A. Синдром Дубина-Джонсона
- B. Синдром Жильбера
- C. Синдром Криглера-Найяра
- D. Синдром Байлера
- E. Синдром Аагенеса

36. Назовите индекс плазмы крови, содержание которого увеличивается главным образом при гемолитической анемии у пациента:

- A. Свободный билирубин
- B. Конъюгированный билирубин
- C. Мочевина
- D. Мочевая кислота
- E. Свободные аминокислоты

37. У пациентов с обтурационной желтухой в моче отсутствует данный желчный пигмент:

- A. Конъюгированный билирубин
- B. Гликохолевая кислота
- C. Уробилиноген
- D. Мочевая кислота
- E. Мочевина

38. Индексы билирубина плазмы крови по значениям могут быть абсолютно идентичными в случае печеночной и подпеченочной желтух. Для дифференциальной диагностики типа желтухи с подтверждением поражения паренхимы печени следует провести анализ:

- A. Определение содержания глюкозы в плазме крови

- В. Определение активности АлАТ в сыворотке крови
- С. Определение мочевой кислоты в сыворотке крови
- Д. Содержания глюкозы в моче
- Е. Определение кетоновых тел в моче

39. Синтез гема регулируется по принципу обратной связи. Выберите ингибитор ключевого фермента синтеза дельта-аминолевулинатсинтазы:

- А. Копропорфирин
- В. Порфобилиноген
- С. Протопорфирин IX
- Д. Витамин С
- Е. Гем

40. Нарушение обеспечения клеток периферических тканей кислородом за счет функции оксигемоглобина может быть обусловлено:

- А. Эффектом Бора
- В. Присутствием 2,3-дифосфоглицерата
- С. Низким  $pO_2$  в крови и высоким  $pCO_2$  клетке ткани
- Д. Все положения верны
- Е. Любое из положений неверно

41. Выберите вещество, участвующее в синтезе протопорфирина:

- А. Лейцин
- В. Аланин
- С. Пролин
- Д. Гистидин
- Е. Глицин

42. Билирубин образуется в организме человека из:

- А. Альбумина

- В. Глюкозы
- С. Мочевой кислоты
- Д. Стеркобилиногена
- Е. Гемоглобина

43. Образование билирубина из гемоглобина начинается в клетках РЭС при участии фермента:

- А. Гемоксигеназы
- В. Гемредуктазы
- С. Гемизомеразы
- Д. Гемгидролазы
- Е. Гемдегидрогеназы

44. Выберите верное утверждение, касающееся превращения деоксигемоглобина в оксигемоглобин в легких:

- А. Связывание  $O_2$  вызывает выделение  $H^+$
- В. Один моль деоксигемоглобина может присоединить два моля 2,3- дифосфоглицерата
- С. рН крови не влияет на связывание гема с кислородом
- Д. Связывание гемоглобина с кислородом усиливает связывание гема с 2,3- дифосфоглицератом
- Е. Связывание гемоглобина с кислородом вызывает выделение  $H_3PO_4$

45. Порфобилиноген в моче дает розовое окрашивание с реактивом:

- А. Фуше
- В. Бенедикта
- С. Нитропруссидом натрия
- Д. Эрлиха
- Е. Биуретовым

46. Образование гемоглобина С происходит путем точечной замены глутаминовой кислоты (6) с N-конца в бета-цепях на аминокислоту:

- A. Изолейцин
- B. Аланин
- C. Фенилаланин
- D. Лизин
- E. Аспарагин

47. Присутствие билирубина диглюкуронида в моче пациента при отсутствии в ней уробилиногена подтверждает:

- A. Гемолитическую желтуху
- B. Гепатоцеллюлярную желтуху
- C. Обтурационную желтуху
- D. Позиции А, В верны
- E. Позиции В, С верны

48. Структура Протопорфирина IX формируется при соединении четырех пиррольных колец специальным фрагментом:

- A. Гидроксильной группой
- B. Карбоксильной группой
- C. Фосфатной группой
- D. Метиленовым мостиком
- E. Пропиленовым мостиком

49. Укажите показатель плазмы крови, увеличение которого наблюдается при болезни Жильбера:

- A. Уробилиноген
- B. Свободный билирубин
- C. Желчные кислоты
- D. Прямой билирубин



Е. Все указанные показатели

50. Выберите название патологическое состояние, при котором наблюдается увеличение концентрации свободного билирубина преимущественно в плазме крови больного:

- А. Вирусный гепатит
- В. Серповидно-клеточная анемия
- С. Синдром Ротора
- Д. Острый холецистит
- Е. Синдром Криглера-Найяра

ВЕРНЫЕ ОТВЕТЫ К ТЕСТАМ

№ теста	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Верный ответ	В	А	Е	Е	С	А	С	А	Е	А

№ теста	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Верный ответ	А	А	В	С	А	Д	А	Е	В	Д

№ теста	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Верный ответ	Е	А	С	Е	Е	С	Е	Е	Е	А

№ теста	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Верный ответ	Д	Е	Е	А	А	А	С	В	Е	Д

№ теста	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Верный ответ	Е	Е	А	А	Д	Д	С	Д	В	В

## ЛИТЕРАТУРА

1. Біохімія: підручник/ за загальною редакцією проф. А.Л.Загайко, проф. К.В. Александрової.- Х.: Вид-во «Форт», 2014.-728с.
2. Губський Ю. І. Біологічна хімія. — Київ — Тернопіль: Укрмедкнига, 2000.— 508 с.
3. Біологічна хімія: підруч. [для студ. вищ. навч. закл./ Л.М. Вороніна, В.Ф. Десенко, Н.М. Мадієвська та ін.. – Харків: Основа, 2000.- 678с.
4. Мардашко О.О., Ясиненко Н.Є. Біологічна та біоорганічна хімія: навч. посібник [для студ. вищ. навч. закл.]- Одеса, Одес. Держ. Мед. ун-т, 2008.- 342 с.
5. Біологічна хімія з біохімічними методами дослідження: підруч. [для студ. вищ. навч. закл./ О.Я. Склярів, Н.В. Фартушок, Л.Д. Сойка, І.С. Смачило.- К.: Медицина, 2009.-352 с.
6. Давыдов В. В., Божков А. И. Основы биохимии. – Харьков: Федорко, 2008. – 296 с.
7. Давыдов В. В., Швец В. Н. Руководство по практическим занятиям по биологической химии. – Х.: ХНУ имени Каразина, 2011. - 316 с.
8. Практикум з біологічної хімії. За ред. О.Я. Склярова.-К.: Здоров'я, 2002.- 298с.
9. Лабораторні та семінарські заняття з біологічної хімії./ Л.М. Вороніна та ін.- Х.: Вид-во НфаУ; Оригінал, 2004.-384с.
- 10.** Николаев А. Я. Биологическая химия. — М.: Мед. информац. агентство, 1998. —496с.
- 11.** А.Ш.Бышевский, О.А. Терсенов. Биохимия для врача.-Екатеринбург: Уральский рабочий.-1994.- **383с**
- 12.Боечко Л. Ф., Боечко Л. О. Основні біохімічні поняття, визначення та терміни: Навч. посібник. — К.: Вища шк., 1993. — 528 с.
- 13.Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини. Підручник .-Тернопіль: Укрмедкнига, 2002.-744 с.
- 14.Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.. Биологическая химия. – М.: Медицина,

1998.- 704с.

15.Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. Под редакцией Е.С. Северина, А.Я. Николаева. М.:ГЭОТАР - Мед., 2001.- 448 с.

16.Марри Р., Греннер Д., Мейес Л., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т. — М.:Мир, 1993. —т. 1—381 с.;т.2 —414с.

17.Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология.- М.: Издат НИИ Биомедхимия. РАМН, 1999. - 373 с.

18.Davidson V.L., Sittman D.B. Biochemistry. USA: Harwal Publishing. -1994. – 584 p

19.Lehninger. A. Principles of Biochemistry, fourth edition, 2000.(CD disk).– 1118 p.

20.Lieberman Michael; Marks Allan; Smith Colleen. Marks' Essential Medical Biochemistry, 2nd Edition. - Lippincott Williams & Wilkins. – 2007. – 540 p.

21.Morse E. // Ann. clin. Lab. Sci.— 1990.— Vol. 20.— P. 169—174.—Vol. 16.—P.94—100.

22.Robert K. Murray at all, Harper's Biochemistry. – Appleton & Lange, 1996.- 868с.

23.Stryer L. Biochemistry. W.H. Freeman & Company, N.Y., 1995 - 1064 p

24.Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. – 3rd ed. - Kolkata:Books and Allied, India. – 2006. – 792 p

25.Smith Colleen, Marks Allan, Lieberman Michael. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, 2nd Ed. - Lippincott Williams & Wilkins.,2002.- 920 p

26.William J Marshall, Stephen K Bangert. Clinical Chemistry. Fifth edition. – China:"Mosby". -2004. – 422 p.