

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Практикум

Издание третье, исправленное и дополненное



Минск 2007

УДК 577.1 (075.8)
ББК 28.072 я 73
Б 63

Утверждено Научно-методическим советом университета
в качестве практикума 25.04.2007 г., протокол № 8

Авторы: проф. А. Д. Таганович; проф. В. К. Кухта; проф. Т. С. Морозкина;
доц. Э. И. Олецкий; доц. А. В. Колб; доц. Т. В. Василькова; доц. Ж. А. Рутковская;
ст. преп. Л. П. Лисицына; доц. И. Л. Котович; ассист. Н. И. Гронская; ассист. З. И. Полякова;
асп. А. С. Смирнов

Рецензенты: проф. Е. В. Барковский; доц. О. Н. Ринейская

Биологическая химия : практикум / А. Д. Таганович [и др.]. 3-е изд., испр. и доп.–
Б 63 Минск: БГМУ, 2007. – 170 с.

Изложены рекомендации по подготовке ко всем темам лабораторно-практических занятий по биологической химии. По каждой теме даны: цель занятия, литература для подготовки, вопросы для обсуждения, тестовые задания, описание лабораторных работ, протоколы их выполнения. Исправлены и дополнены вопросы к итоговым контрольным занятиям. С учетом лекционного курса внесена коррекция в последовательность тем, изучаемых в разделе «Обмен липидов». Первое издание выпущено в 2005 году.

Предназначено для студентов 2-го курса лечебного, педиатрического, медико-профилактического и военно-медицинского факультетов, медицинского факультета иностранных учащихся.

УДК 577.1 (075.8)
ББК 28.072 я 73

© Оформление. Белорусский государственный
медицинский университет, 2007

Учебное издание

*Таганович Анатолий Дмитриевич
Кухта Виктор Климентьевич
Морозкина Татьяна Сергеевна и др.*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Практикум

Издание третье исправленное, дополненное

Ответственный за выпуск А. Д. Таганович
В авторской редакции

Подписано в печать 26.04.07. Формат 60×84/8. Бумага писчая «Снегурочка».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 19,76. Уч.-изд. л. 16,1. Тираж 920 экз. Заказ 427.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусский государственный медицинский университет

ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.

220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 6.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение в практикум. Введение в биохимию. Строение аминокислот и пептидов. Количественное определение содержания белка в биологических жидкостях (А.В. Колб).....	5
2. Строение и функции белков. Гидролиз простого белка (Э.И. Олецкий).....	9
3. Пространственная структура белков. Физико-химические свойства белков. Механизмы осаждения белков (Ж.А. Рутковская).....	14
4. Методы разделения, выделения и очистки белков. Сложные белки (Ж.А. Рутковская).....	20
5. Ферменты. Классификация, строение, свойства (А.В. Колб).....	25
6. Регуляция действия ферментов. Количественное определение активности ферментов (А.В. Колб).....	30
7. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам «Химия белков, ферменты».....	36
8. Введение в метаболизм. Центральные метаболические пути (окислительное декарбоксилирование ПВК, лимоннокислый цикл Кребса) (Л.П. Лисицына).....	37
9. Биологическое окисление. Пути утилизации кислорода клетками. Окислительное фосфорилирование (Л.П. Лисицына).....	43
10. Переваривание углеводов. Гликогенез и гликогенолиз. Гликолиз и спиртовое брожение (З.И. Полякова).....	50
11. Пути метаболизма пирувата. Глюконеогенез. Аэробный распад глюкозы до конечных продуктов (CO ₂ и H ₂ O). Количественное определение глюкозы в крови (З.И. Полякова).....	54
12. Вторичные пути обмена глюкозы. Метаболизм галактозы, фруктозы, этанола. Влияние гормонов на уровень глюкозы в крови (И.Л. Котович).....	59
13. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам «Введение в метаболизм. Центральные метаболические пути. Биологическое окисление. Окислительное фосфорилирование. Обмен углеводов».....	65
14. Обмен липидов: переваривание, всасывание и ресинтез. Транспорт экзогенных липидов. Количественное определение активности липаз (И.Л. Котович).....	67
15. Транспорт липидов кровью. Обмен холестерина. Депонирование и мобилизация липидов. Количественное определение β-липопротеинов (А.С. Смирнов).....	73
16. Внутриклеточный обмен жирных кислот. Кетоновые тела. Количественное определение холестерина в сыворотке крови (А.С. Смирнов).....	77
17. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по теме «Обмен липидов».....	83
18. Контроль практических навыков биохимического анализа (Н.И. Гронская).....	85
19. Переваривание и всасывание белков. Анализ желудочного сока (В.К. Кухта).....	87
20. Внутриклеточный обмен аминокислот. Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови (В.К. Кухта).....	92
21. Обезвреживание аммиака. Количественное определение остаточного азота крови и мочевины в моче. Патологии аминокислотного обмена (Л.П. Лисицына).....	96
22. Химия и обмен нуклеопротеинов. Определение содержания мочевой кислоты и общего азота в моче (Л.П. Лисицына).....	101
23. Матричные биосинтезы (синтез ДНК, РНК, белков) (Семинар) (Э.И. Олецкий).....	106
24. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам «Обмен простых белков и нуклеопротеинов. Биосинтез ДНК, РНК и белка».....	111
25. Гормоны. Общая характеристика и особенности биологического действия гормонов. Качественные реакции на гормоны (Т.С. Морозкина).....	113
26. Биохимия гормонов. Тест на толерантность к глюкозе (Т.С. Морозкина).....	119
27. Физико-химические свойства крови. Гемоглобинозы (Т.В. Василькова).....	125
28. Белки плазмы крови. Система свертывания крови (Т.В. Василькова).....	131
29. Биохимия печени (А.В. Колб).....	137

30. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам «Гормоны, биохимия печени, биохимия крови».....	145
31. Биохимия мочи. Физиологические и патологические составные части мочи (Т.С. Морозкина).....	146
32. Биохимия питания. Роль белков, жиров, углеводов и витаминов (А.Д. Таганович, Н.И. Гронская).....	153
33. Биохимия питания. Минеральные вещества. Регуляция водно-электролитного баланса. Интеграция метаболизма (Т.С. Морозкина, А.Д. Таганович).....	160
34. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам «Биохимия питания, биохимия мочи. Интеграция метаболизма».....	167
35. Контроль практических навыков биохимического анализа. Анализ желудочного сока и мочи (Н.И. Гронская).....	169

1. Введение в практикум. Введение в биохимию. Строение аминокислот и пептидов. Количественное определение содержания белка в биологических жидкостях

Актуальность темы

Аминокислоты после всасывания используются в организме для синтеза специфических тканевых белков, ферментов, гормонов, гема, биогенных аминов, пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований. В печени из аминокислот синтезируются белки плазмы крови. Методы количественного определения белка в биологических жидкостях (растворах) широко используются в медицинской практике. Количественное определение содержания белка в сыворотке (плазме) крови проводят для диагностики целого ряда заболеваний.

Цель занятия

Изучить строение и физико-химические свойства аминокислот как структурных единиц белков и пептидов и усвоить общие принципы определения содержания белка в биологических жидкостях.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– *общей химии:*

- правила работы в химических лабораториях;

– *биоорганической химии:*

- аминокислотный состав белков;
- строение аминокислот, номенклатура;
- классификация и общие свойства аминокислот;
- пептиды, электронное и пространственное строение пептидной связи;
- классификация и функции белков;

– *медицинской и биологической физики:*

- закон Бугера–Ламберта–Бера;
- устройство и принцип работы фотоэлектроколориметра.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Какая из перечисленных аминокислот является нейтральной?

А. Гистидин. Б. Аланин. В. Аспартат. Г. Лизин.

Задание 2. Выберите аминокислоту, которая не обладает оптической активностью:

А. Аланин. Б. Цистеин. В. Глицин. Г. Аргинин.

Задание 3. Назовите аминокислоту, содержащую кольцо индола:

А. Оксализин. Б. Серин. В. Триптофан. Г. Пролин. Д. Гистидин.

Задание 4. Выберите α -аминокислоту:

А. Оксализин. Б. Серин. В. Триптофан. Г. Пролин. Д. Гистидин.

Задание 5. Олигопептид — это соединение, которое содержит:

А. 2 остатка аминокислот. Б. 9 остатков аминокислот.
В. 10 остатков аминокислот. Г. 12 остатков аминокислот.

Задание 6. Белок — это соединение, которое содержит:

А. 15 остатков аминокислот. Б. 28 остатков аминокислот.

В. 49 остатков аминокислот. Г. 120 остатков аминокислот.

Задание 7. Какие функции присущи только белкам?

А. Энергетическая. Б. Каталитическая.

В. Буферная. Г. Структурная.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Предмет, цели и задачи биохимии. Объекты и методы исследований в биохимии.

2. Аминокислоты, классификация. Общие свойства. Формулы протеиногенных аминокислот, номенклатура.

3. Пептиды, строение. Классификация и биологическая роль пептидов.

4. Белки как класс органических веществ, биологические функции. Классификация белков.

5. Методы количественного определения белка (рефрактометрический, нефелометрический, фотоэлектроколориметрический, спектрофотометрический). Принципы определения, сравнительная характеристика методов, их применение в клинике.

6. Общие принципы спектрофотометрии. Молярный коэффициент экстинкции. Построение калибровочного графика и работа с ним.

7. Количественное определение белка биуретовым методом.

Литература для подготовки

1. *Березов Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 13–15, 20–22, 28–37, 63–64.

2. *Николаев А. Я.* Биологическая химия / А. Я. Николаев. М.: Высшая школа, 1989. С. 3–17, 28–30, 41–43.

3. *Конспект лекций.*

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Молекула аминокислоты, находящаяся в изоэлектрической точке:

А. Имеет положительный заряд. Б. Не имеет заряда.

В. Имеет отрицательный заряд.

Задание 2. В изоэлектрической точке белок:

А. Имеет наименьшую растворимость. Б. Является катионом.

В. Является амфионом. Г. Обладает наибольшей степенью ионизации.

Задание 3. В какой среде пептид Ала-Гис-Лиз-Фен будет двигаться к катоду при электрофорезе?

А. Кислой. Б. Нейтральной. В. Щелочной.

Задание 4. Выберите правильные утверждения:

А. Биуретовую реакцию дают все аминокислоты.

Б. Биуретовую реакцию дает биурет.

В. Биуретовую реакцию дают трипептиды.

Г. Биуретовую реакцию дают белки.

Задание 5. Рефрактометрический метод основан на:

А. Определении угла отражения падающего света.

Б. Явлении светорассеяния.

В. Определении коэффициента преломления.

Г. Определении коэффициента экстинкции.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Объясните с точки зрения теории Бренстеда-Лоури и правила Хюккеля, почему гистидин относится к положительно заряженным аминокислотам, а триптофан, аспарагин и глутамин — к нейтральным.

Задание 2. В клинической лаборатории для целей парентерального питания смесь аминокислот (Гли, Ала, Глу, Лиз, Арг, Сер, Асп) разделяют методом электрофореза при $pH = 6,0$. Какие аминокислоты будут двигаться к аноду, какие — к катоду, а какие останутся на месте?

Задание 3. Подобрать к каждому белку соответствующую функцию:

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 1. Коллаген. | А. Структурная. |
| 2. Иммуноглобулин. | Б. Сократительная. |
| 3. Инсулин. | В. Транспортная. |
| 4. Гемоглобин. | Г. Каталитическая. |
| 5. Актин. | Д. Защитная. |
| 6. Кератин. | Е. Гормональная. |
| 7. Родопсин. | Ж. Рецепторная. |
| 8. Альбумин. | З. Токсическая. |

Задание 4. При проведении электрофореза в условиях, где pH буферного раствора выше, чем изоэлектрическая точка белка, последний:

- А. Мигрирует к катоду.
- Б. Мигрирует к аноду.
- В. Остается на линии старта.
- Г. Образует биполярный ион.
- Д. Подвергается гидролизу.

Задание 5. Свойство поглощать световой поток с длиной волны 280 нм при спектрофотометрии обусловлено наличием в белке:

- А. Триптофана.
- Б. Пролина.
- В. Гистидина.
- Г. Тирозина.

Задание 6. В клинику поступил ребенок 3-х лет с пищевым отравлением. Жалобы: диарея, рвота. При биохимическом анализе крови концентрация общего белка — 100 г/л. Данный показатель характеризует:

- А. Абсолютную гиперпротеинемию.
- Б. Нормопротеинемию.
- В. Относительную гипопроотеинемию.
- Г. Относительную гиперпротеинемию.

Эталонные ответы к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1. Б; 2. В; 3. В; 4. Г; 5. А, Б, В; 6. Г; 7. Б.

Для самостоятельной работы:

1. Б; 2. А; 3. А, Б; 4. Б, В, Г; 5. В.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Определение общего белка биуретовым методом

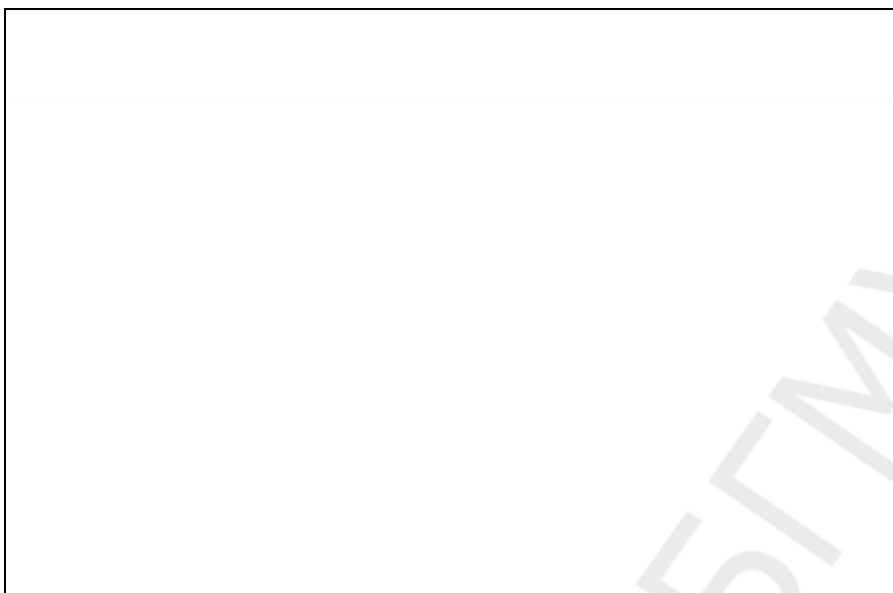
Среди различных методов определения общего белка в сыворотке (плазме) крови наибольшее распространение получили колориметрические методы, а среди них — метод, основанный на биуретовой реакции. Он обладает специфичностью определения, точностью и доступностью. Другой колориметрический метод — метод Лоури — сочетает использование биуретовой реакции и реакции восстановления реактива Фолина циклическими аминокислотами (тирозином, фенилаланином, триптофаном). Хотя этот метод и более чувствителен, но он сложен по приготовлению основного раствора и менее специфичен, т. к. целый ряд других веществ образуют с реактивом Фолина комплексы характерной окраски.

Принцип биуретового метода. Метод основан на образовании окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белка с ионами двухвалентной меди (сульфата меди) в щелочной среде. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации белка в сыворотке и определяется фотометрически.

Порядок выполнения работы. В 1-ю пробирку (опыт) наливают 0,1 мл исследуемой сыворотки, во 2-ю (контроль) — 0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия. В обе пробирки приливают по 5 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок осторожно перемешивают, избегая образования пены, и через 30 мин фотометрируют опытную пробу в кюветах на 10 мм при зеленом светофильтре (длина волны — 540 нм) против контрольного раствора. Определив экстинкцию исследуемого раствора, находят по калибровочному графику, какой концентрации белка (в г/л) она соответствует.

Построение калибровочной кривой. Для построения кривой готовят из основного стандартного раствора белка с концентрацией 100 г/л рабочие растворы альбумина: 20, 40, 60, 80 г/л. Для этого к 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 мл стандартного раствора белка добавляют 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0 мл 0,9% раствора NaCl. Из каждого разведения берут по 0,1 мл раствора и вносят в пробирки, содержащие 5 мл биуретового реактива. Через 30 мин измеряют экстинкцию стандартных проб на ФЭК против контроля. Строят график, откладывая на оси абсцисс значения концентрации стандартных растворов белка (в г/л), на оси ординат — соответствующие им величины оптической плотности.

Клинико-диагностическое значение. Нормальное содержание общего белка в сыворотке крови (нормопротеинемия) у взрослых — 65–85 г/л, у детей до 6 лет — 56–85 г/л. Изменения концентрации общего белка могут быть как абсолютные, так и относительные. Относительные изменения связаны с изменением объема крови (плазмы). Так, относительная гипопропротеинемия (понижение концентрации белка в крови) развивается при гидремии, т. е. нагрузке водой, водном отравлении, а относительная гиперпротеинемия (повышение концентрации белка в крови) возникает при сгущении крови из-за значительных потерь жидкости при поносах, неукротимой рвоте, усиленном потоотделении, холере, ожогах. Абсолютная гипопропротеинемия наблюдается при нефритах, злокачественных опухолях, алиментарной дистрофии. Абсолютная гиперпротеинемия встречается сравнительно редко, например, при миеломной болезни, хронических полиартритах.



Ответ:

Вывод:

Подпись преподавателя:

2. Строение и функции белков. Гидролиз простого белка

Актуальность темы

Гидролиз белков — важный этап в механизмах метаболизма белков в клетке. Гидролиз белковой молекулы перед поступлением ее в организм позволяет обойти возможные созданные природой защитные реакции организма от чужеродных белков. Гидролиз специфического белка, структура которого изменилась под влиянием внешних воздействий, позволяет удалить белок, утративший свою функцию, и использовать повторно его аминокислоты для синтеза других белков. Многие секретируемые белки начинают свою жизнь с гидролитической реакции удаления сигнального пептида на мембранах эндоплазматической сети, а другие - при участии гидролиза переходят в свои активные формы. В аналитических целях гидролиз широко используется при определении аминокислотного состава белков.

Цель занятия

Сформировать представление о первичной структуре белковой молекулы. Познакомить со значением реакций гидролиза белков для процессов жизнедеятельности и в медицинской практике.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **биоорганической химии:**
 - строение аминокислот;
 - свойства пептидной связи;
 - механизм гидролиза.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1.

1.1. Объясните, почему пептидная группа является плоской и жесткой структурой?

1.2. Какие из перечисленных ниже реакций свойственны аминогруппам (1), а какие карбоксильным группам (2) аминокислот?

	-NH ₂ (1)	-COOH(2)
А. Образование солей		
Б. Реакция с 2,4-динитрофторбензолом		
В. Реакция с фенилизотиоцианатом		
Г. Образование эфиров		
Д. Дезаминирование		

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Пептидная связь, свойства (рентгеноструктурный анализ, постулаты Полинга-Кори).
2. Правила написания пептидов (белков), их названия и определения заряда.
3. Этапы и методы исследования аминокислотного состава и аминокислотной последовательности белков и пептидов (методы Сэнджера, Эдмана, Акабори, ферментативные).
4. Сравнительный анализ гомологичных белков (метод Ингрема).
5. Значение реакций гидролиза белка для организма и практическое использование белковых гидролизатов в медицинской практике.

Литература для подготовки

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 16–19, 30–31, 42–50, 60–63.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 9–20, 29–30, 41–43.
3. Конспект лекций.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Вспомните, что в основе полипептидной цепи, построенной из α-аминокислот, лежит постоянно повторяющаяся структура -NH-CH-CO-. Свойства связей, формирующих эту структуру, позволили построить две основные модели расположения ее атомов, названные α-спиралью и β-складчатой структурой. Главное условие стабильности такой структуры — максимум водородных связей, возникающих в ее пределах. Включение иминокислоты пролина в цепь нарушает указанные условия.

- 1.1. Изобразите, как образуются пептидные связи в трипептиде Лиз-Про-Асп. Перечислите свойства пептидной связи. Определите заряд этого пептида.
- 1.2. Объясните, почему в этом пептиде невозможно образование Н-связи, необходимой для стабилизации α-спирали.
- 1.3. В следующем полипептиде выберите:
 - А. Возможные места образования изгибов.
 - Б. Возможные места образования внутрицепочечных ковалентных связей.
 - В. Ряд из трех остатков с боковыми цепями гидрофобной природы.
 - Г. Ряд из шести остатков с боковыми цепями гидрофильной природы.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Иле -	Ала -	Три -	Лей -	Тир -	Фен -	Про -	Фен -	Глу -	Ала -	

Б. Сколько индивидуальных пептидов образуется после такой обработки изображенного фрагмента белка?

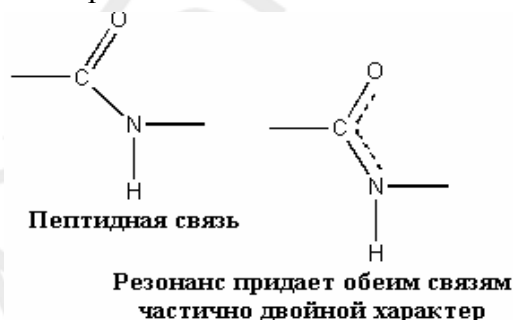
Задание 2. У человека рост волос — относительно медленный процесс, обычно 15–20 см в год. Весь этот рост сконцентрирован у корня волос, где α -нити кератина синтезируются эпидермальными клетками и собираются в фибриллярные структуры. Фундаментальный структурный элемент α -кератина — α -спираль. Так как биосинтез α -спиралей кератина — ограничивающий скорость фактор роста волос, вычислите скорость, с которой должны синтезироваться пептидные связи α -цепей кератина (пептидная связь в секунду), чтобы обеспечить наблюдаемый ежегодный прирост волос.

Задание 3. Пептид ферментативного гидролизата, не передвигающийся в электрическом поле при электрофорезе, дансильировали и выделили дансилпроизводное Лей. Кислотный гидролиз пептида дал три пептида следующего состава: 1) Цис, Асп; 2) Тир, Лей; 3) Тир, Асп, Арг. Напишите формулу пептида, назовите пептид. В какой среде проводили электрофорез исходного гидролизата белка? Почему Вы так решили?

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1.1. Пептидная группа с позиций электронного строения представляет собой трехцентровую p, π -сопряженную структуру, в которой электронная плотность смещена в сторону более электроотрицательного кислорода. Атомы С, О, N, образующие сопряженную структуру, находятся в одной плоскости. Сопряжение выравнивает длины связей. Плоская сопряженная структура затрудняет вращение вокруг связи С-N.



1.2. А – 1, 2; Б – 1; В – 1; Г – 2; Д – 1.

Для самостоятельной работы:

1.3. А. Повороты в области каждого остатка Про — остатки # 7, 19, 28;

Б. Поперечные связи по остаткам цистеина — остатки # 13, 24 могут формировать дисульфидный мостик;

В. Остатки 1–3 гидрофобны;

Г. Остатки 13–18 гидрофильны.

3 – Г.

4 – Б.

5 – (А – 6, 7; Б – 5; В – 1, 3, 5; Г – 2, 4).

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Кислотный гидролиз белка и формоловое титрование по Серенсену

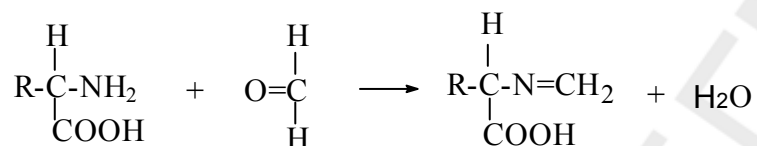
Гидролиз, проводимый в лабораторных условиях, является важным этапом на пути исследования первичной структуры белков. При кислотном гидролизе белки распадаются на высокомолекулярные пептиды, низкомолекулярные пептиды, дипептиды и аминокислоты. Некоторые аминокислоты (триптофан) подвергаются полному разрушению при таком гидролизе, а серин, треонин, цистеин, тирозин, фенилаланин — частичному. Однако процент разрушения этих аминокислот невелик. При щелочном гидролизе белка отмечается значительно более сильное разрушение аминокислот. Поэтому при анализе аминокислотного состава белка используют чистую 6N HCl, которую добавляют к образцу белка, и затем в запаянных ампулах гидролизуют образец при 120°C на протяжении 24, 48 и 72 ч, что необходимо для расчета возможных потерь аминокислот при гидролизе.

Гидролизаты белков (ферментативные или кислотные с добавлением триптофана) применяются в качестве лечебных препаратов для парентерального питания.

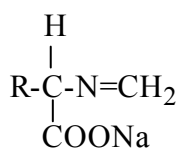
Формоловое титрование

Служит для определения количества карбоксильных групп, которое увеличивается вследствие разрыва пептидных связей в процессе гидролиза. Поскольку в водных растворах аминокислоты образуют внутримолекулярные соли без предварительного блокирования аминогрупп формальдегидом, непосредственно титровать карбоксильные группы аминокислот щелочью невозможно.

Принцип метода. В процессе реакции формальдегид блокирует α -аминогруппу:



Образующееся метиленовое соединение (метилен-аминокислота) оттитровывается щелочью с образованием



Определяя количество карбоксильных групп титрованием, одновременно можно судить и о содержании аминных групп, так как количество титруемых карбоксильных групп эквивалентно количеству связанных формальдегидом аминных групп.

Метод формолового титрования позволяет следить за ходом гидролиза белка и изучить действие протеолитических ферментов. При полном гидролизе белка количество аминных и карбоксильных групп в гидролизате перестает увеличиваться, а биуретовая реакция становится отрицательной (голубое окрашивание).

Порядок выполнения работы

1. Титрование карбоксильных групп в растворе белка до гидролиза. Отмеривают в колбочку 1 мл раствора яичного белка, приливают 5 капель 20% нейтрального раствора формалина и 3 капли 0,5% раствора фенолфталеина. Титруют из микробюретки 0,005н раствором едкого натра до устойчивой бледно-розовой окраски.

2. Титрование карбоксильных групп после гидролиза белка (в гидролизате). Отмеривают в колбочку 1,25 мл гидролизата, добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют, добавляя пипеткой 10% раствор едкого натра до слабо-розовой окраски (щелочь используется для нейтрализации хлористоводородной кислоты, поэтому количество щелочи не учитывается).

Если при нейтрализации окраска делается ярко-красной (много NaOH), то добавляют до обесцвечивания по каплям 1% раствор уксусной кислоты, избыток которой нейтрализуют 1% раствором едкого натра до слабо-розовой окраски. Затем приливают 5 капель 20% нейтрального раствора формалина. Вследствие блокирования аминогрупп формальдегидом и освобождения карбоксильных групп раствор приобретает кислую реакцию и фенолфталеин обесцвечивается. Обесцвеченный раствор титруют 0,005н раствором NaOH до бледно-розового цвета и точно отмечают количество щелочи, затраченной на титрование. Результаты титрования заносят в таблицу. Производят расчет азота аминогрупп по количеству щелочи, затраченной на титрование, исходя из ее нормальности. 1н раствору щелочи соответствует

14 г азота в 1 л или 14 мг в 1 мл, 1 мл 0,005н раствора NaOH соответствует 0,07 мг азота.

3. Открытие промежуточных продуктов распада белка в гидролизате при помощи биуретовой реакции. В пробирку наливают 5 капель гидролизата белка и нейтрализуют 10% раствором щелочи по красному лакмусу

(опускают кусочек лакмуса в пробирку и помешивают стеклянной палочкой). После нейтрализации гидролизата (при посинении лакмуса) проводят биуретовую реакцию, прибавляя 2 капли CuSO_4 . Появляется фиолетово-розовое окрашивание. При полном гидролизе белка до аминокислот (приблизительно 2,5 ч) биуретовая реакция с гидролизатом отрицательная (голубое окрашивание).

Результаты титрования		
	NaOH 0,005 н (мл)	Азот α -аминогрупп (мг)
Белок до гидролиза		
Гидролизат		

Выводы:

Подпись преподавателя:

3. Пространственная структура белков. Физико-химические свойства белков. Механизмы осаждения белков

Актуальность темы

Изучение физико-химических свойств белков необходимо для понимания механизмов развития многих патологических состояний (например, отеков), механизмов транспорта веществ (в том числе лекарственных препаратов). На знании физико-химических свойств белков основано их получение и использование в качестве лекарственных препаратов. Реакции осаждения используются в медицине для качественного и количественного определения белка в биологических жидкостях, для удаления белков из растворов. Пробы коллоидоустойчивости используются для функциональной диагностики болезней внутренних органов.

Цель занятия

Закрепить знания о первичной структуре белка и ее роли в формировании пространственных структур молекулы. Сформировать представление о конформационных состояниях белковой молекулы и значении пространственной структуры в функционировании белков. Познакомиться с возможностями применения денатурации белков в медицинской практике.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **физико-коллоидной химии:**
 - учение о растворах;
 - свойства белковых растворов как коллоидных систем;
 - растворимость белка;
- **биоорганической химии:**
 - понятие об уровнях структурной организации белковых молекул;
 - денатурация и денатурирующие факторы.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Укажите свойства, характерные для грубодисперсных систем:

- А. Интенсивное броуновское движение частиц. Б. Термодинамическая неустойчивость.
В. Опалесценция. Г. Седиментация.

Задание 2. Укажите свойства, отличающие суспензии от истинных растворов:

- А. Прозрачность. Б. Термодинамическая устойчивость.
В. Гетерогенность. Г. Мутность.

Задание 3. Укажите свойства, характеризующие коллоидные растворы:

- А. Низкое осмотическое давление.
Б. Светорассеяние.
В. Для частиц дисперсной фазы характерна седиментация.
Г. Высокая диффузия частиц дисперсной фазы.

Задание 4. Методы очистки коллоидных растворов основаны на следующих свойствах (выберите правильные варианты):

- А. Размеры частиц дисперсной фазы больше размеров частиц примесей.
Б. Концентрация частиц дисперсной фазы больше концентрации частиц примесей.
В. Диффузии частиц примесей через фильтр.
Г. Диффузии частиц примесей через мембрану.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Вторичная, надвторичная, третичная, четвертичная структуры белковой молекулы (понятие, разновидности и связи, стабилизирующие структуру).
2. Конформационные изменения при функционировании белков. Взаимодействие белков с лигандами.
3. Денатурация. Обратимость денатурации. Механизмы действия денатурирующих факторов.
4. Общие физико-химические свойства белков (вязкость растворов, незначительная диффузия, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, поглощение УФ-лучей, растворимость в воде).
5. Факторы устойчивости белковых растворов (заряд белка, гидратная оболочка, молекулярная масса, форма молекулы). Изоэлектрическое состояние.
6. Зависимость растворимости белка от реакции среды (изоэлектрическая точка), ионной силы, температуры раствора. Высаливание и осаждение белков.

Литература для подготовки

Основная литература

1. *Березов Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 37–42, 51–60.
2. *Николаев А. Я.* Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 20–40.
3. *Конспект лекций.*

Дополнительная литература

1. *Ленинджер А.* Основы биохимии / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985.
2. *Марри Р.* Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Знать уровни структурной организации белков и основные связи, участвующие в их формировании.

1.1. Подберите к каждому уровню структурной организации белка соответствующее понятие, обозначенное буквой:

- | | |
|----------------------------|--|
| 1. Первичная структура. | А. Пространственное расположение отдельного участка полипептидной цепи, содержащей α -спирали и β -структуры. |
| 2. Вторичная структура. | |
| 3. Надвторичная структура. | |

4. Третичная структура.
5. Четвертичная структура.

Б. Порядок чередования аминокислот в полипептидной цепи.

В. Объединение в определенном порядке двух или большего количества протомеров в молекуле олигомерного белка.

Г. Способ укладки отдельных участков пептидной цепи в виде α -спиралей и β -структур.

Д. Расположение в пространстве всей полипептидной цепи, имеющей в своем составе α -спирали и β -структуры.

Е. Полипептидная цепь, которая стабилизируется пептидными связями между остатками аминокислот.

1.2. Какому уровню структурной организации белка соответствует каждый пронумерованный тип связи? Подберите пары:

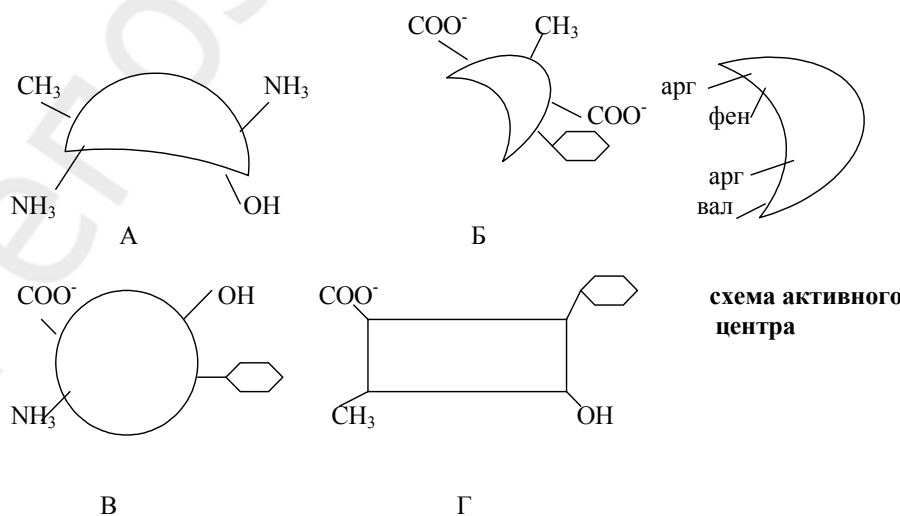
1. Связь между карбоксильными и аминогруппами радикалов аминокислот.
2. Связь между α -амино- и α -карбоксильными группами аминокислот.
3. Связь между радикалами цистеина.
4. Водородные связи между пептидными группировками.
5. Водородные связи между радикалами аминокислот.
6. Межрадикальные гидрофобные взаимодействия.

- А. Первичная структура.
- Б. Вторичная структура.
- В. Третичная структура.
- Г. Четвертичная структура.

Задание 2. Вспомните, что:

- белковые молекулы имеют центры связывания (активные центры) с другими веществами (лигандами);
- активные центры формируются из аминокислотных остатков, сближенных на уровне третичной структуры;
- связи между белком и лигандом могут быть нековалентные и ковалентные;
- белки проявляют высокую специфичность при присоединении лигандов к центрам связывания;
- специфичность взаимодействия белков с лигандами обеспечивается комплементарностью структуры активного центра структуре лиганда.

2.1. В активный центр белка входят два остатка аргинина, один остаток фенилаланина и один остаток валина:



Ответьте на вопросы:

- А. Какой из перечисленных лигандов (А, Б, В, Г) с наибольшей вероятностью будет взаимодействовать с активным центром данного белка и почему?
- Б. Какие типы связей возникают в процессе образования комплекса «белок – лиганд»?

Задание 3. Вспомните основные реагенты и условия, вызывающие денатурацию.

Ответьте на вопросы:

3.1. Денатурация белка сопровождается:

- А. Изменением конформации белка.
- Б. Уменьшением растворимости белка.
- В. Изменением заряда белка.
- Г. Нарушением первичной структуры белка.

3.2. Белки денатурируют в клетке в результате (выберите правильные ответы):

- А. Повышения температуры.
- Б. Изменения рН.
- В. Действия протеолитических ферментов.
- Г. Разрыва слабых связей, поддерживающих конформацию белка.
- Д. Синтеза белков теплового шока.

Задание 4. Знать строение и функции гемоглобина и миоглобина. Уметь дать сравнительную характеристику структуры и свойств этих белков. Ответьте на вопрос:

В ходе оксигенации гемоглобина происходит следующее:

- А. Изменение конформации первого протомера, затем второго и т. д.
- Б. Одновременное изменение конформаций всех протомеров.
- В. Изменение связей между протомерами.
- Г. Изменение валентности железа в гемах протомеров.

Задание 5. Вспомните, что белки являются амфолитами. Степень ионизации катионных и анионных групп, а следовательно, и заряд молекулы белка, зависит от значения рН среды.

5.1. Определите суммарный заряд пентапептида при рН=7: Глу-Арг-Лиз-Вал-Асп. Как изменится заряд этого пептида: а) при рН < 7; б) при рН > 7?

5.2. Усвоить понятия «изоэлектрическое состояние» и «изоэлектрическая точка» белка.

Ответьте, при каких значениях рН устойчивость растворов белков с изоэлектрическими точками 4,8; 5,3 и 6,1 будет наименьшей и почему?

Задание 6. Знать факторы, влияющие на растворимость белков. Ответьте на тестовый вопрос. Растворимость белков в водной среде определяется:

- А. Ионизацией белковой молекулы.
- Б. Гидратацией белковых молекул при растворении.
- В. Формой молекулы белка.
- Г. Способностью связывать природные лиганды.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Подберите верные пары утверждений:

1. неполярные радикалы аминокислот. А. Предпочтительное расположение — на поверхности белковой молекулы.
2. Полярные анионные радикалы. Б. Взаимодействие их функциональных групп формирует вторичную структуру.
3. Оба. В. Предпочтительное расположение — внутри белковой молекулы.
4. Ни один. Г. Участвуют в формировании третичной структуры.

Задание 2. Центр связывания белка с лигандом представляет собой (выберите наиболее полный ответ):

- А. Совокупность радикалов аминокислот, сближенных на уровне третичной структуры.
- Б. Фрагмент полипептидной цепи.
- В. Участок поверхности белковой молекулы, комплементарный лиганду.
- Г. Простетическую группу белка.
- Д. Фрагмент пептидного остова.

Задание 3. Лигандом α -протомера гемоглобина может быть:

- А. Гем. Б. Кислород. В. β -Протомер. Г. 2,3-Бисфосфоглицерат. Д. α -Протомер.

Задание 4. Подберите верные пары утверждений:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| А. Нативная рибонуклеаза. | 1. Молекулы белка имеют одинаковую |
| Б. Денатурированная рибонуклеаза. | конформацию. |
| В. Обе. | 2. Молекулы белка имеют одинаковую первичную |
| Г. Ни одна. | структуру. |
| | 3. У молекул нарушено связывание с природным |
| | лигандом. |
| | 4. Молекулы имеют различную молекулярную |
| | массу. |

Задание 5. В ядерных белках-гистонах содержится большое количество аминокислотных остатков аргинина и лизина, а в белке крови альбумине — много остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. Ответьте на вопросы:

1. В каких средах находятся ИЭТ этих кислот?
2. С каким из белков может взаимодействовать Ca^{2+} ?

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — А, Г; 2 — В, Г; 3 — А, Б, В; 4 — А, Г.

Для самостоятельной работы:

1.1 — (Б, Е – 1; Г – 2; А – 3; Д – 4; В – 5); 1.2 — (А – 2, 3; Б – 4; В – 1, 3, 5, 6; Г – 1, 3, 5);
 2.1 — (А – лиганд Б; Б – ионные, гидрофобные); 3.1 — А, Б; 3.2 — А, Б, Г; 4 — А; 5.1 — «0»,
 а) «++», б) «–»;

5.2 — при $\text{pH}=\text{ИЭТ}$; 6 — А, Б, В.

Самостоятельная работа (60 минут)

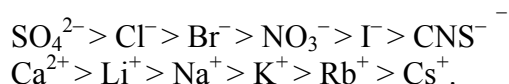
Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Высаливание белков*

Высаливание — обратимая реакция осаждения белков из раствора с помощью больших концентраций нейтральных солей: NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 .

При высаливании происходят дегидратация молекул белка и устранение заряда. На процесс высаливания влияет ряд факторов: гидрофильность белка, его относительная молекулярная масса, заряд, в связи с чем для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей. Альбумины осаждаются в насыщенном р-ре $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а глобулины — в полунасыщенном р-ре $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, так как у глобулинов большая молекулярная масса и меньший заряд, чем у альбуминов.

Высаливание белков — обратимая реакция, так как осадок белка может вновь растворяться после уменьшения концентрации солей путем диализа или разведения водой. Хлорид натрия осаждает белки слабее, чем сульфат аммония, вследствие меньшей дегидратирующей способности, которая характеризуется положением ионов в ряду Гофмейстера:



Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка

Ход работы. К 20 каплям яичного белка добавляют 20 капель насыщенного р-ра $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и перемешивают. Выпадает осадок яичного глобулина. Через 5 мин осадок отфильтровывают, используя бумажный фильтр. В фильтрате остается другой белок — яичный альбумин. К фильтрату добавляют измельченный порошок сульфата аммония до полного насыщения, т. е. пока новая порция порошка остается нерастворенной. Выпавший осадок альбумина также отфильтровывают. С фильтратом проводят биуретовую реакцию: к фильтрату добавляют 2 капли 1% р-ра CuSO_4 + 5 капель 10% р-ра NaOH . Отрицательная биуретовая реакция (голубое окрашивание) указывает на отсутствие белка в исследуемом растворе.

Вывод:

Работа 2. *Осаждение белков*

Денатурация белка (необратимое осаждение) сводится к нарушению пространственной структуры белка и потере им биологических свойств. При необратимых реакциях осаждения белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть растворимы в первоначальном растворителе. К необратимым реакциям относятся: осаждение белка солями тяжелых металлов, минеральными и органическими кислотами, алкалоидными реактивами и осаждение при кипячении.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

Осаждение белков солями тяжелых металлов, в отличие от высаливания, происходит при небольших концентрациях солей. Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) адсорбируют их, образуя солеобразные и комплексные соединения, растворимые в избытке этих солей (за исключением солей нитрата серебра и хлорида ртути), но нерастворимые в воде. Растворение осадка в избытке солей называется *адсорбционной пептизацией*. Это происходит вследствие возникновения одноименного положительного заряда на частицах белка.

Ход работы

Реактивы	1-я пробирка	2-я пробирка
Раствор яичного белка	5 капель	5 капель
1% р-р сульфата меди	1–2 капли	–
5% р-р нитрата серебра	–	1–2 капли
<i>Отметить образование осадка</i>		
1% р-р сульфата меди (избыток)	5–10 капель	–
5% р-р нитрата серебра (избыток)	–	5–10 капель
<i>Отметить растворение осадка</i>		

Вывод:

Способность белка прочно связывать ионы тяжелого металла в виде нерастворимых осадков в воде используется как противоядие при отравлениях солями ртути, меди, свинца и т. д. Сразу после отравления, пока соли еще не успели всосаться и находятся в желудке, пострадавшему дают выпить молоко или белок куриного яйца, а затем вызывают рвоту, чтобы удалить яд из организма.

Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты вызывают денатурацию белка и образуют комплексные соли белка с кислотами. Ортофосфорная кислота осадка не дает. В избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший осадок белка растворяется.

Ход работы

Реактивы	1-я пробирка	2-я пробирка
HNO ₃ (конц.)	10 капель	–
H ₂ SO ₄ (конц.)	–	10 капель
Осторожно, по стенке пробирки, добавляют белок	10 капель	10 капель
<i>Отметить появление осадка на границе раздела фаз</i>		
Избыток HNO ₃ (конц.)	10 капель	–
Избыток H ₂ SO ₄ (конц.)	–	10 капель
<i>Отметить растворение осадка</i>		

Вывод:

Подпись преподавателя:

4. Методы разделения, выделения и очистки белков. Сложные белки

Актуальность темы

Особенности строения и функционирования организма зависят от набора белков, которые в нем синтезируются. Белки выполняют в организме самые многообразные функции, которые всегда определяются их структурой. Для изучения строения и свойств белков их необходимо выделить из клетки и очистить от других белков и неорганических примесей.

Цель занятия

Закрепить знания о физико-химических свойствах белков для того, чтобы понять методы разделения и очистки белков, а также принципы функционирования белков в организме. Освоить метод гель-фильтрации.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– *общей химии:*

- физико-химические свойства дисперсных систем;
- основы хроматографии и электрофореза.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Укажите электрокинетические явления в коллоидных растворах:

А. Электрофорез.

Б. Электроосмос.

В. Потенциал протекания. Г. Потенциал седиментации.

Задание 2. Электрофорез коллоидных растворов и растворов белков применим для:

- А. Очистки воды. Б. Определения заряда эритроцитов.
В. Очистки лекарственных препаратов. Г. Разделения белков.

Задание 3. Скорость электрофореза растворов белков зависит от:

- А. Величины заряда макроиона белка. Б. Формы макроиона белка.
В. Вязкости раствора. Г. рН раствора.

Задание 4. Все хроматографические методы основаны на:

- А. Различия в размерах молекул разделяемых веществ.
Б. Различия в скоростях передвижения отдельных компонентов смеси в подвижной фазе.
В. Различия в степени распределения веществ между подвижной и стационарной фазами.
Г. Многократном повторении актов сорбции и десорбции разделяемых веществ.

Задание 5. Количественно степень распределения разделяемых веществ между стационарной и подвижной фазами (коэффициент распределения) выражается:

- А. Концентрацией вещества в подвижной фазе.
Б. Соотношением концентраций вещества в стационарной и подвижной фазах.
В. Соотношением скоростей перемещения различных компонентов смеси.
Г. Концентрацией вещества в неподвижной фазе.

Задание 6. В какой последовательности выйдут при вымывании их растворителем из колонки, заполненной активированным углем, следующие пигменты, если степень их полярности возрастает в ряду: каротин < ксантофиллы < α -хлорофилл < β -хлорофилл?

- А. Ксантофиллы, каротин, α -хлорофилл, β -хлорофилл.
Б. Каротин, ксантофиллы, α -хлорофилл, β -хлорофилл.
В. β -хлорофилл, α -хлорофилл, ксантофиллы, каротин.
Г. Каротин, ксантофиллы, β -хлорофилл, α -хлорофилл.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Методы разделения белков:
 - 1) высаливание;
 - 2) хроматография (адсорбционная, распределительная, ионообменная, аффинная, гель-хроматография);
 - 3) электрофорез (на бумаге, в полиакриламидном геле с использованием DDS-Na, изоэлектрофокусирование, иммуноэлектрофорез);
 - 4) ультрацентрифугирование.
2. Методы очистки белков от низкомолекулярных примесей (диализ, гель-хроматография, кристаллизация, ультрафильтрация).
3. Вестерн-блот (назначение, этапы, молекулярные зонды).
4. Строение и функции сложных белков.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 20-28, 65-76.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 36-38, 48-52.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985.
2. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.

5.1. Выберите сложные белки, у которых связь между белком и простетической группой ковалентная:

- А. Гемоглобин. Б. Цитохром P₄₅₀. В. Ихтулин.
Г. Интерферон. Д. Тиреотропный гормон.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Подберите к пронумерованному методу разделения и очистки белков соответствующие принципы, на которых основан данный метод:

- | | |
|--|---|
| А. Ультрацентрифугирование. | 1. Метод основан на различной сорбционной способности веществ. |
| Б. Гель-фильтрация. | 2. Метод основан на различиях в молекулярной массе белков. |
| В. Электрофорез в полиакриламидном геле. | 3. Метод основан на комплементарном присоединении белка к иммобилизованному лиганду. |
| Г. Ионообменная хроматография. | 4. В основе метода лежит использование различий в молекулярной массе и заряде белков. |
| Д. Аффинная хроматография. | |

Задание 2. Назовите известные Вам методы, с помощью которых можно разделить смесь белков, приведенных в таблице. Укажите, различия каких физико-химических свойств белков лежат в основе каждого метода разделения.

Название белка	Молекулярная масса, Да	ИЭТ
Церулоплазмин	151 000	4,4
γ-Глобулин	150 000	6,3
β-Лактальбумин	37 000	5,2

Задание 3. В какой последовательности выйдут из колонки, заполненной сефадексом G-200, следующие белки: пепсин (M = 36000), миоглобин (M = 17000), каталаза (M = 250000) при вымывании их растворителем:

- А. Каталаза, пепсин, миоглобин. Б. Пепсин, миоглобин, каталаза.
В. Миоглобин, каталаза, пепсин. Г. Миоглобин, пепсин, каталаза.

Задание 4. В 1987 году были установлены критерии для интерпретации серологического теста при проведении Вестерн-блота на СПИД. Эти критерии следующие:

Нет полос	Отрицательная проба
Наличие полос, соответствующих р31 или р24, и полос, соответствующих гр160 или гр120	Положительная проба
Полосы присутствуют, но не соответствуют критериям положительной пробы	Сомнительная проба

- гр160 — предшественник белка вирусной оболочки;
гр120 — белок вирусной оболочки;
р24 — белок вирусного ядра;
р31 — обратная транскриптаза.

В таблице (см. ниже) приведены результаты блот-анализа для диагностики СПИДа, проанализируйте полученную картину и ответьте на вопросы:

Вопрос 1. Что выявляет этот тест?

- А. Только антитело к вирусу СПИД.
- Б. Только антиген вируса СПИД.
- В. Присутствие свободного циркулирующего вируса у пациента.
- Г. Присутствие вируса только в инфицированных лимфоцитах.

Вопрос 2. Вторичные антитела связывают:

- А. Белки вируса СПИД.
- Б. Только антивирусные первичные антитела человека.
- В. Первичное антитело.
- Г. Ферментный конъюгат.

Вопрос 3. Кто из обследуемых людей является иммунодефицит-положительным по результатам Вестерн-блота?

- А. Пациент А.
- Б. Пациенты В и С.
- В. Пациент С.
- Г. Пациент В — неопределенный, а пациент С — положительный.

	1	2	А	В	С	<i>Интерпретация полос</i>
gp160	—			—		1 — вирус + сыворотка (положительный контроль)
gp120	—			—	—	
p55	—			—		2 — вирус - сыворотка (отрицательный контроль)
gp41	—			—		
p31	—			—		А — пациент А
p24	—			—	—	В — пациент В
						С — пациент С

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — А, Б; 2, 3 — все правильные; 4 — В; 5 — А, Б; 6 — В.

Для самостоятельной работы:

1.1 — «0» а) «+ +»; б) «- -»; 1.2 — 1) к аноду; 2) к катоду; 2.1 — А, Б, В, Г; 2.2 — В; 2.3 — Б, В, Г; 2.4 — (1 - Б, 2 - В, 3 - Г, 4 - А); 3 — А; 4 — Б; 5.1 — В, Г, Д.

Самостоятельная работа (70 минут)

Инструкция к практическому занятию

Колоночная гель-фильтрация

Для гель-фильтрации используют так называемые молекулярные сита — инертные гидратированные полисахаридные молекулы. Их получают из бактериальных полисахаридов (сефадексы), агара или полимеризованных акриламидных гелей (акрилекс). При набухании в растворе гранул геля в них образуются поры, через которые могут проходить молекулы разных размеров (в зависимости от величины пор). Молекулы, которые хорошо проникают внутрь гранул, проходят через хроматографическую колонку медленнее, чем более крупные молекулы. Эффективность разделения смеси веществ определяют по составу вытекающего из колонки раствора (элюата).

Ход работы

1. Колонку для гель-фильтрации закрыть резинкой-заглушкой, поставить в пробирку. Содержимое стаканчика с сефадексом перемешать и влить в колонку. Дать отстояться, снять заглушку. Жидкость при этом свободно вытекает из колонки.

2. Из бюретки в пробирку отмерить 1 мл белка (высокомолекулярное соединение) и добавить 3–5 капель рибофлавина (низкомолекулярное соединение).

3. В 12 чистых пробирок отмерить из бюретки по 1 мл биуретового реактива. Колонку поместить в первую пробирку с биуретовым реактивом, удалить слой жидкости над сефадексом и внести в колонку разделяемый образец (смесь: белок + рибофлавин).

После погружения нанесенного раствора в сефадекс колонку переставить в другую пробирку с биуретовым реактивом, аккуратно заполнить расширенную часть колонки водой и, отсчитав 5–7 капель вытекающей из колонки жидкости, переставить колонку в следующую пробирку. Повторять до выхода белков из колонки (положительная биуретовая реакция), постоянно добавляя в колонку воду.

4. По окончании работы (появление желто-зеленого окрашивания в пробирке с биуретовым реактивом, которое обусловлено вытеканием рибофлавина) содержимое колонки выдувают в стаканчик и ополаскивают колонку водой.

5. Результаты опыта оформите в виде таблицы.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Цвет раствора												
Вывод (что присутствует в р-ре)												

Выводы:

Подпись преподавателя:

5. Ферменты. Классификация Строение. Свойства

Актуальность темы

Ферменты — это биологические катализаторы белковой природы, которые контролируют практически все химические процессы, протекающие в живых организмах.

В отличие от небелковых катализаторов каждый фермент способен катализировать лишь очень небольшое число реакций, часто только одну.

Знание энзимологии имеет большое значение для подготовки и практической деятельности врача. Многие болезни (врожденные нарушения метаболизма) определяются генетически обусловленными нарушениями в синтезе ферментов. При повреждении клеток (вызванном, например, недостатком кровообращения или воспалением) некоторые ферменты попадают в плазму крови. Измерение активности таких ферментов обычно используется для диагностики многих распространенных заболеваний. Диагностическая энзимология — область медицины, использующая ферменты для диагностики и контроля за результатами лечения. Ферменты применяются и в терапии.

Цель занятия

Научиться применять знания о свойствах ферментов и ферментном составе органов при последующем изучении метаболизма органов и систем, а также для решения вопросов диагностики, профилактики и лечения болезней, связанных с нарушением функционирования ферментов.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– *общей химии*:

- общие закономерности и механизмы протекания химических реакций;
- основные положения теории катализа;

– *биоорганической химии*:

- классификация органических реакций по направлению и результатам реакции;
- свойства и строение белков;

- строение коферментов, биологическая роль;
- качественные реакции на крахмал и глюкозу, используемые для оценки степени гидролиза крахмала.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Катализаторы увеличивают скорость реакции, так как:

- А. Изменяют свободную энергию реакции.
- Б. Уменьшают скорость обратной реакции.
- В. Изменяют состояние равновесия реакции.
- Г. Уменьшают энергию активации.
- Д. Избирательно увеличивают скорость прямой реакции, но не увеличивают скорость обратной реакции.

Задание 2. Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

- | | |
|------------------------|---|
| А. Водородные связи. | 1. Участвуют в образовании вторичной структуры. |
| Б. Ионные связи. | 2. Участвуют в формировании первичной структуры. |
| В. Гидрофобные связи. | 3. Участвуют в формировании третичной структуры. |
| Г. Пептидные связи. | 4. Участвуют в формировании четвертичной структуры. |
| Д. Дисульфидные связи. | |

Задание 3. Назовите коферменты, структура которых изображена схематически ниже:

- 3.1. Изоаллоксазин – рибитол – остаток фосфорной кислоты – остаток фосфорной кислоты – рибоза – аденин.
- 3.2. Никотинамид – рибоза – остаток фосфорной кислоты – остаток фосфорной кислоты – рибоза – аденин.

Задание 4. Вам даны четыре пробирки с неизвестными растворами. Проведя реакцию с реактивом Люголя, получили следующие окраски: 1) синяя; 2) бурая; 3) желтая; 4) фиолетовая.

4.1. В какой пробирке произошел полный гидролиз крахмала?

- А. В первой пробирке.
- Б. Во второй пробирке.
- В. В третьей пробирке.
- Г. В четвертой пробирке.

4.2. Какое вещество образовалось при кратковременном гидролизе крахмала?

- А. Глюкоза.
- Б. Декстрины.
- В. Сахароза.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Особенности ферментов как белковых катализаторов.
2. Современная классификация ферментов и номенклатура ферментов (систематическое и рабочее названия). Шифр ферментов. Общая характеристика классов.
3. Строение ферментов. Кофакторы ферментов, их классификация и роль в катализе. Блок-схемы структуры НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД и ФМН.
4. Кинетика ферментативных реакций. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата, рН, температуры (молекулярный механизм, графическая зависимость). Константа Михаэлиса (K_m), использование K_m для прогнозирования протекания биохимических реакций.
5. Специфичность действия ферментов. Виды специфичности.
6. Единицы активности ферментов.

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 92–98, 108–116, 124–129.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 76–77, 79–92.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985. С. 226–241.
2. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Обратите внимание на то, что катализаторы:

- а) увеличивают скорость химической реакции;
- б) в процессе реакции не расходуются;
- в) в равной степени катализируют как прямую, так и обратную реакции.

1.1. Запомните, что белковая природа ферментов обуславливает специфичность их действия.

1.2. Подберите соответствующие пары вопрос – ответ:

1. Увеличивают энергиюА. Небиологические активации. катализаторы.
2. В процессе реакции неБ. Ферменты. расходуются. В. Обе группы катализаторов.
3. Неспецифичны. Г. Ни один из катализаторов.
4. Ингибируются аналогами субстрата.

1.3. Запишите, в общем виде, реакцию с участием фермента, используя символы: S-субстрат, E-фермент, ES-промежуточный комплекс, P-продукт.

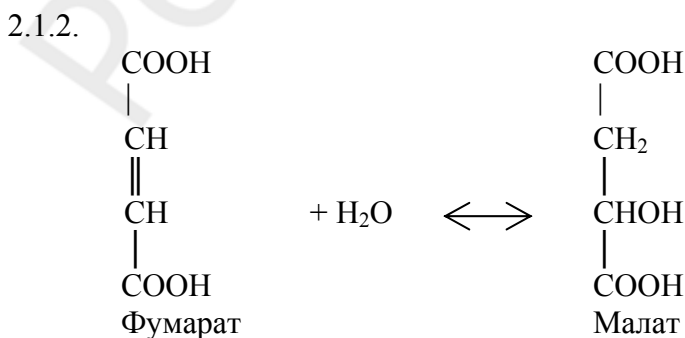
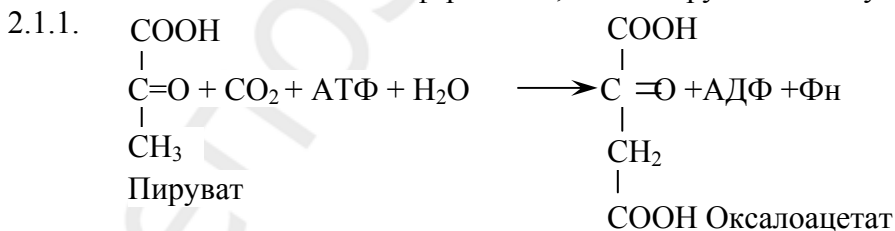
1.4. Назовите основные факторы, влияющие на активность ферментов.

Решите задачу. Оптимальные условия для действия глутаматдегидрогеназы: t — 37°C , pH — 4,5. При повышении температуры инкубационной пробы до 75°C и pH инкубационной среды до 8,0 скорость ферментативной реакции снизилась на 50%. Объясните причину снижения скорости реакции.

Задание 2. Запомните, чтобы назвать ферменты по написанным реакциям, требуется:

- сравнить структуру субстратов и продуктов;
- определить тип превращения.

2.1. Укажите класс и название ферментов, катализирующих следующие реакции:



Задание 3. Напишите схематически структуру коферментов: НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН.

Задание 4. Рассчитайте удельную активность ацетилхолинэстеразы, если 5 мг фермента за 30 с расщепляют 200 мкмоль ацетилхолина.

Задание 5. Нормальные клетки способны превращать аспарагиновую кислоту в аспарагин. Некоторые лейкозные клетки лишены этой способности. Добавление аспарагиназы (фермента, расщепляющего аспарагин) в кровь больных лейкозом может привести к гибели раковых клеток. Какой вид специфичности проявляет этот фермент?

А. Относительную. Б. Абсолютную. В. Стереоспецифичность.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

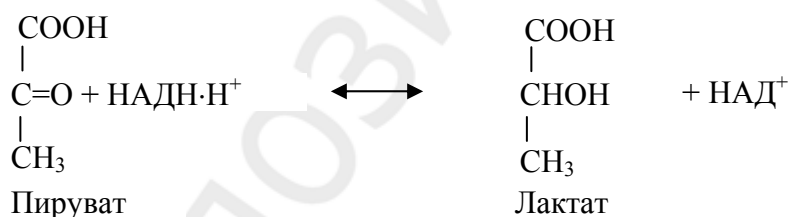
Задание 1. В лаборатории выделили фермент лизоцим и определили его активность при различных значениях pH среды. Установили, что ферментативная активность лизоцима максимальна при pH 5,2 и уменьшается как при снижении, так и при повышении этого значения pH. Укажите возможную причину:

- А. Изменение конформации молекулы фермента.
- Б. Утрата комплементарности активного центра и субстрата.
- В. Изменение ионизации функциональных групп фермента.
- Г. Гидролиз пептидных связей фермента.
- Д. Уменьшение свободной энергии реакции.

Задание 2. Экспериментально доказали, что активный центр фермента лизоцима содержит аминокислотные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот, необходимых для катализа. Какие группы в составе субстрата функционально важны для фермента?

- А. Аминогруппы.
- Б. Карбоксильные группы.
- В. Тиогруппы.
- Г. Алкильные радикалы.
- Д. Гидроксильные группы.

Задание 3. Температура 37°C, pH 7,5 — оптимальные условия для действия лактатдегидрогеназы (ЛДГ), катализирующей превращение:



3.1. Объясните причины уменьшения активности фермента:

- а) при повышении температуры до 60°C;
- б) при хранении фермента в буферном растворе с pH 5,0;
- в) при снижении в клетке отношения НАД⁺ / НАДН·Н⁺.

3.2. Рассчитайте удельную активность фермента, если за 5 с 10 мг ЛДГ вызывает превращение 80 мкмоль пирувата; запишите размерность этой величины.

3.3. По изменению концентрации каких веществ можно определить активность ЛДГ?

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — Г; 2 — (1 — А; 2 — Г; 3 — А, Б, В, Д; 4 — А, Б, В, Д);

3.1 — ФАД; 3.2 — НАД⁺; 4.1 — В; 4.2 — Б.

Для самостоятельной работы:

1.2 — (1 – Г; 2 – В; 3 – А; 4 – Б).

1.4. При повышении температуры до 75°C скорость ферментативной реакции снижается, так как вследствие денатурации количество активных молекул фермента уменьшается.

От рН зависят:

- ионизация аминокислотных остатков, включенных в катализ;
- ионизация субстрата;
- конформация фермента и его активного центра.

2.1.1. Лигаза, пируваткарбоксилаза.

2.1.2. Лиаза, фумаратгидратаза.

4. Международные единицы: 1,33 мккатал/мг фермента; стандартные единицы: 80 мкмоль/мин/мг фермента.

5 — Б.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. **Изучение влияния различных факторов на скорость ферментативных реакций**

1. Определение активности амилазы слюны и ее термолабильности

Одним из характерных свойств ферментов является термолабильность, т. е. чувствительность фермента к температуре, при которой протекает ферментативная реакция. Для большинства ферментов температурный оптимум наблюдается при 38–40°C. Ферменты при нагревании свыше 70°C, как правило, утрачивают свойства биологических катализаторов.

Гидролиз крахмала под действием α -амилазы слюны происходит до стадии образования декстринов. Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание. Декстрины, в зависимости от размера, дают с йодом различное окрашивание: амилодекстрины – фиолетовое, эритродекстрины — красно-бурое, мальтоза — желтое. Конечные продукты гидролиза крахмала — мальтоза и глюкоза — имеют свободные альдегидные группы и могут быть обнаружены реакцией Троммера.

О действии фермента судят по уменьшению количества субстрата или появлению продуктов реакции.

Ход работы. В чистую пробирку отливают небольшое количество неразведенной слюны (2–3 мл) и кипятят ее в течение 5 мин, после чего охлаждают. В 3 пробирки наливают по 10 капель 1% раствора крахмала. В 1-ю пробирку добавляют 10 капель нативной слюны, разведенной в 10 раз, во 2-ю — 10 капель прокипяченной слюны, в 3-ю — 10 капель воды в качестве контроля. Все пробирки помещают в термостат при температуре 38°C на 10 мин. После этого с содержимым пробирок проводят качественные реакции на крахмал и продукты его расщепления.

Реакция на крахмал. К 5 каплям исследуемого раствора приливают 1 каплю раствора йода в иодиде калия (реактив Люголя). В присутствии крахмала появляется синее окрашивание.

Реакция на глюкозу (реакция Троммера). К 5 каплям исследуемой жидкости приливают 5 капель 10% раствора едкого натра и 3 капли 1% раствора сульфата меди. Осторожно кипятят 1 мин до появления красного окрашивания, которое указывает на наличие глюкозы.

Результаты опыта запишите в таблицу:

№ пробирки	Реакция с реактивом Люголя	Реакция Троммера
1 (нативная слюна)		
2 (прокипяченная слюна)		
3 (H ₂ O)		

2. Влияние pH среды на активность ферментов

Для разных ферментов существует свой оптимум pH, при котором фермент наиболее активен. Например, для пепсина оптимум pH — 1,5–2,5, для аргиназы — 9,5. Определите оптимум pH для амилазы слюны по следующей методике.

Ход работы. Слюну предварительно разводят водой в 10 раз. Берут 3 пробирки и в каждую наливают по 2 мл буферного раствора с различным значением pH: 6,0; 6,8; 8,0. Затем приливают по 1 мл 0,5% раствора крахмала и по 1 мл разведенной слюны. Перемешивают содержимое пробирок и помещают в термостат при 38°C на 10 мин. Затем во все пробирки добавляют по 1 капле раствора йода, перемешивают, наблюдают окраску и отмечают pH, при котором амилаза действует наиболее активно.

Результаты опыта запишите в таблицу:

pH среды	6,0	6,8	8,0
Реакция с реактивом Люголя			

3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны

Ход работы. В три пробирки наливают по 1 мл слюны, разведенной в 40 раз. В первую пробирку добавляют 2 капли воды, во вторую — 2 капли 1% раствора NaCl, в третью — 2 капли 1% раствора CuSO₄. После этого во все пробирки добавляют по 5 капель 1% раствора крахмала и оставляют их при комнатной температуре на 2 мин. Затем во все пробирки добавляют по 1 капле раствора Люголя, перемешивают, наблюдают окраску и определяют, в какой пробирке действует активатор или ингибитор.

Результаты опыта запишите в таблицу:

Номер пробирки	1 (H₂O)	2 (NaCl)	3 (CuSO₄)
Реакция с реактивом Люголя			

Работа 2. Специфичность ферментов

В отличие от неорганических катализаторов, ферменты обладают специфичностью (абсолютной, относительной, стереоспецифичностью). Это свойство определяется уникальным строением активного центра каждого фермента. Определите тип специфичности амилазы слюны по следующей методике.

Ход работы. Для исследования специфичности амилазы берут слюну, разведенную в 5 раз, и наливают по 1 мл в 2 пробирки.

В 1-ю пробирку добавляют 1 мл 1% раствора крахмала, во 2-ю — 1 мл 1% раствора сахарозы. Обе пробирки помещают на 10 минут в термостат при 38°C, после чего проводят реакцию Фелинга для обнаружения глюкозы.

Реакция Фелинга: к 15 каплям исследуемого раствора прибавить равный объем реактива Фелинга и довести до кипения. При положительной реакции на глюкозу наблюдается красное окрашивание, которое дает закись меди.

Результаты опытов запишите в таблицу:

№ пробирки	Фермент	Субстрат	Реакция Фелинга
1			
2			

Выводы:

Подпись преподавателя:

6. Регуляция действия ферментов.

Количественное определение активности ферментов

Актуальность темы

Знание механизмов, посредством которых клетки и целые организмы координируют и регулируют весь набор метаболических процессов, важны при исследованиях в разных областях биомедицинских наук. Из всех факторов, от которых зависит определение активности фермента — концентрация фермента и субстрата, температура, рН и присутствие регуляторов, наибольший клинический интерес представляют два последних.

Активаторы и ингибиторы влияют на активность фермента, способствуя формированию или блокированию его активного центра. Они могут взаимодействовать с аллостерическим центром и, тем самым, менять ферментативную активность. Нередко ингибиторы — продукты промежуточных или конечных реакций какого-либо биохимического процесса. Некоторые природные или синтетические вещества оказывают избирательное ингибирующее действие на ферменты и используются в качестве лекарственных веществ. В больших дозах подобные вещества могут оказаться ядами.

Большинство лекарственных препаратов оказывает свое действие, влияя на соответствующие ферментативные реакции. Многие такие препараты сходны с природными субстратами и потому могут действовать как конкурентные ингибиторы ферментов. Чтобы понять многие процессы, которые существенны для фармакологии и токсикологии, необходимо иметь четкое представление о механизмах ингибирования ферментов.

Цель занятия

Уметь использовать знания о механизмах регуляции активности ферментов в последующем изучении клинических дисциплин для усвоения принципов диагностики заболеваний и контроля лечения, а также для понимания механизмов действия лекарственных препаратов, регулирующих активность ферментов.

Требования к исходному уровню знаний

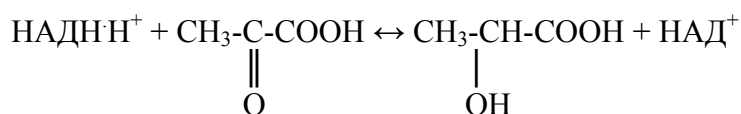
Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **общей химии:**
 - основные положения теории катализа;
- **биоорганической химии:**
 - примеры различных типов химических реакций;
 - конформационные превращения белков.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Известно, что скорость взаимодействия веществ А и В увеличилась в три раза после добавления вещества К. В качестве конечных продуктов обнаруживается вещество АВК. Является ли вещество К катализатором?

Задание 2. При интенсивной мышечной работе в скелетной мускулатуре накапливается молочная кислота, образующаяся в реакции:



К какому типу относится приведенная реакция?

- А. Окислительно-восстановительная реакция.
- Б. Реакция гидролиза.
- В. Реакция синтеза.
- Г. Реакция электролиза.

Задание 3. Вещества А и В взаимодействуют по схеме $A + B \leftrightarrow AB$. При заданной концентрации А и В через 30 минут устанавливается подвижное равновесие, т. е. скорости прямой и обратной реакции уравниваются. Какую из приведенных характеристик реакции изменит внесение катализатора?

- А. Скорость прямой реакции.
- Б. Константу равновесия.
- В. Скорость обратной реакции.
- Г. Время наступления равновесия.
- Д. Концентрацию продуктов реакции.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Механизм ферментативного катализа. Теория промежуточных фермент-субстратных комплексов, типы связей.
2. Представление об активном центре фермента, его организация. Теории, объясняющие работу активного центра (Э. Фишер, Д. Кошленд).
3. Особенности строения аллостерических ферментов, аллостерический центр.
4. Механизмы регуляции скорости ферментативных процессов: регуляция количества ферментов (синтез, распад), активности ферментов, изменение количества субстрата, наличие изоферментов, объединение ферментов в полиферментные комплексы, компартментализация процессов.
5. Ключевые ферменты, характеристика.
6. Регуляция активности ферментов: ковалентная модификация, активаторы и ингибиторы (примеры). Виды ингибирования (необратимое и обратимое, изостерическое и аллостерическое), характеристика, примеры.
7. Множественные формы ферментов (изоферменты и собственно множественные формы), примеры, биологическая роль.
8. Медицинские аспекты энзимологии.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 99–108, 115–126, 129–132.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М.: Высшая школа, 1989. С. 76–77, 79–92.
3. Конспект лекций

Дополнительная литература

1. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985. С. 226–241.
2. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Иметь представление о механизмах ферментативного катализа. Обратит внимание на то, что:

- а) в активный центр входят радикалы аминокислот различных участков полипептидного остова;
- б) активный центр составляет относительно небольшую часть объема фермента;
- в) активный центр располагается в углублении фермента.

1.1. Ферментативный гидролиз триацилглицеролов протекает в сто раз быстрее неферментативного процесса за счет образования промежуточного фермент-субстратного комплекса. Какие связи стабилизируют этот комплекс?

- А. Ионные. Б. Водородные. В. Пептидные.

Г. N-гликозидные. Д. Сложноэфирные.

1.2. Методом ИК-спектроскопии изучали природу связей между субстратом и связывающим участком активного центра фермента. В чем заключается взаимодействие фермента и субстрата по Д. Кошленду?

А. Изменяется только конформация активного центра фермента.

Б. В молекуле фермента изменяется конформация аллостерического центра под действием субстрата.

В. При образовании фермент-субстратного комплекса в ферменте и субстрате одинаково изменяется напряжение химических связей.

Г. Активный центр подходит к субстрату, как ключ к замку.

Задание 2. Усвоить, что действие ферментов можно полностью или частично подавить (ингибировать) определенными химическими веществами (ингибиторами). Дать характеристику основным типам ингибиторов.

2.1. При исследовании влияния салицилатов на активность фермента глутаматдегидрогеназы установлено, что с увеличением концентрации субстрата (глутамата) от 1,5 до 8 ммоль степень ингибирования не изменяется. Удалив ингибитор, активность фермента можно восстановить. Определите тип ингибирования:

А. Необратимое.

Б. Обратимое конкурентное.

В. Обратимое неконкурентное.

Г. Ингибирование по принципу «обратной связи».

2.2. Для лечения некоторых инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, применяются сульфаниламидные препараты, блокирующие синтез фолиевой кислоты - фактора роста бактерий. Выбрать механизм действия сульфаниламидных препаратов:

А. Являются ферментами.

Б. Участвуют в окислительно-восстановительных процессах.

В. Являются аллостерическими ингибиторами.

Г. Конкурируют с п-аминобензойной кислотой за место связывания с активным центром фермента, синтезирующего фолиевую кислоту.

Д. Ингибируют всасывание фолиевой кислоты.

Задание 3. Усвоить основные способы регуляции каталитической активности ферментов и понятие «множественные формы ферментов».

3.1. В клинику доставили пациента с приступом бронхиальной астмы. У больного вследствие дыхательного ацидоза (рН крови 7,2) снижена активность ферментов плазмы. Укажите основную причину инактивации ферментов плазмы крови:

А. Изменение степени ионизации молекул ферментов.

Б. Необратимая денатурация.

В. Разрыв пептидных связей.

Г. Изменение концентрации ферментов.

Д. Репрессия синтеза ферментов.

3.2. При обследовании больного установлено повышение в крови активности изоферментов креатинкиназы ММ и МВ. Укажите их общие свойства.

А. Термоллабильность.

Б. Чувствительность к различным ингибиторам.

В. Электрофоретическая подвижность.

Г. Молекулярная масса.

Д. Катализ одной и той же реакции.

3.3. К какому классу относится этот фермент (см. 3.2)?

- А. Оксидоредуктазы. Б. Трансферазы. В. Лиазы.
Г. Гидролазы. Д. Изомеразы. Е. Лигазы.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Больной С. после приема внутрь 20 мл метанола в тяжелом состоянии доставлен в клинику, где ему ввели внутривенно этиловый спирт в количестве, которое у здорового человека вызывает интоксикацию. Объясните, почему такое лечение оказывается эффективным, учитывая, что высокая токсичность метанола обусловлена действием продукта его метаболизма — формальдегида, образующегося в печени под действием алкогольдегидрогеназы:

- А. Этанол — конкурирующий субстрат для алкогольдегидрогеназы.
Б. Этанол вызывает денатурацию фермента.
В. Вследствие изменения рН среды.
Г. Происходит частичный протеолиз молекулы фермента.
Д. Этанол связывает формальдегид.

Задание 2. При лечении опухолей мочеполовой системы в клинике применяется препарат метотрексат, обратимый конкурентный ингибитор дигидрофолатредуктазы, катализирующей синтез тетрагидрофолиевой кислоты. На взаимодействии с каким компонентом основан механизм действия этого препарата?

- А. Апоферментом. Б. Активным центром фермента.
В. Аллостерическим центром фермента. Г. Простетической группой.
Д. Субстратом.

Задание 3. Кроме H^+ и углекислого газа, связывание кислорода гемоглобином регулируется 2,3-бисфосфоглицератом, который присоединяется к белку в участках, пространственно удаленных от гема. Как называется такой вид регуляции?

- А. Регуляция по принципу обратной связи.
Б. Частичный протеолиз молекулы фермента.
В. Присоединение или отщепление белка-регулятора.
Г. Присоединение или отщепление низкомолекулярного эффектора (модулятора).
Д. Фосфорилирование молекулы.

Задание 4. В клетках *E. coli* синтез пиримидиновых нуклеотидов осуществляется по схеме метаболического пути: $CO_2 + NH_3 + 2ATP \rightarrow P_1 \rightarrow P_2 \rightarrow УТФ \rightarrow ЦТФ$. При увеличении в клетке концентрации ЦТФ синтез пиримидиновых нуклеотидов прекращается. Какой вид регуляции описан?

- А. Аллостерическая регуляция. Б. Частичный протеолиз.
В. Фосфорилирование молекулы фермента. Г. Присоединение белков ингибиторов.
Д. Отщепление белков ингибиторов.

Задание 5. В инкубационную среду, содержащую субстраты аланин, аспартат и креатин, внесли ферменты: аланинаминотрансферазу, аспартатаминотрансферазу и креатинкиназу. Какие общие признаки характерны для этих ферментов?

- А. Ферменты катализируют одну и ту же реакцию.
Б. Ферменты катализируют один тип реакций.
В. Являются изоферментными формами.
Г. Осуществляют передачу нервных импульсов.
Д. Обладают групповой специфичностью.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — нет. 2 — А. 3 — Г.

Для самостоятельной работы:

1.1 — Б. 1.2 — В. 2.1 — В. 2.2 — Г. 3.1 — А. 3.2 — А, Д. 3.3 — Б.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. Количественное определение активности α -амилазы слюны

Метод основан на определении наименьшего количества амилазы (при максимальном разведении слюны), полностью расщепляющего весь добавленный крахмал. Амилазная активность слюны выражается количеством 0,1% раствора крахмала в миллилитрах, которое расщепляется 1 мл неразведенной слюны при 38°C в течение 30 мин. В норме амилазная активность слюны равна 160–320. Амилазная активность обозначается «А 38°/30'». Этот метод широко используется для определения амилазной активности крови и мочи.

Порядок выполнения работы. В 10 пробирок наливают по 1 мл воды и в 1-ю из них добавляют 1 мл разведенной в 10 раз слюны. Содержимое этой пробирки перемешивают, несколько раз втягивая и выпуская жидкость из пипетки. Набирают в пипетку 1 мл смеси и переносят ее во 2-ю пробирку. Содержимое этой пробирки перемешивают и 1 мл смеси переносят в 3-ю пробирку и т. д. до 10-й пробирки. Из 10-й пробирки отбирают 1 мл смеси и выливают. Во все пробирки добавляют по 1 мл воды и по 2 мл 0,1% раствора крахмала, перемешивают, встряхивая пробирки, и помещают в термостат при 38°C на 30 мин. После инкубации пробирки охлаждают водопроводной водой, добавляют по 1 капле 0,1% раствора йода и перемешивают. При реакции с йодом жидкость в пробирках окрашивается в желтый, розовый и фиолетовый цвета. Отмечают последнюю пробирку с желтой окраской, где гидролиз крахмала прошел полностью и делают расчет. Полученные данные заносят в таблицу:

Гидролиз крахмала в присутствии ферментов слюны при различном ее разведении

	Разведение слюны									
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
	Пробирки									
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я	8-я	9-я	10-я
Окраска раствора с йодом										
Выводы										

Расчет. Отметив пробирку, где гидролиз крахмала прошел полностью при наименьшем количестве фермента (желтая окраска раствора), по количеству неразведенной слюны в данной пробирке рассчитывают амилазную активность слюны по следующей пропорции: A мл слюны расщепили 2 мл 0,1% раствора крахмала; 1 мл слюны расщепил x мл 0,1% раствора крахмала, где A — количество неразведенной слюны. Например, желтая окраска появилась в 4-й пробирке, где слюна была разведена в 160 раз; 1/160 мл слюны расщепили 2 мл 0,1% раствора крахмала; 1 мл неразведенной слюны расщепил x мл 0,1% раствора крахмала:

$$x = 2 \cdot 1 \cdot 160 / 1 = 320 \text{ мл } 0,1\% \text{ раствора крахмала.}$$

Следовательно, амилазная активность $A_{38^0/30^0}$ равна 320.

Ответ:

Работа 2. *Количественное определение активности амилазы (диастазы) мочи*

Метод основан на определении времени, необходимого для полного расщепления крахмала в присутствии 1 мл мочи. Условно за единицу активности амилазы мочи принимают количество фермента, расщепляющее 2 мг крахмала за 15 мин. Активность амилазы выражают количеством единиц в 1 мл мочи. В норме она составляет 1–2 ЕД.

Моча здоровых людей обладает низкой амилазной активностью по сравнению с амилазой слюны. Определение активности α -амилазы в моче и сыворотке крови широко используется в клинике при диагностике заболеваний поджелудочной железы. В 1-е сутки заболевания амилазная активность увеличивается в моче и сыворотке крови в десятки раз, а затем постепенно возвращается к норме. При почечной недостаточности амилаза в моче отсутствует.

В детском возрасте увеличение активности амилазы наблюдается при эпидемическом паротите, что указывает на одновременное поражение поджелудочной железы вирусом паротита. Вирус гриппа также поражает поджелудочную железу, но реже.

Порядок выполнения работы. На сухое предметное стекло капают в разных местах по одной капле 0,1% раствора йода в йодиде калия (всего 8–10 капель). В пробирку вносят 2 мл 0,1% раствора крахмала, содержащего 2 мг крахмала, 1 мл 0,85% раствора хлорида натрия и помещают пробирку в водяную баню при температуре 37°C на 2 мин. Через 2 мин, не вынимая пробирку из бани, добавляют в нее 0,5 мл мочи, перемешивают и отмечают время начала реакции. Затем каждые 2–3 мин стеклянной палочкой переносят каплю смеси из пробирки на предметное стекло в каплю раствора йода и так продолжают до тех пор, пока окраска капли йода не перестанет изменяться, т.е. останется желтой. Отмечают время реакции в мин. Активность амилазы мочи рассчитывают по формуле:

$$X_{\text{ед}} = 15 / (T \cdot 0,5),$$

где $X_{\text{ед}}$ — активность амилазы в 1 мл мочи; 15 — время, необходимое для полного расщепления 2 мг крахмала, мин; 0,5 — количество мочи, взятое в реакционную смесь, мл; T — время реакции, мин.

Ответ:

Выводы:

Подпись преподавателя:

7. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Химия белков, ферменты»

1. Классификация и физико-химические свойства аминокислот (общие и специфические). Роль в структурной организации белка.
2. Первичная структура белка и методы ее определения. Свойства пептидной связи. Значение биуретовой реакции для качественного и количественного определения белка в биологических жидкостях.
3. Вторичная, надвторичная, третичная, четвертичная структуры белковой молекулы. Особенности структурной организации, разновидности, типы стабилизирующих связей, методы изучения.
4. Основы функционирования белков.
5. Растворимость белков.

- Почему белки растворяются в воде? Факторы устойчивости белков в растворе.
- Высаливание и осаждение белков. Механизм и практическое использование.
- Денатурация белка, денатурирующие факторы, использование в медицине.
- 6. Гидролиз белка. Типы гидролиза, роль в организме. Методы определения полноты гидролиза. Практическое использование.
- 7. Методы выделения и очистки белков.
 - Этапы исследования структуры белка.
 - Методы очистки белка от низкомолекулярных примесей.
 - Принципы разделения и очистки белков методами хроматографии:
 - а) адсорбционной;
 - б) распределительной;
 - в) ионообменной;
 - г) аффинной;
 - д) гель-хроматографией.
 - Ультрацентрифугирование. Принцип метода.
 - Электрофорез. Принцип метода, практическое применение. Электрофорез в полиакриламидном геле. Изоэлектрофокусирование.
 - Метод «отпечатков пальцев» (метод Ингрэма). Принцип метода, практическое применение.
 - Вестерн-блот. Основные этапы, практическое применение. Понятие «молекулярный зонд».
- 8. Сложные белки. Строение, классификация, биологическая роль каждого класса.
- 9. Какие функции выполняют в организме белки и пептиды?
- 10. Методы искусственного синтеза белков и пептидов.
- 11. Ферменты, классификация. Уметь назвать класс фермента и порядковый номер класса на основании приведенной реакции.
- 12. Свойства ферментов. Термоллабильность, специфичность, влияние рН и концентрации субстрата на активность фермента. Понятие о кинетике ферментативных реакций. Константа Михаэлиса и принципы ее определения.
- 13. Активность фермента, единицы измерения активности.
- 14. Активный центр и его строение.
- 15. Коферменты, классификация.
- 16. Механизмы регуляции активности ферментов, обратимая и необратимая регуляция, изостерическая и аллостерическая регуляция, ковалентная модификация структуры фермента.
- 17. Механизмы регуляции количества фермента в клетке (схема Львова-Жакоба–Моно).
- 18. Множественные формы ферментов (изоферменты и собственно множественные формы), примеры, биологическая роль.
- 19. Примеры использования ферментов и их регуляторов в медицинской практике.

8. Введение в метаболизм.

Центральные метаболические пути (окислительное декарбоксилирование пвк, лимоннокислый цикл Кребса)

Актуальность темы

Знание закономерностей и особенностей метаболизма необходимо для дальнейшего изучения обмена углеводов, липидов и белков на уровне клетки и организма, для понимания механизмов регуляции их метаболизма и возможной коррекции нарушений обмена веществ. Усвоив значение центральных метаболических путей для энергообеспечения клеток, можно понять причины гипоксических состояний и их связь с клеточной энергетикой. Поскольку нарушения энергетического обмена лежат в основе патогенеза многих заболеваний, знание механизма функционирования цикла Кребса позволит врачу провести правильную коррекцию метаболических нарушений (кокарбоксилаза, компоненты адениловой системы, сукцинат и др.).

Цель занятия

Получить представление о метаболизме, анаболических и катаболических метаболических путях, их взаимосвязи на различных уровнях. Сформировать представление об окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты и лимоннокислом цикле Кребса как центральных метаболических путях, о значении водороддонорной функции ЦТК для дальнейших окислительно-восстановительных реакций в цепи тканевого дыхания, понять катаболическую и анаболическую функции цикла Кребса.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **биологии:**
 - понятия «обмен веществ», «ассимиляция», «диссимиляция» и связь между ними;
- **общей химии:**
 - понятие «окислительно-восстановительные реакции», способы окисления веществ, основы биоэнергетики, понятия «макроэргическая связь», «макроэрг»;
- **биоорганической химии:**
 - строение АМФ, АДФ, АТФ, пиррофосфата, дикарбоновых, трикарбоновых кислот, α -кетокислот, гидроксикислот;
- **нормальной физиологии:**
 - понятие «основной обмен», энергетическая роль обмена веществ;
- **цитологии:**
 - структура митохондрий;
- **биохимии:**
 - класс оксидоредуктазы; дегидрогеназы; строение коферментов ФМН, ФАД, НАД⁺, НАДФ⁺; реакции декарбоксилирования.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. К раствору гидрохинона добавили окислитель, в результате чего раствор потемнел. Какова причина изменения окраски гидрохинона?

- А. Гидрохинон присоединил 2 электрона.
- Б. Гидрохинон окислился.
- В. Гидрохинон присоединил 2 атома водорода.
- Г. Гидрохинон восстановился.
- Д. Гидрохинон отдал 2 атома водорода.

Задание 2. Проанализируйте формулы указанных ниже соединений и укажите, к какому классу веществ они относятся:

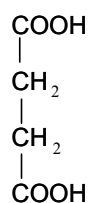
А. Дикарбоновые кислоты.

Б. Трикарбоновые кислоты.

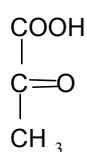
В. Монокарбоновые кислоты.

Г. α -Кето кислоты.

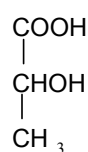
Д. Гидроксикислоты.



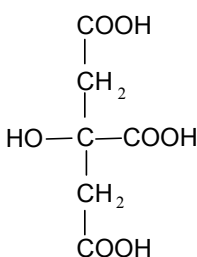
2.1



2.2



2.3

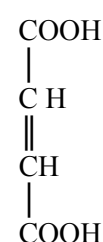
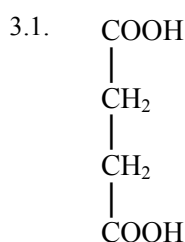


2.4

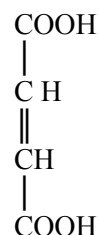
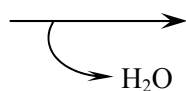
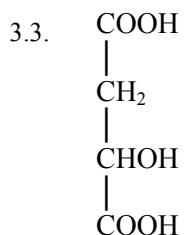
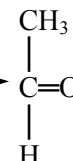
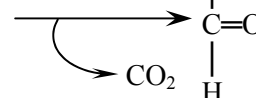
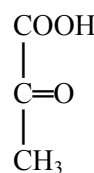


2.5

Задание 3. К написанным ниже реакциям подобрать ферменты. Указать класс.



3.2.



Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Метаболизм, линейные и циклические метаболические пути, регуляторные (ключевые) ферменты.
2. Катаболизм и анаболизм, различия и взаимосвязь между ними.
3. Реакции дегидрирования как основной способ окисления веществ в организме. Пиридинзависимые и флавинзависимые дегидрогеназы. Роль витаминов РР и В₂ в окислительно-восстановительных реакциях. Схематическое строение коферментов НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН.
4. Адениловая система клетки, ее участие в энергетическом обмене. Центральная роль АТФ в процессах, связанных с затратой энергии. Способы синтеза АТФ: субстратное, окислительное и фотосинтетическое фосфорилирование. Понятие о макроэргах.
5. Окислительное декарбоксилирование ПВК. Пируватдегидрогеназный комплекс (ферменты, коферменты, схема).
6. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) как центральный метаболический путь. Локализация ферментов ЦТК, схема процесса, ферменты, коферменты.
7. Дегидрогеназные реакции ЦТК как источник водорода для системы тканевого дыхания. Декарбоксилирование в цикле Кребса как механизм образования в клетках СО₂ — конечного продукта катаболизма соединений углерода.
8. Функции ЦТК: катаболическая, анаболическая, энергетическая. Регуляция.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 204–212, 259–267.
2. Николаев, А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 160–164, 172–175, 212–222.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Марри, Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.
2. Страйер, Л. Биохимия / Л. Страйер. М. : Мир, 1985. Т. 2. С. 6–21, 49–68.

Задания для самостоятельной работы

Для усвоения материала темы следует обратить внимание на то, что:

1. ЦТК представляет собой конечный общий путь для окисления продуктов распада белков, жиров и углеводов.
2. ЦТК служит источником строительных блоков для процессов биосинтеза (гем, аминокислоты, глюкоза и т. д.).
3. Большинство топливных молекул вступают в цикл в виде ацетил-КоА.
4. В ходе реакций цикла дважды происходит декарбоксилирование с образованием конечного продукта — CO_2 .
5. В результате четырех дегидрогеназных реакций восстанавливаются три молекулы НАД^+ и одна молекула ФАД. Эти восстановленные переносчики окисляются затем в цепи переноса электронов внутренней мембраны митохондрий.
6. ЦТК функционирует только в аэробных условиях, поскольку регенерация восстановленных коферментов происходит только при переносе электронов на O_2 .
7. Перенос электронов на кислород сопряжен с одновременным образованием АТФ (окислительное фосфорилирование). Скорость цикла зависит, в первую очередь, от энергетического заряда клетки.

Задание 1. У экспериментальных животных исследовали влияние витаминов на скорость ЦТК. При отсутствии какого витамина скорость реакций ЦТК не нарушалась?

- А. Цианокобаламин. Б. Тиамин. В. Пантотеновая кислота.
Г. Никотинамид. Д. Рибофлавин.

Задание 2. В ходе реакций цикла Кребса происходит восстановление коферментов четырех дегидрогеназ. Укажите субстраты ЦТК, причастные к появлению атомов водорода в составе соответствующих коферментов:

- А. Цитрат. Б. α -Кетоглутарат. В. Фумарат. Г. Малат.
Д. Аконитат. Е. Изоцитрат. Ж. Сукцинат.

Задание 3. Подберите ферменты к соответствующим реакциям:

1. Оксалоацетат + ацетил-КоА + H_2O → цитрат + КоА-SH.
 2. Изоцитрат + НАД^+ → α -кетоглутарат + НАДНН^+ + CO_2 .
 3. Сукцинил-КоА + ГДФ + H_3PO_4 ↔ сукцинат + ГТФ + КоА-SH.
 4. Фумарат + H_2O ↔ малат.
- А. Фумаратгидратаза. Б. Цитратсинтаза.
В. Сукцинил-КоА-синтетаза. Г. Изоцитратдегидрогеназа.

Задание 4. К каждому ферменту подберите соответствующий кофермент:

1. Сукцинатдегидрогеназа. А. ФМН.
2. НАДНН^+ -дегидрогеназа. Б. ФАД.
3. Малатдегидрогеназа. В. НАД^+ .
4. α -Кетоглутаратдегидрогеназный. Г. ТПФ.

комплекс ферментов.

Д. КоА-SH.

Е. Липоевая кислота.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. В цикле лимонной кислоты для расщепления ацетил-КоА используются восемь ферментов:

1) цитратсинтаза; 2) аконитатгидратаза; 3) изоцитратдегидрогеназа; 4) α -кетоглутаратдегидрогеназа; 5) сукцинил-КоА-синтаза; 6) сукцинатдегидрогеназа; 7) фумаратгидратаза; 8) малатдегидрогеназа.

1.1. Напишите химическую реакцию (схема), катализируемую каждым из этих ферментов.

1.2. Какой кофермент или коферменты необходимы для работы третьего, четвертого, шестого и восьмого ферментов?

1.3. Для каждого из ферментов укажите, к какому из перечисленных ниже типов принадлежит катализируемая им реакция: конденсация, дегидратация, гидратация, декарбоксилирование, окислительно-восстановительная реакция, фосфорилирование на уровне субстрата, изомеризация.

1.4. Укажите, к какому классу относится каждый из ферментов цикла Кребса.

Задание 2. У экспериментального животного на фоне внутривенного введения глюкозы определили снижение активности ферментов ЦТК. Какие соединения являются непосредственными их ингибиторами?

А. НАДФНН⁺. Б. НАД⁺. В. НАДНН⁺. Г. АТФ. Д. АДФ.

Задание 3. Будет ли происходить накопление оксалоацетата, если к экстракту, содержащему субстраты, ферменты и коферменты ЦТК, добавить ацетил-КоА? Объясните Ваш ответ.

Задание 4. В клинику доставили пострадавших во время землетрясения, находившихся без пищи 10 дней. Исследования активности ферментов ЦТК показали резкое снижение скорости этого процесса. Какие последствия это имеет для организма?

А. Обезвоживание. Б. Снижение уровня АТФ. В. Снижение уровня глюкозы в крови.

Г. Образование большого количества эндогенной воды.

Задание 5. В образовании ацетил-КоА из пирувата участвует мультиферментный комплекс. Выберите коферменты, необходимые для работы этого комплекса:

А. ФМН, HS-КоА, ТПФ, НАД⁺. Б. ФМН, HS-КоА, ТПФ, НАД⁺, ЛК.

В. ФМН, HS-КоА, ТПФ, НАДФ⁺. Г. ФАД, HS-КоА, ТПФ, НАД⁺, ЛК.

Д. ФАД, HS-КоА, ТПФ, НАД⁺.

Эталонные ответы к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – Б, Д. 2.1 – А. 2.2 – Г. 2.3 – Д. 2.4 – Б. 2.5 – В.

3.1 — дегидрогеназа, I. 3.2 — декарбоксилаза, IV. 3.3 — дегидратаза, IV.

Для самостоятельной работы:

1 — А. 2 — Б, Г, Е, Ж. 3 — (1 – Б, 2 – Г, 3 – В, 4 – А). 4 — (1 – Б, 2 – А, 3 – В, 4 – Б, В, Г, Д, Е).

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Изучение функционирования ЦТК по убывли ацетил-КоА*

Принцип метода. Первый этап ЦТК — реакция конденсации ацетил-КоА с оксалоацетатом, которая осуществляется цитратсинтазой. Образовавшаяся лимонная кислота подвергается превращению в цикле трикарбоновых кислот, а освободившийся КоА-SH можно определять, используя реактив Фолина (появляется синее окрашивание). Если заблокировать ЦТК малоновой кислотой, то ацетил-КоА не используется и КоА-SH не образуется. Для работы используем готовый гомогенат печени.

Схема постановки опыта:

№ п/п	Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
1	Фосфатный буфер рН=7,4	2,0	2,0
2	Р-р ацетил-КоА	0,5	0,5
3	Р-р оксалоацетата	0,5	0,5
4	Р-р малоновой кислоты	1,0	—
5	Физиологический р-р	—	1,0
6	Гомогенат печени	0,5	0,5
Инкубация 10 минут при комнатной температуре			
7	Реактив Фолина А	0,5	0,5
8	Реактив Фолина Б	0,5	0,5

Результат (окраска растворов):

Выводы:

Работа 2. Изучение функционирования ЦТК по образованию углекислого газа

Принцип метода. При окислении ацетил-КоА в ЦТК образуется углекислый газ, который связывается гидроксидом кальция и определяется при добавлении серной кислоты по выделению пузырьков газа.

Схема постановки опыта:

№ п/п	Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
1	Фосфатный буфер рН=7,4	2,0	2,0
2	Р-р ацетил-КоА	0,5	0,5
3	Р-р оксалоацетата	0,5	0,5
4	Р-р малоновой кислоты	1,0	—
5	Инкубационный раствор	—	1,0
6	Р-р Ca(OH) ₂	1,0	1,0
7	Гомогенат печени	0,5	0,5
Инкубация 10 минут при комнатной температуре			
8	0,1н р-р серной кислоты	1,0	1,0

Результат (выделение углекислого газа):

Выводы:

Работа 3. *Изучение функционирования ЦТК по образованию атомов водорода*

Принцип метода. При окислении ацетил-КоА в ЦТК образуется 8 атомов водорода, которые отщепляются при участии соответствующих дегидрогеназ, в качестве акцептора используется 2,6-дихлорфенолиндофенол (2,6-ДХФИ). Если цикл функционирует, то 2,6-ДХФИ восстанавливается и обесцвечивается.

Схема постановки опыта:

№ п/п	Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
1	Фосфатный буфер pH=7,4	2,0	2,0
2	Р-р ацетил-КоА	—	0,5
3	Р-р ЩУК	—	0,5
4	Дистиллированная вода	1,0	—
5	Гомогенат печени	1,0	1,0
6	0,001н р-р ДХФИ	1,0	1,0
Инкубация 15–20 минут при комнатной температуре			

Результат (окраска растворов):

Выводы:

Подпись преподавателя:

9. Биологическое окисление. Пути утилизации кислорода клетками. Окислительное фосфорилирование

Актуальность темы

Знание процесса окисления водорода в митохондриях с образованием эндогенной воды, которое протекает с выделением значительного количества энергии, запасаемой в макроэргических связях АТФ, необходимо для понимания основного пути утилизации кислорода в клетке в норме и патологии. Гипоэнергетические состояния, возникающие в результате нарушения работы дыхательной цепи, нарушения сопряжения дыхания и фосфорилирования, недостаточного поступления субстратов окисления, лежат в основе развития многих патологических состояний. Лечение последних требует четкого представления об окислительном фосфорилировании, о способах его регуляции, энергетической ценности субстратов, поставляющих атомы водорода в дыхательную цепь. Некоторые из них (субстраты цикла Кребса — цитрат, сукцинат) используются для коррекции метаболических нарушений. Оксигеназный путь утилизации кислорода имеет важное значение в процессах обезвреживания в организме ксенобиотиков и токсичных метаболитов.

Цель занятия

Получить представление о путях утилизации кислорода клетками; о локализации, строении и функционировании компонентов дыхательной цепи и цепи митохондриального окисления, об окислительном фосфорилировании. Усвоить, что сопряжение дыхания и фосфорилирования служит основой нормального энергообеспечения клетки. Научиться применять эти знания при последующем изучении клеточного метаболизма. Закрепить

3. Схема дыхательной цепи, пункты фосфорилирования, механизм формирования электрохимического потенциала.
4. Механизмы митохондриального синтеза АТФ. H^+ -АТФ-синтаза. Сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования. Хемииосмотическая теория Митчелла. Коэффициент фосфорилирования (P/O) для различных субстратов, поставляющих водород в дыхательную цепь.
5. Регуляция работы дыхательной цепи и H^+ -АТФ-синтазы.
6. Причины развития гипонергетических состояний. Разобщение окислительного фосфорилирования (механизм, разобщители). Ингибиторы переноса электронов и окислительного фосфорилирования.
7. Микросомное окисление, роль его в клетке.
8. Активные формы кислорода. Антиоксидантная защита.

Литература для подготовки

Основная литература

1. *Березов Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 204–225.
2. *Николаев А. Я.* Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 160–178, 199–212, 223–231.
3. *Конспект лекций.*

Дополнительная литература

1. *Марри Р.* Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993. Т. 1. С. 111–139.

Задания для самостоятельной работы

Для усвоения темы необходимо уяснить, что:

1. Окисление водорода в цепи тканевого дыхания является основным источником энергии для реакции синтеза АТФ.
2. Процесс образования воды в организме и вне его совершается с выделением 210–230 кДж/моль энергии.
3. В организме синтез H_2O происходит при участии дыхательной цепи.
4. Часть энергии этого процесса ($\approx 40\%$) используется для реакции синтеза АТФ.
5. Реакция окисления водорода субстратов в дыхательной цепи в организме сопряжена с процессом окислительного фосфорилирования (синтез АТФ из АДФ и H_3PO_4).
6. Коэффициент фосфорилирования (P/O) — это число молей АТФ, образованных в расчете на один атом кислорода, использованный в процессе тканевого дыхания.
7. Оксигеназный путь утилизации кислорода осуществляется в мембранах эндоплазматического ретикулума и способствует включению кислорода в субстрат. Таким способом происходит обезвреживание многих токсичных веществ (микросомное окисление).

Задание 1. Напишите схему дыхательной цепи для субстратов пиридинзависимых дегидрогеназ (малат, α -кетоглутарат, изоцитрат). Укажите коэффициент фосфорилирования.

Задание 2. Напишите схему дыхательной цепи для субстратов, дегидрируемых с участием ФАД. Укажите коэффициент фосфорилирования. Сколько АТФ будет синтезировано при окислении 5 моль сукцината?

Задание 3. Какое (какие) из приведенных утверждений верно? Последовательность расположения компонентов дыхательной цепи определяется:

- А. Химической структурой переносчика электронов.
- Б. Величиной редокс-потенциала (E_0).
- В. Величиной протонного электрохимического потенциала ($\Delta\mu H^+$).
- Г. Является произвольной.

Задание 4. Подберите к каждому комплексу дыхательной цепи соответствующий небелковый компонент:

- | | |
|--|----------------------------|
| 1. НАДН·Н ⁺ : убинон оксидоредуктаза. | А. ФАД. |
| 2. Убихинол : цитохром с оксидоредуктаза. | Б. Гем. |
| 3. Сукцинатдегидрогеназа. | В. ФМН. |
| 4. Цитохромоксидаза. | Г. НАД ⁺ . |
| | Д. Гем, Cu ²⁺ . |

Задание 5. Подберите к этим же ферментативным комплексам (см. задание 4) соответствующие ингибиторы:

- А. Цианиды. Б. СО. В. Н₂S. Г. Азид натрия. Д. Амитал (барбитуровая кислота).
Е. Ротенон. Ж. Антимидин А. З. Малонат.

Задание 6. Выберите правильный ответ.

Свободные радикалы кислорода:

- А. Стимулируют разрывы связей в молекулах нуклеиновых кислот.
Б. Повреждают ненасыщенные жирные кислоты клеточных мембран.
В. Тормозят синтез простагландинов.
Г. Осуществляют иммунную защиту организма.
Д. Способствуют образованию сшивок и нарушению функционирования белков.
Е. Тормозят процессы обезвреживания ксенобиотиков в печени.

Задание 7. Укажите компоненты ферментативной антиоксидантной защиты клетки:

- А. Супероксиддисмутаза.
Б. Каталаза.
В. Оксидаза L-аминокислот.
Г. Глутаматдегидрогеназа.
Д. Глутатионпероксидаза.

Задание 8. Выберите компоненты монооксигеназных цепей, участвующих в микросомном окислении:

- А. НАДФН·Н⁺.
Б. Аскорбиновая кислота.
В. Изоцитрат.
Г. Цитохром b.
Д. Цитохром P₄₅₀.
Е. Цитохром c.

Задание 9. Подберите к каждому из путей утилизации кислорода соответствующие характеристики:

- | | |
|--|---|
| 1. Оксидазный путь утилизации кислорода. | А. Не дает клетке энергию в виде АТФ. |
| 2. Оксигеназный путь утилизации кислорода. | Б. Способствует включению кислорода в субстрат. |
| | В. Сопровождается образованием эндогенной воды. |
| | Г. Сопровождается синтезом АТФ. |
| | Д. Осуществляется в митохондриях. |
| | Е. Идет в мембранах эндоплазматического ретикулума. |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Какое (какие) из приведенных утверждений неверно согласно хемиосмотической теории Митчелла?

А. В процессе функционирования дыхательной цепи происходит перенос H^+ через внутреннюю мембрану в матрикс митохондрий.

Б. Энергия, выделяющаяся при транспорте электронов I, III, IV комплексами дыхательной цепи, используется на перекачивание протонов из матрикса в межмембранное пространство.

В. В процессе тканевого дыхания на внутренней мембране митохондрий формируется протонный электрохимический потенциал.

Г. Энергия электрохимического потенциала на внутренней митохондриальной мембране используется для работы V комплекса дыхательной цепи.

Д. Обратный ток протонов из межмембранного пространства в матрикс по протонным каналам H^+ -АТФ-синтазы сопровождается синтезом АТФ.

Задание 2. Какие из следующих утверждений характеризуют H^+ -АТФ-синтазу?

А. V ферментный комплекс на внутренней мембране митохондрий.

Б. Ингибируется олигомицином.

В. Имеет протонные каналы.

Г. Может проявлять АТФ-азную активность.

Д. Переходит в рабочее состояние под влиянием движущихся через нее протонов.

Е. Ингибируется атрактилозидом.

Задание 3. Процесс тканевого дыхания стимулируется при добавлении к суспензии митохондрий:

А. АТФ. Б. АДФ. В. KCN. Г. Барбитуратов. Д. 2,4-Динитрофенола.

Задание 4. Причинами гипоэнергетических состояний (нарушение синтеза АТФ) в митохондриях могут быть:

А. Недостаток субстратов тканевого дыхания.

Б. Недостаток кислорода.

В. Избыток витаминов PP и B_2 .

Г. Добавление к изолированным дышащим митохондриям олигомицина.

Д. Низкая концентрация АДФ в матриксе митохондрии.

Е. Разобщение с участием 2, 4-динитрофенола.

Задание 5. В клинику поступила пациентка с отравлением снотворными препаратами — производными барбитуровой кислоты. Какие соединения нужно ввести больной для восстановления тканевого дыхания на период выведения снотворного препарата из организма?

А. Изоцитрат. Б. Ацил-КоА. В. Малат. Г. Сукцинат.

Задание 6. Студенты в лабораторной работе *in vitro* исследовали действие малоната на ряд ферментов цикла Кребса. Накопление какого метаболита они обнаружили?

А. Малат. Б. Изоцитрат. В. Сукцинат. Г. Сукцинил-КоА. Д. α -Кетоглутарат.

Задание 7. Сколько моль АТФ может синтезироваться при окислении 1 моль субстрата в указанных процессах?

1. Ацетил-КоА \rightarrow $CO_2 + H_2O$.

А. 4 моль.

2. Сукцинат \rightarrow ЩУК.

Б. 10 моль.

3. α -Кетоглутарат \rightarrow ЩУК.

В. 7,5 моль.

4. Изоцитрат → сукцинат.
 5. Сукцинат → CO₂, H₂O.

- Г. 6 моль.
 Д. 24 моль.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

- 1 — В.
 2 — Б, Г, Д, Е.
 4.1 — (А – изоцитрат ДГ; Б – α-кетоглутарат ДГ; В – сукцинат ДГ; Г – малат ДГ).
 4.2 — (А – НАД⁺; Б – НАД⁺, ФАД, ТПФ, КоА, липоевая кислота; В – ФАД; Г – НАД⁺).
 4.3 — (А, Б, Г – пиридиновые ДГ; В – флавиновая ДГ).

Для самостоятельной работы:

- 1 — P/O = 2,5. 2 — P/O = 1,5, синтезируется 7,5 АТФ. 3 — Б. 4 — (1 – В; 2 – Б; 3 – А; 4 – Д). 5 — (1 – Д, Е; 2 – Ж; 3 – З; 4 – А, Б, В, Г). 6 — (А, Б, Г, Д). 7 — (А, Б, Д). 8 — (А, Б, Д). 9 — (1 – В, Г, Д; 2 – А, Б, Е).

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. Изучение реакций окислительного фосфорилирования

Принцип метода. При окислении различных субстратов в дыхательной цепи высвобождается энергия, часть которой используется на реакцию окислительного фосфорилирования. Степень последнего (энергетическая ценность субстратов) определяется по убыли неорганического фосфата (коэффициент P/O = 1,5–2,5). Используя различные субстраты (яблочная, янтарная, аскорбиновая кислоты), оцениваем степень окислительного фосфорилирования. Содержание фосфорной кислоты определяем в реакции с молибдатом аммония и редуцирующим раствором аскорбиновой кислоты по интенсивности окраски образующейся молибденовой сини.

Ход работы. В четыре пробирки вносят реактивы согласно схеме:

№ п/п	Содержимое пробирок	Контроль				Опыт			
		1 (мл)	2 (мл)	3 (мл)	4 (мл)	1 (мл)	2 (мл)	3 (мл)	4 (мл)
1	Инкубационная смесь	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2	Физиологический раствор	0,5	—	—	—	—	—	—	—
3	Раствор яблочной кислоты	—	0,5	—	—	—	—	—	—
4	Раствор янтарной кислоты	—	—	0,5	—	—	—	—	—
5	Раствор аскорбиновой кислоты + цитохром с	—	—	—	0,5	—	—	—	0,5
6	Суспензия митохондрий	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Инкубация 10 минут при комнатной температуре, затем добавляют:									
7	Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
8	Раствор молибдата аммония	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
9	Редуцирующий раствор Фиске и Субарроу	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
10	Содержимое всех пробирок разбавить водой в 8 раз								

Инкубация 10 минут.

Результаты (интенсивность окраски по четырехбальной шкале):

Коэффициент P/O:

Выводы:

Работа 2. *Изучение влияния 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) на окислительное фосфорилирование*

Принцип метода. 2,4-ДНФ — разобщитель фосфорилирования, сопряженного с окислением. Об окислительном фосфорилировании судят по убыли в инкубационной среде неорганического фосфата, который определяется, как описано в работе № 1.

№№	Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
1	Раствор яблочной кислоты	0,5	0,5
2	Раствор 2,4-ДНФ	—	0,5
3	Физиологический раствор	0,5	—
4	Суспензия митохондрий	0,5	0,5
Инкубация 10 минут при комнатной температуре			
5	Раствор ТХУ	1,0	1,0
6	Раствор молибдата аммония	0,5	0,5
7	Редуцирующий раствор	1,0	1,0

Результаты (интенсивность окраски):

Выводы:

Работа 3. *Открытие альдегиддегидрогеназы в молоке*

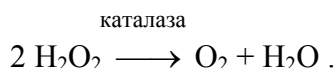
Фермент вырабатывается микроорганизмами, попадающими в молоко извне. По химической природе он относится к флавопротеинам, способным окислять альдегиды, в частности, формальдегид. При добавлении к некипяченому молоку формальдегида и метиленовой сини альдегиддегидрогеназа окисляет формальдегид в муравьиную кислоту, а освобождающийся при этом водород переносится на метиленовую синь, восстанавливая ее в бесцветное соединение.

Ход работы. В одну пробирку вносят 15 капель кипяченого молока, в другую — 15 капель некипяченого. В каждую пробирку вносят по капле 0,4% раствора формальдегида и по капле 0,01% раствора метиленовой сини. Пробирки встряхивают и закрывают пробками, чтобы создать относительно анаэробные условия.

Пробирки помещают в термостат при 37°C и отмечают через 5 мин постепенное обесцвечивание метиленовой сини.

Работа 4. *Обнаружение каталазы крови*

В процессе тканевого дыхания образуется не только вода, но и токсичная для клеток перекись водорода. Разложение перекиси водорода катализируется гемсодержащим ферментом — каталазой:



Ход работы. В пробирку вносят 10–15 капель 3% H_2O_2 и 1 каплю крови. Отмечают выделение пузырьков кислорода.

Работа 5. *Открытие пероксидазы*

Как и каталаза, пероксидаза — гемсодержащий фермент. Пероксидаза катализирует окисление некоторых веществ (фенолы, ароматические амины) в присутствии перекиси водорода. В организме млекопитающих пероксидазной активностью обладают гемоглобин, миоглобин и цитохромы. Об активности пероксидазы можно судить по изменению окраски гваяковой смолы в присутствии перекиси водорода.

Ход работы. В две пробирки наливают по 5 капель 1% раствора гваяковой смолы или 1% раствора бензидина в ледяной уксусной кислоте и по 5 капель 3% раствора H_2O_2 . В первую пробирку добавляют 1 каплю крови, во вторую — 1 каплю H_2O . Наблюдают за изменением окраски.

Выводы:

Подпись преподавателя:

10. Переваривание углеводов. Гликогенез и гликогенолиз. Гликолиз и спиртовое брожение

Актуальность темы

В практике врача встречаются заболевания, сопровождающиеся нарушением переваривания и всасывания углеводов пищи. Диагностика этих состояний и правильный подход к лечению основаны на знаниях, полученных на этом занятии. Состояние гипоксии часто встречается при заболеваниях внутренних органов. Перестройки внутриклеточного обмена при таких состояниях затрагивают и процесс гликолиза. Разные органы обладают неодинаковой способностью адаптироваться к гипоксии, что и лежит в основе направленного врачебного вмешательства. Знакомство с процессом гликолиза дает представление о возможностях энергетического обеспечения клеток в анаэробных условиях.

Цель занятия

Закрепить знания по структуре углеводов животных тканей и растительных углеводов пищи. Сформировать представление об особенностях переваривания углеводов, транспорта глюкозы в клетки, о молекулярных механизмах депонирования и мобилизации гликогена, физиологическом значении и регуляции этих процессов. Усвоить анаэробные процессы окисления глюкозы и их значения.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- *биоорганической химии:*
 - общее представление об углеводах;
 - химическое строение и свойства моносахаридов (глюкоза, галактоза, фруктоза);
 - строение олигосахаридов (мальтоза, лактоза, сахароза);
 - строение гомополисахаридов (крахмал, гликоген, декстраны, целлюлоза);
 - гидролиз полисахаридов *in vitro*;
- *биохимии:*
 - классификация ферментов, механизм действия, регуляция активности;
 - пути образования АТФ в клетках.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Указать, какие моносахариды входят в состав следующих соединений:

- | | |
|----------------------------------|--------------|
| 1. Глюкоза + глюкоза. | А. Лактоза. |
| 2. Глюкоза + фруктоза. | Б. Мальтоза. |
| 3. Галактоза + глюкоза. | В. Сахароза. |
| 4. Фруктоза+ глюкоза+ галактоза. | Г. Рафиноза. |

Задание 2. Какие из перечисленных ниже углеводов имеют свободный полуацетальный гидроксил и будут обладать восстанавливающими свойствами?

А. Сахароза. Б. Мальтоза. В. Крахмал. Г. Лактоза.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Переваривание углеводов, продукты, нарушения переваривания и их молекулярные механизмы, симптомы, подходы к диагностике и лечению. Роль клетчатки и пектинов в питании человека.
2. Всасывание продуктов переваривания углеводов, молекулярные механизмы, нарушения. Судьба всосавшихся моносахаридов. Транспорт глюкозы в клетки.
3. Синтез гликогена, назначение, последовательность реакций, энергозатраты и регуляция. Агликогеноз.
4. Распад (фосфоролитический, гидролитический) гликогена в печени и мышцах, последовательность реакций, регуляция. Гликогенозы.
5. Гликолиз, биологическая роль, субклеточная локализация, этапы (неокислительный, гликолитической оксидоредукции), реакции, ферменты, энергетический выход и механизм образования АТФ. Регуляция гликолиза, ключевые ферменты.
6. Спиртовое брожение. Реакции, общие с гликолизом. Различие гликолиза и спиртового брожения, регуляция.

Литература для подготовки

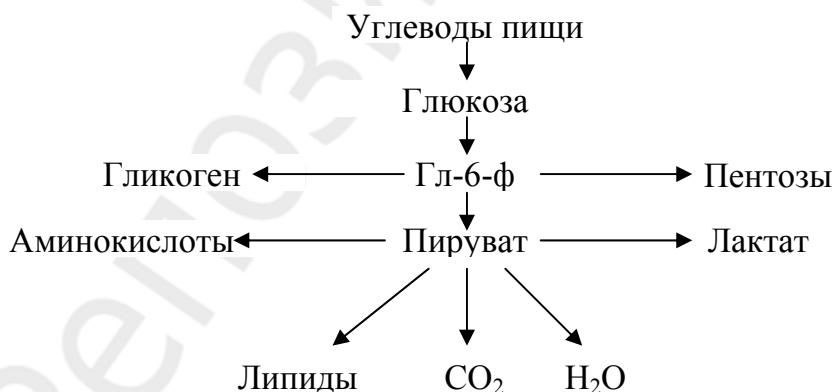
1. Березов, Г. Т. Биологическая химия / Г. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 226–252, 275.
2. Николаев, А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 232–237, 241–243, 245–254.
3. Конспект лекций.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Знать основные этапы переваривания углеводов в пищеварительном тракте. Усвоить, что в процессе переваривания углеводов происходит ферментативный гидролиз гликозидных связей. Запомнить названия ферментов, принимающих участие в переваривании, и место их образования.

Задание 2. Вспомнить способы всасывания моносахаридов из кишечника в кровь. Знать, что первое химическое превращение глюкозы в клетках — ее фосфорилирование, катализируемое гексокиназой (глюкокиназой). Уметь написать эту реакцию.

2.1. Рассмотреть схему превращения глюкозо-6-фосфата в клетке:



Задание 3. Запомнить:

- а) из каких мономеров построен гликоген;
- б) какие связи соединяют мономеры в молекуле гликогена;
- в) в каких органах преимущественно откладывается гликоген.

3.1. Выучить реакции синтеза и распада (фосфоролиза) гликогена. Уметь писать их в виде схемы, запомнить ферменты. Запомнить необратимые стадии процессов и реакции, связанные с потреблением энергии.

3.2. Запомнить реакции синтеза и распада гликогена, катализируемые регуляторными ферментами.

3.3. Объяснить молекулярный механизм перехода фосфоорилазы и гликогенсинтазы из неактивного состояния в активное.

Задание 4. Усвоить, что гликолиз — серия реакций, в результате которых глюкоза распадается на две молекулы пирувата. Уметь писать эти реакции.

4.1. Обратить внимание на то, что:

- в гликолизе можно выделить несколько этапов:
 - а) подготовительный (активирование глюкозы и распад глюкозо-6-фосфата на две молекулы глицеральдегид-3-фосфата);
 - б) гликолитическая оксидоредукция (окисление глицеральдегид-3-фосфата до пирувата в аэробных условиях или до лактата в анаэробных условиях);
 - большинство реакций гликолиза, за исключением трех, обратимы;
 - все промежуточные продукты находятся в фосфорилированном состоянии;
 - источником фосфата при гликолизе является АТФ;
 - образование АТФ при гликолизе идет путем субстратного фосфорилирования.
- 4.2. Сравнить гликолиз со спиртовым брожением, установить сходство и различия.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. У больного, страдающего энтероколитом, после приема молока появились диарея, колики, метеоризм. С недостатком какого фермента это связано?

А. Амилазы. Б. Сахаразы. В. Лактазы. Г. Мальтазы. Д. Гликогенсинтазы.

Задание 2. Часть поступившей в организм глюкозы откладывается в виде гликогена. Какой фермент участвует в его синтезе?

А. Глюкозо-6-фосфатаза. Б. Фосфоорилаза. В. Гликогенсинтаза.
Г. α -1,4-Гликозидаза. Д. α -1,6-Гликозидаза.

Задание 3. Глюкозо-6-фосфат — основная активная форма глюкозы. Какой фермент участвует в ее образовании?

А. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Б. Гексокиназа. В. Глюкозо-6-фосфатаза.
Г. Глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза. Д. Фосфоглюкомутаза.

Задание 4. В гликолизе имеются реакции, приводящие к образованию макроэргических соединений. Выбрать такую реакцию.

А. Фосфодиоксиацетон \leftrightarrow глицеральдегид-3-фосфат.
Б. 3-Фосфоглицерат \leftrightarrow 2-фосфоглицерат.
В. Пируват \leftrightarrow лактат.
Г. Глицеральдегид-3-фосфат \leftrightarrow 1,3-дифосфоглицерат.
Д. Глюкоза \rightarrow глюкозо-6-фосфат.

Задание 5. Известно, что в гликолизе имеются реакции, сопряженные с синтезом АТФ путем субстратного фосфорилирования. Найти такую реакцию:

- А. Глюкоза → глюкозо-6-фосфат.
- Б. Фруктозо-6-фосфат → фруктозо-1,6-дифосфат.
- В. Фосфодиоксиацетон ↔ глицеральдегид-3-фосфат.
- Г. Глицеральдегид-3-фосфат ↔ 1,3-дифосфоглицерат.
- Д. Фосфоенолпируват → пируват.

Задание 6. В одной из реакций гликолиза образуется НАДН⁺. Какова его судьба в анаэробных условиях?

- А. Участвует в превращении малата в оксалоацетат.
- Б. Используется для восстановления оксалоацетата.
- В. Является источником электронов и Н⁺ для дыхательной цепи.
- Г. Превращает пируват в лактат.
- Д. Используется в субстратном фосфорилировании.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

- 1) 1 – Б; 2 – В; 3 – А; 4 – Г. 2) Б, В, Г.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Спиртовое брожение*

Спиртовое брожение – ферментативный процесс распада глюкозы с образованием этилового спирта и углекислого газа:



Процесс гликолиза и брожение протекают одинаково до образования пировиноградной кислоты с выделением тепла и образованием двух молекул АТФ. В анаэробных условиях под действием дрожжевой декарбоксилазы (ТПФ) пировиноградная кислота декарбоксилируется и превращается в уксусный альдегид, который восстанавливается в этиловый спирт под действием алкогольдегидрогеназы.

Порядок выполнения работы

1. Пробирку на 1/3 заполняют раствором дрожжей, доливают доверху 5% раствор глюкозы и закрывают корковой пробкой со стеклянной трубкой. Такой бродильный аппарат помещают в термостат при 37°C на 30–50 минут (в зависимости от активности ферментов дрожжей). Когда в процессе брожения произойдет накопление газа в верхней части пробирки, продельывают качественные реакции на CO₂ и спирт.

2. Обнаружение CO₂. В бродильный аппарат наливают 10% раствор едкого натра почти до краев пробирки и, закрыв отверстие большим пальцем, перемешивают ее содержимое. Углекислый газ поглощается щелочью, создавая вакуум, и палец присасывается к отверстию пробирки.

3. Обнаружение этилового спирта. Спирт можно открыть с помощью реакции получения йодоформа:



Для этого около 2–3 мл жидкости из бродильного аппарата отфильтровывают в пробирку, добавляют несколько капель 10% раствора йода до получения желтого окрашивания и нагревают, не доводя до кипения, в пламени спиртовки. Через некоторое время ощущается характерный запах йодоформа.

Работа 2. *Количественное определение пировиноградной кислоты в моче*

Пировиноградная кислота — один из промежуточных продуктов углеводного обмена. В анаэробных условиях (гипоксия) пировиноградная кислота восстанавливается в лактат. В аэробных условиях пировиноградная кислота под влиянием пируватдегидрогеназного комплекса (коферменты: ТПФ, липоевая кислота в виде амида, КоА-SH, НАД⁺, ФАД) в результате окислительного декарбоксилирования превращается в ацетил-КоА, который в цикле Кребса окисляется до CO₂ и H₂O.

За сутки с мочой выделяется 113,7–283,9 мкмоль/сут (10–25 мг) пировиноградной кислоты.

Принцип метода. Пировиноградная кислота, взаимодействуя с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде, образует 2,4-динитрофенилгидразоны пировиноградной кислоты желто-оранжевого цвета, интенсивность окрашивания которых пропорциональна концентрации пировиноградной кислоты.

Ход работы. Берут 2 пробирки: в контрольную наливают 1 мл H₂O, а в опытную — 1 мл мочи. Затем в обе пробирки приливают по 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидразинового р-ра и оставляют на 20 мин при комнатной температуре. После этого в каждую пробирку добавляют по 5 мл 0,4н NaOH и через 10 мин колориметрируют опытную пробу против контрольной пробы на реактивы (кюветы 10 мм), с зеленым светофильтром.

Расчет проводят по готовому калибровочному графику. Найденную величину умножают на суточный диурез (1500 мл для мужчин и 1200 мл для женщин) и получают содержание пировиноградной кислоты в суточной моче.

Результаты:

Клинико-

диагностическое

значение. При авитаминозе

и гиповитаминозе В₁ в крови и

других тканях, особенно в

мозге, накапливается большое

количество пировиноградной кислоты и увеличивается ее выделение с мочой. Содержание

этой кислоты в крови возрастает при сахарном диабете, сердечной недостаточности,

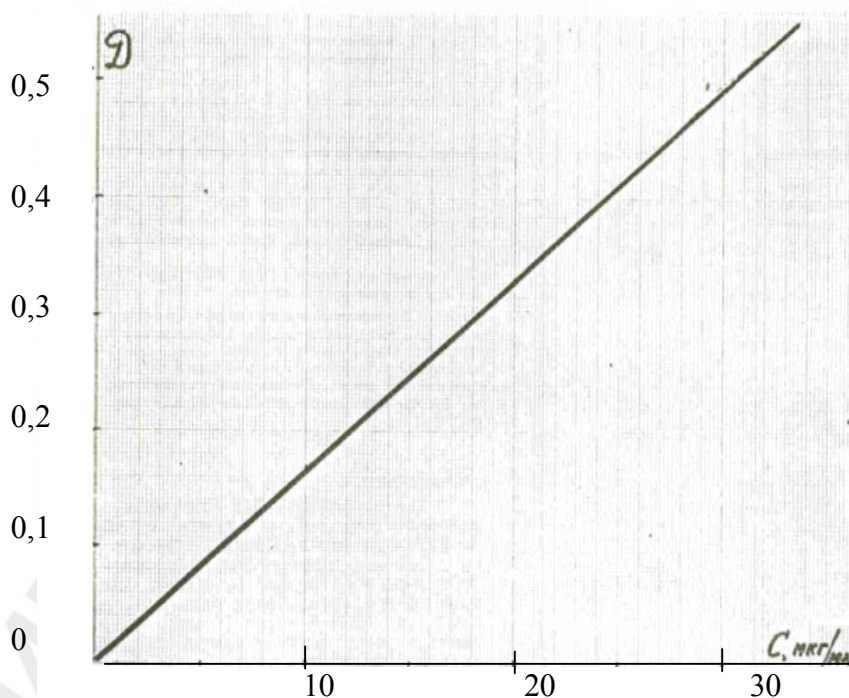
гиперфункции гипофизарно-адреналовой системы. Количество пировиноградной кислоты

увеличивается после введения некоторых лекарств — камфоры, стрихнина, адреналина. При

наркозе содержание этой кислоты в крови снижается.

Выводы:

Подпись преподавателя:



Калибровочный график зависимости величины оптической плотности раствора (D) от концентрации ПВК в пробе

11. Пути метаболизма пирувата.

Глюконеогенез. Аэробный распад глюкозы до конечных продуктов (CO₂ и H₂O). Количественное определение глюкозы в крови

Актуальность темы

Изучаются центральные пути, обеспечивающие связь анаболизма и катаболизма, пути, в которые вовлечены основные пищевые вещества (углеводы, белки, жиры). Понимание значения центральных метаболических путей, аэробных процессов обмена глюкозы для энергообеспечения клеток различных органов позволяет понять механизмы нарушения функций отдельных органов и систем при торможении этих процессов (гипогликемическая кома, ишемия и инфаркт миокарда и др.). В медицинской практике некоторые промежуточные продукты этих путей используются для коррекции метаболических нарушений (лимонная кислота, никотинамид, кокарбоксилаза, компоненты адениловой системы и др.). Содержание глюкозы в крови — основной биохимический показатель состояния углеводного обмена в организме. Отклонение его от нормы происходит при ряде заболеваний. На занятии изучаются механизмы поддержания нормального уровня глюкозы в крови.

Цель занятия

Закрепить знания о путях превращения ПВК в клетках в зависимости от энергетического статуса и особенностей окислительного метаболизма клеток, о глюконеогенезе как важном процессе поддержания уровня глюкозы в крови. Сформировать представление о взаимосвязи центральных путей метаболизма с аэробным гликолизом. Овладеть глюкозооксидазным методом количественного определения глюкозы.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– *биоорганической химии:*

- реакции окислительного декарбоксилирования α -кетокислот;
- реакции альдольной конденсации;
- природные макроэргические ацилирующие реагенты;

– *биологической химии:*

- тканевое дыхание, субстраты, механизм;
- гликолиз.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подобрать к каждому ферменту соответствующий кофермент:

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. НАДН·Н ⁺ – дегидрогеназа. | А. ФАД. |
| 2. QH ₂ – дегидрогеназа. | Б. Гем. |
| 3. Цитохромоксидаза. | В. ФМН. |
| 4. Малатдегидрогеназа. | Г. Гем, Cu ⁺ . |
| 5. Сукцинатдегидрогеназа. | Д. НАД ⁺ . |
| | Е. НАДФ ⁺ . |

Задание 2. Указать, в каких реакциях гликолиза используется, а в каких синтезируется АТФ:

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. 2-ФГК ↔ ФЕПВК. | А. Используется АТФ как донор фосфатной группы. |
| 2. 3-ФГА ↔ 1,3-ДФГК. | Б. Синтезируется АТФ. |
| 3. Фр-6-ф → фр-1,6-фф. | В. Реакция не связана с затратой или синтезом АТФ. |
| 4. ФЕПВК → ПВК. | |
| 5. Гл → гл-6-ф. | |
| 6. 1,3- ДФГК ↔ 3-ФГК. | |
| 7. Фр-1,6-фф ↔ 3-ФГА + ФДА. | |

Задание 3. Указать, к какому классу относятся перечисленные ферменты:

- | | |
|--------------------------|---------------------|
| 1. Гексокиназа. | А. Оксидоредуктазы. |
| 2. Альдолаза. | Б. Лиазы. |
| 3. Фосфофруктокиназа. | В. Лигазы. |
| 4. Фосфоглицераткиназа. | Г. Трансферазы. |
| 5. Дегидрогеназа 3-ФГА. | Д. Гидролазы. |
| 6. Енолаза. | Е. Изомеразы. |
| 7. Пируваткиназа. | |
| 8. Триозофосфатизомераза | |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Пируват как центральный метаболит. Пути превращения ПВК в зависимости от энергетического статуса и особенностей окислительного метаболизма клеток.
2. Восстановление пирувата в лактат (реакция, изоферменты ЛДГ, назначение реакций), цикл Кори. Утилизация лактата клетками.
3. Глюконеогенез (назначение, субстраты, ключевые реакции и ферменты, регуляция, энергозатраты).
4. Окислительное декарбоксилирование ПВК (биологическая роль, субклеточная локализация, реакции); пируватдегидрогеназный комплекс (ферменты, коферменты), регуляция активности пируватдегидрогеназы.
5. Лимоннокислый цикл (субклеточная локализация, схема реакций, энергетика, ферменты, регуляция, биологическая роль).
6. Аэробное окисление глюкозы до CO_2 и H_2O (этапы, сопряжение с процессом окислительного фосфорилирования, энергетика). Челночные механизмы транспорта цитоплазматического НАДН^+ .

Литература для подготовки

1. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин М. : Медицина, 1990. С. 255–267.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 237–241.
3. Конспект лекций.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Запомнить, что аэробный распад глюкозы — это процесс полного окисления ее до CO_2 и H_2O . Он включает реакции аэробного гликолиза (сравнить с анаэробным) и последующее окисление пирувата в общем пути катаболизма.

1.1. Написать реакции, катализируемые отдельными ферментами пируватдегидрогеназного комплекса.

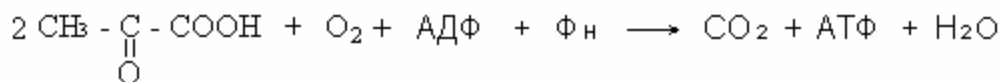
1.2. Определить количество молей АТФ, синтезируемое за счет дегидрирования 1 моля ПВК. Для этого:

- а) напишите суммарное уравнение окислительного декарбоксилирования;
- б) покажите путь от восстановленного кофермента до кислорода;
- в) вспомните определение коэффициента фосфорилирования и рассчитайте его для этого процесса.

Задание 2. Вспомните последовательность реакций, составляющих цитратный цикл, название ферментов, катализирующих эти реакции, и их коферменты.

2.1. Используя схему связи общего пути катаболизма с цепью тканевого дыхания, проследите путь водорода от окисляемых субстратов к кислороду и оцените выход АТФ для отдельных реакций и общего пути катаболизма в целом.

2.2. Подставьте в уравнение соответствующие коэффициенты:



Для этого:

а) найдите на схеме связи общего пути катаболизма с цепью тканевого дыхания реакции, в которых происходит декарбоксилирование, выпишите названия метаболитов, которые декарбоксилируются;

б) найдите на схеме реакции дегидрирования и выпишите названия первичных доноров водорода;

в) найдите на схеме компоненты дыхательной цепи, на которые поступает водород от первичных доноров;

г) расставьте коэффициенты в уравнении.

Задание 3. Выучите:

а) реакции синтеза глюкозы из ПВК (уметь писать);

б) ферменты глюконеогенеза (обратить внимание на ключевые ферменты);

в) основные субстраты и пути их включения в глюконеогенез.

Задание 4. Образовавшийся в скелетных мышцах лактат наряду с диффузией в кровь окисляется в самих миоцитах в аэробных условиях. Укажите этапы окисления лактата и энергетический баланс этого процесса.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Сколько молей АТФ может синтезироваться при окислении 1 моля субстрата в указанных реакциях:

- | | |
|--|---------------|
| 1. Пируват \rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. | А. 2,5 моль. |
| 2. Ацетил-КоА \rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. | Б. 4 моль. |
| 3. Пируват \rightarrow ацетил -КоА. | В. 10 моль. |
| 4. Сукцинат \rightarrow ЩУК. | Г. 12,5 моль. |

Задание 2. Назовите ферменты, катализирующие следующие реакции:

- Оксалоацетат + ацетил-КоА + H_2O \rightarrow цитрат + HS-КоА.
 - Изоцитрат + НАД^+ \rightarrow α -кетоглутарат + CO_2 + $\text{НАДН}\cdot\text{H}^+$.
 - Сукцинил-КоА + ГДФ + H_3PO_4 \rightarrow сукцинат + ГТФ + HS-КоА.
 - Фумарат + H_2O \rightarrow малат.
- А. Фумаратгидратаза. Б. Цитратсинтаза.
В. Сукцинил-КоА-синтетаза. Г. Изоцитратдегидрогеназа.

Задание 3. Глюконеогенез — ферментативный процесс, имеющий необратимые реакции. Выберите фермент, участвующий в одной из них:

- А. Гексокиназа. Б. Пируваткарбоксилаза. В. Лактатдегидрогеназа.
Г. Пируватдегидрогеназа. Д. Пируватдекарбоксилаза.

Задание 4. В образовании ацетил-КоА из пирувата участвует мультиферментный комплекс. Выберите коферменты, необходимые для работы этого комплекса:

- А. ФМН, HS-КоА, ТПФ, НАД^+ . Б. ФМН, HS-КоА, ТПФ, НАД^+ , ЛК.
В. ФМН, HS-КоА, ТПФ, НАДФ^+ . Г. ФАД, HS-КоА, ТПФ, НАД^+ , ЛК.
Д. ФАД, HS-КоА, ТПФ, НАД^+ .

Задание 5. В глюконеогенезе имеются необратимые реакции. Выбрать из перечисленных необратимую:

- А. Фруктозо-6-фосфат → глюкозо-6-фосфат.
- Б. 2-Фосфоглицерат → 3-фосфоглицерат.
- В. Лактат → пируват.
- Г. Пируват → фосфоенолпируват.
- Д. Фосфодиоксиацетон → глицеральдегид-3-фосфат.

Задание 6. В процессе синтеза глюкозы из пирувата затрачивается энергия. Сколько молей АТФ необходимо для этого метаболического пути?

- А. 2 АТФ.
- Б. 4 АТФ.
- В. 6 АТФ.
- Г. 5 АТФ.
- Д. 7 АТФ.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

- 1 — (1 – В; 2 – Б; 3 – Г; 4 – Д; 5 – А).
- 2 — (1 – В; 2 – В; 3 – А; 4 – Б; 5 – А; 6 – Б; 7 – В).
- 3 — (1 – Г; 2 – Б; 3 – Г; 4 – Г; 5 – А; 6 – Б; 7 – Г; 8 – Е).

Для самостоятельной работы:

4 – 15 АТФ.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом

Принцип метода. Метод основан на специфическом окислении глюкозы под влиянием глюкозооксидазы (КФ.1.1.3.4.), обладающей высокой субстратной специфичностью по отношению к D-глюкозе. Глюкоза в присутствии фермента глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха с образованием в ходе реакции перекиси водорода. Перекись водорода окисляет ортолуидин, превращая его в окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию глюкозы. Этот метод позволяет определить содержание глюкозы в крови в присутствии других восстанавливающих веществ.

Порядок выполнения работы. Параллельно ставят две пробы: опытную и стандартную. Для этого в две центрифужные пробирки вносят по 1,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия. В опытную пробу добавляют 0,1 мл крови (плазмы, сыворотки), в стандартную — 0,1 мл стандартного раствора глюкозы. Далее в обе пробы прибавляют по 0,4 мл 5% раствора сернокислого цинка и по 0,4 мл 0,3н раствора едкого натра. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и через 10 минут центрифугируют при 3000 об/мин на протяжении 10 минут. Тотчас же сливают надосадочную жидкость в сухие пробирки.

Из надосадочной жидкости опытной и стандартных проб отбирают по 1 мл в сухие пробирки и приливают по 2,5 мл рабочего раствора ферментов. Осторожно все перемешивают. В ходе реакции интенсивность голубовато-синей окраски постепенно возрастает. Через 20–23 минуты измеряют экстинкции растворов на ФЭК с красным светофильтром (длина волны 630 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контроля.

Контрольную пробу готовят следующим образом. К 2 мл дистиллированной воды добавляют 2,5 мл рабочего раствора ферментов (контрольную пробу можно готовить одну на группу).

Расчет производят по формуле:

$$C_{\text{оп.}} = E_{\text{оп.}} \cdot C_{\text{ст.}} / E_{\text{ст.}}$$

где $C_{\text{оп.}}$ — концентрация глюкозы в крови (мг%); $C_{\text{ст.}}$ — концентрация глюкозы в стандартном растворе (100 мг%); $E_{\text{оп.}}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{\text{ст.}}$ — экстинкция стандартной пробы. Коэффициент пересчета в систему СИ (ммоль/л) — 0,0555.

Нормальные величины концентрации глюкозы в плазме и сыворотке крови — 70–110 мг% (3,9–6,1 ммоль/л), в спинномозговой жидкости — около 50 мг% (2,78–3,89 ммоль/л).

Результаты:

Клинико-диагностическое значение. Увеличение содержания глюкозы в крови (гипергликемия) наблюдается при сахарном диабете, остром панкреатите, панкреатических циррозах, эмоциональных стрессах, после эфирного наркоза, обильного приема углеводов с пищей, а также при повышении гормональной активности ряда желез (щитовидной, гипофиза, коркового и мозгового слоя надпочечников).

Снижение уровня глюкозы в крови (гипогликемия) встречается при поражении паренхимы печени, нарушении ферментативной активности при распаде гликогена; недостаточной функции щитовидной железы, надпочечников, гипофиза; передозировке инсулина при лечении сахарного диабета, нарушении всасывания углеводов, отравлениях фосфором, бензолом, хлороформом, при недостатке приема с пищей углеводов, после больших потерь крови.

Выводы:

Подпись преподавателя:

12. Вторичные пути обмена глюкозы. Метаболизм галактозы, фруктозы, этанола. Влияние гормонов на уровень глюкозы в крови

Актуальность темы

Пентозофосфатный путь (ПФП) и глюкуроновый путь обмена глюкозы не приводят к синтезу АТФ. Они выполняют следующие главные функции: 1) образование НАДФН⁺ для восстановительных синтезов (ПФП); 2) обеспечение рибозой синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот (ПФП); 3) образование глюкуроновой кислоты для синтеза гетерополисахаридов соединительной ткани и детоксикации продуктов метаболизма и ксенобиотиков (чужеродных веществ) в печени путем их связывания и выведения в виде глюкуронидов (глюкуроновый путь).

Недостаточность ряда ферментов ПФП — причина гемолиза эритроцитов. Тот факт, что аскорбиновая кислота — незаменимый компонент пищи у морских свинок и приматов (в том числе и человека), объясняется отсутствием одного из ферментов синтеза этого витамина из гулоновой кислоты (у большинства других млекопитающих он есть).

Будущему врачу необходимо четко представлять, как протекает метаболизм фруктозы и галактозы у человека, поскольку недостаточная активность ферментов, участвующих в обмене этих гексоз, приводит к таким заболеваниям, как идиопатическая фруктозурия и галактоземия. Знание особенностей обмена этанола в организме необходимо для понимания патогенеза алкоголизма и основных подходов к его терапии.

Концентрация глюкозы в крови поддерживается на постоянном уровне и находится под строгим гормональным контролем. В связи с этим патологические изменения со стороны эндокринной системы нередко сопровождаются нарушением и углеводного обмена. Так, недостаток инсулина приводит к гипергликемии и сахарному диабету.

Цель занятия

Сформировать представление о значении пентозофосфатного и глюкуронового путей превращения глюкозы; изучить метаболизм галактозы, фруктозы, этанола; усвоить роль гормональной регуляции обмена углеводов в поддержании концентрации глюкозы в крови

для умения интерпретировать характер биохимических нарушений у больных при патологии углеводного обмена.

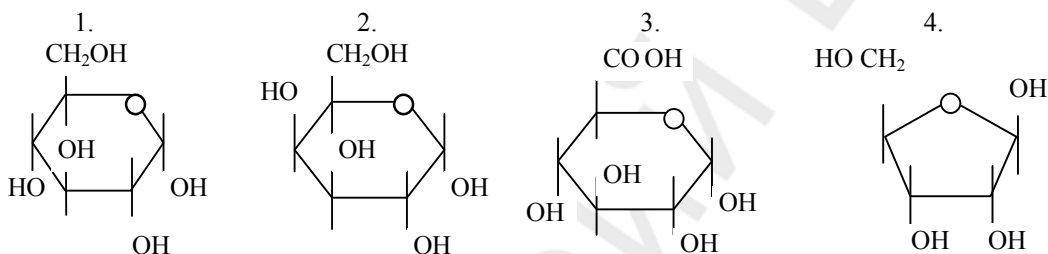
Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- биоорганической химии:
 - строение и свойства рибозы, дезоксирибозы, галактозы, фруктозы, глюкуроновой кислоты;
 - реакции альдольной конденсации;
- нормальной физиологии:
 - нейrogормональные механизмы регуляции углеводного обмена.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:

Задание 1. Напишите названия сахаров под соответствующими формулами:



Правильность решения проверьте, сопоставив его с эталоном ответа.

Вопросы для обсуждения

1. Пентозофосфатный путь (субклеточная локализация, этапы, ключевые ферменты, метаболиты, биологическая роль).
2. Глюкуроновый путь (тканевая и субклеточная локализация, пути метаболизма глюкуроновой кислоты, биологическая роль).
3. Катаболизм фруктозы в печени, схема реакций. Нарушения обмена фруктозы (идиопатическая фруктозурия, врожденная непереносимость фруктозы), молекулярные механизмы, подходы к диагностике и лечению.
4. Катаболизм галактозы в печени, схема реакций. Нарушение обмена галактозы (галактоземия), причины, подходы к диагностике и лечению.
5. Метаболизм экзогенного этанола (пути, схема реакций).
6. Регуляция содержания глюкозы в крови. Механизмы регуляторного действия гормонов (инсулин, адреналин, глюкагон, глюкокортикоиды и др.).

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 252–254, 268–275.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 254–260, 263–270, 369–384.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. М.: Мир, 1985.
2. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993. – Т. 1. С. 199–224.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Рассмотрите реакции, составляющие окислительный этап ПФП. Обратите внимание на то, что в двух реакциях дегидрирования в качестве кофермента используется НАДФ⁺.

1.1. Вспомните и укажите сходство и различия в структуре и функциях НАДН·Н⁺ и НАДФН·Н⁺.

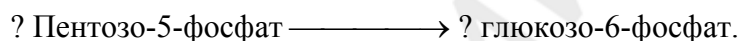
1.2. Запомните:

а) отличия неокислительного этапа ПФП от окислительного (ферменты, коферменты, обратимость реакций). Обратите внимание на значение окислительной и неокислительной части ПФП;

б) наиболее активно ПФП протекает в печени, жировой ткани, лактирующей молочной железе, коре надпочечников, половых железах, эритроцитах, макрофагах.

Умейте объяснить значение ПФП для этих клеток и тканей.

1.3. Обратите внимание на то, что окислительный путь образования пентоз и путь превращения пентоз в гексозы (неокислительный) вместе составляют циклический процесс — пентозофосфатный цикл, который функционирует, по-видимому, только в жировой ткани. Выучите суммарное уравнение пентозофосфатного цикла. Напишите стехиометрические коэффициенты для превращения:



Задание 2. Ознакомьтесь со схемой глюкуронового пути обмена углеводов. Отметьте для себя главные промежуточные метаболиты этого пути.

2.1. Умейте объяснить роль глюкуронового пути для печени и фибробластов, ответьте на вопрос: какие из приведенных утверждений о глюкуроновом пути обмена глюкозы являются справедливыми?

А. Обеспечивает потребности гепатоцитов в УДФ-глюкуроновой кислоте для реакций обезвреживания билирубина, стероидов, лекарственных веществ и ксенобиотиков.

Б. Метаболиты глюкуронового пути используются для синтеза протеогликанов основного вещества соединительной ткани.

В. Это источник гулоновой кислоты для синтеза аскорбиновой кислоты у большинства животных.

Г. Это дополнительный путь синтеза пентоз.

Д. Выполняет энергетическую функцию.

2.2. Разберитесь, в чем будет проявляться недостаточность фермента, превращающего L-ксилулозу в D-ксилулозу.

Задание 3. Запомните, что сродство фермента гексокиназы к фруктозе значительно ниже, чем к глюкозе, поэтому вероятность участия этого фермента в превращении фруктозы крайне мала. Напишите реакцию, которую катализирует печеночный фермент — фруктокиназа.

3.1. Умейте оценить последствия недостаточности ферментов, участвующих в превращении фруктозы в глюкозу. Оцените правильность фраз:

а) идиопатическая фруктозурия сопровождается выведением нефосфорилированной фруктозы с мочой, ПОТОМУ ЧТО дефицит фермента фруктокиназы не позволяет осуществлять нормальный метаболизм экзогенной фруктозы;

б) при генетически обусловленной непереносимости фруктозы наблюдается индуцируемая фруктозой гипоглюкоземия, ПОТОМУ ЧТО накапливающийся фруктозо-1-

фосфат блокирует мобилизацию глюкозы из гликогена путем ингибирования фосфорилазы печени.

3.2. Подпишите ферменты и коферменты, которые осуществляют цепочку превращений:



Ответьте на вопрос: обратим ли этот процесс?

Задание 4. Разберитесь, каким образом включается в метаболизм галактоза, поступающая с пищей. Ответьте на вопросы задачи.

Задача. У ребенка с рождения отмечаются рвота и диарея после каждого кормления. При обследовании выявлено отставание в массе тела, увеличение печени, желтуха, задержка нервно-психического развития, частичное помутнение хрусталика.

А. Ваш предположительный диагноз?

Б. Лабораторный анализ активности какого фермента можно провести, чтобы подтвердить диагноз?

В. Какие рекомендации по кормлению ребенка Вы дадите матери?

4.1. Помните о том, что галактоза необходима:

а) для синтеза лактозы в лактирующей молочной железе;

б) для синтеза гликолипидов, гликопротеинов и протеогликанов.

Обратите внимание на возможность синтеза галактозы из глюкозы и умейте схематически изобразить этот процесс.

Задание 5. Рассмотрите основной путь метаболизма этилового спирта. Запомните, что метаболизм этанола на 90% происходит в печени, поэтому при любой патологии, сопровождающейся нарушением функции печени, наблюдается снижение толерантности к алкоголю.

5.1. Для окисления 50 г этанола требуется такое же количество НАД^+ , как и для окисления 200 г глюкозы. Причем обмен этанола осуществляется значительно быстрее, чем окисление глюкозы. Учитывая эту информацию, ответьте на вопросы:

а) как изменится при приеме алкоголя отношение $\text{НАДН}^+ / \text{НАД}^+$ в клетках печени?

б) как изменится в этих условиях концентрация пирувата и лактата в клетках печени?

Ответ подтвердите соответствующей реакцией.

5.2. Оцените правильность фразы: при приеме алкоголя отмечается гипогликемия, ПОТОМУ ЧТО в этих условиях в клетках печени снижается концентрация пирувата, что приводит к снижению скорости глюконеогенеза, являющегося одним из источников глюкозы в крови.

Задание 6. Заполните таблицу, обобщающую сведения о влиянии гормонов на обмен углеводов, выбирая правильные варианты ответов из приведенных ниже.

Гормональная регуляция концентрации глюкозы в крови

Название гормона	Место синтеза гормона	Химическая природа гормона	Ткани-мишени	Влияние на процессы обмена углеводов	Влияние на концентр. глюкозы в крови
Инсулин					
Адреналин					
Глюкагон					
Кортизол					

■ Эти гормоны синтезируются:

– α -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы;

- клетками коркового слоя надпочечников;
- клетками мозгового слоя надпочечников;
- β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы.
- По химической природе представляют собой: белок; полипептид; производное тирозина; стероид.

Ткани-мишени для этих гормонов: печень; мышечная ткань (гладкая, поперечно-полосатая); жировая ткань.

- Концентрация глюкозы в крови зависит от скорости следующих процессов: поступление глюкозы из кишечника в кровь; синтез гликогена; мобилизация гликогена; глюконеогенез; поступление глюкозы из крови в клетки.

6.1. Запомните концентрацию глюкозы в плазме (сыворотке) крови в норме — 3,9–6,1 ммоль/л.

6.2. Подберите соответствующие пары гормон — механизм действия:

- | | |
|---------------|--|
| 1. Кортизол. | А. Активация аденилатциклазы → повышение уровня цАМФ в клетке → активация протеинкиназы А → фосфорилирование ферментов, участвующих в обмене глюкозы, и изменение их активности. |
| 2. Адреналин. | Б. Ускорение транспорта глюкозы через мембраны клеток-мишеней, активация фосфодиэстеразы и снижение уровня цАМФ в клетке. |
| 3. Инсулин. | В. Индукция синтеза ферментов на генетическом уровне. |

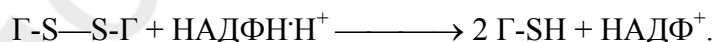
Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Тиаминпирофосфат — необходимый кофермент для следующего фермента ПФП:

- | | | |
|-------------------|--------------------|---------------|
| А. Эпимераза. | Б. Трансальдолаза. | В. Изомераза. |
| Г. Транскетолаза. | Д. Дегидрогеназа. | |

Задание 2. Применение некоторых лекарственных препаратов может вызвать гемолиз эритроцитов, снижение содержания гемоглобина в крови, желтуху (лекарственная гемолитическая анемия). Причиной является нарушение в эритроцитах реакции восстановления дисульфидной формы глутатиона в сульфгидрильную:



Восстановленный глутатион (Г-SH) — необходимый фактор для восстановления SH-групп в гемоглобине, поддержания нормальной формы эритроцитов, стабилизации клеточной мембраны и т. д. Недостаточная активность каких ферментов ПФП может быть причиной заболевания?

- Задание 3.* Метаболиты ПФП могут быть использованы для синтеза:
- | | | | |
|-----------------------|----------------------|---------|------------------|
| А. НАД ⁺ . | Б. ФАД. | В. УТФ. | Г. Кофермента А. |
| Д. Жирных кислот. | Е. Половых гормонов. | | |

Задание 4. Пищевая фруктоза фосфорилируется в печени и расщепляется с образованием:

- | |
|---|
| А. Двух молекул фосфодиоксиацетона. |
| Б. Молекулы фосфодиоксиацетона и глицеринового альдегида. |
| В. Молекулы диоксиацетона и 3-фосфоглицеринового альдегида. |

- Г. Молекулы фосфодиоксиацетона и 3-фосфоглицеринового альдегида.
Д. Двух молекул 3-фосфоглицеринового альдегида.

Задание 5. Какой из следующих ферментов не участвует в реакциях последовательного превращения галактозы в УДФ-глюкозу?

- А. Галактокиназа. Б. Эпимераза. В. Фосфоглюкомутаза. Г. Уридилтрансфераза.

Задание 6. У больного хронический гепатит с признаками печеночной недостаточности. На приеме у врача он спрашивает, как часто может употреблять спиртные напитки. Что бы вы посоветовали больному? Обоснуйте свой ответ.

Задание 7. Кофеин ингибирует 3',5'-фосфодиэстеразу, превращающую цАМФ в АМФ. Какой из перечисленных эффектов будет наблюдаться после воздействия кофеина?

- А. Снижение активности протеинкиназы А в печени.
Б. Снижение активности протеинкиназы А в мышцах.
В. Повышение активности пируваткиназы в печени.
Г. Снижение активности гликогенсинтазы в печени.

Задание 8. Больной сахарным диабетом после инъекции инсулина не смог своевременно поесть. На работе его состояние резко ухудшилось. Врач скорой помощи при осмотре отмечает беспокойство больного, бледность и влажность кожных покровов, угнетение рефлексов. Уровень глюкозы в крови составляет 2,8 ммоль/л. Что следует срочно ввести этому пациенту?

- А. Адреналин. Б. Глюкозу. В. Инсулин. Г. Нитроглицерин.

Задание 9. Почечный порог для глюкозы составляет:

- А. 5,5 ммоль/л. Б. 10 ммоль/л. В. 20 ммоль/л. Г. 30 ммоль/л.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1. 1. Глюкоза. 2. Галактоза. 3. Глюкуроновая кислота. 4. Рибоза.

Для самостоятельной работы:

2.1 — (А, Б, В, Г).

3.1 — а) верно; б) верно.

4. Галактоземия. Гал-1-фосфат-уридилтрансфераза. Исключить галактозу из пищи (искусственное вскармливание).

5.1 — а) увеличится; б) пируват снижается, лактат нарастает.

5.2 — Верно.

6.2 — (1 — В; 2 — А; 3 — Б, В).

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Изучение влияния гормонов на содержание глюкозы в крови

Для изучения влияния гормонов на уровень глюкозы в крови предлагаются три пробы крови (опытные). Одна из них взята до введения гормонов, другая — после введения инсулина, а третья — после введения адреналина.

1. Определите содержание глюкозы в каждой из проб.

2. На основании полученных результатов сделайте вывод, какая из проб соответствует приведенным выше состояниям.

Определение концентрации глюкозы в пробах проводят **глюкозооксидазным методом**. Параллельно ставят опытные и стандартную пробы.

Ход определения: см. предыдущее занятие. Контрольную пробу можно готовить одну на группу.

Проба	Оптическая плотность (E)	Расчет концентрации глюкозы по формуле: $C_{оп} (мг\%) = E_{оп} \cdot C_{ст} (100 мг\%) / E_{ст}$ Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л) = 0,0555
1		
2		
3		
Стандарт		

Выводы:

Подпись преподавателя:

13 Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Введение в метаболизм. Центральные метаболические пути. Биологическое окисление. Окислительное фосфорилирование. Обмен углеводов»

1. Метаболизм. Понятие о катаболизме (привести примеры) и об анаболизме (привести примеры), различия и уровни взаимосвязи между ними. Виды метаболических путей. Понятие о линейных и циклических путях метаболизма (привести примеры), о ключевых (регуляторных) ферментах. Центральные пути метаболизма.

2. Адениловая система, ее компоненты, роль в клетке. Способы синтеза АТФ в клетке и способы ее гидролиза. Перечислить реакции и процессы, сопряженные с гидролизом АТФ. Их роль для клеток и организмов.

3. Окислительное декарбоксилирование ПВК. Почему процесс окислительного декарбоксилирования пирувата называют центральным метаболическим путем (покажите на схеме катаболизма)? Написать суммарное уравнение и реакции окислительного декарбоксилирования пирувата. Указать ферменты и коферменты пируватдегидрогеназного комплекса. Какие витамины участвуют в этом процессе? Что произойдет при дефиците этих витаминов в организме? Как осуществляется регуляция пируватдегидрогеназного комплекса? Рассчитать энергетический выход (в молях АТФ) окисления пирувата до конечных продуктов обмена.

4. Цикл трикарбоновых кислот. Почему цикл Кребса является центральным метаболическим путем? Показать на схеме. Функции ЦТК. Что такое анаэробные реакции (пример такой реакции)? Написать схему ЦТК, назвать витамины, участвующие в этом процессе. Какие реакции цикла Кребса связаны с

комплексами дыхательной цепи? Сколько моль АТФ можно при этом получить? Показать это на схеме ферментов тканевого дыхания. Рассчитать энергетический баланс окисления ацетил-КоА. Катаболическая функция цикла Кребса. Уметь рассчитать и показать на схеме, сколько АТФ синтезируется в митохондриях при окислении различных субстратов (аминокислоты) до конечных продуктов:

- а) тир → фумарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
- б) про → α -кетоглутарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
- в) асп → оксалоацетат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
- г) арг → α -кетоглутарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
- д) мет → сукцинил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
- е) фен → ацетил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
- ж) вал → сукцинил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
- з) гис → α -кетоглутарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
- и) иле → сукцинил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

5. Виды биологического окисления. Витамины РР и В₂ как участники окислительно-восстановительных реакций. Нарисовать блок-схемы НАД⁺, НАДФ⁺, ФМН и ФАД. Оксигеназный путь утилизации кислорода в клетках. Ферменты. Окисление в микросомах. Схема микросомной цепи. Сравнить оксидазный и оксигеназный пути утилизации кислорода. Роль этих процессов в клетке. Роль свободнорадикального окисления, ферментативная защита от свободных радикалов кислорода.

6. Тканевое дыхание. Схема ферментов тканевого дыхания. Комплексы дыхательной цепи. Указать на схеме участки с энергией, достаточной для образования АТФ. На основании какого измеряемого показателя можно определить количество энергии, выделяемой в реакции переноса электронов? Регуляция активности ферментов дыхательной цепи, роль АДФ, АТФ. Уметь изобразить схему ферментов тканевого дыхания для НАД-зависимых и ФАД-зависимых субстратов. Уметь включать субстраты цикла Кребса (изоцитрат, α -кетоглутарат, малат, сукцинат) в дыхательную цепь. Знать, чему равен коэффициент фосфорилирования (P/O) для каждого из этих субстратов. На схеме обязательно указывать участки сопряжения транспорта электронов и фосфорилирования. Можно ли использовать для окисления субстратов в митохондриях НАДФ⁺? Роль НАДФ⁺ в клетке.

7. Что такое окислительное фосфорилирование (определение, субклеточная локализация)? Основные положения теории П. Митчелла, объясняющие механизм окислительного фосфорилирования. Как изменяется процесс окислительного фосфорилирования при недостатке кислорода в клетках (объяснить механизм)? Что такое разобщение окислительного фосфорилирования? Какими свойствами должен обладать разобщитель? Как изменяется поглощение кислорода при действии разобщителей (пояснить механизм)? Сравнить механизмы окислительного и субстратного фосфорилирования. Какой из них преобладает в митохондриях?

8. Гипоэнергетические состояния. Ингибиторы переноса электронов по дыхательной цепи. В каком состоянии (окисленном или восстановленном) будут находиться переносчики электронов при блокаде цепи: а) производными барбитуровой кислоты; б) малоновой кислотой; в) цианидами, угарным газом; г) ротеноном; д) антимицином А?

9. Переваривание углеводов. Что понимают под врожденной непереносимостью дисахаридов? Причины нарушения переваривания лактозы. Лактулоза и обоснование её использования в питании. Роль пищевых волокон (клетчатка, пектины) в питании человека. Механизмы всасывания углеводов в кишечнике.

10. Механизм транспорта глюкозы в клетки. Написать реакцию активирования поступившей в клетку глюкозы и указать пути ее дальнейшего превращения.

11. Химизм реакций неокислительного и окислительного этапов анаэробного гликолиза. Биологическая роль гликолиза, назначение лактатдегидрогеназной реакции. Регуляция анаэробного распада глюкозы. Какой из ключевых ферментов гликолиза является ключевым и для других путей обмена глюкозы? Регуляторная роль 2,3-дифосфоглицерата. Энергетический выход гликолиза. Механизм синтеза АТФ в анаэробных условиях.

12. Химизм спиртового брожения (неокислительный этап, окислительный этап). Реакции, общие для спиртового брожения и гликолиза. Различия этих двух процессов. Ключевые ферменты спиртового брожения. Какие соединения могут регулировать этот процесс?

13. Обмен экзогенного этанола (схема), тканевая локализация процесса. Механизм развития алкогольной гипогликемии и лактацидемии.

14. Аэробное окисление глюкозы. Этапы и их субклеточная локализация, энергетический выход (расчет проводить поэтапно) и механизмы синтеза АТФ. Уровни регуляции, ключевые ферменты и их регуляторы. Сравнить энергетический выход анаэробного и аэробного (поэтапно) окисления глюкозы и механизмы синтеза АТФ.

15. Судьба конечных продуктов гликолиза – пировиноградной и молочной кислот. Какова судьба лактата, образовавшегося в эритроцитах? Этапы и энергетический выход аэробного окисления лактата (расчет проводить поэтапно). Пути метаболизма пирувата. Какой путь утилизации пирувата стимулируется при энергодифиците в клетках?

16. Глюконеогенез. Биологическая роль, субклеточная локализация, субстраты, ключевые ферменты и регуляция процесса. Химизм ключевых реакций. Уметь рассчитать энергетический баланс синтеза моля глюкозы из ПВК и ЦУК.

17. Схема гликогенеза в гепатоцитах и миоцитах. Каковы запасы углеводов в мышцах, в печени и в целом организме? Рассчитать энерготраты включения молекулы (моля) глюкозы в молекулы гликогена. Гормональная регуляция гликогенеза. Как проявляется у человека снижение активности гликогенсинтазы? Что такое агликогеноз?

18. Гликогенолиз, биологическая роль. Что такое фосфоролиз и гидролиз гликогена? Возможны ли реакции гидролиза гликогена в клетках? Схема фосфоролиза гликогена. Знать различия этого процесса в печени и мышцах. Есть ли в этих различиях биологический смысл, а если есть, то какой? Изобразить схему гликогенолиза под влиянием глюкагона, тканевая локализация. Механизмы активирования гликогенфосфорилазы адреналином (схема). Показать на схеме, что выгоднее в энергетическом отношении: сразу окислять глюкозу или вначале присоединить ее к гликогену или это не имеет значения (расчет провести для анаэробных условий). Что называют гликогенозами? Причины болезни Гирке, болезни Помпе.

19. Пентозофосфатный путь распада глюкозы, этапы, биологическая роль.

20. Изобразить схематически образование УДФ-глюкозы. Какова биологическая роль процессов, использующих УДФ-глюкозу? Значение глюкуронового пути расщепления глюкозы в печени и фибробластах.

21. Превращение галактозы в глюкозу (схема). Каковы причины галактоземии? Написать реакцию синтеза лактозы в клетках молочной железы.

22. Схема превращения фруктозы в глюкозу. Причины идиопатической фруктозурии и врожденной непереносимости фруктозы.

23. Методы определения содержания глюкозы в крови и ее физиологическая концентрация. Гормональная регуляция уровня глюкозы в крови.

14. Обмен липидов. переваривание, всасывание и ресинтез. Транспорт экзогенных липидов.

Количественное определение активности липаз

Актуальность темы

Липиды — важная составная часть пищевых продуктов не только вследствие высокой энергетической ценности, но также и потому, что в натуральных пищевых жирах содержатся жирорастворимые витамины и «незаменимые» жирные кислоты (полиненасыщенные). Такие жирные кислоты в организме — предшественники эйкозаноидов — липидных гормонов, играющих важную роль в развитии воспаления, аллергии, процесса свертывания крови.

Переваривание липидов в желудочно-кишечном тракте — сложный биохимический процесс. Для создания физиологических условий гидролиза липидов в кишечнике необходимо полноценное функционирование нескольких органов: печени, поджелудочной железы, тонкого кишечника. Дефект участия этих органов в усвоении пищевых липидов организмом приводит к нарушению обмена жиров и развитию патологических проявлений. Одно из таких проявлений — стеаторея (появление в фекалиях непереваренных жиров).

Поскольку липиды — гидрофобные соединения, их присутствие в кровотоке возможно только в виде специальных транспортных форм — липопротеинов. Хиломикроны (один из классов липопротеинов) служат для доставки липидов из кишечника в различные ткани и печень. Нарушения на уровне образования липопротеинов (или их утилизации) являются причинами развития различных форм гипо- и гиперлипидемий. Наиболее распространенные заболевания, связанные с нарушениями обмена липидов, — сахарный диабет и атеросклероз.

Цель занятия

Закрепить знания по химии липидов. Усвоить молекулярные механизмы переваривания и всасывания липидов пищи, ресинтеза липидов, транспорта экзогенных липидов по кровеносному руслу для последующего анализа биохимических аспектов нарушений этих процессов.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **общей химии:**
 - свойства поверхностно-активных веществ, желчные кислоты, мицеллообразование;
 - титрометрические методы анализа;
- **биоорганической химии:**
 - строение и свойства многоатомных спиртов (глицерол, инозитол), природных высших карбоновых кислот;
 - строение простых липидов (восков и нейтральных жиров);
 - особенности структуры и физико-химических свойств фосфолипидов;
 - состав и свойства желчи, ее участие в процессах пищеварения. Механизмы регуляции желчеобразования и желчевыделения;
 - состав и свойства пищеварительных соков; переваривание жиров и всасывание продуктов гидролиза жиров.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Вспомните, что природные жирные кислоты бывают насыщенные и ненасыщенные. Полиеновые жирные кислоты являются незаменимыми факторами питания и

делятся на 2 группы — ω -3 и ω -6 — в зависимости от положения двойной связи от углеродного атома последней (метильной) группы.

Подберите для каждой жирной кислоты соответствующее обозначение:

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| 1. Пальмитиновая. | А. 18:2 ω -6. |
| 2. Стеариновая. | Б. 18:3 ω -3. |
| 3. Олеиновая. | В. 20:5 ω -3. |
| 4. Линолевая. | Г. 20:4 ω -6. |
| 5. Линоленовая. | Д. 18:1 ω -9. |
| 6. Арахидоновая. | Е. 18:0. |
| 7. Эйкозапентаеновая. | Ж. 16:0. |

Задание 2. При добавлении к капле неэмульгированного жира солей желчных кислот образовалось 10^{12} мелких капель жира. Каким свойством желчных кислот можно объяснить их эмульгирующее действие?

- А. Амфифильностью. Б. Растворимостью только в воде.
В. Растворимостью только в неполярных растворителях. Г. Нерастворимостью в воде.
Д. Нерастворимостью в органических растворителях.

Задание 3. В растворе с помощью специфических реакций определены следующие продукты гидролиза: глицерол и жирные кислоты. Какое вещество было подвергнуто гидролизу?

- А. Холестерол. Б. Триацилглицерол. В. Фосфатидилхолин.
Г. Холевая кислота. Д. Сфингозин.

Задание 4. Обратите внимание, что в составе глицеролипидов ненасыщенные жирные кислоты обычно располагаются в 2 (β)-положении. Напишите формулу 1-пальмитоил-2-линолеоил-3-стеароилглицерола. Это соединение:

- А. Гидрофильное. Б. Гидрофобное. В. Амфифильное.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Общая характеристика и классификация липидов (омыляемые и неомыляемые, простые и сложные). Характеристика групп липидов (химические формулы и номенклатура ацилглицеролов и глицерофосфолипидов; блок-схемы строения восков, сфингофосфолипидов, гликолипидов, сульфолипидов). Биологическая роль липидов.

2. Липиды пищи. Переваривание липидов, этапы. Эмульгирование (назначение, факторы, стабилизация жировой эмульсии). Желчь, желчные кислоты (первичные, конъюгированные, вторичные). Место образования, участие в усвоении липидов пищи. Печеночно-кишечная рециркуляция желчных кислот.

3. Гидролиз липидов (схемы превращений). Ферменты (место образования, субстратная специфичность). Механизмы активации панкреатической липазы. Всасывание (механизмы, мицеллярное растворение, судьба мицелл). Представление о нарушениях переваривания и всасывания липидов.

4. Синтез триацилглицеролов и глицерофосфолипидов в различных тканях (химизм, общие этапы синтеза, различия). Транспортные формы липидов в крови. Строение и метаболизм хиломикронов, ЛПОНП, ЛППП, ЛПНП, ЛПВП.

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 276–291, 305–309, 315–316.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 270–271, 279–281, 284–286, 292–295.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985.
2. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993. Т. 1. С. 151–164, 238–246, 256–268. Т. 2. С. 287–290, 295–296.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Вспомните классификацию липидов и напишите формулы триацилглицеролов и глицерофосфолипидов. Запомните, что важное свойство некоторых липидов — амфифильность, т. е. способность взаимодействовать как с гидрофобными, так и с гидрофильными молекулами. Обратите внимание на то, что липиды выполняют разные функции в зависимости от их строения и свойств. Какие функции выполняют перечисленные ниже липиды?

- | | |
|-------------------------------------|---|
| А. Холестерол. | 1. Энергетическая. |
| Б. Триацилглицерол. | 2. Структурная. |
| В. Жирные кислоты. | 3. Предшественник стероидных |
| Г. Полиненасыщенные жирные кислоты. | гормонов, витамина Д ₃ , желчных кислот. |
| Д. Фосфолипиды. | 4. Предшественники эйкозаноидов. |
| Е. Гликолипиды. | 5. Терморегуляция. |

Задание 2. Запомните этапы переваривания и всасывания пищевых жиров (эмульгирование, гидролиз, образование мицелл и всасывание в слизистую кишечника). Умейте назвать факторы, способствующие эмульгированию жиров, и механизм стабилизации эмульсии под действием солей желчных кислот, исходя из структуры этих соединений. Укажите, какая из перечисленных желчных кислот является наиболее сильным эмульгатором:

- А. Холевая. Б. Хенодезоксихолевая. В. Гликохолевая.
Г. Литохолевая. Д. Дезоксихолевая.

2.1. Подберите место образования для вышеперечисленных желчных кислот:

- 1) печень; 2) кишечник; 3) поджелудочная железа.

2.2. Изучите схему печеночно-кишечной рециркуляции желчных кислот и обратите внимание на то, что ежедневно с калом выделяется 0,5–1 г желчных кислот. Это единственный значимый путь выведения холестерина из организма.

Задание 3. Эмульгирование гидрофобных жиров — одно из условий эффективной работы панкреатической липазы. Напишите в общем виде реакцию поэтапного гидролиза ТАГ под действием этого фермента с учетом того, что панкреатическая липаза с большей скоростью расщепляет в жирах сложно-эфирные связи в α -положении. Подчеркните основные конечные продукты переваривания жиров. Выберите правильный вариант ответа.

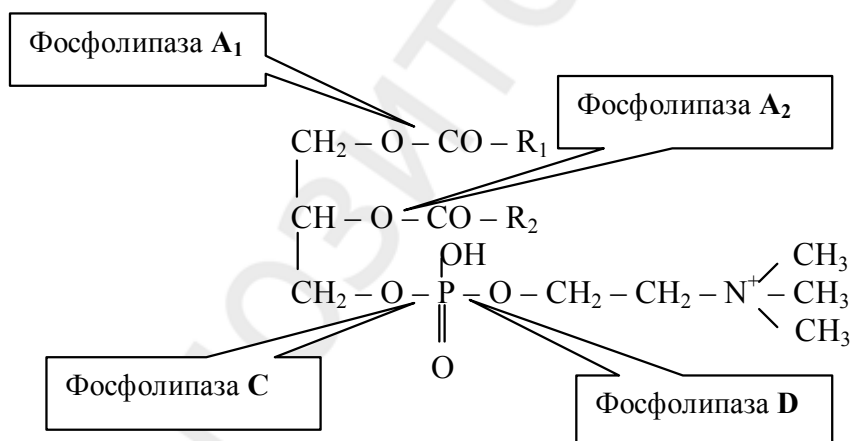
Перед всасыванием в слизистую тонкого кишечника из желчных кислот, холестерина и амфифильных продуктов гидролиза жиров (жирных кислот и β -моноацилглицеролов) образуются:

- А. Смешанные мицеллы. Б. Липосомы.
 В. Секреторные гранулы. Г. Триацилглицеролы.

3.1. Запомните, что признаком нарушения переваривания и всасывания жиров является стеаторея. При этом кал больного содержит нерасщепленный жир и имеет серовато-белый цвет. Выполните следующее задание: из левого столбика таблицы выберите состояния, которые могут привести к стеаторее; из правого столбика — возможные последствия:

- | | |
|--|--|
| <p>А. Снижение секреции или активности панкреатической липазы (панкреатит).</p> <p>Б. Нарушение эмульгирования жиров вследствие недостаточного поступления желчи в просвет кишечника (желчнокаменная болезнь).</p> <p>В. Нарушение функции печени и уменьшение синтеза желчных кислот (гепатит).</p> <p>Г. Дисбактериоз.</p> | <p>Д. Повышение уровня ТАГ в крови.</p> <p>Е. Нарушение всасывания жирорастворимых витаминов («куриная слепота», кровоточивость).</p> <p>Ж. Нарушение всасывания незаменимых полиненасыщенных жирных кислот.</p> <p>З. Ожирение.</p> |
|--|--|

3.2. Переваривание фосфолипидов происходит под действием панкреатических фосфолипаз с образованием глицерола, высших жирных кислот, азотистых соединений и фосфорной кислоты. Запомните, какие связи специфически гидролизуют разные виды фосфолипаз:



Задание 4. Запомните, что в клетках слизистой оболочки кишечника (в энтероцитах) происходит ресинтез ТАГ и фосфолипидов из воссавшихся продуктов гидролиза. Выучите реакции ресинтеза липидов.

Оцените правильность фразы: состав жирных кислот ресинтезированных липидов может существенно отличаться от пищевых жиров, ПОТОМУ ЧТО субстраты ресинтеза жиров — не только воссавшиеся жирные кислоты, но и жирные кислоты, синтезированные в слизистой кишечника.

4.1. Нужно усвоить, что для «вывоза» гидрофобных продуктов ресинтеза (ТАГ и эфиров холестерина) из кишечника служат хиломикроны (один из классов

липопротеинов). Ознакомьтесь с общим принципом строения липопротеиновых частиц и укажите компоненты, которые составляют в хиломикроне:

- А. Внутреннюю часть: 1. ... 2. ...
Б. Наружную часть: 1. ... 2. ... 3. ...

4.2. Выберите особенности, характеризующие транспорт экзогенных липидов:

- А. Хиломикроны поступают непосредственно в кровоток.
Б. Хиломикроны поступают в лимфу.
В. После гидролиза ТАГ в составе хиломикронов липопротеинлипазой, располагающейся на эндотелии сосудов, жирные кислоты поступают в клетки различных тканей.

Г. Окончательное расщепление обломков хиломикронов на составные компоненты происходит в гепатоцитах.

4.3. Имейте представление о том, что у людей с наследственным дефектом липопротеинлипазы в крови повышается концентрация ТАГ и хиломикронов. К внешним проявлениям гиперлипидемии относится ксантома (отложение жировых бляшек в коже).

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Все перечисленные липиды относятся к глицерофосфолипидам, КРОМЕ:

- А. Дипальмитоилфосфатидилхолина. Б. Фосфатидной кислоты.
В. Сфингомиелина. Г. Фосфатидилсерина. Д. Фосфатидилинозитола.

Задание 2. Пищевые жиры в ЖКТ подвергаются ферментативному гидролизу. В каком отделе ЖКТ происходит расщепление жиров у взрослых людей?

- А. Ротовой полости. Б. Толстом кишечнике. В. Желудке.
Г. Тонком кишечнике. Д. Пищевом.

Задание 3. Больному с хроническим панкреатитом в курсе комплексной терапии рекомендован препарат желчи. Какие компоненты желчи участвуют в переваривании жиров?

- А. Высшие жирные насыщенные кислоты. Б. Холестерол и его эфиры.
В. Соли желчных кислот. Г. Панкреатическая липаза.
Д. Диацилглицеролы. Е. Панкреатическая α -амилаза.

Задание 4. Сыворотка крови больного, взятой утром натощак, имеет молочный вид. При анализе обнаружено высокое содержание ТАГ и хиломикронов. Наследственный дефект какого фермента приводит к хиломикронемии?

- А. Тканевой гормон-чувствительной липазы. Б. Холестеролэстеразы.
В. Липопротеинлипазы. Г. Панкреатической липазы.
Д. Фосфолипазы.

Задание 5. Какой из перечисленных ферментов высвобождает арахидоновую кислоту из мембранных фосфолипидов?

А. Фосфолипаза А₁.

Б. Фосфолипаза А₂.

В. Панкреатическая липаза.

Г. Гормон-чувствительная липаза.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — (1 – Ж; 2 – Е; 3 – Д; 4 – А; 5 – Б; 6 – Г; 7 – В).

2 – А. 3 – Б. 4 – Б.

Для самостоятельной работы:

1. А – 2, 3; Б – 1, 5; В – 1; Г – 4; Д – 2; Е – 2.

2 – В. 2.1 – (А – 1; Б – 1; В – 1; Г – 2; Д – 2).

3 – А. 3.1 – (А, Б, В, Е, Ж)

4. Верно. 4.1. А – 1) ТАГ; 2) эфиры холестерина. Б – 1) фосфолипиды; 2) холестерол; 3) апоВ48). 4.2 – (Б, В, Г).

Самостоятельная работа (60 минут)

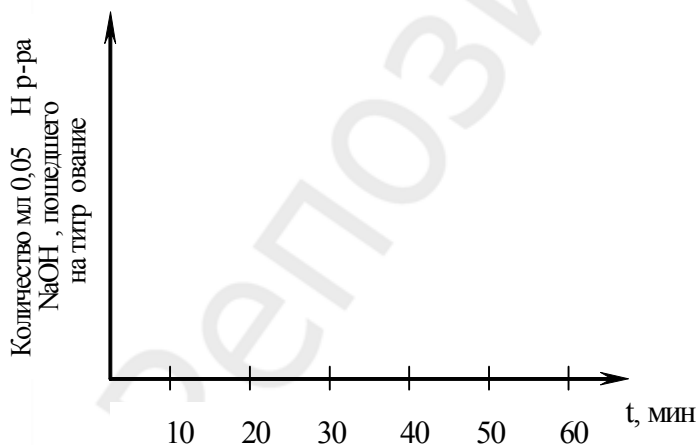
Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Кинетика действия панкреатической липазы*

Принцип метода. Скорость действия липазы в отдельных порциях молока определяется по количеству жирных кислот, образующихся при гидролизе жира молока за определенный промежуток времени. Количество жирных кислот определяют титрованием щелочью.

Ход работы. В две пробирки наливают по 5 мл молока и по 1 мл 5% раствора панкреатина (сока поджелудочной железы). В одну пробирку приливают 1 мл воды, а в другую — 1 мл желчи. Жидкость в пробирках быстро перемешивают. Из каждой пробирки отбирают по 1 мл смеси в колбы, добавляют 1–2 капли 0,5% раствора фенолфталеина и титруют 0,05н раствором едкого натра до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд. Обе пробирки с оставшейся смесью помещают в термостат при 38°C. Через каждые 10 минут из пробирок отбирают по 1 мл смеси и титруют 0,05н раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина до слабозеленой окраски. Проводят 5 таких определений и на основании полученных данных строят две

кривые, отражающие процесс гидролиза жира под действием фермента липазы во времени и в зависимости от наличия или отсутствия желчи.



Вывод:

Работа 2. *Действие фосфолипаз поджелудочной железы*

Принцип метода. О действии фосфолипаз поджелудочной железы на глицерофосфолипиды яичного желтка можно судить по появлению свободной фосфорной кислоты, способной образовывать желтый осадок при нагревании с молибдатом аммония.

Ход работы. В две пробирки наливают по 5 капель суспензии яичного желтка. В 1-ю пробирку добавляют 2 капли панкреатина, а во 2-ю (контрольную) — 2 капли воды. Обе пробирки помещают в термостат при 38°C на 30 мин. После инкубации в обе пробирки наливают по 5 капель молибденового реактива, нагревают их на пламени горелки и охлаждают водой под краном.

Вывод:

Подпись преподавателя:

15. Транспорт липидов кровью. Обмен холестерина. Депонирование и мобилизация липидов. Количественное определение β -липопротеинов в сыворотке крови.

Актуальность темы

Процессы депонирования и мобилизации липидов из жировых депо взаимосвязаны и подвержены четкой гормональной регуляции.

Холестерол — важный элемент мембранной структуры, предшественник стероидных гормонов, витамина Д, желчных кислот. Холестерол присутствует в пищевых жирах и может синтезироваться многими тканями. Механизм его синтеза находится под строгим метаболическим контролем. Холестерол экскретируется с желчью либо в неизменном виде, либо в виде продуктов его метаболизма — желчных кислот. С нарушением обмена липидов и холестерина связаны такие заболевания, как ожирение, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, желчнокаменная болезнь. Потому понимание вопросов синтеза, распада, транспорта и регуляции обмена липидов и холестерина необходимо при изучении этих заболеваний.

Липопротеиновый спектр плазмы крови – основной показатель липидного обмена в организме, и изменение соотношения липопротеинов свидетельствует о нарушении метаболизма липидов.

Цель занятия

Изучить процессы синтеза и распада липидов в организме. Сформировать представление о механизме синтеза холестерина в клетках. Приобрести навыки количественного определения β – липопротеинов в крови.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- *биоорганической химии:*
 - холестерол: вторичный спирт — производное циклопентанпергидрофенантрена, строение, свойства.
- *биологической химии:*
 - гликолиз и пентозофосфатный путь окисления глюкозы, окислительное фосфорилирование.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:

Задание 1. Исследуемое вещество подвергли гидролизу и с помощью качественных реакций определили в гидролизате жирные кислоты и холестерол. Какое вещество исследовалось?

А. Холевая кислота. Б. Триацилглицерол. В. Фосфатидилхолин. Г. Воск.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Ресинтез ТАГ и глицерофосфолипидов в печени и жировой ткани (химизм, общие этапы синтеза, различия). Транспортные формы липидов в крови. Строение и метаболизм ЛПОНП, ЛППП, ЛПНП, ЛПВП.
2. Мобилизация липидов из жировой ткани (схема, цАМФ-зависимый механизм активации гормон-чувствительной липазы, гормональная регуляция). Роль депонирования и мобилизации жиров, нарушения этих процессов при ожирении.
3. Пути превращения глицерола в клетках. Энергетический баланс окисления глицерола.
4. Биологическая роль холестерола, пищевые источники. Выведение холестерола из организма, желчные кислоты как основной конечный продукт обмена холестерола, представление о желчнокаменной болезни.
5. Биосинтез холестерола (тканевая и субклеточная локализация, субстраты, этапы, химизм I этапа, регуляция).
6. Механизмы поддержания баланса холестерола в клетках. Транспорт холестерола (ЭХ) во внепеченочные клетки, роль апоВ₁₀₀. Роль ЛПВП и ЛХАТ в разгрузке клеток от избытка холестерола. Метаболизм эфиров холестерола, роль АХАТ, холестеролэстеразы.
7. Транспорт холестерола (ЭХ) кровью. Гиперхолестеролемиа и ее причины. Биохимия атеросклероза, гиперхолестеролемиа как фактор риска, другие факторы риска, механизм атерогенного действия аполипопротеина (а). Основы профилактики и диагностики гиперхолестеролемий, атеросклероза (индекс атерогенности).

Литература для подготовки

Основная литература

1. *Березов Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 292–293, 305–317.
2. *Николаев А. Я.* Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 281–303.
3. *Конспект лекций.*

Дополнительная литература

1. *Маршалл В. Дж.* Клиническая биохимия / В. Дж. Маршалл. М.; СПб. : Изд-во БИНОМ-Невский Диалект, 1999. 368 с.
2. *Марри Р.* Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993. 384 с.

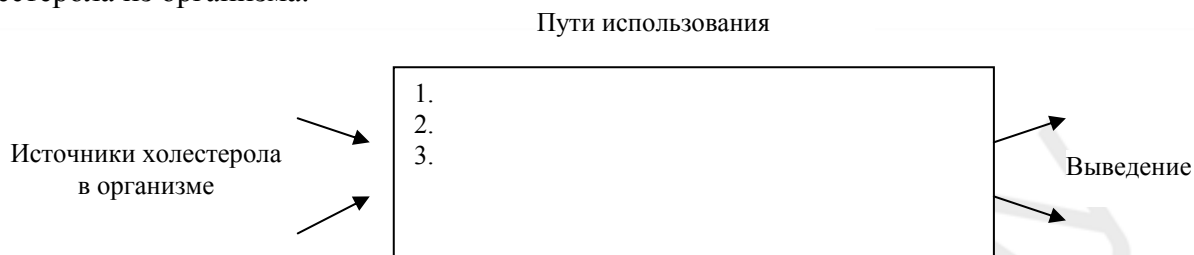
Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Вспомнить, что холестерол — структурный компонент биомембран всех тканей организма. Для синтеза различных биологически активных веществ в организме используется свободный холестерол, тогда как этерифицированная форма — резерв холестерола в клетке.

1.1. Из организма человека ежедневно выводится около 1 грамма холестерола. Назовите наиболее значимые пути выделения холестерола:

- А. В составе хиломикронов.
- Б. В виде солей желчных кислот.
- В. Выделение с фекалиями.
- Г. В виде стероидных гормонов.
- Д. Расщепляется до ацетил-КоА.

1.2. Дополните рисунок, указав пути поступления, использования и выведения холестерина из организма.



Задание 2. Выучите и напишите последовательность реакций синтеза холестерина из ацетил-КоА до образования мевалоната, укажите ферменты.

2.1. Для снижения содержания холестерина в крови больному, страдающему желчнокаменной болезнью, была назначена в качестве лечебного препарата хенодезоксихолевая кислота. Какой фермент, участвующий в обмене холестерина, ингибируется этим препаратом?

- А. Ацетил-КоА-ацетилтрансфераза. Б. ГОМГ-КоА-синтаза.
В. ГОМГ-КоА-редуктаза. Г. Холестеролэстераза.
Д. Ацил-КоА-холестерол-ацилтрансфераза.

2.2. Ответьте на вопрос: можно ли снижением потребления холестерина с пищей до 100 мг в сутки вызвать снижение концентрации холестерина в крови?

Задание 3. Знать строение и роль различных липопротеинов в транспорте холестерина в организме, участие ЛПНП и ЛПВП в переносе холестерина из кровотока в ткани и избытка холестерина из тканей в печень.

3.1. Выбрать, в какой форме пищевой холестерол поступает в кровоток:

- А. ЛПНП. Б. ЛПВП. В. ЛПОНП. Г. Хиломикронов.

Задание 4. При интенсивной физической работе активируется мобилизация нейтральных жиров из депо.

4.1. Какой фермент осуществляет внутриклеточный липолиз?

- А. Пепсин. Б. Гормон-чувствительная липаза. В. Липопротеинлипаза.
Г. Эндопептидаза. Д. Фосфолипаза.

4.2. Каким гормоном активируется этот фермент?

- А. Инсулином. Б. Глюкагоном. В. Кальцитонином.
Г. Окситоцином.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. У больного после курса лечения атеросклероза и строгого соблюдения диетологических рекомендаций в плазме крови лабораторно подтверждено повышение уровня антиатерогенных липопротеинов. Какие липопротеины являются антиатерогенными?

- А. ЛПОНП. Б. ЛПНП. В. ЛПВП. Г. Хиломикроны.

Задание 2. У людей, в рационе которых преобладает растительная пища и рыба, значительно снижен риск заболевания атеросклерозом. Какие вещества, входящие в состав этих продуктов, могут оказывать антиатерогенное действие? Их роль в обмене холестерина?

Задание 3. У пациента обнаружено повышение содержания кетоновых тел в крови. При каких физиологических состояниях организма наблюдается кетонемия?

- А. При длительной мышечной работе. Б. При избытке углеводов в пище.

- В. При отсутствии жиров в пище. Г. При голодании.
 Д. При нарушении переваривания жиров.

Задание 4. Пациент, которому с лечебной целью назначено голодание, в течение двух недель значительно похудел. Каким гормоном регулируется скорость мобилизации жиров при изменении режима питания?

- А. Глюкагоном. Б. Окситоцином. В. Адреналином.
 Г. Кальцитонином. Д. Паратирином.

Задание 5. При обследовании подростка, страдающего ксантоматозом, выявлена семейная гиперхолестеролемиа. Концентрация каких липопротеинов резко повышена в крови при данной патологии?

- А. Хиломикронов. Б. ЛПНП. В. ЛПОНП. Г. ЛПВП.

Задание 6. Для ситуации, когда происходит депонирование липидов, характерно:

- А. Повышение секреции инсулина.
 Б. Увеличение в крови концентрации свободных жирных кислот.
 В. Увеличение в крови концентрации ЛПОНП и хиломикронов.
 Г. Повышенная активность гормон-чувствительной липазы.
 Д. Повышенная активность липопротеинлипазы.

Задание 7. Какие положения правильны для ситуации, когда происходит мобилизация липидов?

- А. Концентрация жирных кислот в крови выше нормы.
 Б. Концентрация ЛПОНП выше нормы.
 В. Гормон-чувствительная липаза находится в фосфорилированной форме.
 Г. Липопротеинлипаза находится в фосфорилированной форме.
 Д. Активность липопротеинлипазы снижена.

Задание 8. Сравните особенности биосинтеза липидов (триацилглицеролов) в различных тканях, заполнив таблицу:

Ткань	Исходные субстраты синтеза	Форма транспорта липидов из органа
Слизистая оболочка тонкой кишки		
Печень		
Жировая ткань		

Задание 9.

Сравните биосинтез жиров в печени и жировой ткани:

- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1. Биосинтез жиров в печени. | А. Свободный глицерол используется для синтеза жиров. |
| 2. Биосинтез жиров в жировой ткани. | Б. В процессе биосинтеза образуется фосфатидная кислота. |
| 3. Оба процесса. | В. Стимулируется при низкой концентрации глюкозы в крови. |
| 4. Ни один. | Г. Синтезируемый жир образует вакуоли, заполняющие цитоплазму. |

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – А;

Для самостоятельной работы:

1.1 – Б, В; 2.1 – В; 2.2 - да; 3.1 – Г; 4.1 – Б; 4.2 – Б.

16. Внутриклеточный обмен жирных кислот. Кетоновые тела. Количественное определение холестерола в сыворотке крови.

Актуальность темы

Жирные кислоты — неотъемлемый составной компонент большинства липидов. Понимание механизмов синтеза и распада жирных кислот имеет большое практическое значение в деятельности врача. Многие болезни, врожденные и приобретенные, определяются нарушениями в соотношении процессов анаболизма и катаболизма жирных кислот. Нарушение соотношения незаменимых жирных кислот в питании может приводить к существенным изменениям в составе эйкозаноидов и, как следствие, к различной патологии.

Один из важных показателей липидного обмена – содержание кетоновых тел. Кетоновые тела содержатся в крови здорового человека в небольших количествах. Однако, при сахарном диабете, голодании концентрация кетоновых тел может повышаться в несколько раз, развивается кетонемия.

Цель занятия

Изучить процессы окисления и синтеза жирных кислот. Сформировать представление об эйкозаноидах и их функциях. Приобрести навыки определения холестерина и кетоновых тел.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– биоорганической химии:

- реакции альдольной конденсации, формирование и характеристика сложноэфирной связи, высшие жирные кислоты (строение, номенклатура, свойства); ПОЛ, продукты ПОЛ;
- кетоновые тела и их свойства

– биологической химии:

- окислительное фосфорилирование, дихотомический распад глюкозы, пентозофосфатный путь; центральные пути метаболизма (окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, ЦТК).

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:

Задание 1. Определите количество моль АТФ, синтезируемое за счет полного окисления одного моля:

- | | | |
|------------------------|----|---------|
| 1. Глюкозы. | А. | 17. |
| 2. Ацетил-КоА. | Б. | 18. |
| 3. Сукцинил-КоА. | В. | 10. |
| 4. Фосфодиоксиацетона. | Г. | 25. |
| | Д. | 32(30). |

Задание 2. В исследуемой моче определили выраженную кислую реакцию за счет вещества, обладающего свойствами кетонов. Какое из перечисленных веществ может обусловить это изменение рН мочи?

- А. Ацетон. Б. Янтарная кислота.
В. Угольная кислота. Г. Ацетоуксусная кислота. Д. Уксусная кислота.

Задание 3. В моче больного с выраженной кислой реакцией определили содержание β-гидроксибутирата. Из какого предшественника он может образоваться?

- А. Ацетон. Б. Ацетоуксусная кислота.
В. Масляная кислота. Г. Янтарная кислота. Д. γ-Оксималяная кислота.

Правильность решения проверьте, сопоставив его с эталоном ответа

Вопросы для обсуждения

1. β -Окисление как центральный путь катаболизма жирных кислот. Субклеточная локализация процесса, активация жирных кислот, транспорт в митохондрии. Химизм окисления, участие витаминов. Сопряжение с процессом окислительного фосфорилирования и энергетический выход. Особенности окисления в пероксисомах.

2. β -Окисление жирных кислот с нечетным количеством углеродных атомов, ненасыщенных жирных кислот, жирных кислот с разветвленной цепью.

3. α - и ω -окисление как вторичные пути обмена жирных кислот. Субклеточная локализация, продукты, биологическая роль.

4. Биосинтез жирных кислот. Субклеточная локализация, субстраты, химизм, регуляция. Особенности строения ацилсинтазы. Роль малик-фермента.

5. Синтез ненасыщенных жирных кислот: субстраты, ферментные системы. Высоконепредельные жирные кислоты как незаменимые факторы питания: представители, биологическая роль.

6. Метаболизм арахидоновой кислоты. Биосинтез эйкозаноидов (простагландины, простациклины, лейкотриены, тромбоксаны) и их биологическая роль.

7. Кетогенез: тканевая и субклеточная локализация, субстраты, химизм. Оксиметилглутариловый и деацилазный пути образования кетоновых тел. Молекулярные механизмы кетонемий при сахарном диабете, недостаточном углеводном питании, голодании. Утилизация кетоновых тел (взаимопревращения, активация, включение в метаболизм, энергетика окисления).

8. Ацетил-КоА как центральный метаболит. Пути его потребления в клетках. Взаимосвязь липидного и углеводного обмена.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 293-305.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 283-284.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.
2. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами / под ред. Е.С. Северина, А.Я. Николаева. М. : ГЭОТАР-МЕД, 2001. С. 186–189, 193–198, 205–210.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Научитесь рассчитывать энергетический выход β -окисления жирных кислот. Для этого нужно помнить, что:

А. Число молей ацетил-КоА, образующихся в результате окисления жирных кислот с четным числом атомов углерода (n), можно рассчитать по формуле: $n/2$.

Б. Каждый моль ацетил-КоА далее окисляется в ЦТК с образованием 10 моль АТФ.

В. В каждом витке β -окисления происходят две реакции дегидрирования, в которых восстанавливаются одна молекула НАД⁺ (НАДН⁺) и одна молекула ФАД (ФАДН₂), поэтому каждый виток дает 4 АТФ при сопряжении с процессом окислительного фосфорилирования.

Г. Число витков можно рассчитать по формуле: $n/2 - 1$, т. к. в последний виток β -окисления всегда вступает бутирил-КоА и при его расщеплении образуется два ацетил-КоА, а не один, как во всех предыдущих витках.

Д. Суммарный выход АТФ для β -окисления жирных кислот с четным числом атомов углерода можно рассчитать по формуле:

$$[(n/2) \cdot 10 + (n/2 - 1) \cdot 4] - 2^*$$

* — 2 АТФ расходуется на активацию жирных кислот.

1.1. Решите задачу. Рассчитайте количество АТФ, образующееся при окислении одной молекулы трипальмитоилглицерола. Алгоритм:

- А. Напишите реакцию гидролиза этого соединения.
- Б. Рассчитайте количество АТФ, образующееся при окислении каждой молекулы пальмитиновой кислоты до CO_2 и H_2O .
- В. Напишите реакции катаболизма глицерола (глицерол \rightarrow фосфоглицерол \rightarrow диоксиацетонфосфат \rightarrow глицеральдегидфосфат) до CO_2 и H_2O .
- Г. Рассчитайте количество АТФ, образующееся при окислении одной молекулы глицерола до CO_2 и H_2O .
- Д. Рассчитайте суммарный выход АТФ при полном окислении трипальмитоилглицерола.
- 1.2. При каких условиях будет активироваться β -окисление жирных кислот?
- А. При уменьшении синтеза малонил-КоА в цитозоле.
- Б. При увеличении концентрации НАДН \cdot H $^+$ в митохондриях.
- В. При гипоксии.
- Г. При наличии большого количества глюкозы.

Задание 2.

- 2.1. Напишите реакции первого витка синтеза пальмитиновой кислоты.
- 2.2. Напишите суммарное уравнение синтеза пальмитиновой кислоты и посчитайте количество циклов, необходимых для ее синтеза.
- 2.3. Сколько молекул глюкозы и какими путями нужно затратить, чтобы синтезировать 1 молекулу трипальмитоилглицерола?
- 2.4. Укажите, какие из приведенных ниже жирных кислот
- | | |
|---|----------------------|
| 1. Синтезируются в организме. | А. 18:2 (9, 12). |
| 2. Не синтезируются в организме и должны поступать с пищей. | Б. 18:1 (9). |
| | В. 18:3 (9, 12, 15). |
| | Г. 18:0. |
| | Д. 16:0. |
- 2.5. При каких условиях будет увеличиваться синтез жирных кислот?
- А. При повышении концентрации глюкозы в крови после еды.
- Б. При снижении секреции инсулина.
- В. При увеличении секреции глюкагона.
- Г. При дефосфорилировании ацетил-КоА-карбоксилазы.
- Д. При избыточном поступлении жиров с пищей.

Задание 3.

- 3.1. Укажите, какие функции регулируют перечисленные ниже эйкозаноиды:
- | | |
|--------------------|--|
| 1. Лейкотриены. | А. Сокращение гладких мышц, липолиз, секреция, проницаемость, электролитный баланс, свертывание крови. |
| 2. Простагландины. | Б. Хемотаксис, воспаление, аллергические реакции, сокращение гладкой мускулатуры бронхов и ЖКТ. |
| 3. Тромбоксаны. | В. Агрегация тромбоцитов, сужение сосудов и бронхов, регуляция уровня цАМФ в тромбоцитах. |
- 3.2. Известно, что аспирин необратимо ингибирует циклооксигеназу.
- А. Объясните, почему аспирин в малых дозах может применяться для предотвращения образования тромбов.
- Б. У некоторых людей (с генетической предрасположенностью) принятие аспирина может вызвать приступ бронхиальной астмы — так называемую аспириновую астму. Помогут ли данному больному стероидные препараты?

Задание 4. Изучить пути образования кетоновых тел в печени и их метаболизм. Обратить внимание на то, что ацетоацетат и β -гидроксибутират образуются в норме в

небольших количествах, а ацетон — лишь при значительном накоплении кетоновых тел (голодание, сахарный диабет).

4.1. Какие органы в норме используют ацетоацетат в качестве источника энергии?

А. Печень. Б. Сердце. В. Мозг. Г. Скелетная мускулатура.

4.2. Оценить энергетический эффект (в моль АТФ) окисления 1 моль ацетоацетата до CO_2 и H_2O . Расчет записать:

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1.

1.1. Один цикл β -окисления включает четыре последовательные реакции. Выберите правильную последовательность:

А. Окисление, дегидратация, окисление, расщепление.

Б. Восстановление, дегидрирование, восстановление, расщепление.

В. Дегидрирование, гидратация, дегидрирование, расщепление.

Г. Гидрирование, дегидратация, гидрирование, расщепление.

Д. Восстановление, гидратация, дегидрирование, расщепление.

1.2. Известно наследственное заболевание, при котором в скелетных мышцах снижена концентрация карнитина в результате дефекта ферментов, участвующих в его синтезе. Ответьте на вопросы:

А. Как скажется на способности выполнять длительную работу снижение концентрации карнитина?

Б. Под микроскопом в клетках таких мышц видны вакуоли жира. Объясните их происхождение.

Задание 2.

2.1. Охарактеризуйте виды окисления жирных кислот:

	Вид окисления	Локализация	Виды окисляемых жирных кислот
1	ω -Окисление		
2	α -Окисление		
3	β -Окисление	1)	
		2)	

2.2. Врожденная недостаточность какого фермента приводит к болезни Рефзума?

Задание 3.

3.1. Изучив метаболизм жирных кислот, заполните таблицу:

Процессы	β -Окисление	Биосинтез
Локализация процесса		
Исходный субстрат		
Переносчик субстрата через митохондриальную мембрану		
Коферменты окислительно-восстановительных реакций		
Источник присоединяемого		

фрагмента или отщепляемый фрагмент		
Регуляторные ферменты		
Регулирующие факторы		
Активаторы		
Ингибиторы		

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — (1 – Д; 2 – В; 3 – Г; 4 – А), 2 – А, Г; 3 – Б.

Для самостоятельной работы:

1.1 — 336,5.

1.2 — А.

2.3 — 34 молекулы глюкозы.

2.4 — (1 – Б, Г, Д; 2 – А, В).

2.5 — (А, Г).

3.1 — (1 – Б; 2 – А; 3 – В).

4.1. – Б, Г.

4.2. – 20 АТФ.

Самостоятельная работа (60 минут)

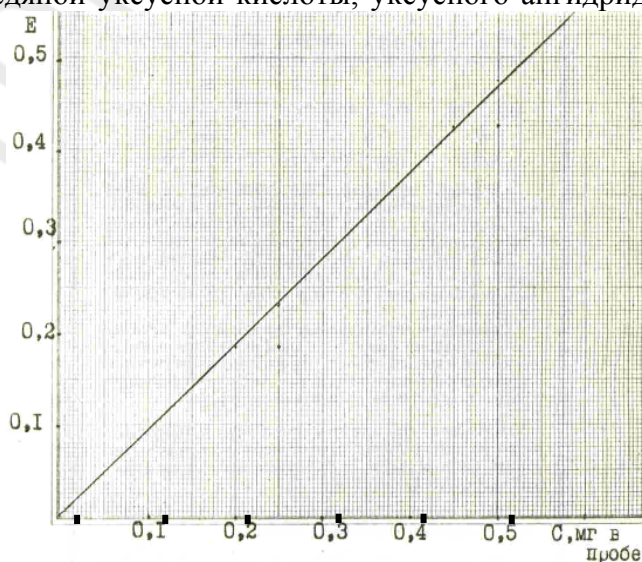
Инструкция к практическому занятию

Работа 1. **Определение концентрации общего холестерина в сыворотке крови**

Принцип метода. Метод основан на способности раствора холестерина в хлороформе давать с уксусным ангидридом и концентрированной серной кислотой зеленое окрашивание.

Ход работы. На дно сухой пробирки вносят 0,1 мл сыворотки крови. Отмеривают цилиндром 2,1 мл реактива № 1 (смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты).

Работать с реактивом № 1 надо осторожно, пипеткой не набирать и не проливать, так как он представляет собой смесь концентрированных кислот! Переливают реактив № 1 в пробирку с сывороткой, перемешивают, встряхивают и помещают в термостат при температуре 37°C на 20 минут (или при комнатной температуре). При этом развивается зеленое окрашивание. Интенсивность окраски измеряют на ФЭК в кювете толщиной 5 мм против воды при красном светофильтре. Для определения содержания холестерина по найденной оптической плотности пользуются готовым калибровочным графиком. Найденную концентрацию холестерина умножают на 1000, т. к. в опыт берется 0,1 мл сыворотки. Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л) равен 0,0258.



Калибровочный график для определения концентрации холестерина

Ответ: E= C(мг%)=

Норма — 3,9 – 6,2 ммоль/л холестерина в сыворотке крови (150–240 мг%).

Клинико-диагностическое значение. При нарушении жирового обмена холестерол может накапливаться в крови. Увеличение уровня холестерола в плазме крови (гиперхолестеролемиа) наблюдается при атеросклерозе, сахарном диабете, механической желтухе, нефрите, нефрозе (особенно при липоидных нефрозах), гипотиреозе. Понижение холестерола в крови (гипохолестеролемиа) наблюдается при анемиях, голодании, туберкулезе, гипертиреозе, раковой кахексии, паренхиматозной желтухе, поражении центральной нервной системы, лихорадочных состояниях, при введении инсулина.

Работа 2. Качественные реакции на ацетон и ацетоуксусную кислоту

Порядок выполнения работы

1. Проба Легалья на ацетон. Ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом натрия оранжево-красное окрашивание. После подкисления ледяной уксусной кислотой образуется соединение вишневого цвета.

В пробирку вносят 1 каплю мочи, 1 каплю 10% раствора NaOH и 1 каплю свежеприготовленного нитропруссид натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 3 капли ледяной уксусной кислоты, появляется вишнево-красное окрашивание.

2. Реакция Герхардта на ацетоуксусную кислоту. К 5 каплям мочи прибавляют по каплям 5% раствор хлорного железа; при этом выпадает осадок фосфатов в форме $FePO_4$. При наличии ацетоуксусной кислоты от дальнейшего прибавления хлорного железа появляется вишнево-красное окрашивание. При стоянии окраска бледнеет вследствие самопроизвольного декарбоксилирования ацетоуксусной кислоты. При кипячении процесс протекает очень быстро.

Клинико-диагностическое значение. Гиперкетонемия и кетонурия наблюдаются при сахарном диабете, голодании, гиперпродукции гормонов-антагонистов инсулина.

Выводы:

Подпись преподавателя:

17. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по теме «Обмен липидов»

1. Какие вещества относятся к липидам, простым липидам, неомыляемым и омыляемым липидам? Структура, физико-химические свойства и функции природных восков, ацилглицеролов, глицеро- и сфингофосфолипидов, гликолипидов, сульфоллипидов. Уметь писать химические формулы ацилглицеролов, фосфатидной кислоты, фосфатидилинозита, лизолецитина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилхолина, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот, блок-схемы строения церамида, цереброзидов и ганглиозидов (GM_1), сфингомиелина. Уметь писать реакции β -окисления жирных кислот с четным и нечетным числом углеродных атомов, подсчитывать энергетический выход полного окисления отдельных жирных кислот и ацилглицеролов.

2. Этапы переваривания липидов в желудочно-кишечном тракте. Представители первичных, конъюгированных и вторичных желчных кислот. Место их образования, роль в переваривании липидов. Эмульгирующие свойства желчных кислот в просвете кишечника. Роль таурина и глицина. Печеночно-кишечная рециркуляция желчных кислот.

3. Какие жирные кислоты подвергаются β -окислению в пероксисомах? Отличие β -окисления в митохондриях и пероксисомах.

4. В какой части клетки осуществляется α -гидроксилирование и ω -окисление жирных кислот? Метаболические последствия нарушения синтеза рецептора для фитанат гидроксилазы, нарушения в организме при болезни Рефзума.

5. Регуляторная взаимосвязь β -окисления жирных кислот в клетках и аэробного окисления глюкозы. Этапы превращения углеводов в депонируемые липиды (схема).

6. Ферментные системы, ответственные за образование ненасыщенных жирных кислот в клетке. Ненасыщенные жирные кислоты, относящиеся к группе незаменимых факторов питания. Схема синтеза арахидоновой кислоты и пути её использования.

7. Виды эйкозаноидов, закономерности их действия, функции в организме. Механизм действия противовоспалительных лекарственных препаратов нестероидной природы.

8. Условия, при которых активируется биосинтез жирных кислот в клетках. Внутриклеточная локализация этого процесса и происхождение исходных субстратов. Реакции синтеза жирных кислот. Уметь рассчитывать затрату глюкозы (молекул) на синтез заданного триацилглицерола (молекулы).

9. Схемы путей образования НАДФН⁺ для кетоацилредуктазной и еноилредуктазной реакций биосинтеза жирных кислот в гепатоцитах и адипоцитах.

10. Сколько АТФ нужно затратить на синтез жирных кислот (кислоты по вашему усмотрению), чтобы обеспечить ими образование одной молекулы глюкоцерамида?

11. Схема ферментов тканевого дыхания. Комплексы дыхательной цепи. Указать на схеме участки с энергией, достаточной для образования АТФ. На основании какого измеряемого показателя можно определить количество энергии, выделяемой в реакции переноса электронов? Регуляция дыхательной цепи, роль АДФ, АТФ.

12. Схема ферментов тканевого дыхания для НАД⁺-зависимых и ФАД-зависимых субстратов. Уметь включать субстраты β -окисления жирных кислот (β -гидроксиацил-КоА, ацил-КоА) в дыхательную цепь. Знать, чему равен коэффициент фосфорилирования (Р/О) для каждого из этих субстратов. На схеме обязательно указывать участки сопряжения транспорта электронов и фосфорилирования. Можно ли использовать для окисления субстратов в митохондриях НАДФ⁺? Роль НАДФ⁺ в клетке.

13. Что такое окислительное фосфорилирование (определение, субклеточная локализация)? Основные положения теории П. Митчелла, объясняющие механизм окислительного фосфорилирования. Что такое разобщение окислительного фосфорилирования? Какими свойствами должен обладать разобщитель? Примеры разобщителей. Как изменяется процесс окислительного фосфорилирования при недостатке кислорода в клетках (объяснить механизм)?

14. Ингибиторы переноса электронов по дыхательной цепи. В каком состоянии (окисленном или восстановленном) будут находиться переносчики электронов при блокаде цепи: а) производными барбитуровой кислоты; б) малоновой кислотой; в) цианидами, угарным газом; г) ротеноном; д) антимицином А?

15. Реакции образования β -гидрокси- β -метилглутарил-КоА и мевалоновой кислоты. Пути использования этих соединений в клетке. Регуляция активности ГОМГ-КоА редуктазы.

16. Синтез холестерина в клетках (схема). Регуляция этого процесса, направленная на защиту клетки от перегрузки холестерином. Составляющие механизма поддержания баланса холестерина в клетках, роль апо А₁, апо D, апо В-100, ЛХАТ, клеточных рецепторов, остатков хиломикронов, ЛППП и ЛПВП.

17. Факторы, способствующие высокому уровню холестерина в составе ЛПВП, в составе ЛПНП. Вероятный механизм участия холестерина в развитии атеросклероза. Происхождение и роль пенистых клеток. Исходя из метаболизма холестерина в организме и его регуляции, уметь обосновать подходы к снижению его уровня в крови.

18. Возможные механизмы атерогенного действия липопротеина (а).

19. Что такое дислиппротеинемия? Причины и проявления гиперлиппротеинемий I–V типов (по классификации Фредриксона).

20. Предложить механизм развития последствий в результате снижения активности липопротеинлипазы в крови, печеночной липазы, апо C-2, недостаточности рецепторов для апо B-48/E.

21. Особенности синтеза триацилглицеролов в клетках жировой ткани, печени и ресинтеза в кишечнике (реакции этих процессов).

22. Метаболизм липопротеинов крови (ХМ, ЛПОНП, ЛППП, ЛПНП и ЛПВП).

23. Возможные причины повышения уровня свободных жирных кислот в крови. Роль аполиппротеинов, гормон-чувствительной липазы.

24. Месторасположение действия фосфолипаз A₁, A₂, C и D на структуру фосфолипидов. Реакции синтеза лецитина. Липотропные факторы, их роль в нарушении синтеза глицерофосфолипидов в печени. Механизм развития жирового перерождения печени.

25. Понятие «кетонные тела», их химические формулы. Реакции синтеза кетонных тел, локализация в клетке. Роль в организме. Уметь рассчитать количество молекул кетонных тел, образующихся из одной молекулы заданной жирной кислоты.

26. Уметь писать реакции включения кетонных тел в процесс энергопродукции, его органная и внутриклеточная локализация, энергетический выход.

27. Понятие «кетоз», вероятный механизм его происхождения при сахарном диабете, голодании.

18. Контроль практических навыков биохимического анализа

Актуальность темы

Качественный и количественный биохимический анализ находит широкое применение в клинических, медико-биологических и санитарно-гигиенических исследованиях. Так, некоторые цветные реакции нашли широкое применение в лабораторной практике для количественного определения белка и аминокислот (биуретовая реакция лежит в основе биуретового метода количественного определения белка, нингидриновая реакция используется на практике для количественного определения аминокислот).

Цель занятия

Закрепить приобретенные практические навыки качественного и количественного биохимического анализа. Проведением определения содержания белка в сыворотке крови и цветных реакций на белки и аминокислоты проверить умение студентов применять методы количественного и качественного анализа для решения прикладных медицинских аспектов.

Требования к исходному уровню знаний

Для качественного выполнения заданий необходимо вспомнить из:

- **общей химии:**
 - принципы проведения качественных реакций;
- **биоорганической химии:**
 - методы проведения цветных реакций на белки и аминокислоты.
- **медицинской и биологической физики**
 - устройство и принцип работы фотоэлектрокалориметра.

Получив индивидуальные контрольные задания, студенты приступают к выполнению лабораторных работ, используя при этом инструкцию и оформляя протокол работы.

Инструкция к контрольному занятию

Работа 1. *Цветные реакции на белки и аминокислоты*

Цветные реакции дают возможность обнаружить присутствие белка в растворах и биологических жидкостях. Эти реакции применяют как для качественного, так и для количественного определения белка и содержащихся в нем аминокислот. Некоторые реакции присущи не только белкам, но и другим веществам, например, фенол, подобно тирозину, дает розово-красное окрашивание с реактивом Миллона, поэтому недостаточно проведения одной какой-либо реакции для установления наличия белка в исследуемом растворе.

Существует два типа цветных реакций: 1) универсальные — биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все α -аминокислоты и белки); 2) специфические — только на определенные аминокислоты как в молекуле белка, так и в растворах аминокислот, например, реакция Фоля (на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу), реакция Сакагучи (на аргинин) и др.

После оформления протокола исследования своей контрольной задачи с использованием цветных реакций на основании полученных результатов студент делает выбор из следующих вариантов ответов:

- 1) раствор яичного белка (содержит ароматические, алифатические и серусодержащие аминокислоты);
- 2) раствор желатина (желатин — денатурированный коллаген, не содержит ароматических аминокислот);
- 3) раствор ароматических α -аминокислот;
- 4) раствор алифатических α -аминокислот.

название реакции	Принцип реакции	Краткий ход работы	Примечания
Биуретовая реакция (Пиотровского)	Данная реакция открывает пептидную связь в белке. Обусловлена образованием в щелочной среде биуретового комплекса в результате соединения меди с пептидной группировкой белка. При этом раствор приобретает сине-фиолетовый цвет	К 5 каплям исследуемого раствора прибавляют 5 капель 10% р-ра едкого натра, 2 капли 1% р-ра сульфата меди. Содержимое пробирки перемешивают	Биуретовую р-цию дают вещества, содержащие не менее двух пептидных связей
Нингидриновая реакция	Аминокислоты, полипептиды и белки при кипячении с водным р-ром нингидрина дают синее или сине-фиолетовое окрашивание. В результате взаимодействия α -аминокислоты с нингидрином образуется шиффово основание, которое перегруппировывается, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден	К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 5 капель 0,5% водного раствора нингидрина и кипятят 1–2 мин. Отмечают появление окраски	Характерна для аминокислот в α -положении, входящих в состав белков, полипептидов и свободных аминокислот
К ⁺ гопротеиновая реакция (Мульдера)	При обработке р-ра белка конц. азотной кислотой появляется желтое окрашивание. Ароматические аминокислоты при взаимодействии с концентрированной HNO ₃ образуют нитросоединения, окрашенные в желтый цвет	К 5 каплям исследуемого р-ра добавляют 3 капли конц. азотной кислоты и осторожно кипятят	Положительная реакция Мульдера доказывает присутствие в растворе ароматических аминокислот (три, фен, тир)
Реакция на тирозин (Миллона)	Тирозин при взаимодействии с реактивом Миллона и при кипячении образует кроваво-красный осадок ртутной соли динитротирозина, благодаря наличию у тирозина фенольного ядра	К 5 каплям исследуемого раствора приливают 3 капли р-ра Миллона и нагревают (осторожно!)	Соединения, имеющие в своем составе фенольное ядро, также дают положительную р-цию Миллона

Реакция Фоля	Сульфгидрильные группы (-SH) в белке или в пептиде подвергаются щелочному гидролизу, в результате чего происходит отщепление серы в виде сульфида свинца, который с плюмбитом дает черный или бурый нерастворимый осадок сульфида свинца PbS	К 5 каплям исследуемого р-ра добавить 5 кап. реактива Фоля. Прокипятить и дать постоять 1–2 мин	Положительна только с аминокислотами, которые содержат слабосвязанную серу (цистеин)
--------------	--	---	--

Вывод:

Работа 2. Количественное определение белка в сыворотке крови биуретовым методом

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белка с ионами двухвалентной меди (сульфата меди) в щелочной среде. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации белка в сыворотке и определяется фотометрически.

Порядок выполнения работы. Каждый студент получает пробирку, содержащую 0,1 мл исследуемой сыворотки (опытная проба). Во вторую пробирку вносят 0,1 мл стандартного раствора белка с концентрацией 100 г/л (стандартная проба). В третью пробирку отмеривают 0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия (контрольная проба, которую можно сделать одну на всю группу). Во все пробирки приливают по 5 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок осторожно перемешивают, избегая образования пены, и через 30 мин фотометрируют опытную и стандартную пробы в кюветах на 10 мм при зеленом светофильтре (длина волны — 540 нм) против контрольного раствора. Определив экстинкцию проб, рассчитывают концентрацию белка (г/л) в исследуемой сыворотке по формуле:

$$C_{\text{оп}}(\text{г/л}) = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) \cdot C_{\text{ст}},$$

где $C_{\text{оп}}$ — концентрация белка в исследуемой сыворотке; $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора белка (100 г/л); $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность опытной пробы; $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандартной пробы.

Ответ:

Подпись преподавателя:

19. переваривание и всасывание белков. Анализ желудочного сока

Актуальность темы

Основным поставщиком азота в организме являются аминокислоты. Аминокислоты образуются в процессе протеолиза белков. Распад белков в организме осуществляют протеазы. Существует протеолиз двух типов — тотальный (неограниченный), при котором белки распадаются до аминокислот, и ограниченный (частичный), при котором отщепляется несколько аминокислот. Ограниченный протеолиз имеет регуляторное значение (активация ферментов, гормонов белковой природы, система свертывания крови, система комплемента и другие процессы). Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте — это расщепление их до аминокислот. От этого зависит полноценное снабжение организма азотом и незаменимыми факторами питания, к которым относятся незаменимые аминокислоты.

Переваривание осуществляют соляная кислота и протеазы. Об обмене белков судят по азотистому балансу — разнице между поступлением азота в составе белков и выделению азота из организма.

Цель занятия

Сформировать представление об общей концепции обмена азота в организме, о белке как главном пищевом источнике азота и аминокислот. Получить представление о молекулярных основах переваривания белков в ЖКТ, особенностях действия различных протеаз и использовании их ингибиторов в клинической практике, всасывании аминокислот и транспорте их в клетки. Научиться применять полученные знания для объяснения причин нарушения усвоения белков пищи. Освоить методы клинического анализа желудочного сока.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **биохимии:**

- структурная организация белковой молекулы;
- строение аминокислот;
- ферменты.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. При исследовании желудочного сока методом гель-фильтрации выделили неактивную форму пепсина с молекулярной массой 42 кДа. После добавления к ферменту соляной кислоты молекулярная масса пепсина уменьшилась до 35 кДа и фермент стал активным. Какой вид регуляции характерен для данного фермента?

- А. Фосфорилирование молекулы фермента.
- Б. Аллостерическая регуляция.
- В. Присоединение или отщепление белков ингибиторов.
- Г. Частичный протеолиз молекулы фермента.
- Д. Регуляция по принципу обратной связи.

Задание 2. В клинику госпитализирован больной с дерматитом открытых участков кожи, диареей, деменцией. Выбрать, какая из перечисленных реакций, протекающая с участием НАД⁺-зависимого фермента, нарушается при данном заболевании.

- А. Окисление молочной кислоты.
- Б. Трансаминирование пировиноградной кислоты.
- В. Гидролиз жиров.
- Г. Синтез карбамоилфосфата.
- Д. Взаимопревращение оптических изомеров.

Задание 3. Для рассасывания послеоперационных рубцов больному проведен курс электрофореза трипсина. Активация какого типа химических реакций лежит в основе энзимотерапии?

- А. Изомеризации.
- Б. Оксидоредукции.
- В. Синтеза.
- Г. Гидролиза.
- Д. Переноса функциональных групп.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Что такое азотистый баланс? Какие виды азотистого баланса имеют место в норме и патологии?
2. Потребность в белках. Биологическая ценность белков.
3. Что такое протеолиз? Роль ограниченного протеолиза в организме.
4. Где происходит переваривание белков? Какие ферменты участвуют в этом процессе? Общая характеристика протеаз. Их субстратная специфичность и место действия.
5. Роль желудочного сока в переваривании белков. Механизмы образования соляной кислоты в желудке.
6. Всасывание аминокислот, транспорт аминокислот в клетки.
7. Процессы гниения белков в кишечнике. Обезвреживание продуктов гниения и ксенобиотиков.
8. Аминокислотный фонд клетки — его источники и использование.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 318–337.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 303–308.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985. С. 747–750.
2. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993. С. 286–298.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1.

- 1.1. Запомнить основные этапы переваривания белков:
 - А. В желудке.
 - Б. В просвете тонкого кишечника.
 - В. «Пристеночное» переваривание.
- 1.2. Запомнить ферменты, участвующие на каждом этапе переваривания белков, и знать специфичность их действия, рН-оптимум, механизм активации.
- 1.3. Усвоить, что конечным результатом переваривания белков является образование аминокислот, легко проникающих в клетки слизистой посредством активного транспорта.
- 1.4. Уметь объяснить причины появления в кровотоке фенола, индола, скатола, путресцина, кадаверина после переваривания белковой пищи в желудочно-кишечном тракте.
- 1.5. Выберите правильные ответы. Биологическое значение переваривания белков заключается в том, что благодаря этому процессу происходит:
 - А. Образование набора аминокислот, необходимых для синтеза собственных белков организма и биологически активных соединений.
 - Б. Отщепление небелковой части сложных белков (липо-, нуклеопротеинов), что облегчает расщепление белковой части молекулы.
 - В. Образование продуктов, лишенных антигенной специфичности.
 - Г. Образование продуктов, которые могут легко проникать в клетки слизистой оболочки кишечника.

Задание 2. Ответьте на вопрос: что является начальной причиной образования активных протеолитических ферментов из проферментов?

- А. Сближение аминокислот, входящих в активный центр.
- Б. Изменение вторичной структуры фермента.
- В. Образование новых связей в молекуле фермента.
- Г. Изменение первичной структуры.

Д. Изменение третичной структуры.

Задание 3. Выберите правильные ответы на вопрос: что предохраняет секреторные клетки от действия протеаз?

- А. Наличие слизи, содержащей гетерополисахариды.
- Б. Активация фермента только в полости (желудка, кишечника).
- В. Наличие гликопротеинов на наружной поверхности мембран.
- Г. Отсутствие субстратов.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. При острых панкреатитах происходит преждевременная активация проферментов в клетках панкреатической железы. В результате механического повреждения (сильное сдавливание, травмы) проферменты выходят из клеток и активизируются в самой железе, а не в полости тонкой кишки. Ответьте на вопросы:

- А. Какие ферменты могут активироваться при острых панкреатитах?
- Б. Какие последствия может вызвать такая активация?
- В. Как можно уменьшить разрушительное действие панкреатических протеаз?

Г. Биохимическим тестом на острый панкреатит в клинической практике служит определение активности α -амилазы в крови больного. Объясните, почему увеличивается активность α -амилазы в крови при остром панкреатите.

Задание 2. При гипoaцидном гастрите снижение кислотности желудочного сока вызывает торможение частичного протеолиза молекулы пепсиногена. Изменения какого уровня структурной организации фермента имеют решающее значение при его активации?

- А. Первичной структуры.
- Б. Вторичной структуры.
- В. Третичной структуры.
- Г. Четвертичной структуры.
- Д. Более высокого уровня.

Задание 3. Мужчина направлен в больницу с диагнозом острый панкреатит, при котором вследствие внутриклеточной активации панкреатических ферментов происходит разрушение тканей. Пациенту был назначен препарат контрикал — конкурентный ингибитор панкреатических ферментов. Выберите характерные особенности ингибирования:

- А. Ингибитор является структурным аналогом субстрата.
- Б. Степень ингибирования зависит от концентрации ингибитора.
- В. Структура ингибитора не похожа на структуру субстрата.
- Г. Степень ингибирования зависит от времени действия ингибитора.
- Д. Образование неактивного комплекса ингибитор-субстрат.

Эталонные ответы к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – Г; 2 – А; 3 – Г.

Для самостоятельной работы:

1.5. – А, Б, В, Г; 2 – Г; 3 – А, Б, В.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Количественное определение кислотности желудочного сока*

Принцип метода. Общую кислотность желудочного сока измеряют в миллилитрах 0,1н раствора едкого натра, затраченного на нейтрализацию 1000 мл желудочного сока в присутствии индикатора фенолфталеина (зона перехода рН 8,3–10,0; ниже 8,2 — бесцветный, выше 10,0 — красный). В норме общая кислотность для взрослого человека составляет 40–60 ммоль/л, у новорожденных — 2,8 ммоль/л, у детей от 1 месяца до 1 года — 4–20 ммоль/л.

Содержание свободной соляной кислоты в желудочном соке измеряют в миллилитрах 0,1н раствора едкого натра, затраченного на нейтрализацию 1000 мл желудочного сока в присутствии индикатора диметиламиноазобензола (зона перехода рН 2,9–4,0; ниже 2,9 — розово-красный; выше 4,0 — желтый). Свободная соляная кислота почти вся оттитровывается при рН 3,0; при этом окраска диметиламиноазобензола изменяется от розово-красной до оранжевой. Содержание свободной соляной кислоты в норме составляет 20–40 ммоль/л (у новорожденных — 0,5 ммоль/л).

Определение общей кислотности, общей соляной кислоты, свободной соляной кислоты и связанной соляной кислоты проводится в одной порции желудочного сока. Титрование проводят с двумя индикаторами: диметиламиноазобензолом и фенолфталеином.

Ход работы. Отмеривают пипеткой в колбочку 10 мл желудочного сока, добавляют 1 каплю диметиламиноазобензола и 2 капли фенолфталеина. При наличии в желудочном соке свободной соляной кислоты он окрашивается в красный цвет с розовым оттенком, при ее отсутствии сразу появляется оранжевая окраска.

Титруют свободную соляную кислоту 0,1н NaOH из микробюретки до появления оранжевого окрашивания и результат записывают (1-я отметка). Не добавляя щелочи в бюретку, продолжают титрование до появления лимонно-желтого цвета и результат записывают (2-я отметка от 0). Продолжают титрование до появления розового окрашивания (3-я отметка от 0).

Расчет. Содержание свободной HCl (1-я отметка), связанной HCl (2-я отметка) и общую кислотность (3-я отметка) рассчитывают по формуле:

$$X \text{ (ммоль/л)} = A \times 1000 \times 0,1/10 ,$$

где А — количество 0,1н раствора NaOH, мл; 10 — количество желудочного сока, взятого для титрования, мл; 0,1 — количество мг/экв. щелочи в 1 мл 0,1н раствора, ммоль; 1000 — пересчет на 1 литр.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. При заболеваниях желудка кислотность может быть нулевой, пониженной и повышенной. При язвенной болезни желудка или гиперацидном гастрите происходит увеличение содержания свободной соляной кислоты и общей кислотности (гиперхлоргидрия). При гипоацидном гастрите или раке желудка наблюдается уменьшение количества свободной соляной кислоты и общей кислотности (гипохлоргидрия). При раке желудка, хроническом гастрите иногда отмечается полное отсутствие соляной кислоты (ахлоргидрия). При злокачественном малокровии, при раке желудка часто наблюдается полное отсутствие соляной кислоты и пепсина (ахилия).

Работа 2. Обнаружение молочной кислоты реакцией Уффельмана

Молочная кислота относится к патологическим составным частям желудочного сока и обнаруживается при ахлоргидрии вследствие усиления процессов брожения в желудке.

Принцип метода. При добавлении к реактиву Уффельмана, имеющему фиолетовую окраску, патологического желудочного сока появляется желто-зеленое окрашивание вследствие образования лактата железа (положительная реакция Уффельмана).

Ход работы. Готовят в пробирке реактив Уффельмана (20 капель 1% раствора фенола и 2 капли 1% раствора хлорного железа). Добавляют в пробирку 5 капель желудочного сока. При наличии молочной кислоты появляется желто-зеленая окраска.

Работа 3. *Количественное определение активности пепсина желудочного сока*

Принцип метода. В основе метода лежит способность пепсина в желудочном соке створаживать белок молока — казеиноген. Створаживание молочно-ацетатной смеси при pH 4,9 и температуре 25°C пепсином происходит строго параллельно его способности переваривать белки. За единицу активности пепсина принимают то его количество, которое при указанных условиях створаживает 5 мл молочно-ацетатной смеси за 60 с (эта условная единица соответствует 0,010 мг кристаллического пепсина). Желудочный сок человека в норме содержит в 1 мл 40–60 ед. пепсина. Таким же методом можно определить активность уропепсина в моче. С мочой здорового человека за сутки обычно выделяется от 150 до 300 ед. (1,5–3 мг) уропепсина.

Ход работы. На дно пробирки с помощью микропипетки наливают 0,1 мл раствора пепсина, а в другую пробирку наливают 5 мл молочно-ацетатной смеси. Помещают обе пробирки в термостат на 10 мин. Быстро переливают молочно-ацетатную смесь в пробирку с пепсином, содержимое пробирки встряхивают. Момент приливания смеси отмечают по секундомеру. Пробирку со смесью встряхивают, наклоняют ее и наблюдают за появлением на ее стенках первых хлопьев казеина. Записывают время створаживания смеси в секундах.

Расчет. Для расчета активности пепсина в 1 мл желудочного сока делят 60 секунд на время створаживания смеси и таким путем находят количество единиц пепсина в 0,1 мл желудочного сока, а умножая на 10 — в 1 мл.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. При ахилии уропепсин в моче и пепсин в желудочном соке могут полностью отсутствовать, а при язвенной болезни желудка количество пепсина резко увеличено.

Выводы:

Подпись преподавателя:

20. Внутриклеточный обмен аминокислот. Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови

Актуальность темы

Поступившие в клетки аминокислоты образуют фонд аминокислот, который пополняется за счет распада пищевых и тканевых белков и аминокислот, образующихся из других веществ. Аминокислоты фонда клетки используются для синтеза белков и других соединений, а также подвергаются индивидуальным превращениям и общим реакциям обмена — дезаминированию, трансаминированию, декарбоксилированию и активации при биосинтезе белков. Реакции дезаминирования приводят к образованию аммиака. Наибольшую роль играет глутаматдегидрогеназная реакция. В ходе реакций переаминирования происходит распад аминокислот, синтез новых аминокислот и

обеспечивается взаимосвязь реакций углеводного и белкового обмена. При декарбоксилировании аминокислот образуются биогенные амины — триптамин, серотонин, гистамин, ГАМК, играющие важную роль в организме.

Цель занятия

Усвоить общие пути обмена аминокислот. Получить представление о путях обмена безазотистого остатка аминокислот, о роли аминокислот в образовании важных биологически активных соединений. На примере определения активности аминотрансфераз в сыворотке крови показать значение использования индикаторных ферментов в диагностике и прогнозе заболеваний.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **биохимии**:

- структурная организация белковой молекулы;
- строение аминокислот;
- ферменты.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Данные врачебного осмотра пожилой женщины, проживающей в доме для престарелых, соответствовали периферической нейропатии. Лабораторные анализы подтвердили недостаточность тиамина. Активность каких процессов снижена при данном гиповитаминозе?

- А. Трансаминирование аминокислот.
- Б. Декарбоксилирование аминокислот.
- В. Окислительное декарбоксилирование α -кетокилот.
- Г. Окислительное дезаминирование аминокислот.

Задание 2. Вспомните классификацию ферментов. Ферменты каких классов участвуют в катализе реакций дезаминирования, переаминирования, декарбоксилирования аминокислот?

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Аминокислотный фонд клетки, источники пополнения и пути использования.
2. Трансаминирование, аминотрансферазы, коферментная функция витамина В₆. Клинико-диагностическое значение определения активности аминотрансфераз сыворотки крови.
3. Пути дезаминирования аминокислот. Окислительное дезаминирование (ферменты, коферменты). Окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты (химизм), значение глутаматдегидрогеназной реакции. Непрямое дезаминирование.
4. Пути использования безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты. Способы синтеза новых аминокислот.
5. Декарбоксилирование аминокислот, ферменты, кофермент. Биогенные амины (триптамин, серотонин, гистамин, γ -аминомасляная кислота), катехоламины (дофамин, норадреналин, адреналин). Реакции образования, биологическая роль, пути обезвреживания.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Г. Т. Биологическая химия / Березов Г. Т., Коровкин Б. Ф. М. : Медицина, 1990. С. 337–350.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 308–315.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. У мужчины, в течение длительного времени злоупотреблявшего алкоголем, значительно повышен уровень аланинаминотрансферазы крови. Какие биохимические реакции катализирует данный фермент?

- А. Переаминирование.
- Б. Окислительное дезаминирование.
- В. Синтез глутамата.
- Г. Декарбоксилирование.
- Д. Трансметилирование.

Задание 2. У больного с инфекционным гепатитом установлено резкое увеличение активности глутаматдегидрогеназы в крови. Укажите витамин, который является коферментом данного энзима:

- А. Никотинамид.
- Б. Тиамин.
- В. Фолиевая кислота.
- Г. Пиридоксин.
- Д. Аскорбиновая кислота.

Задание 3. У больного после перенесенного инфаркта миокарда в течение 2-х суток значительно повышалась активность аспартатаминотрансферазы в крови. Укажите кофермент данного фермента:

- А. НАД⁺.
- Б. ФАД.
- В. НАДФ⁺.
- Г. Пиридоксальфосфат.
- Д. Тиаминпирофосфат.

Задание 4. После эпилептиформного припадка педиатром был осмотрен грудной ребенок, получающий искусственную пищу. У ребенка обнаружен также дерматит. При лабораторном обследовании установлено снижение аланин- и аспартатаминотрансферазной активности в крови. Недостатком какого кофермента обусловлено снижение скорости трансаминирования аминокислот?

- А. НАД⁺.
- Б. НАДФ⁺.
- В. ФАД.
- Г. Пиридоксальфосфата.
- Д. Тиаминпирофосфата.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Центральная роль глутаминовой кислоты в промежуточном обмене аминокислот определяется тем, что глутаминовая кислота:

1. Участвует в трансаминировании как универсальный донор NH₂-группы.
2. Легко образуется из α-кетоглутаровой кислоты — универсального акцептора аминогрупп.
3. Дезаминируется НАД⁺-зависимой глутаматдегидрогеназой.
4. Является заменимой аминокислотой.

Задание 2. При декарбоксилировании каких аминокислот или их производных образуются следующие биогенные амины?

1. Триптамин.
2. Серотонин.
3. Гистамин.
4. ГАМК
5. Дофамин.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — В.

Для самостоятельной работы:

1 — А; 2 — А; 3 — Г; 4 — Г.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Определение активности аланиновой аминотрансферазы (АлАТ)

Аминотрансферазы (трансаминазы) — ферменты, которые используют в качестве кофермента фосфопиридоксаль и катализируют обратимый перенос аминокруппы с аминокислот на кетокислоты. Определение концентрации образующихся α -кетокислот лежит в основе методов определения активности трансаминаз.

Принцип метода. В результате переаминирования аланин превращается в пировиноградную кислоту. Добавление кислого 2,4-динитрофенилгидразина останавливает ферментативный процесс. Образовавшийся гидразон пировиноградной кислоты в щелочной среде дает коричнево-красное окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшегося пирувата.

Активность аминотрансфераз выражают в микромолях пировиноградной кислоты, образованной за 1 час инкубации при температуре 37°C в расчете на 1 мл сыворотки крови. В норме активность аминотрансфераз в крови невелика и составляет для АсАТ от 0,1 до 0,45 мкмоль/ч·мл, а для АлАТ — 0,1–0,68 мкмоль/ч·мл.

Ход определения. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора, затем добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки и инкубируют в термостате 30 мин при 37°C . Затем приливают 0,5 мл динитрофенилгидразинового раствора и пробы выдерживают 20 мин при комнатной температуре. После этого добавляют 5 мл 0,4н NaOH, тщательно перемешивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре для развития окраски. Оптическую плотность измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром (530 нм) в кювете с шириной 10 мм против контрольной пробы на реактивы. Контрольная проба содержит все ингредиенты опытной пробы за исключением сыворотки крови, вместо которой берут 0,1 мл дистиллированной воды.

Расчет активности производится по готовому калибровочному графику зависимости концентрации ПВК от оптической плотности окрашенного раствора. Пересчет активности фермента в микромоли пировиноградной кислоты производят по следующей формуле:

$$\text{АлАТ(мкмоль/ч·мл)} = a \cdot 10 \cdot 2 / 88,$$

где a — количество пировиноградной кислоты в 0,1 мл сыворотки, найденное по калибровочному графику в мкг; 88 — масса 1 мкмоль пировиноградной кислоты в мкг; 2 — коэффициент перерасчета на 1 час инкубации; 10 — коэффициент перерасчета на 1 мл сыворотки.

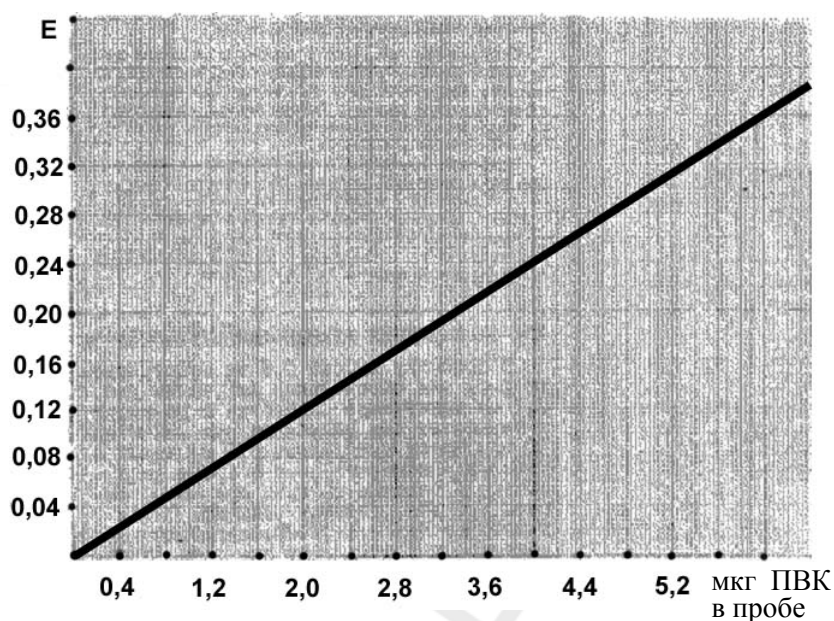
Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Аминотрансферазы относятся к индикаторным ферментам, и определение их

активности широко применяется в диагностике заболеваний сердца и печени. При инфаркте миокарда через 4–6 часов наблюдается повышение уровня АсАТ, максимальна ее активность через 24–36 часов. Активность обеих аминотрансфераз, в особенности АлАТ, повышается при инфекционном гепатите. Особенно важна диагностическая ценность определения АлАТ при безжелтушных формах болезни Боткина и в инкубационном периоде.

Выводы:

Подпись преподавателя:



21. Обезвреживание аммиака. Количественное

определение остаточного азота крови и мочевины в моче.

Патологии аминокислотного обмена

Актуальность темы

Образующийся в процессе метаболизма аммиак является токсичным соединением, в первую очередь для центральной нервной системы. Нарушение процессов его связывания и обезвреживания ведет к гипераммониемии, коматозному состоянию и смерти больного. Знание процессов обезвреживания аммиака необходимо для понимания механизма возникновения гипераммониемии, способов борьбы с ней, а также для своевременной диагностики и лечения врожденных нарушений орнитинового цикла реакций синтеза мочевины. Знакомство с наследственными нарушениями обмена аминокислот необходимо для своевременного выявления этих заболеваний и их лечения.

Важнейшим показателем азотистого обмена является остаточный азот крови. В клинической лабораторной практике определение остаточного азота и его фракций, а также мочевины в моче помогает оценить выделительную функцию почек, степень почечной и печеночной недостаточности.

Цель занятия

Изучить процессы обезвреживания аммиака в организме и возможные механизмы развития гипераммониемии. Закрепить представление о молекулярных механизмах наследственных патологий обмена фенилаланина и тирозина, некоторых других нарушениях обмена белков и аминокислот. Приобрести навыки количественного определения остаточного азота крови и мочевины в моче и усвоить диагностическую ценность этих показателей.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **общей химии:**

- аммиак и соли аммония как соединения азота;

– **биоорганической химии:**

- мочевины — конечный продукт азотистого обмена в организме человека; структура и свойства мочевины, виды азотемии;

- формулы циклических аминокислот;

– **биологической химии:**

- ферменты классов трансфераз и оксидоредуктаз; структура коферментов оксидоредуктаз (НАД⁺, НАДФ⁺, ФМН, ФАД).

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

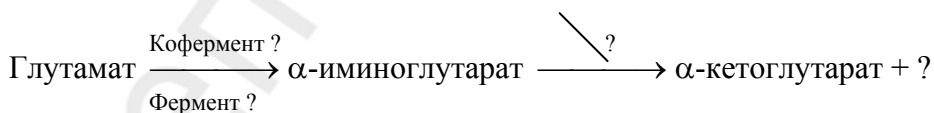
Задание 1. Аммиак в клетке образуется в результате:

- А. Реакций дезаминирования аминокислот.
- Б. Реакций переаминирования.
- В. Реакций распада биогенных аминов.
- Г. Реакций декарбоксилирования аминокислот.
- Д. Непрямого дезаминирования.

Задание 2. Назовите ферменты, катализирующие в организме человека реакции окислительного дезаминирования аминокислот:

- А. Оксидаза D-аминокислот.
- Б. Оксидаза L-аминокислот.
- В. Моноаминоксидаза (МАО).
- Г. Глутаматдекарбоксилаза.
- Д. Глутаматдегидрогеназа.
- Е. Аланинаминотрансфераза.

Задание 3. Дополните схему реакции окислительного дезаминирования глутамата недостающими компонентами:



- | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------|---------|
| А. Глутаматдекарбоксилаза. | Б. Глутаматдегидрогеназа. | | |
| В. Аспаратаминотрансфераза. | Г. НАД ⁺ . | Д. ФАД. | Е. ФМН. |
| Ж. Н ₂ О. | З. NH ₃ . | И. СО ₂ . | |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Пути связывания аммиака в клетках (восстановительное аминирование α-кетоглутарата, синтез глутамина и аспарагина, образование карбамоилфосфата). Транспортные формы аммиака.

2. Образование солей аммония в почках (источник аммиака, роль глутаминазы и глутаматдегидрогеназы, значение активирования глутаминазы почек при ацидозе).

3. Роль клеток печени в обезвреживании аммиака. Орнитинный цикл мочевинообразования (схема цикла, субстраты, ферменты, энергетическое обеспечение, связь с лимоннокислым циклом, регуляция). Судьба мочевины. Гипераммониемия, причины.

4. Остаточный азот крови (основные компоненты и их относительное содержание). Принцип определения и клинико-диагностическое значение.

5. Обмен фенилаланина и тирозина. Нарушения обмена при фенилкетонурии, тирозинемии, алкаптонурии, альбинизме.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 350–368.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 315–338.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985. С. 578–597.
2. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека / У. Мак-Мюррей. М. : Мир, 1980. С. 280–300.

Задания для самостоятельной работы

Для закрепления материала необходимо обратить особое внимание на химизм реакций локального обезвреживания аммиака в тканях; на последовательность реакций орнитинового цикла мочевинообразования; на связь орнитинового цикла с лимоннокислым циклом Кребса; на клинико-диагностическое значение определения остаточного азота крови и мочевины в моче.

Задание 1. Подобрать соответствующие пары вопрос — ответ:

А. Фермент орнитинкарбамоилтрансфераза (ОКТ).	1. Участвует в синтезе аргининоянтарной кислоты.
Б. Фермент аргиназа.	2. Участвует в синтезе цитруллина.
В. Фермент аргининосукцинатсинтетаза.	3. Участвует в распаде аргининоянтарной кислоты.
Г. Фермент аргининосукцинатлиаза.	4. Участвует в реакции гидролиза аргинина.

Задание 2. Назовите ферменты, катализирующие следующие реакции:

1. Образование амида глутаминовой кислоты.
2. Восстановительное аминирование α -кетоглутарата.
3. Гидролиз амида глутаминовой кислоты.
4. Образование амида аспарагиновой кислоты.
5. Образование карбамоилфосфата.

Задание 3. Оцените функциональное состояние печени и почек у больных С. и А. с учетом биохимических показателей крови и мочи.

1. У больного С. содержание мочевины в крови 1,8 ммоль/л. С мочой выводится 12 г мочевины в сутки. Потребление белка с пищей — достаточное.

2. Больной А. потребляет в сутки 105 г полноценного белка. Содержание мочевины в крови 10 ммоль/л, с мочой выводится 8,5 г мочевины в сутки.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. В клинику поступил больной с повторными рвотами, судорожными припадками, с потерей сознания, вызванным отравлением аммиаком. Почему при высокой концентрации NH_3 в крови наступает потеря сознания и смерть?

- А. Снижение концентрации глюкозы в крови.
- Б. Повышение содержания мочевины в крови.
- В. Повышение содержания ацетил-КоА в печени.
- Г. Снижение концентрации АТФ в клетках мозга.
- Д. Повышение содержания глюкозы в крови.

Задание 2. Подберите к каждой пронумерованной реакции обмена фенилаланина и тирозина соответствующий фермент:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. Фен \longrightarrow Тир. | А. Декарбоксилаза диоксифенилаланина. |
| 2. ДОФА \longrightarrow дофамин. | Б. Оксидаза гомогентизиновой кислоты. |
| 3. Гомогентизиновая кислота \longrightarrow
фумарилацетат. | В. Фенилаланингидроксилаза. |
| 4. Фен \longrightarrow фенилпириват. | Г. Фенилаланинтрансминаза. |

Задание 3. Сколько молей АТФ требуется для синтеза 1 моля мочевины? Напишите реакции (схема), идущие с затратой АТФ, укажите ферменты.

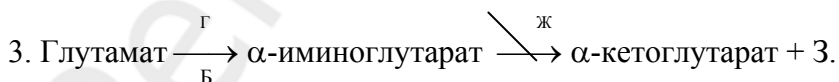
Задание 4. Больная страдает наследственным заболеванием — алкаптонурией. Жалуется на сильные боли в суставах, по ходу позвоночника. Проявление артрита в данном случае может быть вызвано накоплением определенного метаболита. Назовите этот метаболит.

- А. Фенилаланин.
- Б. Ацетоацетат.
- В. Тирозин.
- Г. Гомогентизиновая кислота.
- Д. Фенилпировиноградная кислота.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

- 1 — А, В, Д.
- 2 — А, Б, Д.



Для самостоятельной работы:

- 1. А — 2, Б — 4, В — 1, Г — 3.
- 2. 1. Глутаминсинтетаза.
2. Глутамат ДГ (НАДФН · Н⁺).
3. Глутаминаза.
4. Аспарагинсинтетаза.
5. Карбамоилфосфатсинтетаза.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Определение содержания мочевины в моче*

С мочой здорового человека выделяется за сутки 20–35 г или 333–583 ммоль мочевины.

Принцип метода. Метод основан на способности мочевины, содержащей аминогруппы, образовывать с парадиметиламинобензальдегидом в кислой среде комплексное соединение, окрашенное в желтый цвет. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации мочевины в исследуемой моче и определяется фотометрически.

Порядок выполнения работы. Пипетки и пробирки должны быть обязательно сухими.

В три пробирки наливают по 0,2 мл соответственно мочи (опытная проба), стандартного раствора мочевины (25 мг/мл) и воды (контроль на реактивы), добавляют в каждую по 1,2 мл 2% раствора парадиметиламинобензальдегида и тщательно перемешивают. Через 15 мин опытную и стандартную пробы фотометрируют в сухих кюветах шириной 3 мм с синим светофильтром против контрольной пробы.

Расчет. Содержание мочевины в опытной пробе рассчитывают по стандартному раствору мочевины по формуле:

$$C_{\text{оп}} = C_{\text{ст}} \cdot E_{\text{оп}} / E_{\text{ст}}$$

где $C_{\text{оп}}$ — концентрация мочевины в моче в пробе мг/мл; $C_{\text{ст}}$ — концентрация мочевины в стандартной пробе, 25 мг/мл; $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность пробы; $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандартного раствора мочевины.

Полученную величину умножают на диурез (1200–1500 мл) и получают суточное содержание мочевины в моче. Коэффициент пересчета в единицы СИ (моль/сут) равен 0,0167.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Пониженное содержание мочевины в моче отмечается при нефрите, ацидозе, паренхиматозной желтухе, циррозе печени, уремии, повышенное — при недостатке белка в питании, злокачественной анемии, лихорадке, интенсивном распаде белков в организме, после приема салицилатов, при отравлении фосфором.

Работа 2. *Количественное определение остаточного азота*

Азотсодержащие небелковые вещества составляют фракцию остаточного азота крови (промежуточные или конечные продукты обмена простых и сложных белков). Это мочевина, мочевая кислота, креатин, креатинин, аммиак, индикан, билирубин, полипептиды, аминокислоты и др. Азот этих веществ называют остаточным, поскольку он остается в фильтрате после осаждения белков плазмы крови.

Основной частью остаточного азота крови является азот мочевины — 50%, затем следует азот аминокислот — 25% и азот других азотсодержащих компонентов. В норме остаточный азот крови составляет 14,3–25,0 ммоль/л (20–40 мг%); у новорожденных — 42,84–71,40 ммоль/л (60–100 мг%); на 10–12-й день снижается до уровня, определяемого у взрослых.

Принцип метода. Остаточный азот крови определяют в безбелковом фильтрате после осаждения белков крови различными осадителями (трихлоруксусной кислотой или вольфраматом) с последующей минерализацией безбелкового фильтрата концентрированной серной кислотой. Азот всех исследуемых фракций в виде аммиака связывается с серной кислотой, образуя сульфат аммония, который взаимодействует с реактивом Несслера (щелочной раствор комплексной соли ртути $K_2(HgI_4)$) с образованием соединения желто-

оранжевого цвета. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации аммиака, а следовательно, и азота.

Порядок выполнения работы. Готовят три обычные пробирки. В одну из них наливают 1 мл готового минерализата и 9 мл воды (опытная проба), в другую вносят 1 мл стандартного раствора сульфата аммония и 9 мл воды (стандартная проба), а в третью наливают 10 мл воды (контроль). Затем во все пробирки вносят по 0,5 мл реактива Несслера. Фотометрируют опытную (минерализат) и стандартную пробы против контроля при синем светофильтре в кювете толщиной 5 мм.

Расчет. Содержание остаточного азота в опытной пробе рассчитывают по формуле:

$$C_{оп} = (C_{ст} \cdot E_{оп} / E_{ст}) \cdot 100,$$

где $C_{оп}$ — концентрация остаточного азота в крови, мг%; $C_{ст}$ — концентрация азота в стандартной пробе (0,1 мг в 1 мл); $E_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы (минерализат); $E_{ст}$ — оптическая плотность стандарта (сульфат аммония).

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л) равен 0,714.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Определение остаточного азота и его фракций используется для диагностики нарушения выделительной функции почек и мочевинообразовательной функции печени. Повышение остаточного азота в крови обозначается термином «азотемия». Азотемия может быть двух видов: абсолютной (накопление в крови компонентов остаточного азота) и относительной (дегидратация организма при рвоте или поносе). Причины абсолютной азотемии могут быть две: ретенционная (почечная) и продукционная (внепочечная). Ретенционная азотемия вызывается задержкой азотистых шлаков при их нормальном образовании и наблюдается при нарушении выделительной способности почек, например при острых и хронических нефритах за счет повышения уровня мочевины в крови. При хронических нефритах стойкая азотемия указывает на развивающуюся недостаточность почек. Продукционная азотемия наблюдается при усиленном распаде белков и преобладании аминокислот, например, при злокачественных новообразованиях. Повышение остаточного азота отмечается при кахексии неракового происхождения, вызванной туберкулезом, диабетом и циррозом печени, при сердечной недостаточности, инфекционных заболеваниях (скарлатине, дифтерии). У недоношенных детей азотемия может быть связана с почечной недостаточностью и усиленным распадом тканевых белков.

Понижение содержания остаточного азота наблюдается при недостаточном питании и иногда при беременности.

Выводы:

Подпись преподавателя:

22. Химия и обмен нуклеопротеинов. Определение содержания мочевой кислоты и общего азота в моче

Актуальность темы

У взрослого здорового человека наблюдается азотистое равновесие. Поступающий с пищей азот в организме не задерживается и выделяется, главным образом, почками в составе многих продуктов (мочевины, аминокислот, мочевой кислоты и др.). Для изучения состояния азотистого обмена в организме пользуются определением общего азота мочи. В диагностике ряда заболеваний применяют методы определения содержания в моче отдельных азотсодержащих соединений. Например, при врожденных нарушениях обмена аминокислот исследуют содержание отдельных аминокислот или продуктов их метаболизма. Количество мочевой кислоты в моче и крови зависит от поступления нуклеопротеинов с пищей и от интенсивности их клеточного метаболизма. Этот показатель — важный критерий в диагностике и контроле лечения подагры.

Знание механизмов распада и синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, регуляции этих процессов позволило разработать и применить лекарственные препараты, влияющие на процессы деления клеток (например, антифолатов в химиотерапии опухолей), и способствует пониманию механизмов действия препаратов, используемых в коррекции гипознергетических состояний органов (ИМФ (рибоксин), оротат калия и др.).

Цель занятия

Получить представление о катаболизме нуклеопротеинов в тканях и желудочно-кишечном тракте, механизмах биосинтеза и распада нуклеотидов и регуляции этих процессов. Познакомиться с примерами использования этих знаний в диагностике и лечении болезней. Для закрепления теоретического материала провести лабораторную работу по количественному определению мочевой кислоты и общего азота в моче.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **общей химии:**

- титрометрические методы анализа;

– **биологии:**

- строение генетического аппарата клетки;

– **биоорганической химии:**

- формулы и свойства гетероциклических соединений (пурины, пиримидины);
- химические свойства и формулы гипоксантина, ксантина, мочевой кислоты;
- свойства солей мочевой кислоты (уратов);
- формулы азотистых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

- | | |
|----------------------|---|
| А. Аденозин. | 1. Пиримидиновый нуклеозид. |
| Б. Гуанин. | 2. Азотистое основание пуринового ряда. |
| В. Цитозин. | 3. Пиримидиновый нуклеотид. |
| Г. Уридинтрифосфат. | 4. Азотистое основание пиримидинового ряда. |
| Д. Тимидин. | 5. Пуриновый нуклеозид. |
| Е. Гуанозиндифосфат. | 6. Пуриновый нуклеотид. |

Задание 2. Назовите нуклеотиды, структура которых схематически изображена ниже:

- 1) аденин – дезоксирибоза – фосфат – фосфат;
- 2) цитозин – рибоза – фосфат;
- 3) гуанин – дезоксирибоза – фосфат – фосфат – фосфат;
- 4) урацил – рибоза – фосфат – фосфат.

Задание 3. Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

- | | |
|--|--|
| А. Первичная структура ДНК. | 1. Модель «двойная спираль». |
| Б. Вторичная структура ДНК. | 2. 3',5'-Фосфодиэфирные связи. |
| В. Для первичной структуры РНК характерны связи. | 3. Последовательность нуклеотидов в полинуклеотидной цепи. |
| Г. Для вторичной структуры ДНК характерны связи. | 4. Водородные связи между азотистыми основаниями. |
| | 5. Силы гидрофобного взаимодействия между выше- и нижележащими азотистыми основаниями. |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Мононуклеотиды, строение, номенклатура, биологическая роль.
2. Первичная, вторичная и третичная структуры нуклеиновых кислот (особенности структуры, разновидности, типы стабилизирующих связей).
3. Обмен нуклеопротеинов. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте (значение, этапы, ферменты). Распад нуклеиновых кислот в тканях, роль лизосомных ферментов.
4. Распад пуриновых нуклеотидов (химизм, мочевая кислота как конечный продукт катаболизма). Представление о нарушениях пуринового обмена (гиперурикемия и подагра, почечно-каменная болезнь).
5. Биосинтез пуриновых нуклеотидов *de novo* (источники азота и углерода пуринового кольца, участие фолиевой кислоты, основные промежуточные продукты, ключевой фермент, регуляция синтеза). Представление о синтезе нуклеотидов из свободных азотистых оснований и нуклеозидов.
6. Распад пиримидиновых нуклеотидов.
7. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов (субстраты, схема процесса, ключевой фермент, регуляция синтеза, роль витаминов). Представление о нарушениях пиримидинового обмена (оротацидурия).
8. Синтез дезоксирибонуклеозидфосфатов, нуклеозиддифосфатов и нуклеозидтрифосфатов.
9. Общий азот мочи (количество, компоненты и их происхождение).

Литература для подготовки

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 71–73, 77–91, 369–376, 390–394.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 92–159, 339–350.
3. Конспект лекций.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Выберите положения, правильно характеризующие свойства ксантиноксидазы:
А. Ее коферментом является производное витамина РР.

Б. Одним из продуктов реакции является перекись водорода.

В. Фермент катализирует две последовательные необратимые реакции образования мочевой кислоты.

Г. Субстрат фермента — гипоксантин — имеет меньшую растворимость, чем мочевая кислота.

Д. Фермент обладает абсолютной специфичностью к субстрату.

Задание 2. При обследовании больного ревматизмом после интенсивной терапии кортикостероидами установлена гиперурикемия. В результате активации какого метаболического процесса развиваются данные нарушения?

А. Интенсивного распада белков.

Б. Активация глюконеогенеза.

В. Интенсивного распада пуриновых нуклеотидов.

Г. Мобилизации липидов.

Д. Интенсивного распада пиримидиновых нуклеотидов.

Задание 3. Дополнить недостающими компонентами реакции синтеза пуриновых рибонуклеотидов:

1. ФРПФ + ? → 5-фосфорибозиламин.

А. Глн.

2. ИМФ + ГТФ + Асп → ?

Б. АМФ.

3. Рибозо-5-фосфат + АТФ → ? + АМФ.

В. Глу.

4. ИМФ + АТФ + ? → ГМФ.

Г. ФРПФ.

Д. АТФ.

Задание 4. Дополнить недостающими компонентами реакции синтеза пиримидиновых нуклеотидов:

1. Карбамоилфосфат + ? → карбамоиласпартат.

А. ФРПФ.

2. Оротат + ? → ОМФ + $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$.

Б. Асп.

3. ОМФ → CO_2 + ?

В. АТФ.

4. УМФ + ? → УДФ + ?

Г. АДФ.

5. УДФ + ? → УТФ + ?

Д. УМФ.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. При терапии некоторых форм рака применяются ингибиторы дигидрофолатредуктазы. Торможение каких реакций определяет цитостатическое действие препарата?

А. Синтез пиримидиновых нуклеотидов.

Б. Синтез пуринового ядра нуклеотидов.

В. Синтез дезоксицитидиловых нуклеотидов.

Г. Синтез цитидиловых нуклеотидов.

Д. Синтез дУМФ.

Задание 2. У ребенка с синдромом Леша-Нихана — корковый паралич и гиперурикемия. Количество экскретируемых пуринов увеличено. Дефект какого фермента вызывает данную патологию?

А. Ксантинооксидазы.

Б. Аденозиндезаминазы.

В. Гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы.

Г. Карбамоилфосфатсинтетазы.

Д. Тимидилатсинтазы.

Задание 3. Женщине с лимфолейкозом назначен противоопухолевый препарат — ингибитор тиоредоксинредуктазы. На чем основано цитостатическое действие препарата?

- А. Ингибируется синтез ИМФ.
- Б. Ингибируется синтез оротовой кислоты.
- В. Ингибируется синтез ЦМФ.
- Г. Ингибируется синтез дГДФ.
- Д. Ингибируется синтез УМФ.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

- 1. А – 5, Б – 2, В – 4, Г – 3, Д – 1, Е – 6.
- 2. 1. Дезоксиаденозиндифосфат.
2. Цитидинмонофосфат.
3. Дезоксигуанозинтрифосфат.
4. Уридиндифосфат.
- 3. А – 3, Б – 1, В – 2, Г – 4, 5

Для самостоятельной работы:

- 1. Б, В.
- 2. В.
- 3. 3.1 – А; 3.2 – Б; 3.3 – Г; 3.4 – А.
- 4. 4.1 – Б; 4.2 – А; 4.3 – Д; 4.4 – В, Г; 4.5 – В, Г.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. **Определение содержания общего азота мочи колориметрическим методом**

Исследование общего азота мочи может быть использовано для исследования состояния азотистого баланса. Количество общего азота, выделяемого за сутки с мочой, у взрослого человека составляет 6–17 г (428–1214 ммоль/сут).

Принцип метода. После сжигания (минерализации) органических веществ мочи с концентрированной серной кислотой азот всех исследуемых фракций в виде аммиака связывается с серной кислотой, образуя сульфат аммония. Колориметрическое определение общего азота основано на том, что сульфат аммония образует с реактивом Несслера соединение желто-оранжевого цвета, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации аммиака, а следовательно, и азота в моче.

Порядок выполнения работы. Готовят три обычные сухие пробирки. В две из них отмеривают соответственно 0,5 мл минерализата (опыт) и 0,5 мл стандартного раствора сульфата аммония (стандарт, содержащий 0,2 мг азота в 1 мл). Прибавляют в каждую пробирку по 6,5 мл воды и тщательно перемешивают. В третью пробирку отмеривают 7 мл воды (контроль) и во все пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Несслера. Содержимое пробирок тщательно перемешивают. **Необходимо строго соблюдать порядок приливания реагентов и тщательно перемешивать жидкость.** Фотометрируют опытную и стандартную пробы против контроля при синем светофилтре в кювете толщиной 5 мм.

Расчет. Содержание азота в опытной пробе рассчитывают по стандартному раствору сульфата аммония по формуле:

$$C_{оп} = C_{ст} \cdot E_{оп} / E_{ст},$$

где $C_{оп}$ — концентрация азота мочи в исследуемой пробе, мг/мл; $C_{ст}$ — концентрация $(NH_4)_2SO_4$ в стандартной пробе (0,2 мг в 1 мл); $E_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы; $E_{ст}$ — оптическая плотность стандарта сульфата аммония.

Содержание общего азота в моче (г/сут) рассчитывают по формуле:

$$C_{он} \cdot 100 \cdot \text{суточный диурез} / 0,5 \cdot 1000,$$

где $C_{он}$ — концентрация азота, найденная по стандартному раствору; 100 — разведение мочи при приготовлении минерализата; 0,5 — количество минерализата, взятого для анализа; 1000 — коэффициент перевода миллиграммов в граммы.

Суточное выделение мочи составляет в среднем 1500 мл для мужчин и 1200 мл для женщин. Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) равен 71,39.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Определение общего азота мочи позволяет судить о белковом обмене в организме, о количестве распавшегося белка. Для этого полученную величину общего азота умножают на 6,25, исходя из того, что в белке в среднем содержится 16% азота ($100 : 16 = 6,25$).

При заболевании почек, вследствие нарушения их выделительной функции содержание общего азота в моче уменьшается. Задержка азота в организме наблюдается при заболеваниях печени и сердечно-сосудистой системы в связи с возникновением отеков, при наличии экссудатов и трансудатов.

Увеличение содержания общего азота в моче отмечается при усиленном распаде белков (отрицательный азотистый баланс), диабете, при рассасывании экссудатов и трансудатов, хроническом отравлении фосфором.

Работа 2. *Определение содержания мочевой кислоты в моче*

Мочевая кислота у человека является конечным продуктом обмена пуриновых оснований, входящих в состав сложных белков - нуклеопротеинов.

В норме у человека с мочой выделяется мочевой кислоты 1,6–3,54 ммоль/сут (270–600 мг/сут).

Принцип метода. Метод основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорно-вольфрамовый реактив в фосфорно-вольфрамовую синь, интенсивность окраски которой пропорциональна содержанию мочевой кислоты. Количество фосфорно-вольфрамовой сини определяется путем титрования красной кровяной солью $K_2[Fe(CN)_6]$. Последняя окисляет фосфорно-вольфрамовую синь, и синее окрашивание исчезает.

Порядок выполнения работы. К 1,5 мл мочи прибавляют 1 мл 20% раствора карбоната натрия и 1 мл фосфорно-вольфрамового реактива Фолина, перемешивают и титруют 0,01н раствором $K_3[Fe(CN)_6]$ до исчезновения синего окрашивания.

Расчет. Содержание мочевой кислоты (в мг) в суточной моче вычисляют по формуле:

$$\text{Мочевая кислота, мг/сут} = 0,8 \cdot a \cdot v / 1,5,$$

где 0,8 мг мочевой кислоты соответствует 1 мл $K_3[Fe(CN)_6]$; a — количество $K_3[Fe(CN)_6]$, пошедшее на титрование, мл; v — суточный диурез, мл; 1,5 — объем пробы, мл.

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) равен 0,0059.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Гипоурикурия (уменьшение выделения мочевой кислоты с мочой) отмечается при подагре, нефрите, почечной недостаточности; гиперурикурия (увеличение выделения мочевой кислоты с мочой) — при лейкемии, усиленном распаде нуклеопротеинов. У детей выделяется относительно больше мочевой кислоты, чем у взрослых. Выделение мочевой кислоты зависит от содержания пуринов в пище и интенсивности обмена нуклеопротеинов.

При подагре соли мочевой кислоты (ураты) откладываются в хрящах, мышцах и слизистой сумке суставов. Содержание мочевой кислоты в крови может быть повышено, а в моче понижено.

Выводы:

Подпись преподавателя:

23. Матричные биосинтезы (синтез ДНК, РНК, белков)

Актуальность темы

Знание строения нуклеиновых кислот позволяет понять механизмы передачи и реализации генетической информации в клетке, овладеть основами понимания причин наследственных заболеваний и разработать методы их лечения. Нуклеотиды выполняют ряд специфических функций. Некоторые из них используются в качестве лекарственных препаратов.

Цель занятия

Усвоить молекулярные механизмы репликации, репарации, транскрипции, трансляции и механизмы их регуляции. Систематизировать эти знания и обсудить возможные механизмы нарушений реализации генетической информации для понимания последствий и подходов к лечению этих нарушений.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **курса биологии:**
 - строение клетки;
 - механизмы митоза и мейоза;
- **биоорганической химии:**
 - строение мононуклеотидов;
 - общие принципы пространственной организации нуклеиновых кислот;
 - биологическая роль нуклеиновых кислот.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подберите пары и напишите формулу:

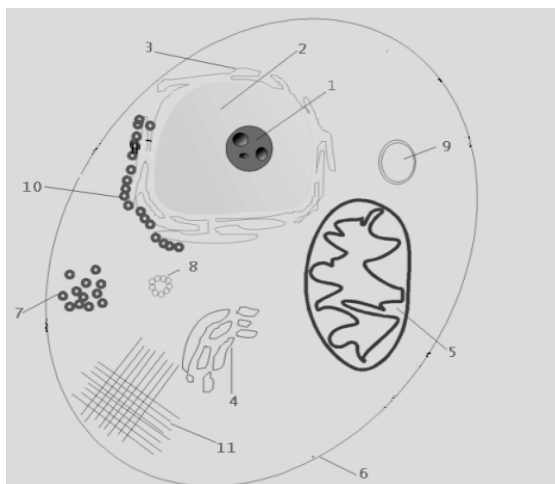
Название	Составные части
А. Гуанозин	1. Рибоза, фосфат, аденин
Б. Адениловая кислота	2. Дезоксирибоза, тимин
В. Уридин	3. Гуанин, рибоза
Г. ДезоксиЦМФ	4. Урацил, рибоза
Д. Тимидин	5. Фосфат, дезоксирибоза, цитозин

А Б В Г Д

Задание 2. Выберите, что относится только к ДНК, только к РНК, к ДНК и РНК:

- | | |
|---|---|
| А. Хранение генетической информации. | Е. Реализация генетической информации. |
| Б. А, Г, Т, Ц. | Ж. Рибоза. |
| В. Цитоплазма. | З. Ядро. |
| Г. 3',5'-фосфодиэфирная связь между мононуклеотидами. | И. А, Г, У, Ц. |
| Д. Дезоксирибоза. | К. Стабильность структуры поддерживается Н-связями. |

Задание 3. Пользуясь рисунком (использовать цифру), подберите пары:



- А. Рибосомы.
- Б. Гладкая эндоплазматическая сеть.
- В. Шероховатая эндоплазматическая сеть.
- Г. Аппарат Гольджи.
- Д. Лизосомы.
- Е. Плазматическая мембрана.
- Ж. Цитоскелет.
- З. Ядро.
- И. Ядрышко.
- К. Митохондрия.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Репликация, биологическая роль, субстраты, ферменты, молекулярный механизм.
2. Репарация ДНК, молекулярный механизм, биологическая роль.
3. Транскрипция, биологическая роль, молекулярный механизм, механизмы регуляции активности генов (схема Жакоба и Моно, схема Георгиева), процессинг РНК. Обратная транскрипция.
4. Генетический код и его свойства.
5. Рекогниция и трансляция как этапы реализации генетической информации в клетке. Компоненты белоксинтезирующей системы. Рекогниция (субклеточная локализация, схема, субстратная специфичность АРСаз). Роль тРНК в синтезе белка.
6. Современное представление о биосинтезе белка. Регуляция биосинтеза белка в клетке на генетическом уровне (роль гистонов, гормонов и жирорастворимых витаминов). Посттрансляционная модификация молекул белка (гидроксилирование, гликозилирование, ограниченный протеолиз, фосфорилирование, карбоксилирование).
7. Представление о клонировании ДНК и генной терапии.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 377–389, 399–422.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 105–159.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.
2. Таганович А.Д. и др. Нуклеопротеины : учеб. пособие / А.Д. Таганович [и др.]. Мн., 2000.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Вспомните, что основная «догма» молекулярной биологии указывает на два основных направления потока генетической информации в клетке:

- А. Хранение и передача информации (репликация и репарация).
- Б. Реализация генетической информации — экспрессия генов (рекогниция, транскрипция и трансляция).

На рисунке и в таблице 1 показаны основные участники механизма репликации у прокариот:

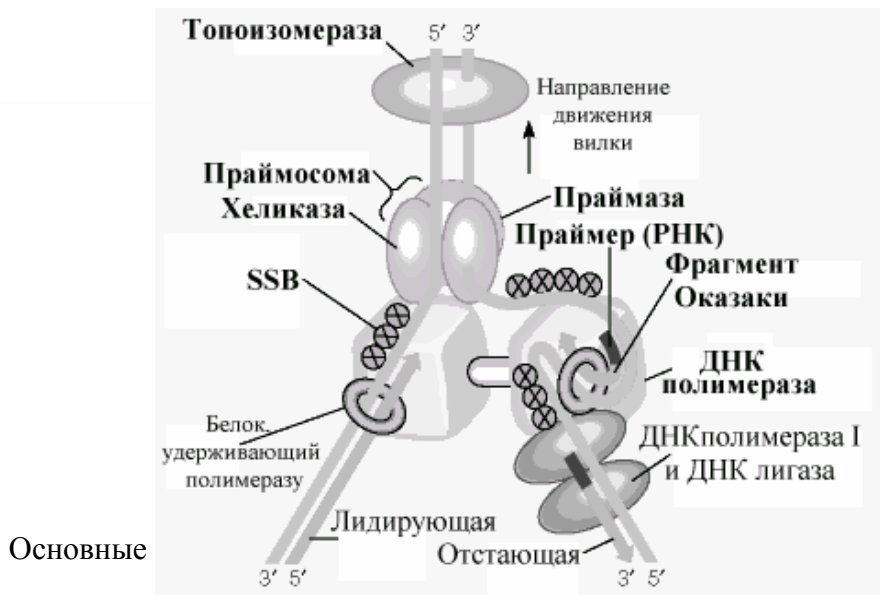


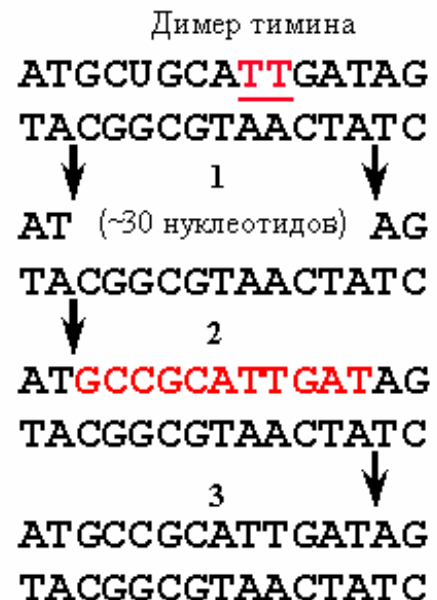
Таблица 1

Белок	Функция
Белок Rep	Хеликаза (раскручивает ДНК в репликационной вилке)
Праймаза (dnaG)	Синтезирует РНК-затравку (праймер)
ДНК-полимераза III	Полимераза, катализирующая репликацию
SSB	Связывается с одноцепочечной ДНК в репликативной вилке для предотвращения образования двойной спирали
ДНК-полимераза I	Удаляет РНК-затравку, заполняя пробел
ДНК-лигаза	Катализирует образование 3',5'-фосфодиэфирной связи, соединяя фрагменты Оказаки
Топоизомераза I	Ослабляет суперспирализацию ДНК
Топоизомераза II	Разделяет ДНК после репликации

1.1. Напишите в общем виде суммарную реакцию, катализируемую ДНК-полимеразой III.

Задание 2. Вспомните, что в процессе синтеза и во время хранения молекулы ДНК подвергаются многочисленным физическим, химическим и другого рода воздействиям, которые вызывают нарушения структуры молекул ДНК. Существует многоуровневая система репарации повреждений:

- мутации, которые возникают в процессе репликации. Репарируются (если это возможно) путем повторного считывания последовательности, удаления неправильно вставленного нуклеотида ДНК- полимеразы, обладающими экзонуклеазной активностью;
- мутации, которые не исправлены путем повторного считывания. Репарируют при помощи специальной пострепликативной репарации. Молекула родительской ДНК метилирована по отдельным азотистым основаниям, и вновь синтезируемая цепь также метилируется. Во время метилирования идет проверка правильности расположения мононуклеотидов, и в случае обнаружения мутации включается механизм эксцизионной репарации с последующим метилированием цепи;
- мутации, возникающие спонтанно, в любое время репарируются механизмом эксцизионной репарации.



2.1. На рисунке изображена последовательность событий эксцизионной репарации в случае образования димера тимина в структуре ДНК. Расставьте в последовательности, обозначенной на рисунке, следующие ферменты: А. ДНК-лигаза. Б. Эксцизионная нуклеаза. В. ДНК- β-полимераза.

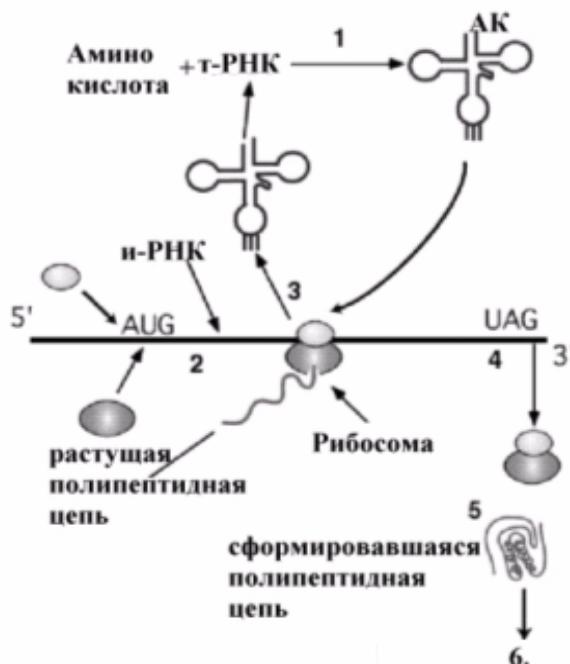
Задание 3. Вспомните, что среди механизмов узнавания белками (ферментами, факторами регуляции и т. д.) отдельных участков нуклеотидных последовательностей определенную роль играют палиндромные последовательности нуклеотидов (в частности, при узнавании ДНК- рестриктазами), которые могут формировать крестообразные структуры в молекуле ДНК.



3.1. Изобразите крестообразную структуру из палиндромной последовательности, показанной на рисунке выше.

Задание 4. Механизмы реализации генетической информации в клетке многоэтапны. На рисунке изображены основные этапы экспрессии генов. Подберите пары (буква – таблица, цифра – рисунок).

А. Терминация	
Б. Рекогниция	
В. Инициация	
Г. Секреция	
Д. Формирование пространственной структуры	
Е. Элонгация	



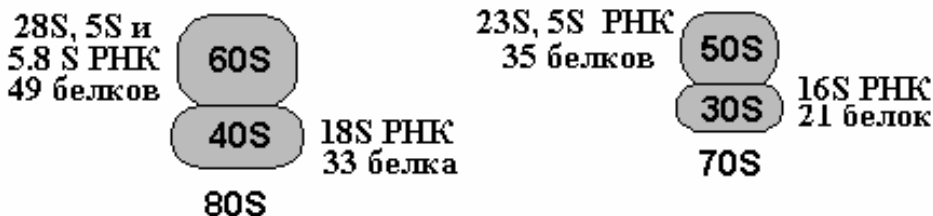
Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

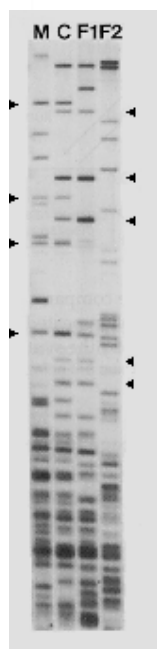
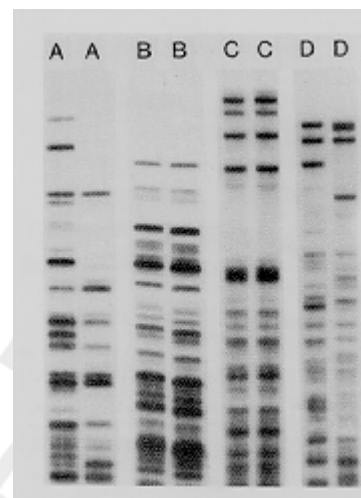
Задание 1. Напишите реакцию, катализируемую АРСазой.

Задание 2. Почему 60S+40S=80S, а 50S+30S=70S? Выберите правильный ответ.

1. Скорость седиментации зависит от массы частиц.
2. Скорость седиментации зависит от формы частиц.
3. От того и другого.



Задание 5. Электрофореграмма справа показывает результаты исследования полиморфизма длины фрагментов рестрикции 4-х пар близнецов. Ваше мнение об идентичности близнецов.



Задание 6. Слева «отпечатки пальцев» ДНК матери (M), ребенка (C) и двух предполагаемых отцов (F1, F2). Указатели на левой стороне указывают полосы ДНК, общие между ребенком и матерью. Указатели на правой стороне указывают полосы ДНК, общие между ребенком и предполагаемыми отцами. Ваше мнение о предполагаемом отце.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1. А – 3, Б – 1, В – 4, Г – 5, Д – 2.
2. ДНК – А, Б, Д. РНК – В, Е, Ж, И. ДНК и РНК – Г, К, З.
3. А – 7; Б – 3; В – 10; Г – 4; Д – 9; Е – 6; Ж – 11, З – 2; И – 1; К – 5.

Для самостоятельной работы:

2. 1 – Б; 2 – В; 3 – А.
4. А – 4; Б – 1; В – 2; Г – 6; Д – 5; Е – 3.

Подпись преподавателя:

24. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Обмен простых белков и нуклеопротеинов. иосинтез ДНК, РНК и белка»

1. Азотистый баланс, его состояние в норме и при патологии. Что характеризует коэффициент изнашивания?
2. Биологическая ценность белков. Нормы белка в питании.
3. Гидролиз белков (протеолиз). Классификация и свойства протеаз.
4. Переваривание белков. Характеристика протеаз желудочно-кишечного тракта (оптимум рН, механизмы активации, субстратная специфичность, эндо- и экзопептидазы). Роль HCl в переваривании белков. Кислотность желудочного сока — принцип определения, содержание в норме.
5. Гниение белков. Знать схематически происхождение фенола, крезола, скатола, индола, кадаверина, путресцина. Механизмы обезвреживания продуктов гниения белков и других ксенобиотиков.
6. Аминокислотный фонд клетки, его пополнение и использование.
7. Переаминирование. Роль витамина В₆. Уметь писать реакции переаминирования с участием аланиновой и аспарагиновой трансаминаз. Знать их диагностическое значение.
8. Виды дезаминирования. Глутаматдегидрогеназная реакция — химизм, коферменты, значение. Непрямое дезаминирование.
9. Пути использования безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты.

10. Пути обезвреживания аммиака. Уметь написать реакции синтеза и распада аспарагина, глутамина, восстановительного аминирования α -кетоглутарата, схему синтеза мочевины. Остаточный азот. Значение определения мочевины и остаточного азота в клинике.

11. Реакции декарбоксилирования аминокислот, биогенные амины. Уметь писать реакции синтеза триптамина, серотонина, гистамина, γ -аминомасляной кислоты, знать их роль в организме.

12. Синтез катехоламинов. Функции дофамина, норадреналина и адреналина в организме. Наследственные нарушения обмена фенилаланина и тирозина. Роль дофамина при болезни Паркинсона.

13. Нуклеотиды — их строение и функции. Знать номенклатуру и уметь писать формулы азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов; изображать образование 3'-5'-фосфо-диэфирной связи между нуклеотидами.

14. Особенности строения ДНК и РНК на уровне первичной, вторичной и третичной структуры (строение нуклеосом).

15. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте.

16. Пути реутилизации азотистых оснований и нуклеозидов в клетке.

17. Конечные продукты распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Реакции образования мочевой кислоты. Гиперурикемия — ее причины и последствия.

18. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов *de novo*: субстраты, ключевые ферменты, основные промежуточные продукты. Регуляция синтеза. Роль витаминов.

19. Применение в медицине синтетических структурных аналогов нуклеозидов и фолиевой кислоты.

20. Образование дезоксирибонуклеотидов для синтеза ДНК (схема).

21. Репликация. Субстраты, ферменты, механизм. Механизмы репарации ДНК, роль этого процесса.

22. Транскрипция. Ферменты, субстраты, механизм, регуляция. Обратная транскрипция.

23. Генетический код и его характеристика.

24. Рекогниция и собственно трансляция как этапы биосинтеза белка в клетке (роль т-РНК, АРСазы, строение рибосом и общие принципы механизма трансляции, источники энергии для биосинтеза белка, регуляция).

25. Виды посттрансляционной модификации белков.

26. Современные методы молекулярной биологии (ЦПР, блот-анализ ДНК и РНК (Саузерн-блот и Нозерн-блот), метод «отпечатков пальцев ДНК», клонирование). Принципы проведения, применение в медицине.

27. Метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК (метод Сэнджера).

Пример задачи и вопросов на метод Сэнджера

На рисунке приводятся результаты исследования нуклеотидной последовательности участка молекулы ДНК (метод Сэнджера).

На чем основан этот метод?

Что нужно сделать, чтобы получить такую картину (поэтапно)?

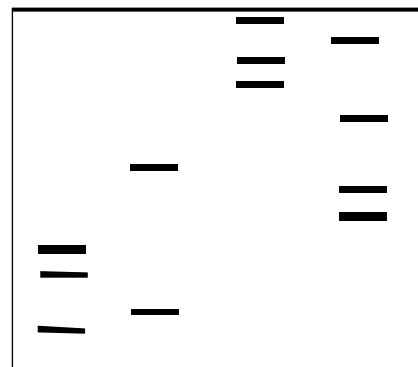
В чем проводили электрофорез, по какому принципу произошло разделение фрагментов?

Что обозначают буквы в скобках и черточки на рисунке?

Какую роль выполняют дидезоксинуклеотиды в этом методе?

В каком направлении следует «читать» полученную электрофореграмму и почему?

Г А Т Ц



Установите, в какой последовательности ДНК-полимераза включала нуклеотиды в синтезируемую цепь.

Что нужно сделать, чтобы расшифровать полученную картину и узнать последовательность нуклеотидов в анализируемом участке ДНК?

Какая аминокислотная последовательность закодирована в этом участке? (таблица генетического кода будет в Вашем распоряжении).

25. Гормоны. Общая характеристика и особенности биологического действия гормонов. Качественные реакции на гормоны

Актуальность темы

Гормоны — класс регуляторных химических соединений, синтезируемых железами внутренней секреции и/или специальными клетками. Значение гормональной продукции заключается в том, что секретируемые гормоны осуществляют регуляцию метаболизма отдельных органов и тканей, определяют состояние физиологических процессов и жизнедеятельности организма в целом. Нарушение синтеза, секреции, транспорта и рецепции гормонов клетками лежит в основе многообразных эндокринных расстройств. В связи с этим понимание механизма эндокринных нарушений чрезвычайно важно для диагностики и целенаправленной терапии эндокринных заболеваний.

Цель занятия

Научиться применять знание классификации гормонов, типов гормональных рецепторов, G-белков и последующего каскада внутриклеточных передатчиков для понимания особенностей механизма действия гормонов на клетки. Уметь применять знания о механизме действия индивидуальных гормонов для объяснения расстройств метаболизма при нарушении образования или гиперпродукции гормонов в организме.

Рекомендуемые темы для реферативных докладов

- Механизм действия стероидных гормонов: внутриклеточная рецепция, взаимодействие с геномом клетки, активация синтеза ферментов.
- Типы гормональных рецепторов. Механизм рецепции гормонов 1-TMS и 7-TMS рецепторами. Проявления наследственного дефекта рецепторов.
- Молекулярный механизм действия инсулина и сахарный диабет.
- Молекулярный механизм действия тиреоидных гормонов. Зоб, микседема и базедова болезнь.
- Применение анаболических гормонов в спортивной медицине.
- Эндокринная функция эпифиза.
- Оксид азота: происхождение, регуляторное действие в организме, использование в лекарственной терапии.
- Факторы роста, их рецепторы, механизм действия. Значение в межклеточном взаимодействии.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- *анатомии человека:*
- анатомию желез внутренней секреции;

- **гистологии:**
 - гистологическое строение желез внутренней секреции и гормоны, синтезируемые ими;
 - АПУД-систему;
 - типы гормональной секреции: эндокринную, нейроэндокринную, пара- и аутокринную;
- **биоорганической химии:**
 - строение и свойства белков и пептидов;
 - холестерол и стероиды — строение и свойства.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подобрать соответствующие пары гормон – источник гормона:

- | | |
|--|------------------------|
| А. α-Клетки островков Лангерганса. | 1. Глюкагон. |
| Б. β-Клетки островков Лангерганса. | 2. Минералокортикоиды. |
| В. С-Клетки щитовидной железы. | 3. Глюкокортикоиды. |
| Г. Фолликулярные клетки щитовидной железы. | 4. Инсулин. |
| Д. Сетчатая зона коры надпочечников. | 5. Половые гормоны. |
| Е. Пучковая зона коры надпочечников. | 6. Тиреокальцитонин. |
| Ж. Клубочковая зона коры надпочечников. | 7. Тироксин. |

Задание 2. Выбрать правильный ответ: эндокринная секреция — это:

- А. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в окружающую среду и действует на рядом расположенные клетки.
- Б. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в окружающую среду и действует на клетку, в которой он был синтезирован.
- В. Нейромедиатор, синтезируемый нервными клетками.
- Г. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в кровь и действует на отдаленные от места синтеза клетки.

Задание 3. Какие гормоны секретируются эпифизом?

- А. Окситоцин. Б. Либерины. В. Статины.
- Г. Серотонин. Д. Мелатонин. Е. Меланоцитостимулирующий гормон.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Номенклатура и классификация гормонов по месту синтеза, химической структуре.
2. Особенности синтеза гормонов белково-пептидной природы, стероидной природы, производных липидов.
3. Особенности биологического действия гормонов. Транспорт кровью.
4. Понятие «рецептор гормона». Классификация рецепторов: внутриклеточные рецепторы (ядерные и цитозольные), рецепторы цитоплазматической мембраны (лиганд-зависимые и потенциал-зависимые каналообразующие рецепторы, строение 1-TMS и 7-TMS-рецепторов).

5. Механизм действия гормонов: стероидной, аминокислотной и белково-пептидной природы.
6. Классификация G-белков и механизм их функционирования. Патология этих белков.
7. Понятие о вторичных посредниках действия гормонов (циклические нуклеотиды, ИТФ, Ca^{2+} , диацилглицерол).
8. Растворимая и мембраносвязанная гуанилатциклазы. Оксид азота.
9. Аденилатциклаза и фосфолипаза С. Их роль в клетке.
10. Роль протеинкиназ в клетке.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 170–174.
2. Биохимия. Ключевые пути метаболизма. Мн. : БГМУ. 2002. С. 178–191.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Строев Е. А. Биологическая химия / Е. А. Строев. М. : Высшая школа, 1986. С. 370–412.
2. Маршалл В. Клиническая биохимия / В. Маршалл. СПб., 2002. 380 с.
3. Руководство по клинической эндокринологии / под ред. Н. Т. Старковой. СПб., 1996. С. 7–10, 201–279, 296–376.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Вспомните, какие гормоны связываются с внутриклеточными рецепторами, а какие — с рецепторами, встроенными в цитоплазматическую мембрану. Обратите внимание, что при патологии рецепторов ткани-мишени теряется чувствительность к гормону (гормон не вызовет соответствующего метаболического ответа).

1.1. В клинику поступил больной в состоянии гипергликемической комы. Введение инсулина не нормализовало концентрацию глюкозы крови. Какую причину гипергликемии можно предположить у больного?

- А. Аномалия клеточных рецепторов.
- Б. Гиперфункция гормонов коры надпочечников.
- В. Истинная гипоинсулинемия.
- Г. Опухоль базофильных клеток гипофиза.
- Д. Опухоль мозгового слоя надпочечников

1.2. У лабораторных животных, подвергшихся действию мутагенного вещества, обнаружили в тканях измененную аденилатциклазу. К какому гормону будут нечувствительны органы-мишени у этих животных?

- А. Эстрадиолу.
- Б. Тироксину.
- В. Глюкагону.
- Г. Прогестерону.
- Д. Альдостерону.

Задание 2. Вспомните химическую природу гормонов.

2.1. Студенту предложили смоделировать биосинтез адреналина, используя в качестве источника ферментов гомогенат мозгового слоя надпочечников, а в качестве субстрата — одно из ниженазванных веществ. Студент не справился с заданием, так как использовал для синтеза:

- А. Диоксифенилаланин.
- Б. Фенилаланин.
- В. Тирозин.
- Г. Лизин.
- Д. Дофамин.

2.2. У больных с опухолью клубочковой зоны надпочечника в три раза увеличивается биосинтез кортизола и кортикостерона и в 70 раз возрастает биосинтез альдостерона. Укажите метаболит, использование которого резко увеличивается:

- А. Сукцинил-КоА.
- Б. Эргостерол.
- В. Холин.

- Г. Метионин. Д. Холестерол.
2.3. Какой из нижеперечисленных гормонов не является гликопротеином?
А. Соматотропин. Б. Тиреотропин.
В. Лютеинизирующий гормон. Г. Фолликулостимулирующий гормон.

Задание 3. Вторичными посредниками действия гормонов на клетку являются циклические нуклеотиды, ИТФ, Ca^{2+} , диацилглицерол. Запомните, что цАМФ по своему влиянию на метаболизм клетки является антагонистом цГМФ.

3.1. Больному в течение недели вводили препарат теofilлин — ингибитор фосфодиэстеразы цАМФ. Активность какого гормона может усиливаться на фоне такого лечения?

- А. Адреналин. Б. Дезоксикортикостерон. В. Альдостерон.
Г. Кортизол. Д. Эстрадиол.

3.2. У больного диагностирована опухоль мозгового слоя надпочечников — феохромоцитома. Какой посредник гормонального сигнала активно участвует в действии на ферменты при этом заболевании?

- А. цАМФ. Б. Простагландины. В. цТМФ.
Г. Са-кальмодулин. Д. цГМФ.

3.3. Больной поступил в клинику с гипергликемией в результате развития опухоли, продуцирующей адреналин. С помощью введения каких веществ можно уменьшить интенсивность действия адреналина на органы-мишени?

- А. Активаторы фосфодиэстеразы. Б. цАМФ. В. Простагландины.
Г. цГМФ. Д. Ингибиторы кальциевых каналов.

3.4. Какое из названных соединений не является вторичным посредником в действии гормонов?

- А. Диацилглицерол. Б. цАМФ. В. цГМФ.
Г. Ca^{2+} . Д. ГМФ.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Внутрядерные рецепторы обнаружены для:

- А. Адреналина. Б. Трийодтиронина. В. Мелатонина.
Г. Гормона роста. Д. Серотонина.

Задание 2. При обследовании представителей африканского племени пигмеев обнаружили нарушение синтеза в печени белка — соматомедина С. В реализации биологического действия какого гормона участвует этот белок?

- А. Соматотропина. Б. Пролактина. В. Соматолиберина.
Г. Соматостатина. Д. Лютропина.

Задание 3. Фосфолипаза, расщепляющая фосфатидилинозитол на диацилглицерол и ИТФ, это:

- А. Фосфолипаза А₁. Б. Фосфолипаза А₂. В. Фосфолипаза С. Г. Фосфолипаза Д.

Задание 4. Какой из нижеперечисленных гормонов не является стероидом?

- А. Кортизол. Б. Альдостерон. В. Прогестерон.
Г. Лактогенный гормон. Д. Дигидроксихолекальциферол.

Задание 5. Какой из нижеперечисленных гормонов не является пептидом?

- А. Окситоцин. Б. Трийодтиронин. В. Глюкагон.
Г. Вазопрессин. Д. Тиреолиберин.

Задание 6. G_s-белки стимулируют активность аденилатциклазы. Однако с течением времени этот эффект исчезает. Это обусловлено:

- А. АТФ-азной активностью α-субъединицы.
- Б. АТФ-азной активностью γ-субъединицы.
- В. Фосфодиэстеразной активностью G_s-белка.
- Г. Фосфолипазной активностью G_s-белка.
- Д. ГТФ-азной активностью α-субъединицы.
- Е. АТФ-азной активностью γ-субъединицы.

Задание 7. Фосфорилироваться в рецепторах гормонов могут аминокислоты, содержащие ОН-группы. Назовите киназу, которой не существует:

- А. Тирозинкиназа. Б. Рецептор инсулина. В. Серин-треонинкиназа.
- Г. Тир/сер/тре-киназа. Д. Рецептор соматотропина. Е. Тир/вал-киназа.

Задание 8. Выберите вторичный посредник действия окситоцина.

- А. Ca²⁺. Б. цАМФ. В. цГМФ. Г. Диацилглицерол.
- Д. Оксид азота. Е. ИТФ.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

- 1. А – 1; Б – 4; В – 6; Г – 7; Д – 5; Е – 3; Ж – 2.
- 2. Г. 3. Г, Д.

Для самостоятельной работы:

- 1.1. – А; 1.2 – В.
- 2.1. – Г; 2.2 – Д; 2.3 – А.
- 3.1. – А; 3.2 – А; 3.3 – А, Г; 3.4 – Д.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Качественные реакции на гормоны

Гормоны щитовидной железы

Щитовидная железа синтезирует и секретирует высокоактивные йодсодержащие тиреоидные гормоны: тироксин (Т₄) и 3,5,3'-трийодтиронин (Т₃), а также нейодированный гормон (полипептид) тиреокальцитонин, функция которого связана с регуляцией уровня кальция и фосфора в крови.

Работа 1. Качественная реакция на тироксин

Принцип метода. При разрушении тиреоидина образуется йодид калия, из которого йод легко вытесняется йодатом калия. Вытеснение йода из соли йодистоводородной кислоты является окислительно-восстановительной реакцией, где йодид калия служит восстановителем, а йодат калия (остаток йодноватой кислоты) — окислителем. Выделившийся йод обнаруживают с помощью крахмала (синее окрашивание) в кислой среде.

Ход работы. В пробирку наливают 24 капли гидролизата тиреоидина, прибавляют 3 капли 1% раствора крахмала, 1 каплю фенолфталеина, а затем 4 капли йодата калия и приблизительно 10–15 капель 10% раствора серной кислоты до обесцвечивания и появления синего окрашивания.

Гормоны поджелудочной железы

В поджелудочной железе вырабатывается ряд гормонов: инсулин, глюкагон и липокаин. Инсулин вырабатывается в β -клетках островков Лангерганса (от лат. *insula* — остров), откуда и получил свое название. Инсулин — белок, состоящий из двух полипептидных цепей, соединенных друг с другом дисульфидными связями.

Первичная структура инсулина полностью расшифрована и осуществлен химический синтез инсулина. Органы мишени для инсулина: печень, мышечная ткань, жировая ткань. Действие инсулина многообразно. Инсулин играет важную роль в метаболизме углеводов. Он снижает содержание глюкозы в крови, увеличивает биосинтез гликогена в печени и мышцах, усиливает липогенез, т. е. образование жиров из углеводов, стимулирует синтез белков. Инсулин является антагонистом адреналина в регуляции синтеза и мобилизации гликогена.

Работа 2. *Цветные реакции на инсулин*

Инсулин дает характерные реакции на белок: биуретовую, Фоля, Миллона и др.

Биуретовая реакция

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора инсулина прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натра, 2 капли 1% раствора сульфата меди и все перемешивают; содержимое пробирки приобретает фиолетовое окрашивание.

Нингидриновая реакция

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора инсулина добавляют 5 капель 0,5% водного раствора нингидрина и кипятят 1–2 мин. В пробирке появляется розово-фиолетовое окрашивание, а с течением времени раствор синее.

Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель 1% раствора инсулина, затем добавляют 3 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. В пробирке появляется осадок желтого цвета.

Реакция на тирозин (Миллона)

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель 1% раствора инсулина, добавляют 3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. В пробирке появляется осадок темно-красного цвета.

Реакция на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (Фоля)

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель 1% раствора инсулина и добавляют 5 капель реактива Фоля, интенсивно кипятят и дают постоять 1–2 мин. При этом появляется черный или бурый осадок сульфида свинца.

Гормоны мозгового слоя надпочечников

В мозговом слое надпочечников из аминокислоты тирозина синтезируются катехоламины, имеющие пирокатехиновое ядро и аминогруппу.

Работа 3. *Качественные реакции на адреналин*

Реакция с хлорным железом

Принцип метода. Адреналин обладает слабощелочной реакцией, легко окисляется на воздухе с образованием адренохрома, вследствие чего раствор окрашивается в красный цвет. При взаимодействии с нитритом наблюдается желто-оранжевое окрашивание, с диазореактивом — красное и с хлорным железом — зеленое. Реакция с хлорным железом характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина и норадреналина.

Ход работы. В пробирку наливают 10 капель раствора адреналина и добавляют 1 каплю хлорного железа. Появляется зеленое окрашивание вследствие присутствия пирокатехина в молекуле адреналина. Добавляют 3 капли 10% раствора едкого натра и наблюдают изменение окрашивания (на вишнево-красное).

Диазореакция

Принцип метода. При взаимодействии диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

Ход работы. К 6 каплям 0,5% раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 6 капель 0,5% раствора нитрита натрия (смесь диазореактива), 10 капель раствора адреналина и 3 капли 10% раствора едкого натра. Жидкость окрашивается в красный цвет.

Работа 4. Флюоресценция продуктов окисления адреналина

Принцип метода. Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, при добавлении щелочи дает флюоресцирующие продукты.

Ход работы. К 10 каплям воды приливают 6 капель 10% раствора едкого натра и 6 капель раствора адреналина. Поместив пробирку перед включенным флюороскопом, наблюдают зеленую флюоресценцию продуктов окисления адреналина.

Гормоны половых желез

Половые гормоны синтезируются в семенниках, яичниках, плаценте и надпочечниках.

Женские половые гормоны — эстрогены — можно рассматривать как производные эстрадиол (углеводорода с 18 атомами углерода). Основными природными эстрогенами являются эстрадиол, эстрон и гормон желтого цвета — прогестерон.

Мужские половые гормоны — андрогены — можно рассматривать как производные андростана (углеводорода с 19 атомами углерода). К мужским половым гормонам относятся тестостерон и андростерон.

Работа 5. Качественные реакции на фолликулин

Принцип метода. Качественная реакция на фолликулин (эстрон) проводится с концентрированной серной кислотой и обусловлена образованием эфирного соединения соломенно-желтого цвета с зеленой флюоресценцией.

Ход работы. С масляным раствором фолликулина реакцию проводят при комнатной температуре. К 2 каплям масляного раствора фолликулина приливают 30 капель концентрированной серной кислоты. Постепенно развивается соломенно-желтое окрашивание.

Выводы:

Подпись преподавателя:

26. Биохимия гормонов. Тест на толерантность к глюкозе

Актуальность темы

Механизм действия индивидуальных гормонов необходимо знать не только врачу-эндокринологу, но и медику любой специализации. Гормоны нашли широкое применение в медицине. Диагностика эндокринной патологии на основании изменения биохимических показателей метаболизма, в частности, диагностика сахарного диабета с помощью метода сахарной нагрузки широко применяется в медицинской практике.

Цель занятия

Закрепить знания о химическом строении и механизмах действия индивидуальных гормонов. Особое внимание уделить эндокринной патологии поджелудочной железы. Научиться строить и интерпретировать результаты построения различных типов сахарной кривой.

Требования к исходному уровню знаний

Требования те же, что и к предыдущему занятию. Дополнительно нужно вспомнить из курса биоорганической химии о том, что глюкоза (благодаря наличию в ее формуле альдегидной группы) обладает редуцирующими свойствами. На этом основаны методы ее определения в биологических жидкостях.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:

Задание 1. Какой из этих углеводов даст реакцию Троммера?

А. Сахароза. Б. Лактоза. В. Фруктоза. Г. Глюкоза. Д. Гликоген.

Правильность решения проверьте, сопоставив его с эталоном ответа.

Вопросы для обсуждения

1. Гормоны гипоталамуса: химическое строение, тип рецептора в клетках-мишенях, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, ответ клеток гипофиза на действие либеринов и статинов гипоталамуса.

2. Гормоны аденогипофиза: химическое строение, типы рецепторов в тканях-мишенях, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, реализация эффекта гормонов на уровне тканей-мишеней. Роль избыточной и недостаточной секреции гормонов.

3. Гормоны нейрогипофиза: химическое строение, тип рецептора в ткани-мишени, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, реализация эффекта окситоцина и вазопрессина на уровне тканей-мишеней. Роль избыточной и недостаточной секреции гормонов.

4. Гормоны эпифиза: химическое строение, предшественники синтеза, реализация эффекта на уровне тканей-мишеней. Роль избыточной и недостаточной секреции гормонов.

5. Тироксин и трийодтиронин: химическое строение, предшественник синтеза, тиреоглобулин, тип рецептора в ткани-мишени, реализация эффекта тиреоидных гормонов на уровне клетки. Роль пероксидазы и дейодазы в метаболизме гормонов. Проявление гипо- и гипертиреозидизма.

6. Гормоны коры надпочечников: химическое строение, предшественник синтеза, тип рецептора в ткани-мишени, реализация эффекта глюкокортикоидов и минералокортикоидов на уровне клетки. Синдром Кушинга. «Бронзовая болезнь». Несахарный диабет.

7. Половые гормоны: химическое строение, предшественник синтеза, реализация эффекта эстрогенов, прогестерона и мужских половых гормонов на уровне клетки. Избыточная и недостаточная секреция половых гормонов.

8. Инсулин и глюкагон: химическое строение, синтез инсулина, типы рецепторов в тканях-мишенях для глюкагона и инсулина, реализация эффекта гормонов поджелудочной железы на уровне клеток. Нарушения метаболизма при диабете. Диагностическое значение сахарных кривых.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 174–203.

2. *Биохимия*. Ключевые пути метаболизма. Мн. : БГМУ. 2002. С. 192–198.

3. *Конспект лекций*.

Дополнительная литература

1. *Строев Е. А.* Биологическая химия / Е. А. Строев. М. : Высшая школа, 1986. С. 370–412.

2. *Маршалл В.* Клиническая биохимия / В. Маршалл. СПб., 2002. 380 с.

3. *Руководство по клинической эндокринологии* / под ред. Н. Т. Старковой. СПб., 1996. С. 15–486.

4. *Charles G. D. Brook. Essential Endocrinology* / Charles G. D. Brook, Nicholas J. Marshall, 2001, Blackwell Science (Oxford). P. 1–164.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Обратите внимание на то, что полиурия отмечается не только при сахарном диабете (*Diabetes mellitus*), но и при несахарном диабете (*Diabetes insipidus*), а также при почечном диабете (при поражении почек). Различить причину полиурии помогает определение удельного веса мочи и данные определения уровня гликемии. Не забывайте, что часто диабет носит скрытый характер и выявить заболевание можно на основании результатов сахарной нагрузки.

1.1. При обследовании больного на толерантность к глюкозе определен натощак уровень глюкозы в крови 7,0 ммоль/л, через 2 часа после нагрузки глюкозой — 10 ммоль/л. Для какого нарушения регуляции углеводного обмена характерны эти показатели?

А. Сахарный диабет. Б. Скрытая форма сахарного диабета.

В. Гиперинсулинизм. Г. Болезнь Аддисона. Д. Микседема.

1.2. В клинику поступил ребенок с жалобами на усиленную жажду, частое мочеиспускание. Клинический анализ крови и общий анализ мочи патологических компонентов не обнаружили. Что можно применить для лечения ребенка?

А. Вазопрессин. Б. Окситоцин. В. Альдостерон.

Г. Тиреоидин. Д. Кортикостерон.

1.3. В эндокринологическое отделение поступила больная с жалобами на жажду, частое мочеиспускание, выраженную сухость кожных покровов. При анализе мочи качественной патологии не выявлено, плотность мочи 1,009. Для какого нарушения гормональной регуляции это характерно?

А. Несахарный диабет. Б. Стероидный диабет. В. Инсулярный диабет.

Г. Тиреотоксикоз. Д. Микседема.

1.4. При лабораторном анализе у больного выявлен гипергликемический тип сахарной кривой. При каком заболевании, помимо сахарного диабета, это может быть?

А. Тиреотоксикозе. Б. Болезни Аддисона. В. Инсулиноме.

Г. Несахарном диабете. Д. Гипотиреозе.

1.5. В клинической лаборатории при анализе мочи в одной из проб определили низкий удельный вес. Какие изменения должны сопутствовать этому показателю?

А. Креатинурия. Б. Глюкозурия. В. Кетонурия. Г. Протеинурия. Д. Полиурия.

1.6. У больного при анализе мочи определили низкий удельный вес. Уровень какого гормона в крови нужно определить у больного для уточнения нарушения?

А. Инсулина. Б. Вазопрессина. В. Кортизола.

Г. Альдостерона. Д. Тиреокальцитонина.

1.7. При профосмотре у женщины выявлена скрытая форма диабета. Лабораторные анализы позволили врачу назначить диетотерапию со сниженным количеством углеводов и увеличение липотропных веществ. Какой основной метаболический эффект достигается такой диетой?

А. Повышение использования глюкозы на синтез жира в жировой ткани.

Б. Снижение окисления жирных кислот в печени.

В. Повышение использования глюкозы на синтез жира в печени.

Г. Увеличение синтеза фосфолипидов и уменьшение отложения нейтрального жира в печени.

Д. Снижение синтеза фосфолипидов.

Задание 2. Инсулин и глюкагон — антагонисты. Вспомните механизм действия этих гормонов на углеводный и липидный обмены.

2.1. Пациент при лечении голоданием потерял 10 кг веса. Активация какого гормона привела к увеличению скорости катаболизма жиров при голодании?

А. Инсулин. Б. Соматостатин. В. Глюкагон. Г. Альдостерон. Д. Окситоцин.

2.2. Больному сахарным диабетом с отрицательным азотистым балансом назначили инъекции инсулина. На какой процесс подействует инсулин для восстановления азотистого равновесия?

А. Ингибирование глюконеогенеза. Б. Ингибирование гликолиза.

В. Увеличение проницаемости клеток для Ca^{2+} . Г. Активацию гликогенфосфоорилазы.

Д. Активацию протеинфосфатаз

2.3. В клинику поступил больной без сознания. В выдыхаемом воздухе был запах ацетона, упругость тканей снижена (обезвоживание). Какой биохимический анализ будет вписываться в клиническую картину заболевания?

А. Гипергаммаглобулинемия. Б. Снижение содержания $NH_2-CO-NH_2$ в крови.

В. Наличие в моче $CH_3-CH(OH)-CH_2-COOH$. Г. Снижение удельного веса мочи.

Д. Снижение содержания аминокислот в крови.

2.4. Вполне благополучный новорожденный, оставленный без кормления на длительный период, умер. Анализ взятого биопсией тканевого материала выявил отсутствие в печени фосфоенолпируваткарбоккиназы. Какой гормон индуцирует синтез этого фермента?

А. Глюкагон. Б. Тироксин. В. Инсулин. Г. Кортизол. Д. Альдостерон.

2.5. Подростку, длительно страдающему гипогликемией, ввели глюкагон и не получили ответной реакции на гормон. Исследование ткани печени, взятой при биопсии, выявило дефект фермента. Назовите этот фермент:

А. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Б. Гексокиназа. В. Фосфогексоизомераза.

Г. Фосфоглюкомутаза. Д. Глюкозо-6-фосфатаза.

2.6. У ребенка 2-го года жизни, страдающего мышечной слабостью, обнаружили увеличенную печень и низкий уровень глюкозы в крови натощак. После введения глюкагона гипергликемия не возникает. Исследование ткани печени, взятой при биопсии, выявило дефект фермента. Назовите этот фермент:

А. α -Амилаза. Б. Лактатдегидрогеназа. В. Гликогенфосфоорилаза.

Г. Гексокиназа. Д. Фруктокиназа.

Задание 3. Вспомните механизм действия гормонов коры надпочечников.

3.1. Девушка обратилась к врачу с жалобами на резкую мышечную слабость, головокружение, усиление пигментации кожи, потерю веса, сухость кожи, повышенный диурез. При обследовании установили сниженное артериальное давление, концентрация глюкозы крови 3,0 ммоль/л, повышенное выделение натрия с мочой. Назначение какого препарата может улучшить состояние больной?

А. Инсулин. Б. Глюкагон. В. Тироксин. Г. Альдостерон.

Д. Питуитрин (вытяжка из задней доли гипофиза).

3.2. Больной обратился с жалобами на общую утомляемость, головную боль, боль в спине и конечностях, исхудание конечностей и увеличение жировых отложений в области спины и шеи, постоянную жажду. При осмотре врач заподозрил синдром Иценко-Кушинга. Изменение уровня какого гормона в крови подтверждает предположение врача?

А. Тироксина. Б. Кортизола. В. Альдостерона. Г. Прогестерона.

Задание 4. При заболевании сахарным диабетом нарушается усвоение глюкозы тканями и усиливается распад липидов. В результате дефицита ЦУК нарушается функционирование ЦТК и избыток молекул ацетил-КоА используется на синтез ацетоновых тел.

4.1. В клинику доставлена больная с сахарным диабетом в прекоматозном состоянии кетоацидотического типа. Увеличение содержания какого метаболита к этому привело?

А. Малоната. Б. Оксалоацетата. В. α -Кетоглутарата. Г. Ацетоацетата. Д. Аспартата.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Молодой пациент, страдающий инсулинзависимым диабетом, соблюдал рекомендации врача. Больной хорошо себя чувствовал. Однако при определении уровня глюкозы в крови у него была обнаружена выраженная гипергликемия (15 ммоль/л). Содержание гликозилированного гемоглобина HbA_{1c} составило 6,5%. Насколько компенсировано заболевание?

Комментарии. Несмотря на высокий уровень глюкозы содержание HbA_{1c} у больного было нормальным, т. е. за прошедшие несколько недель лечение диабета было эффективным. Наличие гипергликемии, как удалось выяснить при более подробном анамнезе, объяснялось обильным застольем накануне.

Задание 2. При анализе мочи у больного обнаружена выраженная глюкозурия. Вспомните, чему равен почечный порог для глюкозы. Укажите уровень гликемии, при котором глюкоза будет экскретироваться в мочу:

А. 6 ммоль/л. Б. 10 ммоль/л. В. 15 ммоль/л. Г. 40 ммоль/л.

Задание 3. Выберите причину, по которой глюкозурия может отмечаться у больного с нормогликемией:

А. Стресс. Б. Голод. В. Заболевания почек. Г. Тиреотоксикоз.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – Г.

Для самостоятельной работы:

1.1 – А; 1.2 – А; 1.3 – А; 1.4 – А; 1.5 – Д; 1.6 – Б; 1.7 – Г.

2.1 – В; 2.2 – А; 2.3 – В; 2.4 – Г; 2.5 – Д; 2.6 – В.

3.1 – Г; 3.2 – Б.

4.1 – Г.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Изучение углеводного обмена методом нагрузки глюкозой

Для диагностики сахарного диабета и некоторых патологических состояний (недостаточность функции печени и почек, некоторые эндокринные заболевания, новообразования мозга, поджелудочной железы и надпочечников, гиповитаминоз B_1 , некоторые наследственные аферментозы) важно иметь представление о состоянии углеводного обмена у больных, одним из показателей которого является уровень глюкозы в крови. В норме концентрация глюкозы в крови взрослого человека составляет **3,9–6,1 ммоль/л.**

Пероральный тест на толерантность к глюкозе (нагрузка глюкозой) позволяет выявить патологию в тех случаях, когда исследование содержания глюкозы в крови натощак не позволяет выявить нарушения обмена веществ.

Показания для проведения теста на толерантность к глюкозе

- Неоднозначные результаты однократных анализов крови натощак.
- Глюкозурия: панкреатическая и внепанкреатическая (первая связана с недостатком секреции или недостаточностью самого инсулина; внепанкреатическая глюкозурия развивается при поражении других органов внутренней секреции, ЦНС, при эмоциональном стрессе, заболеваниях почек, печени, избытке углеводов в диете, при беременности).
- Клинические признаки сахарного диабета или его осложнений при нормальной концентрации глюкозы крови натощак (скрытые формы диабета).

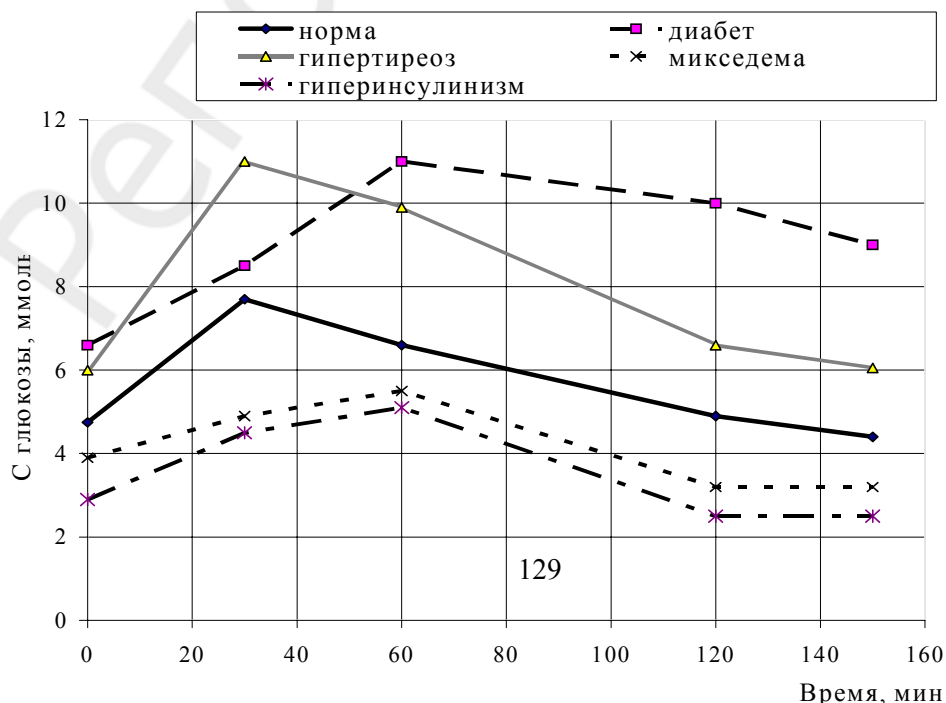
Проведение нагрузки. Утром натощак у больного берут кровь из пальца для определения содержания глюкозы, после чего ему дают выпить 200 мл раствора глюкозы (из расчета 1 г глюкозы на 1 кг массы тела) в течение 5 мин. Затем через каждые 30 мин у больного снова берут кровь из пальца (в пределах 2,5–3 ч), и результаты определения содержания глюкозы в этих пробах используют для построения сахарных кривых, откладывая на вертикальной оси значение концентрации глюкозы в каждой пробе, а на горизонтальной — время (мин или ч).

Ход работы. В пробах для анализа № 1–6 определите содержание глюкозы (см. Инструкцию к практическому занятию № 11 «Определение глюкозы в крови энзиматическим методом»). В пробирке № 1 — сыворотка крови, взятой натощак, в пробирках № 2–6 — взятой через каждые 30 минут после нагрузки глюкозой. На основании полученных данных постройте кривую. Проанализируйте гликемическую кривую, запишите выводы:

№ пробирки	1	2	3	4	5	6
Уровень глюкозы (ммоль/л)						

В норме после нагрузки концентрация глюкозы в крови возрастает в течение первого часа на 50–80%, через 2 часа ее уровень снижается (часто ниже исходного), а через 2,5–3 часа он возвращается к исходному. В случаях нарушения толерантности к глюкозе (НТГ) значительное (до 10,0 ммоль/л) повышение концентрации глюкозы после нагрузки сохраняется более 3 ч.

Гликемические кривые при однократной нагрузке глюкозой в норме и при некоторых патологических состояниях



Гликемические кривые у детей имеют такой же характер, что и у взрослых, с тем лишь отличием, что повышение концентрации сахара в крови у детей меньшее.

Клинико-диагностическое значение оценки гликемических кривых. У больных с разными формами диабета нарастание гликемической кривой происходит медленнее, достигая через 60–150 мин значительной величины (более чем в 1,8 раза превышая исходное значение), в большинстве случаев отмечается глюкозурия. Чем тяжелее заболевание, тем позже достигается максимум гликемии и тем он выше. Понижение кривой происходит очень медленно, чаще оно растягивается на 3–4 ч.

Заболеваниям щитовидной железы, связанным с ее гиперфункцией, свойственны гликемические кривые с более быстрым, чем в норме, подъемом, что, возможно, вызвано более интенсивным обменом веществ и возбуждением симпатического отдела вегетативной нервной системы.

Для больных с аденомой островков Лангерганса, гипотиреозом (микседемой), болезнью Аддисона характерен низкий исходный уровень кривой, низкая ее вершина и высокий постгликемический коэффициент. При некоторых тяжелых заболеваниях (энцефалит и др.) глюкоза может появляться в моче в результате ренальной глюкозурии.

Критерии ВОЗ для постановки диагноза «сахарный диабет» и НТГ

Диагноз	Время взятия крови	Венозная цельная кровь, ммоль/л
Сахарный диабет	Натощак	>6,7
	2 ч после нагрузки глюкозой	>10,0
НТГ	Натощак	<6,7
	2 ч после нагрузки глюкозой	6,7–10,0

Выводы:

Подпись преподавателя:

27. Физико-химические свойства крови.

Гемоглобинозы

Актуальность темы

Химический состав крови в определенной степени отражает состояние обмена веществ в организме. Различные заболевания сопровождаются изменением содержания в крови тех или иных веществ. Биохимический анализ крови проводится с целью диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний, установления прогноза болезни и оценки эффективности проводимого лечения. На занятии студенты рассматривают основные показатели биохимического анализа крови, закрепляя знания о происхождении веществ крови. Аномальные гемоглобины — одна из причин гипоксии.

Цель занятия

Изучить физико-химические свойства крови, закрепить знания о происхождении компонентов плазмы крови и их физиологических концентрациях, буферных системах крови, строении и функционировании гемоглобина, транспорте газов кровью и механизмах

развития гипоксии, диагностическом значении наиболее важных биохимических компонентов крови.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **общей химии:**
 - осмотическое и онкотическое давление, водородный показатель, рН крови, буферные системы, титриметрические методы анализа;
- **биоорганической химии:**
 - строение и свойства гемоглобина;
- **нормальной физиологии:**
 - гемоглобин (функции, производные и аномальные формы); общий анализ крови, ацидоз и алкалоз;
- **биологической химии:**
 - особенности метаболизма эритроцитов; пути использования O_2 в клетках; пути образования CO_2 в клетках; происхождение биохимических компонентов плазмы крови.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. В схеме метаболизма эритроцитов (см. ниже) укажите:

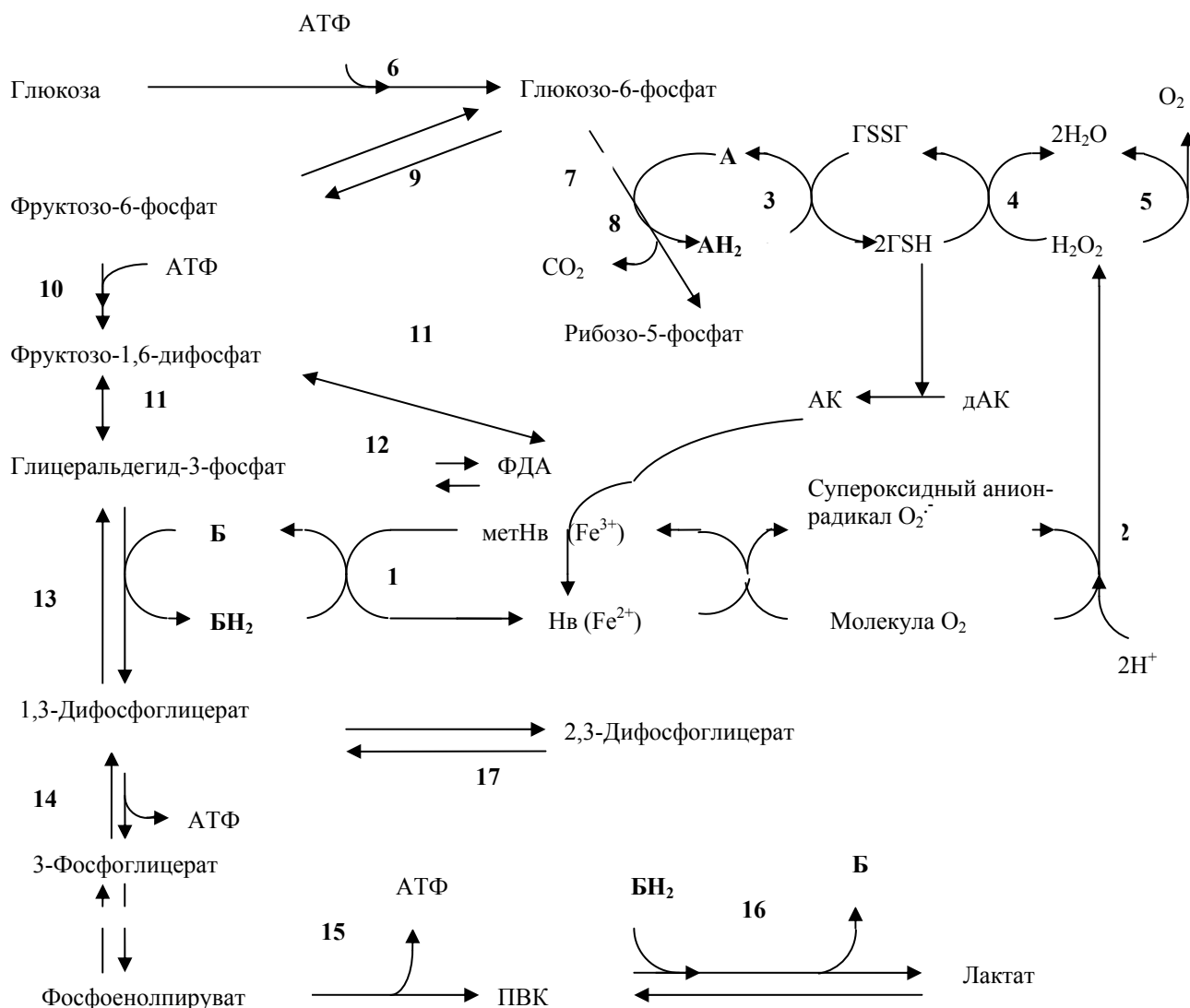
А. Ферменты, обозначенные цифрами 1, 2 и т. д. (*варианты ответов:* 6-фосфофруктокиназа, гексокиназа, пируваткиназа, альдолаза А, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, триозофосфатизомераза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, дифосфоглицератмутаза, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, фосфогексоизомераза, фосфоглицераткиназа, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, каталаза, супероксиддисмутаза, лактатдегидрогеназа, метгемоглобинредуктаза).

Б. Коферменты, обозначенные буквами А, Б (*варианты ответов:* НАД⁺, НАДФ⁺).

В. Реакции, обеспечивающие эритроциты АТФ.

Г. Процесс, обеспечивающий эритроциты НАДФН·Н⁺. Д. Ферменты антиоксидантной защиты.

Е. Аллостерический регулятор, снижающий сродство гемоглобина к кислороду.



Метаболизм эритроцитов.
 АК – аскорбиновая кислота, дАК – дегидроаскорбиновая кислота,
 А,Б – коферменты; АН₂, БН₂ – восстановленные коферменты.

Задание 2. Недостаточность каких ферментов эритроцитов сопровождается их гемолизом?

- А. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Б. Пируваткиназы.
 В. Пируватдегидрогеназы. Г. Исоцитратдегидрогеназы. Д. Аргиназы.

Задание 3. В крови новорожденного с четко выраженной синюшностью носогубного треугольника обнаружен повышенный уровень аномального гемоглобина с валентностью железа 3⁺. Как называется этот аномальный гемоглобин?

- А. Метгемоглобин. Б. Карбоксигемоглобин. В. Оксигемоглобин.
 Г. Карбгемоглобин. Д. Гемоглобин S.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Химический состав плазмы крови (физиологические концентрации наиболее важных компонентов плазмы крови и их происхождение). Биохимический анализ крови и его значение в характеристике состояния здоровья человека.

2. Важнейшие буферные системы крови: бикарбонатная, гемоглибиновая, фосфатная, белковая (компоненты и их соотношение, механизм действия, емкость). Представление о нарушениях кислотно-основного состояния (ацидоз, алкалоз).

3. Белки эритроцитов. Строение гемоглибина, гема, глобина; разновидности (нормальные и аномальные) и производные гемоглибина. Гемоглибинозы.

4. Дыхательная функция крови. Эритроциты как главный участник транспорта газов кровью (роль гемоглибина и карбангидразы). Обратимое связывание кислорода и углекислого газа как способ транспортировки (механизмы связывания CO_2 и O_2 с гемоглибином, кооперативное взаимодействие субъединиц гемоглибина, регуляция насыщения гемоглибина кислородом и диссоциации оксигемоглибина (рН, 2,3-дифосфоглицерат, температура)). Гипоксия, формы, механизмы развития.

Литература для подготовки

Основная литература

Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 65–71, 448–464.

Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 427–439. Конспект лекций.

Дополнительная литература

Марри Р. Биохимия человека : учеб. : В 2 т. / Р. Марри [и др.] / пер. с англ. М. : Мир, 1993. Т. 1. С. 52–62.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Повторите и запомните физиологические концентрации химических соединений крови (табл. 1).

Таблица 1

Некоторые биохимические константы крови

Плотность крови (цельной)	1,05–1,06
рН	7,34–7,44
Осмотическое давление	7,6–8,1 атм
Онкотическое давление	0,03–0,04 атм
Глюкоза плазмы (сыворотки)	3,9–6,1 ммоль/л
Общие липиды	3,5–6,5 г/л
Триацилглицеролы	1,2–2,8 ммоль/л
Холестерол	3,9–7,2 ммоль/л
Общий белок плазмы	60–85 г/л
Альбумины	35–50 г/л
Глобулины	20–35 г/л
Фибриноген	2–4 г/л
Остаточный азот плазмы (сыворотки)	14,3–25 ммоль/л
Мочевина плазмы (сыворотки)	2,5–8,3 ммоль/л
Аммиак крови	6–65 мкмоль/л
Мочевая кислота	0,15–0,5 ммоль/л
Гемоглибин крови: мужчины	130–160 г/л
женщины	120–140 г/л (до 150 г/л)
Билирубин плазмы (сыворотки): общий	3,5–20,5 мкмоль/л
прямой	до 5 мкмоль/л
непрямой	до 16 мкмоль/л
Na^+ в плазме	135–150 ммоль/л
K^+ в плазме	3,4–5,6 ммоль/л
Ca^{2+} в плазме (общий)	2,2–2,7 ммоль/л

1.1. Поясните происхождение химических компонентов крови и их биологическую роль.

Задание 2. Знать механизм функционирования буферных систем крови. Уметь объяснить механизм сопряжения бикарбонатной и гемоглобиновой буферных систем крови.

Задание 3.

3.1. Какие из приведенных утверждений характеризуют гемоглобин человека?

А. Гемоглобин взрослого человека представляет собой смесь, состоящую из гемоглобина А (96–98%), гемоглобина А₂ (2–3%) и гемоглобина F (0,2–1%).

Б. Гемоглобин А содержит по две цепи α и β.

В. Гемоглобин А₂ содержит по две α- и две δ-цепи.

Г. Гемоглобин F содержит по две цепи α и γ.

Д. Эмбриональный гемоглобин (гемоглобин Р) включает в себя три фракции: гемоглобин Говер I (ζ₂ε₂), гемоглобин Говер II (α₂ε₂) и гемоглобин Портленд (ζ₂γ₂).

3.2. Какие из следующих утверждений о структуре гемоглобина верны?

А. Молекула основного гемоглобина взрослого человека состоит из двух идентичных α-субъединиц и двух идентичных β-субъединиц.

Б. Субъединица (протомер) гемоглобина состоит из одной полипептидной цепи (глобина) и гема.

В. Гем — это комплекс протопорфирина со связанным в его центре атомом железа.

Г. Железо гемоглобина остается двухвалентным независимо от присоединения или отдачи кислорода.

Д. В молекуле гемоглобина имеются центры для связывания O₂, CO₂, протонов (H⁺) и 2,3-дифосфоглицерата.

3.3. Какие из следующих утверждений о взаимодействии кислорода и гемоглобина верны?

А. Кислород связывается с молекулой гемоглобина кооперативно.

Б. Кислород связывается с железом гема гемоглобина.

В. Углекислый газ уменьшает сродство гемоглобина к кислороду.

Г. Сродство гемоглобина к кислороду увеличивается при понижении pH и наоборот.

Д. Окись углерода, цианиды конкурируют с кислородом за место связывания в геме гемоглобина.

3.4. Укажите ошибочное утверждение о 2,3-дифосфоглицерате (2,3-ДФГК):

А. Преобладающий органический фосфат в эритроцитах.

Б. Промежуточный продукт гликолитического пути.

В. В эритроцитах находится в концентрациях приблизительно эквивалентных гемоглобину.

Г. Молекула гемоглобина связывает четыре молекулы 2,3-ДФГК.

Д. Стабилизирует дезоксиформу гемоглобина, способствуя переходу кислорода в ткани.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Определение компонентов какой буферной системы крови используется для диагностики расстройств кислотно-щелочного равновесия?

А. Бикарбонатной (гидрокарбонатной). Б. Фосфатной.

В. Гемоглобиновой.

Г. Оксигемоглобиновой.

Д. Белковой.

Задание 2. Развитие метгемоглобинемий может быть обусловлено:

А. Отравлением окислителями (нитриты, нитраты, нитрозосоединения, бромиды и др.).

- Б. Низким парциальным давлением кислорода.
- В. Наследственным дефектом метгемоглобинредуктазы.
- Г. Аномальной формой гемоглобина (М-гемоглобин и др.).
- Д. Высоким парциальным давлением углекислого газа.

Задание 3. α -Талассемия характеризуется:

- А. Нарушением синтеза α -цепи.
- Б. Нарушением синтеза β -цепи.
- В. Усилением синтеза β - и γ -цепей.
- Г. Появлением в крови гемоглобина H (β_4).
- Д. Появлением в крови гемоглобина Бартса (γ_4).

Задание 4. β -Талассемия характеризуется:

- А. Нарушением синтеза α -цепи.
- Б. Нарушением синтеза β -цепи.
- В. Появлением в крови гемоглобина Кения (содержит γ - и β -цепи наряду с α -цепями).
- Г. Увеличением содержания в крови гемоглобина F ($\alpha_2\gamma_2$).
- Д. Увеличением содержания в крови гемоглобина A₂ ($\alpha_2\delta_2$).

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1. Б: А – НАДФ⁺, Б – НАД⁺; В: фосфоглицераткиназная (14) и пируваткиназная (15) реакции; Г: пентозофосфатный путь; Д: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза; Е: 2,3-дифосфоглицерат; 2 – А, Б; 3 – А.

Для самостоятельной работы:

3.1 – А, Б, В, Г, Д. 3.2 – А, Б, В, Г, Д. 3.3 – А, Б, В, Д. 3.4 – Г.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Буферные свойства сыворотки крови*

В сыворотке крови функционируют бикарбонатная, белковая и фосфатная буферные системы.

Принцип метода. Титруют 0,1н раствором HCl 1 мл сыворотки крови (1-я пробирка) и 1 мл воды (2-я пробирка) по индикатору бромфеноловому синему (по 1 капле в каждую пробирку) до желтой окраски. Сравнивают результаты титрования.

Ответ:

Вывод:

Работа 2. *Титрометрический метод определения щелочного запаса крови*

Количество всех оснований крови, в том числе связанных с гемоглобином, обозначается щелочным запасом цельной крови. Эта величина не соответствует резервной щелочности крови, т. е. количеству химически связанной плазмой углекислоты при 40 мм ее напряжения, а всегда значительно превышает ее.

Принцип метода. К цельной крови добавляют заведомо большее количество HCl, которая нейтрализует все щелочные компоненты. Избыток кислоты оттитровывают щелочью, заканчивая титрование в точке эквивалентности при pH = 5,0. Это значение pH соответствует изоэлектрическим точкам основных белков крови — альбумина, глобулина и глобина. В среде, близкой к изоэлектрической точке, белки неустойчивы и легко выпадают в осадок. Поэтому о конце титрования судят по помутнению раствора и выпадению хлопьев белка. Обычно окончание реакции (помутнение) происходит резко с добавлением одной капли щелочи. Щелочной запас крови выражают в миллиэквивалентах щелочи и

соответствует количеству связанной основаниями крови HCl в пересчете на один литр крови. Физиологические пределы колебаний щелочного запаса крови — 100–115 мэкв/л.

Ход работы. К 10 мл 0,01н HCl добавляют 0,2 мл крови и тщательно перемешивают. Прозрачный бурый раствор титруют из микробюретки 0,1н NaOH до резко наступающего помутнения. Отмечают количество щелочи, пошедшее на титрование. $V_T(\text{мл}) =$.

Щелочной запас крови рассчитывают по формуле:

$$X(\text{мэкв/л}) = (1 - V_T) \cdot 0,1 \cdot 1000 / 0,2,$$

где 1 — количество HCl, взятой для анализа и выраженной в 0,1н концентрации, мл; V_T — объем щелочи, израсходованный на титрование, мл; 0,1 — количество мэкв в 1 мл щелочи; 0,2 — количество крови, взятое для анализа, мл; 1000 — 1 литр крови.

Ответ: $X(\text{мэкв/л}) =$

Вывод:

Работа 3. Количественное определение хлоридов в крови по Левинсону

Хлор находится в организме в основном в ионизированной форме. Хлорид-ион — главный внеклеточный анион. Анионы хлора — наиболее важные осмотически активные компоненты крови, лимфы, спинномозговой жидкости. Содержание хлора (хлорид-ионов) в сыворотке крови практически здоровых взрослых людей составляет 95–105 ммоль/л. В плазме и сыворотке крови грудных детей концентрация хлорид-ионов в норме равна 80–140 ммоль/л.

Принцип метода. Аргентометрический осадочный метод основан на способности ионов серебра образовывать с ионами хлора нерастворимые соли. Количество осаждающего вещества (AgNO_3) эквивалентно содержанию хлорид-ионов.

Проводят титрование хлорид-ионов крови азотнокислым серебром в присутствии индикатора K_2CrO_4 . По достижении эквивалентной точки титрования избыток ионов серебра образует с индикатором соединение кирпично-красного цвета (Ag_2CrO_4).

Ход работы

1. Осаждение белков крови. В двух пробирках готовят смесь растворов: 5 мл 0,45% ZnSO_4 + 1 мл 0,1н NaOH. Затем в 1-ю пробирку вносят 0,1 мл сыворотки, во 2-ю (контрольную) — 0,1 мл $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$. Пробирки нагревают 3 мин над пламенем спиртовки. После этого содержимое пробирок фильтруют в колбочки через вату. Осадок на ватном фильтре промывают два раза водой (по 3 мл).

2. Осаждение ионов хлора в присутствии K_2CrO_4 . К фильтрату приливают 2 капли 1–2% раствора K_2CrO_4 и титруют раствором AgNO_3 до изменения желтого цвета раствора в кирпично-красный.

Расчет. Из объема (мл) AgNO_3 , пошедшего на титрование опытного раствора, вычитают объем (мл) AgNO_3 , пошедший на титрование контроля, и разницу умножают на 0,355, если результат выражают в мг хлора на 0,1 мл крови. Для выражения в мг% полученную величину нужно умножить на 1000. Коэффициент пересчета в единицы СИ(ммоль/л) — 0,282.

$V_{\text{оп}}(\text{мл}) =$

$V_{\text{контр}}(\text{мл}) =$

$$C(\text{ммоль/л}) = (V_{\text{оп}} - V_{\text{контр}}) \cdot 0,355 \cdot 1000 \cdot 0,282;$$

Ответ: $C(\text{ммоль/л}) =$

Вывод:

Подпись преподавателя:

28. Белки плазмы крови. Система свертывания крови

Актуальность темы

Наряду с определением общего белка плазмы крови важное диагностическое значение имеет выяснение количественных взаимоотношений между отдельными фракциями белков. На занятии студенты знакомятся с электрофоретическим разделением белков сыворотки крови, проводят количественную оценку протеинограмм. Тема «Гемостаз. Система свертывания крови» — традиционно сложная для студентов. Понимание процессов свертывания крови и фибринолиза — основа для дальнейшего изучения вопросов диагностики, лечения, профилактики тромбозов (тромбоэмболий) и геморрагий.

Цель занятия

Ознакомиться с принципами исследования белкового состава крови, понять диагностическое значение определения количественного соотношения белковых фракций и отдельных белков плазмы крови. Получить представление о механизмах гемостаза и изучить функционирование системы свертывания крови.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- *общей химии*:
 - титрометрические методы анализа;
- *биоорганической химии*:
 - «цитратная кровь»;
- *нормальной физиологии*:
 - гемостаз;
- *биологической химии*:
 - физико-химические свойства белков, методы разделения белков (высаливание, электрофорез), количественное определение белка плазмы крови.

Для проверки исходного уровня знаний ответьте на следующие вопросы:

1. Что понимают под гемостазом? Виды гемостаза.
2. Что такое «цитратная кровь»?

Вопросы для обсуждения

1. Белки плазмы крови. Основные белковые фракции: альбумины, глобулины, фибриноген (содержание, функции); альбумино-глобулиновый коэффициент и его диагностическое значение. Биологическая роль и диагностическое значение некоторых белков плазмы крови (гаптоглобин, трансферрин, церулоплазмин, ингибиторы трипсина, С-реактивный белок, интерферон, криоглобулины).

2. Ферменты плазмы крови (секреторные, индикаторные, экскреторные). Диагностическое значение определения активности ферментов плазмы крови.

3. Представление о гемостазе (определение, структурно-функциональные компоненты, сосудисто-тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз). Система свертывания крови (функциональные звенья и их биологическая роль). Представление о нарушениях функционирования системы свертывания крови.

4. Свертывающая система (компоненты и их происхождение), гемокоагуляция (определение, фазы и их продолжительность, источники тромбопластинов). Внешний и внутренний механизмы свертывания крови.

5. Витамин К (химическая природа, разновидности, природные источники, роль в гемокоагуляции).

6. Антикоагулянтная система, классификация физиологических антикоагулянтов: первичные и вторичные (представители, механизм действия). Представление об искусственных антикоагулянтах прямого и непрямого действия.

7. Фибринолитическая система, механизмы фибринолиза. Плазминовая система (компоненты и их происхождение, механизм действия).

8. Представление о коагулограмме (ориентировочные тесты).

Литература для подготовки

Основная литература

1. **Березов Т. Т.** Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 143–145, 438–447, 464–472.
2. **Николаев А. Я.** Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 439–448.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. **Иванов Е. П.** Руководство по гемостазиологии / Е. П. Иванов. Мн. : Беларусь, 1991. – 304 с.
2. **Василькова Т. В.** Молекулярные механизмы гемостаза: учеб. пособие / Т. В. Василькова. Мн. : МГМИ, 1999. 57 с.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Назовите индикаторные ферменты крови и поясните их диагностическое значение.

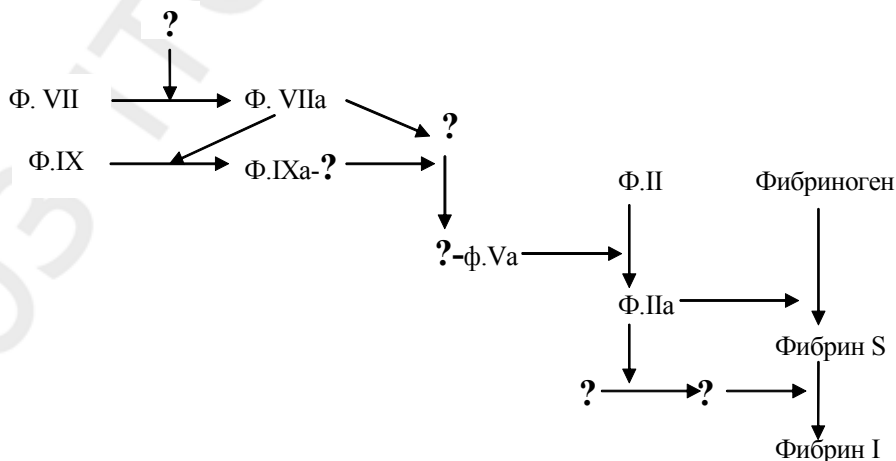
Задание 2.

2.1. Напишите схему внутреннего пути свертывания крови.

2.2. Запомните активаторы фактора Хагемана.

2.3. На схеме

внешнего механизма свертывания крови (см. справа) замените знак вопроса соответствующими факторами.



Задание 3.

Назовите витамин К-зависимые факторы системы свертывания крови.

Внешний механизм свертывания крови

Задание 4. Умейте объяснить механизм действия основных физиологических антикоагулянтов.

4.1. Выберите из приведенных физиологических антикоагулянтов:

- | | | |
|---------------|---------------------|--------------------------------------|
| А. Первичные. | 1. Фибрин. | 4. Протеины С и S. |
| Б. Вторичные. | 2. Антитромбин III. | 5. α ₂ -Макроглобулин. |
| | 3. Гепарин. | 6. Ингибитор пути тканевого фактора. |
| | | 7. Продукты деградации фибрина. |

4.2. Ответьте на вопрос: почему у гомозиготных новорожденных с мутацией гена протеина C наблюдается распространенный тромбоз внутренних органов (врожденная молниеносная пурпура)?

4.3. Ответьте на вопрос: почему при бактериальных инфекциях, вызванных некоторыми стрептококками, наблюдаются диффузные кровотечения?

Задание 5. Назовите ориентировочные тесты коагулограммы, характеризующие:

- А. Общее состояние свертывания крови.
- Б. Состояние отдельных фаз гемокоагуляции.
- В. Посткоагуляционную фазу.
- Г. Антикоагулянтную систему.
- Д. Систему фибринолиза.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Альбумины плазмы крови характеризуются:

- А. Хорошей растворимостью в воде.
- Б. Молекулярной массой около 70000 Да.
- В. Содержат много дикарбоновых аминокислот.
- Г. Не являются гликопротеинами.
- Д. Содержание в плазме крови в норме составляет 35–50 г/л.

Задание 2. Укажите ошибочное утверждение. Альбумины плазмы крови:

- А. Синтезируются в эритроцитах.
- Б. Сравнительно быстро обновляются.
- В. Играют важную роль в создании онкотического давления.
- Г. Выполняют роль белкового резерва организма.
- Д. Осуществляют транспорт метаболитов (жирных кислот, билирубина, альдостерона, Ca^{2+}) и лекарственных веществ (антибиотиков, сульфаниламидов, салицилатов, барбитуратов, сердечных гликозидов и др.).

Задание 3. Глобулины плазмы крови характеризуются:

- А. Большинство глобулинов — гликопротеины.
- Б. Имеют большую молекулярную массу в сравнении с альбуминами.
- В. Многие глобулины — сравнительно гидрофобные белки.
- Г. Выпадают в осадок только в насыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- Д. Физиологические концентрации глобулинов в плазме крови — 20–35 г/л.

Задание 4. Укажите верные утверждения. Глобулины плазмы крови:

- А. Принимают участие в создании гуморального иммунитета.
- Б. Осуществляют транспорт органических веществ (метаболитов, гормонов, витаминов).
- В. Осуществляют транспорт катионов (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} и др.).
- Г. Являются ингибиторами протеолитических ферментов.
- Д. Играют ведущую роль в создании онкотического давления.

Задание 5. Какие функции выполняют приведенные ниже глобулины крови?

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. Церулоплазмин. | А. Участвует в транспорте железа (Fe^{3+}) по кровеносному руслу. |
| 2. Трансферрин. | |
| 3. α_2 -Макроглобулин. | Б. Ведущая роль в транспорте меди к тканям. |
| 4. Гаптоглобин. | В. Обладает оксидазной активностью. |

Г. Связывает и транспортирует свободный гемоглобин плазмы в клетки ретикулоэндотелия.

Д. Ингибирует протеолитические ферменты крови (трипсин, химотрипсин, тромбин, плазмин, калликреин).

Задание 6. Какие из приведенных утверждений характеризуют С-реактивный белок?

А. Дает преципитат с С-полисахаридом пневмококка.

Б. Состоит из 6 субъединиц с молекулярной массой 23000 Да каждая.

В. Постоянно в малых количествах содержится в крови практически здоровых людей.

Г. Концентрация в плазме крови при воспалении или некрозе тканей может увеличиваться в 20–25 раз.

Д. Является парапротеином.

Задание 7. В процессе тромбообразования различают внешний и внутренний пути свертывания крови. На каком этапе свертывания крови они не совпадают?

А. Превращение протромбина в тромбин.

Б. Превращение фибриногена в фибрин.

В. Образование протромбиназы (активного тромбoplastина крови).

Г. Ретракция кровяного тромба.

Д. Превращение пламиногена в плазмин.

Задание 8. Какое из приведенных утверждений не характерно для фактора Хагемана?

А. Является сериновой протеазой.

Б. Активируется калликреином.

В. Активируется при контакте крови с чужеродной поверхностью (стекло, каолин).

Г. Активируется тромбоцитарным тромбoplastином.

Д. Активируется тканевым тромбoplastином.

Задание 9. Расположите в правильном порядке события, происходящие при образовании фибринового сгустка:

А. Образование геля фибрина. Б. Стабилизация полимера фибрина (образование фибрина I).

В. Отщепление от фибриногена фибринопептидов А и В.

Г. Сжатие геля.

Д. Образование фибрина S.

Задание 10. Наблюдаемая при наследственной недостаточности фактора XIII повышенная кровоточивость объясняется невозможностью образования стабильного фибринового сгустка. Какова роль плазменной трансглутаминазы (фибриназы) в образовании гемостатического тромба?

А. Участие в синтезе фибриногена в печени.

Б. Участие в образовании фибрин-мономера.

В. Участие в образовании растворимых фибрин-мономерных комплексов.

Г. Участие в ковалентной сшивке фибриновых молекул.

Д. Участие в ретракции гемостатического тромба.

Задание 11. Гиповитаминоз К сопровождается повышенной кровоточивостью. Какова роль витамина К в гемокоагуляции?

А. Необходим для активации свертывающей системы после повреждения сосуда.

Б. Необходим для одновременного активирования свертывающей и противосвертывающей систем.

В. Участвует в постсинтетическом созревании II, VII, IX и X факторов свертывания крови.

- Г. Участвует в связывании ионов кальция.
- Д. Участвует в синтезе V и VIII факторов свертывания крови.

Задание 12. Выберите правильные утверждения, характеризующие участие ионов кальция (ф. IV) в гемокоагуляции:

- А. Являются вторичными посредниками в действии ряда гормонов.
- Б. Стимулирование процессов перекисного окисления липидов.
- В. Связывание на тромбопластинах кальций-зависимых факторов свертывания крови (ф. IX, ф. X, ф. VII, ф. II).
- Г. Стабилизация структуры тромбопластинов.
- Д. Активирование некоторых факторов свертывания крови.

Задание 13. Дефицит антитромбина III — частая причина тромбозов. Какова антикоагулянтная роль антитромбина III?

- А. Образование необратимого комплекса с гепарином.
- Б. Ингибирует витамин K-зависимое карбоксилирование остатков глутамата.
- В. Необратимо инактивирует большинство сериновых протеаз свертывающей системы.
- Г. Затрудняет связывание факторов свертывания на тромбопластинах.
- Д. Разрушает V и VIII факторы свертывания крови.

Задание 14. Что определяет противосвертывающую активность гепарина?

- А. Связывает ионы кальция.
- Б. Активирует антитромбин III.
- В. Образует нестабильные комплексы с некоторыми факторами свертывающей системы, выключая их из процесса гемокоагуляции.
- Г. Осуществляет неферментативный фибринолиз.
- Д. Ингибирует витамин K-зависимое карбоксилирование остатков глутамата протеинов C и S

Задание 15. Отберите те протеолитические ферменты, при действии которых возможно превращение плазминогена в плазмин:

- А. Тканевый активатор плазминогена. Б. Урокиназа.
- В. Протеин C (S). Г. α_2 -Антиплазмин. Д. α_2 -Макроглобулин.

Задание 16. Расположите в правильном порядке события, происходящие при фибринолизе:

- А. Плазминоген осаждается на фибриновых нитях.
- Б. Тканевый активатор плазминогена активирует плазминоген.
- В. Тканевый активатор плазминогена связывается с фибрином.
- Г. Плазминоген превращается в плазмин.
- Д. Плазмин гидролизует фибрин.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самостоятельной работы:

4.1 А – 2, 3, 4, 5, 6; Б – 1, 7.

5. А — 1) время свертывания крови по Ли-Уайту; 2) время рекальцификации; Б — I фаза: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), II фаза: протромбиновый индекс (ПТИ), III фаза: 1) количество фибриногена; 2) активность фибриназы; В — 1) ретракция тромба; 2) гематокрит тромба; Г — 1) тромбиновое время (ТВ); 2) толерантность плазмы к гепарину; 3) активность антитромбина III; Д — фибринолитическая активность (спонтанный фибринолиз).

Самостоятельная работа (80 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Разделение белков сыворотки методом электрофореза на бумаге*

В клинических лабораториях наиболее распространены электрофоретические методы исследования белкового спектра плазмы (сыворотки) крови.

Принцип метода. Метод основан на том, что под влиянием постоянного электрического поля белки сыворотки, обладающие электрическим зарядом, движутся по смоченной буферным раствором бумаге со скоростью, зависящей от величины заряда и молекулярной массы частиц. Вследствие этого белки сыворотки разделяются обычно на 5–7 фракций: альбумины и глобулины α_1 , α_2 , β и γ , содержание которых определяется фотометрически. Относительное содержание белковых фракций в сыворотке крови здорового человека выражается следующими цифрами: альбумины — 52–65%; глобулины — 29–54%:
 α_1 -глобулины — — 2 — 5%,
 α_2 -глобулины — 7–13%, β -глобулины — 8–14%, γ -глобулины — 12–22%.

1. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови

Ход работы. Полоска хроматографической бумаги пропитывается буферным раствором, концы полоски опускаются в кюветы с этим буфером, туда же помещают электроды — катод и анод. В средней трети бумажной полоски поперек на линию старта наносят исследуемую сыворотку и включают электрический ток. Через определенное время ток выключают и бумажку подсушивают при 90°C (при этом белки подвергаются денатурации и фиксируются на бумаге). Далее белковые фракции нужно покрасить.

2. Окраска электрофореграмм

Электрофореграммы помещают в кювету с краской (амидочерный 10 В) и оставляют там на 15–20 минут. Для удаления избытка краски бумажные полоски переносят в кювету с 2% раствором уксусной кислоты. Через 5–10 минут кислоту сливают и полоски заливают чистым раствором уксусной кислоты. В результате такой обработки синие пятна, соответствующие различным фракциям белков, отчетливо видны на белом фоне. Полученные электрофореграммы сушат на воздухе.

3. Количественная оценка электрофореграмм

В пять пробирок наливают из бюретки по 5 мл 0,1н NaOH. Вырезают ножницами соответствующие каждой фракции участки электрофореграммы, измельчают их и помещают в пронумерованные пробирки со щелочью. В качестве контроля в шестую пробирку помещают неокрашенный участок бумажной полоски шириной 3–10 мм. Пробирки осторожно встряхивают и оставляют на 20–30 минут для полного извлечения краски из бумаги. Затем определяют оптическую плотность каждого раствора против контроля на фотоэлектрокалориметре (кювета 10 мм, красный светофильтр с $\lambda=670$ нм). Зная оптические плотности растворов, соответствующие каждой фракции, вычисляют сумму оптических плотностей всех фракций и выражают относительное содержание белка в каждой фракции.

$$\text{Относит. содерж. альбуминов}(\%) = \frac{\text{Оптич. плотн. элюата альбуминов (E)}}{\text{Сумма оптич. плотностей (\Sigma)}} \cdot 100\%.$$

$E_{\text{альбум}} =$	$E_{\alpha_1\text{-глобул}} =$	$E_{\alpha_2\text{-глобул}} =$	$E_{\beta\text{-глобул}} =$	$E_{\gamma\text{-глобул}} =$	$\Sigma =$
% =	% =	% =	% =	% =	

Ответ:

Вывод:

Работа 2. *Определение содержания кальция в плазме крови*

Кальций играет важную роль в осуществлении процессов жизнедеятельности. Он влияет на проницаемость биологических мембран, возбудимость нервов и мышц, участвует в нервно-мышечной проводимости, сокращении и расслаблении мускулатуры (в том числе мышцы сердца), секреторных процессах, формировании кости и хряща; воздействует на обмен веществ в клетках, является важным фактором гемостаза и посредником действия гормонов в клетке.

Количественное определение кальция в плазме крови имеет важное значение для диагностики ряда заболеваний и при наблюдении за ходом лечения.

В норме концентрация общего кальция в плазме крови — 2,2–2,7 ммоль/л (9–11 мг%).

Принцип метода. Индикатор хромоген черный ЕТ-00 образует с кальцием соединение розово-фиолетового цвета. При титровании трилоном Б (двухзамещенная натриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты, образующая прочные комплексы с ионами кальция) такого окрашенного раствора произойдет изменение окраски в сине-розовый цвет в эквивалентной точке, соответствующей связыванию трилоном Б всех ионов кальция в растворе.

Ход работы. В колбочку наливают 25 мл H₂O и вносят 1 мл аммиачного буферного раствора. Затем приливают 1 мл исследуемой плазмы крови и 2 капли индикатора хромогена черного. Раствор приобретает розово-фиолетовый цвет. Затем раствор титруют 0,002М раствором трилона Б до сине-розовой окраски. По объему трилона Б, пошедшего на титрование, рассчитывают содержание кальция в плазме крови.

Расчет:

$$X \text{ (мг\%)} = \frac{0,002 \cdot 40,8 \cdot 100 \cdot V_T}{1},$$

где 0,002 — молярность раствора трилона Б; 40,8 — молекулярный вес Са; 100 — коэффициент для пересчета в мг%; 1 — объем сыворотки, взятый для анализа; V_T — объем трилона Б, израсходованный на титрование.

Ответ: V_T (мл) = , X (мг%) = .

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л) — 0,245. C (ммоль/л) = $X \cdot 0,245 =$

Вывод:

Подпись преподавателя:

29. Биохимия печени

Актуальность темы

Печень играет центральную роль в промежуточном обмене веществ. Особенности ферментативного аппарата печени и ее анатомических связей с другими органами дают возможность печени участвовать в регуляции практически всех видов обмена веществ и поддерживать постоянство концентрации в крови многих жизненно важных соединений.

Печень — большая промежуточная станция между порталным и общим кругами кровообращения организма, поэтому все вещества, всасывающиеся из кишечника, должны пройти через печень. Функции печени обуславливают ее своеобразный «биохимический альтруизм»: многие происходящие в ней процессы настроены на синтез различных веществ

для других органов, а также на защиту этих органов от образующихся в них (или поступающих извне) токсических соединений.

В состав органа входят клетки Купфера, принимающие участие в фагоцитозе. Печень выделяет желчь, необходимую для переваривания жира. Значительную роль играет печень в процессах свертывании крови, т. к. синтезирует белки-компоненты свертывающей и антисвертывающей систем крови.

В печени депонируются железо, медь и витамин В₁₂, необходимые для эритропоэза. Продолжительность жизни эритроцитов составляет 110–120 дней. После этого они разрушаются с освобождением гемоглобина. В печени, селезенке, костном мозге гемоглобин распадается с образованием билирубина. Дальнейшая судьба желчных пигментов (билирубина) связана с их метаболизмом в печени и в кишечнике. Определение в клинике содержания общего билирубина, его фракций и продуктов их деградации имеет важное значение в дифференциальной диагностике желтух различной этиологии.

Следует отметить значительную вариабельность химического состава печени, который зависит от характера питания, состояния обмена веществ. Особенно существенные изменения в соотношении отдельных компонентов наблюдаются при голодании и патологических процессах, например, жировой инфильтрации печени, гликогенозах и др.

В связи с вышеизложенным понятна необходимость правильной оценки функционального состояния печени с использованием различных биохимических тестов, позволяющих установить факт заболевания и отслеживать его течение.

Цель занятия

Уметь применять знания о гомеостатической и интегрирующей роли печени в обмене углеводов, липидов и аминокислот для объяснения механизмов нарушений обмена веществ при болезнях печени и желчных путей. Уметь использовать знания о путях превращения в печени ксенобиотиков для понимания биохимических аспектов фармакологии и токсикологии.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **анатомии, гистологии, физиологии:**

- особенности строения и микроструктуры печени;
- функции печени;
- анатомо-физиологические взаимоотношения между печенью, желудочно-кишечным трактом и воротной веной;

– **биоорганической химии:**

- основные реакции введения функциональных групп в молекулы химических веществ с целью повышения их гидрофильных свойств.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. При изучении микропрепарата печени студентам дано задание зарисовать структурную морфологическую единицу печени — ацинус.

1.1. Выберите функцию, которую выполняют элементы этой морфологической единицы — клетки Купфера:

А. Синтетическая. Б. Выделительная. В. Обезвреживающая.

1.2. Какую роль играет пространство Дисе?

А. Участвует в транспорте веществ между кровью синусоидов и паренхиматозными клетками.

Б. Является депо желчи.

В. Участвует в транспорте веществ между артериолами, венулами и центральной веной.

Задание 2. Методом «меченых атомов» была зафиксирована энтерогепатическая циркуляция желчных кислот. По каким кровеносным сосудам происходит возврат желчных кислот из кишечника к гепатоцитам в процессе этой циркуляции?

А. По центральной вене печени. Б. По воротной вене печени.

В. По нижней полой вене печени. Г. По печеночной артерии.

Задание 3. На лабораторном практикуме студенты получили задание сравнить растворимость различных веществ в воде. Сравнив результаты исследования, студенты убедились, что введение некоторых функциональных групп повышает гидрофильность молекул органических соединений.

3.1. Какие функциональные группы могут обеспечить гидрофильные свойства этих молекул?

А. Изопропильные. Б. Дисульфидные. В. Гидроксильные. Г. Карбоксильные.

3.2. Назовите химические реакции, в результате которых в молекулы органических соединений могут быть введены указанные выше функциональные группы.

А. Гидроксилирование. Б. Карбоксилирование.

В. Деаминация. Г. Нитрование.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Основные функции и химический состав печени.

2. Роль печени в обмене углеводов.

3. Роль печени в обмене липидов.

4. Роль печени в обмене белков.

5. Обезвреживающая функция печени, механизмы: (защитные синтезы, ацилирование, микросомное окисление, конъюгация).

6. Роль печени в пигментном обмене. Синтез и распад гемоглобина (схемы). Обмен билирубина в норме и патологии. Порфирии, желтухи (гемолитическая, обтурационная, паренхиматозная) и их дифференциальная диагностика.

7. Биохимические методы диагностики нарушений функций печени.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 427–438.

2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 411–426, 428–430.

3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Маршалл В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршалл. М., СПб. : Изд-во БИНОМ-Невский Диалект, 1999. 368 с.

2. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993. 384 с.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Систематизировать знания об интеграции путей метаболизма в печени. Познакомиться с рисунком «Пути превращения углеводов и липидов в печени».

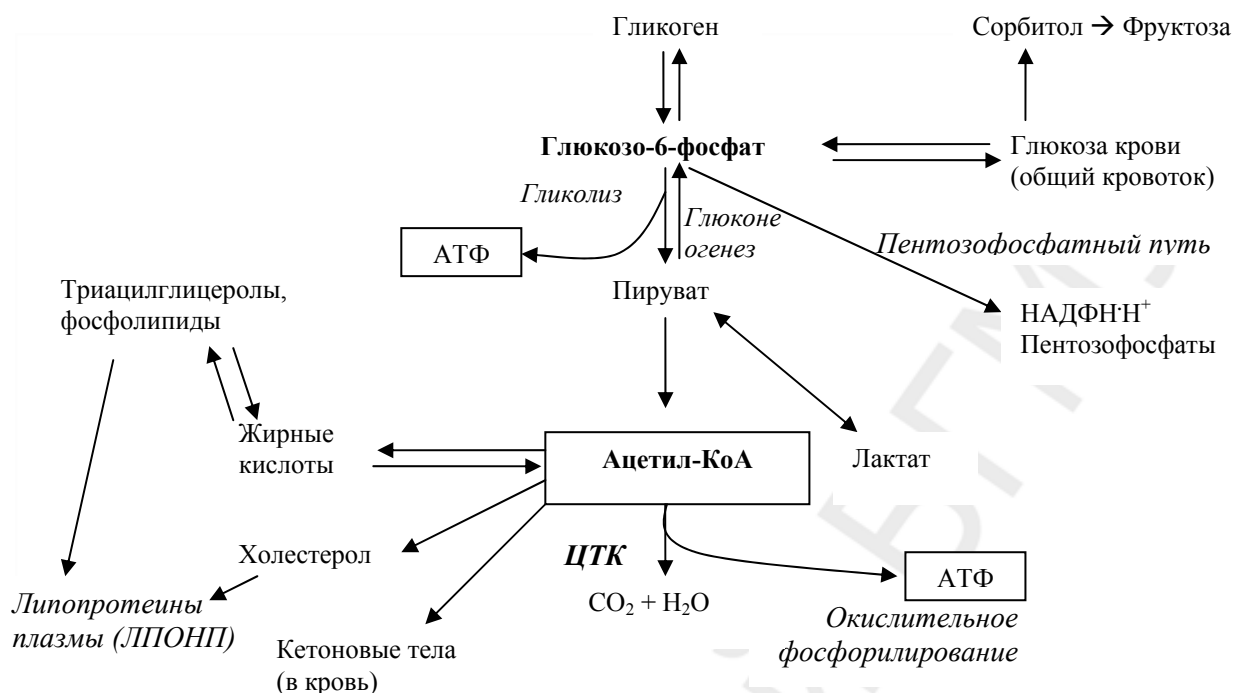
1.1. Обратит внимание на то, что большая часть потребленной свободной глюкозы в печени фосфорилируется с образованием глюкозо-6-фосфата. Метаболизм этого соединения может осуществляться по пяти основным направлениям, выбор которых зависит от соотношения между потребностями организма и количеством поступивших с пищей углеводов.

1.2. Печень поддерживает постоянный уровень глюкозы в крови при голодании за счет активации гликогенолиза и глюконеогенеза, а при избыточном ее поступлении из кишечника глюкоза депонируется в виде гликогена и липидов.

1.3. Знать, что обратимость превращения лактата в пируват (направление реакции) зависит от соотношения НАДН·Н⁺/НАД⁺.

1.4. Знать, что жирные кислоты — основной субстрат энергетического метаболизма в печени и предшественники в биосинтезе холестерина, кетоновых тел, липидной части липопротеинов плазмы крови.

Пути превращения углеводов и липидов в печени



1.5. Задание. Этанол окисляется, главным образом, в печени, где при участии НАД-зависимых дегидрогеназ, последовательно превращаясь в уксусный альдегид и уксусную кислоту, приводит к увеличению отношения $\text{НАДН}^+/\text{НАД}^+$. Объясните, почему при алкогольном токсикозе наблюдается гиперлактатемия и гипогликемия. Напишите реакции, подтверждающие указанные явления.

1.6. Объясните:

а) почему уже через три часа после удаления печени у животных развивается гипогликемия и наступает смерть, если ежечасно не вводить глюкозу;

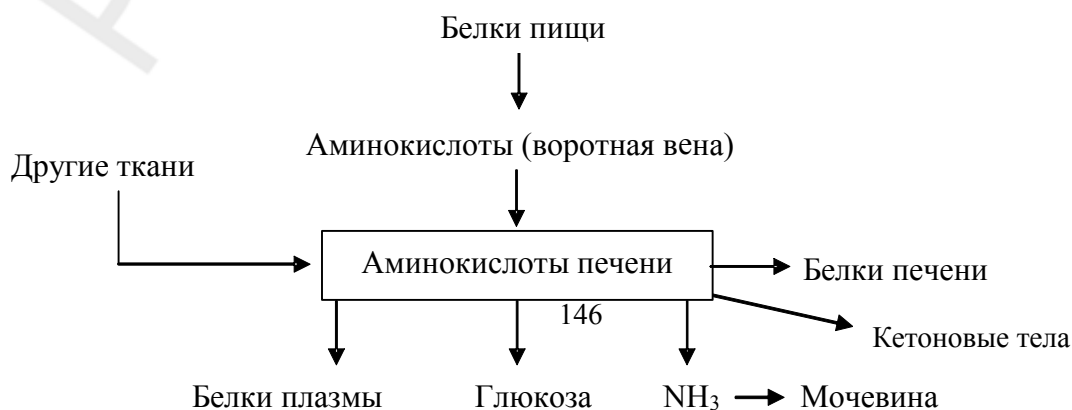
б) почему введение галактозы, лактата или пирувата в этих условиях не эффективно.

1.7. Выбрать продукты липидного обмена, синтезирующиеся преимущественно в печени:

А. Холестерол. Б. ТАГ. В. Фосфолипиды. Г. Кетоновые тела.

Д. Хиломикроны. Е. ЛПВП. Ж. Свободный билирубин. З. ЛПОНП.

Задание 2. Знать, что аминокислоты, всосавшиеся в кишечнике и поступившие затем в печень, имеют несколько основных путей метаболизма:



2.1. Задача. У больного с алкогольным циррозом печени наблюдается сильная отечность. С нарушением синтеза каких веществ в печени связано это состояние?

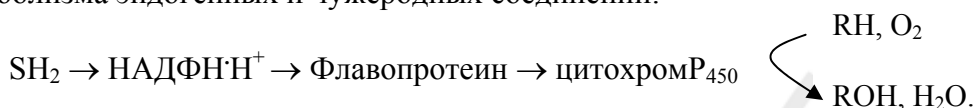
- А. Мочевины. Б. Альбуминов. В. Холестерола.
Г. Гаптоглобина. Д. Фибриногена.

2.2. Задача. В организме здорового человека железо депонируется в печени, селезенке, костном мозге. В составе какого белка происходит его депонирование?

- А. Ферритина. Б. Трансферрина. В. Апоферритина.
Г. Плазмина. Д. Церулоплазмина.

Задание 3. Усвоить механизмы обезвреживания веществ в печени.

3.1. Знать основы функционирования микросомной системы окисления как пути метаболизма эндогенных и чужеродных соединений:



Таким способом гидроксилируются стероиды в процессе образования гормонов коры надпочечников, ряд лекарственных препаратов и чужеродных соединений.

В результате гидроксилирования уменьшается токсичность и повышается растворимость ксенобиотиков, что способствует выведению их из организма. Многие лекарственные вещества, например, фенobarбитал, способны индуцировать синтез микросомных ферментов и цитохрома P₄₅₀.

3.2. Знать, что конъюгационная фаза необходима для образования малотоксичных и легковыводимых продуктов метаболизма лекарств и может протекать как самостоятельный этап обезвреживания.

3.3. Задача. Для исследования обезвреживающей функции печени пациенту назначена проба Квика. После приема бензоата натрия уровень гиппуровой кислоты в моче обследуемого повысился, что свидетельствует о нормальной детоксикационной функции печени. Какое вещество принимает участие в обезвреживании этой соли?

- А. ФАФС. Б. Церулоплазмин. В. УДФ-глюкуроновая кислота.
Г. Таурин. Д. Глицин.

3.4. Задача. У больного инфекционным гепатитом произошло обесцвечивание кала. С отсутствием в кишечнике какого продукта распада билирубина это связано?

- А. Копропорфирина. Б. Стеркобилина. В. Биливердина. Г. Вердоглобина.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Для предотвращения развития гипербилирубинемии у новорожденного вследствие несовпадения у матери и ребенка резус-фактора беременной перед родами рекомендован фенobarбитал. Выберите ответ, объясняющий, с какой целью в данном случае был назначен этот препарат:

- А. В качестве снотворного средства.
Б. Для инактивации компонентов микросомного окисления.
В. Для снижения растворимости билирубина.
Г. Как индуктора печеночных ферментов детоксикации.
Д. В качестве липотропного средства.

Задание 2. При лабораторном обследовании больного желтухой получены следующие данные: общее содержание в сыворотке крови билирубина — 60 мкмоль/л, прямого

билирубина — 43 мкмоль/л, в моче определяется прямой билирубин и отсутствуют уробилин и стеркобилин. Какой вид желтухи у данного больного?

- А. Паренхиматозная. Б. Гемолитическая. В. Обтурационная.

Задание 3. Для оценки функционального состояния печени у больного исследована экскреция животного индикана. Индикан образуется в результате обезвреживания в печени индоксила — продукта гниения аминокислоты триптофана в толстом кишечнике. Какое вещество участвует в обезвреживании этого токсического соединения?

- А. ФАФС. Б. УДФ-глюкуроновая кислота. В. Глицин.
Г. Церулоплазмин. Д. Таурин.

Задание 4. Методом дифференциального центрифугирования клеток печени была получена микросомная фракция. Микросомное окисление — это способ обезвреживания токсических веществ в печени. Выберите компонент этой цепи окисления:

- А. Цитохром а₃. Б. Цитохром с. В. Цитохром b.
Г. Цитохром р₄₅₀. Д. Цитохром с₁.

Задание 5. В моче больного обнаружены в большом количестве аминолевулиновая кислота, порфобилиноген и порфирины. Моча при длительном освещении приобрела темно-красный винный цвет. Какую патологию можно предположить в данном случае?

- А. Печеночная желтуха.
Б. Эритропоэтическая порфирия.
В. Гемолитическая желтуха.
Г. Печеночная порфирия.
Д. Талассемия.

Задание 6. Больному с жировой инфильтрацией печени назначена растительно-молочная диета. Дефицит каких липотропных веществ восполняют рекомендованные продукты?

- А. Ненасыщенных жирных кислот. Б. Насыщенных жирных кислот.
В. Креатина. Г. Метионина.
Д. Серотонина. Е. Кальцитонина.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1.1 – В; 1.2 – А; 2 – Б; 3.1 – В, Г; 3.2 – А, Б.

Для самостоятельной работы:

1.5 – пируват + НАДН⁺ ↔ лактат + НАД⁺.

При приеме алкоголя отмечается гипоглюкоземия, потому что в этих условиях в клетках печени снижается концентрация пирувата, что приводит к снижению скорости глюконеогенеза, являющегося важным источником глюкозы крови.

1.7 – А, Б, В, Г, Е, З; 2.1 – Б; 2.2 – А; 3.3 – Д; 3.4 – Б.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Исследование коллоидоустойчивости белков сыворотки крови*



Проба Вельтмана в модификации Тейля

Принцип метода. Реакция основана на том, что белки сыворотки крови при добавлении раствора хлористого кальция определенной концентрации и последующем нагревании выпадают в виде хлопьев в осадок (происходит нарушение коллоидной устойчивости).

Ход определения. К 4,9 мл воды прибавляют 0,1 мл сыворотки, содержимое пробирки перемешивают путем ее опрокидывания (при этом пробирку можно закрывать большим пальцем) и затем приливают 0,1 мл 0,5% раствора хлористого кальция (из пипетки на 1,0 мл или капельницы, если объем каждой капли соответствует 0,05 мл). Содержимое пробирки встряхивают и нагревают над пламенем спиртовки до однократного вскипания смеси. Затем пробирку охлаждают и смотрят через нее на свет. Если хлопья в пробирке не обнаруживаются, то в нее добавляют еще 0,1 мл CaCl_2 и раствор вновь нагревают до кипения. Процедуру повторяют до выпадения хлопьевидного осадка. Записывают общий объем CaCl_2 (в мл), добавленный в пробирку.

Примечание. Сыворотка для исследования должна быть свежей (хранящейся не более 24 часов от момента взятия), без следов гемолиза.

Клинико-диагностическое значение реакции Вельтмана. Реакция коагуляции с хлористым кальцием (по Вельтману) может изменяться в двух направлениях: в сторону укорочения коагуляционной ленты или ее удлинения (см. схему).

CaCl_2 (мл) 1,0 0,9 0,8 0,7 Сужение (сдвиг влево) Укорочение 	0,6 0,5 0,4 Норма	0,35 0,3 0,2 0,1 Расширение (сдвиг вправо) Удлинение 
Экссудаты, некрозы, опухоли		Фиброзы, повреждения печени, гемолиз

Главные причины, которые ведут к удлинению полосы (коагуляция, наступающая при добавлении менее 0,4 мл CaCl_2), — это фиброзные и пролиферативные процессы, повреждения паренхимы печени и гемолитические состояния. Сдвиг вправо отмечается при болезни Боткина, циррозах, острой желтой атрофии печени, малярии, после переливания крови, аутогемотерапии и при многих воспалительных заболеваниях. Считают, что удлинение коагуляционной полосы обусловлено повышением содержания γ -глобулинов, снижающих стабильность сыворотки.

Укорочение коагуляционной полосы (коагуляция, наступающая при добавлении более 0,6 мл CaCl_2) обнаруживается при острых воспалительных и экссудативных процессах. В этих случаях увеличивается количество α - и β -глобулинов и за счет этого повышается стабильность сыворотки (экссудативная фаза ревматизма, активный процесс туберкулеза легких, нефрозы, макроглобулинемия Вальденштрема, α_2 -, β -плазмоцитомы, злокачественные опухоли, экссудативный перитонит, некрозы, большие потери жидкости, острые инфекционные заболевания). Крайнее укорочение коагуляционной ленты (отрицательная проба) наблюдается при остром ревматизме.

Работа 2. **Определение содержания общего билирубина в сыворотке крови**

Принцип метода. Диазореактив образует с растворимым билирубином азобилирубин, окрашенный в розовый цвет. Интенсивность окраски раствора азобилирубина пропорциональна концентрации билирубина и может быть определена колориметрически. Конъюгированный (прямой) билирубин дает прямую реакцию с диазореактивом. Неконъюгированный (непрямой) билирубин можно перевести в растворимое состояние добавлением к сыворотке крови этилового спирта.

Ход определения. В центрифужную пробирку отмеривают 1 мл сыворотки крови, 2 мл этилового спирта, тщательно перемешивают содержимое стеклянной палочкой и центрифугируют 15 мин при скорости 3000 об/мин. Затем сливают надосадочную жидкость в другую пробирку и добавляют к ней 0,25 мл диазореактива. При этом появляется красно-розовое окрашивание, интенсивность которого определяют через 10 минут, измеряя

оптическую плотность пробы против воды в кювете шириной 5 мм при зеленом светофильтре (500–560 нм). Параллельно колориметрируют стандартный раствор азобилирубина, соответствующий концентрации билирубина 0,4 мг% ($C_{ст}$).

Расчет производят по формуле:

$$C_{оп} (\text{мг}\%) = E_{оп} \cdot C_{ст} / E_{ст}$$

Ответ:

В норме концентрация общего билирубина в плазме (сыворотке) крови составляет 0,5–1,2 мг% (8,55–20,52 мкмоль/л). 75% его количества приходится на долю непрямого билирубина.

Клинико-диагностическое значение исследования пигментного обмена. Один из важных признаков нарушения пигментного обмена — появление желтухи, которое отмечается обычно при уровне билирубина в крови 27–34 мкмоль/л и более. Кровь новорожденных, особенно недоношенных детей, отличается более высоким содержанием билирубина (физиологическая желтуха). Наблюдаемое со 2–3-го до 7–10-го дня жизни увеличение концентрации билирубина, в основном за счет непрямого, связано с функциональной недостаточностью печени, в частности, малой активностью фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы, необходимого для образования прямого билирубина.

Гемолитическая желтуха (надпеченочная) — усиление гемолиза эритроцитов, что приводит к усиленному образованию неконъюгированного билирубина, так как печень не успевает его связывать.

Паренхиматозная желтуха (печеночная) — нарушение функции печеночных клеток. Может быть вызвана также наследственно обусловленными дефектами в процессах транспорта билирубина и образования диглюкуронида билирубина.

Механическая желтуха (обтурационная, подпеченочная) — задержка оттока желчи. Возникает при переполнении желчных путей вследствие закупорки, разрыва их и последующего перехода желчи в кровь.

Тяжесть желтухи обычно соответствует уровню билирубинемии. Принято считать, что желтуха протекает в легкой форме, если содержание билирубина в плазме (сыворотке) не превышает 85 мкмоль/л; уровень его 86–169 мкмоль/л свидетельствует о среднетяжелой, а свыше 170 мкмоль/л — о тяжелой форме желтухи.

Выводы:

Подпись преподавателя:

30. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Гормоны, биохимия печени, биохимия крови»

1. Свойства гормонов. Особенности биологического действия.
2. Рецепторы к гормонам, классификация, строение мембранных рецепторов.
3. G-белки, их роль в механизме действия гормонов, связывающихся с мембранными рецепторами.

4. Перечислить эффекторные системы и вторичные посредники проведения гормонального сигнала в клетку. Механизмы образования вторичных посредников.
5. Роль кальция в механизме передачи гормонального сигнала.
6. Растворимая и мембраносвязанная гуанилатциклазы, механизм активации, реализация эффекта.
7. Механизмы усиления гормонального сигнала в клетке.
8. Гормоны — белки: простые и сложные. Место образования, пример молекулярного действия.
9. Гормоны — производные аминокислот. Место образования, механизмы молекулярного действия.
10. Общие принципы синтеза гормонов белково-пептидной природы.
11. Общие принципы синтеза гормонов стероидной природы.
12. Перечислить гормоны гипоталамуса, химическая природа, регуляция их секреции. Механизм действия.
13. Гормоны задней доли гипофиза, химическая природа, механизм действия. Влияние на метаболизм.
14. Перечислить гормоны передней доли гипофиза. Гормон роста, механизм действия, влияние на метаболизм.
15. Иодсодержащие гормоны щитовидной железы. Химическая природа, особенности синтеза, механизм действия, влияние на метаболизм.
16. Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфора в организме. Место синтеза, химическая природа, механизм действия.
17. Глюкагон. Химическая природа, место синтеза, механизм действия, влияние на метаболизм углеводов и липидов.
18. Гормоны мозгового вещества надпочечников. Химическая природа, схема синтеза, механизм действия.
19. Гормоны коры надпочечников: глюко- и минералокортикоиды. Химическая природа, особенности строения рецепторов, механизм действия, влияние на метаболизм.
20. Половые гормоны, химическая природа, особенности строения рецепторов, механизм действия, метаболический эффект.
21. Инсулин. Химическая природа, особенности синтеза, строение рецепторов, механизмы передачи гормонального сигнала. Влияние на метаболизм углеводов, липидов, белков.
22. Сахарный диабет. Нарушения обмена углеводов, биохимическая диагностика, диагностическое значение гликемических кривых при сахарной нагрузке.
23. Сахарный диабет: механизм кетонемии и нарушение реакций гликозилирования. Метаболизм глюкозы в инсулиннезависимых тканях. Восстановительный путь обмена глюкозы, его роль в норме и при сахарном диабете.
24. Печень как главный орган гомеостаза. Функции печени.
25. Роль печени в обмене углеводов. Механизм гиперлактатемии и гипогликемии при алкогольном токсикозе.
26. Роль печени в обмене белков.
27. Роль печени в обмене липидов. Механизмы развития жировой инфильтрации и дегенерации печени (в том числе при алкоголизме).
28. Антитоксическая функция печени. Обезвреживание в печени токсичных веществ, нормальных метаболитов, лекарственных препаратов.

29. Роль печени в пигментном обмене. Биосинтез гемопroteинов и его регуляция. Распад гемоглобина в клетках РЭС. Метаболизм желчных пигментов. Порфирии.

30. Желтухи. Причины возникновения. Механизмы развития патологических изменений. Лабораторная диагностика.

31. Биохимические методы диагностики заболеваний печени.

32. Гемоглобин (структура, физиологические гемоглобины, производные гемоглобина, аномальные формы).

33. Механизмы транспорта кислорода и углекислого газа кровью. Виды гипоксий и их причины.

34. Буферные системы крови (разновидности, компоненты, механизм действия, емкость).

35. Индикаторные ферменты крови и их диагностическое значение.

36. Белки плазмы крови. Основные белковые фракции: альбумины, глобулины, фибриноген (содержание, функции); альбумино-глобулиновый коэффициент и его диагностическое значение. Биологическая роль и диагностическое значение некоторых белков плазмы крови (гаптоглобин, трансферрин, церулоплазмин, ингибиторы трипсина, С-реактивный белок, интерферон, криоглобулины).

37. Что понимают под гемостазом? Представление о механизмах гемостаза. Три основных структурно-функциональных компонента гемостаза. К каким патологическим состояниям могут привести нарушения в системе гемостаза?

38. Функциональные звенья системы свертывания крови и их биологическая роль.

39. Свертывающая система крови (компоненты и их происхождение). Гемокоагуляция (определение, время свертывания крови, фазы и их продолжительность). Внутренний и внешний механизм гемокоагуляции (схемы), общие этапы и отличия. Активаторы фактора Хагемана. Роль тромбоцитов в гемокоагуляции. Физиологические концентрации фибриногена в крови. Схема превращения фибриногена в фибрин. Молекулярные различия фибрина S и I. Физиологические концентрации кальция в крови и его участие в свертывании крови. Витамин К (химическая природа, разновидности, природные источники, роль в гемокоагуляции, викасол).

40. Антикоагулянтная система. Классификация естественных антикоагулянтов. Наиболее значимые естественные антикоагулянты, механизм их действия. Искусственные антикоагулянты (примеры). Механизм действия диккумарола и гепарина.

41. Фибринолитическая система, механизмы фибринолиза. Плазминовая система (компоненты и их происхождение, механизм действия).

31. Биохимия мочи. Физиологические и патологические компоненты мочи

Актуальность темы

Анализ мочи — обязательная составляющая плана обследования больного. На основании анализа мочи диагностируют заболевания почек — как собственно почечную патологию, так и поражение почек и мочевыводящих путей при заболеваниях других органов. Кроме того, на основании анализа мочи можно

заподозрить или подтвердить наличие заболеваний печени, сердечной мышцы, поджелудочной железы, диагностировать различные виды желтухи, провести дифференциальную диагностику сахарного и несахарного диабета, определить тип некоторых гормональных нарушений и т. д.

Цель занятия

Уметь применять знания о физиологических и патологических компонентах мочи для решения вопросов диагностики, профилактики и прогноза заболеваний, связанных с почечной и внепочечной патологией.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **нормальной физиологии человека:**
 - механизм образования мочи почками;
- **гистологии:**
 - строение нефрона.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Под действием гидростатического давления кровь фильтруется через полупроницаемую мембрану и попадает в пространство капсулы Шумлянско-Боумена — это первичная моча. Каков ее качественный состав?

А. Содержит форменные элементы крови.

Б. Аналогична составу крови, но не содержит белков и форменных элементов.

В. Аналогична составу крови и содержит белки с молекулярной массой до 70 кДа, но отсутствуют форменные элементы.

Г. Состав первичной мочи отличается от состава плазмы крови по всем компонентам.

Задание 2. Каналец нефрона состоит из 3-х отделов: проксимального канальца, петли Генле и дистального канальца. В канальцах первичная моча подвергается реабсорбции. Параллельно осуществляется и секреция определенных веществ. Какое количество глюкозы реабсорбируется в проксимальном канальце здоровой почки?

А. 100% при нормогликемии. Б. 50% при нормогликемии.

В. 100% при содержании глюкозы в крови > 10 ммоль/л.

Задание 3. В дистальном канальце нефрона наряду с процессами, связанными с разведением и концентрированием мочи, осуществляются реабсорбционные и секреторные процессы, главная задача которых — сохранить кислотно-щелочное равновесие организма и, в частности, постоянство рН крови. Какие ионы секретируются канальцами?

А. K^+ . Б. Na^+ . В. H^+ . Г. NH_4^+ . Д. Cl^- . Е. HPO_3^- .

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Нормальные показатели объема мочи, ее плотности, цвета, прозрачности. Факторы, обуславливающие изменения показателя кислотности мочи.
2. Неорганические составные части мочи.

3. Органические составные части мочи в норме: мочеви́на, мочева́я кислота, креатинин, аминокислоты, безазотистые органические компоненты мочи, гормоны и их метаболиты.

4. Диагностическое значение определения в моче аминокислот, которыми богаты специализированные белки: гидроксипролина (в коллагене), 3-метилгистидина (в актине и миозине). Определение метаболитов аминокислот для диагностики фенилкетонурии (нарушение обмена фенилаланина), алкаптонурии (нарушение обмена тирозина), гиперпролинурии (нарушение окисления пролина), цитруллинурии (нарушение синтеза мочевины).

5. Диагностическое значение определения патологических составных частей мочи:

- а) протеинурия почечная и внепочечная; ферменты, определяемые в моче с диагностической целью;
- б) глюкозурия при сахарном диабете и почечная глюкозурия;
- в) гематурия почечная и внепочечная, гемоглобинурия;
- г) кетонурия при голодании, диабете, ацидозах иного происхождения;
- д) желчные пигменты, определяемые с целью дифференциальной диагностики желтух, порфирины.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 473–486.

Дополнительная литература

1. Чиркин А. А. Диагностический справочник терапевта / А. А. Чиркин, А. Н. Огороков, И. И. Гончарик. Мн. : Беларусь, 1993. С. 369–390.

2. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В. С. Камышников. Мн. : Беларусь, 2000. С. 171–208, 275–347, 358–428.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Чтобы заподозрить у больного сахарный диабет, обратите внимание на объем выделяемой мочи и ее удельный вес. При диабете, несмотря на большую суточную экскрецию мочи, ее удельный вес остается высоким. Для уточнения диагноза необходимо определить содержание сахара в моче и сравнить эти данные с результатами определения уровня гликемии.

1.1. Решите задачу. Подберите пару симптомов, характерных для диабета:

- А. D мочи = 1,02. 1. Суточный диурез 6 л.
- Б. D мочи = 1,022. 2. Суточный диурез 2 л.
- В. D мочи = 1,20. 3. Суточный диурез 1 л.
- Г. D мочи = 1,5. 4. Суточный диурез 20 л.

1.2. Решите задачу. Подберите пару симптомов, характерных для диабета:

- А. Глюкозурия — нет. 1. Гликемия 5,5 ммоль/л.
- Б. Глюкозурия — 1%. 2. Гликемия 15,0 ммоль/л.
- В. Глюкозурия — следы. 3. Гликемия 8,0 ммоль/л.

Задание 2. Для дифференциальной диагностики различного рода желтух изучают цвет мочи и определяют в ней наличие желчных пигментов. Необходимо вспомнить, каким образом осуществляется распад желчных пигментов, содержание каких соединений увеличивается в крови и моче, каким образом изменяется цвет стула. Следует помнить, что через почечный фильтр способен проникать связанный

билирубин (в отличие от свободного билирубина, не способного преодолевать почечный «фильтр», молекула диглюкуронида билирубина мала).

2.1. Решите задачу. Подберите параметры анализа мочи, характерные для механической желтухи:

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| А. Моча «цвета пива». | 1. Билирубин. |
| Б. Моча соломенно-желтая. | 2. Уробилин (истинный). |
| В. Моча красного цвета. | 3. Стеркобилиноген. |
| Г. Светло-желтая моча. | 4. Урохром. |

Задание 3. Диагностика панкреатита во многом основывается на определении активности ферментов мочи. Вспомните, какие ферменты, способные перейти в мочу, секретирует поджелудочная железа. Назовите фермент, активность которого обязательно определяется в моче при панкреатите:

- А. Фосфоорилаза. Б. Амилаза. В. Лактатдегидрогеназа. Г. Пепсин. Д. Сахараза.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. В клинику поступил больной с жалобами на обильное и частое мочеиспускание, жажду, которые его беспокоят даже ночью. Суточное количество мочи = 10 л с низкой относительной плотностью. Каков предположительный диагноз?

- А. Сахарный диабет. Б. Несахарный диабет. В. Болезнь Иценко-Кушинга.
Г. Болезнь Аддисона. Д. Микседема.

Задание 2. У больного острым гломерулонефритом суточное количество мочи = 500 мл. Как называется этот симптом?

- А. Анурия. Б. Полиурия. В. Олигурия. Г. Никтурия. Д. Изостенурия.

Задание 3. У больного острым гломерулонефритом выявлена макрогематурия. Какой цвет мочи у данного больного?

- А. Красный. Б. Коричневый. В. Черный. Г. Розовый. Д. Цвета мясных помоев.

Задание 4. У больного в результате отравления солями свинца в моче появилось много протопорфиринов. Какой цвет мочи у данного больного?

- А. Зеленый. Б. Коричневый. В. Черный. Г. Розовый. Д. Цвета мясных помоев.

Задание 5. У больного инфекционным гепатитом с желтухой в моче выявлено высокое содержание билирубина. Какой цвет мочи у данного больного?

- А. Соломенно-желтый. Б. Коричневый. В. Черный.
Г. Розовый. Д. Цвета мясных помоев.

Задание 6. У больного хроническим нефритом выявлено нарушение концентрационной функции почек. Как называется это состояние?

- А. Никтурия. Б. Изостенурия. В. Олигурия. Г. Анурия. Д. Полиурия.

Задание 7. У больного в моче содержание мочевой кислоты составило 9,5 ммоль/24 ч. Какую патологию можно заподозрить?

А. Кахексия. Б. Оротатацидурия. В. Почечная недостаточность.
Г. Печеночная недостаточность. Д. Подагра.

Задание 8. Больному, страдающему хроническим гепатитом, была проведена нагрузка бензоатом натрия. При этом об обезвреживающей функции печени судили на основании обнаружения в моче:

А. Бензойной кислоты. Б. Лимонной кислоты. В. Валериановой кислоты.
Г. Гиппуровой кислоты. Д. Щавелевой кислоты.

Задание 9. Содержание какого из продуктов белкового обмена повысилось в моче у спортсмена с развитой мускулатурой после спортивных соревнований?

А. Мочевой кислоты. Б. Креатина. В. Креатинина. Г. Мочевины. Д. Аммиака.

Задание 10. Для уточнения диагноза «прогрессирующая мышечная дистрофия» у больного был сделан анализ мочи. Какое соединение при этом будет обнаруживаться в моче?

А. Порфирины. Б. Креатин. В. Креатинин. Г. Миоглобин. Д. Кальмодулин.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – В; 2 – А; 3 – А, В, Г.

Для самостоятельной работы:

1.1 — Г–1. 1.2 — Б–2.

2.1 — А–1.

3 — Б.

Самостоятельная работа (2 часа)

Инструкции к практическому занятию

Работа 1. *Определение удельного веса мочи*

Поскольку отдельные порции мочи отличаются по удельному весу и химическому составу, удельный вес определяют в моче, собранной за сутки. В норме удельный вес мочи коррелирует с количеством «суточной» мочи и составляет 1,010–1,025. При различных состояниях он может колебаться от 1,000 до 1,060.

Ход работы. В цилиндр наливают мочу и осторожно погружают в нее урометр. Отсчет ведется по делению шкалы урометра, соответствующему нижнему мениску жидкости.

Работа 2. *Определение кислотности мочи*

В норме реакция мочи слабо кислая.

Ход работы. На лакмусовую бумажку наносят каплю мочи и определяют ее реакцию:

- 1) синяя лакмусовая бумага краснеет, красная не изменяет цвета — кислая реакция;
- 2) красная бумага синеет, синяя не изменяет цвета — щелочная реакция;
- 3) обе бумаги не изменяют своего цвета — нейтральная реакция.

Можно использовать и другие индикаторные бумаги.

Работа 3. *Качественное определение неорганических составных частей мочи*

Из минеральных солей более всего с мочой выделяется хлористого натрия — 8–15 г/сутки.

1. Определение хлоридов. Ионы хлора реагируют с азотнокислым серебром с образованием осадка хлористого серебра, не растворяющегося в азотной кислоте.

Ход работы. К 1 мл мочи (20 капель) добавляют 3–5 капель 1% раствора AgNO_3 и 2 капли 10% раствора азотной кислоты. Выпадает белый осадок AgCl , темнеющий на свету, нерастворимый в азотной кислоте.

2. Определение сульфатов. В кислой среде сульфаты с хлористым барием образуют белый осадок BaSO_4 .

Ход работы. К 20 каплям мочи приливают 5 капель 10% раствора HCl и по каплям, медленно, добавляют раствор BaCl_2 до образования осадка. Выпавший осадок отфильтровывают. В фильтрате обнаруживают соли эфиросерных кислот, нагревая фильтрат в кипящей водяной бане (5–10 мин). При этом снова появляется муть из-за того, что из эфиросерных кислот освобождается серная кислота.

3. Определение фосфатов. Фосфаты мочи при реакции с молибденовым реактивом образуют желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

Ход работы. В пробирку наливают 20–30 капель молибденового реактива и нагревают раствор до закипания (не кипятить). Затем добавляют несколько капель мочи. Выпадает желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

4. Определение кальция. Кальций мочи выпадает в осадок при добавлении щавелевокислого аммония.

Ход работы. К 20 каплям мочи приливают 1–2 капли 10% раствора уксусной кислоты и 2–3 капли 5% раствора щавелевокислого аммония. Выпадает кристаллический осадок щавелевокислого кальция.

Работа 4. *Качественное определение органических составных частей мочи*

1. *Определение белка.* В норме в моче определяются следы белка.

1.1. Проба Геллера. Под действием азотной кислоты белок образует нерастворимый осадок.

Ход работы. В пробирку осторожно наливают около 1 мл концентрированной HNO_3 и сверху настилают 1 мл мочи. При наличии в моче белка на границе жидкостей появляется мутное беловатое кольцо.

1.2. Осаждение белка сульфосалициловой кислотой. Эта проба является самой чувствительной реакцией на белок.

Ход работы. К 20 каплям мочи добавляют 5 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка (помутнение раствора).

2. *Определение глюкозы.* В норме с мочой выделяется небольшое количество глюкозы. Для качественного определения глюкозы в моче пользуются следующими реакциями:

2.1. Реакция Троммера. В щелочной среде в присутствии глюкозы при добавлении CuSO_4 образуется желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

Ход работы. К 5 каплям исследуемой мочи прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натрия и 5 капель 1% раствора сернокислой меди. Нагревают.

2.2. Реакция Фелинга. Проба основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Преимущество этой реакции заключается в том, что сегнетова соль в составе реактива Фелинга связывает избыток гидрата окиси меди, из которого при нагревании образуется окись меди черного цвета, мешающая реакции.

Ход работы. К 20 каплям исследуемой мочи приливают равный объем жидкости Фелинга и нагревают до кипения.

2.3. Реакция Ниландера. В реактив Ниландера входит азотнокислый висмут. В щелочной среде образуется гидрат окиси висмута, который, восстанавливаясь в присутствии глюкозы до металлического висмута, окрашивает жидкость в черный цвет.

Ход работы. К 20 каплям исследуемой мочи приливают 10–20 капель реактива Ниландера и кипятят 1–2 мин. Жидкость бурет, затем образуется черный осадок металлического висмута.

3. *Определение кровяных пигментов.* В норме в моче кровяных пигментов нет.

Гваяковая проба. Гваяковая смола в присутствии пероксида водорода под влиянием пероксидазы крови восстанавливается в азонид гваяковой смолы, имеющий синий цвет.

Ход работы. В пробирку наливают 20 капель мочи, 5 капель гваяковой смолы и несколько капель H_2O_2 . В присутствии крови появляется синее окрашивание.

4. *Определение кетоновых тел.* Кетоновые тела обнаруживаются в моче при диабете, голодании и других ацидотических состояниях. Метод основан на цветной реакции, которую дают кетоновые тела с нитропруссидом натрия.

Ход работы. К 2 каплям мочи добавляют 2 капли 10% NaOH и 2 капли нитропрусида натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 6 капель концентрированной уксусной кислоты — появляется вишневое окрашивание.

Работа 5. *Количественное определение органических составных частей мочи*

5.1. Определение содержания глюкозы в моче глюкозооксидазным методом. В норме сахар в моче присутствует в следовых количествах и обычными методами не определяется.

Принцип метода. Метод основан на специфическом окислении глюкозы под влиянием глюкозооксидазы, обладающей высокой субстратной специфичностью по отношению к D-глюкозе. Глюкоза в присутствии глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха с образованием перекиси водорода, которая окисляет ортотолуидин, превращая его в окрашенное соединение. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации глюкозы в растворе.

Ход работы. Параллельно ставят две пробы: опытную и стандартную.

В две пробирки вносят по 1,1 мл 0,9% раствора NaCl. В одну пробирку добавляют 0,1 мл мочи (опытная проба), в другую — 0,1 мл стандартного раствора глюкозы (стандартная проба). Далее в обе пробирки приливают по 0,8 мл дистиллированной воды.

Из опытной и стандартной проб отбирают по 1 мл в две сухие пробирки и приливают в каждую по 2,5 мл рабочего раствора ферментов. Осторожно все перемешивают. В ходе реакции интенсивность голубовато-синей окраски постепенно возрастает. Через 20–23 минуты измеряют экстинкции растворов на ФЭК с красным светофильтром (длина волны 630 нм) в кювете шириной 5 мм против контроля (контроль: к 2 мл дистиллированной воды добавляют 2,5 мл рабочего раствора ферментов; контрольную пробу можно готовить одну на группу).

Расчет производят по формуле:

$$C_{\text{оп}} = E_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}} / E_{\text{ст}},$$

где $C_{\text{оп}}$ — концентрация глюкозы в моче (мг%); $C_{\text{ст}}$ — концентрация глюкозы в стандартном растворе (100 мг%); $E_{\text{оп}}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{\text{ст}}$ — экстинкция стандартной пробы. Коэффициент пересчета в систему СИ (ммоль/л) — 0,0555.

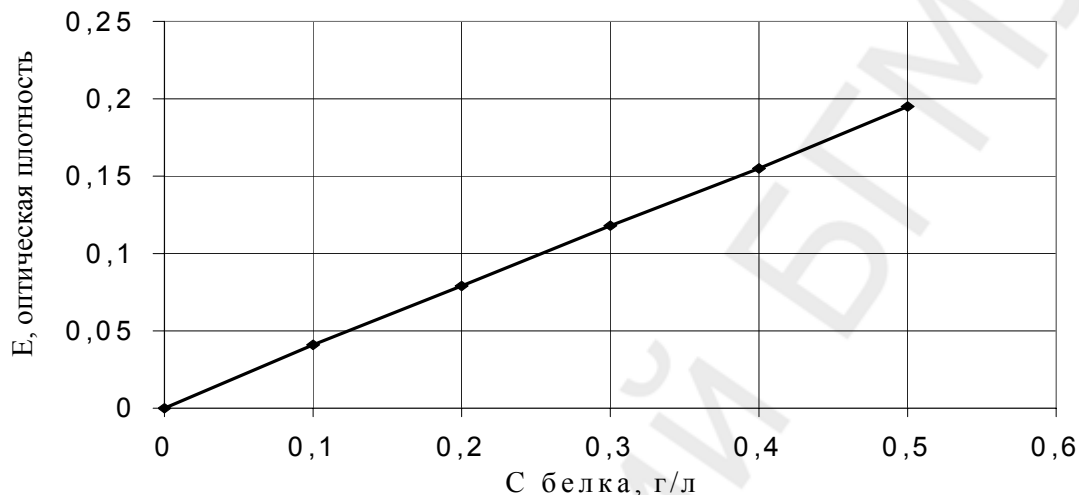
Проводят расчет суточного выделения глюкозы с мочой (с учетом диуреза 1200–1500 мл).

5.2. Определение концентрации белка в моче

Принцип метода. Метод основан на способности сульфосалициловой кислоты реагировать с белком, вызывая помутнение, интенсивность которого пропорциональна содержанию белка в моче.

Ход определения. К 1 мл прозрачной мочи добавляют 3 мл 3% раствора сульфосалициловой кислоты, смесь перемешивают и через 5 мин измеряют оптическую плотность содержимого пробирки на ФЭК при красном светофильтре (длина волны 630–650 нм) в кювете шириной 10 мм против контрольной пробы (контрольная проба: к 1 мл мочи добавляют 3 мл изотонического раствора NaCl). Расчет производят по калибровочному графику. Расчет суточных потерь белка проводят с учетом диуреза (1200–1500 мл).

Калибровочный график для определения содержания общего белка в моче



Ответ:

Содержание глюкозы в моче (ммоль/сут)	
Содержание белка в моче (г/сут)	

Клинико-диагностическое значение определения содержания белка в моче. В моче в норме содержатся «следы белка» (альбумин и глобулины, не более 0,15 г/сут). Повышенное содержание белка в моче — **протеинурия** — отражает нарушение баланса между процессами его фильтрации и реабсорбции и отмечается при заболеваниях почек, мочевыводящих путей, усиленном распаде белков тканей. Функциональные почечные протеинурии связаны с увеличением проницаемости почечного фильтра либо замедлением тока крови в клубочках (под влиянием переохлаждения, физического и психического перенапряжения).

Выводы:

Подпись преподавателя:

32. Биохимия питания. Роль белков, жиров, углеводов, витаминов.

Актуальность темы

Использование пищи живыми организмами обозначается термином «питание». Различают три важнейших категории или составных компонента пищи:

- 1) питательные вещества — источники энергии и пластического материала (белки, жиры, углеводы);
- 2) микрокомпоненты пищи (витамины и минеральные соединения, необходимые для биохимических процессов);
- 3) волокнистые структуры (неперевариваемые полисахариды, необходимые для нормального функционирования пищеварительной системы).

Осуществление теми или иными компонентами пищи, в том числе незаменимыми факторами питания, своих функций в организме происходит через биохимические превращения. Понимание того, каким образом различные компоненты пищи вовлекаются в них, поможет осмыслить необходимость и суть сбалансированного питания, своевременно распознавать и активно действовать при столь распространенном в клинической практике состоянии недостаточного питания. Дефицит любого витамина ведет к появлению специфических нарушений реакций обмена с характерными клиническими проявлениями. Знание коферментных функций витаминов в организме позволяет понять механизмы развития и профилактики гипо- и авитаминозов и использовать витамины с профилактической и лечебной целью.

Цель занятия

Закрепить знания по химической структуре и молекулярным механизмам биологического действия коферментных форм витаминов, вовлечению в метаболизм других незаменимых факторов питания. Сформировать представление о биохимических механизмах использования компонентов пищи для поддержания нормальной жизнедеятельности организма, о патологических состояниях недостаточного питания. Познакомить студентов с методами обнаружения витаминов и количественного их определения в продуктах питания.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– *биоорганической химии:*

▪ строение и свойства гетероциклических соединений — пурина, пиримидина, тиазола, пиррола, порфирина, парааминобензойной кислоты, никотиновой кислоты, пиридина;

▪ биологически активные гетерофункциональные соединения бензольного и гетероциклического рядов, метаболиты и биорегуляторы;

– *биохимии:*

▪ коферменты и их роль в процессах метаболизма;

▪ коферментные формы водорастворимых витаминов и их участие в метаболизме;

▪ пути катаболизма белков, жиров, углеводов в клетках.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Какое из нижеследующих выражений относительно панкреатических ферментов правильное?

А. Все они секретируются в виде неактивных проферментов.

Б. Все они секретируются ацинарными клетками.

В. Все они секретируются в ответ на холецистокинин.

Г. Для оптимальной активности им требуется рН около 7.

Д. Они важны только для переваривания белков.

Задание 2. Какое из нижеследующих выражений правильное?

А. Действие адреналина и глюкагона направлено на увеличение уровня гликогенфосфорилазы.

Б. Интенсивность расщепления гликогена в состоянии натощак равна интенсивности его синтеза.

В. Дефосфорилирование гликогенсинтетазы в ответ на действие инсулина приводит к увеличению её активности.

Г. цАМФ — это вторичный посредник, который образуется в ответ на действие адреналина и глюкагона в печени.

Д. Фосфорилирование гликогенфосфорилазы в ответ на действие глюкагона увеличивает её активность.

Задание 3. Какова функция гормон-чувствительной липазы в жировой ткани?

А. Гидролизует гормон, который участвует в расщеплении жира.

Б. Синтезирует новые жировые клетки из простых жирных кислот.

В. Гидролизует триацилглицеролы с образованием жирных кислот для других клеток.

Д. Синтезирует длинноцепочечные жирные кислоты для синтеза липидов в других клетках.

Задание 4. Какую роль играет генетический фактор в перспективе достижения определенного веса тела? Что такое ген Ob и какую роль ему отводят в развитии ожирения у человека? Какие аргументы можно привести в пользу того, что этот ген связан с контролем веса?

Задание 5. Лабораторный анализ после гидролиза вещества выявил в гидролизате аденин, рибозу и фосфорную кислоту. Какова структура исходного вещества?

А. Пептид. Б. Нуклеозид. В. Мононуклеотид. Г. Пентозофосфат. Д. Олигосахарид.

Задание 6. Вспомните, что витамины принимают участие в процессах метаболизма после их активации в клетках, т. е. превращения в коферментную форму.

6.1. Объясните, чем руководствовался врач, заменив больному нейродермитом пиридоксин на пиридоксальфосфат.

6.2. Подберите соответствующие пары витамин — кофермент:

А. НАД⁺. 1. Производное пиридоксина.

Б. ТПФ. 2. Производное рибофлавина.

В. HS-КоА. 3. Производное тиамина.

Г. ФАД. 4. Производное никотиновой кислоты.

Д. ПФ. 5. Производное пантотеновой кислоты.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Пищевая ценность белков, жиров, углеводов. Роль волокнистых полисахаридов для работы пищеварительного тракта и обменных процессов в организме. Незаменимые факторы питания.

2. Энергия — потребность, происхождение и расходование в организме.

3. Синдром недостаточного питания.

4. Химическая природа, коферментные формы, молекулярные механизмы действия витаминов группы В: а) тиамин (В₁); б) рибофлавин (В₂); в) пантотеновой кислоты; г) ниацин; д) пиридоксин (В₆); е) фолиевой кислоты (В₉); ж) кобаламина (В₁₂).

5. Биотин (витамин Н), витамин С. Структура, роль в процессах метаболизма.

6. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (вит. Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота и др.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 147–164.

2. Конспект лекций.

Дополнительная литература

3. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.

4. Морозкина Т. С. Витамины: краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармакологических и биологических специальностей / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. Мн. : Асар, 2002.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Запомните суточную потребность человека в витаминах, существенное снижение которой неизбежно приводит к нарушению биохимических процессов и развитию заболеваний. Умейте назвать признаки гиповитаминозов.

1.1. Решите задачу. Как было установлено, синдром Вернике-Корсакова, проявляющийся нарушением тонуса мышц конечностей, снижением умственной способности и дезориентацией, связан с нарушением прочной связи апофермента и кофермента в ферменте транскетолазе. Симптомы этого синдрома могут проявляться у алкоголиков вследствие снижения поступления в организм витамина. Назовите этот витамин и его коферментные формы. С какими ферментами кроме транскетолазы работает этот витамин?

Задание 2. Уясните энергозатраты организма взрослого человека в состоянии покоя и лабильность этого показателя в условиях патологии. Умейте объяснить, куда используется АТФ в состоянии покоя. Запомните реальный и желательный вклад в энергопродукцию белков, жиров и углеводов.

2.1. Ответьте на вопросы. Как поступает организм с образовавшимся избытком аминокислот, когда Вы потребляете с пищей или в виде пищевых добавок большее их количество, чем требуется для синтеза новых белков? Отличаются ли механизмы использования избытка аминокислот от механизмов использования избытка углеводов или липидов? Укажите эти различия.

2.2. Выберите правильный ответ. Источниками энергии для организма человека в состоянии покоя являются:

А. Реально — углеводы 60%. Б. Желательно — алкоголь 3%.

В. Реально — белок 15%. Г. Желательно — жир 40%. Д. Реально — алкоголь 0%.

Задание 3. Запомните, что синдром недостаточного питания проявляется в двух клинических формах: квашиоркоре и маразме. Умейте указать сходство и принципиальные различия между ними.

3.1. Решите задачу. У больного после операции резекции тощей кишки, которая была произведена для удаления опухоли, в течение нескольких недель развилась гипоальбуминемия и отечность тканей. При осмотре больной не выглядел истощенным, но была заметна бледность кожных покровов. Какую патологию позволяют заподозрить врачу

эти симптомы? Какой подход можно было бы предложить для преодоления этого состояния у пациента?

Задание 4. Запомните, что наряду с незаменимыми факторами питания имеются условно незаменимые, которые не ограничиваются только аминокислотами аргинином и гистидином; они могут стать незаменимыми при определенных состояниях организма. Умейте объяснить, почему при выборе пищевых источников незаменимых жирных кислот необходимо различать омега-3 и омега-6 кислоты. Обратите внимание на преимущества и недостатки неперевариваемых полисахаридов в составе пищи.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Данные врачебного осмотра пожилой женщины соответствовали периферической нейропатии. Лабораторные анализы подтвердили недостаточность тиамина. Активность каких процессов снижена при данном гиповитаминозе?

- А. Трансаминирование аминокислот.**
- Б. Декарбоксилирование аминокислот.
- В. Окислительное декарбоксилирование α -кетокислот.
- Г. Трансметилование аминокислот.
- Д. Окислительное дезаминирование аминокислот.

Задание 2. У больного после перенесенного инфаркта в течение двух суток значительно увеличилась активность аспаратаминотрансферазы в крови. Указать кофермент данного фермента и тип катализируемой им реакции. Производным какого витамина является этот кофермент?

Задание 3. При недостатке фолиевой кислоты страдает прежде всего кроветворение и деятельность желудочно-кишечного тракта. Какие соединения входят в состав B_9 ? В реакциях какого типа участвует коферментная форма (назвать ее) этого витамина?

Задание 4. Гиповитаминоз пантотеновой кислоты практически не встречается, т. к. она обнаружена повсеместно: в тканях животных, растений, микроорганизмов. Указать кофермент данного витамина, назвать тип реакций, в которых он участвует. Изобразить схематически строение коферментной формы пантотеновой кислоты.

Задание 5. У мужчины, в течение многих лет злоупотреблявшего алкоголем, появились воспаления слизистой оболочки языка, губ, помутнение хрусталика, общая мышечная слабость. В анализе крови установлено значительное снижение активности глутатион-редуктазы эритроцитов. Активность фермента выросла после добавления в пробу рибофлавина. Какой кофермент входит в состав глутатион-редуктазы эритроцитов?

- А. ТПФ.**
- Б. ФАД.**
- В. НАД⁺.**
- Г. ТГФК.**
- Д. ПФ.**

Задание 6. Больному сделана операция резекции желудка, после чего вследствие недостаточности витамина B_{12} у него развилась анемия. Назовите коферментные формы этого витамина. В каких реакциях они принимают участие?

Задание 7. К врачу обратился пациент с жалобами на воспалительные процессы кожи (дерматит), сопровождающиеся усиленной деятельностью сальных желез, выпадением волос — типичными признаками недостаточности витамина Н. Объясните, какие реакции обмена нарушаются при этом.

Задание 8. Какие из нижеперечисленных продуктов питания содержат много эйкозопентаеновой и докозагексаеновой кислот?

А. Креветки. Б. Семга. В. Грудное молоко человека. Г. Соевое масло.

Задание 9. Каким образом растворимые волокна в составе принимаемой пищи помогают снизить уровень холестерина в крови? Выберите правильный ответ.

А. Они денатурируют холестерин в желудке.

Б. Они гидролизуют холестерин в кишечнике.

В. Они задерживают холестерин в кишечнике и таким образом замедляют его всасывание.

Г. Они усиливают экскрецию желчи, ускоряя обмен холестерина.

Задание 10. Какой источник энергии обеспечивает 90% глюкозы, необходимой в качестве топлива в течение первых нескольких дней голодания?

А. Белок. Б. Кетоновые тела. В. Гликоген. Г. Триацилглицеролы.

Задание 11. Чем обусловлено преимущественное запасание жира на бедрах у женщин и вокруг живота — у мужчин?

А. Различием уровня инсулина в крови.

Б. Разницей в активности липопротеинлипазы.

В. Разницей уровня циркуляции липидтранспортных белков.

Г. Разницей активности липопротеинсинтетазы.

Эталонные ответы к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – А, В, Г. 2 – В, Г, Д. 3 – В. 5 – В. 6.2 — А – 4, Б – 3, В – 5, Г – 2, Д – 1.

Для самостоятельной работы

1.1 – В₁, его коферментные формы ТМФ, ТДФ (ТПФ), ТТФ.

2.2 – В.

3.1 – Квасиоркор.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Для обнаружения витаминов и определения их количества в различных веществах и биологических жидкостях существуют реакции, основанные на цветных реакциях, характерных для той или иной группировки, входящей в витамин.

Работа 1. **Качественные реакции на витамин В₁**

Витамин В₁ состоит из пиримидинового и тиазолового колец. Витамин В₁ получил название тиамин поскольку содержит серу и азот.

1. Реакция окисления

Принцип метода. В щелочной среде тиамин окисляется в тиохром феррицианидом калия. Тиохром обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора на флюороскопе.

Ход работы. К 1 капле 5% раствора тиамин прибавляют 5–10 капель 10% раствора едкого натра, 1–2 капли 5% раствора феррицианида калия и взбалтывают смесь. После прогревания флюороскопа наблюдают синюю флюоресценцию при облучении раствора ультрафиолетовыми лучами.

2. Диазореакция

Принцип метода. В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

Ход работы. К диазореактиву, содержащему 5 капель 1% раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5% раствора нитрата натрия, добавляют 1–2 капли 5% раствора тиамина и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5–7 капель 10% раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Работа 2. **Качественная реакция на витамин В₂**

Принцип метода. Окисленная форма витамина В₂ представляет собой желтое флюоресцирующее в ультрафиолетовых лучах вещество. Реакция на витамин В₂ основана на его способности легко восстанавливаться. При этом раствор витамина В₂, обладающий желтой окраской, приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, т. к. восстановленная форма витамина В₂ бесцветна.

Ход работы. В пробирку наливают 10 капель раствора витамина В₂, добавляют 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и опускают зернышко металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается. Сравнивают обе формы витамина В₂ по флюоресценции.

Работа 3. **Качественная реакция на витамин РР**

Принцип метода. Витамин РР при нагревании с раствором ацетата меди образует плохо растворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Ход работы. Наливают в пробирку 20 капель 3% раствора витамина РР (перед определением раствор обязательно следует взболтать) и нагревают до кипения; при этом мутный раствор становится прозрачным. Взболтав 5% раствор ацетата меди, приливают 20 капель его к нагретому раствору витамина РР. Содержимое пробирки доводят до кипения и сразу охлаждают под струей холодной воды. На дне пробирки выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Работа 4. **Качественная реакция на витамин В₆**

Принцип метода. Витамин В₆ при взаимодействии с раствором хлорного железа образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора витамина В₆ приливают равное количество 1% раствора хлорного железа и перемешивают. Развивается красное окрашивание.

Работа 5. **Качественная реакция на витамин В₁₂**

В₁₂ — единственный витамин, содержащий в своей структуре металл (кобальт).

Принцип метода. При взаимодействии ионов кобальта с тиомочевинной при нагревании образуется роданид кобальта зеленого цвета.

Ход работы. На бумажный фильтр наносят 2–3 капли раствора тиомочевины и высушивают над пламенем спиртовки. После этого наносят на фильтр 1–2 капли минерализата (В₁₂) и снова нагревают фильтр над спиртовкой. На фильтре, чаще по краю, появляется зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

Результаты опытов записывают в таблицу:

№	Название опыта	Наблюдаемые изменения	Выводы

№	Название опыта	Наблюдаемые изменения	Выводы

Работа 6. Количественное определение витамина С

Принцип метода. Метод основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, а при восстановлении обесцвечивается; в щелочной среде окраска синяя. Для предохранения витамина С от разрушения исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления розового окрашивания.

Определение содержания витамина С в картофеле

Ход работы. Отвешивают 1 г картофеля и растирают его в ступке с 2 мл 10% раствора соляной кислоты (чтобы картофель не темнел), постепенно приливая 8 мл дистиллированной воды. Полученный гомогенат фильтруют через марлю в стаканчик, и фильтрат титруют 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 с.

Для расчета содержания аскорбиновой кислоты в таких продуктах, как капуста, картофель, хвоя, шиповник и др., используют формулу:

$$X = (0,088 \cdot A \cdot 100) / B,$$

где x — содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах на 100 г продукта; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, мг, соответствующее 1 мл 2,6-дихлорфенолиндофенола; A — результат титрования 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл; B — количество продукта, взятое для анализа, г; 100 — пересчет на 100 г продукта.

В 100 г картофеля обычно содержится 1–5 мг витамина С.

Ответ:

Определение содержания витамина С в моче

Определение содержания витамина С в моче дает представление о запасах этого витамина в организме, так как имеется соответствие между концентрацией витамина в крови и количеством этого витамина, выделяемым с мочой. Однако при гиповитаминозе С содержание аскорбиновой кислоты в моче не всегда понижено. Часто оно бывает нормальным, несмотря на большой недостаток этого витамина в тканях и органах.

У здоровых людей введение *per os* 100 мг витамина С быстро приводит к повышению его концентрации в крови и в моче. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, задерживают принятый витамин С и его концентрация в моче не повышается. Моча здорового человека содержит 20–30 мг/сутки витамина С или 113,55–170,33 мкмоль/сут. У

детей уровень этого витамина понижается при цинге, а также при острых и хронических инфекционных заболеваниях.

Ход работы. В стаканчик или колбочку отмеривают 10 мл мочи и 10 мл дистиллированной воды, перемешивают, подкисляют 20 каплями 10% раствора хлористоводородной кислоты и титруют 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Для расчета содержания аскорбиновой кислоты в моче используют формулу:

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B},$$

где x — содержание аскорбиновой кислоты в мг/сут; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты (мг) соответствующее 1 мл 2,6-дихлорфенолиндофенола; A — результат титрования 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл; B — объем мочи, взятый для титрования, мл; B — среднее суточное количество мочи (для мужчин 1500 мл, для женщин 1200 мл).

Ответ:

Выводы:

Подпись преподавателя:

33. Биохимия питания. Минеральные вещества.

Регуляция водно-электролитного баланса.

Интеграция метаболизма.

Актуальность темы

Изменение состава минеральных веществ и нарушение распределения электролитов и жидкости в организме являются причиной многих серьезных нарушений, коррекцией которых чаще всего приходится заниматься реаниматологам. Способность организма животных к поддержанию постоянства состава внутренней среды организма осуществляется за счет интеграции метаболических путей и является одним из наиболее существенных достижений эволюции. Изменение интегративных связей нарушает сбалансированную продукцию энергии, пластического материала и служит основой развития заболеваний.

Цель занятия

Понять принципы и механизмы взаимодействия различных метаболических путей для обеспечения жизнедеятельности и адаптации. Закрепить знания электролитного состава жидкостей организма, роли микро- и макроэлементов в клетках и внеклеточной жидкости для последующего использования их во врачебной деятельности.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– *нормальной физиологии человека:*

- распределение воды в организме. Аквапорины;
- состав интерстициальной (межклеточной) и клеточной жидкостей организма;
- механизм действия Na^+/K^+ - АТФазы;

– *общей химии:*

▪ понятия «осмотическое давление», «осмоляльность», «гипотоническое и гипертоническое изменение объема», «рН», «буферные системы»;

– **биоорганической химии:**

▪ кетоновые тела, альбумины, глобулины;

– **биологической химии:**

▪ гормоны, ферменты, регуляцию активности ферментов, метаболические пути обмена углеводов, липидов и белков, занятие 8 настоящего руководства.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. В обычных условиях неизбежная суточная потеря воды взрослым человеком составляет около 2500 мл. Сколько воды теряется:

а) с выдыхаемым воздухом; б) с мочой; в) через кожу в виде пота?

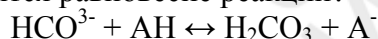
Задание 2. Что произойдет при помещении эритроцитов в гипотоническую среду?

А. Они не изменятся.

Б. Наступит их сморщивание.

В. Произойдет гемолиз.

Задание 3. Кетоновые тела (АН) являются более сильными кислотами, чем угольная кислота. В какую сторону сместится равновесие реакции?



Задание 4. У больного появились отёки. Каковы возможные причины?

А. Нарушение белоксинтезирующей функции печени.

Б. Стужение крови.

В. Протеинурия.

Г. Недостаток вазопрессина.

Задание 5. Назовите метаболит гликолиза, используемый для синтеза глицерола:

А. Фосфодиоксиацетон.

Б. Ацетил-КоА.

В. Пировиноградная кислота.

Г. Щавелевоуксусная кислота.

Д. β-Гидроксимасляная кислота.

Задание 6. Для образования глюкозы во время голодания клетки печени используют:

А. Жирные кислоты.

Б. Аминокислоты.

В. Ацетоацетат.

Г. β-Гидроксibuтират.

Д. Ацетил-КоА.

Задание 7. Что(1,2,3,4) из чего(А,В,С,Д) может синтезироваться? Подберите соответствующие пары:

1	Аминокислоты заменимые	А	Аминокислоты заменимые
2	Аминокислоты незаменимые	В	Аминокислоты незаменимые
3	Глюкоза	С	Глюкоза
4	Жирные кислоты	Д	Жирные кислоты

Задание 8. Молекулой, непосредственно связанной с инициацией развития атеросклеротической бляшки, является:

А. Фактор некроза опухолей.

- Б. Тромбоксан А₂.
- В. Простациклин.
- Г. Тромбоцитарный фактор роста.
- Д. Окисленный холестерол.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Натрий, калий, кальций, фосфор. Роль в метаболизме, гормональная регуляция их обмена.
2. Роль железа в организме (всасывание, транспорт, внутриклеточный обмен). Железодефицитные состояния и железодефицитные анемии.
3. Роль меди, цинка, селена, йода и фтора в метаболизме тканей.
4. Механизм действия гормонов, регулирующих водно-минеральный обмен (адреногломерулотропина, вазопрессина, натрий-уретического гормона, альдостерона).
5. Ренин-ангиотензиновая система и её роль в регуляции водно-солевого обмена.
6. Необходимость интеграции метаболизма, ее принципиальные составляющие или уровни обеспечения. Механизмы регуляции метаболизма.
7. Особенности метаболизма в печени в состоянии после приема пищи и натошак.
8. Межорганый метаболизм в динамике голодания.

Литература для подготовки

Основная литература

1. Берёзов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия / Т. Т. Берёзов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 473–486, 449–452.
2. Николаев А. Я. Биологическая химия / А.Я. Николаев. М. : Высшая школа, 1989. С. 358–367.
3. Конспект лекций.

Дополнительная литература

1. Уайт А., Хендлер Ф. Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер. М. : Мир, 1981. Т. 3. С. 1307–1314.
2. Николаев А.Я. Биологическая химия /А.Я.Николаев, М: Медицинское информационное агенство, 2004. С.399-411.

Задания для самостоятельной работы

Для усвоения материала необходимо обратить внимание на то, что

- благодаря интеграции метаболизма (а не отдельным метаболическим путям) организм снабжается энергией и пластическим материалом за счет постоянного обновления его участников на уровне ключевых метаболитов, коферментов;
- ключевой составляющей взаимодействия метаболических путей является наличие сходных механизмов регуляции. Через эти механизмы реализуют свое действие гормоны и другие биологически активные соединения;
- центральным органом в интеграции метаболизма является печень, благодаря которой в крови поддерживается необходимый уровень веществ для использования их мозгом, мышцами и другими тканями.

Задание 1. Выберите правильный ответ: в мышцах после приема пищи:

- А. Глюкоза используется для синтеза гликогена.
- Б. Основной источник энергии – жирные кислоты.
- В. α -Кетокислоты, образующиеся из аминокислот с разветвленной цепью, окисляются в цикле Кребса.
- Г. Гликоген подвергается фосфоролиту.
- Д. Образуются кетоновые тела.

Задание 2. Выберите правильный ответ: в печени натошак:

- А. Активируется глюконеогенез.

- Б. Усиленно окисляются жирные кислоты.
- В. Активно синтезируется гликоген.
- Г. Образуются кетоновые тела.
- Д. Глюкоза высвобождается в кровь.

Задание 3. Какое из нижеследующих выражений относительно синтеза и использования гликогена правильное?

- А. Действие адреналина и глюкагона направлено на увеличение активности гликогенфосфорилазы.
- Б. В состоянии натощак интенсивность расщепления гликогена соизмерима с интенсивностью его синтеза.
- В. Дефосфорилирование гликогенсинтазы под влиянием инсулина ведет к увеличению активности этого фермента.
- Г. цАМФ – вторичный посредник, который образуется в ответ на действие адреналина и глюкагона в печени.
- Д. Фосфорилирование гликогенфосфорилазы под влиянием глюкагона приводит к увеличению активности этого фермента.

Задание 4. Запомните физиологические концентрации основных катионов.

Катионы	Плазма	Эритроциты
Калий	3,4–5,6 ммоль/л	80–113 ммоль/л
Натрий: взрослые	135–150 ммоль/л	13,5–22 ммоль/л
дети	130–145 ммоль/л	

Содержание общего кальция в сыворотке крови — 2,2–2,7 ммоль/л, ионизированного кальция в сыворотке — 1,1–1,3 ммоль/л.

Задание 5. Все минеральные вещества в зависимости от их концентрации в организме подразделяются на макро- и микроэлементы. Минеральные вещества, содержание которых превышает 50 мг/кг массы тела, относятся к макроэлементам. Перечислите эти элементы.

Задание 6. В состав каких хромопротеинов входит железо?

- А. Цитохрома P₄₅₀.
- Б. I и II комплексов дыхательной цепи.
- В. III и IV комплексов дыхательной цепи.
- Г. Церулоплазмينا.
- Д. Миоглобина.

Задание 7. Муковисцидоз — наследственное заболевание, характеризующееся поражением желез внешней секреции. Клинически проявляется сгущением слизи в выводных протоках (главным образом, поджелудочной железы и бронхов). Этиология болезни — генетический дефект CFTR (перевод: кистозно-фиброзный транспортёр-регулятор), т. е. хлорного канала. Предложите способ лечения этого заболевания (на основании материала лекции).

Задание 8. После назначения препаратов селена в крови у пациента:

- А. Снизилось содержание продуктов ПОЛ.
- Б. Увеличилось содержание продуктов ПОЛ.
- В. Увеличилась активность глутатионпероксидазы эритроцитов.
- Г. Снизилась активность глутатионпероксидазы эритроцитов.

Задание 9. Усвоить, что в случае снижения объёма крови включаются два механизма: 1) раздражаются барорецепторы а. carotis и рецепторы предсердия, что приводит к высвобождению натрий-уретического гормона (он стимулирует секрецию эпифизом адреногломерулотропина); 2) раздражаются рецепторы юкстагломерулярного аппарата почек, что сопровождается выбросом в кровоток ренина.

Используя приведенную схему, рассмотрите основные эффекты гормонов и ренина.



Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. У больного нефритом развились отёки. Что может служить их основной причиной?

- А. Уменьшение содержания в крови альбуминов.
- Б. Уменьшение содержания в крови глобулинов.
- В. Увеличение содержания в крови белков острой фазы.
- Г. Снижение концентрации глюкозы в плазме крови.
- Д. Снижение концентрации натрия в плазме.

Задание 2. Объяснить, почему и недостаток, и избыточное поступление витамина Д в организм будет приводить к деструкции костной ткани.

Задание 3. Назовите минеральные вещества, выполняющие следующие функции:

- А. Поддержка электролитного баланса.
- Б. Поддержка определённого осмотического давления.
- В. Создание благоприятных условий растворимости белков клеток крови.
- Г. Участие в механизмах возбудимости.
- Д. Влияние на обменные процессы путём активирования или ингибирования ферментов.
- Е. Минерализация костей скелета и зубов.

Задание 4. Во время тиреоидэктомии хирург не заметил расположенных в толще щитовидной железы паразитовидных желёз. У больного начались судороги. Почему?

- А. В результате падения содержания в крови тиреокальцитонина.
- Б. В результате снижения содержания в крови паратирина.
- В. Вследствие снижения содержания Ca⁺⁺ в плазме крови.
- Г. Вследствие увеличения содержания Ca⁺⁺ в плазме крови.

Задание 5. Отёк головного мозга — опасное осложнение травм черепа. Он может также развиваться при неправильной тактике лечения кровопотери (из-за избытка введенной в организм жидкости). Нарушение функции каких классов аквапоринов при этом отмечается?

- А. Аквапоринов АQ P₁ и АQ P₄.
- Б. Акваглицеропоринов.
- В. Аквапоринов АQ P₂ .

Задание 6. Какие из приведенных ниже выражений верны?

- А. При максимальном мышечном напряжении пируват восстанавливается в лактат.
- Б. В норме в мышцах некоторое количество глюкозы подвергается анаэробному гликолизу, поэтому всегда имеется некоторое количество лактата, используемого для глюконеогенеза.
- В. Для глюконеогенеза из лактата требуется больше АТФ, чем образуется во время анаэробного гликолиза.

Задание 7. Каковы последствия увеличения количества свободных жирных кислот в печени ?

- А. Увеличится интенсивность β-окисления.
- Б. Увеличится интенсивность гликолиза.
- В. Снизится активность пируватдегидрогеназы.
- Г. Снизится интенсивность синтеза жирных кислот.
- Д. Увеличится интенсивность образования кетоновых тел.

Задание 8. Какое из приведенных ниже выражений правильное?

- А. β-гидроксibuтират является важным метаболическим источником энергии в состоянии натошак.
- Б. Ацетоацетат является важным метаболическим источником энергии в состоянии натошак.
- В. Кетоновые тела являются основным источником энергии для скелетных мышц в состоянии натошак.
- Г. Кетоновые тела являются основным источником энергии для печени в состоянии натошак.
- Д. Кетоновые тела являются важным субстратом для глюконеогенеза в состоянии натошак.

Задание 9. Подберите соответствующие пары (цифра – орган, буква – процесс метаболизма):

Через 12 часов голодания

1	Печень	А	Использует глюкозу в качестве источника энергии
2	Мышцы	В	Использует кетоновые тела в качестве источника энергии
3	Мозг	С	Использует жирные кислоты в качестве источника энергии
4	Почки	Д	Активирует ферменты глюконеогенеза

Через 3-е суток голодания

1	Печень	А	Использует глюкозу в качестве источника энергии
2	Мышцы	В	Использует кетоновые тела в качестве источника энергии
3	Мозг	С	Использует жирные кислоты в качестве

			источника энергии
4	Почки	D	Активирует ферменты глюконеогенеза

Через 2 недели голодания

1	Печень	A	Использует глюкозу в качестве источника энергии
2	Мышцы	B	Использует кетоновые тела в качестве источника энергии
3	Мозг	C	Использует жирные кислоты в качестве источника энергии
4	Почки	D	Активирует ферменты глюконеогенеза

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1. а) 300–400 мл; б) 1200–1500 мл; в) 500–600 мл.
2. В. 3. Вправо. 4. А, В. 5. А. 6. Б. 7. 1-А,В,С; 3-А,В; 4 - А,В,С,Д. 8.- Д

Для самостоятельной работы:

1. А,Б,В. 2. А,Б,Д,Г. 3. А,В,Г,Д. 5. Na, K, Ca, Mg, P, Cl, S. 6. А, В, Д. 7. Генная инженерия. 8. А, В.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. **Определение содержания натрия в сыворотке крови фотометрическим методом**

Принцип метода. Метод основан на том, что содержащийся в образце натрий осаждается уранилацетатом магния. Уранил-анионы, оставшиеся в растворе, способны образовывать окрашенный комплекс с тиогликолятом. Концентрация натрия прямо пропорциональна разности между холостой (без преципитации) и опытной пробами.

Ход работы. Берут 2 центрифужные пробирки. В первую пробирку (опытная проба) отмеривают 1,0 мл реагента 1 и затем добавляют 0,02 мл сыворотки крови. Во вторую пробирку (стандартная проба) вносят 1,0 мл реагента 1 + 0,02 мл стандартного раствора. **Необходимо строго соблюдать последовательность внесения реактивов в пробирки (сыворотку добавляют к реагенту)!** Закрывают пробирки и 30 с встряхивают их содержимое. Через 5 мин вновь так же встряхивают и оставляют пробы на 30 мин в темноте. Затем центрифугируют 10 мин (1000 об/мин).

Из каждой центрифужной пробирки отбирают по 0,02 мл надосадочной жидкости в обычные пробирки и добавляют в каждую по 2,0 мл реагента 2. Одновременно готовят холостую пробу (0,02 мл реагента 1 + 2,0 мл реагента 2). Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют 5 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность всех проб против воды, используя кюветы с рабочей шириной 5 мм (длина волны — 400 нм).

Расчёт: концентрацию Na^+ (ммоль/л) определяют по формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{E_{\text{хол}} - E_{\text{оп}}}{E_{\text{хол}} - E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

где $E_{\text{хол}}$, $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность холостой, опытной и стандартной проб, соответственно; $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора (150 ммоль/л).

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Содержание Na^+ в сыворотке крови в норме составляет 135-150 ммоль/л.

Уменьшение концентрации натрия в сыворотке крови обуславливает клинический симптомокомплекс, характеризующийся появлением апатии, потерей аппетита, тошнотой, рвотой, нарушением рефлексов, тахикардией, падением кровяного давления, психозами.

Гипернатриемия сопровождается тяжёлым общим состоянием больных, повышением температуры тела, тахикардией.

Работа 2. *Определение содержания калия в сыворотке крови турбодиметрическим методом*

Принцип метода. Метод основан на способности ионов калия образовывать стабильную суспензию с ионами тетрафенилбората. Мутность суспензии пропорциональна концентрации ионов калия.

Ход работы. Берут три пробирки. В первую пробирку (опытная проба) наливают 2,0 мл реагента и добавляют 0,04 мл сыворотки крови, во вторую пробирку (стандартная проба) вносят 2,0 мл реагента + 0,04 мл стандартного раствора, в третью пробирку (холостая проба) добавляют только реагент (2,0 мл). **Необходимо строго соблюдать последовательность внесения реактивов в пробирки (сыворотку добавляют к реагенту)!** Перемешивают и инкубируют 2 мин. Вновь тщательно перемешивают и инкубируют точно 10 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность опытной пробы ($E_{\text{оп}}$) и стандартного раствора ($E_{\text{ст}}$) против холостой пробы, используя кюветы с рабочей шириной 5 мм (длина волны 590 нм). Перед фотометрированием пробы необходимо взболтать.

Расчёт: концентрацию K^+ (ммоль/л) определяют по формуле:

$$C_{\text{оп}} = C_{\text{ст}} \times E_{\text{оп}} / E_{\text{ст}}.$$

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Содержание K^+ в сыворотке крови в норме составляет 3,4–5,6 ммоль/л.

Уменьшение концентрации калия в сыворотке крови приводит к тяжёлым нарушениям — вплоть до появления вялых параличей. Ухудшаются психическая и умственная деятельность, угнетается перистальтика кишечника, развивается метеоризм, расширяются желудок и мочевого пузырь.

Гиперкалиемия сопровождается ощущением «ползания мурашек», исчезновением сухожильных рефлексов, нарушением функции сердца. При двукратном превышении содержания калия в крови сердце останавливается в фазе диастолы.

Выводы:

Подпись преподавателя:

34. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Биохимия питания, биохимия мочи, интеграция метаболизма»

1. Витамин В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), пантотеновая кислота, РР (никотиновая кислота), В₆ (пиридоксин), В₉ (фолиевая кислота), В₁₂ (кобаламин), Н (биотин), С (аскор-биновая кислота). Узнать витамин по нарисованной формуле, назвать химическую природу. Знать коферментные формы и участие в метаболизме, признаки гиповитаминоза, суточную потребность. Уметь нарисовать блок-схемы для коферментных форм витамина РР (НАД⁺ и НАДФ⁺) и витамина В₂ (ФМН и ФАД). Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (вит. Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота и др.
2. Энергозатраты организма взрослого человека в состоянии покоя в норме и изменения их при патологии. Пути использования АТФ в состоянии покоя. Реальный и желательный вклад в энергопродукцию белков, жиров и углеводов.
3. Метаболические процессы использования углеводов, жиров и белков в качестве источников энергии (гликогенолиз, дихотомическое расщепление глюкозы и последующее окисление ПВК, мобилизация жира из депо и β-окисление жирных кислот).
4. Метаболические процессы депонирования углеводов и липидов пищи.
5. Пищевая ценность углеводов, липидов и белков. Незаменимые и условно незаменимые факторы питания. Роль волокнистых полисахаридов пищи для работы пищеварительного тракта и обменных процессов в организме.
6. Квашиоркор и маразм — клинические формы синдрома недостаточности питания. Характерные черты, сходство и принципиальные отличия.
7. Регуляция и направленность метаболических процессов в печени после приема пищи и натощак.
8. Межорганый метаболизм для обеспечения организма энергией в различные периоды голодания. Механизм гиперпродукции кетоновых тел.
9. Токоферол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гиповитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина Е.
10. Ретинол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гипо- и гипервитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина А.
11. Витамин К. Химическая природа, участие в процессе свертывания крови. Синтетические производные. Антивитамины.
12. Витамин D. Химическая природа, всасывание, механизм действия.
13. Обмен кальция и фосфора в организме. Гормоны, регулирующие их обмен.
14. Гормоны — регуляторы водно-минерального обмена (вазопрессин, натрий-уретический гормон, минералокортикоиды). Химическая природа, рецепция, влияние на реабсорбцию воды и электролитов.
15. Ренин-ангиотензиновая система и ее роль в регуляции водно-минерального обмена.
16. Роль железа в организме. Всасывание и транспорт железа. Железодефицитные состояния и железодефицитные анемии.

17. Роль макроэлементов (натрия, калия, хлора, магния, серы) в метаболизме клетки.
18. Значение йода, селена, фтора, цинка, кобальта, меди, марганца в обмене веществ.
19. Физико-химические свойства мочи.
20. Неорганические составные части мочи.
21. Органические составные части мочи.
22. Патологические составные части мочи. Диагностическое значение определения белка, крови, ацетоновых тел и сахаров в моче.
23. Диагностическое значение определения в моче аминокислот и их метаболитов, желчных пигментов.

35. Контроль практических навыков биохимического анализа: Анализ желудочного сока и мочи

Актуальность темы

В процессе изучения биологической химии студенты приобрели начальные знания и практические навыки качественного и количественного биохимического анализа, который находит широкое применение в лабораторной диагностике, например, анализы желудочного сока и мочи. В дальнейшем, в ходе изучения клинических дисциплин, будет осуществляться расширение и закрепление знаний по биохимической лабораторной диагностике.

Цель занятия

Проверить: 1) навыки студентов в проведении качественного и количественного анализа биологических жидкостей; 2) умение ориентироваться в результатах анализа и давать им правильную оценку; 3) понимание происхождения и диагностического значения патологических компонентов анализируемых биологических жидкостей.

Требования к исходному уровню знаний

Для качественного выполнения задания необходимо вспомнить из:

– общей химии:

- основы качественного и количественного анализа;

– биологической химии:

- физико-химические свойства и состав желудочного сока в норме и патологии;
- физико-химические свойства и состав мочи в норме и патологии.

Получив индивидуальные контрольные пробы желудочного сока и мочи, студенты приступают к их анализу, используя методики занятия № 19 («Анализ желудочного сока») и занятия № 31 («Физиологические и патологические компоненты мочи»).

Результаты и выводы:

1. Определение кислотности желудочного сока.
2. Определение состава мочи.

Подпись преподавателя: