

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Практикум для студентов фармацевтического факультета

5-е издание, исправленное



Минск БГМУ 2026

УДК 577.1(076.5)(075.8)
ББК 24я73
Б63

Рекомендовано Научно-методическим советом университета
в качестве практикума 19.11.2025 г., протокол № 3

А в т о р ы: д-р мед. наук, проф. А. Д. Таганович; канд. мед. наук, доц. Е. А. Девина; канд. биол. наук, доц. А. В. Колб; канд. мед. наук, доц. Ж. А. Рутковская; канд. хим. наук, доц. Н. Н. Ковганко; канд. биол. наук, доц. Е. М. Барабанова; канд. биол. наук, доц. Т. Ю. Принькова; канд. мед. наук, ст. преп. Л. П. Лисицына; д-р мед. наук, доц. А. Г. Кадушкин; канд. мед. наук, доц. Е. А. Хотько

Р е ц е н з е н т ы: канд. биол. наук, доц. каф. общей и клинической биохимии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета Н. Г. Фомченко; каф. биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета

Биологическая химия : практикум для студентов фармацевтического факультета /
Б63 А. Д. Таганович, Е. А. Девина, А. В. Колб [и др.]. – 5-е изд., испр. – Минск : БГМУ, 2026. – 140 с.

ISBN 978-985-21-2119-4.

Изложены рекомендации по лабораторно-практическим занятиям. По каждой теме занятия даны: цель, актуальность, литература для подготовки, вопросы для обсуждения, тестовые задания, описание лабораторных работ, протоколы их выполнения. Приведены вопросы к итоговым контрольным занятиям. Приложения содержат перечень экзаменационных вопросов и некоторые биохимические константы. Первое издание вышло в 2022 году.

Предназначено для студентов 2-го и 3-го курса фармацевтического факультета.

УДК 577.1(076.5)(075.8)
ББК 24я73

ISBN 978-985-21-2119-4

© УО «Белорусский государственный
медицинский университет», 2026

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

К работе в химических лабораториях допускаются лица, прошедшие инструктаж по охране труда и не имеющие противопоказаний по состоянию здоровья.

Обучающиеся обязаны выполнять требования по охране труда, пожарной безопасности, знать порядок действий при пожаре, места расположения средств пожаротушения.

При работе в лаборатории возможно воздействие на работающих следующих опасных и вредных производственных факторов:

- химические ожоги при попадании на кожу или в глаза едких химических веществ;
- термические ожоги при неаккуратном пользовании спиртовками и нагревании жидкостей;
- порезы рук при небрежном обращении с лабораторной посудой;
- отравление парами или газами высокотоксичных химических веществ;
- возникновение пожара при неаккуратном обращении с легковоспламеняющимися и горючими жидкостями.

Работать в помещении лаборатории разрешается только в присутствии преподавателя.

Работа с химическими веществами без спецодежды и наличия необходимых средств защиты глаз, органов дыхания, кожных покровов запрещается.

Перед зажиганием спиртовки нужно удостовериться, что корпус ее исправен, фитиль выпущен на нужную высоту и распущен, а горловина и держатель фитиля сухие.

Зажженную спиртовку нельзя переносить с места на место, нельзя зажигать спиртовку от другой.

Гасить спиртовку нужно, накрывая пламя фитиля колпачком. Задувать пламя запрещается.

Каждый обучающийся должен выполнять лабораторные работы на закрепленном за ним учебном месте, не загромождать его посторонними предметами. Переход на другое рабочее место без разрешения преподавателя не допускается.

Перед выполнением лабораторной работы студент обязан изучить методику и требования по ее безопасному применению.

Пролитые на пол или стол вещества, обучающиеся могут обезвредить и удалить под руководством преподавателя или лаборанта.

Обучающимся запрещается покидать лабораторию, оставляя без присмотра зажженные спиртовки и другие нагревательные приборы.

Занятие 1. 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. В лечебных целях применяется смесь аминокислот для парентерального питания. Отдельные аминокислоты и пептиды применяются в качестве лекарственных средств. Методы количественного определения белка в биологических жидкостях широко используются в медицинской практике, а также при стандартизации и контроле качества белковых препаратов.

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.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Какая из перечисленных аминокислот является нейтральной?

А. Аргинин Б. Лейцин 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. 3 остатка аминокислот Б. 9 остатков аминокислот
В. 10 остатков аминокислот Г. 15 остатков аминокислот

Задание 6. Какие функции присущи только белкам?

А. Энергетическая Б. Каталитическая В. Буферная Г. Структурная

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Предмет, цели и задачи биохимии.
2. Аминокислоты, классификация, общие свойства, примеры использования в качестве лекарственных средств.
3. Пептидная связь, свойства (постулаты Полинга-Кори). Пептиды, строение, классификация, биологическая роль, применение в медицине.
4. Правила написания пептидов, их названия и определения заряда
5. Белки как класс органических веществ, биологические функции. Классификация белков.
6. Общие принципы спектрофотометрии. Количественное определение белка биуретовым методом. Построение калибровочного графика и работа с ним.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 22–33.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 4–8.
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 Лей-Гис-Лиз-Тир 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 Г. Биуретовую реакцию дают белки
В. Биуретовую реакцию дают трипептиды

Задание 5. Рефрактометрический метод основан на:

- А. Определении угла отражения падающего света
Б. Явлении светорассеяния Г. Определении коэффициента экстинкции
В. Определении коэффициента преломления

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Что из указанного ниже относится к строению радикала цистеина?

- А. Содержит сульфометильную группу
Б. Содержит разветвленную углеводородную цепь
В. Содержит ароматическое кольцо
Г. Не имеет боковой цепи
Д. Содержит сульфгидрильную группу

Задание 2. Препараты для парентерального белкового питания — это гидролизаты, получаемые из белков крови крупного рогатого скота (Гидролизин, Фибриносол) и человека (Амикровин, Инфузамин) а также казеина молока (Гидролизат казеина). Они содержат смесь L-аминокислот. Эту смесь аминокислот (Гли, Асн, Глу, Лиз, Арг, Тир, Асп) можно разделить 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. Амилаза | Е. Гормональная |

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

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

Задание 5. Присутствие веществ белковой природы в лекарственных препаратах можно обнаружить с помощью некоторых качественных (цветных) реакций. Выберите правильный ответ:

- А. Реакция на пептидную группу Г. Реакция на α -аминогруппу
Б. Реакция на альдегидную группу Д. Реакция на слабосвязанную серу
В. Реакция на ароматическое кольцо

Задание 6. Свойство поглощать световой поток с длиной волны 280 нм при спектрофотометрии обусловлено наличием в белке:

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

Задание 7. 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 В. Относительную гипопроотеинемию
Б. Нормопротеинемию Г. Относительную гиперпротеинемию

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1Б; 2. В; 3В; 4. Г; 5А, Б, В; 6Б.

Для самостоятельной работы:

1Б; 2. А, В; 3А, Б; 4Б, В, Г; 5В.

Лабораторная работа

Определение концентрации общего белка в сыворотке крови биуретовым методом

Среди 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.

Ход работы. В 1-ю пробирку (опыт) наливают 0,1 мл исследуемой сыворотки, во 2-ю (контроль) — 0,1 мл 0,9%-ного 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%-ного 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, данные заносят в таблицу. 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 гипопроотеинемия* (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. *Абсо-*

лутная гипопроотеинемия наблюдается при нефритах, злокачественных опухолях, алиментарной дистрофии. Абсолютная гиперпротеинемия встречается сравнительно редко, например, при миеломной болезни, хронических полиартритах.

Результат:

<i>C</i> , г/л	20	40	60	80	100
<i>E</i> (оптическая плотность)					



E оп. =

C оп. =

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 2. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ И ОСНОВЫ ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ. РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

Актуальность темы

Белки присутствуют во всех живых клетках. Для построения белков используется набор из 20 различных аминокислот, связанных в определенной, характерной только для данного белка последовательности. Белки имеют несколько уровней структурной организации. Белки — это наиболее многочисленные и исключительно разнообразные по своим функциям макромолекулы. Одна из важнейших задач современной биохимии как раз и состоит в том, чтобы понять, каким образом аминокислотные последовательности разных белков дают им возможность выполнять различные функции (каталитическую, рецепторную, структурную, гормональную, защитную, сократительную и др.). Важно понимать, что конформационная лабильность — основа функционирования белков.

Вещества, нарушающие структурную организацию белковой молекулы, приводят к изменению физико-химических и биологических свойств белка. Это явление называется денатурацией. Явление денатурации используется в клинике, фармации и биохимических исследованиях: для осаждения белка в изучаемом биологическом материале, для количественного определения белка в биологических жидкостях, а также для удаления белков из растворов (для очистки лекарственных препаратов). Чаще применяется метод обратимого осаждения бел-

ков — высаливание, который используется в клинических лабораториях для разделения альбуминов и глобулинов, а в фармацевтической технологии для получения и очистки кристаллических препаратов белка.

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.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Белок — это соединение, которое содержит:

- А. 15 остатков аминокислот Б. 28 остатков аминокислот
В. 49 остатков аминокислот Г. более 50 остатков аминокислот

Задание 2. Что понимают под изменением конформации белков?

- А. Изменение аминокислотной последовательности полипептидной цепи
Б. Изменение вторичной и третичной структуры полипептидных цепей
В. Замену одной простетической группы в сложном белке на другую
Г. Изменение взаиморасположения в пространстве субъединиц олигомерного белка при взаимодействии с лигандом

Задание 3. Для пептидной связи характерны следующие свойства:

- А. Имеет частично двойной характер
Б. Является ковалентной
В. Возможно свободное вращение атомов вокруг связи
Г. Не является плоскостной
Д. Имеет транс-конформацию в α -спирали

Задание 4. При термической обработке пищи наблюдаются изменения пространственной структуры белка. Этот процесс получил название:

- А. Ренатурация Б. Денатурация В. Высаливание Г. Диализ Д. Гидратация

Задание 5. Объясните, почему пептидная группа является плоской и жесткой структурой?

Задание 6. Укажите свойства, характеризующие коллоидные растворы:

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Структурная организация белков и этапы формирования нативной конформации белков (первичная, вторичная, надвторичная, третичная и четвертичная структуры). Определение понятий, разновидности и связи, стабилизирующие структуру.

2. Конформационные изменения — основа функционирования белков. Взаимодействие белков с лигандами. Лекарственные вещества как лиганды, влияющие на функцию белков.

3. Особенности строения и функционирования олигомерных белков (на примере гемоглобина). Преимущества существования белков с четвертичной структурой.

4. Сложные белки. Их строение и функции.

5. Денатурация. Обратимость денатурации. Механизмы действия денатурирующих факторов. Применение денатурации в медицине.

6. Факторы устойчивости белковых растворов (заряд белка, гидратная оболочка, молекулярная масса, форма молекулы). Осаждение белков (обратимое осаждение — высаливание, необратимое осаждение).

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 34–46, 49–50.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 9–13.
3. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. Москва : Медицина, 1990. С. 13–19, 28–37, 42–76.
4. *Конспект лекций.*

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Что происходит с белком при действии высокой температуры в присутствии соляной кислоты?

- А. Обратимое осаждение
Б. Высаливание
В. Диализ
Г. Хроматография
Д. Гидролиз

Задание 2. Вспомните, что в основе полипептидной цепи, построенной из α -аминокислот, лежит постоянно повторяющаяся структура $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$. 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.

2.1. Изобразите в тетради, как образуются пептидные связи в трипептиде Лиз-Про-Асп. Перечислите свойства пептидной связи. Определите заряд этого пептида.

2.2. Объясните, почему в этом пептиде невозможно образование Н-связи, необходимой для стабилизации α -спирали.

2.3. 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 -	
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Ала -	Мет -	Цис -	Лиз -	Гис -	Глу -	Гли -	Глу -	Про -	Асп -	
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Гли -	Мет -	Глу -	Цис -	Ала -	Фен -	Гис -	Про -	Тир -	Лей -	Мет

Задание 3. Знайте уровни структурной организации белков и основные связи, участвующие в их формировании.

3.1. 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 | Б. Порядок чередования аминокислот в полипептидной цепи |
| 3. Надвторичная структура | В. Объединение в определенном порядке двух или большего количества протомеров в молекуле олигомерного белка |
| 4. Третичная структура | Г. Способ укладки отдельных участков пептидной цепи в виде α -спиралей и β -структур |
| 5. Четвертичная структура | 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 |

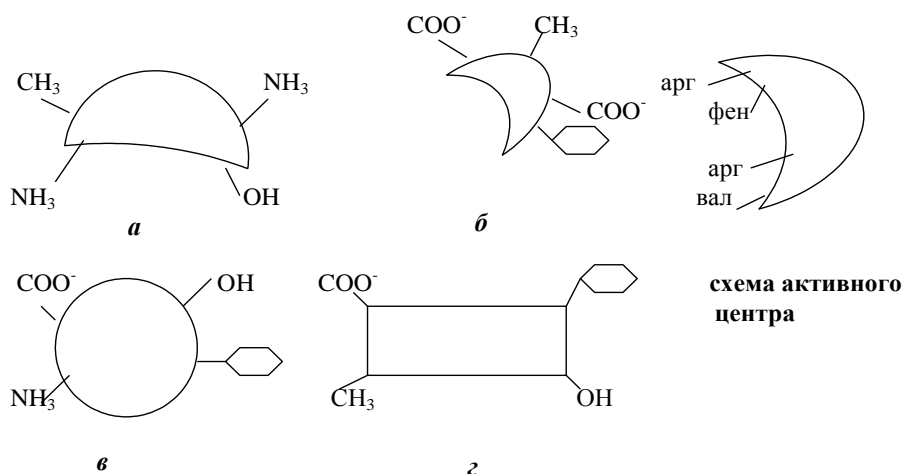
3.2. Какому уровню структурной организации белка соответствует каждый пронумерованный тип связи? Подберите пары:

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. Связь между карбоксильными и аминогруппами радикалов аминокислот | А. Первичная структура |
| 2. Связь между α -амино- и α -карбоксильными группами аминокислот | Б. Вторичная структура |
| 3. Связь между радикалами цистеина | В. Третичная структура |
| 4. Водородные связи между пептидными группировками | Г. Четвертичная структура |
| 5. Водородные связи между радикалами аминокислот | |
| 6. Межрадикальные гидрофобные взаимодействия | |

Задание 4. 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.

4.1. 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»?

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. При проведении электрофореза в условиях, где рН буферного раствора выше, чем изоэлектрическая точка белка, последний:

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

Задание 2. 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+} ?

Задание 3. 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 4. 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 5. Лигандом α -протомера гемоглобина может быть:

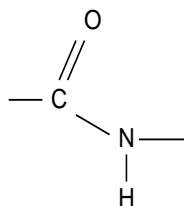
- | | | |
|-------------|-------------------------|-----------------------|
| А. Гем | В. β -Протомер | Д. α -Протомер |
| Б. Кислород | Г. 2,3-Бисфосфоглицерат | |

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

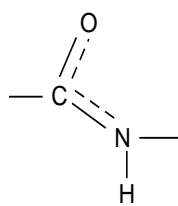
Для самопроверки исходного уровня знаний:

1Г; 2Б, Г; 3А, Б, Д; 4Б;

5 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.



Пептидная связь



Резонанс придает обеим связям частично двойной характер

6А, Б, В.

Для самостоятельной работы:

1Д; 2.3А. 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 и 10–12 гидрофобны; Г. Остатки 13–18 гидрофильны;

3.1 (Б, Е – 1; Г – 2; А – 3; Д – 4; В – 5);

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

4.1 (А – лиганд Б; Б – ионные, гидрофобные).

Лабораторная работа

Работа 1. *Высаливание белков*

Высаливание — обратимая реакция осаждения белков из раствора с помощью больших концентраций нейтральных солей: NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.

При высаливании белок и соль конкурируют за гидратную оболочку, но сродство к воде у соли больше, поэтому происходит дегидратация белка и частичное устранение его 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 (NH₄)₂SO₄, а глобулины — в полунасыщенном растворе (NH₄)₂SO₄, так как у глобулинов бóльшая молекулярная масса, чем у альбуминов. Высаливание белков — обратимая реакция, так как осадок белка может вновь растворяться после уменьшения концентрации солей путем диализа или разведения водой.

Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка

Ход работы. К 20 каплям яичного белка добавляют 20 капель насыщенного р-ра (NH₄)₂SO₄ 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 CuSO₄ + 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 соединениями и осаждение при кипячении.

В медицинской практике денатурирующие агенты используют для стерилизации медицинских инструментов и материала (автоклавы), а также в качестве антисептиков (этанол, фенол, крезол, лизол, сулема).

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.

Схема постановки опыта:

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>		

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.

Схема постановки опыта:

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:

ЗАНЯТИЕ 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ. МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ, ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ

Актуальность темы

Для исследования физико-химических и биологических свойств белков, а также для изучения их аминокислотного состава и структуры белки необходимо выделить из биологических объектов (органы, ткани, клетки, органеллы) и очистить от других белков и низкомолекулярных примесей. 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.

Цель занятия

Закрепить знания о физико-химических свойствах белков для того, чтобы понять методы разделения и очистки белков, определение аминокислотной последовательности полипептидных цепей, а также принципы функционирования белков в организме. Познакомить со значением реакций гидролиза белков и их использованием в медицинской и фармацевтической практике. Освоить метод гель-фильтрации.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. 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		

Задание 2. В изоэлектрической точке белок:

- А. Имеет наименьшую растворимость В. Является амфионом
 Б. Является катионом Г. Обладает наибольшей степенью ионизации

Задание 3. Электрофорез коллоидных растворов и растворов белков применим для:

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

Задание 4. Скорость электрофореза растворов белков зависит от:

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

Задание 5. 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 6. 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 7. В какой последовательности выйдут из колонки, заполненной активированным углем, при вымывании их неполярным растворителем 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 ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Общие физико-химические свойства белков.
2. Методы разделения белков:
 - 1) осаждение (высаливание);
 - 2) хроматография (распределительная, ионообменная, аффинная, гель-хроматография);
 - 3) электрофорез (на бумаге, в полиакриламидном геле с использованием DDS-Na, изоэлектрофокусирование; иммуноэлектрофорез);
 - 4) ультрацентрифугирование.
3. Методы очистки белков от низкомолекулярных примесей (диализ, гель-хроматография).
4. Вестерн-блот (назначение, этапы, молекулярные зонды).
5. Этапы и методы исследования аминокислотного состава и аминокислотной последовательности белков, и пептидов (методы Сэнджера, Эдмана, Акабори, ферментативные).
6. Гидролиз белка, его виды. Значение реакций гидролиза белка для организма и практическое использование белковых гидролизатов в медицинской и фармацевтической практике.
7. Правила написания пептидов, их названия и определение заряда.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 45–46, 51–71.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 14–22.
3. *Конспект лекций.*

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Вспомните, что заряд белка или пептида зависит от суммы зарядов аминокислот, которые входят в его состав, и от рН раствора, в котором находится данный белок или пептид. Повторите понятия «изоэлектрическая точка» и «изоэлектрическое состояние» белка.

1.1. Определите суммарный заряд пептида при рН = 7,0: Глу-Арг-Гис-Вал-Асп-Тре. Как изменится суммарный заряд этого пептида: а) в кислой среде; б) в щелочной среде?

1.2. Сравните направление движения в электрическом поле двух пептидов при рН = 7,0 (к катоду или к аноду):

а) Сер-Цис-Глу-Тир-Асп;

б) Вал-Арг-Мет-Фен-Тир.

Задание 2. Вспомните физико-химические свойства, лежащие в основе методов разделения и очистки белков. Умейте объяснить принцип каждого метода. Ответьте на вопросы:

2.1. Хроматографию применяют для:

А. Разделения веществ

В. Идентификации веществ

Б. Очистки веществ

Г. Концентрирования веществ

2.2. Метод ионообменной хроматографии основан на:

А. Различия в размерах молекул разделяемых веществ

Б. Избирательном взаимодействии молекул разных веществ со специфическим лигандом

В. Ионообменной адсорбции

2.3. Какие из приведенных методов позволяют разделить смесь белков по молекулярной массе?

А. Распределительная хроматография

Г. Гель-фильтрация

Б. Электрофорез в полиакриламидном геле

Д. Ионообменная хроматография

В. Ультрацентрифугирование

2.4. Подберите к пронумерованному методу разделения и очистки белков их соответствующие свойства, на которых основан данный метод.

А. Различия по величине заряда

1. Гель-фильтрация

Б. Различия по молекулярной массе

2. Электрофорез в полиакриламидном геле

В. Различия по величине заряда и молекулярной массе

3. Аффинная хроматография

4. Ионообменная хроматография

Г. Различия по другим свойствам

Задание 3. Ознакомьтесь с современными методами идентификации белков (блот-анализ) и ответьте на тестовый вопрос:

В качестве зонда при проведении блот-анализа (вестерн-блот) используют:

А. Меченые антитела к искомому белку

Б. Пероксидазу хрена

В. Казеин молока

Г. Альбумины

Задание 4. Метод аффинной хроматографии используется для:

А. Выделения индивидуальных белков

Б. Разделения белков по величине заряда

В. Очистки белков от низкомолекулярных примесей

Задание 5. Подберите для каждого из пронумерованных методов его назначение:

1. Реакция с динитрофторбензолом (ДНФБ)

А. Для определения аминокислотного состава

2. Ферментная обработка карбоксипептидазой

Б. Для определения аминокислотной последовательности

3. Реакция с дансилхлоридом

4. Реакция с гидразином

В. Для определения N-концевой аминокислоты

5. Реакция с фенилизотиоцианатом (ФИТЦ)

Г. Для определения C-концевой аминокислоты

6. Ионообменная хроматография

7. Масс-спектрометрия

Задание 6. Выберите правильный ответ. Гидролиз — это:

- А. Образование гидратных оболочек
- Б. Распад полимеров до мономеров с участием воды
- В. Присоединение воды к молекуле без ее распада
- Г. Образование воды во время реакции

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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 различиях в полярности 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. Распределительная 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 = 36 000), миоглобин (M = 17 000), каталаза (M = 250 000) при вымывании их растворителем:

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

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

Нет полос	Отрицательная проба
Наличие полос, соответствующих р31 или р24, и полос, соответствующих gp160 или gp120	Положительная проба
Полосы присутствуют, но не соответствуют критериям положительной пробы	Сомнительная проба

gp160 — предшественник белка вирусной оболочки

gp120 — 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 ВИЧ
- Б. Только антиген ВИЧ
- В. Присутствие свободного циркулирующего вируса у пациента
- Г. Присутствие вируса только в инфицированных лимфоцитах

Вопрос 2. Вторичные антитела связывают:

- А. Белки ВИЧ
 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	—			—	—	2 — вирус-сыворотка (отрицательный контроль)
p55	—			—		А — пациент А
gp41	—			—		В — пациент В
p31	—			—		С — пациент С
p24	—			—	—	

Задание 4. Пептид ферментативного гидролизата, не передвигавшийся в электрическом поле при электрофорезе, дансировали 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?

Задание 5. Трипсин гидролизует пептидные связи, образованные СООН группами диаминокарбоновых кислот. Трипсиновый гидролизат фракционировали методом электрофореза, и пептид с низкой подвижностью прогидролизовали кислотой. Получили 3 пептида следующего состава: 1) Лей, Мет; 2) Лей, Арг, Глу; 3) Мет, Тир. Напишите формулу пептида. Назовите его. В какой среде проводили электрофорез трипсинового гидролизата? Объясните свой выбор.

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1А – 1, 2; **Б** – 1; **В** – 1; **Г** – 2; **Д** – 1; **2А, В; 3, 4** – все правильные; **5В; 6Б; 7Б.**

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

Лабораторная работа

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 величин 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 1-ю пробирку с биуретовым реактивом, удалить слой жидкости над сефадексом и внести в колонку разделяемый образец (смесь: белок + рибофлавин).

4. 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.

5. 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.

6. Результаты опыта запишите в таблицу.

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

Вывод:

Подпись преподавателя:

ЗАНЯТИЕ 4. ФЕРМЕНТЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Актуальность темы

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

Кинетические свойства ферментов изучаются для подбора оптимальных условий (концентрация субстрата, оптимум pH среды и температуры, ионный состав среды) определения активности ферментов в научных и клинических исследованиях, а также при стандартизации ферментных препаратов.

Определение активности тканеспецифичных ферментов в крови используется для диагностики заболеваний. Ферменты применяются для лечения заболеваний, а также в качестве аналитических реагентов.

Цель занятия

Изучить ферменты как биологические катализаторы, их особенности строения и свойства. Научиться применять знания о свойствах ферментов при стандартизации и контроле качества ферментных препаратов. Иметь представление об источниках получения ферментных препаратов.

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. Подберите 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 1-ой Б. Во 2-ой В. В 3-ей Г. В 4-ой

4.2. Какое вещество образовалось при кратковременном гидролизе крахмала?

- А. Глюкоза Б. Декстрины В. Сахароза

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Ферменты. Свойства ферментов как белковых катализаторов.
2. Современная классификация и номенклатура ферментов (систематическое и рабочее названия). Шифр ферментов. Общая характеристика классов.
3. Строение ферментов. Коферменты, их классификация и роль в катализе. Блок-схемы структуры НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД и ФМН.
4. Представление об активном центре фермента, его организация. Теории, объясняющие работу активного центра (Э. Фишер, Д. Кошленд).
5. Специфичность действия ферментов. Виды специфичности.
6. Механизм ферментативного катализа. Теория промежуточных фермент–субстратных комплексов, типы связей.
7. Кинетика ферментативных реакций. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата, pH, температуры (молекулярный механизм, графическая зависимость). Константа Михаэлиса (K_m).
8. Единицы активности ферментов.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 74–93.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 23–27.
3. *Конспект лекций*.

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 энергию активации | А. Не биологические катализаторы |
| 2. В процессе реакции не расходуются | Б. Ферменты |
| 3. Неспецифичны | В. Обе группы катализаторов |
| 4. Ингибируются аналогами субстрата | Г. Ни один из катализаторов |

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.

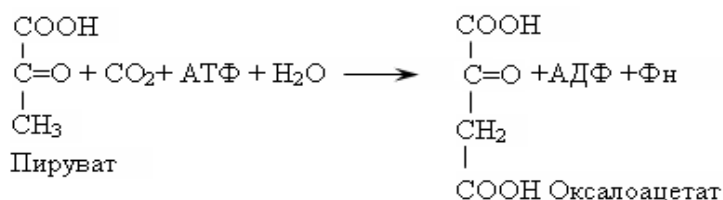
Решите задачу. Оптимальные условия для действия глутаматдегидрогеназы: *t* — 37 °С, рН — 4,5. При повышении температуры инкубационной пробы до 75 °С и рН инкубационной среды до 8,0 скорость ферментативной реакции снизилась на 50 %. Объясните причину снижения скорости реакции.

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

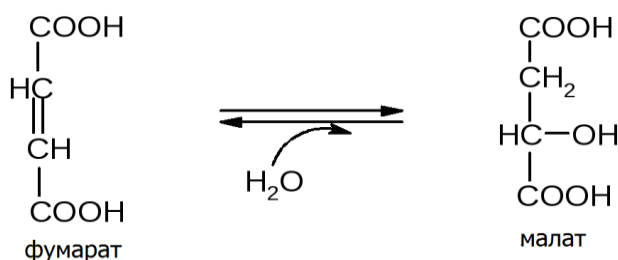
- сравнить структуру субстратов и продуктов;
- определить тип превращения.

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

2.1.1.



2.1.2.



Задание 3. Изобразите 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 ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. В лаборатории выделили фермент лизоцим и определили его активность при различных значениях рН среды. Установили, что ферментативная активность лизоцима максимальна при рН5,2 и уменьшается как при снижении, так и при повышении этого значения рН. Какова основная причина данного явления?

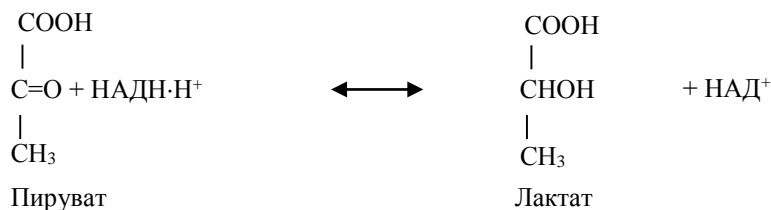
- А. Изменение конформации молекулы фермента
 Б. Утрата комплементарности активного центра и субстрата
 В. Изменение ионизации функциональных групп фермента

- 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, рН 7,5 – оптимальные условия для действия лактатдегидрогеназы (ЛДГ), катализирующей превращение:



3.1. Объясните причины уменьшения активности фермента:

- а) при повышении температуры до 60 °С;
 б) при хранении фермента в буферном растворе с рН 5,0.

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?

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1Г; 2(1 – А; 2 – Г,Д; 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 °С 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. 5Б.

Лабораторная работа

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 °С. Ферменты при нагревании свыше 70 °С, 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. Слюну предварительно разводят водой в 10 раз. В чистую пробирку отливают небольшое количество разведенной 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 некипяченой 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 °С 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 NaOH и 3 капли 1%-ного 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)		

Вывод:

2. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны

Ход работы. В три пробирки наливают по 1мл слюны, разведенной в 10 раз. В 1-ю пробирку добавляют 2 капли воды, во 2-ю — 2 капли 1%-ного раствора NaCl, в 3-ю — 2 капли 1%-ного раствора CuSO₄. После этого во все пробирки добавляют по 5 капель 1%-ного 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 действие активатора или ингибитора. Результаты опыта заносят в таблицу:

Номер пробирки	1(H ₂ O)	2(NaCl)	3(CuSO ₄)
Реакция с реактивом Люголя			

Вывод:

Работа 2. Специфичность действия 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 10 раз, и наливают по 1 мл в 2 пробирки.

В 1-ю пробирку добавляют 1 мл 1%-ного раствора крахмала, во 2-ю — 1 мл 1%-ного раствора сахарозы. Обе пробирки помещают на 10 минут в термостат при 38 °С, 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 опыта запишите в таблицу:

№ пробирки	Фермент	Субстрат	Реакция Фелинга
1			
2			

Вывод:

Подпись преподавателя:

ЗАНЯТИЕ 5. РЕГУЛЯЦИЯ РАБОТЫ ФЕРМЕНТОВ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Актуальность темы

Знание механизмов, посредством которых клетки и целые организмы координируют и регулируют весь набор метаболических процессов, важны для понимания механизмов действия лекарственных препаратов. Необходимо иметь четкое представление о молекулярных механизмах ингибирования ферментов, так как лекарственные препараты сходны с природными субстратами и могут действовать как конкурентные ингибиторы ферментов.

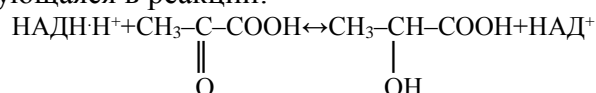
Цель занятия

Научиться использовать знания о регуляции активности ферментов для объяснения механизмов действия лекарственных препаратов.

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 Д. Реакция изомеризации

Задание 3. Вещества А и В взаимодействуют по схеме $\text{A} + \text{B} \leftrightarrow \text{AB}$. 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 ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Механизмы регуляции скорости ферментативных процессов: регуляция количества ферментов (синтез, распад), активности ферментов, изменение количества субстрата, наличие изоферментов, объединение ферментов в полиферментные комплексы, компартиментализация процессов.

2. Особенности строения и характеристика аллостерических (ключевых) ферментов, аллостерический центр.

3. Регуляция активности ферментов: ковалентная модификация, активаторы и ингибиторы (примеры). Виды ингибирования (необратимое и обратимое, изостерическое и аллостерическое), характеристика, примеры.

4. Изоферменты, примеры, биологическая роль.

5. Медицинские аспекты энзимологии (энзимопатология, энзимодиагностика, энзимотерапия). Имобилизованные ферменты. Применение ферментов в качестве аналитических реагентов (примеры).

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 94–112.

2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 28–32.

3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Имейте представление о механизмах ферментативного катализа. Обратите 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

Г. N-гликозидные

Б. Водородные

Д. Сложноэфирные

В. Пептидные

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. Усвойте, 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

В. Обратимое неконкурентное

Б. Обратимое конкурентное

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. Усвойте 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. Термолабильность
Б. Чувствительность к различным ингибиторам
В. Электрофоретическая подвижность
Г. Молекулярная масса
Д. Катализ одной и той же реакции

3.3. К какому классу относится фермент креатинкиназа?

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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 относятся к одному классу
 В. Являются изоферментными формами
 Г. Осуществляют передачу нервных импульсов
 Д. Обладают групповой специфичностью

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1нет. 2А; 3Г.

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа

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%-ного раствора крахмала в миллилитрах, которое расщепляется 1 мл неразведенной слюны при 38 °С 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 6 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 6-й пробирки. Из 6-й пробирки отбирают 1 мл смеси и выливают. Во все пробирки добавляют по 2 мл 0,1 % раствора крахмала, перемешивают, встряхивая пробирки, и помещают в термостат при 38 °С на 30 мин. После инкубации в пробирки 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
	Пробирки					
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
Окраска раствора с йодом						
Выводы						

Пример расчета. 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%-ного раствора крахмала; 1 мл слюны расщепил x мл 0,1%-ного раствора крахмала, где A — количество неразведенной слюны. Например, желтая окраска появилась в четвертой пробирке, где слюна была разведена в 160 раз; 1/160 мл слюны расщепили 2 мл 0,1%-ного раствора крахмала; 1 мл неразведенной слюны расщепил x мл 0,1%-ного раствора крахмала:

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

Следовательно, амилазная активность $A_{38^\circ/30'}$ равна 320.

Расчет:

Вывод:

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 первые 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, 1 мл 0,85 % раствора хлорида натрия и помещают пробирку в термостат при температуре 37 °С на 2 мин. Через 2 мин 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.

Полученные данные и расчет:

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 6. ВОПРОСЫ 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 структуры белковой молекулы. Особенности структурной организации, разновидности, типы стабилизирующих связей.
4. Особенности строения и функционирования олигомерных белков на примере гемоглобина. Преимущества существования белков с четвертичной структурой.
5. Физико-химические свойства белков (молекулярная масса, растворимость, ионизация, ИЭТ). Денатурация белка, денатурирующие факторы, использование в медицине.
6. Гидролиз белка. Типы гидролиза, роль в организме. Практическое использование.
7. Методы выделения и очистки белков. Этапы исследования структуры белка.
 - Методы очистки белка от низкомолекулярных примесей. Высаливание и осаждение белков. Механизм и практическое использование.
 - Принципы разделения и очистки белков методами хроматографии (распределительной, ионообменной, аффинной, гель-хроматографией).
 - Ультрацентрифугирование. Принцип метода.
 - Электрофорез. Принцип метода, практическое применение. Электрофорез в полиакриламидном геле. Изоэлектрофокусирование.
 - Вестерн-блот. Основные этапы, практическое применение. Понятие «молекулярный зонд».
8. Сложные белки. Строение, классификация, биологическая роль каждого класса.
9. Функции белков и пептидов в организме.
10. Ферменты, классификация. Уметь назвать класс фермента и порядковый номер класса на основании приведенной реакции.
11. Свойства ферментов. Термоллабильность, специфичность, влияние рН и концентрации субстрата на активность фермента. Понятие о кинетике ферментативных реакций. Константа Михаэлиса.
12. Активность фермента, единицы измерения активности.
13. Активный центр и его строение.
14. Коферменты, классификация и роль.
15. Механизмы регуляции активности ферментов (обратимая и необратимая регуляция, изо-стерическая и аллостерическая регуляция, ковалентная модификация структуры фермента).
16. Изоферменты, примеры, биологическая роль.
17. Примеры использования ферментов и их регуляторов в медицинской практике. Им- мобилизованные ферменты. Применение ферментов в качестве аналитических реагентов.

Занятие 7. ВВЕДЕНИЕ В МЕТАБОЛИЗМ. ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА (ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ПВК, ЛИМОННОКИСЛЫЙ ЦИКЛ). ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦТК

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. Поскольку нарушения энергетического обмена лежат в основе патогенеза многих заболеваний, знание центральных путей метаболизма позволит провизорориентироваться в коррекции метаболических нарушений и понимать механизм действия лекарственных препаратов (кокарбоксилазы, сукцината и др.).

Цель занятия

Получить представление о метаболизме, анаболических и катаболических 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.

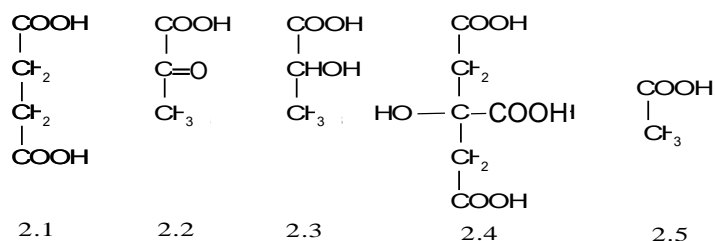
Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

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

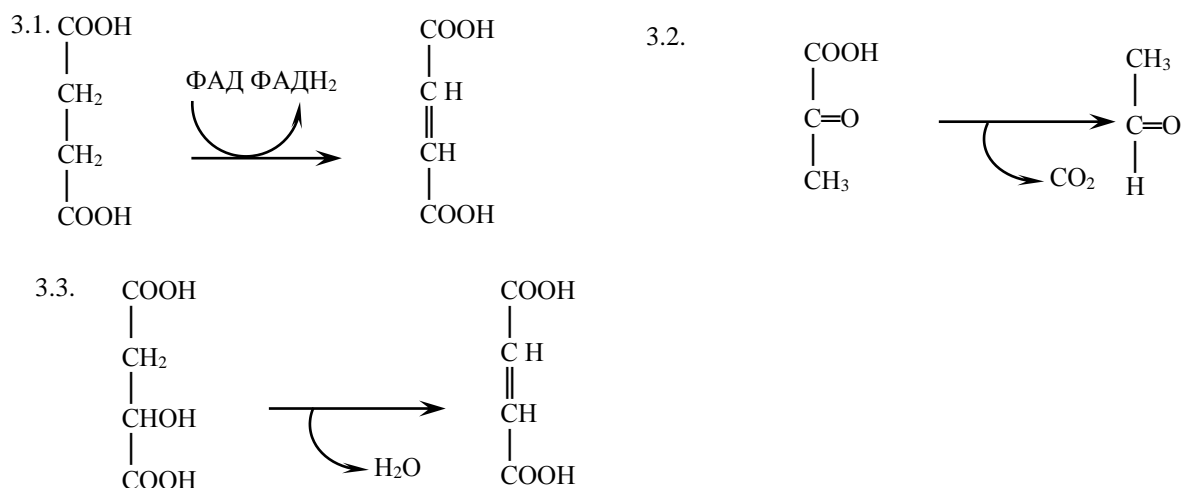
- А. Гидрохинон присоединил 2 электрона
- Б. Гидрохинон окислился
- В. Гидрохинон присоединил 2 атома водорода
- Г. Гидрохинон восстановился
- Д. Гидрохинон отдал 2 атома водорода

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

- А. Дикарбоновые кислоты
- Б. α -Кетокислоты
- В. Трикарбоновые кислоты
- Г. Монокарбоновые кислоты
- Д. Гидроксикислоты



Задание 3. К написанным ниже реакциям подберите ферменты. Укажите класс.



Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Понятие о метаболизме. 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 флаavinзависимые дегидрогеназы. Роль витаминов РР и В₂ в окислительно-восстановительных реакциях. Схематическое строение коферментов НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН.
4. Окислительное декарбоксилирование ПВК. Пируватдегидрогеназный комплекс (ферменты, коферменты, схема, регуляция).
5. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Локализация ферментов ЦТК, схема процесса, ферменты, коферменты.
6. 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.
7. Функции ЦТК: интегративная, катаболическая, анаболическая, энергетическая, водород-донорная. Регуляция. Анаплеротические реакции.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 113–133.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 33–42.
3. *Конспект лекций*.

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 — СО₂.
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 О₂.
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 В. Фумарат Д. Аконитат Ж. Сукцинат
Б. α-Кетоглутарат Г. Малат Е. Изоцитрат

Лабораторная работа

Работа 1. Изучение функционирования ЦТК по убыли 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:

Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
Фосфатный буфер pH=7,4	2,0	2,0
Р-р ацетил-КоА	0,5	0,5
Р-р оксалоацетата	0,5	0,5
Р-р малоновой кислоты	1,0	–
Физиологический р-р	–	1,0
Гомогенат печени	0,5	0,5
Инкубация 10 минут при комнатной температуре		
Реактив Фолина А	0,5	0,5
Реактив Фолина Б	0,5	0,5
Результат (окраска растворов):		

Вывод:

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:

Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
Фосфатный буфер pH=7,4	2,0	2,0
Р-р ацетил-КоА	0,5	0,5
Р-р оксалоацетата	0,5	0,5
Р-р малоновой кислоты	1,0	–
Инкубационный раствор	–	1,0
Р-р Ca(OH) ₂	1,0	1,0
Гомогенат печени	0,5	0,5
Инкубация 10 минут при комнатной температуре		
0,1н р-р серной кислоты	1,0	1,0
Результат (выделение углекислого газа):		

Вывод:

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:

Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
Фосфатный буфер pH=7,4	2,0	2,0
Р-р ацетил-КоА	–	0,5
Р-р ЦУК	–	0,5
Дистиллированная вода	1,0	–
Гомогенат печени	1,0	1,0
0,001н р-р ДХФИ	1,0	1,0
Инкубация 15–20 минут при комнатной температуре		
Результат (окраска растворов):		

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 8. ТКАНЕВОЕ ДЫХАНИЕ. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ. ФОТОСИНТЕЗ (СВЕТОВАЯ СТАДИЯ). ИЗУЧЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ. ОБНАРУЖЕНИЕ ОКСИДОРЕДУКТАЗ

Актуальность темы

Гетеротрофные и фотосинтезирующие организмы существуют в сбалансированном стационарном состоянии. Фотосинтезирующие растения улавливают солнечную энергию и запасают ее в форме АТФ и НАДФН⁺, используя эту энергию для синтеза углеводов и выделяя при этом кислород. Аэробные гетеротрофы используют этот кислород для расщепления богатых энергией органических продуктов фотосинтеза до СО₂ и Н₂О, чтобы генерировать таким путем АТФ. Знание этих процессов необходимо для понимания основного пути утилизации кислорода в клетке в норме и патологии. Гипоэнергетические состояния, возникающие в результате недостаточного поступления субстратов окисления, нарушения работы дыхательной цепи, разобщения тканевого дыхания и фосфорилирования лежат в основе развития многих патологических состояний.

Цель занятия

Получить представление о путях утилизации кислорода клетками, о локализации, строении и функционировании компонентов дыхательной цепи у человека и цепи переноса электронов фотосинтезирующих растений, об окислительном и фотосинтетическом фосфорилировании. Усвоить, что сопряжение дыхания и фосфорилирования служит основой нормального энергообеспечения клетки. Научиться применять эти знания при последующем изучении клеточного метаболизма.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Какие из приведенных утверждений не характеризуют АТФ?

- | | |
|--------------------------------------|--|
| А. Пуриновый нуклеотид | Г. Имеет две фосфоангидридные связи |
| Б. Универсальный макроэрг в клетках | Д. Является формой запасаения, хранения и передачи энергии в клетках |
| В. Имеет две гуанидинфосфатные связи | |

Задание 2. Какие из ниже перечисленных субстратов ЦТК не являются донорами водорода для дыхательной цепи?

- | | | |
|-------------|--------------|-----------------|
| А. Сукцинат | В. Изоцитрат | Д. Оксалоацетат |
| Б. Цитрат | Г. Фумарат | Е. Сукцинил-КоА |

Задание 3. Напишите формулу АТФ, обозначив макроэргические связи.

Задание 4. В цикле Кребса протекают четыре дегидрогеназные реакции:

- А. Изоцитрат → α -кетоглутарат В. Сукцинат → фумарат
Б. α -Кетоглутарат → сукцинил-КоА Г. Малат → оксалоацетат

4.1. Укажите соответствующий каждой реакции фермент

4.2. Укажите соответствующий каждой дегидрогеназе кофермент

4.3. Отнесите каждую дегидрогеназу к разряду либо пиридиновых, либо флавиновых дегидрогеназ.

Задание 5. Синтез АТФ из АДФ и фосфата с затратой энергии квантов солнечного света называется _____ фосфорилированием.

Задание 6. Существуют все указанные виды хлорофиллов, кроме:

- А. d Б. b В. a Г. c Д. s

Задание 7. Конечным продуктом световых реакций фотосинтеза являются:

- А. АТФ, вода, кислород В. НАДФН·Н⁺, АТФ, кислород
Б. АТФ, углеводы, кислород Г. НАДФН·Н⁺, вода, кислород

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Понятие о макроэргах. 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.

2. Тканевое дыхание (биологическое окисление). Отличия образования воды в процессе тканевого дыхания от такого же процесса *in vitro*.

3. Строение компонентов дыхательной цепи, комплексы ферментов, коферменты, механизм функционирования.

4. Схема дыхательной цепи. Сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования. Хемосмотическая теория Митчелла. Коэффициент фосфорилирования (Р/О). Н⁺-АТФ-синтаза. Регуляция работы дыхательной цепи и Н⁺-АТФ-синтазы.

5. Причины развития гипоэнергетических состояний. Разобщение окислительного фосфорилирования (механизм, разобщители). Ингибиторы переноса электронов и окислительного фосфорилирования.

6. Оксигеназный путь утилизации кислорода в клетках и его роль. Ферменты. Окисление в митохондриях. Схема цепи митохондриального окисления.

7. Фотосинтез: сущность процесса, стадии. Суммарная реакция фотосинтеза. Фотосинтезирующие структуры в клетке растений. Роль фотосинтеза для жизни на Земле.

8. Пигменты фотосинтеза. Фотосистемы I и II, общая схема переноса электронов. Фотосинтетическое фосфорилирование — основной путь образования АТФ в растительных клетках.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э.И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 134–157, 163–175.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 43–53.
3. *Конспект лекций*.

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 Н₂О 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 (микросомальное окисление).

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

Задание 2. Напишите схему дыхательной цепи для субстратов, дегидрируемых с участием ФАД. Рассчитайте 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 ($\Delta\mu\text{H}^+$)
- Г. Является произвольной

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

- | | |
|--|--------------------------|
| 1. НАДН· H^+ : убихинон 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 | Г. Азид натрия | Ж. Антимидин А |
| Б. СО | Д. Амитап (барбитуровая кислота) | З. Малонат |
| В. H_2S | Е. Ротенон | |

Задание 6. 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 |

Задание 7. Расположите в правильной последовательности переносчики в цепи переноса электронов, ведущей от P_{700} к НАДФ⁺, где P_{700} — реакционный центр фотосистемы I.

- | | |
|---------------------|--|
| А. Ферредоксин | В. Ферредоксин - НАДФ ⁺ - оксидоредуктаза |
| Б. P_{700} | Г. Филлохинон |

Задание 8. Расположите последовательно переносчики электронов в цепи, по которой электроны движутся от возбужденного реакционного центра фотосистемы II (P_{680}) к фотосистеме I (P_{700}).

- | | | |
|----------------|---------------|---------------------|
| А. Пластохинон | В. Цитохром f | Д. P_{680} |
| Б. Цитохром b5 | Г. Феофитин | Е. Пластоцианин |

Задание 9. Запомните, что фотосинтетическое фосфорилирование сходно с окислительным фосфорилированием. Это сходство проявляется в следующем:

1. Переносчики электронов и ферменты, участвующие в образовании АТФ, находятся на мембране тилакоидов;
2. Необходимым условием является целостность тилакоидных мембран;
3. Тилакоидная мембрана непроницаема для ионов H^+ ;
4. Фотофосфорилирование можно разобщить с переносом электронов при помощи реагентов, увеличивающих способность прохождения H^+ через мембрану;
5. Фотофосфорилирование можно блокировать *олигомицином*;
6. Синтез АТФ осуществляется «грибовидными» ферментными молекулами, находящимися на наружной поверхности тилакоидной мембраны.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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.
- 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 внутренней мембраны 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. 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 \rightarrow сукцинат | Г. 6 моль |
| 5. Сукцинат \rightarrow CO_2, H_2O | Д. 24 моль |

Задание 5. 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 митохондрий
- Е. Разобщение с участием 2, 4-динитрофенола

Задание 6. Какие соединения необходимо вводить при отравлении производными барбитуровой кислоты для восстановления тканевого дыхания на период выведения снотворного препарата из организма?

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

Задание 7. Напишите суммарное уравнение фотосинтеза. Умейте объяснить роль фотосинтеза для жизни на Земле.

Задание 8. Выберите верное утверждение:

- А. Фотосистема I после передачи электрона в уже окисленную фотосистему II получает электрон из реакции окисления воды в тилакоиде
 Б. В случае работы циклического пути переноса электронов в мембране тилакоида электроны с ферредоксина передаются на пластохинон
 В. Заполнение электронной вакансии в молекуле хлорофилла П680 происходит за счет хлорофилла П700
 Г. В результате работы фотосистемы I происходит окисление НАДФН·Н⁺

Задание 9. Выберите компоненты, входящие в состав фотосистемы II:

- А. Ферредоксин В. Хлорофилла
 Б. Цитохром f Г. Феофитин

Задание 10. В световую фазу фотосинтеза происходит:

- А. Синтез углеводов Б. Выделение углекислого газа
 В. Образование НАДФН·Н⁺
 Г. Образование электрохимического потенциала на мембране тилакоида
 Д. Синтез АТФ

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1В; 2Б, 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); **5** фотосинтетическое; **6 Д; 7В.**

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа

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 = 0,5–2,5). 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.

Схема постановки опыта:

Содержимое пробирок	Контрольная проба, мл	Опытные пробы, мл		
		1	2	3
Инкубационная смесь	1,0	1,0	1,0	1,0
Физиологический раствор	0,5	–	–	–
Раствор яблочной кислоты	–	0,5	–	–
Раствор янтарной кислоты	–	–	0,5	–
Раствор аскорбиновой кислоты + цитохром с	–	–	–	0,5
Суспензия митохондрий	0,5	0,5	0,5	0,5

Инкубация 10 мин при комнатной температуре, затем добавить:				
Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ)	1,0	1,0	1,0	1,0
Раствор молибдата аммония	0,5	0,5	0,5	0,5
Редуцирующий раствор Фиске и Субарроу	0,5	0,5	0,5	0,5
Содержимое всех пробирок разбавить водой в 8 раз (1 мл содержимого и 7 мл воды)				
Инкубация 10 минут				
Результат:				
1. Оцените интенсивность окраски по 4-балльной шкале:				
2. Коэффициент Р/О:				

Вывод:

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)
Раствор яблочной кислоты	0,5	0,5
Раствор 2,4-ДНФ	—	0,5
Физиологический раствор	0,5	—
Суспензия митохондрий	0,5	0,5
Инкубация 10 мин при комнатной температуре		
Раствор ТХУ	1,0	1,0
Раствор молибдата аммония	0,5	0,5
Редуцирующий раствор	1,0	1,0
Результат (интенсивность окраски):		

Вывод:

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%-ного раствора формальдегида и по капле 0,01%-ного раствора метиленовой сини. Пробирки встряхивают и закрывают пробками, чтобы создать относительно анаэробные условия.

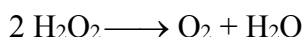
Пробирки помещают в термостат при 37 °С и отмечают через 5 мин постепенное обесцвечивание метиленовой сини.

Результат:

Вывод:

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:



каталаза

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

Результат:

Вывод:

Работа 5. *Открытие пероксидазы*

Как и каталаза, пероксидаза — гемсодержащий фермент. Пероксидаза катализирует окисление некоторых веществ (фенолы, ароматические амины) в присутствии перекиси водорода. 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 1-ю пробирку добавляют 1 каплю крови, во 2-ю — 1 каплю H_2O . Наблюдают за изменением окраски.

Результат:

Вывод:

Подпись преподавателя:

ЗАНЯТИЕ 9. ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ. ОБМЕН ГЛИКОГЕНА. ГЛИКОЛИЗ И СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ. ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОДУКТОВ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

Актуальность темы

Углеводы являются важнейшими органическими соединениями живых организмов. Главным источником углеводов для человека является пища. Многие заболевания сопровождаются нарушением переваривания и всасывания углеводов. 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. Знакомство с процессом гликолиза дает представление о возможностях энергетического обеспечения клеток в анаэробных условиях.

Цель занятия

Закрепить знания о структуре и функциях углеводов животных тканей и углеводов пищи. Сформировать представление о переваривании углеводов, транспорте глюкозы в клетки, о молекулярных механизмах депонирования и мобилизации гликогена, значении и регуляции этих процессов; усвоить анаэробные процессы окисления глюкозы и их значение.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Источником глюкозы для человека являются углеводы пищи, за исключением:

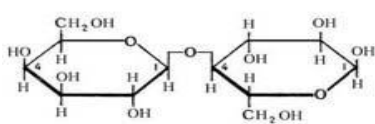
- А. Хитина Б. Гликогена В. Сахарозы Г. Мальтозы Д. Крахмала

Задание 2. Гликоген — это:

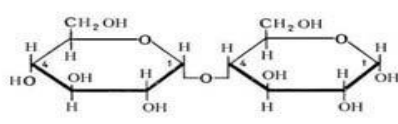
- А. Неразветвленный полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, связанных β -1,4- и β -1,6-гликозидными связями
Б. Сильно разветвленный полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, связанных α -1,4- и α -1,6-гликозидными связями
В. Линейный полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, связанных β -1,4-гликозидной связью
Г. Линейный полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, связанных α -1,6-гликозидной связью

Задание 3. Установите соответствие между структурой и названием дисахарида:

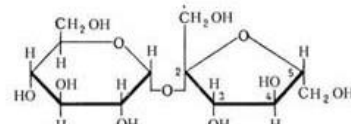
1. Мальтоза 2. Сахароза 3. Лактоза



А



Б



В

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте. Роль клетчатки и пектинов в питании человека.
2. Молекулярные механизмы всасывания продуктов переваривания углеводов. Транспорт глюкозы в клетки различных органов и тканей.
3. Синтез гликогена: назначение, последовательность реакций, энергозатраты, механизмы регуляции.
4. Фосфорилиз и гидролиз гликогена в печени и мышцах, последовательность реакций, регуляция.
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 глюкозы.

Литература для подготовки

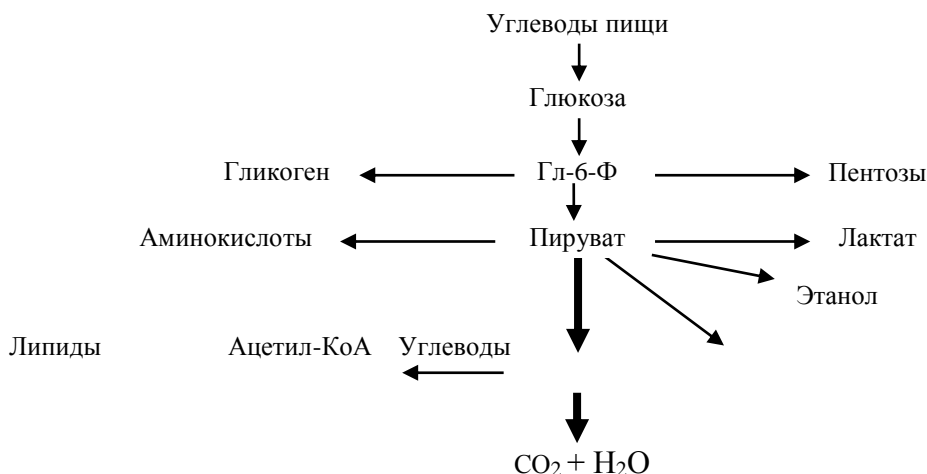
1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 178–208, 216–217.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 58–69.
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Выучите основные этапы переваривания углеводов в пищеварительном тракте. Усвойте, что в процессе переваривания углеводов происходит ферментативный гидролиз гликозидных связей. Запомните названия ферментов, принимающих участие в переваривании, и места их образования.

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

2.1. Рассмотрите схему превращения глюкозо-6-фосфата в клетках:



Задание 3. Запомните: а) из каких мономеров построен гликоген; б) какие связи соединяют мономеры в молекуле гликогена; в) в каких органах преимущественно откладывается гликоген.

3.1. Выучите 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. Запомните реакции синтеза и распада гликогена, катализируемые регуляторными ферментами.

3.3. Объясните молекулярный механизм перехода фосфорилазы и гликогенсинтазы из неактивного состояния в активное.

Задание 4. Гликолиз — серия реакций, в результате которых глюкоза распадается на две молекулы пирувата. Умейте писать эти реакции.

4.1. Обратите внимание на то, что:

а) в гликолизе можно выделить несколько этапов:

– подготовительный (активирование глюкозы и распад глюкозо-6-фосфата на две молекулы глицеральдегид-3-фосфата);

– гликолитическая оксидоредукция (окисление глицеральдегид-3-фосфата до пирувата в аэробных условиях или до лактата в анаэробных условиях);

б) большинство реакций гликолиза, за исключением трех, обратимы;

в) все промежуточные продукты находятся в фосфорилированном состоянии;

г) источником фосфата при гликолизе является АТФ;

д) образование АТФ при гликолизе идет путем субстратного фосфорилирования.

4.2. Сравните гликолиз со спиртовым брожением, установите сходства и различия.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Суточная норма углеводов в питании человека составляет:

А. 500 г Б. 50 г В. 200 г Г. 300 г Д. 1000 г

Задание 2. Выберите лекарственные средства, относящиеся к углеводам:

А. Лактулоза Б. Гепарин В. Глюкоза
Г. Метионин Д. Гиалуроновая кислота Е. Глутаминовая кислота

Задание 3. Выберите правильные ответы. Всасывание глюкозы из полости кишечника в энтероцит осуществляется путем:

- А. Фильтрации
- Б. Эндоцитоза
- В. Активного транспорта (с участием натрий-глюкозного транспортера)
- Г. Облегченной диффузии (с участием глюкозных транспортеров)
- Д. Пассивной диффузии

Задание 4. 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 5. Часть поступившей в организм глюкозы откладывается в виде гликогена. Какой фермент участвует в его синтезе?

- А. Глюкозо-6-фосфатаза
- Б. Фосфорилаза
- В. Гликогенсинтаза
- Г. α -1,4-гликозидаза
- Д. α -1,6-гликозидаза

Задание 6. Выберите правильный ответ. Аллостерическим активатором гликогенфосфорилазы в мышечной ткани является:

- А. Глюкозо-6-фосфат
- Б. АМФ
- В. АТФ
- Г. цАМФ
- Д. Кофеин

Задание 7. В гликолизе имеются реакции, приводящие к образованию макроэргических соединений. Укажите 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 8. Известно, что в гликолизе имеются реакции, сопряженные с синтезом АТФ путем субстратного фосфорилирования. Укажите такую реакцию:

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

Задание 9. В одной из реакций гликолиза образуется НАДН·Н⁺. 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

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1А 2Б; 3 (1– Б, 2 – В, 3– А).

Лабораторная работа

Обнаружение продуктов спиртового брожения глюкозы

Спиртовое брожение — ферментативный процесс распада глюкозы с образованием этилового спирта и углекислого газа: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$.

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, кофермент (ТПФ) пировиноградная кислота декарбоксилируется и превращается в уксусный альдегид, который восстанавливается в этиловый спирт под действием алкогольдегидрогеназы.

Порядок выполнения работы. Пробирку на $\frac{1}{3}$ заполняют раствором дрожжей, доливают доверху 5%-ный раствор глюкозы и закрывают корковой пробкой со стеклянной трубкой. Такой бродильный аппарат помещают в термостат при 37 °С на 30–50 минут (в зависимости от активности ферментов дрожжей). Когда в процессе брожения произойдет накопление газа в верхней части пробирки, прodelьывают качественные реакции на CO_2 и спирт.

1. *Обнаружение CO_2 .* В бродильный аппарат наливают 10%-ный раствор NaOH почти до краев пробирки и, закрыв отверстие большим пальцем, перемешивают ее содержимое. Углекислый газ поглощается щелочью, создавая вакуум, и палец присасывается к отверстию пробирки.

2. *Обнаружение этилового спирта.* Спирт можно открыть с помощью реакции получения йодоформа: $C_2H_5OH + 4I_2 + 6NaOH \rightarrow CHI_3 + 5NaI + HCOONa + 5H_2O$.

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

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 10. МЕТАБОЛИЗМ ПИРУВАТА. ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ. АЭРОБНЫЙ ПУТЬ РАСПАДА ГЛЮКОЗЫ ДО КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ (CO_2 И H_2O). МЕТАБОЛИЗМ ЭКЗОГЕННОГО ЭТАНОЛА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПВК В МОЧЕ

Актуальность темы

Содержание глюкозы в крови — основной биохимический показатель состояния углеводного обмена в организме. Знания о значении центральных метаболических путей, аэробных процессов обмена глюкозы для энергообеспечения клеток различных органов позволяют понять механизмы нарушения функций отдельных органов и систем при торможении этих процессов (гипогликемическая кома, ишемия и инфаркт миокарда и др.). Промежуточные продукты этих путей используются в качестве лекарственных препаратов (лимонная кислота, никотинамид, кокарбоксилаза, компоненты адениловой системы) для коррекции метаболических нарушений.

Цель занятия

Сформировать представление о взаимосвязи центральных путей метаболизма с аэробным окислением глюкозы. 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. Овладеть методом количественного определения пирувата в моче.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подберите 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. Укажите, 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. Укажите, 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 ответами.

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). Утилизация лактата клетками. Цикл Кори.
3. Глюконеогенез (назначение, субстраты, ключевые реакции и ферменты, регуляция, энергозатраты).
4. Аэробное окисление глюкозы до CO₂ и H₂O (этапы, сопряжение с процессом окислительного фосфорилирования, энергетика).
5. Метаболизм экзогенного этанола (пути, схема реакций). Механизм развития алкогольной гипогликемии и лактацидемии.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 208–216, 635–636.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие /А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 66–73.
3. *Конспект лекций.*

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Запомните, что аэробный распад глюкозы — это процесс полного окисления ее до CO₂ и H₂O. Он включает реакции аэробной дихотомии (сравнить с анаэробной) и последующее окисление пирувата в общем пути катаболизма.

1.1. Напишите реакции, катализируемые отдельными ферментами пируватдегидрогеназного комплекса.

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

а) напишите суммарное уравнение окислительного декарбоксилирования ПВК;

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.

Задание 3. Выучите:

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

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

в) основные субстраты и пути их включения в глюконеогенез.

Задание 4. Образовавшийся в кардиомиоцитах 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 ответами.

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 ЦУК | Г. 12,5 моль |

Задание 2. Подберите ферменты к соответствующим реакциям:

- 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 \leftrightarrow сукцинат + ГТФ + HS-КоА
 - Фумарат + H_2O \leftrightarrow 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 В. Пируватдегидрогеназа
Б. Пируваткарбоксилаза Г. Пируватдекарбоксилаза Д. Лактатдегидрогеназа

Задание 4. В глюконеогенезе имеются необратимые реакции. Выберите из перечисленных необратимую:

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

Задание 5. 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

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

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.

Лабораторная работа

Количественное определение пировиноградной кислоты в моче

Пировиноградная кислота — один из промежуточных продуктов углеводного обмена. В анаэробных условиях ПВК восстанавливается в лактат. В аэробных условиях ПВК под влиянием пируватдегидрогеназного комплекса (коферменты: ТДФ, 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 динитрофенилгидразиновой 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 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. Коэффициент пересчета в единицы СИ (мкмоль/сут) — 11,4.

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. Количество пировиноградной кислоты увеличивается после введения некоторых лекарств — камфоры, стрихнина, адреналина. При наркозе содержание этой кислоты в крови снижается.

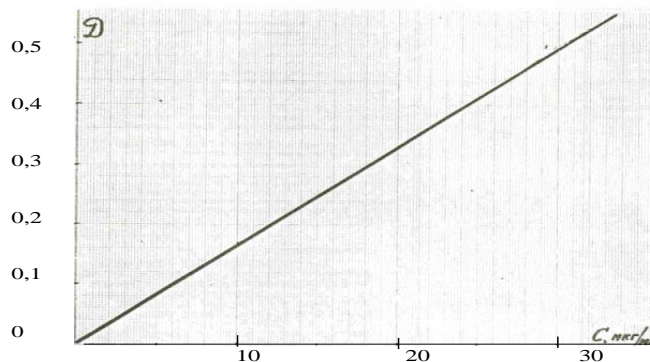
Результат: D =

C =

Расчет:

Вывод:

Подпись преподавателя:



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

ЗАНЯТИЕ 11. ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ И ГЛЮКУРОНОВЫЙ ПУТИ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ. ФОТОСИНТЕЗ (ТЕМНОВАЯ СТАДИЯ). РЕГУЛЯЦИЯ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность темы

Пентозофосфатный путь (ПФП) и глюкуроновый путь обмена глюкозы не приводят к синтезу АТФ. Они выполняют другие функции: 1) образование НАДФН·Н⁺ 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 в печени путем их связывания и выведения в виде глюкуроноидов (глюкуроновый путь). У растений, дополнительно к ПФП, образование углеводов происходит в цикле Кальвина в процессе темновой стадии фотосинтеза. Во время темновой фазы атомы водорода, поставляемые световыми реакциями, используются для синтеза углеводов из СО₂ и воды.

Концентрация глюкозы в крови поддерживается на постоянном уровне и находится под строгим гормональным контролем. Патологические изменения со стороны эндокринной системы (недостаток инсулина, избыток йодтиронинов и др.) сопровождаются нарушением углеводного обмена и приводят к гипергликемии и сахарному диабету.

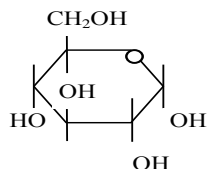
Цель занятия

Сформировать представление о значении пентозофосфатного и глюкуронового путей превращения глюкозы; усвоить роль гормональной регуляции обмена углеводов в поддержании концентрации глюкозы в крови. Овладеть глюкозооксидазным методом количественного определения глюкозы. Изучить биохимические превращения углерода в темновую фазу фотосинтеза.

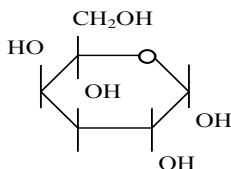
Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задания:

Задание 1. Напишите названия сахаров под соответствующими формулами:

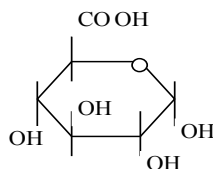
1.



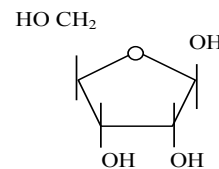
2.



3.



4.



Задание 2. Выберите правильные утверждения:

- | | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| А. Глюкоза является альдозой | Г. Рибоза является альдозой |
| Б. Дигидроксиацетон является альдозой | Д. Фруктоза является кетозой |
| В. Рибулоза является альдозой | |

Задание 3. Выберите правильные утверждения:

- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| А. Арабиноза — это пентоза | Г. Галактоза — это дисахарид |
| Б. Фруктоза — это гексоза | Д. Ксилулоза — это пентоза |
| В. Эритроза — это тетроза | |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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. Регуляция содержания глюкозы в крови. Механизмы регуляторного действия гормонов (инсулин, адреналин, глюкагон, глюкокортикоиды и др.).

4. Темновая стадия фотосинтеза (суммарное уравнение). Карбоксилирование рибулозо – 1,5 – бисфосфата, последовательность реакций до образования 3 – ФГА. Синтез углеводов в цикле Кальвина.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 217–225, 175–177.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 53–54, 74–78.
3. *Конспект лекций*.

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⁺.

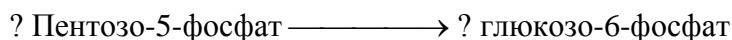
1.2. Запомните:

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, ксенобиотиков, в том числе лекарственных веществ
- 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

Задание 3. 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.

Задание 4. Подберите соответствующие пары гормон — механизм действия:

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

Задание 5. Механизмы действия адреналина на углеводный обмен включают:

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| А. Стимуляцию распада гликогена | Г. Гипогликемический эффект |
| Б. Подавление биосинтеза гликогена | Д. Стимуляцию гликогенеза |
| В. Гипергликемический эффект | |

Задание 6. Выберите правильный ответ. Субстратами для фотосинтетического образования углеводов являются:

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| А. АДФ, H_2O , кванты света | В. АТФ, CO_2 , НАДФН· H^+ , |
| Б. НАДФН· H^+ , АТФ, H_2O | Г. CO_2 , АТФ, H_2O |

Задание 7. Темновая фаза фотосинтеза называется:

- А. Окислительный цитратный цикл
- Б. Восстановительный пентозофосфатный цикл
- В. Окислительный пентозофосфатный цикл
- Г. Восстановительный глюкозофосфатный цикл

Задание 8. В фиксации CO_2 в процессе фотосинтеза участвует фермент:

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| А. Глюкозобисфосфаткарбоксилаза | В. Рибулозобисфосфаткарбоксилаза |
| Б. Рибулозобисфосфатдекарбоксилаза | Г. Пентозофосфаткарбоксилаза |

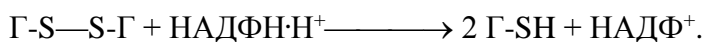
Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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 и развитие желтухи (лекарственная гемолитическая анемия). Причиной является нарушение в эритроцитах реакции восстановления дисульфидной формы глутатиона в сульфгидрильную:



Ход работы. Белки сыворотки крови осаждают депротеинизирующим реагентом. Глюкозу определяют в надосадочной жидкости после центрифугирования. Реактивы добавляют по следующей схеме:

	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл
В центрифужные пробирки вносят:		
Сыворотка крови	0,1	—
Стандартный раствор глюкозы	—	0,1
Депротеинизирующий раствор (3 % ТХУ)	1,0	1,0
Перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут		
В сухие пробирки вносят:		
Надосадочная жидкость	0,2	0,2
Рабочий раствор ферментов	2,0	2,0
Перемешивают и инкубируют реакционную смесь 10 мин при 37 °С		

По окончании инкубации измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб на ФЭК (длина волны 490–540 нм) в кюветах с толщиной слоя 5 мм против контроля.

Контрольная проба содержит 0,2 мл депротеинизирующего раствора и 2,0 мл рабочего раствора ферментов. Контрольную пробу можно готовить одну на группу.

Расчет производят по формуле:

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

где $C_{\text{оп.}}$ — концентрация глюкозы в крови (ммоль/л); $C_{\text{ст.}}$ — концентрация глюкозы в стандартном растворе (5,5 ммоль/л); $E_{\text{оп.}}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{\text{ст.}}$ — экстинкция стандартной пробы.

Нормальные величины концентрации глюкозы в плазме и сыворотке крови — 3,9–6,1 ммоль/л, в спинномозговой жидкости — 2,78–3,89 ммоль/л.

Результаты: $E_{\text{оп.}} =$ $E_{\text{ст.}} =$

$C_{\text{оп.}} =$

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.

Вывод:

Подпись преподавателя:

ЗАНЯТИЕ 12. ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ: «ВВЕДЕНИЕ В МЕТАБОЛИЗМ И БИОЭНЕРГЕТИКУ», «ОБМЕН УГЛЕВОДОВ», «ФОТОСИНТЕЗ»

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

2. Адениловая система, ее компоненты, роль в клетке. Виды синтеза АТФ в клетке и способы 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? 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 катаболизма. Функции ЦТК. Что такое анаэробные реакции (пример)? Нарисовать 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. Катаболическая функция цикла Кребса. Уметь рассчитать и показать на схеме, сколько АТФ синтезируется в митохондриях при окислении различных субстратов до конечных продуктов:

а) тир → фумарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;

е) фен → ацетил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;

б) про → α -кетоглутарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;

ж) вал → сукцинил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;

в) асп → оксалоацетат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;

з) гис → α -кетоглутарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;

г) арг → α -кетоглутарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;

и) иле → сукцинил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

д) мет → сукцинил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;

5. Виды биологического окисления. Витамины РР и В₂ как участники окислительно-восстановительных реакций. Уметь рисовать блок-схемы НАД⁺, НАДФ⁺, ФМН и ФАД. Кислородный путь утилизации кислорода в клетках. Ферменты. Окисление в микросомах. Схема микросомной цепи. Сравнить оксидазный и оксигеназный пути утилизации кислорода. Роль этих процессов в клетке.

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. Уметь рассчитать 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.

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. Лактулоза и обоснование её использования в питании. Роль пищевых волокон (клетчатка, пектины) в питании человека. Механизмы всасывания углеводов в кишечнике. Углеводы как лекарственные средства (примеры).

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.

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 глюкозы в молекулы гликогена. Гормональная регуляция гликогенеза.

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. 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 (расчет провести для анаэробных условий).

19. Пентозофосфатный путь распада глюкозы, этапы, ключевые ферменты, биологическая роль, регуляция.

20. Изобразить схематически образование УДФ-глюкозы. Значение глюкуронового пути расщепления глюкозы в печени и фибробластах.

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

22. Фотосинтез. Суммарное уравнение. Пигменты фотосинтеза. Характеристика световой стадии. Нециклический и циклический перенос электронов в фотосистемах. Образование протонного градиента в тилакоидах. Фотофосфорилирование. Конечные продукты световой стадии.

23. Характеристика темновой стадии фотосинтеза. Синтез углеводов в цикле Кальвина (схема, ключевая реакция). Суммарное уравнение.

Занятие 13. ОБМЕН ЛИПИДОВ: ПЕРЕВАРИВАНИЕ, ВСАСЫВАНИЕ, РЕСИНТЕЗ. ТРАНСПОРТ ЭКЗОГЕННЫХ ЛИПИДОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗ

Актуальность темы

Липиды — разнообразная по химическому строению группа органических веществ биологического происхождения, и важная составная часть пищевых продуктов не только вследствие высокой энергетической ценности, но также и потому, что в жирах содержатся жирорастворимые витамины и полиненасыщенные жирные кислоты. Такие жирные кислоты в организме являются предшественниками 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.

Липиды — гидрофобные соединения, их присутствие в кровотоке возможно только в виде специальных транспортных форм — липопротеинов. Нарушения образования липопротеинов (или их утилизации) являются причинами развития гипо- и гиперлипидемий.

Цель занятия

Закрепить знания по химии липидов. Усвоить молекулярные механизмы переваривания и всасывания липидов пищи, ресинтеза липидов, транспорта экзогенных липидов по кровеносному руслу. Изучить влияние желчи на активность панкреатической липазы.

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 | В. Фосфатидилхолин | |
| Б. Триацилглицерол | 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-линолеил-3-стеароилглицерола. Это соединение:

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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. Применение липидов и их компонентов в качестве лекарственных препаратов. Строение липосом, их применение.

3. 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.

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

5. Ресинтез триацилглицеролов и глицерофосфолипидов в энтероцитах. Транспортные формы липидов в крови. Строение и метаболизм хиломикронов.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 226–254.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 82–87.
3. *Конспект лекций*.

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 гормонов, витамина Д ₃ , желчных кислот |
| Г. Полиненасыщенные жирные кислоты | 4. Предшественники эйкозаноидов |
| Д. Фосфолипиды | 5. Терморегуляция |
| Е. Гликолипиды | |

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 | В. Гликохолевая | Д. Дезоксхолевая |
| Б. Хенодезоксхолевая | Г. Литохолевая | |

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.

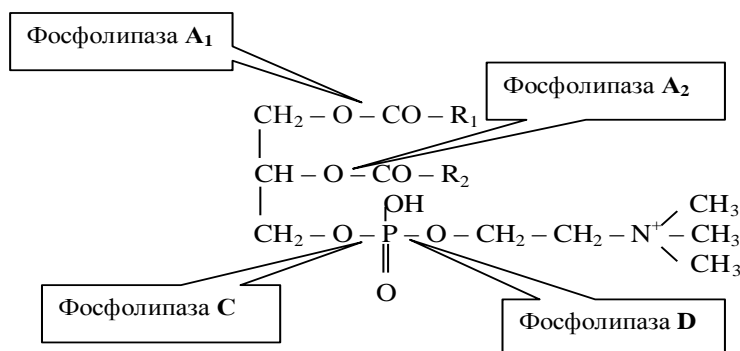
Задание 3. Эмульгирование гидрофобных жиров — одно из условий эффективной работы панкреатической липазы. Напишите в общем виде реакцию поэтапного гидролиза ТАГ

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. Мицеллы
 Б. Липосомы
 В. Секреторные гранулы
 Г. Триацилглицеролы

3.1. 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 всосавшихся 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 всосавшиеся жирные кислоты, но и жирные кислоты, синтезированные в слизистой кишечника.

Задание 5. Ознакомьтесь с общим принципом строения липопротеиновых частиц и расположите компоненты в составе хиломикрона:

- | | |
|------------------------------|-------------------------|
| 1. Внутренняя часть (ядро) | А. Эфиры холестерина |
| 2. Наружная часть (оболочка) | Б. Триацилглицеролы |
| | В. Фосфолипиды |
| | Г. Свободный холестерол |
| | Д. Апо В-48 |

Задание 6. 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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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 В. Желудке Д. Пищевоме
Б. Толстом кишечнике Г. Тонком кишечнике

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 Г. Панкреатическая липаза
Б. Холестерол и его эфиры Д. Диацилглицеролы
В. Соли желчных кислот 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 Г. Панкреатической липазы
Б. Холестеролэстеразы Д. Фосфолипазы
В. Липопротеинлипазы

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

- А. Фосфолипаза А₁ В. Панкреатическая липаза
Б. Фосфолипаза А₂ Г. Гормон-чувствительная липаза

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

1(А – 2, 3; Б – 1, 5; В – 1; Г – 4; Д – 2; Е – 2); 2В; 2.1 (А – 1; Б – 1; В – 1; Г – 2; Д – 2); 3А; 4. Верно. 5(1–А, Б; 2–В, Г, Д); 6Б, В, Г.

Лабораторная работа

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 два стаканчика наливают по 10 мл молока. В 1-й стаканчик приливают 1 мл воды, а во 2-й — 1 мл желчи. Затем в каждый стаканчик добавляют по 1 мл 10 % раствора панкреатина (сока поджелудочной железы, который содержит липазу). Жидкость в стаканчиках быстро перемешивают. Из каждого стаканчика отбирают по 1 мл смеси в колбы, добавляют 1–2 капли 0,5 % раствора фенолфталеина и титруют 0,05 н раствором NaOH до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд. Полученное значение титрования — это «время реакции «0». Оба стаканчика помещают в термостат при 38 °С. Через каждые 10 минут из стаканчиков отбирают по 1 мл смеси в чистые колбы и титруют 0,05 н раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до слабо-розовой окраски. Проводят 5 таких определений.

При построении графиков из каждого полученного значения вычитают величину, полученную при первом титровании («время реакции «0»). В этом случае кривые пройдут через начало координат, так как вычитается результат титрования исходного количества жирных кислот, присутствовавших в молоке. На основании полученных данных строят две кинетические кривые, отражающие процесс гидролиза жира под действием фермента липазы в зависимости от наличия или отсутствия желчи.

Результаты:

№ стаканчика	Результат титрования	Время инкубации					
		0 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин
1. Контроль (с водой)	Объем NaOH, мл						
2. Опыт (с желчью)	Объем NaOH, мл						



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 °С 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:

Занятие 14. ДЕПОНИРОВАНИЕ И МОБИЛИЗАЦИЯ ЛИПИДОВ. ОБМЕН ХОЛЕСТЕРОЛА. ТРАНСПОРТ ЛИПИДОВ КРОВЬЮ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ В-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 D, желчных кислот. Холестерол присутствует в пищевых жирах и может синтезироваться многими тканями. Механизм его синтеза находится под строгим метаболическим контролем. С нарушением обмена липидов и холестерина связаны такие заболевания, как ожирение, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, желчнокаменная болезнь.

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.

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 миристиновый спирт. Какое вещество исследовалось?

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

Правильность решения проверьте, сопоставив его с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Синтез ТАГ и глицерофосфолипидов в печени и жировой ткани (химизм, общие этапы синтеза, различия).

2. Мобилизация липидов из жировой ткани (схема, жировая ТАГ-липаза, гормон-чувствительная липаза, их активация и регуляция). Роль депонирования и мобилизации жиров.

3. Холестерол, биологическая роль, пищевые источники. Выведение холестерина из организма, желчные кислоты как основной конечный продукт обмена холестерина, представление о желчнокаменной болезни. Биосинтез холестерина (тканевая и субклеточная локализация, субстраты, этапы, химизм I этапа, регуляция).

4. Транспортные формы липидов в крови. Строение и метаболизм ЛПОНП, ЛПВП, ЛПНП, ЛПВП. Механизм развития жирового перерождения печени. Липотропные факторы.

5. Механизмы поддержания баланса холестерина в клетках. Транспорт холестерина (ЭХ) во внепеченочные клетки, роль апоВ₁₀₀. Роль ЛПВП и ЛХАТ в разгрузке клеток от избытка холестерина. Метаболизм эфиров холестерина, роль АХАТ, холестеролэстеразы.

6. Биохимия атеросклероза. Основы профилактики и диагностики атеросклероза (индекс атерогенности).

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 255–264, 265–270, 285–289.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 87–91, 98–101.
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Вспомните, 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 хиломикрон | Г. В виде стероидных гормонов |
| Б. В виде солей желчных кислот | Д. Расщепляется до ацетил-КоА |
| В. Выделение с фекалиями | |

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

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

Задание 3. Знайте 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. Выберите, в какой форме пищевой холестерол поступает в кровоток:

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

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

4.1. Какой фермент осуществляет внутриклеточный липолиз?

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

4.2. Каким гормоном активируется этот фермент?

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. 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. Каким гормоном регулируется скорость мобилизации жиров при изменении режима питания?

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

Задание 4. 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 хиломикрон
Г. Повышенная активность гормон-чувствительной липазы
Д. Повышенная активность липопротеинлипазы

Задание 5. 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 6. Сравните биосинтез триацилглицеролов 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 |

Задание 7. 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		

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний: 1Г.

Для самостоятельной работы: 1.1(Б, В); 2.1Да; 3.1Г; 4.1Б; 4.2 Б.

Лабораторная работа

Определение содержания β -липопротеинов (липопротеинов низкой плотности) в плазме крови

Большинство липидов находятся в крови не в свободном состоянии, а в составе белково-липидных комплексов (липопротеинов). Фракции липопротеинов отличаются по относительной молекулярной массе, количеству белка, процентному содержанию отдельных липидных компонентов. При электрофоретическом разделении липопротеинов плазмы крови (на хроматографической бумаге, ацетатцеллюлозе, агаре, в полиакриламидном геле) получают фракции хиломикрон и липопротеинов различной плотности: α -липопротеины (ЛПВП) имеют подвижность α -глобулинов, β -липопротеины (ЛПНП) обладают подвижностью β -глобулинов. Пре- β -липопротеины (ЛПОНП) на электрофореграмме располагаются от линии старта перед β -липопротеинами, поэтому у них такое название.

Определение содержания β -липопротеинов в плазме крови имеет значение для диагностики атеросклероза, острых и хронических заболеваний печени, ксантоматоза и других патологий.

Принцип метода. В основу метода положена способность β -липопротеинов (ЛПНП) осаждаться в присутствии хлорида кальция и гепарина; при этом изменяется мутность раствора. По степени помутнения раствора, которую определяют спектрофотометрическим методом, судят о концентрации β -липопротеинов в сыворотке крови.

Ход работы. В пробирку вносят 2 мл 0,025М раствора CaCl_2 и 0,2 мл сыворотки крови, перемешивают. Определяют оптическую плотность раствора (E_1) против раствора CaCl_2 в кюветах толщиной 5 мм при красном светофильтре (630 нм). В кювету добавляют 0,1 мл раствора гепарина, перемешивают и точно через 4 мин снова определяют оптическую плотность раствора (E_2) в тех же условиях.

Расчет. Вычисляют разность оптических плотностей и умножают ее на 10 — эмпирический коэффициент, предложенный Ледвиной, т. к. построение калибровочной кривой сопряжено с рядом трудностей (x (г/л) = $(E_2 - E_1) \cdot 10$).

В норме содержание β -липопротеинов (ЛПНП) составляет **3–4,5 г/л**. Содержание β -липопротеинов колеблется в зависимости от возраста и пола.

Полученные данные и расчет: $E_1 =$ $E_2 =$

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 15. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН ЖИРНЫХ КИСЛОТ. КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность темы

Жирные кислоты — неотъемлемый составной компонент большинства липидов. 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.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

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 | В. Угольная кислота | Д. Уксусная кислота |
| Б. Янтарная кислота | Г. Ацетоуксусная кислота | |

Задание 3. Из какого предшественника может образоваться β-гидроксibuтират?

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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. β-окисление жирных кислот с нечетным количеством углеродных атомов, ненасыщенных жирных кислот. Особенности β-окисления в пероксисомах.

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

3. Высоконеопредельные жирные кислоты как незаменимые факторы питания: представители, биологическая роль. Метаболизм арахидоновой кислоты. Биосинтез эйкозаноидов (простагландины, простаглицлины, лейкотриены, тромбоксаны) и их биологическая роль.

4. Кетогенез: тканевая и субклеточная локализация, субстраты, химизм. Молекулярные механизмы кетонемии при сахарном диабете, недостаточном углеводном питании, голодании. Утилизация кетоновых тел (взаимопревращения, активация, включение в метаболизм, энергетика окисления).

5. Ацетил-КоА как центральный метаболит. Пути его потребления в клетках. Взаимосвязь липидного и углеводного обмена. Пути превращения глицерола в клетках. Энергетический баланс окисления глицерола.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 264–265, 270–285, 290–295.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 92–97.
3. *Конспект лекций*.

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·Н⁺) 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 CO₂ и H₂O.

В. Напишите реакции катаболизма глицерола (глицерол → фосфоглицерол → диоксиацетонфосфат → глицеральдегидфосфат) до CO₂ и H₂O.

Г. Рассчитайте количество АТФ, образующееся при окислении одной молекулы глицерола до CO₂ и H₂O.

Д. Рассчитайте суммарный выход АТФ при полном окислении трипальмитоилглицерола.

1.2. При каком условии активируется β -окисление жирных кислот?

А. При уменьшении синтеза малонил-КоА в цитозоле.

Б. При увеличении концентрации НАДН·Н⁺ 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

Б. 18:1 (9)

и должны поступать с пищей

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. Изучите пути образования кетоновых тел в печени и их метаболизм. Обратите 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. Рассчитайте энергетический эффект (в моль АТФ) окисления 1 моль ацетоацетата до CO_2 и H_2O .

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 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		

Задание 2. 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 3. 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

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний: 1(1 – Д; 2 – В; 3 – Г; 4 – А); 2Г; 3Б.

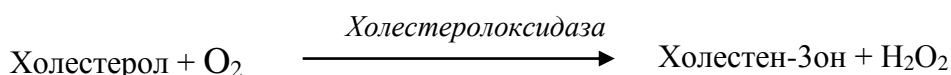
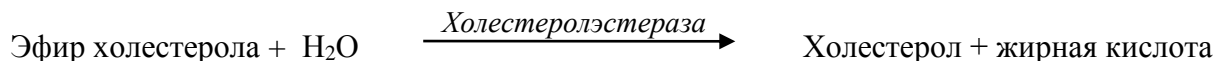
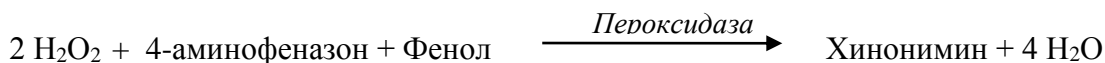
Для самостоятельной работы:

- 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.

Лабораторная работа

Работа 1. **Определение концентрации холестерина в сыворотке крови ферментативным методом**

Принцип метода. Определение холестерина после его ферментативного гидролиза и окисления. Индикатором является хинонимин, образуемый из перекиси водорода и 4-аминофеназона в присутствии фенола и пероксидазы.



Образующийся продукт имеет розовую окраску. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации холестерина и измеряется фотометрически.

Схема постановки опыта:

	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл
В пробирки вносят:		
Сыворотка крови	0,02	—
Стандартный раствор холестерина	—	0,02
Рабочий раствор ферментов	2,0	2,0
Перемешивают и инкубируют реакционную смесь 10 мин при комнатной температуре		

По окончании инкубации измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб на ФЭК (длина волны 540 нм) в кюветах с толщиной слоя 5 мм против контроля.

Контрольная проба содержит 2,0 мл рабочего раствора ферментов. Контрольную пробу можно готовить одну на группу.

Расчет. Схолест. (ммоль/л) = $5,17 \times (E_{\text{оп}} / E_{\text{станд.}})$

Норма холестерина в сыворотке крови 3,1–5,2 ммоль/л

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

Полученные данные и расчет: $E_{оп} =$

$E_{станд} =$

Вывод:

Работа 2. Качественные реакции на ацетон и ацетоуксусную кислоту

1. Проба Легалья на ацетон. Ацетон в щелочной среде образует с нитропруссидом натрия оранжево-красное окрашивание. После подкисления концентрированной уксусной кислотой образуется соединение вишневого цвета.

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

Результат:

2. Реакция Герхардта на ацетоуксусную кислоту. К 5 каплям мочи прибавляют по каплям 5%-ного 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.

Результат:

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

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 16. ВОПРОСЫ 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. Уметь писать химические формулы ацилглицеролов, фосфатидной кислоты, фосфатидилинозита, лизолецитина, фосфатидилэтанолamina, фосфатидилсерина, фосфатидилхолина, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот, блок-схемы строения церамида, цереброзидов и ганглиозидов, сфингомиелина.

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

3. Уметь писать реакции β -окисления жирных кислот с четным и нечетным числом углеродных атомов, подсчитывать энергетический выход полного окисления отдельных жирных кислот и ацилглицеролов. Какие жирные кислоты подвергаются β -окислению в пероксисомах? Отличие β -окисления в митохондриях и пероксисомах.

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

5. Пути высвобождения арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов (схема) и пути ее использования. Ингибиторы фосфолипазы A_2 .

6. Виды эйкозаноидов и их функции в организме. Механизм действия противовоспалительных лекарственных препаратов нестероидной природы.

7. Биосинтез жирных кислот (внутриклеточная локализация, происхождение исходных субстратов, химизм, условия, при которых активируется синтез, ключевые ферменты, регуляция). Уметь рассчитывать затраты глюкозы (молекул) на синтез данного триацилглицерола.

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

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

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

11. Синтез холестерина в клетках (схема). Регуляция этого процесса, направленная на защиту клетки от перегрузки холестерином. Составляющие механизма поддержания баланса холестерина в клетках, роль апо A_1 , апо D, апо B-100, ЛХАТ, клеточных рецепторов, остатков хиломикрон, ЛППП и ЛПВП.

12. Факторы, способствующие высокому уровню холестерина в составе ЛПВП, в составе ЛПНП. Вероятный механизм участия холестерина в развитии атеросклероза. Подходы к снижению его уровня в крови.

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

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

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

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

17. Месторасположение действия фосфолипаз A_1 , A_2 , C и D на структуру фосфолипидов. Реакции синтеза лецитина. Липотропные факторы, их роль в нарушении синтеза глицерофосфолипидов в печени. Механизм развития жирового перерождения печени. Липотропные факторы как лекарственные препараты.

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

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

20. Понятие «кетоз», механизмы его происхождения при сахарном диабете, голодании.

ЗАНЯТИЕ 17. КОНТРОЛЬ ПРАКТИЧЕСКИХ НАВЫКОВ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА И ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность темы

Качественный и количественный биохимический анализ находит широкое применение в клинических и аналитических исследованиях. Так, биуретовая реакция лежит в основе метода количественного определения общего белка в сыворотке крови. Количественное определение концентрации глюкозы в сыворотке крови является важным показателем нарушения углеводного обмена и диагностики сахарного диабета.

Цель занятия

Закрепить приобретенные практические навыки качественного и количественного биохимического анализа. Проведением определения содержания общего белка и глюкозы в сыворотке крови проверить умение студентов применять методы количественного анализа для решения прикладных аспектов медицины и фармации.

Работы выполняются по индивидуальным заданиям с последующим оформлением протоколов.

Работа 1. *Количественное определение общего 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 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.

Результат: $E_{\text{оп}} =$ $E_{\text{ст}} =$

Расчет:

Вывод:

Работа 2. Количественное определение концентрации глюкозы в сыворотке крови ферментативным методом

Ход работы: см. Инструкцию к практическому занятию № 11 «Количественное определение концентрации глюкозы в сыворотке крови ферментативным методом». Контрольную пробу можно готовить одну на группу.

Результат: $E_{оп} =$ $E_{ст} =$

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

где $C_{оп}$ — концентрация глюкозы в исследуемой сыворотке; $C_{ст}$ — концентрация глюкозы в стандартном растворе (5,5 ммоль/л); $E_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы; $E_{ст}$ — оптическая плотность стандартной пробы.

Вывод:

Подпись преподавателя:

ЗАНЯТИЕ 18. АЗОТИСТЫЙ БАЛАНС. ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ. ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В КЛЕТКЕ. АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Актуальность темы

Об обмене белков судят по азотистому балансу — разнице между поступлением азота в составе белков пищи и выделению азота из организма. Белки пищи могут быть использованы организмом человека только после предварительного переваривания и расщепления в пищеварительном тракте до свободных аминокислот. От переваривания зависит полноценное снабжение организма азотом и незаменимыми аминокислотами. Существует два типа распада белков (протеолиза) — тотальный (неограниченный), при котором белки распадаются до аминокислот, и ограниченный (частичный), при котором отщепляется несколько аминокислот. Катализируют этот процесс — протеазы. Ограниченный протеолиз имеет регуляторное значение (активация ферментов, гормонов белковой природы, системы свертывания крови, системы комплемента и другие процессы). 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.

Цель занятия

Сформировать представление об обмене белка в организме 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. Освоить методы клинического анализа желудочного сока.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Выберите правильный ответ. К незаменимым аминокислотам относятся:

- | | |
|-------------------------|----------------|
| А. Аланин | Г. Метионин |
| Б. Валин | Д. Тирозин |
| В. Глутаминовая кислота | Е. Фенилаланин |

Задание 2. 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 3. Выберите, какая из перечисленных реакций протекает с участием НАД⁺-зависимого фермента:

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

Задание 4. Активация какого типа химических реакций лежит в основе энзимотерапии, которая проводилась для рассасывания послеоперационных рубцов трипсином (лекарственный препарат трипсин вводили путем электрофореза)?

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Что такое азотистый баланс? Какие виды азотистого баланса имеют место в норме и при 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. Процессы гниения белков в кишечнике. Продукты гниения белков и их обезвреживание.
7. Всасывание аминокислот, транспорт аминокислот в клетки.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 309–320.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 103–106
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1.1. Запомните основные этапы переваривания белков:

- А. В желудке
- Б. В просвете тонкого кишечника
- В. «Пристеночное» переваривание

1.2. Запомните ферменты, участвующие на каждом этапе переваривания белков, найдите специфичность их действия, рН-оптимум, механизм активации.

1.3. Усвойте, что конечным результатом переваривания белков является образование набора аминокислот, легко проникающих в клетки слизистой посредством активного транспорта.

1.4. Умейте 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

Задание 4. Какие ферменты относятся к экзопептидазам?

А. Карбоксипептидазы А и В

Б. Пепсин

В. Аминопептидаза

Г. Трипсин

Д. Эластаза

Задание 5. К протеолитическим ферментам относятся все перечисленные ниже, кроме:

А. Аланинаминотрансфераза

Б. Пепсин

В. Трипсин

Г. Аминопептидаза

Д. Эластаза

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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 гипоацидном 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. Препарат контрикал — конкурентный ингибитор панкреатических ферментов назначается при остром панкреатите, при котором вследствие внутриклеточной активации панкреатических ферментов происходит разрушение тканей. 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

Задание 4. Выберите аминокислоты, которые применяются в качестве лекарственных препаратов:

- А. Метионин
- Б. Глицин
- В. Аланин
- Г. Глутаминовая кислота
- Д. Пролин

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний: 1Б, Г, Е; 2Г; 3А; 4В.

Для самостоятельной работы: 1.5 (А, Б, В, Г); 2Г; 3А, Б, В; 4А, В; 5А.

Лабораторная работа

Работа 1. *Количественное определение кислотности желудочного сока*

Принцип метода. Общую кислотность желудочного сока измеряют в миллилитрах 0,1н раствора NaOH, 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 NaOH, 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.

Результаты:

	Свободная НСІ	Связанная НСІ	Общая кислотность
Желудочный сок №1	$A_1 =$ $X \text{ (ммоль/л)} =$	$A_2 =$ $A_2 - A_1 =$ $X \text{ (ммоль/л)} =$	$A_3 =$ $X \text{ (ммоль/л)} =$
Желудочный сок №2	$A_1 =$ $X \text{ (ммоль/л)} =$	$A_2 =$ $A_2 - A_1 =$ $X \text{ (ммоль/л)} =$	$A_3 =$ $X \text{ (ммоль/л)} =$
Желудочный сок №3	$A_1 =$ $X \text{ (ммоль/л)} =$	$A_2 =$ $A_2 - A_1 =$ $X \text{ (ммоль/л)} =$	$A_3 =$ $X \text{ (ммоль/л)} =$

Вывод:

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.

Вывод:**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 рН 4,9 и температуре 25 °С 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.

Полученные данные и расчет:

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.

Вывод:

Подпись преподавателя:

ЗАНЯТИЕ 19. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА КРОВИ И МОЧЕВИНЫ В МОЧЕ

Актуальность темы

При декарбоксилировании аминокислот образуются биогенные амины — триптамин, серотонин, гистамин, ГАМК, играющие важную роль в организме. Общие пути превращения аминокислот по аминокгруппе включают реакции дезаминирования и трансаминирования (переаминирования). В ходе реакций переаминирования происходит распад аминокислот, синтез новых аминокислот и обеспечивается взаимосвязь реакций углеводного и белкового обмена. Реакции дезаминирования приводят к образованию аммиака. Образующийся в процессе метаболизма аммиак является токсичным соединением, в первую очередь для центральной нервной системы. Нарушение процессов его связывания и обезвреживания ведет к гипераммониемии, развитию коматозного состояния и смерти больного.

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

Усвоить общие пути обмена аминокислот. Получить представление о путях обмена безазотистого остатка аминокислот, о роли аминокислот в образовании важных биологически активных соединений. Уметь объяснить значение в обмене веществ каждой аминокислоты, применяемой в качестве лекарственного средства. Изучить процессы обезвреживания аммиака в организме и возможные механизмы развития гипераммониемии.

Приобрести навыки количественного определения остаточного азота крови и мочевины в моче и усвоить диагностическую ценность этих показателей.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Активность каких процессов снижается при недостатке тиамина?

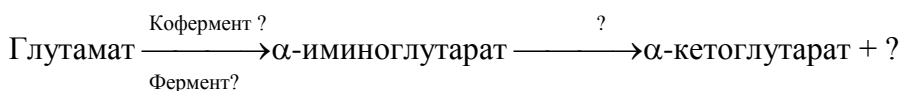
- А. Трансаминирование аминокислот
- Б. Декарбоксилирование аминокислот
- В. Окислительное декарбоксилирование α -кетокилот
- Г. Окислительное дезаминирование аминокислот

Задание 2. Вспомните классификацию ферментов. Ферменты каких классов участвуют в катализе реакций дезаминирования, переаминирования, декарбоксилирования аминокислот?

Задание 3. Назовите ферменты, катализирующие в организме человека реакции окислительного дезаминирования аминокислот:

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| А. Оксидаза D-аминокислот | Г. Глутаматдекарбоксилаза |
| Б. Оксидаза L-аминокислот | Д. Глутаматдегидрогеназа |
| В. Моноаминоксидаза (MAO) | Е. Аланинаминотрансфераза |

Задание 4. Дополните схему реакции окислительного дезаминирования глутамата недостающими компонентами:



- | | | | |
|----------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| А. Глутаматдекарбоксилаза | Г. НАД ⁺ | Ж. Н ₂ O | К. NO ₂ |
| Б. Глутаматдегидрогеназа | Д. ФАД | З. NH ₃ | |
| В. Аспаратаминотрансфераза | Е. ФМН | И. CO ₂ | |

Задание 5. 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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Аминокислотный фонд клетки — его источники и использование.
2. Декарбоксилирование аминокислот, ферменты, кофермент. Биогенные амины (трип-тамин, серотонин, гистамин, γ -аминомасляная кислота), катехоламины (дофамин, норадрена-лин, адреналин). Реакции образования, биологическая роль. Окисление биогенных аминов (MAO и DAO). Лекарственные средства – ингибиторы аминоксидаз.
3. Трансаминирование, аминотрансферазы, коферментная функция витамина B₆. Кли-нико-диагностическое значение определения активности аминотрансфераз сыворотки крови.
4. Пути дезаминирования аминокислот. Окислительное дезаминирование (ферменты, ко-ферменты). Окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты (химизм), значение глу-таматдегидрогеназной реакции. Непрямое дезаминирование.
5. Пути использования безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты. Способы синтеза новых аминокислот.
6. Пути образования и связывания аммиака в клетках (восстановительное аминирование α -кетоглутарата, синтез глутамина и аспарагина, образование карбамоилфосфата). Транспорти-руемые формы аммиака.
7. Орнитинный цикл мочевинообразования (схема цикла, субстраты, ферменты, энерге-тическое обеспечение, связь с лимоннокислым циклом, регуляция). Гипераммониемия.
8. Образование солей аммония в почках (источник аммиака, роль глутаминазы и глута-матдегидрогеназы, значение активирования глутаминазы почек при ацидозе).
9. Остаточный азот крови (основные компоненты и их относительное содержание). Принцип определения и клинико-диагностическое значение.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 320–344.
2. *Биологическая химия* : учебное пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С.107–112.
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Какие биохимические реакции катализирует аланинаминотрансфераза?

- | | |
|----------------------------------|------------------------|
| А. Переаминирование | Г. Декарбоксилирование |
| Б. Окислительное дезаминирование | Д. Трансметилирование |
| В. Синтез глутамата | |

Задание 2. Укажите витамин, который является коферментом глутаматдегидрогеназы:

- | | | |
|----------------|---------------------|-------------------------|
| А. Никотинамид | В. Фолиевая кислота | Д. Аскорбиновая кислота |
| Б. Тиамин | Г. Пиридоксин | |

Задание 3. Укажите кофермент аспаратаминотрансферазы:

- | | | |
|---------------------|----------------------|---------------------|
| А. НАД ⁺ | В. НАДФ ⁺ | Д. Тиаминпирофосфат |
| Б. ФАД | Г. Пиридоксальфосфат | |

Задание 4. Недостатком какого кофермента обусловлено снижение скорости трансаминирования аминокислот?

- | | | |
|----------------------|-----------------------|----------------------|
| А. НАД ⁺ | В. ФАД | Д. Тиаминпирофосфата |
| Б. НАДФ ⁺ | Г. Пиридоксальфосфата | |

Задание 5. Назовите конечные продукты азотистого обмена:

- | | | |
|-------------|--------------|--------------------|
| А. Глутамин | В. Билирубин | Д. Аммонийные соли |
| Б. Глицерол | Г. Мочевина | |

Задание 6. Подберите соответствующие пары вопрос — ответ:

- | | |
|---|---|
| А. Фермент орнитинкарбамоил-
трансфераза (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 7. 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 8. Напишите реакцию преобразования аммиака в карбамоилфосфат.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Сравните процессы трансаминирования и дезаминирования аминокислот. Установите соответствие:

- | | |
|--|----------------------|
| 1. Является этапом катаболизма аминокислот | А. Трансаминирование |
| 2. Сопровождается образованием аммиака | Б. Оба процесса |
| 3. Не приводит к изменению общего количества аминокислот | В. Дезаминирование |

Задание 2. Центральная роль глутаминовой кислоты в промежуточном обмене аминокислот определяется тем, что глутаминовая кислота:

1. Участвует в трансаминировании как универсальный донор NH_2 -группы
2. Легко образуется из α -кетоглутаровой кислоты — универсального акцептора аминогрупп
3. Дезаминируется НАД⁺-зависимой глутаматдегидрогеназой
4. Является заменимой аминокислотой

Задание 3. Установите соответствие между безазотистым остатком и аминокислотой:

- | | |
|---------------------------|-------------|
| 1. Пируват | А. Аспарат |
| 2. α -Кетоглутарат | Б. Аланин |
| 3. Оксалоацетат | В. Глутамат |

Задание 4. Кетогенными называются аминокислоты, которые в ходе метаболизма превращаются в:

- | | |
|--------------------|-----------------|
| А. Ацетил-КоА | Г. ЦУК |
| Б. ПВК | Д. Сукцинил-КоА |
| В. Ацетоацетил-КоА | |

Задание 5. Расположите перечисленные субстраты в порядке их участия в синтезе дофамина:

- | | | | |
|------------|------------|----------------|----------------------|
| А. Дофамин | Б. Тирозин | В. Фенилаланин | Г. Диоксифенилаланин |
|------------|------------|----------------|----------------------|

Задание 6. Подберите к реакциям орнитинового цикла недостающий компонент:

- | | |
|------------------------------------|----------------------|
| 1. Цитрулин + Аспартат → | А. Цитрулин |
| 2. Орнитин + Карбамоилфосфат → ? | Б. Фумарат |
| 3. Аргинин → Мочевина + ? | В. Орнитин |
| 4. Аргинино-сукцинат → Аргинин + ? | Г. Аргинино-сукцинат |

Задание 7. При декарбоксилировании каких аминокислот или их производных образуются следующие биогенные амины?

- | | | |
|--------------|-------------|------------|
| 1. Триптамин | 3. Гистамин | 5. Дофамин |
| 2. Серотонин | 4. ГАМК | |

Задание 8. Сколько молей АТФ требуется для синтеза 1 моля мочевины? Напишите реакции (схема), идущие с затратой АТФ, укажите ферменты.

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1В; 3А, Б, Д.



5А, В, Д.

Для самостоятельной работы:

1А,В ; 2А; 3Г; 4Г. 5Г,Д; 6 (А — 2, Б — 4, В — 1, Г — 3);

- | | |
|---|------------------------------|
| 7 1. Глутаминсинтетаза. | 4. Аспарагинсинтетаза. |
| 2. Глутамат ДГ (НАДФН·Н ⁺). | 5. Карбамоилфосфатсинтетаза. |
| 3. Глутаминаза. | |

Лабораторная работа

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 *n*-диметиламинобензальдегидом 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.

Берут 3 пробирки. В первую наливают 0,2 мл мочи (опытная проба), во вторую пробирку вносят 0,2 мл стандартного раствора мочевины (25 мг/мл) и в третью — 0,2 мл 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 толщиной 3 мм с синим светофильтром (длина волны 400нм) 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 (ммоль/сут) = 0,0167.

Полученные данные: $E_{\text{оп}} =$ $E_{\text{ст}} =$

Расчет:

Вывод:

Клинико-диагностическое значение. Пониженное содержание мочевины в моче отмечается при нефрите, ацидозе, паренхиматозной желтухе, циррозе печени, уремии, повышенное — при голодании и интенсивном распаде белков в организме, высокобелковой диете, злокачественной анемии, лихорадке, 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.**

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 1-ю наливают 1 мл готового минерализата и 9 мл воды (опытная проба), во 2-ю вносят 1 мл стандартного раствора сульфата аммония и 9 мл воды (стандартная проба), а в 3-ю 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 (длина волны 400нм) в кювете толщиной 5 мм.

Расчет. Содержание остаточного азота в опытной пробе рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{он}} = (C_{\text{ст}} \cdot E_{\text{оп}} / E_{\text{ст}}) \cdot 71,4$$

где $C_{\text{он}}$ — концентрация остаточного азота в крови, ммоль/л; $C_{\text{ст}}$ — концентрация азота в стандартной пробе (0,1 мг в 1 мл); $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность опытной пробы (минерализат); $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандарта (сульфат аммония); 71,4 — коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л).

Полученные данные: $E_{\text{оп}} =$ $E_{\text{ст}} =$

Расчет:

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.

Вывод:

Подпись преподавателя:

ЗАНЯТИЕ 20. ОБМЕН НУКЛЕОПРОТЕИНОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ И ОБЩЕГО АЗОТА В МОЧЕ

Актуальность темы

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 гипохромицистических состояний органов (ИМФ (рибоксин), оротат калия 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. 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.

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.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подберите 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. Подберите 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 ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Обмен нуклеопротеинов. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте (значение, этапы, ферменты). Распад нуклеиновых кислот в тканях, роль лизосомных ферментов.

2. Распад пуриновых нуклеотидов (химизм, мочевая кислота как конечный продукт катаболизма). Представление о нарушениях пуринового обмена (гиперурикемия и подагра, почечно-каменная болезнь).

3. 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.

4. Распад пиримидиновых нуклеотидов.

5. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов (субстраты, схема процесса, ключевой фермент, регуляция синтеза, роль витаминов). Представление о нарушениях пиримидинового обмена (оротацидурия).

6. Синтез дезоксирибонуклеозидфосфатов, нуклеозиддифосфатов и нуклеозидтрифосфатов.

7. Общий азот мочи (количество, компоненты и их происхождение).

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 345–368.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 113–125.
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. В результате активации какого метаболического процесса развивается гиперурикемия?

- А. Интенсивного распада белков
- Б. Активация глюконеогенеза
- В. Интенсивного распада пуриновых нуклеотидов
- Г. Мобилизации липидов
- Д. Интенсивного распада пиримидиновых нуклеотидов

Задание 3. Дополните недостающими компонентами реакции синтеза пуриновых рибонуклеотидов:

- 1. ФРПФ + ? → 5-фосфорибозиламин
 - 2. ИМФ + ГТФ + Асп → ?
 - 3. Рибозо-5-фосфат + АТФ → ? + АМФ
 - 4. ИМФ + АТФ + ? → ГМФ
- А. Глн
 - Б. АМФ
 - В. Глу
 - Г. ФРПФ
 - Д. АТФ

Задание 4. Дополните недостающими компонентами реакции синтеза пиримидиновых нуклеотидов:

- 1. Карбамоилфосфат + ? → карбамоиласпартат
 - 2. Оротат + ? → ОМФ + $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$
 - 3. ОМФ → CO_2 + ?
 - 4. УМФ + ? → УДФ + ?
 - 5. УДФ + ? → УТФ + ?
- А. ФРПФ
 - Б. Асп
 - В. АТФ
 - Г. АДФ
 - Д. УМФ

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Установите соответствие между нуклеотидом и его функцией:

- 1. Участвует в синтезе гликогена в качестве переносчика молекул глюкозы
 - 2. Расходуется в результате работы ряда ионных каналов
 - 3. Является вторичным посредником действия гормонов
 - 4. Участвует в синтезе фосфолипидов
- А. цАМФ
 - Б. АТФ
 - Г. УДФ
 - В. ЦДФ

Задание 2. Источниками атомов пуринового кольца являются все ниже перечисленные соединения, за исключением:

- А. Глицин
- Б. Серин
- В. Глутамин
- Г. Аспартат
- Д. CO_2
- Е. Метенил- H_4 фолат
- Ж. Формил - H_4 фолат

Задание 3. Восстановление ГДФ в дГДФ катализирует рибонуклеотидредуктазный комплекс, который включает ниже перечисленные соединения. Выберите правильный ответ.

- А. АТФ
- Б. НДФ – редуктаза
- В. НАДФН- H^+
- Г. Тиоредоксин
- Д. Тиоредоксинредуктаза

Задание 4. Расположите перечисленные метаболиты в порядке их превращения в мочевую кислоту, используя цифровые обозначения:

- | | |
|--------------------|----------------|
| А. АМР | Г. Инозин |
| Б. Мочевая кислота | Д. Аденозин |
| В. Ксантин | Е. Гипоксантин |

Задание 5. 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 6. Женщине с лимфолейкозом назначен противоопухолевый препарат — ингибитор тиоредоксинредуктазы. На чем основано цитостатическое действие препарата?

- | | |
|---|-----------------------------|
| А. Ингибируется синтез ИМФ | Г. Ингибируется синтез дГДФ |
| Б. Ингибируется синтез оротовой кислоты | Д. Ингибируется синтез УМФ |
| В. Ингибируется синтез ЦМФ | |

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний: 1А – 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:

1Б, В; 2В; 31 – А; 2 – Б; 3 – Г; 4 – А; 4 1 – Б; 2 – А; 3 – Д; 4 – В, Г; 5 – В, Г.

Лабораторная работа

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 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 3-ю 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 светофильтре (длина волны 400 нм) 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:

$$C_{оп} \cdot 100 \cdot \text{суточный диурез} / 0,5 \cdot 1000,$$

где $C_{оп}$ — 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) = 71,39.

Полученные данные: $E_{оп} =$ $E_{ст} =$

Расчет: $C_{оп} =$

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.

Вывод:

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.

Результат: $a =$

Расчет:

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.

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 21. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ (СИНТЕЗ ДНК, РНК, БЕЛКОВ). СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ. АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

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 и их аналоги используются в качестве лекарственных препаратов. Различные группы антибиотиков влияют на процессы репликации, транскрипции и трансляции.

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. Освоить методы анализа продуктов гидролиза нуклеопротеинов.

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

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. Выберите правильное утверждение, характеризующее каждый из перечисленных методов:

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. Генная инженерия | А. Позволяет определить первичную структуру фрагмента ДНК |
| 2. Секвенирование по Сэнджеру | Б. Позволяет получить большое количество исследуемой ДНК |
| 3. Полимеразная цепная реакция | В. Используется для получения белковых лекарственных препаратов. Важным этапом является создание гибридного вектора и экспрессия встроенного гена в бактериальной клетке |

Задание 4. Выберите верное утверждение о механизме действия ацикловира (ациклогуанозин):

- А. Является антиметаболитом
- Б. Применяется для лечения вирусных инфекций
- В. Применяется в качестве отхаркивающего средства
- Г. В организме превращается в соответствующий нуклеозидтрифосфат и останавливает синтез вирусной ДНК

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

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 Львова – Жакоба – Моно, схема Георгиева), процессинг РНК. Обратная транскрипция.
4. Рекогниция (субклеточная локализация, схема, субстратная специфичность АРСаз). Роль тРНК в синтезе белка.
5. Трансляция как этап реализации генетической информации в клетке. Регуляция биосинтеза белка (роль гистонов, гормонов и жирорастворимых витаминов). Посттрансляционная модификация молекул белка (гидроксилирование, гликозилирование, ограниченный протеолиз, фосфорилирование, карбоксилирование).
6. Ингибиторы биосинтеза белка (лекарственные препараты, токсины).
7. Современные методы молекулярной биологии (ПЦР, блот-анализ ДНК (Саузерн-блот), метод «отпечатков пальцев ДНК», клонирование). Принципы проведения, применение.
8. Метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК (метод Сэнджера).

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 369–425.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 126–136.
3. *Нуклеопротеины* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск, 2000.
4. *Конспект лекций.*

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Вспомните, что основная «догма» молекулярной биологии указывает на два основных направления потока генетической информации в клетке:

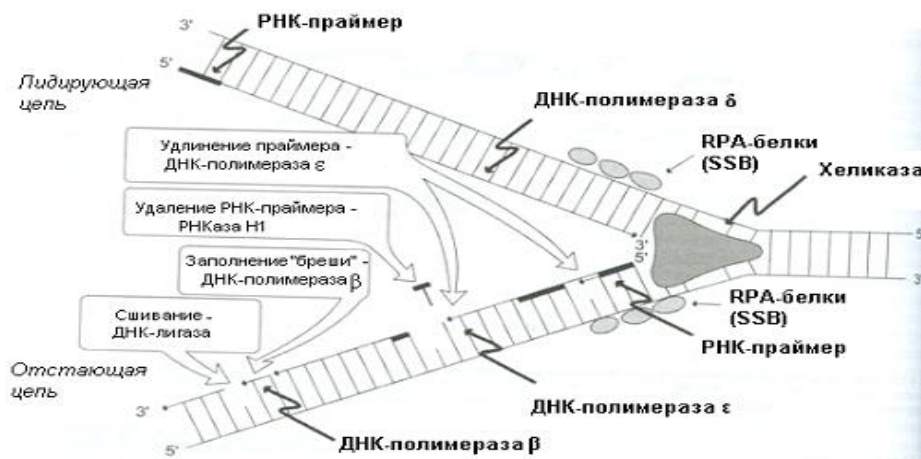
- А. Хранение и передача информации (репликация и репарация).
- Б. Реализация генетической информации — экспрессия генов (рекогниция, транскрипция и трансляция).

На рисунке показаны основные участники механизма репликации у эукариот.

1.1. Выберите субстраты, которые используются в реакции биосинтеза ДНК при участии ДНК-полимеразы:

- А. дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ
- Б. дАДФ, дЦДФ, дГДФ, дТДФ
- В. АТФ, ЦТФ, ГТФ, ТТФ
- Г. дАМФ, дТМФ, дЦМФ, дГМФ

1.2. Напишите в общем виде суммарную реакцию, катализируемую ДНК-полимеразой

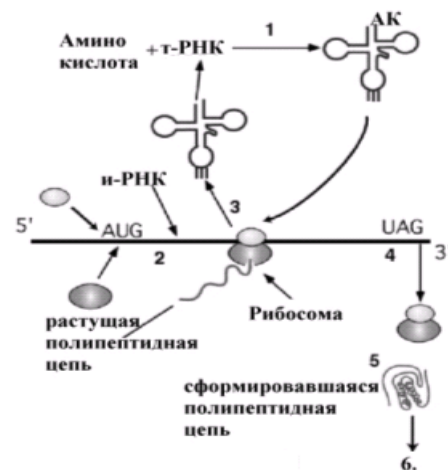


Задание 2. Вспомните, что среди механизмов узнавания белками (ферментами, факторами регуляции и т. д.) отдельных участков нуклеотидных последовательностей определенную роль играют палиндромные последовательности нуклеотидов (в частности, при узнавании ДНК-рестриктазами), которые могут формировать крестообразные структуры в молекуле ДНК.

2.1. Изобразите крестообразную структуру из палиндромной последовательности, показанной на рисунке ниже.



Задание 3. Механизмы реализации генетической информации в клетке многоступенчатые. На рисунке изображены основные этапы экспрессии генов. Подберите пары (буква – таблица, цифра – рисунок).



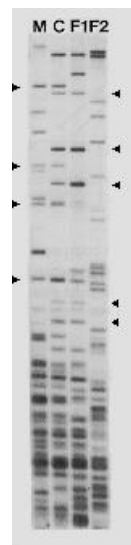
А. Терминация	
Б. Рекогниция	
В. Инициация	
Г. Секреция	
Д. Формирование пространственной структуры	
Е. Элонгация	

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Задание 6. В генно-инженерных технологиях используются ферменты рестриктазы. Найдите верные утверждения:

- А. Рестриктазы являются эстеразами
- Б. Рестриктазы являются эндонуклеазами
- В. Рестриктазы узнают специфические последовательности нуклеотидов двухцепочечной ДНК
- Г. Рестриктазы являются экзонуклеазами

Задание 7. Справа «отпечатки пальцев» ДНК матери (М), ребенка (С) 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.



ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

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 (1 – В, 2 – А, 3 – Б); 4 А, Б, Г.

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа

Анализ продуктов гидролиза нуклеопротеинов дрожжей

Для изучения химического состава нуклеопротеинов проводят кислотный гидролиз дрожжей, поскольку они очень богаты нуклеопротеинами. Специфическими реакциями для каждого вещества открывают продукты гидролиза — полипептиды, пуриновые основания, углевод и фосфорную кислоту.

Принцип метода. Пекарские дрожжи гидролизуют под действием разбавленной серной кислоты. Полученный гидролизат используют для дальнейшей работы.

Работа 1. Биуретовая реакция на полипептиды

К 5 каплям гидролизата приливают 10 капель 10%-ного раствора NaOH, затем 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Отмечают появление розово-фиолетовой окраски.

Работа 2. Серебряная проба на пуриновые основания

К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель концентрированного раствора аммиака, затем добавляют 10 капель 2%-ного аммиачного раствора нитрата серебра. При стоянии через 3–5 мин образуется светло-коричневый осадок серебряных солей пуриновых оснований (содержимое пробирки перемешивать при стоянии не надо).

Работа 3. Качественная реакция на пентозу (Молиша)

К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 3 капли 1%-ного спиртового раствора тиола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно приливают 20–30 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется продукт конденсации красного цвета.

Работа 4. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 20 капель молибденового реактива и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет (не осадок). Пробирку сразу охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется кристаллический лимонно-желтый осадок фосфорномолибденовой кислоты.

Выводы:

Подпись преподавателя:

**Занятие 22. ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ:
«ОБМЕН ПРОСТЫХ БЕЛКОВ И НУКЛЕОПРОТЕИНОВ», «БИОСИНТЕЗ
ДНК, РНК И БЕЛКА», «МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ»**

1. Азотистый баланс, виды, 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 pH, механизмы активации, субстратная специфичность, эндо- и экзопептидазы). Роль HCl в переваривании белков. Кислотность желудочного сока. принцип определения, нормальные значения.
5. Гниение белков. Уметь схематически показать происхождение фенола, крезола, скатола, индола, кадаверина, путресцина. Механизмы обезвреживания продуктов гниения белков
6. Аминокислотный фонд клетки, его пополнение и использование.
7. Переаминирование. Роль витамина B₆. Уметь писать реакции переаминирования с участием аланиновой и аспарагиновой трансаминаз. Знать их диагностическое значение.
8. Виды дезаминирования. Глутаматдегидрогеназная реакция — химизм, кофферменты, значение. Непрямое дезаминирование.
9. Пути использования безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты. Умейте привести примеры конкретных метаболических путей.
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 и способы обезвреживания.
12. Синтез катехоламинов. Функции дофамина, норадреналина и адреналина в организме. Обезвреживание катехоламинов. Применение ингибиторов МАО.
13. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте.
14. Пути реутилизации азотистых оснований и нуклеозидов в клетке.
15. Конечные продукты распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Реакции образования мочевой кислоты. Гиперурикемия — ее причины и последствия.
16. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов de novo: субстраты, ключевые ферменты, основные промежуточные продукты. Регуляция синтеза. Роль витаминов.
17. Применение в медицине синтетических структурных аналогов нуклеозидов и фолиевой кислоты.
18. Образование дезоксирибонуклеотидов для синтеза ДНК (схема).
19. Репликация. Субстраты, ферменты, механизм. Механизмы репарации ДНК, роль этого процесса.
20. Транскрипция. Ферменты, субстраты, механизм, регуляция. Обратная транскрипция.
21. 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).
22. Виды посттрансляционной модификации белков.
23. Ингибиторы биосинтеза белка (лекарственные препараты, токсины).
24. Современные методы молекулярной биологии (ПЦР, блот-анализ ДНК (Саузерн-блот), метод «отпечатков пальцев ДНК», клонирование). Принципы проведения, применение.
25. 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)?

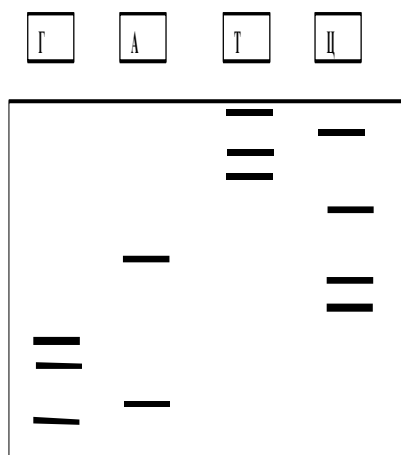
В чем проводили электрофорез, по какому принципу произошло разделение фрагментов?

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? 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).



ЗАНЯТИЕ 23. 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. Гормоны широко используются в качестве лекарственных препаратов. Понимание механизма эндокринных нарушений чрезвычайно важно для целенаправленной терапии эндокринных заболеваний. Методы качественного и количественного анализа используются в клинико-биохимических и аналитических лабораториях для определения гормонов в биологическом материале и лекарственных препаратах.

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.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Выберите 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 2. Какие гормоны секретируются аденогипофизом?

- | | |
|-----------------|---------------|
| А. Вазопрессин | Г. Серотонин. |
| Б. Тироксин | Д. АКТГ |
| В. Соматотропин | Е. Пролактин |

Задание 3. Выберите правильный ответ. Гормоны как лекарственные препараты получают:

- | | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| А. Путем химического синтеза | В. Путем генно-инженерного синтеза |
| Б. Из органов и тканей животных | Г. Все варианты ответов не верны |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Классификация гормонов по месту синтеза, химической природе. Гормоны как лекарственные препараты.
2. Особенности биологического действия гормонов, их синтеза и транспорта кровью.
3. 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).
4. Механизм действия гормонов стероидной, аминокислотной и белково-пептидной природы. Роль G-белков, вторичных посредников (циклические нуклеотиды, ИТФ, Ca^{2+} , диацилглицерол), протеинкиназ.
5. Растворимая и мембраносвязанная гуанилатциклазы. Оксид азота (NO).
6. Гормоны аденогипофиза: химическое строение, типы рецепторов в тканях-мишенях. Гормон роста, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, реализация эффекта этого гормона на уровне тканей-мишеней. Роль избыточной и недостаточной секреции гормона роста.
7. Гормоны нейрогофиза: химическое строение, тип рецептора в ткани-мишени, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, реализация эффекта вазопрессина на уровне тканей-мишеней. Несахарный диабет.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 426–461, 532–535.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С.144–155.
3. *Конспект лекций*

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Особенностью биологического действия гормонов является все нижеперечисленное, кроме:

- А. Низкая концентрация в крови
- Б. Связывание со специфическим рецептором
- В. Действие осуществляется через внутриклеточные вторичные посредники
- Г. Изменение скорости синтеза ферментов или их активности
- Д. Регуляция секреции осуществляется по принципу обратной связи
- Е. Высокая концентрация в крови

Задание 2. Подберите соответствие между гормоном и его местом синтеза:

- | | |
|--|----------------|
| 1. Секретируется передней долей гипофиза | А. Тироксин |
| 2. Синтезируется в щитовидной железе | Б. ТТГ |
| 3. Секретируется задней долей гипофиза | В. Вазопрессин |
| 4. Синтезируется в пучковой зоне коры надпочечников | Г. Кортизол |
| 5. Синтезируется в клубочковой зоне коры надпочечников | Д. Альдостерон |

Задание 5. 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. ГТФ-азной активностью γ-субъединицы

Задание 6. 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 7. Выберите вторичные посредники действия вазопрессина:

- А. Са²⁺
- Б. цАМФ
- В. цГМФ
- Г. Диацилглицерол
- Д. Оксид азота
- Е. ИТФ

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1Г; 2В, Д, Е; 3А, Б, В.

Для самостоятельной работы:

1Е; 2(1-Б, 2-А, 3-В, 4-Г, 5-Д); 3А, Б, Д; 4В; 5А; 6.1А; 6.2Д; 6.3В; 6.4Д.

Лабораторная работа

Гормоны щитовидной железы

Работа 1. Качественная реакция на тироксин

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.

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%-ного раствора крахмала, 1 каплю фенолфталеина, а затем 4 капли йодата калия и приблизительно 10–15 капель 10%-ного 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 цветные реакции на белок и входящие в его состав аминокислоты. 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.

Биуретовая реакция

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора инсулина прибавляют 5 капель 10% раствора NaOH, 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 синеет.

Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель 1%-ного 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%-ного 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%-ного 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%-ного раствора NaOH 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%-ного раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 6 капель 0,5%-ного раствора нитрита натрия (смесь диазореактива), 10 капель раствора адреналина и 3 капли 10%-ного раствора NaOH. 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%-ного раствора NaOH и 6 капель раствора адреналина. Поместив пробирку перед включенным флюороскопом, наблюдают зеленую флюоресценцию продуктов окисления адреналина.

Подпись преподавателя:

Занятие 24. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА. 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.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подберите 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. Какой из этих углеводов даст реакцию Троммера?

- А. Сахароза Б. Лактоза В. Фруктоза Г. Глюкоза Д. Гликоген

Задание 3. Выберите правильные варианты ответа. По химической природе гормоны бывают:

- | | |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| А. Производными аминокислот | Г. Производными арахидоновой кислоты |
| Б. Производными углеводов | Д. Производными холестерина |
| В. Белково – пептидными | |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. 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.

2. Катехоламины: химическое строение, синтез, тип рецептора в ткани-мишени, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, реализация эффекта катехоламинов на уровне тканей-мишеней.

3. 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.

4. Гормоны коры надпочечников: химическое строение, предшественник синтеза, тип рецептора в ткани-мишени, реализация эффекта глюкокортикоидов и минералокортикоидов на уровне клетки.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 461–477.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 155–159.
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 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

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 нижеуказанных веществ. Студент не справился с заданием, так как использовал для синтеза:

- А. Диоксифенилаланин
- Б. Фенилаланин
- В. Тирозин
- Г. Лизин
- Д. Дофамин

2.2. Укажите метаболит, который используется для биосинтеза кортизола и альдостерона:

- А. Сукцинил-КоА
- Б. Глицерол
- В. Холин
- Г. Метионин
- Д. Холестерол

Задание 3. Инсулин и глюкагон — антагонисты. Вспомните механизм действия этих гормонов на углеводный и липидный обмены.

3.1. 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. Вазопрессин

3.2. Больному сахарным диабетом с отрицательным азотистым балансом назначили инъекции инсулина. На какой процесс действует инсулин для восстановления азотистого равновесия?

- А. Ингибирование глюконеогенеза
- Б. Ингибирование гликолиза
- В. Увеличение проницаемости клеток для Ca^{2+}
- Г. Активацию гликогенфосфоорилазы
- Д. Активацию протеинкиназы

3.3. Какой гормон индуцирует синтез фосфоенолпируваткарбоксикиназы в печени?

- А. Глюкагон
- Б. Тироксин
- В. Инсулин
- Г. Кортизол
- Д. Альдостерон

3.4. Какие из нижеследующих выражений правильные?

- А. Действие адреналина и глюкагона направлено на увеличение количества гликогенфосфоорилазы
- Б. Интенсивность расщепления гликогена 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 гликогенфосфоорилазы в ответ на действие глюкагона увеличивает её активность

Задание 4. 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 5. При заболевании сахарным диабетом нарушается усвоение глюкозы тканями и усиливается распад липидов. В результате дефицита ЩУК нарушается функционирование ЦТК и избыток молекул ацетил-КоА используется на синтез ацетоновых тел. Увеличение содержания какого метаболита приводит к развитию кетоацидоза?

- А. Малоната
- В. α -Кетоглутарата
- Д. Аспартата
- Б. Оксалоацетата
- Г. Ацетоацетата

Задание 6. Выберите правильные ответы. Гормоны как лекарственные препараты используются в качестве:

- А. Заместительной терапии
- Г. Противовоспалительных средств
- Б. Анаболических стероидов
- Д. Иммуносупрессоров
- В. Противозачаточных средств
- Е. Антигипоксантов

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Внутрядерные рецепторы обнаружены для:

- А. Адреналина
- Б. Трийодтиронина
- В. Глюкагон
- Г. Гормона роста
- Д. Серотонина

Задание 2. Все утверждения относительно йодтиронинов справедливы, кроме:

- А. Йодтиронины синтезируются из тиреоглобулина
- Б. ТТГ стимулирует синтез йодтиронинов
- В. Избыток йодтиронинов ингибирует синтез тиролиберина
- Г. Тиролиберин стимулирует освобождение ТТГ
- Д. Трийодтиронин образуется из тироксина только в печени

Задание 3. Установите соответствие:

- | | |
|--|----------------------|
| 1. Возникает при гипофункции щитовидной железы в раннем детском возрасте | А. Базедова болезнь. |
| 2. Возникает при гиперфункции щитовидной железы | Б. Кретинизм |
| 3. Возникает при гипофункции щитовидной железы и сопровождается накоплением воды и протеогликанов в коже | В. Микседема |
| 4. Возникает при недостатке йода в питьевой воде. | Г. Эндемический зоб |

Задание 4. Выберите правильные утверждения. Инсулин:

- А. Синтезируется в форме неактивного предшественника
- Б. Состоит из двух полипептидных цепей
- В. Секретируется в кровь вместе с С-пептидом
- Г. Синтезируется в α -клетках островков Лангенгарса поджелудочной железы
- Д. Превращение проинсулина в инсулин происходит путем частичного протеолиза

Задание 5. Укажите уровень гликемии, при котором глюкоза будет экскретироваться в мочу:

- А. 6 ммоль/л Б. 10 ммоль/л В. 5,5 ммоль/л Г. 4 ммоль/л

Задание 6. Выберите правильные высказывания, характеризующие кортизол:

- А. Синтезируется из холестерина
- Б. Синтезируется в сетчатой зоне коры надпочечников
- В. Взаимодействует с рецептором плазматической мембраны
- Г. Синтез и секреция стимулируется АКТГ
- Д. Транспортируется кровью в комплексе с глобулином
- Е. Взаимодействует с хроматином клетки

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

1А; 2.1Г; 2.2Д; 3.1В; 3.2А; 3.3Г; 3.4В, Г, Д; 4Г; 5Г; 6А, Б, В, Г, Д.

Лабораторная работа

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 В₁, 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**.

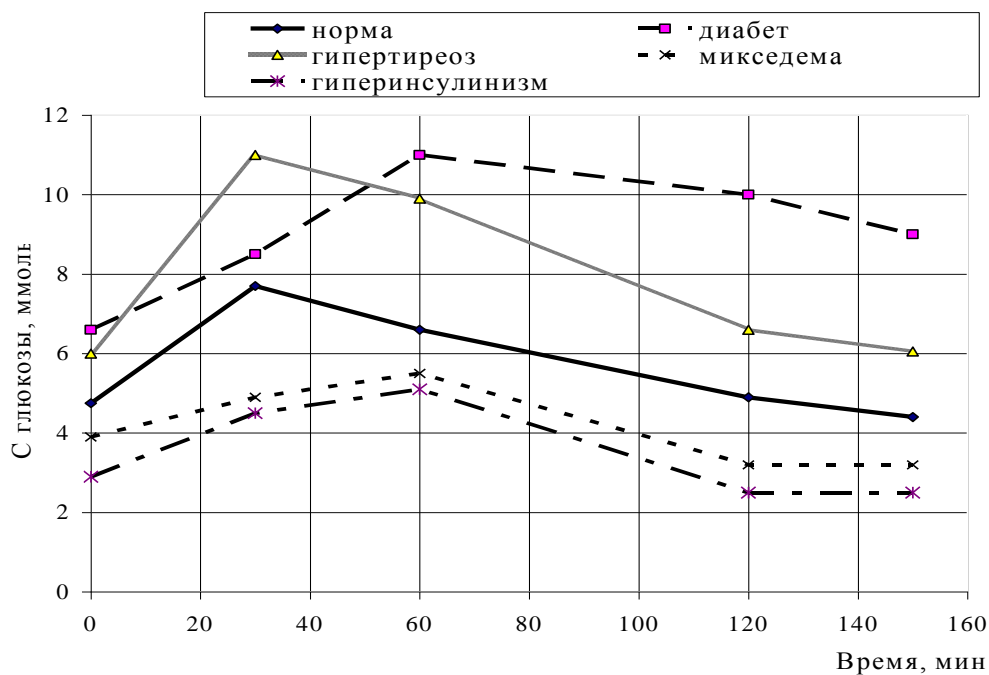
Пероральный тест на толерантность к глюкозе (нагрузка глюкозой) позволяет выявить патологию в тех случаях, когда исследование содержания глюкозы в крови натощак не позволяет выявить нарушения обмена веществ.

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).

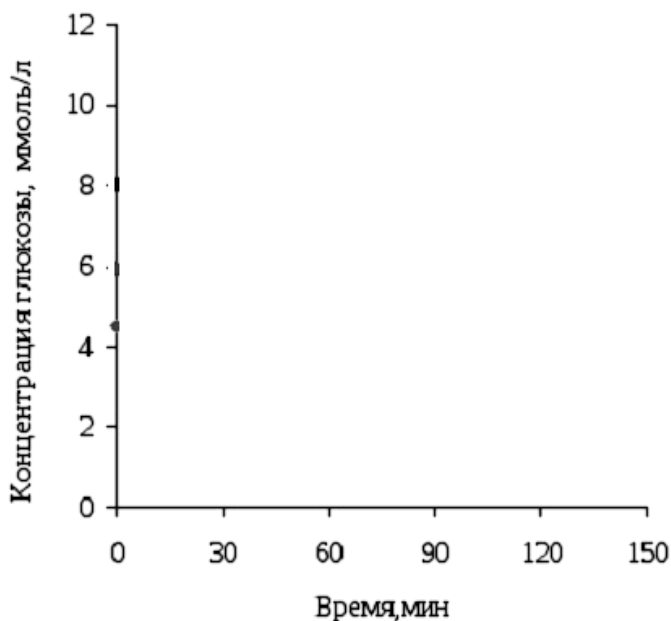
Ход работы. В пробах для анализа № 1–6 определите содержание глюкозы (см. Инструкцию к практическому занятию № 11 «Определение концентрации глюкозы в крови ферментативным методом»). В пробирке № 1 — сыворотка крови, взятой натощак, в пробирках № 2–6 — взятой через каждые 30 мин после нагрузки глюкозой. На основании полученных данных постройте кривую. Проанализируйте гликемическую кривую.

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 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:



		0 мин	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин
Пациент 1	Е _{оп.}						
	С глюкозы (ммоль/л)						
Пациент 2	Е _{оп.}						
	С глюкозы (ммоль/л)						



Вывод:

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.

Подпись преподавателя:

Занятие 25. БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ. ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛЛОИДНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ БЕЛКОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО БИЛИРУБИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

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 портальным 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 свертывания крови, т. к. синтезирует белки-компоненты свертывающей и противосвертывающей 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.

Цель занятия

Научиться применять знания о гомеостатической и интегрирующей роли печени в обмене веществ для и о путях превращения в печени ксенобиотиков для понимания биохимических аспектов фармакологии и токсикологии.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. 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 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 В. По нижней полой вене печени
Б. По воротной вене печени Г. По печеночной артерии

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

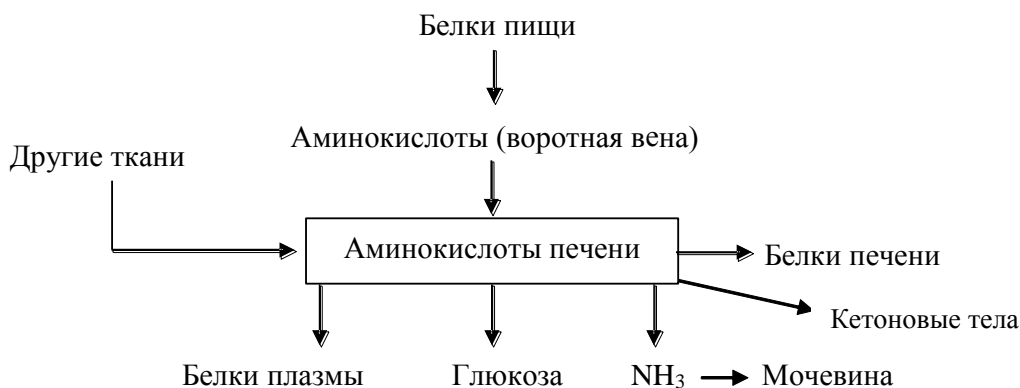
1. Роль печени в обмене углеводов, липидов, белков.
2. Обезвреживающая функция печени, механизмы: защитные синтезы, восстановление, гидролиз, микросомальное окисление, конъюгация (примеры).
3. Роль печени в пигментном обмене. Распад гемоглобина (схема). Метаболизм желчных пигментов.
4. Желтуха: виды и причины ее возникновения.
5. Лабораторная диагностика заболеваний печени.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 594–596, 616–618.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 160–166.
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Знайте, что аминокислоты, всосавшиеся в кишечнике и поступившие затем в печень, имеют несколько основных путей метаболизма:



1.1. С нарушением синтеза каких веществ в печени связано развитие отеков?

- А. Мочевины В. Холестерола Д. Фибриногена
Б. Альбуминов Г. Гаптоглобина

1.2. В организме здорового человека железо депонируется в печени, селезенке, костном мозге. В составе какого белка происходит его депонирование?

- А. Ферритина В. Апоферритина Д. Церулоплазмина
Б. Трансферрина Г. Плазмина

Задание 2. 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 В. УДФ-глюкуроновая кислота Д. Глицин
Б. Церулоплазмин Г. Таурин

Задание 3. Выберите правильные ответы. Изоформы цитохрома Р450 различаются по:

- А. Первичной структуре Г. Строению небелковой части
Б. Субстратной специфичности Д. Строению активного центра
В. Локализации

Задание 4. Установите правильную последовательность событий при катаболизме гема:

- А. Гемоксигеназная система ЭПР превращает гемоглобин в биливердин
- Б. Билирубин соединяется с альбумином
- В. Биливердинредуктаза восстанавливает биливердин в билирубин
- Г. В гепатоцитах образуется конъюгированный билирубин
- Д. Непрямой билирубин транспортируется кровью в печень

Задание 5. Выберите правильные ответы. Глюкуронилтрансфераза:

- А. Катализирует реакцию конъюгации
- Б. Индуцируется фенобарбиталом и этанолом
- В. Участвует в образовании прямого билирубина
- Г. Необходима для обезвреживания прямого билирубина

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. 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
- В. Глицин
- Д. Таурин

- Б. УДФ-глюкуроновая кислота
- Г. Церулоплазмин

Задание 2. Дефицит каких липотропных веществ восполняет растительно-молочная диета при жировой инфильтрации печени?

- А. Ненасыщенных жирных кислот
- Г. Метионина
- Б. Насыщенных жирных кислот
- Д. Серотонина
- В. Креатина
- Е. Кальцитонина

Задание 3. 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 4. Выберите продукты липидного обмена, синтезирующиеся преимущественно в печени:

- А. Холестерол
- Г. Кетоновые тела
- Ж. Свободный билирубин
- Б. ТАГ
- Д. Хиломикроны
- З. ЛПОНП
- В. Фосфолипиды
- Е. ЛПВП

Задание 5. Методом дифференциального центрифугирования клеток печени была получена микросомальная фракция. Микросомальное окисление — это способ обезвреживания токсических веществ в печени. Выберите компонент этой цепи окисления:

- А. Цитохром аз
- В. Цитохром b
- Д. Цитохром с₁
- Б. Цитохром с
- Г. Цитохром P₄₅₀

Задание 6. Выберите правильные ответы. При паренхиматозной желтухе:

- А. Увеличивается содержание прямого билирубина в крови
- Б. В моче присутствует билирубин
- В. В кале увеличено содержание стеркобилина
- Г. Повышается уровень непрямого билирубина в крови
- Д. Кал ахолический (обесцвечен)

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний: 1Г; 2Б.

Для самостоятельной работы:

1.1 Б; 1.2 А; 2Д; 3А, Б, Д; 4 А→В→Б→Д→Г; 5 А, Б, В.

Лабораторная работа

Работа 1. Исследование коллоидоустойчивости белков сыворотки крови

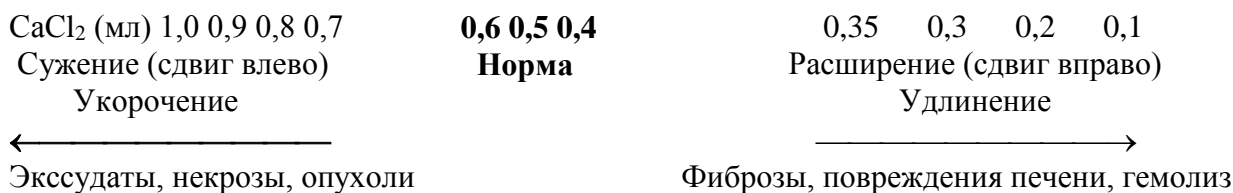
Проба Вельтмана в модификации Тейля

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%-ного 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).



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 Вальденстрема, 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.

Результат: $V(\text{CaCl}_2) =$

Вывод:

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 (длина волны 500–560 нм). Параллельно колориметрируют стандартный раствор азобилирубина, соответствующий концентрации билирубина 6,84 мкмоль/л ($C_{ст}$).

Расчет производят по формуле:

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

В норме концентрация общего билирубина в плазме (сыворотке) крови составляет (5,0–20,5 мкмоль/л). 75 % его количества приходится на долю непрямого билирубина.

Полученные данные и расчёт: $E_{оп} =$ $E_{ст} =$ $C_{оп} =$

Вывод:

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 выше 170 мкмоль/л — о тяжелой форме желтухи.

Подпись преподавателя:

Занятие 26. ИНТЕГРАЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГОРМОНОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Актуальность темы

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.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Назовите метаболит гликолиза, используемый для синтеза глицерола:

- | | |
|----------------------------|--------------------------------------|
| А. Фосфодиоксиацетон | Г. Щавелевоуксусная кислота |
| Б. Ацетил-КоА | Д. β -Гидроксимасляная кислота |
| В. Пировиноградная кислота | |

Задание 2. Для образования глюкозы во время голодания клетки печени используют:

- | | | |
|-------------------|-----------------------------|---------------|
| А. Жирные кислоты | В. Ацетоацетат | Д. Ацетил-КоА |
| Б. Аминокислоты | Г. β -Гидроксипутират | |

Задание 3. 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 |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Интеграция метаболизма, ее составляющие.
2. Механизмы регуляции метаболизма.
3. Особенности метаболизма в печени и во внепеченочных тканях в состоянии после приема пищи и натошак.
4. Особенности метаболизма в печени и во внепеченочных тканях при голодании.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 598–621.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 167–173.
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Систематизируйте знания об интеграции путей метаболизма в печени. Познакомьтесь с рисунком «Пути превращения углеводов и липидов в печени».

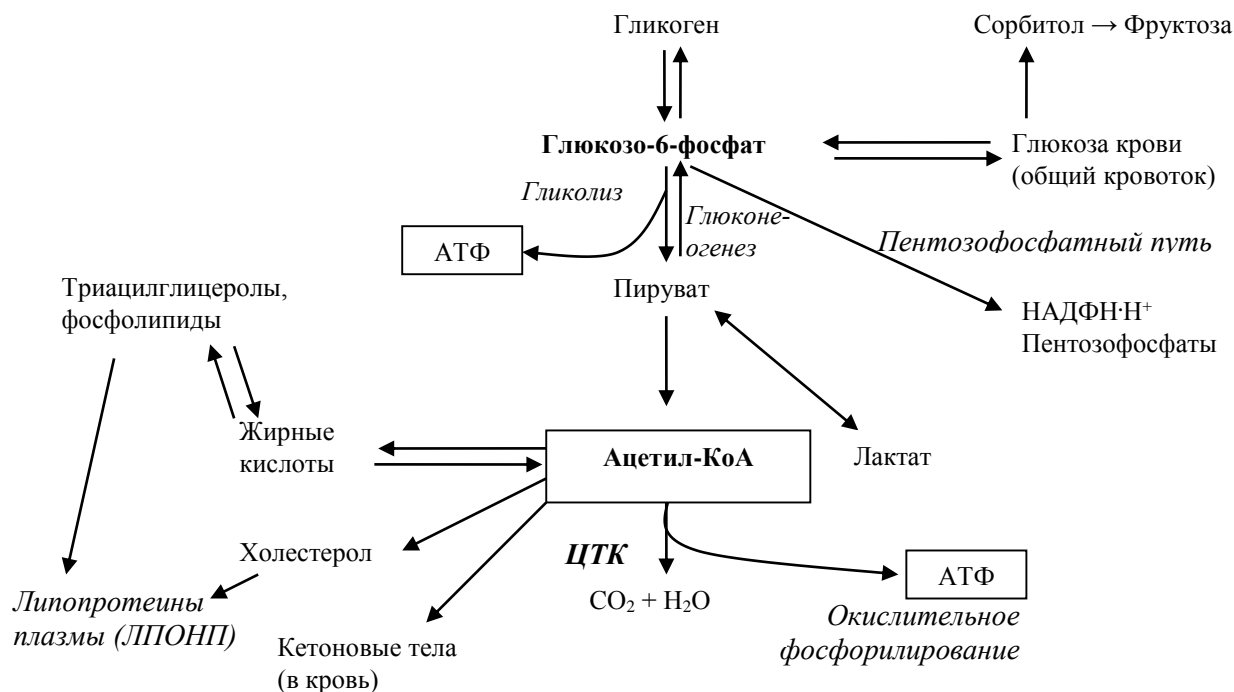
1.1. Обратите внимание на то, что большая часть потребленной свободной глюкозы в печени фосфорилируется с образованием глюкозо-6-фосфата. Метаболизм этого соединения может осуществляться по пяти основным направлениям, выбор которых зависит от соотношения между потребностями организма и количеством поступивших 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. Знайте, что обратимость превращения лактата в пируват (направление реакции) зависит от соотношения $\text{НАДН}\cdot\text{Н}^+/\text{НАД}^+$.

1.4. Знайте, 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



1.1. Объясните:

- почему уже через три часа после удаления печени у животных развивается гипогликемия и наступает смерть, если ежечасно не вводить глюкозу;
- почему введение галактозы, лактата или пирувата в этих условиях не эффективно.

Задание 2. Обратите 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.

2.1. Выберите правильные ответы. В мышцах после приема пищи:

- Глюкоза используется для синтеза гликогена
- Основной источник энергии — жирные кислоты
- α -Кетокислоты, образующиеся из аминокислот с разветвленной цепью, окисляются в цикле Кребса
- Гликоген подвергается фосфолизу
- Образуются кетоновые тела

Задание 3. Выберите правильные ответы. 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 4. Какие из нижеследующих выражений относительно синтеза и использования гликогена правильные?

- А. Действие адреналина и глюкагона направлено на увеличение активности гликогенфосфорилазы
- Б. В состоянии натошак 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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Выберите правильный ответ. Глюкагон в жировой ткани активирует:

- А. Гормон-чувствительную липазу
- Б. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу
- В. Ацетил-КоА карбоксилазу
- Г. Липопропротеинлипазу
- Д. Пируваткиназу

Задание 2. Выберите правильные ответы. Инсулин:

- А. Ускоряет транспорт глюкозы в мышцы
- Б. Ускоряет синтез гликогена в печени
- В. Стимулирует липолиз в жировой ткани
- Г. Ускоряет глюконеогенез
- Д. Ускоряет транспорт глюкозы в адипоциты

Задание 3. 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 4. Какие из приведенных ниже выражений правильные?

- 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

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1А; 2Б; 3 (1 – А, В, С; 3 – А, В; 4 – А, В, С, D).

Для самостоятельной работы:

2.1А; 3А, Б, Г, Д; 4А, В, Г, Д.

Лабораторная работа

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 **ферментативным (глюкозооксидазным) методом**. Параллельно ставят опытные и стандартную пробы.

Ход работы: см. Инструкцию к практическому занятию № 11 «Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови ферментативным методом». Контрольную пробу можно готовить одну на группу.

Расчет концентрации глюкозы производят по формуле:

$$C_{\text{оп.}} (\text{ммоль/л}) = E_{\text{оп.}} \times C_{\text{ст.}} (5,5 \text{ ммоль/л}) / E_{\text{ст.}}$$

Результаты:

Проба	Оптическая плотность (E)	Концентрация глюкозы (ммоль/л)
1		
2		
3		
Стандарт		

Нормальные величины концентрации глюкозы в плазме и сыворотке крови – 3,9–6,1 ммоль/л.

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 27. ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ:

**«ГОРМОНЫ», «БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ»,
«ИНТЕГРАЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА»**

1. Свойства гормонов. Особенности биологического действия. При ответе на вопрос необходимо приводить примеры гормонов, реализующих свое действие через различные рецепторы.
2. Рецепторы к гормонам, классификация, строение рецепторов. При ответе на вопрос необходимо приводить примеры гормонов, реализующих свое действие через различные рецепторы.
3. G-белки, их виды и 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 передачи гормонального сигнала в клетке.
10. Общие принципы синтеза гормонов белково-пептидной природы.
11. Общие принципы синтеза гормонов стероидной природы.
12. Вазопресин, химическая природа, механизмы передачи гормонального сигнала в клетке, эффекты. Несахарный диабет.
13. Гормон роста, рецептор соматотропина, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, органы-мишени, влияние на метаболизм. Избыток и недостаточность соматотропина.
14. Йодсодержащие гормоны щитовидной железы. Химическая природа, особенности синтеза, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, влияние на метаболизм, гипо- и гипертиреоз.
15. Глюкагон. Химическая природа, место синтеза, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, влияние на метаболизм.
16. Гормоны мозгового вещества надпочечников. Химическая природа, схема синтеза, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, влияние на метаболизм.
17. Гормоны коры надпочечников: глюко- и минералокортикоиды. Химическая природа, особенности строения рецепторов, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, влияние на метаболизм.
18. Инсулин. Химическая природа, особенности синтеза, строение инсулинового рецептора, механизмы передачи гормонального сигнала. Влияние на метаболизм углеводов, липидов, белков.
19. Сахарный диабет. Нарушения обмена углеводов, липидов, белков. Механизм развития кетонемии. Биохимическая диагностика сахарного диабета.
20. Метаболизм глюкозы в инсулиннезависимых тканях при сахарном диабете. Восстановительный путь обмена глюкозы, его роль в норме и при сахарном диабете.
21. Печень как главный орган гомеостаза. Функции печени.
22. Роль печени в обмене углеводов. Необходимо знать схемы основных путей обмена углеводов, ключевые ферменты этих процессов и их регуляторы, а также уметь объяснить значение пентозофосфатного и глюкуронового путей метаболизма глюкозы.
23. Роль печени в обмене белков. Необходимо знать реакции превращения аминокислот по аминокруппе, пути образования заменимых аминокислот, как обезвреживаются продукты гниения белков и аммиак. Уметь привести примеры схем включения углеродного скелета аминокислот в цикл Кребса.
24. Роль печени в обмене липидов. Необходимо знать схемы основных путей обмена липидов, механизмы развития жировой инфильтрации печени (в том числе при алкоголизме). липотропные факторы.
25. Поясните центральную роль ацетил-КоА в обмене липидов. Необходимо знать схему образования кетонных тел и реакции, с которых начинаются синтез жирных кислот и синтез холестерина.
26. Антитоксическая функция печени. Обезвреживание в печени токсичных веществ, нормальных метаболитов, лекарственных препаратов. Уметь привести примеры реакций окисления, конъюгации, синтеза. Необходимо знать схему процесса окисления веществ в системе цитохрома P₄₅₀ и реакции окисления этанола и ацетальдегида в клетках печени.
27. Роль печени в пигментном обмене. Распад гемоглобина в клетках РЭС. Метаболизм желчных пигментов.
28. Желтуха, виды и причины ее возникновения.
29. 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).

30. Метаболические процессы депонирования углеводов и липидов пищи. Необходимо знать схему синтеза гликогена, схемы ресинтеза и синтеза триацилглицеролов, фосфолипидов. Знать отличие синтеза триацилглицеролов в печени и жировой ткани.

31. Интеграция метаболизма, ее составляющие. Механизмы регуляции метаболизма.

32. Регуляция и направленность метаболических процессов в печени после приема пищи и натощак. Механизм гиперпродукции кетоновых тел при голодании.

ЗАНЯТИЕ 28. БИОХИМИЯ КРОВИ. БЕЛКИ КРОВИ. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА АЦЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЕ

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 белков и ферментов плазмы крови проводится с целью диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний, установления прогноза болезни и оценки эффективности проводимого лечения. 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.

Одной из важнейших функций крови является ее дыхательная функция. Студенты рассматривают основные белки крови, их происхождение, структуру, механизмы транспорта кислорода и углекислого газа.

Цель занятия

Закрепить знания о происхождении белков и ферментов плазмы крови, особенностях метаболизма в эритроцитах, строении и функционировании гемоглобина, транспорте газов кровью; ознакомиться с принципами исследования белкового состава крови, понять диагностическое значение определения количественного соотношения белковых фракций сыворотки крови.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Недостаточность каких ферментов эритроцитов сопровождается их гемолизом?

- А. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.
- Б. Пируваткиназы.
- В. Пируватдегидрогеназы.
- Г. Изоцитратдегидрогеназы.
- Д. Аргиназы.

Задание 2. 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.

Задание 3. 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,

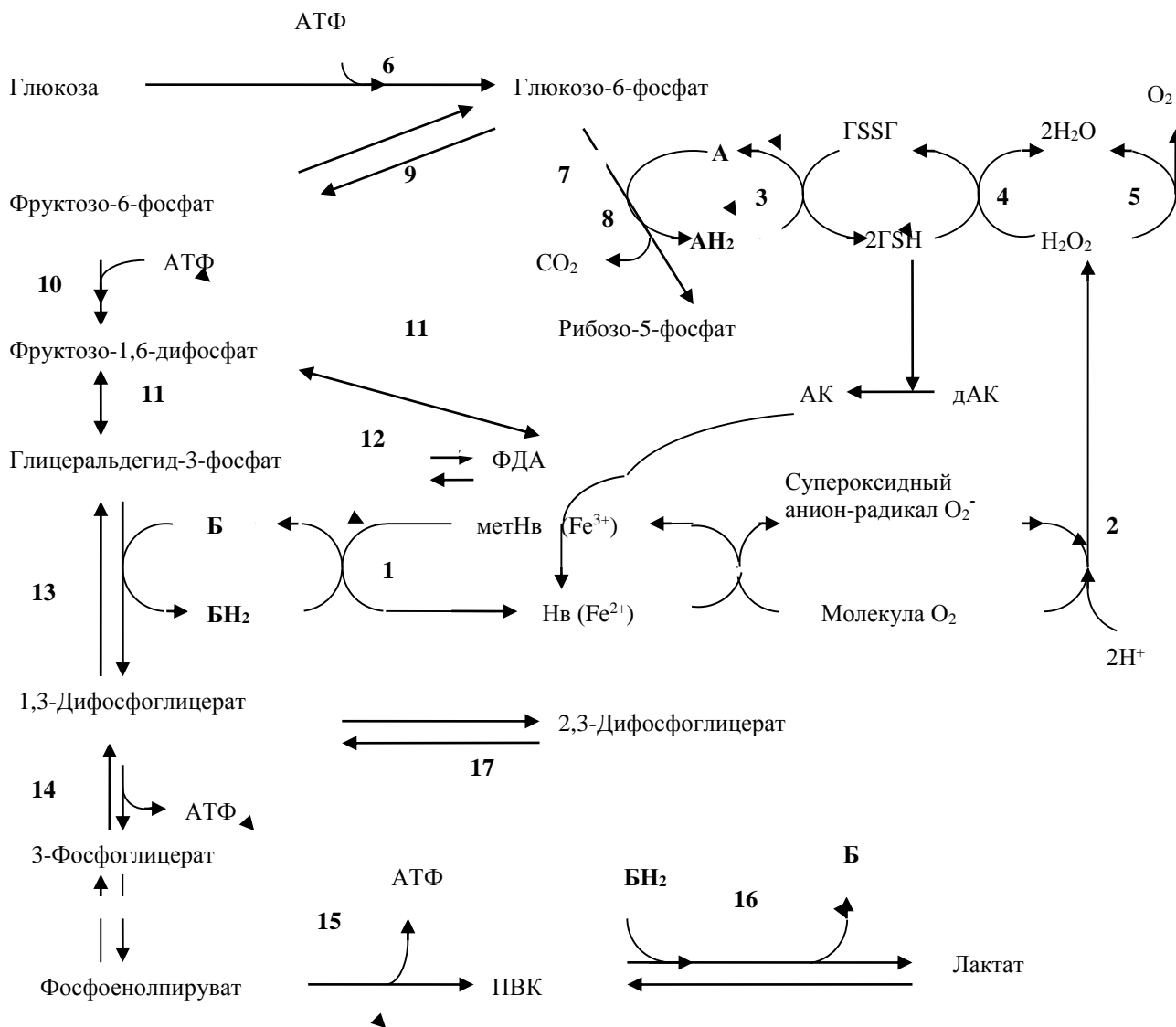
6-фосфоглюконатдегидрогеназа, фосфогексоизомераза, фосфоглицераткиназа, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, каталаза, супероксиддисмутаза, лактатдегидрогеназа, метгемоглобинредуктаза).

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.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Белки плазмы крови. Основные белковые фракции: альбумин, глобулины, фибриноген (содержание, функции); альбумин-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. Особенности метаболизма в эритроцитах. Строение гемоглобина, разновидности (нормальные и аномальные) и производные гемоглобина. Синтез гема.

4. Дыхательная функция крови. Эритроциты как главный участник транспорта газов кровью (роль гемоглобина и карбангидразы). Обратимое связывание кислорода и углекислого газа как способ транспортировки (механизмы связывания CO_2 и O_2 с гемоглобином, кооперативное взаимодействие субъединиц гемоглобина, регуляция насыщения гемоглобина кислородом и диссоциации оксигемоглобина (рН, 2,3-дифосфоглицерат, температура).

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое нание, 2019. С. 558–567, 587–594.

2. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Повторите и запомните биохимические константы крови (см. таблицу):

Некоторые биохимические константы крови

Плотность крови (цельной)		1,05–1,06
рН		7,37–7,44
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		0,85–2,0 ммоль/л
Холестерол		3,1–5,2 ммоль/л
Общий белок сыворотки		65–85 г/л
Альбумин		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:	мужчины	0,20–0,42 ммоль/л
	женщины	0,12–0,34
Гемоглобин крови:	мужчины	130–170 г/л
	женщины	120–150 г/л
Билирубин плазмы (сыворотки):	общий	5,0–20,5 мкмоль/л
	прямой	до 5 мкмоль/л
	непрямой	до 15,5 мкмоль/л
Na^+ в плазме		135–145 ммоль/л
K^+ в плазме		3,5–5,0 ммоль/л
Ca^{2+} в плазме (общий)		2,2–2,6 ммоль/л

Поясните происхождение химических компонентов крови и их биологическую роль.

Задание 2. Назовите индикаторные ферменты крови и поясните их диагностическое значение.

Задание 3. Знать и уметь объяснить механизмы транспорта газов кровью.

Задание 4.

4.1. 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 ($\zeta_2\varepsilon_2$), гемоглобин Говер II ($\alpha_2\varepsilon_2$) и гемоглобин Портленд ($\zeta_2\gamma_2$).

4.2. 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.

4.3. 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 рН и наоборот.
- Д. Окись углерода, цианиды конкурируют с кислородом за место связывания в геме гемоглобина.

4.4. 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 ответами.*

Проверьте ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Какие функции выполняют приведенные ниже глобулины крови?

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. Церулоплазмин. | А. Участвует в транспорте железа (Fe ³⁺) по кровеносному руслу. |
| 2. Трансферрин. | Б. Ведущая роль в транспорте меди к тканям. |
| 3. α_2 -Макро-глобулин. | В. Связывает и транспортирует свободный гемоглобин плазмы в клетки ретикулоэндотелия. |
| 4. Гаптоглобин. | Г. Ингибирует протеолитические ферменты крови (трипсин, химотрипсин, тромбин, плазмин, калликреин). |

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 ($\alpha_2\delta_2$).

ОТВЕТЫ К РЕШЕНИЮ ЗАДАНИЙ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — А, Б, 2 — А, 3. Б: А — НАДФ⁺, Б — НАД⁺; В: фосфоглицераткиназная (14) и пируваткиназная (15) реакции; Г: пентозофосфатный путь; Д: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза; Е: 2,3-дифосфоглицерат.

Для самостоятельной работы:

4.1 — А, Б, В, Г, Д; 4.2 — А, Б, В, Г, Д; 4.3 — А, Б, В, Д; 4.4 — Г.

Лабораторная работа

Работа 1. Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза на ацетилцеллюлозе

В клинических лабораториях наиболее распространены электрофоретические методы исследования белкового спектра плазмы (сыворотки) крови. Электрофорез белков сыворотки крови — объективный метод при первичной лабораторной диагностике острых и хронических воспалительных заболеваний, злокачественных опухолей, заболеваний печени, белок-дефицитных состояний, моноклональных гаммапатий и дефицита антител.

Разделение белков сыворотки крови на ацетилцеллюлозных плёнках даёт чёткое фракционирование и сокращает время электрофореза до 25–30 минут.

Принцип метода. Метод фракционирования основан на том, что под влиянием постоянного электрического поля белки сыворотки крови, обладающие электрическим зарядом, движутся по смоченной буферным раствором плёнке ацетилцеллюлозы со скоростью, зависящей от величины заряда и молекулярной массы частиц. Вследствие этого белки сыворотки разделяются обычно на 5 основных фракций: альбумин 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: альбумин — 53–66 %; глобулины — 29–54 % α_1 -глобулины — 2–5 %, α_2 -глобулины — 6–12 %, β -глобулины — 8–15 %, γ -глобулины — 11–22 %. Альбумин-глобулиновый коэффициент — отношение количества альбуминов к количеству глобулинов в биологических жидкостях. В крови величина альбумин-глобулинового коэффициента в норме относительно постоянна и равна 1,5–1,7. Снижение альбумин-глобулинового коэффициента, характерное для многих патологических состояний, может быть связано как с увеличением абсолютного количества глобулинов (при острых и хронических воспалительных процессах), так и с уменьшением абсолютного количества альбуминов (при циррозе печени, гепатите и других заболеваниях печени).

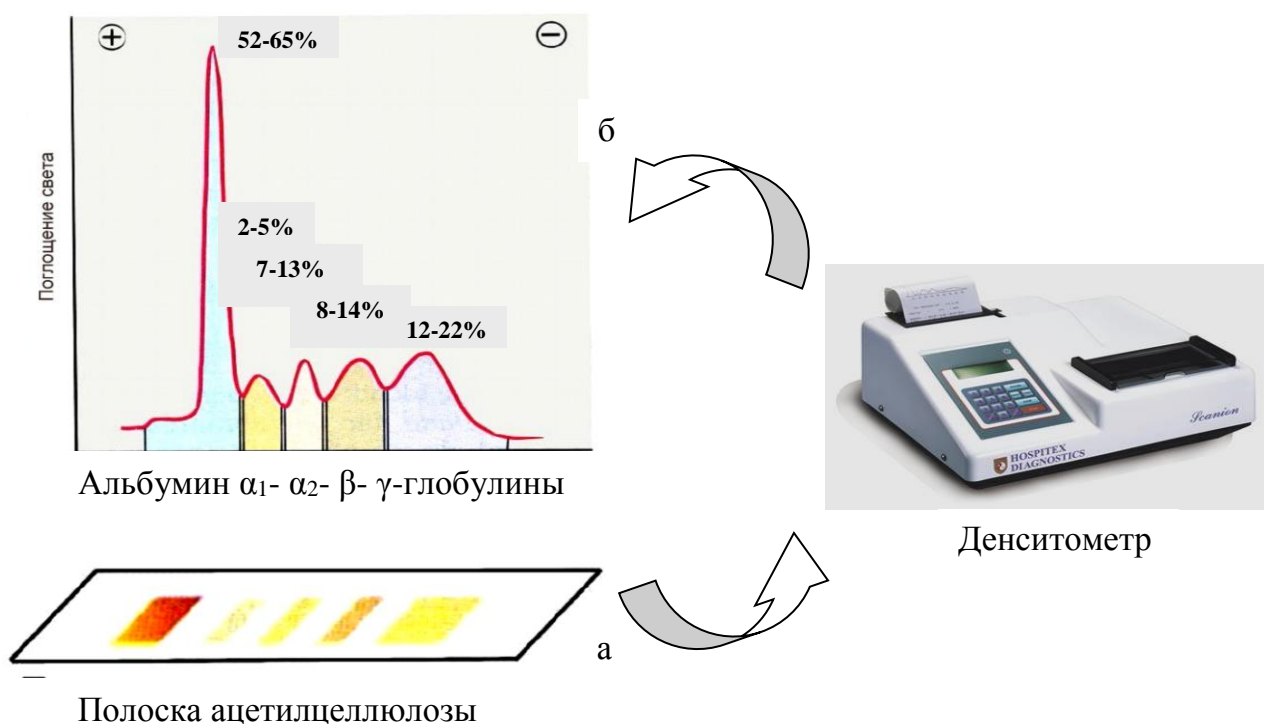
1. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови

Кюветные отделения аппарата для электрофореза заполняют буферным раствором. Полоски ацетилцеллюлозы смачивают буфером и туго натягивают (не должны провисать) в промежутке между кюветными отделениями. Через полоску носителя в течение 5 минут про-

пускают электрический ток. Отключают электрофоретическую камеру, на поверхность ацетилцеллюлозной плёнки у катода на линию старта наносят сыворотку крови. Прибор включают вновь и проводят электрофоретическое разделение белков.

2. Окраска электрофореграмм

После отключения прибора плёнки вынимают и сразу помещают их в раствор красителя (амидочёрный 10 В) на 10–15 минут. Для удаления избытка красителя полоски ацетилцеллюлозы переносят в кювету с 2 % раствором уксусной кислоты. Через 10–15 минут кислоту сливают и полоски заливают чистым раствором уксусной кислоты. В результате такой обработки синие пятна, соответствующие различным фракциям белков, отчетливо видны на прозрачном фоне ацетилцеллюлозной плёнки.



Электрофореграмма (а) и денситограмма (б) белков сыворотки крови человека на ацетилцеллюлозе

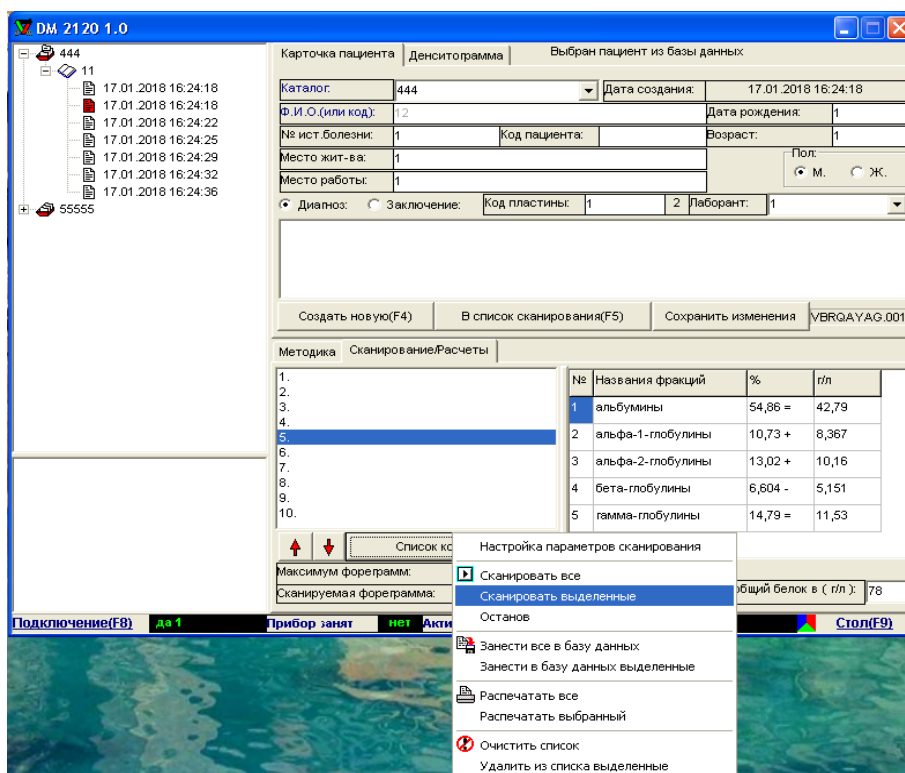
3. Количественная оценка электрофореграмм проводится путем денситометрии или фотометрии соответствующих элюатов.

3.1. Денситометрия электрофореграмм проводится с использованием денситометра. Денситометр — фотометрический прибор, обеспечивающий сканирование электрофореграммы. Целью сканирования является получение денситограммы — графического изображения распределения концентрации красителя вдоль электрофореграммы, представляющую собой серию отдельных пиков, по соотношению площадей которых интегратор и микропроцессорное устройство прибора вычисляют относительное содержание каждой белковой фракции.



Ход работы. Ознакомьтесь с устройством денситометра. Поместите на рабочий стол прибора исследуемую электрофореграмму таким образом, чтобы фракция альбуминов была слева, т. к. прибор производит измерения оптической плотности слева направо.

В программе, управляющей прибором, выберите номер дорожки электрофореграммы. Выберите команду «Сканировать выделенное». Прибор в автоматическом режиме отсканирует выбранную электрофореграмму, определит границы фракций и выдаст их процентное соотношение. В случае необходимости границы фракций можно выставить путем нажатия левой клавишей мышки.



Полученные результаты заносят в таблицу.

Фракция	альбумины	α_1 -глобулины	α_2 -глобулины	β -глобулины	γ -глобулины
Содержание, %					

По соотношению фракций определяют их соответствие норме и производят вычисление альбумин-глобулинового коэффициента по формуле:

$$A/\Gamma = \frac{\text{содержание альбуминов, \%}}{\text{содержание глобулинов (сумма всех глобулиновых фракций), \%}}$$

Расчет: $A/\Gamma =$

Вывод:

3.2. Фотометрия элюатов фракций белка

Ход работы. Полоски ацетилцеллюлозы промокают фильтровальной бумагой, окрашенные белковые фракции вырезают и помещают в соответствующие пронумерованные пробирки

с элюирующим раствором (в 5 пробирок наливают из бюретки по 5 мл 0,1 н NaOH). Через 20 минут против воды (контроль) определяют оптическую плотность каждого раствора 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 рассчитывают относительное содержание белка в каждой фракции, вычисляют альбумин-глобулиновый коэффициент.

$$\text{Относит. содерж. альбумина (\%)} = \frac{\text{Оптич. плотн. элюата альбумина (E)}}{\text{Сумма оптич. плотностей (\Sigma)}} \cdot 100 \%$$

Результаты:

	альбумины	α_1 -глобулины	α_2 -глобулины	β -глобулины	γ -глобулины	Σ
E (оптич. плотн.)						
Относит. сод-е, %						

Расчет: A/G =

Вывод:

Подпись преподавателя:

ЗАНЯТИЕ 29. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ И ХЛОРИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Актуальность темы

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. Кальций является главным минералом по содержанию, а хлорид-ион — главным внеклеточным анионом в организме человека.

Цель занятия

Получить представление о механизмах гемостаза и изучить функционирование системы свертывания крови. Ознакомиться с принципами определения и диагностическом значении концентрации кальция и хлоридов в плазме 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. 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.

2. Свертывающая система (компоненты и их происхождение), гемокоагуляция (определение, фазы и их продолжительность, источники тромбопластинов). Внешний и внутренний механизмы свертывания крови.

3. Витамин К. Химическая природа, разновидности, природные источники, роль в гемокоагуляции.

4. Антикоагулянтная система, классификация физиологических антикоагулянтов: первичные и вторичные (представители, механизм действия). Представление об искусственных антикоагулянтах прямого и непрямого действия.

5. Фибринолитическая система, механизмы фибринолиза. Плазминовая система. Компоненты и их происхождение, механизм действия.

Литература для подготовки

1. Фармацевтическая биохимия : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое издание, 2019. С. 567–582.
2. Биологическая химия : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 204–210.
3. Конспект лекций.

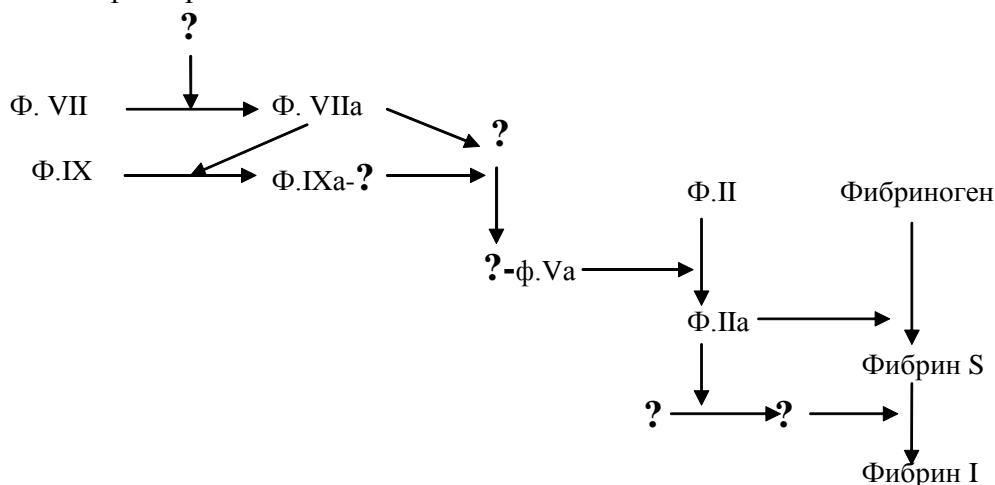
Задания для самостоятельной работы

Задание 1.

1.1. Напишите схему внутреннего пути свертывания крови.

1.2. Запомните активаторы фактора Хагемана.

1.3. На схеме внешнего механизма свертывания крови замените знак вопроса соответствующими факторами.



Внешний механизм свертывания крови

Задание 2. Назовите витамин К-зависимые факторы системы свертывания крови.

Задание 3. Умейте объяснить механизм действия основных физиологических антикоагулянтов.

3.1. 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. |

3.2. Ответьте на вопрос: почему у гомозиготных новорожденных с мутацией гена протеина С наблюдается распространенный тромбоз внутренних органов (врожденная молниеносная пурпура)?

3.3. Ответьте на вопрос: почему при бактериальных инфекциях, вызванных некоторыми стрептококками, наблюдаются диффузные кровотечения?

Задание 4. 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 ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. 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 плазминогена в плазмин.

Задание 2. 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 тромбопластином.
- Д. Активируется тканевым тромбопластином.

Задание 3. Расположите в правильном порядке события, происходящие при образовании фибринового сгустка:

- А. Стабилизация полимера фибрина (образование фибрина I).
- Б. Отщепление от фибриногена фибринопептидов А и В.
- В. Ретракция сгустка.
- Г. Образование фибрина S.

Задание 4. 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 5. 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 6. 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 7. Дефицит антитромбина III — частая причина тромбозов. Какова антикоагулянтная роль антитромбина III?

- А. Образование необратимого комплекса с гепарином.
- Б. Ингибирует витамин К-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 8. 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 К-зависимое карбоксилирование остатков глутамата протеинов C и S.

Задание 9. 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 10. 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.

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самостоятельной работы:

3.1 А – 2, 3, 4, 5, 6; Б – 1, 7.

Лабораторная работа

Работа 1. 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 — 2,2–2,6 ммоль/л.

Принцип метода. Индикатор хромоген черный ET-00 образует с кальцием соединение фиолетового цвета. При титровании трилоном Б (двухзамещенная натриевая соль этилендиа-

минотетрауксусной кислоты, образуя прочные комплексы с ионами кальция) такого окрашенного раствора произойдет изменение окраски в синий цвет в эквивалентной точке, соответствующей связыванию трилоном Б всех ионов кальция в растворе.

Ход работы. В колбочку наливают 25 мл H_2O и вносят 1 мл аммиачного буферного раствора. Затем приливают 1 мл исследуемой плазмы крови и 2 капли индикатора хромогена черного. Раствор приобретает фиолетовый цвет. Затем раствор титруют 0,002 М раствором трилона Б до синей окраски. По объему трилона Б, пошедшего на титрование, рассчитывают содержание кальция в плазме крови.

$$X = \frac{0,002 \cdot 40,8 \cdot 100 \cdot 0,245 \cdot V_T}{1},$$

где 0,002 — молярность раствора трилона Б; 40,8 — молекулярный вес Ca; 100 — коэффициент для пересчета в мг%; 1 — объем сыворотки, взятый для анализа; V_T — объем трилона Б, израсходованный на титрование. 0,245 - коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л).

Результат: $V_T =$

Расчет: X (ммоль/л) =

Вывод:

Работа 2. 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 $H_2O_{дист}$. 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 ($V_{оп}$ (мл)), вычитают объем (мл) $AgNO_3$, пошедший на титрование контроля ($V_{контр}$ (мл)), 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.

$$C \text{ (ммоль/л)} = (V_{оп} - V_{контр}) \cdot 0,355 \cdot 1000 \cdot 0,282;$$

Результат: $V_{\text{оп}} (\text{мл}) =$

$V_{\text{контр}} (\text{мл}) =$

Расчет:

Вывод:

Подпись преподавателя:

ЗАНЯТИЕ 30. БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ БЕЛКОВ, ЖИРОВ, УГЛЕВОДОВ, ВИТАМИНОВ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В ПЛОДАХ ШИПОВНИКА И В МОЧЕ

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 компонентами пищи 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. Знание коферментных функций витаминов в организме позволяет понять механизмы развития и профилактики гипо- и авитаминозов и использовать витамины с профилактической и лечебной целью.

В этой теме изучается механизм образования активных форм кислорода, их физиологическое и повреждающее действие на клетки организма и антиоксидантное действие витаминов С, Е и А.

Цель занятия

Сформировать представление о биохимических механизмах использования компонентов пищи для поддержания нормальной жизнедеятельности организма. Закрепить знания по химической структуре и молекулярным механизмам биологического действия коферментных форм витаминов, вовлечению в метаболизм других незаменимых факторов питания. Познакомить студентов с методами обнаружения витаминов и количественного их определения в лекарственном растительном сырье, продуктах питания и биологических жидкостях.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. 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
- Г. Синтезирует длинноцепочечные жирные кислоты для синтеза липидов в других клетках

Задание 2. Патологическое состояние, связанное с недостатком витаминов в пище, нарушением их всасывания или нарушением их использования организмом, называется _____.

Задание 3. Вспомните, что витамины принимают участие в процессах метаболизма после их активации в клетках, т. е. превращения в коферментную форму.

3.1. Подберите соответствующие пары витамин — кофермент:

- | | |
|----------------------|-------------------------------------|
| А. НАД ⁺ | 1. Производное пиридоксина |
| Б. ТПФ | 2. Производное рибофлавина |
| В. HS-CoA | 3. Производное тиамина |
| Г. ФАД | 4. Производное никотиновой кислоты |
| Д. Пиридоксальфосфат | 5. Производное пантотеновой кислоты |

Задание 4. Укажите активную форму витамина А:

- | | | |
|-------------------------------|--------------|-------------------|
| А. Тетрагидрофолиевая кислота | В. Ретиналь | Д. Карбоксибиотин |
| Б. Пиридоксальфосфат | Г. Коэнзим А | |

Задание 5. Характерными проявлениями авитаминоза А являются:

- | | |
|-------------------------------|--|
| А. Себорейный дерматит | Г. Рахит |
| Б. Фолликулярный гиперкератоз | Д. Куриная слепота |
| В. Ксерофтальмия | Е. Торможение роста, потеря массы тела |

Задание 6. Характерными проявлениями гиповитаминоза Е являются:

- А. Повышение проницаемости клеточных мембран
- Б. Нарушение сумеречного зрения
- В. Бесплодие, выкидыши
- Г. Мишечная дистрофия, поражение связочного аппарата
- Г. Диарея

Задание 7. Укажите компоненты неферментативной антиоксидантной защиты клетки:

- | | | |
|--------------|--------------|--------------------|
| А. Глутатион | В. Глюкоза | Д. Мочевая кислота |
| Б. Каталаза | Г. Токоферол | |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Незаменимые факторы питания. Характеристика питательных веществ (белков, жиров, углеводов), их пищевая ценность.
2. Энергия — потребность, происхождение и расходование в организме.
3. Водорастворимые витамины: тиамин (В₁), рибофлавин (В₂), пантотеновая кислота, ниацин (РР), пиридоксин (В₆), фолиевая кислота (В₉), кобаламин (В₁₂), биотин (витамин Н), витамин С; химическая природа, коферментные формы, биологическая роль, источники, суточная потребность. Признаки недостаточности.
4. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (вит. Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота.
5. Каротины, витамины А и Е, молекулярные механизмы действия, биологическая роль, источники, суточная потребность. Признаки недостаточности.
6. Понятие о свободных радикалах и активных формах кислорода, их физиологическое и повреждающее действие. Ферментативная и неферментативная антиоксидантная защита. Антиоксидантное действие витаминов С, А и Е.
7. Методы оценки насыщенности организма витаминами.

Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 478–496, 500–525.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 174–183, 186–189.
3. *Морозкина, Т. С.* Витамины : краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармакологических и биологических специальностей / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. Минск : Асар, 2002.
4. *Конспект лекций.*

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. 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.

1.1. 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.

1.2. Выберите правильный ответ. Источниками энергии для организма человека в состоянии покоя являются:

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| А. Реально — углеводы 60 % | Г. Желательно — жиры 40 % |
| Б. Желательно — алкоголь 3 % | Д. Реально — жиры 10 %. |
| В. Реально — белки 15 % | |

Задание 2. 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.

Задание 3. Какие из нижеперечисленных соединений относятся к активным формам кислорода? Назовите их:

- | | | |
|------------------|---------------------------|------------------------|
| А. NO_2 | В. $\text{O}_2^{\cdot -}$ | Д. OH^{\cdot} |
| Б. CO | Г. H_2O_2 | Е. ONOO^- |

Задание 4. 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 5. Укажите компоненты ферментативной антиоксидантной защиты клетки:

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

Задание 6. Выберите правильные ответы относительно участия витамина А в антиоксидантной защите организма:

- А. Ослабляет действие витамина Е
- Б. Препятствует окислению SH-содержащих белков
- В. Активирует включение селена в состав глутатионпероксидазы
- Г. Усиливает антиоксидантное действие токоферола
- Д. Взаимодействует со свободными радикалами различных типов
- Е. Активирует супероксиддисмутазу

Задание 7. Запомните, что жирорастворимые витамины в отличие от водорастворимых 1) действуют на генетическом уровне подобно стероидным гормонам, 2) являются структурными компонентами клеточных мембран и проявляют антиоксидантное действие, 3) коферментные функции им не присущи (кроме витамина К). Умейте объяснить механизм антиоксидантного действия витамина Е путем «физической» защиты клеточных мембран от свободных радикалов.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Какие из нижеперечисленных продуктов питания содержат много эйкозопентаеновой (ω -3) и докозагексаеновой кислот (ω -3)?

- | | | | |
|-------------|----------|---------------------------|-----------------|
| А. Креветки | Б. Семга | В. Женское грудное молоко | Г. Соевое масло |
|-------------|----------|---------------------------|-----------------|

Задание 2. Каким образом пищевые 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 3. Какой источник энергии обеспечивает 90 % глюкозы, необходимой в качестве топлива в течение первых нескольких дней голодания?

- А. Белок
- В. Гликоген
- Б. Кетоновые тела
- Г. Триацилглицеролы

Задание 4. Активность каких процессов снижена при недостаточности тиамина?

- А. Трансаминирование аминокислот
- Б. Декарбоксилирование аминокислот
- В. Окислительное декарбоксилирование α -кетокислот
- Г. Трансметилирование аминокислот
- Д. Окислительное дезаминирование аминокислот

Задание 5. При недостатке фолиевой кислоты страдает прежде всего кроветворение и деятельность желудочно-кишечного тракта. Какие соединения входят в состав В₉? В реакциях какого типа участвует коферментная форма (назвать ее) этого витамина?

Задание 6. 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.

Задание 7. Больному сделана операция резекции желудка, после чего вследствие недостаточности витамина В₁₂ у него развилась анемия. Назовите коферментные формы этого витамина. В каких реакциях они принимают участие?

Задание 8. Выберите правильные ответы относительно участия витамина Е в антиоксидантной защите организма:

- А. Защита от окисления двойных связей в молекулах каротинов и витамина А
- Б. Включение селена в состав активного центра глутатиопероксидазы
- В. Разобщение процесса тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования
- Г. Защита от окисления SH – групп мембранных белков
- Д. Мембраностабилизирующее действие
- Е. Сдерживание прооксидантного действия витамина С

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1В; 2Гиповитаминоз; 3.1 (А – 4, Б – 3, В – 5, Г – 2, Д – 1); 4В; 5Б, В, Д, Е.; 6А, В, Г. 7А, Г, Д;

Для самостоятельной работы:

1.2В; 3В – супероксидный анион-радикал, Г – пероксид водорода, Д – гидроксильный радикал, Е – пероксинитрит; 4А, Б, Г, Д; 5А, Б, Д; 6Б, В, Г, Д.

Лабораторная работа

Качественные реакции на витамины позволяют обнаружить их наличие в пищевых продуктах, в лекарственных препаратах и лекарственных растениях. Принцип, положенный в основу качественных реакций на витамины, используется при разработке количественного определения их в различных природных объектах и лекарственных препаратах.

Работа 1. Качественные реакции на витамин А (ретинол)

Витамин А содержит β -иононовое кольцо и боковую цепь, состоящую из двух остатков изопрена и первичной спиртовой группы. Провитамин А является желтый пигмент растений — каротин. В организме каротин превращается в витамин А.

1.1. Проба Друммонда

Принцип метода. Метод основан на способности концентрированной H_2SO_4 отнимать воду от ретинола с образованием окрашенных продуктов реакции.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1 каплю ретинола ацетата и 5 капель хлороформа, перемешивают и добавляют 1 каплю конц. H_2SO_4 . Появляется голубое или красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в буро-красное.

1.2. Реакция с хлорным железом

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1 каплю ретинола ацетата и 5 капель хлороформа. Перемешивают и добавляют 3 капли хлорида железа. Появляется желтое окрашивание.

Работа 2. Качественные реакции на витамин E (α -токоферол)

2.1. Реакция с азотной кислотой

Принцип метода. Спиртовой раствор витамина E в присутствии концентрированной азотной кислоты окисляется в хиноидное соединение, окрашенное в красный цвет.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 6 капель 0,1% спиртового раствора витамина E, добавляют несколько крупинок сахарозы. Осторожно по стенке пробирки прибавляют 10 капель конц. HNO_3 . Пробирку слегка встряхивают. Через 1–2 мин наблюдают красное или желтовато-красное окрашивание.

2.2. Реакция с хлоридом железа

Принцип метода. Спиртовой раствора-токоферола окисляется $FeCl_3$ в токоферилхинон и раствор окрашивается.

Ход работы. В сухую пробирку берут 4–5 капель 0,1%-ного спиртового раствора α -токоферола, прибавляют 0,5 мл 1%-ного раствора $FeCl_3$, тщательно перемешивают. Содержимое пробирки приобретает красное окрашивание.

Работа 3. Качественная реакция на викасол (витамин K)

Известны два природных витамина K_1 и K_2 , являющиеся производными нафтохинона. Искусственно синтезированный водорастворимый аналог витамина K_1 -викасол обладает биологической активностью витамина.

Принцип метода. Викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Ход работы. На сухое предметное стекло наносят 5 капель раствора викасола, добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю 10%-ного $NaOH$. Появляется лимонно-желтое окрашивание.

Работа 4. Качественные реакции на витамин B₁

Витамин B_1 состоит из пиримидинового и тиазолового колец. Витамин B_1 получил название тиамин поскольку содержит серу и азот.

4.1. 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%-ного раствора тиамин прибавляют 5–10 капель 10%-ного раствора $NaOH$, 1–2 капли 5%-ного раствора феррицианида калия и взбалтывают смесь. После прогревания флюороскопа наблюдают синюю флюоресценцию при облучении раствора ультрафиолетовыми лучами.

4.2. Диазореакция

Принцип метода. В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

Ход работы. К диазореактиву, содержащему 5 капель 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5% раствора нитрита натрия, добавляют 1–2 капли 5%-ного раствора тиамин и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5–7 капель 10%-ного раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Работа 5. *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 НСl и опускают зернышко металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается. Сравнивают обе формы витамина В₂ по флюоресценции.

Работа 6. *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%-ного раствора витамина РР (перед определением раствор обязательно следует взболтать) и нагревают до кипения; при этом мутный раствор становится прозрачным. Взболтав 5%-ный 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 7. *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 8. *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.

Вывод:

Количественное определение аскорбиновой кислоты (витамина С)

Определение содержания аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах и лекарственных растениях необходимо для составления правильного рациона, удовлетворяющего потребность организма в этом витамине. Богаты витамином С цитрусовые, капуста, картофель, хвоя, плоды шиповника, рябины черноплодной, черной смородины и др.

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.

Работа 9. ***Определение содержания витамина С в плодах шиповника***

Метод используется в Государственной Фармакопее при определении содержания витамина С в плодах шиповника.

Ход работы. В колбу отвешивают 5 г растительного сырья (мелко измельченных плодов шиповника) и добавляют 50 мл дистиллированной воды. Полученную смесь настаивают 10 мин, затем размешивают и фильтруют. В коническую колбу вносят 1 мл полученного фильтрата, 1 мл 2%-ного р-ра HCl, 13 мл воды, перемешивают и титруют из микробюретки 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски, сохраняющейся в течение 30–60 с.

Для расчета содержания аскорбиновой кислоты 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-дихлор-фенолиндофенола; A — результат титрования 0,001н раствором 2,6-дихлор-фенолиндофенола, мл; B — количество продукта, взятое для анализа, г; 100 — пересчет на 100 г продукта. В 100 г плодов шиповника (розы собачьей) содержится 800 мг витамина С.

Полученные данные и расчет: $A =$

Вывод:

Работа 10. *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%-ного 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).

Полученные данные и расчет: $A =$ $x =$

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 31. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ВЕЩЕСТВ И ИХ ВЫВЕДЕНИЕ ИЗ ОРГАНИЗМА. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ, ПАРАЦЕТАМОЛА, ДИКЛОФЕНАКА И ТЕТРАЦИКЛИНА В МОЧЕ

Актуальность темы

Для обеспечения профессиональной деятельности провизора необходимы знания о механизмах действия природных и чужеродных веществ, способах их биотрансформации в условиях живого организма и способах выведения.

С мочой из организма выделяются продукты обмена (мочевина, мочевая кислота и др), продукты обезвреживания различных лекарственных и ядовитых веществ (эфиро-серные, парные глюкуроновые кислоты, гиппуровая кислота и др.), а также содержатся в небольшом количестве аминокислоты, некоторые гормоны и витамины, различные метаболиты и неорганические вещества, всего свыше 150 химических ингредиентов.

Цель занятия

Научиться применять знания о химическом составе живых организмов, закономерностях обмена веществ и энергии, основных путях поступления, превращения и выведения лекарственных веществ и эндогенных соединений из организма для усвоения основ биофармации, положений фармакокинетики, методов стандартизации и контроля качества лекарственных препаратов. Научиться оценивать содержание лекарственных препаратов и их метаболитов в моче.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Процесс поглощения клеткой жидкости и растворенных в ней веществ, называется _____.

Задание 2. Перенос вещества из среды в клетку вместе с частью плазматической мембраны, называется:

- А. Эндоцитоз
- В. Активный симпорт
- Б. Фильтрация
- Г. Простая диффузия

Задание 3. Для пассивного транспорта:

- А. Используется энергия, полученная при катаболизме белков
- Б. Используется энергия, полученная при катаболизме углеводов
- В. Используется энергия, полученная при окислении липидов
- Г. Не используется энергия вообще

Задание 4. Облегченная диффузия:

- А. Происходит при участии специальных белковых структур по градиенту концентрации
- Б. Использует в качестве источника энергии АТФ
- В. Не требует специальных переносчиков
- Г. Использует в качестве источника энергии градиент концентрации одного из переносимых веществ

Задание 5. Мембранный транспорт веществ различается по направлению перемещения переносимых переносчиком веществ. Установите соответствие между видом транспорта и его определением:

- | | |
|-------------|---|
| 1. Симпорт | А. Перемещение двух веществ в разных направлениях через один переносчик |
| 2. Унипорт | Б. Транспорт двух веществ в одном направлении через один переносчик |
| 3. Антипорт | В. Транспорт одного вещества в одном направлении в зависимости от градиента |

Задание 6. Какое количество глюкозы реабсорбируется в проксимальном канальце здоровой почки?

- А. 100 % при нормогликемии.
- Б. 50 % при нормогликемии
- В. 100 % при содержании глюкозы в крови более 10 ммоль/л

Задание 7. В дистальном канальце нефрона наряду с процессами, связанными с разведением и концентрированием мочи, осуществляются реабсорбционные и секреторные процессы, главная задача которых — сохранить кислотно-основное состояние 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 ответами.

Вопросы для обсуждения

1. Фармацевтическая биохимия. Всасывание и транспорт лекарственных веществ. Специфические и неспецифические транспортные системы крови. Распределение лекарственных веществ в тканях. Факторы, влияющие на процессы фармакокинетики.

2. Фазы биотрансформации веществ. Изменения активности и токсичности веществ в процессе метаболизма. Факторы, влияющие на метаболизм лекарственных веществ: генетические, физиологические и внешней среды.

3. Реакции окисления, восстановления, гидролиза. Микросомальная система окисления, роль цитохрома P_{450} . Метаболизм экзогенного этанола.

4. Фаза конъюгации в системе обезвреживания различных веществ. Виды конъюгации (глюкуронирование, ацетилирование, метилирование, сульфатирование и гидратация), косубстраты и ферменты (примеры реакций).

5. Выведение лекарственных веществ из организма. Основные пути выведения, их механизмы.

6. Общие свойства мочи (объем, плотность цвет, прозрачность). Факторы, обуславливающие изменения этих показателей.

7. Неорганические и органические компоненты мочи в норме.

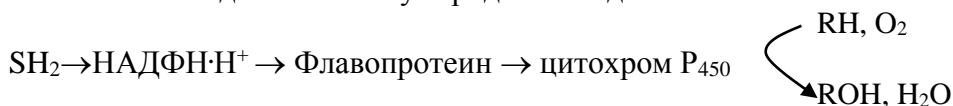
8. Патологические компоненты мочи: глюкоза, белок, кровь, кетоновые тела.

Литература для подготовки

- 1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 622–648.
- 2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [др.]. Минск : Беларусь, 2013. С 235–250.
- 3. *Конспект лекций*

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Знайте основы функционирования микросомальной 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, фенобарбитал, способны индуцировать синтез микросомальных ферментов и цитохрома P_{450} .

Знайте, что фаза конъюгации необходима для образования малотоксичных и легковыводимых продуктов метаболизма лекарств и может протекать как самостоятельный этап обезвреживания.

1.1. Выберите предложения, которые правильно характеризуют микросомальное окисление:

- А. Микросомальное окисление происходит в гладком ЭПР печени и других органах, а также митохондриях коры надпочечников и половых желез
- Б. НАДФНН⁺ не является донором водорода для реакции «микросомального» окисления
- В. Главные ферменты системы — цитохромы а, а₃
- Г. Для образования гидроксильной группы в модифицируемом гидрофобном веществе используется атом кислорода молекулы воды

1.2. Подберите соответствия:

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 1. Образуется под действием метилтрансферазы | А. Билирубинглюкуронид |
| 2. Конечный продукт обезвреживания аспирина | Б. Метилгистамин |
| 3. Образуется под действием УДФ-
глюкуронилтрансферазы | В. Эпоксид бензантрацена |
| 4. Канцероген | Г. Индоксилсульфат |
| 5. Конечный продукт обезвреживания триптофана | Д. Глюкуронид салициловой кислоты |

Задание 2. Найдите верные утверждения:

- А. В результате метаболизма лекарственных веществ может произойти его инактивация
- Б. В результате биотрансформации может произойти повышение активности лекарственного средства
- В. Под действием монооксигеназ образуются реакционноспособные ОН-группы
- Г. Чувствительность к лекарственным средствам не меняется с возрастом

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 | В. Гидроксильные |
| Б. Дисульфидные | Г. Карбоксильные |

Задание 4. Какие из нижеперечисленных реакций относятся к первой фазе метаболизма ксенобиотиков:

- | | |
|-------------------|-------------------|
| А. Гидролиз | Г. Метилирование |
| Б. Восстановление | Д. Ацетилирование |
| В. Окисление | Е. Конъюгация |

Задание 5. Выберите правильный ответ. К ферментам конъюгации относятся:

- | | |
|----------------------|--------------------------------|
| А. Сульфотрансфераза | Д. Глутатионредуктаза |
| Б. Фосфорилаза | Е. УДФ – глюкуронилтрансфераза |
| В. Метилтрансфераза | Ж. Глутатиотрансфераза |
| Г. Ацетилтрансфераза | |

Задание 6. 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 | В. Глицин | Д. Таурин |
| Б. УДФ-глюкуроновая кислота | Г. Церулоплазмин | |

Задание 7. В результате метаболической трансформации с веществом может произойти всё, кроме:

- | | |
|---------------------------------------|---|
| А. Повышение биологической активности | Г. Появление токсического эффекта |
| Б. Снижение биологической активности | Д. Полная потеря активности или токсичности |
| В. Повышение липофильности | |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Методом дифференциального центрифугирования клеток печени была получена микросомная фракция. Микросомальное окисление — это способ обезвреживания токсических веществ в печени. Выберите компонент этой цепи окисления:

- А. Цитохром a_3 В. Цитохром b Д. Цитохром c_1
Б. Цитохром c Г. Цитохром P_{450}

Задание 2. При помощи реакции гидролиза биотрансформируются лекарственные вещества, за исключением:

- А. Инсулин Г. Аминокислоты
Б. Ацетилхолин Д. Ацетилсалициловая кислота
В. Новокаиамид

Задание 3. Конъюгация, как фаза метаболизма ксенобиотиков, включает в себя:

- А. Взаимодействие с глутатионом
Б. Взаимодействие с глицином
В. Взаимодействие с ионом железа (Fe^{2+})
Г. Взаимодействие с гидроксильным радикалом

Задание 4. Выберите основной метаболит производных барбитуровой кислоты:

- А. Эпоксид Г. Индоксилсульфат
Б. о-карбоксифенилгликуронид Д. Метилгистидин
В. Барбитуратгликуронид

Задание 5. Больной, принимающий одновременно неодикумарин и фенobarбитал, самовольно без разрешения врача прекратил прием фенobarбитала. К чему это может привести? Ответ аргументируйте.

Задание 6. Для предотвращения развития гипербилирубинемии (желтухи) 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 микросомного окисления
Д. В качестве липотропного средства

ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

1.1 А, Б; 1.2 – 1Б, 2Д, 3А, Д, 4В, 5Г; 2А, Б, В; 3.1 В, Г; 4А, Б, В; 5А, В, Г, Е, Ж; 6А, Б; 7В. 8В; 9А; 10Б.

Лабораторная работа

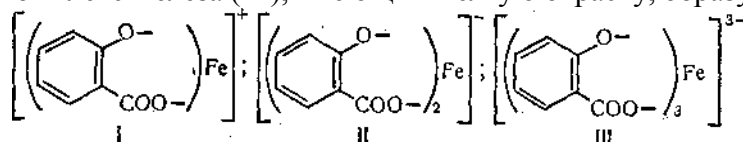
Работа 1. **Определение ацетилсалициловой и салициловой кислот в моче**

При помощи описанных ниже реакций можно обнаружить ацетилсалициловую кислоту в моче лиц, принявших 1–2 таблетки этого препарата за 24 ч до взятия пробы мочи.

Реакция с хлоридом железа (III).

Принцип метода: при взаимодействии салициловой кислоты с ионами железа образуется комплексное соединение. Состав и окраска образующихся комплексов зависит от рН среды. При рН = 1,8–2,5 образуется моносалицилатный комплекс (I), имеющий сине-фиолетовую окраску.

При pH = 4–8 образуется дисалицилатный комплекс (II), имеющий красно-бурую окраску. Три-салицилатный комплекс железа (III), имеющий желтую окраску, образуется при pH = 8–11:



Ход работы: к 1 мл мочи прибавляют 3 капли 5%-го раствора хлорида железа (III). Появление фиолетовой окраски свидетельствует о наличии ацетилсалициловой или салициловой кислоты в моче.

Вывод:

Работа 2. *Определение парацетамола в моче*

Принцип метода: парацетамол выделяется с мочой в неизменном виде и в виде п-аминофенола (продукта разложения).

Ход работы: к 1 мл мочи прибавляют 2–3 капли 10%-го раствора соляной кислоты и охлаждают водой под краном. Затем к охлажденной смеси прибавляют 2–3 капли 1%-го раствора нитрита натрия и 2–3 капли свежеприготовленного 1%-го раствора α-нафтола в 10%-м растворе NaOH. Появление красной окраски свидетельствует о наличии п-аминофенола в моче. Избыток (!) раствора α-нафтола мешает этой реакции.

Вывод:

Работа 3. *Определение диклофенака в моче*

Принцип метода: при взаимодействии диклофенака с ионами тяжелых металлов образуются солеобразные и комплексные соединения различного цвета, выпадающие в осадок.

Реакция с нитратом серебра.

Ход работы: к 1 мл мочи прибавляют 10 капель 5%-го раствора нитрата серебра (AgNO₃). При наличии в моче диклофенака выпадает осадок белого цвета.

Реакция с сульфатом меди.

Ход работы: к 10 каплям мочи добавляют 5–10 капель сульфата меди (CuSO₄). При наличии в моче диклофенака выпадает осадок светло-зеленого цвета.

Вывод:

Работа 4. *Определение тетрациклина в моче*

Принцип метода: под действием концентрированной серной кислоты образуются окрашенные ангидропроизводные тетрациклина желто-оранжевого цвета.

Реакция с концентрированной серной кислотой.

Ход работы: к 10 каплям мочи добавляют 2–3 капли концентрированной серной кислоты. Появление желто-оранжевой окраски свидетельствует о наличии тетрациклина в моче.

Вывод:

Подпись преподавателя:

Занятие 32. ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ:

«БИОХИМИЯ КРОВИ». «БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ». «ВОДНО-МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН», «ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ»

1. Строение гемоглобина, разновидности (нормальные и аномальные) и производные гемоглобина. Синтез гема.
2. Механизмы переноса кислорода и углекислого газа кровью.
3. 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).

4. Индикаторные ферменты крови и их диагностическое значение.

5. Что понимают под гемостазом? Представление о механизмах гемостаза. Три основных структурно-функциональных компонента гемостаза. К каким патологическим состояниям могут привести нарушения в системе гемостаза?

6. Функциональные звенья системы свертывания крови и их биологическая роль.

7. 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.

8. Антикоагулянтная система. Классификация естественных антикоагулянтов. Наиболее значимые естественные антикоагулянты, механизм их действия. Искусственные антикоагулянты (примеры). Механизм действия дикумарола и гепарина.

9. Фибринолитическая система, механизмы фибринолиза. Плазминовая система (компоненты и их происхождение, механизм действия).

10. Витамин К. Химическая природа, разновидности, участие в процессе свертывания крови. Синтетические производные. Антивитамины.

11. Пищевая ценность углеводов, липидов и белков. Незаменимые и условно незаменимые факторы питания.

12. Реальный и желательный вклад белков, жиров и углеводов в энергопродукцию. Пути использования АТФ.

13. Витамин В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), пантотеновая кислота, РР (никотиновая кислота), В₆ (пиридоксин), В₉ (фолиевая кислота), В₁₂ (кобаламин), Н (биотин), С (аскорбиновая кислота). Назвать химическую природу. Знать коферментные формы и участие в метаболизме, признаки гиповитаминоза, суточную потребность и пищевые источники. Уметь нарисовать блок-схемы для коферментных форм витамина РР (НАД⁺ и НАДФ⁺) и витамина В₂ (ФМН и ФАД).

14. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (витамин Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота.

15. Образование и физиологическая роль активных форм кислорода и азота. Повреждающее действие свободных радикалов и активных форм кислорода. Антиоксидантная защита.

16. Токоферол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гиповитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина Е.

17. Ретинол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гипо- и гипervитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина А. Каротины.

18. Витамин D. Химическая природа, всасывание, механизм действия, участие в метаболизме, признаки гипо- и гипervитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина D.

19. Минеральные вещества как незаменимые факторы питания. Классификация. Пути поступления минеральных веществ в организм, механизмы всасывания. Функции минеральных веществ. Электролитный состав биологических жидкостей. Механизмы регуляции объема и электролитного состава жидкостей организма.

20. Макроэлементы. Биологическая роль магния, серы, кальция и фосфора. Распределение в организме. Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфора в организме (кальцитонин, паратгормон, кальцитриол): место синтеза, химическая природа, механизмы передачи гормонального сигнала в клетке и эффекты.

21. Обмен натрия, хлора и калия. Регуляция обмена. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) и ее регуляторы.

22. Микроэлементы. Биологическая роль железа, меди, кобальта, йода, цинка, марганца, фтора, селена. Обмен микроэлементов в организме. Обмен железа. Трансферрин и ферритин.
23. Оценка обеспеченности организма витаминами. Биохимические основы создания поливитаминных и витаминно-минеральных комплексов.
24. Фармацевтическая биохимия. Задачи и биохимические методы, используемые в анализе и контроле качества лекарственных препаратов.
25. Основы фармакокинетики. Пути поступления лекарственных веществ в организм и механизмы всасывания. Факторы, влияющие на всасывание.
26. Транспорт лекарственных веществ. Специфические и неспецифические транспортные системы крови. Распределение лекарственных веществ в тканях. Факторы, влияющие на процессы фармакокинетики.
27. Фазы биотрансформации веществ. Изменения активности и токсичности веществ в процессе метаболизма. Пролекарства. Факторы, влияющие на метаболизм лекарственных веществ: генетические, физиологические и внешней среды.
28. Реакции окисления, восстановления, гидролиза. Микросомальная система окисления, роль цитохрома P₄₅₀ (схема процесса окисления веществ в системе цитохрома P₄₅₀). Индукция цитохрома P₄₅₀. Метаболизм экзогенного этанола.
29. Фаза конъюгации в системе обезвреживания лекарственных препаратов. Виды конъюгации (глюкуронирование, ацетилирование, метилирование, сульфатирование), косубстраты и ферменты. Примеры реакций.
30. Выведение лекарственных веществ из организма (пути и механизмы). Роль Р – гликопротеина, металлотионеина.

Занятие 33. КОНТРОЛЬ ПРАКТИЧЕСКИХ НАВЫКОВ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА. ОБНАРУЖЕНИЕ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ, ПАРАЦЕТАМОЛА, ДИКЛОФЕНАКА И ТЕТРАЦИКЛИНА В МОЧЕ

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. Анализ желудочного сока является важным методом диагностики заболеваний желудочно-кишечного тракта, а анализ мочи – обязательная составляющая плана обследования любого пациента. В дальнейшем, в ходе изучения профильных дисциплин, будет осуществляться расширение и закрепление знаний по фармацевтической и клинической лабораторной диагностике.

Цель занятия

Проверить навыки студентов в проведении качественного и количественного анализа биологических жидкостей; умение ориентироваться в результатах анализа и давать им правильную оценку; понимание происхождения нормальных и патологических компонентов анализируемых биологических жидкостей и их диагностического значения.

Работы выполняются по индивидуальным заданиям с последующим оформлением протоколов.

Работа 1. *Определение кислотности желудочного сока*

В исследуемой пробе желудочного сока определяют содержание свободной и связанной соляной кислоты, а также общую кислотность, используя методики занятия № 18. Полученный результат выражают в ммоль/л.

Результат:

	Свободная НСІ	Связанная НСІ	Общая кислотность
Желудочный сок №	$A_1 =$	$A_2 =$ $A_2 - A_1 =$	$A_3 =$
	X (ммоль/л) =	X (ммоль/л) =	X (ммоль/л) =

Вывод:**Работа 2. Обнаружение ацетилсалициловой кислоты, парацетамола, диклофенака и тетрациклина в моче**

В исследуемой пробе мочи с помощью качественных реакций выявляют наличие вышеуказанных лекарственных веществ или их метаболитов. Для выполнения данной работы используйте инструкции к занятию № 31.

Вывод:

Подпись преподавателя:

**ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЭКЗАМЕНУ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Смотри QR-код

Некоторые биохимические константы

КРОВЬ		
Плотность крови (цельной)		1,05–1,06
рН		7,37–7,44
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		0,85–2,0 ммоль/л
Холестерол		3,1–5,2 ммоль/л
Общий белок сыворотки		65–85 г/л
Альбумин		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
Гемоглобин:	мужчины	130–160 г/л
	женщины	120–150 г/л
Билирубин плазмы (сыворотки):	общий	5,0–20,5 мкмоль/л
	прямой	до 5 мкмоль/л
	непрямой	до 15,5 мкмоль/л
Na ⁺ в плазме		135–145 ммоль/л
K ⁺ в плазме		3,5–5,0 ммоль/л
Ca ²⁺ в плазме (общий)		2,2–2,6 ммоль/л
ЖЕЛУДОЧНЫЙ СОК		
Кислотность желудочного сока	общая	40–60 ммоль/л
свободная HCl		20–40 ммоль/л
связанная HCl		10–20 ммоль/л
МОЧА		
Плотность		1,01–1,025
рН		5,0–7,0
Общий азот		6–17 г/сут
Мочевина		20–35 г/сут
Азот аммиака		0,5–1,0 г/сут
Белок		< 150 мг/сут

ОГЛАВЛЕНИЕ

Правила техники безопасности при работе в химической лаборатории.....	3
Занятие 1. Введение в биохимию. Строение аминокислот и пептидов. Количественное определение содержания белка в биологических жидкостях.....	4
Занятие 2. Структурная организация белков и основы их функционирования. Реакции осаждения белков.....	7
Занятие 3. Физико-химические свойства белков. Методы разделения, выделения и очистки белков. Гель-фильтрация.....	13
Занятие 4. Ферменты: классификация, строение, свойства. Кинетика ферментативных реакций. Влияние различных факторов на активность ферментов	18
Занятие 5. Регуляция работы ферментов. Количественное определение активности ферментов	23
Занятие 6. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам «Химия белков», «Ферменты»	28
Занятие 7. Введение в метаболизм. Центральные пути метаболизма (окислительное декарбоксилирование ПВК, лимоннокислый цикл). Изучение функционирования ЦТК.....	28
Занятие 8. Тканевое дыхание. Окислительное фосфорилирование. Фотосинтез (световая стадия). Изучение окислительного фосфорилирования. Обнаружение оксидоредуктаз.	33
Занятие 9. Переваривание углеводов. Обмен гликогена. Гликолиз и спиртовое брожение. Обнаружение продуктов спиртового брожения глюкозы.....	39
Занятие 10. Метаболизм пирувата. Глюконеогенез. Аэробный путь распада глюкозы до конечных продуктов (CO ₂ и H ₂ O). Метаболизм экзогенного этанола. Количественное определение ПВК в моче.....	43
Занятие 11. Пентозофосфатный и глюкуроновый пути обмена глюкозы. Фотосинтез (темновая стадия). Регуляция уровня глюкозы в крови. Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови	47
Занятие 12. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам: «Введение в метаболизм и биоэнергетику», «Обмен углеводов», «Фотосинтез».....	52
Занятие 13. Обмен липидов. Переваривание, всасывание и ресинтез. Транспорт экзогенных липидов. Определение активности липаз	54
Занятие 14. Депонирование и мобилизация липидов. Обмен холестерина. Транспорт липидов кровью. Определение β-липопротеинов в сыворотке крови	58
Занятие 15. Внутриклеточный обмен жирных кислот. Кетоновые тела. Количественное определение холестерина в сыворотке крови.....	62
Занятие 16. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по теме «Обмен липидов»	66
Занятие 17. Контроль практических навыков биохимического анализа. Количественное определение общего белка и глюкозы в сыворотке крови.....	68
Занятие 18. Азотистый баланс. Переваривание белков. Пути использования аминокислот в клетке. Анализ желудочного сока	69
Занятие 19. Внутриклеточный обмен аминокислот. Обезвреживание аммиака. Количественное определение остаточного азота крови и мочевины в моче	74
Занятие 20. Обмен нуклеопротеинов. Определение содержания мочевой кислоты и общего азота в моче	79
Занятие 21. Матричные биосинтезы (синтез ДНК, РНК, белков). Современные методы молекулярной биологии. Анализ продуктов гидролиза нуклеопротеинов	84
Занятие 22. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам: «Обмен простых белков и нуклеопротеинов», «Биосинтез ДНК, РНК и белка», «Методы молекулярной биологии».....	89
Занятие 23. Общая характеристика и особенности биологического действия гормонов. Качественные реакции на гормоны.....	90

Занятие 24. Гормональная регуляция метаболизма. Тест на толерантность к глюкозе	95
Занятие 25. Биохимия печени. Исследование коллоидной устойчивости белков и определение содержания общего билирубина в сыворотке крови	100
Занятие 26. Интеграция метаболизма. Изучение влияния гормонов на содержание глюкозы в крови	105
Занятие 27. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам: «Гормоны», «Биохимия печени», «Интеграция метаболизма»	108
Занятие 28. Биохимия крови. Белки крови. Дыхательная функция крови. Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза на ацетилцеллюлозе	110
Занятие 29. Система гемостаза. Количественное определение кальция и хлоридов в плазме крови	117
Занятие 30. Биохимия питания. Биологическая роль белков, жиров, углеводов, витаминов. Качественные реакции на витамины и определение содержания витамина С в плодах шиповника и в моче	122
Занятие 31. Фармацевтическая биохимия. Биотрансформация веществ и их выведение из организма. Определение салициловой кислоты, парацетамола, диклофенака и терациклина в моче	129
Занятие 32. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам: «Биохимия крови», «Биохимия питания», «Водно-минеральный обмен», «Фармацевтическая биохимия»	133
Занятие 33. Контроль практических навыков биохимического анализа. Анализ желудочного сока. Обнаружение ацетилсалициловой кислоты, парацетомола, диклофенака и тетрациклина в моче	135
Вопросы для подготовки к экзамену по биологической химии	136
Приложение 1. Некоторые биохимические константы	137

Учебное издание

Таганович Анатолий Дмитриевич
Девина Елена Анатольевна
Колб Александр Владимирович и др.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Практикум для студентов фармацевтического факультета

5-е издание, исправленное

Ответственный за выпуск А. Д. Таганович
Компьютерная вёрстка А. В. Янушкевич

Подписано в печать 12.12.25. Формат 60×84/8. Бумага «Снегурочка».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 16,27. Уч.-изд. л. 10,48. Тираж 113 экз. Заказ 11.
Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 24.11.2023.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.