

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

ПРАКТИКУМ ДЛЯ СТУДЕНТОВ
МЕДИКО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО
ФАКУЛЬТЕТА



Минск БГМУ 2015

УДК 577(076.5) (075.8)
ББК 24 я73
Б63

Рекомендовано Научно-методическим советом университета в качестве
практикума 18.03.2015 г., протокол № 7

А в т о р ы: д-р мед. наук, проф. А. Д. Таганович; д-р мед. наук, проф. В. К. Кухта; д-р мед. наук, проф. Т. С. Морозкина; канд. мед. наук, доц. Э. И. Олецкий; канд. биол. наук, доц. А. В. Колб; канд. мед. наук, доц. Т. В. Василькова; канд. мед. наук, доц. Ж. А. Рутковская; канд. мед. наук, доц. И. Л. Котович; канд. мед. наук, доц. Е. А. Девина; канд. хим. наук, доц. Н. Н. Ковганко; канд. мед. наук, ст. преп. Л. П. Лисицына; канд. биол. наук, ассист. Н. И. Гронская; ассист. З. И. Полякова;

Р е ц е н з е н т ы: канд. мед. наук, доц. В. Э. Бутвиловский; канд. мед. наук, доц. О. Н. Ринейская

Биологическая химия : практикум для студентов медико-профилактического факультета /
Б63 А. Д. Таганович [и др.]. – Минск : БГМУ, 2015. – 168 с.

ISBN 978-985-567-188-7.

Издание составлено в соответствии с новой типовой программой для специальности «Медико-профилактическое дело». Изложены рекомендации по всем темам лабораторно-практических занятий по биологической химии. По каждой теме даны: цель занятия, актуальность темы, литература для подготовки, вопросы для обсуждения, тестовые задания, описание лабораторных работ, протоколы их выполнения. Приведены вопросы к итоговым занятиям и экзамену.

Предназначен для студентов 2-го курса медико-профилактического факультета.

УДК 577(076.5) (075.8)
ББК 24 я73

ISBN 978-985-567-188-7

© УО «Белорусский государственный
медицинский университет», 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Тема: Введение в практикум. введение в биохимию. строение аминокислот и пептидов. количественное определение содержания белка в биологических жидкостях	5
2. Тема: Строение и функции белков. Пространственная структура белков. Физико-химические свойства белков. Механизмы осаждения белков.....	9
3. Тема: Методы разделения, выделения и очистки белков. Гель-фильтрация. Сложные белки.....	16
4. Тема: Ферменты. классификация, строение, свойства. влияние различных факторов на скорость ферментативных реакций. специфичность ферментов	21
5. Тема: Регуляция действия ферментов. Количественное определение активности ферментов	27
6. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Химия белков, ферменты»	32
7. Тема: Введение в метаболизм. Центральные метаболические пути (окислительное декарбоксилирование ПВК, лимоннокислый цикл Кребса). Изучение функционирования ЦТК	34
8. Тема: Биологическое окисление. Окислительное фосфорилирование.....	40
9. Тема: Переваривание углеводов. Гликогенез и гликогенолиз. Гликолиз и спиртовое брожение. Определение ПВК в моче	46
10. Тема: Пути метаболизма пирувата. Глюконеогенез. Аэробный распад глюкозы до конечных продуктов (CO ₂ и H ₂ O). Количественное определение глюкозы в крови	51
11. Тема: Вторичные пути обмена глюкозы. Метаболизм этанола. Влияние гормонов на уровень глюкозы в крови	55
12. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Введение в метаболизм, центральные метаболические пути, биологическое окисление, окислительное фосфорилирование, обмен углеводов».....	60
13. Тема: Обмен липидов. Переваривание, всасывание и ресинтез. Транспорт экзогенных липидов. кинетика действия панкреатической липазы	62
14. Тема: Транспорт липидов кровью. Обмен холестерина. Депонирование и мобилизация липидов. Количественное определение β-липопротеинов в сыворотке крови.	68
15. Тема: Внутриклеточный обмен жирных кислот. Кетоновые тела. Количественное определение холестерина в сыворотке крови.....	72
16. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по теме «Обмен липидов»	78
17. Тема: Переваривание и всасывание белков. Анализ желудочного сока	79
18. Тема: Внутриклеточный обмен аминокислот. Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови	84
19. Тема: Обезвреживание аммиака. Количественное определение остаточного азота крови и мочевины в моче. Нарушения аминокислотного обмена	88
20. Тема: Химия и обмен нуклеопротеинов. Определение Содержания мочевой кислоты и общего азота в моче.....	93
21. Тема: Матричные биосинтезы (синтез ДНК, РНК, белков). современные методы молекулярной биологии	99

22. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Обмен простых белков и нуклеопротеинов. Биосинтез ДНК, РНК и белка. Методы молекулярной биологии»	105
23. Тема: Гормоны. Общая характеристика и особенности биологического действия гормонов. Качественные реакции на гормоны	107
24. Тема: Биохимия гормонов. Тест на толерантность к глюкозе.....	113
25. Тема: Физико-химические свойства крови. Определение щелочного запаса крови и хлоридов	119
26. Тема: Белки плазмы крови. Система свертывания крови. Электрофорез белков плазмы крови. Определение содержания кальция в плазме крови.....	126
27. Тема: Биохимия печени. Пробы коллоидоустойчивости. Количественное определение билирубина в сыворотке крови.....	133
28. Тема: Биохимия мочи. Физиологические и патологические компоненты мочи.	141
29. Тема: Биохимия питания. Роль белков, липидов, углеводов и витаминов.	149
30. Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Гормоны, биохимия печени, биохимия крови, биохимия питания»	157
31. Тема: Контроль практических навыков биохимического анализа: анализ желудочного сока и мочи	159
Перечень экзаменационных вопросов по биологической химии	160

1. ТЕМА: ВВЕДЕНИЕ В ПРАКТИКУМ. ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ. СТРОЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Актуальность темы

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– *общей химии:*

- правила работы в химических лабораториях;

– *биоорганической химии:*

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

– *медицинской и биологической физики:*

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

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Какая из перечисленных аминокислот является нейтральной?

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

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

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

Задание 3. Назовите аминокислоту, содержащую кольцо индола:

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

Задание 4. Выберите α -аминокислоту:

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

Задание 5. Олигопептид — это соединение, которое содержит:

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

Задание 6. Белок — это соединение, которое содержит:

А. 15 остатков аминокислот. Б. 28 остатков аминокислот.
В. 49 остатков аминокислот. Г. 120 остатков аминокислот.

Задание 7. Какие функции присущи только белкам?

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Предмет, цели и задачи биохимии. Объекты и методы исследований в биохимии.
2. Аминокислоты, классификация. Общие свойства. Формулы протеиногенных аминокислот, номенклатура.
3. Пептиды, строение. Классификация и биологическая роль пептидов.
4. Белки как класс органических веществ, биологические функции. Классификация белков.
5. Методы количественного определения белка (рефрактометрический, нефелометрический, колориметрический, спектрофотометрический). Принципы определения, сравнительная характеристика методов, их применение в клинике.
6. Общие принципы спектрофотометрии. Молярный коэффициент экстинкции. Построение калибровочного графика и работа с ним.
7. Количественное определение белка биуретовым методом.

Литература

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 3–4, 7–18, 21, 31–32, 39–40.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. Шк., 2013. С. 5–19, 29–31.
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Молекула аминокислоты, находящаяся в изоэлектрической точке:

- А. Имеет положительный заряд. Б. Не имеет заряда.
В. Имеет отрицательный заряд.

Задание 2. В изоэлектрической точке белок:

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

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

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

Задание 4. Выберите правильные утверждения:

- А. Биуретовую реакцию дают все аминокислоты.
Б. Биуретовую реакцию дает биурет.
В. Биуретовую реакцию дают трипептиды.
Г. Биуретовую реакцию дают белки.

Задание 5. Рефрактометрический метод основан на:

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

Задание 3. Подобрать к каждому белку соответствующую функцию:

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

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

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

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

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

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

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

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Определение общего белка биуретовым методом

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

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

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

экстинкцию исследуемого раствора, находят по калибровочному графику, какой концентрации белка (в г/л) она соответствует.

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



Ответ:

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 гипопро-теинемия (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 по-носах, неукротимой рвоте, усиленном потоотделении, холере, ожогах. Абсолютная гипопро-теинемия наблюдается при нефритах, злокачественных опухолях, алиментарной дистрофии. Абсолютная гиперпротеинемия встречается сравнительно редко, например, при миеломной болезни, хронических полиартритах.

Вывод:

Подпись преподавателя:

2. Тема: СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ. МЕХАНИЗМЫ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

Актуальность темы

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

Цель занятия

Изучить уровни структурной организации белковой молекулы. Сформировать представление о конформационных состояниях белковой молекулы и значении пространственной структуры в функционировании белков. Ознакомиться с физико-химическими свойствами белков. Познакомиться с возможностями применения денатурации белков в медицинской практике.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– *биоорганической химии:*

- строение аминокислот; свойства пептидной связи;
- денатурация и денатурирующие факторы.

– *физико-коллоидной химии:*

- учение о растворах;
- свойства белковых растворов как коллоидных систем;
- растворимость белка;

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Объясните, почему пептидная группа является плоской и жесткой структурой?

Задание 2. Укажите свойства, характерные для грубодисперсных систем:

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

Задание 3. Укажите свойства, отличающие суспензии от истинных растворов:

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

Задание 4. Укажите свойства, характеризующие коллоидные растворы:

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

Задание 5. Методы очистки коллоидных растворов основаны на следующих свойствах (выберите правильные варианты):

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Первичная структура белка. Пептидная связь, свойства (постулаты Полинга-Кори).
2. Этапы и методы исследования аминокислотного состава и аминокислотной последовательности белков и пептидов (методы Сэнджера, Эдмана, Акабори, ферментативные).
3. Сравнительный анализ гомологичных белков (метод Ингрема).
4. Вторичная, надвторичная, третичная, четвертичная структуры белковой молекулы (понятие, разновидности и связи, стабилизирующие структуру).
5. Конформационные изменения при функционировании белков. Взаимодействие белков с лигандами.
6. Денатурация. Обратимость денатурации. Механизмы действия денатурирующих факторов.
7. Общие физико-химические свойства белков (вязкость растворов, незначительная диффузия, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, поглощение УФ-лучей, растворимость в воде).
8. Факторы устойчивости белковых растворов (заряд белка, гидратная оболочка, молекулярная масса, форма молекулы). Изоэлектрическое состояние.
9. Зависимость растворимости белка от реакции среды (изоэлектрическая точка), ионной силы, температуры раствора. Осаждение белков (обратимое осаждение – высаливание, необратимое осаждение).

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином, Минск: Асар, 2008. С 18–21, 24–25, 28–39.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 16 – 20, 25 – 29, 31 – 34.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. 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.

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

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

Задание 2. 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. | В. Для определения N-концевой аминокислоты |
| 4. Реакция с гидразином. | Г. Для определения C-концевой аминокислоты |
| 5. Реакция с фенилизотиоцианатом (ФИТЦ). | |
| 6. Ионообменная хроматография. | |
| 7. Масс-спектрометрия. | |

Задание 3. Знать 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. |

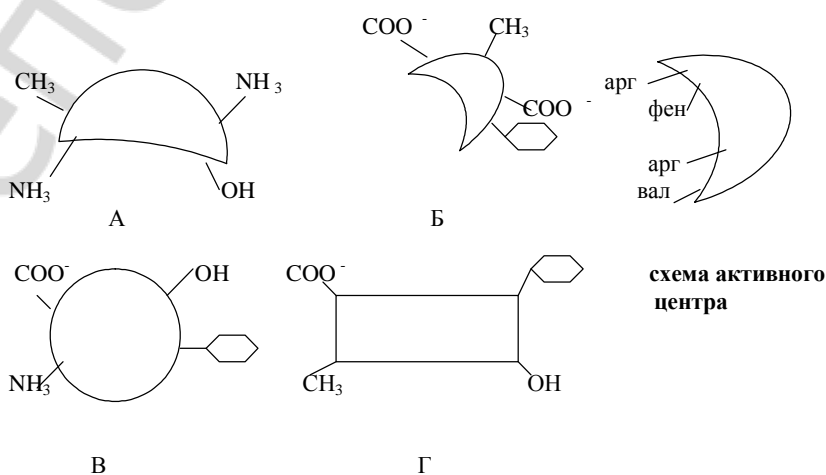
3.2. Какому уровню структурной организации белка соответствует каждый пронумерованный тип связи? Подберите пары:

- | | |
|--|----------------------------|
| 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»?

Задание 5. Вспомните основные реагенты и условия, вызывающие денатурацию. Ответьте на вопросы:

5.1. Денатурация белка сопровождается:

А. Изменением конформации белка.

Б. Уменьшением растворимости белка.

В. Изменением заряда белка.

Г. Нарушением первичной структуры белка.

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

А. Повышения температуры.

Б. Изменения рН.

В. Действия протеолитических ферментов.

Г. Разрыва слабых связей, поддерживающих конформацию белка.

Д. Синтеза белков теплового шока.

Задание 6. Знать строение и функции гемоглобина и миоглобина. Уметь дать сравнительную характеристику структуры и свойств этих белков. Ответьте на вопрос:

В ходе оксигенации гемоглобина происходит следующее:

А. Изменение конформации первого протомера, затем второго и т. д.

Б. Одновременное изменение конформаций всех протомеров.

В. Изменение связей между протомерами.

Г. Изменение валентности железа в гемах протомеров.

Задание 7. Вспомните, что белки являются амфолитами. Степень ионизации катионных и анионных групп, а следовательно, и заряд молекулы белка, зависит от значения рН среды.

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

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

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

Задание 8. Знать факторы, влияющие на растворимость белков. Ответьте на тестовый вопрос. Растворимость белков в водной среде определяется:

А. Ионизацией белковой молекулы.

Б. Гидратацией белковых молекул при растворении.

В. Формой молекулы белка.

Г. Способностью связывать природные лиганды.

Правильность Ваших ответов сопоставьте с эталонами.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1.

А. Дитиотреитол — восстанавливающий агент. Что произойдет с дисульфидными мостиками (см. рисунок) после их обработки дитиотреитолом?

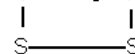
Б. Сколько индивидуальных пептидов образуется после такой обработки изображенного фрагмента белка?

Задание 2. Пептид ферментативного гидролизата, не передвигающийся в электрическом поле при электрофорезе, дансильировали и выделили дансилпроизводное Лей. Кислотный

Гис-цис - ала - гли - фен



Цис- три-мет-цис-глу-цис- гли



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 3. Трипсин гидролизует пептидные связи, образованные COOH группами диаминомонокарбоновых 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.

Задание 4. 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 5. 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 6. Лигандом α -протомера гемоглобина может быть:

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

Задание 7. Подберите верные пары утверждений:

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

Задание 8. В ядерных белках-гистонах содержится большое количество аминокислотных остатков аргинина и лизина, а в белке крови альбумине — много остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. Ответьте на вопросы:

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

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1. 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, на-

ходятся в одной плоскости. Сопряжение выравнивает длины связей. Плоская сопряженная структура затрудняет вращение вокруг связи C-N.

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

Для самостоятельной работы:

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

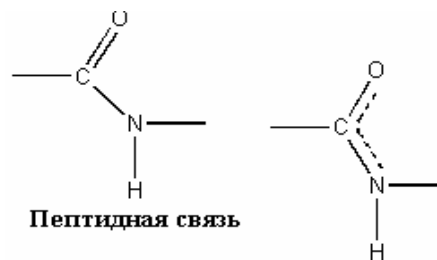
Б. Поперечные связи по остаткам цистеина — остатки # 13, 24 могут формировать дисульфидный мостик;

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

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);

4.1 — (А – лиганд Б; Б – ионные, гидрофобные); 5.1 — А, Б; 5.2 — А, Б, Г; 6 — А; 7.1 — «0»;

а) «++», б) «- -»; 7.2 — при рН=ИЭТ; 8 — А, Б, В.



Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

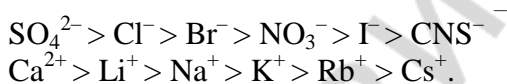
Работа 1. Высаливание белков

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

При высаливании происходят дегидратация молекул белка и устранение заряда. На процесс высаливания влияет ряд факторов: гидрофильность белка, его относительная молекулярная масса, заряд, в связи с чем для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей. Альбумины осаждаются в насыщенном р-ре (NH₄)₂SO₄, а глобулины — в полунасыщенном р-ре (NH₄)₂SO₄, так как у глобулинов большая молекулярная масса и меньший заряд, чем у альбуминов.

Высаливание белков — обратимая реакция, так как осадок белка может вновь раствориться после уменьшения концентрации солей путем диализа или разведения водой.

В соответствии с положением ионов в ряду Гофмейстера, хлорид натрия осаждает белки слабее, чем сульфат аммония, вследствие его меньшей дегидратирующей способности:



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.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

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

Ход работы

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

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

Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

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

Ход работы

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

Вывод:

Подпись преподавателя:

3. Тема: МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ, ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ. СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Актуальность темы

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– *общей химии*:

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

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Укажите электрокинетические явления в коллоидных растворах:

- А. Электрофорез.
- Б. Электроосмос.
- В. Потенциал протекания.
- Г. Потенциал седиментации.

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

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

Задание 3. Скорость электрофореза растворов белков зависит от:

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

Задание 4. Все хроматографические методы основаны на:

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

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

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

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

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

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 21–28, 40–44.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 29–31.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

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

1.1. Определите суммарный заряд пептида при pH = 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 pH=7,0 (к катоду или к аноду):

- а) Сер-Цис-Глу-Тир-Асп;
- б) Вал-Арг-Мет-Фен-Тир.

Задание 2. Знать физико-химические свойства, лежащие в основе методов разделения и очистки белков. Уметь объяснить принцип каждого метода.

Ответьте на вопросы:

2.1. Хроматографию применяют для:

- А. Разделения веществ.
- Б. Очистки веществ.
- В. Идентификации 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. Адсорбционная хроматография. Б. Электрофорез в полиакриламидном геле.
В. Ультрацентрифугирование. Г. Гель-фильтрация.
Д. Ионообменная хроматография.

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.
Г. Различия по другим свойствам. 4. Ионообменная хроматография.

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. Объясните, с какой целью используется метод «отпечатки пальцев» (выберите верный ответ):

- А. Выделения индивидуальных белков.
Б. Анализа гомологичных белков.
В. Очистки белков от низкомолекулярных примесей.

Задание 5. Вспомните, что белки кроме аминокислот могут содержать в своем составе другие соединения (углеводы, липиды, ионы металлов и т. д.). Небелковая часть является простетической группой. Такие белки называют сложными. Выучите классификацию сложных белков.

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. В какой последовательности выйдут из колонки, заполненной сефадексом G-200, следующие белки: пепсин (M = 36000), миоглобин (M = 17000), каталаза (M = 250000) при вымывании их растворителем:

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

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

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

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

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

- gp160 — предшественник белка вирусной оболочки;
gp120 — белок вирусной оболочки;
p24 — белок вирусного ядра;
p31 — обратная транскриптаза.

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

Вопрос 1. Что выявляет этот тест?

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

Вопрос 2. Вторичные антитела связывают:

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

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

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

	1	2	А	В	С	Интерпретация полос 1 — вирус + сыворотка (положительный контроль) 2 — вирус – сыворотка (отрицательный контроль) А — пациент А В — пациент В С — пациент С
gp160	—			—		
gp120	—			—	—	
p55	—			—		
gp41	—			—		
p31	—			—		
p24	—			—	—	

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа (70 минут)

Инструкция к практическому занятию

Колоночная гель-фильтрация

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

Ход работы

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

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

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

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

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

5. Результаты опыта оформите в рабочей тетради в виде таблицы.

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

Вывод:

Подпись преподавателя:

4. Тема: **ФЕРМЕНТЫ. КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ**

Актуальность темы

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

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

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– общей химии:

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

– биоорганической химии:

- классификация органических реакций по направлению и результатам реакции;
- свойства и строение белков;
- строение коферментов, биологическая роль;
- качественные реакции на крахмал и глюкозу, используемые для оценки степени гидролиза крахмала.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Катализаторы увеличивают скорость реакции, так как:

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

Задание 2. Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

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

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.

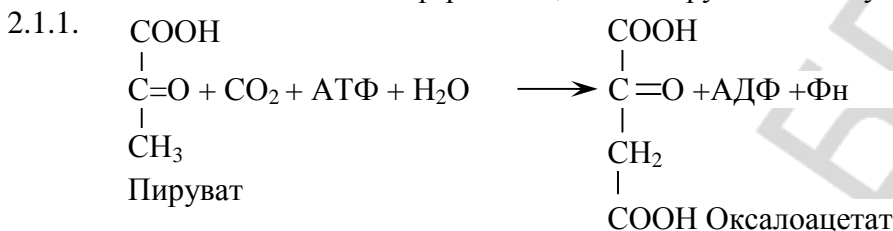
Решите задачу. Оптимальные условия для действия глутаматдегидрогеназы: $t = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$. При повышении температуры инкубационной пробы до 75°C и pH инкубационной среды до 8,0 скорость ферментативной реакции снизилась на 50%. Объясните причину снижения скорости реакции.

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

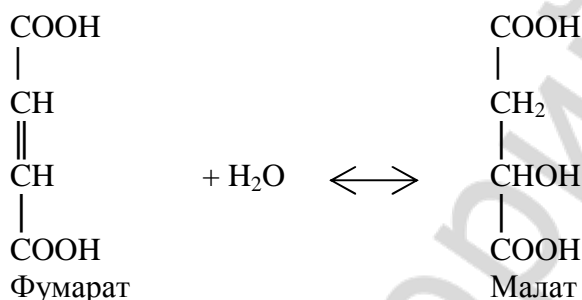
– сравнить структуру субстратов и продуктов;

– определить тип превращения.

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



2.1.2.



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

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

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

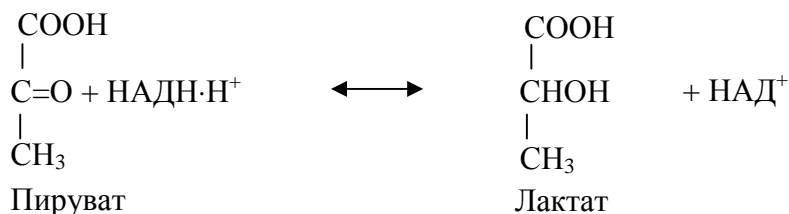
Задание 1. В лаборатории выделили фермент лизоцим и определили его активность при различных значениях pH среды. Установили, что ферментативная активность лизоцима максимальна при $\text{pH} 5,2$ и уменьшается как при снижении, так и при повышении этого значения pH . Укажите возможную причину:

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

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

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

Задание 3. Температура 37 °С, 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?

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

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

Для самостоятельной работы:

1.2 — (1 — Г; 2 — В; 3 — А; 4 — Б).

1.4. При повышении температуры до 75°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.

5 — Б.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. Изучение влияния различных факторов на скорость ферментативных реакций

1. Определение активности амилазы слюны и ее термолабильности

Одним из характерных свойств ферментов является термолабильность, т. е. чувствительность фермента к температуре, при которой протекает ферментативная реакция. Для большинства ферментов температурный оптимум наблюдается при 38–40 °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. В чистую пробирку отливают небольшое количество неразведенной слюны (2–3 мл) и кипятят ее в течение 5 мин, после чего охлаждают. В 3 пробирки наливают по 10 капель 1% раствора крахмала. В 1-ю пробирку добавляют 10 капель нативной слюны, разведенной в 10 раз, во 2-ю — 10 капель прокипяченной слюны, в 3-ю — 10 капель воды в качестве контроля. Все пробирки помещают в термостат при температуре 38 °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 едкого натра и 3 капли 1% раствора сульфата меди. Осторожно кипятят 1 мин до появления красного окрашивания, которое указывает на наличие глюкозы.

Результаты опыта запишите в виде таблицы:

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

Вывод:

2. Влияние pH среды на активность ферментов

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

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

Результаты опыта запишите в виде таблицы:

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

Вывод:

3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны

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

Результаты опыта запишите в виде таблицы:

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

Вывод:

Работа 2. Специфичность ферментов

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

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

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

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

Результаты опыта запишите в виде таблицы:

№ пробирки	Фермент	Субстрат	Реакция Фелинга
1			
2			

Вывод:

Подпись преподавателя:

5. Тема: РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Актуальность темы

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

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

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

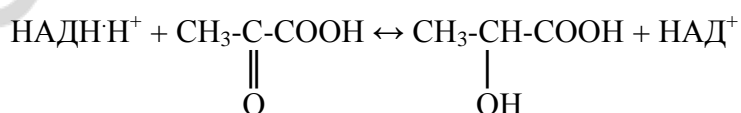
Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

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

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

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

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



К какому типу относится приведенная реакция?

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

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

Вопросы для обсуждения

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

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 58–60, 68–86.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 55–62, 68–75.
3. *Конспект лекций*

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

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

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

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

- А. Ионные. Б. Водородные. В. Пептидные. Г. N-гликозидные. Д. Сложноэфирные.

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

- А. Изменяется только конформация активного центра фермента.
- Б. В молекуле фермента изменяется конформация аллостерического центра под действием субстрата.
- В. При образовании фермент-субстратного комплекса в ферменте и субстрате одинаково изменяется напряжение химических связей.
- Г. Активный центр подходит к субстрату, как ключ к замку.

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

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

- А. Необратимое.
- Б. Обратимое конкурентное.
- В. Обратимое неконкурентное.
- Г. Ингибирование по принципу «обратной связи».

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

- А. Являются ферментами.
- Б. Участвуют в окислительно-восстановительных процессах.
- В. Являются аллостерическими ингибиторами.
- Г. Конкурируют с п-аминобензойной кислотой за место связывания с активным центром фермента, синтезирующего фолиевую кислоту.
- Д. Ингибируют всасывание фолиевой кислоты.

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

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

- А. Изменение степени ионизации молекул ферментов.
- Б. Необратимая денатурация.
- В. Разрыв пептидных связей.
- Г. Изменение концентрации ферментов.
- Д. Репрессия синтеза ферментов.

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

- А. 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 этот фермент (см. 3.2)?

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Больной С. после приема внутрь 20 мл метанола в тяжелом состоянии доставлен в клинику, где ему ввели внутривенно этиловый спирт в количестве, которое у здорового человека вызывает интоксикацию. Объясните, почему такое лечение оказывается эффективным,

учитывая, что высокая токсичность метанола обусловлена действием продукта его метаболизма — формальдегида, образующегося в печени под действием алкогольдегидрогеназы:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Эталонные ответы к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний: 1 — нет. 2 — А. 3 — Г.

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. Количественное определение активности α -амилазы слюны

Метод основан на определении наименьшего количества амилазы (при максимальном разведении слюны), полностью расщепляющего весь добавленный крахмал. Амилазная активность слюны выражается количеством 0,1% раствора крахмала в миллилитрах, которое расщепляется 1 мл неразведенной слюны при 38°C в течение 30 мин. В норме амилазная активность слюны равна 160–320. Амилазная активность обозначается «А 38⁰/30'». Этот метод широко используется для определения амилазной активности крови и мочи.

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

Гидролиз крахмала в присутствии ферментов слюны при различном ее разведении

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

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

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

Следовательно, амилазная активность А 38⁰/30' равна 320.

Ответ:

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 1-е сутки заболевания амилазная активность увеличивается в моче и сыворотке крови в десятки раз, а затем постепенно возвращается к норме. При почечной недостаточности амилаза в моче отсутствует.

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

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

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

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

Ответ:

Вывод:

Подпись преподавателя:

6. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ: «ХИМИЯ БЕЛКОВ, ФЕРМЕНТЫ»

1. Классификация и физико-химические свойства аминокислот (общие и специфические). Роль в структурной организации белка. Применение аминокислот как лекарственных препаратов.

2. Первичная и вторичная структура белковой молекулы. Связи, стабилизирующие их. Особенности строения пептидной связи и их роль в формировании пространственной структуры белка (постулаты Полинга-Кори). Виды вторичной структуры.

3. Понятие о надвторичной структуре белка. Структурные и функциональные домены. Причины формирования третичной структуры белковой молекулы.

4. Третичная структура белка. Силы, стабилизирующие третичную структуру. Конформационные изменения при функционировании белков. Денатурация белка и факторы, ее вызывающие. Использование явления денатурации в медицинской практике.

5. Четвертичная структура белков. Преимущества существования белков с четвертичной структурой. Кооперативные изменения конформации полипептидных цепей при функционировании белков с четвертичной структурой на примере гемоглобина. Сравнительные особенности транспорта кислорода гемоглобином и миоглобином.

6. Основы функционирования белков.

7. Растворимость белков.

– Почему белки растворяются в воде? Факторы устойчивости белков в растворе.

– Высаливание и осаждение белков. Механизм и практическое использование.

– Денатурация белка, денатурирующие факторы, использование в медицине.

8. Гидролиз белка. Типы гидролиза, роль в организме. Методы определения полноты гидролиза. Практическое использование.

9. Методы выделения и очистки белков.

– Этапы исследования структуры белка.

– Методы очистки белка от низкомолекулярных примесей.

– Принципы разделения и очистки белков методами хроматографии:

а) адсорбционной; б) распределительной;

в) ионообменной; г) аффинной;

д) гель-хроматографией.

– Ультрацентрифугирование. Принцип метода.

– Электрофорез. Принцип метода, практическое применение. Электрофорез в полиакриламидном геле. Изоэлектрофокусирование.

– Метод «отпечатков пальцев» (метод Ингрэма). Принцип метода, практическое применение.

– Использование вестерн-блот анализа для идентификации белков. Основные этапы, практическое применение. Понятие «молекулярный зонд».

10. Методы исследования аминокислотного состава (ионообменная хроматография) и аминокислотной последовательности белков и пептидов (Сэнджер, Эдман, Акабори, секвенатор Эдмана - Бэга).

11. Сложные белки. Строение, классификация, биологическая роль каждого класса.

12. Какие функции выполняют в организме белки и пептиды?

13. Ферменты, классификация. Уметь назвать класс фермента и порядковый номер класса на основании приведенной реакции.

14. Свойства ферментов. Термоллабильность, специфичность, влияние рН и концентрации субстрата на активность фермента. Понятие о кинетике ферментативных реакций. Константа Михаэлиса и принципы ее определения.

15. Активность фермента, единицы измерения активности.

16. Активный центр и его строение.

17. Коферменты, классификация и роль.

18. Механизмы регуляции активности ферментов, обратимая и необратимая регуляция, изостерическая и аллостерическая регуляция, ковалентная модификация структуры фермента.

19. Механизмы регуляции количества фермента в клетке (схема Львова-Жакоба-Моно).

20. Множественные формы ферментов (изоферменты и собственно множественные формы), примеры, биологическая роль.

21. Примеры использования ферментов и их регуляторов в медицинской практике.

7. ТЕМА: ВВЕДЕНИЕ В МЕТАБОЛИЗМ. ЦЕНТРАЛЬНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ (ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ПВК, ЛИМОННОКИСЛЫЙ ЦИКЛ КРЕБСА). 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. Усвоив значение центральных метаболических путей для энергообеспечения клеток, можно понять причины гипоксических состояний и их связь с клеточной энергетикой. Поскольку нарушения энергетического обмена лежат в основе патогенеза многих заболеваний, знание механизма функционирования цикла Кребса позволит врачу провести правильную коррекцию метаболических нарушений (кокарбоксилаза, компоненты адениловой системы, сукцинат и др.).

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

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

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

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

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

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

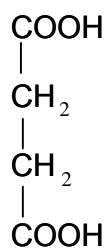
А. Дикарбоновые кислоты.

Б. Трикарбоновые кислоты.

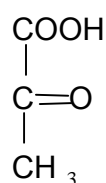
В. Монокарбоновые кислоты.

Г. α -Кетокислоты.

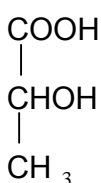
Д. Гидроксикислоты.



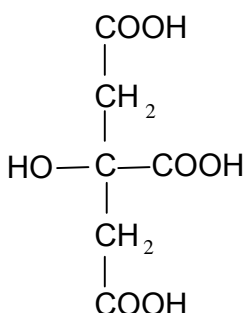
2.1



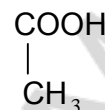
2.2



2.3

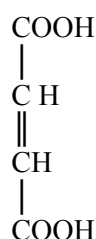
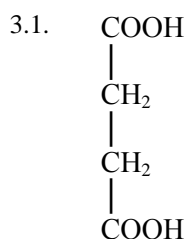


2.4

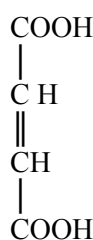
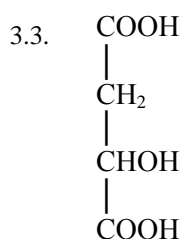
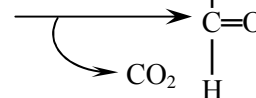
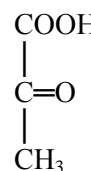


2.5

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



3.2.



Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Метаболизм, линейные и циклические метаболические пути, регуляторные (ключевые) ферменты.
2. Катаболизм и анаболизм, различия и взаимосвязь между ними.
3. Реакции дегидрирования как основной способ окисления веществ в организме. Пиридинзависимые и флаavinзависимые дегидрогеназы. Роль витаминов РР и В₂ в окислительно-восстановительных реакциях. Схематическое строение коферментов НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН.
4. Адениловая система клетки, ее участие в энергетическом обмене. Центральная роль АТФ в процессах, связанных с затратой энергии. Способы синтеза АТФ: субстратное, окислительное и фотосинтетическое фосфорилирование. Понятие о макроэргах.
5. Окислительное декарбоксилирование ПВК. Пируватдегидрогеназный комплекс (ферменты, коферменты, схема).
6. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) как центральный метаболический путь. Локализация ферментов ЦТК, схема процесса, ферменты, коферменты.

7. Дегидрогеназные реакции ЦТК как источник водорода для системы тканевого дыхания. Декарбоксилирование в цикле Кребса как механизм образования в клетках CO_2 — конечного продукта катаболизма соединений углерода.

8. Функции ЦТК: интегративная, катаболическая, анаболическая, энергетическая, водороднодонорная. Регуляция. Анаэробные реакции.

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 133–139, 177–182.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк. 2013. С. 90–102.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

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

1. ЦТК представляет собой конечный общий путь для окисления продуктов распада белков, жиров и углеводов.

2. ЦТК служит источником строительных блоков для процессов биосинтеза (гем, аминокислоты, глюкоза и т. д.).

3. Большинство топливных молекул вступают в цикл в виде ацетил-КоА.

4. В ходе реакций цикла дважды происходит декарбоксилирование с образованием конечного продукта — CO_2 .

5. В результате четырех дегидрогеназных реакций восстанавливаются три молекулы НАД^+ и одна молекула ФАД. Эти восстановленные переносчики окисляются затем в цепи переноса электронов внутренней мембраны митохондрий.

6. ЦТК функционирует только в аэробных условиях, поскольку регенерация восстановленных коферментов происходит только при переносе электронов на O_2 .

7. Перенос электронов на кислород сопряжен с одновременным образованием АТФ (окислительное фосфорилирование). Скорость цикла зависит, в первую очередь, от энергетического заряда клетки.

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

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

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

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

Задание 3. Подберите ферменты к соответствующим реакциям:

1. Оксалоацетат + ацетил-КоА + $H_2O \rightarrow$ цитрат + КоА-SH.
2. Изоцитрат + $НАД^+ \rightarrow \alpha$ - кетоглутарат + $НАДНН^+ + CO_2$.
3. Сукцинил-КоА + ГДФ + $H_3PO_4 \leftrightarrow$ сукцинат + ГТФ + КоА-SH.
4. Фумарат + $H_2O \leftrightarrow$ малат.

А. Фумаратгидратаза.

Б. Цитратсинтаза.

В. Сукцинил-КоА-синтетаза.

Г. Исоцитратдегидрогеназа.

Задание 4. К каждому ферменту подберите соответствующий кофермент:

1. Сукцинатдегидрогеназа.
2. $НАДНН^+$ -дегидрогеназа.
3. Малатдегидрогеназа.
4. α -Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс ферментов.

А. ФМН.

Б. ФАД.

В. $НАД^+$.

Г. ТПФ.

Д. КоА-SH.

Е. Липоевая кислота.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

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

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

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

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

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

А. $НАДФНН^+$. Б. $НАД^+$. В. $НАДНН^+$.

Г. АТФ. Д. АДФ.

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

Задание 4. В клинику доставили пострадавших во время землетрясения, находившихся без пищи 10 дней. Исследования активности ферментов ЦТК (цитрат синтазы и альфа-кетоглутарат дегидрогеназы) в лейкоцитарной фракции крови показали резкое снижение скорости этого процесса. Какие последствия это имеет для организма?

А. Обезвоживание.

Б. Снижение уровня АТФ.

В. Снижение уровня глюкозы в крови.

Г. Образование большого количества эндогенной воды.

Задание 5. В образовании ацетил-КоА из пирувата участвует мультиферментный комплекс. Выберите коферменты, необходимые для работы этого комплекса:
 А. ФМН, HS-КоА, ТПФ, НАД⁺. Б. ФМН, HS-КоА, ТПФ, НАД⁺, ЛК.
 В. ФМН, HS-КоА, ТПФ, НАДФ⁺. Г. ФАД, HS-КоА, ТПФ, НАД⁺, ЛК.
 Д. ФАД, HS-КоА, ТПФ, НАД⁺.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – Б, Д. 2.1 – А. 2.2 – Г. 2.3 – Д. 2.4 – Б. 2.5 – В.
 3.1 — дегидрогеназа, I. 3.2 — декарбоксилаза, IV. 3.3 — дегидратаза, IV.

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

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:

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

Результат (окраска растворов):

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:

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

Результат (выделение углекислого газа):

Вывод:

Работа 3. Изучение функционирования ЦТК по образованию восстановительных эквивалентов

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

Схема постановки опыта:

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

Результат (окраска растворов):

Вывод:

Подпись преподавателя:

8. ТЕМА: БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ.

Актуальность темы

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **общей химии:**
 - понятия «окисление» («окислитель»), «восстановление» («восстановитель»), «окислительно-восстановительные реакции», «редокс-потенциал», «макроэргическая связь», «макроэрги»;
- **биоорганической химии:**
 - строение АТФ, ее роль как универсального макроэрга; барбитуровая кислота и ее производные;
- **цитологии:**
 - строение митохондриальной мембраны;
- **биохимии:**
 - класс оксидоредуктазы, пиридин- и флавинзависимые дегидрогеназы, строение и функционирование НАД⁺, ФМН, ФАД; водорододонорная функция цикла Кребса; субстраты ЦТК, поставляющие водород в дыхательную цепь.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Какие из приведенных утверждений не характеризуют АТФ?

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

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

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

Задание 3. Написать формулу АТФ, обозначив макроэргические связи.

Задание 4. В цикле Кребса протекают четыре дегидрогеназные реакции:

А. Изоцитрат → α -кетоглутарат. Б. α -Кетоглутарат → сукцинил-КоА.

В. Сукцинат → фумарат. 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.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Тканевое дыхание — процесс окисления водорода субстратов в дыхательной цепи с образованием эндогенной воды в клетках. Отличия образования воды в процессе тканевого дыхания от такого же процесса *in vitro*.

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

3. Схема дыхательной цепи, пункты фосфорилирования, механизм формирования электрохимического потенциала.

4. Механизмы митохондриального синтеза АТФ. H^+ -АТФ-синтаза. Сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования. Хемосмотическая теория Митчелла. Коэффициент фосфорилирования (Р/О) для различных субстратов, поставляющих водород в дыхательную цепь.

5. Регуляция работы дыхательной цепи и H^+ -АТФ-синтазы.

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

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 134–154.

2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 76–89.

3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

Для усвоения темы необходимо уяснить, что:

1. Окисление водорода в цепи тканевого дыхания является основным источником энергии для реакции синтеза АТФ.

2. Процесс образования воды в организме и вне его совершается с выделением 210–230 кДж/моль энергии.

3. В организме синтез H_2O происходит при участии дыхательной цепи.

4. Часть энергии этого процесса ($\approx 40\%$) используется для реакции синтеза АТФ.

5. Реакция окисления водорода субстратов в дыхательной цепи в организме сопряжена с процессом окислительного фосфорилирования (синтез АТФ из АДФ и H_3PO_4).

6. Коэффициент фосфорилирования (Р/О) — это число молей поглощенного Φ_n , пошедших на образование АТФ, в расчете на один атом кислорода, использованный в процессе тканевого дыхания.

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

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

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

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

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

- | | |
|--|----------------------------|
| 1. НАДН \cdot Н $^+$: 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.
- Б. СО.
- В. H_2S .
- Г. Азид натрия.
- Д. Амитал (барбитуровая кислота).
- Е. Ротенон.
- Ж. Антимисин А.
- З. Малонат.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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 на внутренней мембране митохондрий.

Б. Ингибируется олигомицином.

В. Имеет протонные каналы.

Г. Может проявлять АТФ-азную активность.

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

Е. Ингибируется атрактилозидом.

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

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

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

- А. Недостаток субстратов тканевого дыхания.
- Б. Недостаток кислорода.
- В. Избыток витаминов РР и В₂.
- Г. Добавление к изолированным дышащим митохондриям олигомицина.
- Д. Низкая концентрация АДФ в матриксе митохондрии.
- Е. Разобшение с участием 2, 4-динитрофенола.

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

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

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

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

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

- | | |
|---|--------------|
| 1. Ацетил-КоА \rightarrow CO ₂ + H ₂ O. | А. 4 моль. |
| 2. Сукцинат \rightarrow ЩУК. | Б. 10 моль. |
| 3. α -Кетоглутарат \rightarrow ЩУК. | В. 7,5 моль. |
| 4. Исоцитрат \rightarrow сукцинат. | Г. 6 моль. |
| 5. Сукцинат \rightarrow CO ₂ , H ₂ O. | Д. 24 моль. |

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. Изучение реакций окислительного фосфорилирования

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

Ход работы. В четыре пробирки вносят реактивы согласно схеме:

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

Инкубация 10 минут.

Результаты:

– интенсивность окраски по четырехбальной шкале:

– коэффициент Р/О:

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

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

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

Результаты (интенсивность окраски):

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 освобождающиеся при этом протоны и электроны переносятся на метиленовую синь, восстанавливая ее в бесцветное соединение.

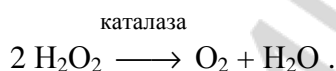
Ход работы. В одну пробирку вносят 15 капель кипяченого молока, в другую — 15 капель некипяченого. В каждую пробирку вносят по капле 0,4% раствора формальдегида и по капле 0,01% раствора метиленовой сини. Пробирки встряхивают и закрывают пробками, чтобы создать относительно анаэробные условия.

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

Результат:

Работа 4. *Обнаружение каталазы крови*

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



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

Результат:

Работа 5. *Открытие пероксидазы*

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

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

Результат:

Вывод:

Подпись преподавателя:

9. ТЕМА: ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ. ГЛИКОГЕНЕЗ И ГЛИКОГЕНОЛИЗ. ГЛИКОЛИЗ И СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПВК В МОЧЕ

Актуальность темы

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **биоорганической химии:**

- общее представление об углеводах;
- химическое строение и свойства моносахаридов (глюкоза, галактоза, фруктоза);
- строение олигосахаридов (мальтоза, лактоза, сахароза);
- строение гомополисахаридов (крахмал, гликоген, декстраны, целлюлоза);
- гидролиз полисахаридов *in vitro*;

– **биохимии:**

- классификация ферментов, механизм действия, регуляция активности;
- пути образования АТФ в клетках.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

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

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

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Переваривание углеводов, продукты, нарушения переваривания и их молекулярные механизмы, симптомы, подходы к диагностике и лечению. Роль клетчатки и пектинов в питании человека.

2. Всасывание продуктов переваривания углеводов, молекулярные механизмы, нарушения. Судьба всосавшихся моносахаридов. Транспорт глюкозы в клетки.

3. Синтез гликогена, назначение, последовательность реакций, энергозатраты и регуляция.
4. Распад (фосфоролиз, 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. Реакции, общие с гликолизом. Различие гликолиза и спиртового брожения, регуляция.

Литература

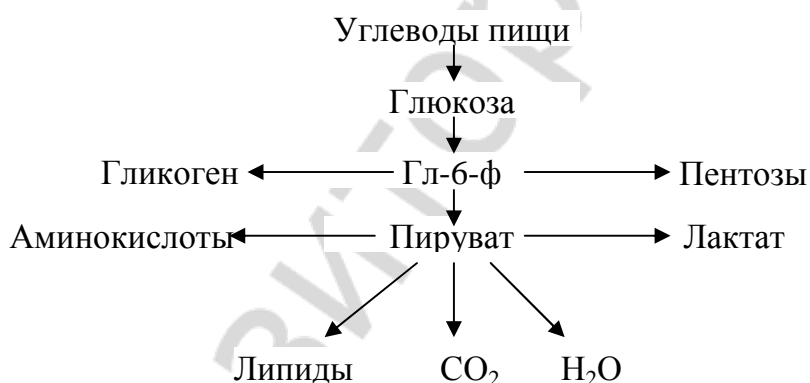
1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 155–172.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 102–134.
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

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

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

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



Задание 3. Запомнить:

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

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

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

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

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

4.1. Обратить внимание на то, что:

– в гликолизе можно выделить несколько этапов:

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

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

– большинство реакций гликолиза, за исключением трех, обратимы;

– все промежуточные продукты находятся в фосфорилированном состоянии;

– источником фосфата при гликолизе является АТФ;

– образование АТФ при гликолизе идет путем субстратного фосфорилирования.

4.2. Сравнить гликолиз со спиртовым брожением, установить сходство и различия.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

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

А. Глюкозо-6-фосфатаза.

Б. Фосфорилаза.

В. Гликогенсинтаза.

Г. α -1,4-Гликозидаза.

Д. α -1,6-Гликозидаза.

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

А. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

Б. Гексокиназа.

В. Глюкозо-6-фосфатаза.

Г. Глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза. Д. Фосфоглюкомутаза.

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

А. Фосфодиоксиацетон \leftrightarrow глицеральдегид-3-фосфат.

Б. 3-Фосфоглицерат \leftrightarrow 2-фосфоглицерат.

В. Пируват \leftrightarrow лактат.

Г. Глицеральдегид-3-фосфат \leftrightarrow 1,3-дифосфоглицерат.

Д. Глюкоза \rightarrow глюкозо-6-фосфат.

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

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

А. Участвует в превращении малата в оксалоацетат.

Б. Используется для восстановления оксалоацетата.

В. Является источником электронов и Н⁺ для дыхательной цепи.

Г. Превращает пируват в лактат.

Д. Используется в субстратном фосфорилировании.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Спиртовое брожение*

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



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

Порядок выполнения работы

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

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

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



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

Результат:

Работа 2. *Количественное определение пировиноградной кислоты в моче*

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

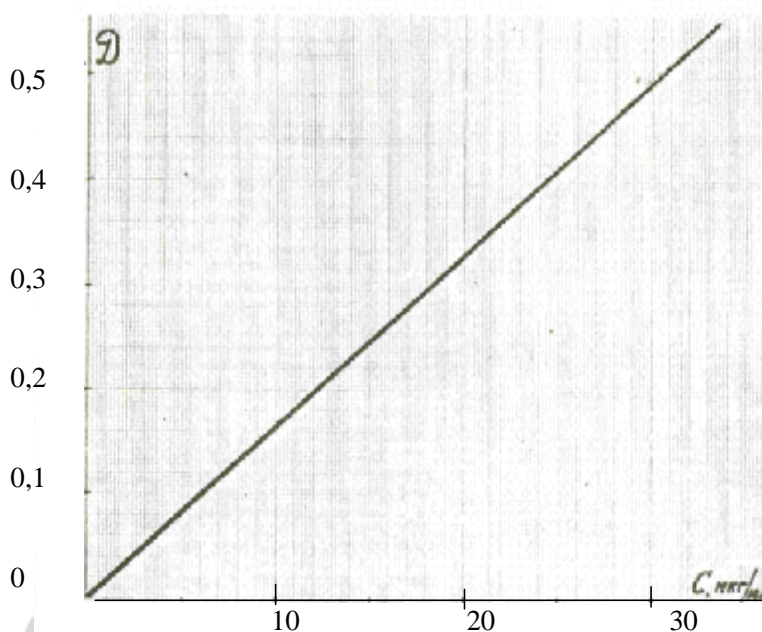
За сутки с мочой выделяется 113,7–283,9 мкмоль/сут (10–25 мг) пировиноградной кислоты.

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

Ход работы. Берут 2 пробирки: в контрольную наливают 1 мл H_2O , а в опытную — 1 мл мочи. Затем в обе пробирки приливают по 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидразинового р-ра и оставляют на 20 мин при комнатной температуре. После этого в каждую пробирку добавляют по 5 мл 0,4н NaOH и через 10 мин колориметрируют опытную пробу против контрольной пробы на реактивы (кюветы 10 мм), с зеленым светофильтром.

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

Ответ:



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

Клинико-диагностическое значение. При авитаминозе и гиповитаминозе B_1 в крови и других тканях, особенно в мозге, накапливается большое количество пировиноградной кислоты и увеличивается ее выделение с мочой. Содержание этой кислоты в крови возрастает при сахарном диабете, сердечной недостаточности, гиперфункции гипофизарно-адреналовой системы. Количество пировиноградной кислоты увеличивается после введения некоторых лекарств — камфоры, стрихнина, адреналина. При наркозе содержание этой кислоты в крови снижается.

Вывод:

Подпись преподавателя:

10. ТЕМА: ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА ПИРУВАТА. ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ. АЭРОБНЫЙ РАСПАД ГЛЮКОЗЫ ДО КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ (CO_2 И H_2O). КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Актуальность темы

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– биорганической химии:

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

– биологической химии:

- тканевое дыхание, субстраты, механизм;
- гликолиз;
- окислительное декарбоксилирование ПВК;
- цикл трикарбоновых кислот.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подобрать к каждому ферменту соответствующий кофермент:

- | | |
|------------------------------------|-------------------------|
| 1. NAD^+ – дегидрогеназа. | А. ФАД. |
| 2. QH_2 – дегидрогеназа. | Б. Гем. |
| 3. Цитохромоксидаза. | В. ФМН. |
| 4. Малатдегидрогеназа. | Г. Гем, Cu^+ . |
| 5. Сукцинатдегидрогеназа. | Д. NAD^+ . |
| | Е. NADP^+ . |

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

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

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

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

Задание 4. Запомнить, 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.

4.1. Написать реакции, катализируемые отдельными ферментами пируватдегидрогеназного комплекса.

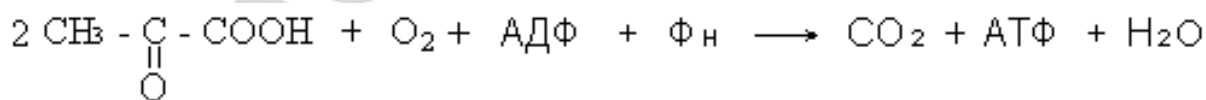
4.2. Определить количество молей АТФ, синтезируемое за счет дегидрирования 1 моля ПВК. Для этого:

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

Задание 5. Вспомните последовательность реакций, составляющих цитратный цикл, название ферментов, катализирующих эти реакции, и их коферменты.

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

5.2. Подставьте в уравнение соответствующие коэффициенты:



Для этого:

- найдите на схеме связи общего пути катаболизма с цепью тканевого дыхания реакции, в которых происходит декарбоксилирование, выпишите названия метаболитов, которые декарбоксилируются;
- найдите на схеме реакции дегидрирования и выпишите названия первичных доноров водорода;
- найдите на схеме компоненты дыхательной цепи, на которые поступает водород от первичных доноров;
- расставьте коэффициенты в уравнении.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Пируват как центральный метаболит. Пути превращения ПВК в зависимости от энергетического статуса и особенностей окислительного метаболизма клеток.
2. Восстановление пирувата в лактат (реакция, изоферменты ЛДГ, назначение реакций), цикл Кори. Утилизация лактата клетками.
3. Глюконеогенез (назначение, субстраты, ключевые реакции и ферменты, регуляция, энергозатраты).
4. Аэробное окисление глюкозы до CO_2 и H_2O (этапы, сопряжение с процессом окислительного фосфорилирования, энергетика). Челночные механизмы транспорта цитоплазматического $\text{НАДН}\cdot\text{H}^+$ в митохондрию.

Литература

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 172–182.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 134–142.
3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Выучите:

- а) реакции синтеза глюкозы из ПВК (уметь писать);
- б) ферменты глюконеогенеза (обратить внимание на ключевые ферменты);
- в) основные субстраты и пути их включения в глюконеогенез.

Задание 2. Образовавшийся в скелетных мышцах лактат наряду с диффузией в кровь окисляется в самих миоцитах в аэробных условиях. Укажите этапы окисления лактата и энергетический баланс этого процесса.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

Задание 2. Назовите ферменты, катализирующие следующие реакции:

1. Оксалоацетат + ацетил-КоА + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ цитрат + HS-CoA .
 2. Исоцитрат + $\text{НАД}^+ \rightarrow$ α -кетоглутарат + CO_2 + $\text{НАДН}\cdot\text{H}^+$.
 3. Сукцинил-КоА + ГДФ + $\text{H}_3\text{PO}_4 \leftrightarrow$ сукцинат + ГТФ + HS-CoA .
 4. Фумарат + $\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow$ малат.
- А. Фумаратгидратаза. Б. Цитратсинтаза.
В. Сукцинил-КоА-синтетаза. Г. Исоцитратдегидрогеназа.

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

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

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

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

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

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

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

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

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

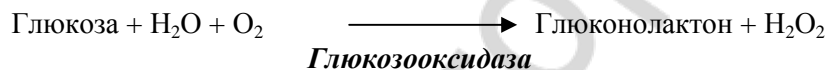
Для самостоятельной работы: 2 – 15 АТФ.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови ферментативным методом

Принцип метода. Метод основан на следующих ферментативных реакциях:



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

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°C или 30 мин при комнатной температуре		

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:

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

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

Ответ:

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

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:

11. ТЕМА: ВТОРИЧНЫЕ ПУТИ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ. МЕТАБОЛИЗМ ЭТАНОЛА. ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ НА УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Актуальность темы

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

Недостаточность ряда ферментов ПФП — причина гемолиза эритроцитов. Тот факт, что аскорбиновая кислота — незаменимый компонент пищи у морских свинок и приматов (в

том числе и человека), объясняется отсутствием одного из ферментов синтеза этого витамина из гулоновой кислоты (у большинства других млекопитающих он есть).

Знание особенностей обмена этанола в организме необходимо для понимания патогенеза алкоголизма и основных подходов к его терапии.

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

Цель занятия

Сформировать представление о значении пентозофосфатного и глюкуронового путей превращения глюкозы; изучить метаболизм этанола; усвоить роль гормональной регуляции обмена углеводов в поддержании концентрации глюкозы в крови для умения интерпретировать характер биохимических нарушений у больных при патологии углеводного обмена.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **биоорганической химии:**

▪ строение и свойства рибозы, дезоксирибозы, галактозы, фруктозы, глюкуроновой кислоты;

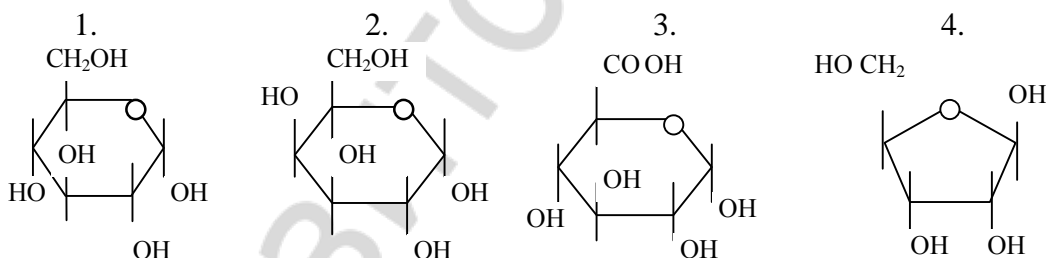
▪ реакции альдольной конденсации;

– **нормальной физиологии:**

▪ нейрогормональные механизмы регуляции углеводного обмена.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:

Задание 1. Напишите названия углеводов под соответствующими формулами:



Правильность решения проверьте, сопоставив его с эталоном ответа.

Вопросы для обсуждения

1. Пентозофосфатный путь (субклеточная локализация, этапы, ключевые ферменты, метаболиты, биологическая роль).

2. Глюкуроновый путь (тканевая и субклеточная локализация, пути метаболизма глюкуроновой кислоты, биологическая роль).

3. Метаболизм экзогенного этанола (пути, схема реакций).

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

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 182–192
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 142–162.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

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

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

1.2. Запомните:

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

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

Умейте объяснить значение ПФП для этих клеток и тканей.

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



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

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

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

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

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

Г. Это дополнительный путь синтеза пентоз.

Д. Выполняет энергетическую функцию.

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

Задание 3. Рассмотрите основной путь метаболизма этилового спирта. Запомните, что метаболизм этанола на 90% происходит в печени, поэтому при любой патологии, сопровождающейся нарушением функции печени, наблюдается снижение толерантности к алкоголю.

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

а) как изменится при приеме алкоголя отношение НАДН⁺ / НАД⁺ в клетках печени?

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

Ответ подтвердите соответствующей реакцией.

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

Задание 4. 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.

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

4.2. Подберите соответствующие пары гормон — механизм действия:

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

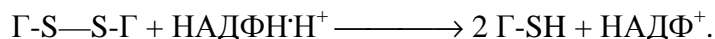
Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

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



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

Задание 3. Метаболиты ПФП могут быть использованы для синтеза:

- А. НАД⁺. Б. ФАД. В. УТФ. Г. Кофермента А.
Д. Жирных кислот. Е. Половых гормонов.

Задание 4. У больного хронический гепатит с признаками печеночной недостаточности. На приеме у врача он спрашивает, как часто может употреблять спиртные напитки. Что бы вы посоветовали больному? Обоснуйте свой ответ.

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

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

Задание 6. Больной сахарным диабетом после инъекции инсулина не смог своевременно поесть. На работе его состояние резко ухудшилось. Врач скорой помощи при осмотре отмечает беспокойство больного, бледность и влажность кожных покровов, угнетение рефлексов. Уровень глюкозы в крови составляет 2,8 ммоль/л. Что следует срочно ввести этому пациенту?

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

Задание 7. Почечный порог для глюкозы составляет:

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

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

- 2.1 — (А, Б, В, Г). 3.1 — а) увеличится; б) пируват снижается, лактат нарастает.
3.2 — Верно. 4.2 — (1 — В; 2 — А; 3 — Б, В).

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Изучение влияния гормонов на содержание глюкозы в крови

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

1. Определите содержание глюкозы в каждой из проб.
2. На основании полученных результатов сделайте вывод, какая из проб соответствует приведенным выше состояниям.

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

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

Расчет концентрации глюкозы по формуле:

$$C_{\text{оп}} (\text{мг}\%) = E_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}} (100 \text{ мг}\%) / E_{\text{ст}}$$

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л) = 0,0555.

Ответ:

Вывод:

Подпись преподавателя:

12. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ: «ВВЕДЕНИЕ В МЕТАБОЛИЗМ, ЦЕНТРАЛЬНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ, БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ, ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ, ОБМЕН УГЛЕВОДОВ»

1. Метаболизм. Понятие о катаболизме (привести примеры) и об анаболизме (привести примеры), различия и связь между ними на уровне субстрата, восстановленных коферментов, энергии и регуляторов обмена.

2. Виды метаболических путей. Понятие о линейных и циклических путях метаболизма (привести примеры), о ключевых (регуляторных) ферментах. Центральные пути метаболизма.

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

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

5. Цикл трикарбоновых кислот. Почему цикл Кребса является центральным метаболическим путем? Показать на схеме. Функции ЦТК. Что такое анаэробные реакции (пример такой реакции)? Написать схему ЦТК, назвать витамины, участвующие в этом процессе. Какие реакции цикла Кребса связаны с комплексами дыхательной цепи? Сколько моль АТФ можно при этом получить? Показать это на схеме ферментов тканевого дыхания. Рассчитать энергетический баланс окисления ацетил-КоА. Катаболическая функция цикла Кребса. Уметь рассчитать и показать на схеме, сколько АТФ синтезируется в митохондриях при окислении различных субстратов (аминокислоты) до конечных продуктов:

а) тир → фумарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
в) асп → оксалоацетат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
д) мет → сукцинил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
ж) вал → сукцинил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
и) иле → сукцинил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

б) про → α -кетоглутарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
г) арг → α -кетоглутарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
е) фен → ацетил-КоА → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
з) гис → α -кетоглутарат → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;

6. Виды биологического окисления. Витамины РР и В₂ как участники окислительно-восстановительных реакций. Нарисовать блок-схемы НАД⁺, НАДФ⁺, ФМН и ФАД.

7. Тканевое дыхание. Схема ферментов тканевого дыхания. Комплексы дыхательной цепи. Указать на схеме участки с энергией, достаточной для образования АТФ. На основании какого измеряемого показателя можно определить количество энергии, выделяемой в реакции переноса электронов? Регуляция активности ферментов дыхательной цепи, роль АДФ, АТФ. Уметь изобразить схему ферментов тканевого дыхания для НАД-зависимых и ФАД-зависимых субстратов. Уметь включать субстраты цикла Кребса (изоцитрат, α -кетоглутарат, малат, сукцинат) в дыхательную цепь. Знать, чему равен коэффициент фосфорилирования (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.

8. 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?

9. 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?

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

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

12. 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.

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

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

15. 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.

16. Судьба конечных продуктов гликолиза – пировиноградной и молочной кислот. Какова судьба лактата, образовавшегося в эритроцитах? Этапы и энергетический выход аэроб-

ного окисления лактата (расчет проводить поэтапно). Пути метаболизма пирувата. Какой путь утилизации пирувата стимулируется при энергодефиците в клетках?

17. 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.

18. Схема гликогенеза в гепатоцитах и миоцитах. Каковы запасы углеводов в мышцах, в печени и в целом организме? Рассчитать энерготраты включения молекулы (моля) глюкозы в молекулы гликогена. Гормональная регуляция гликогенеза.

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

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

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

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

13. ТЕМА: ОБМЕН ЛИПИДОВ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ, ВСАСЫВАНИЕ И РЕСИНТЕЗ. ТРАНСПОРТ ЭКЗОГЕННЫХ ЛИПИДОВ. КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ

Актуальность темы

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

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

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **общей химии:**

- свойства поверхностно-активных веществ, мицеллообразование;
- титрометрические методы анализа;

– **биоорганической химии:**

- строение и свойства многоатомных спиртов (глицерол, инозитол), природных высших карбоновых кислот;
 - строение простых липидов (восков и нейтральных жиров);
 - особенности структуры и физико-химических свойств фосфолипидов и желчных кислот;
 - состав и свойства желчи, ее участие в процессах пищеварения. Механизмы регуляции желчеобразования и желчевыделения;
 - состав и свойства пищеварительных соков; переваривание жиров и всасывание продуктов гидролиза жиров.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Вспомните, что природные жирные кислоты бывают насыщенные и ненасыщенные. Полиеновые жирные кислоты являются незаменимыми факторами питания и делятся на 2 группы — ω -3 и ω -6 — в зависимости от положения двойной связи от углеродного атома последней (метильной) группы.

Подберите для каждой жирной кислоты соответствующее обозначение:

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

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

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

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

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

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Общая характеристика и классификация липидов (омыляемые и неомыляемые, простые и сложные). Характеристика групп липидов (химические формулы и номенклатура

ацилглицеролов и глицерофосфолипидов; блок-схемы строения восков, сфингофосфолипидов, гликолипидов, сульфолипидов). Биологическая роль липидов.

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

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

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

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 193–210, 213–216.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 163–186.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

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

- | | |
|-------------------------------------|--|
| А. Холестерол. | 1. Энергетическая. |
| Б. Триацилглицерол. | 2. Структурная. |
| В. Жирные кислоты. | 3. Предшественник стероидных гормонов, витамина D ₃ , желчных кислот. |
| Г. Полиненасыщенные жирные кислоты. | 4. Предшественникиэйкозаноидов. |
| 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. | Б. Хенодзоксихолева. | В. Гликохолевая. |
| Г. Литохолевая. | Д. Дезоксихолева. | |

2.1. Подберите место образования для вышеперечисленных желчных кислот:

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

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

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

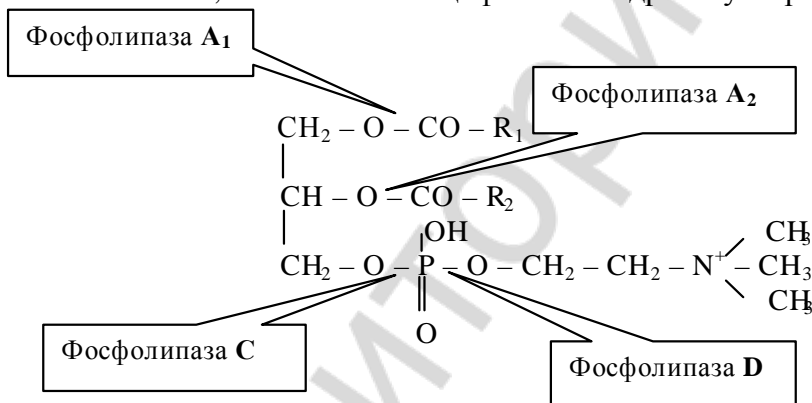
Перед всасыванием в слизистую тонкого кишечника из желчных кислот, холестерина и амфифильных продуктов гидролиза жиров (жирных кислот и β -моноацилглицеролов) образуются:

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

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

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> А. Снижение секреции или активности панкреатической липазы (панкреатит). Б. Нарушение эмульгирования жиров вследствие недостаточного поступления желчи в просвет кишечника (желчнокаменная болезнь). В. Нарушение функции печени и уменьшение синтеза желчных кислот (гепатит). Г. Дисбактериоз. | <ul style="list-style-type: none"> Д. Повышение уровня ТАГ в крови. Е. Нарушение всасывания жирорастворимых витаминов («куриная слепота», кровоточивость). Ж. Нарушение всасывания незаменимых полиненасыщенных жирных кислот. З. Ожирение. |
|---|---|

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



Задание 4. Запомните, что в клетках слизистой оболочки кишечника (в энтероцитах) происходит ресинтез ТАГ и фосфолипидов из 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.

4.1. Нужно усвоить, что для транспорта гидрофобных продуктов ресинтеза (ТАГ и эфиров холестерина) из кишечника служат хиломикроны (один из классов липопротеинов). Ознакомьтесь с общим принципом строения липопротеиновых частиц и укажите компоненты, которые составляют в хиломикроне:

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

4.2. Выберите особенности, характеризующие транспорт экзогенных липидов:

- А. Хиломикроны поступают непосредственно в кровоток.
- Б. Хиломикроны поступают в лимфу.

В. После гидролиза ТАГ в составе хиломикронных липопротеинлипазой, располагающейся на эндотелии сосудов, жирные кислоты поступают в клетки различных тканей.

Г. Окончательное расщепление ремнантов хиломикронных на составные компоненты происходит в гепатоцитах.

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- А. Фосфолипаза A_1 . Б. Фосфолипаза A_2 .
В. Панкреатическая липаза. Г. Гормон-чувствительная липаза.

Эталонные ответы к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

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

2 — В. 2.1 – (А – 1; Б – 1; В – 1; Г – 2; Д – 2). 3 — А. 3.1 – (А, Б, В, Е, Ж)

4. Верно. 4.1. А – 1) ТАГ; 2) эфиры холестерина. Б – 1) фосфолипиды; 2) холестерол; 3) апобелки (апо-В48). 4.2 – (Б, В, Г).

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Кинетика действия панкреатической липазы*

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

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



Вывод:

Работа 2. *Действие фосфолипаз поджелудочной железы*

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

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

Результат:

Вывод:

Подпись преподавателя:

14. ТЕМА: ТРАНСПОРТ ЛИПИДОВ КРОВЬЮ. ОБМЕН ХОЛЕСТЕРОЛА. ДЕПОНИРОВАНИЕ И МОБИЛИЗАЦИЯ ЛИПИДОВ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ β -ЛИПОПРОТЕИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ.

Актуальность темы

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

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

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

Цель занятия

Изучить процессы синтеза липидов и холестерина в клетках. Усвоить процессы мобилизации липидов в жировой ткани. Сформировать представление о механизмах транспорта липидов и холестерина в крови. Приобрести навыки количественного определения β -липопротеинов в крови.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

— *биоорганической химии:*

• холестерол: вторичный спирт — производное циклопентанпергидрофенантрена, строение, свойства.

— *биологической химии:*

• гликолиз и пентозофосфатный путь окисления глюкозы, окислительное фосфорилирование.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Синтез ТАГ и глицерофосфолипидов в печени и жировой ткани (химизм, общие этапы синтеза, различия). Транспортные формы липидов в крови. Строение и метаболизм ЛПОНП, ЛППП, ЛПНП, ЛПВП. Классификация дислипидемий по Фредриксону.

2. 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).

3. 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.

4. Гиперхолестеролемиа и ее причины. Биохимия атеросклероза, гиперхолестеролемиа как фактор риска, другие факторы риска, механизм атерогенного действия аполипопротеина (а). Основы профилактики и диагностики гиперхолестеролемиа, атеросклероза (индекс атерогенности).

5. Мобилизация липидов из жировой ткани (схема, Са²⁺ и цАМФ-зависимые механизмы активации гормон-чувствительной липазы, гормональная регуляция). Роль депонирования и мобилизации жиров.

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 210–231, 254–258.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 186–199, 210–212, 214–217.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

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

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

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

1.2. Назовите пути поступления, использования и выведения холестерола из организма.

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

3.1. Выбрать, в какой форме пищевой холестерол поступает в кровоток:
А. ЛПНП. Б. ЛПВП. В. ЛПОНП. Г. Хиломикронов.

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

4.1. Какой фермент осуществляет внутриклеточный липолиз?

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

4.2. Каким гормоном активируется этот фермент?

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

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

Задание 3. Пациент, которому с лечебной целью назначено голодание, в течение двух недель значительно похудел. Каким гормоном регулируется скорость мобилизации жиров при изменении режима питания?

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

Задание 4. При обследовании подростка, страдающего ксантоматозом, выявлена семейная гиперхолестеролемиа. Концентрация каких липопротеинов резко повышена в крови при данной патологии?

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

Задание 5. Для ситуации, когда происходит депонирование липидов, характерно:

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

Задание 6. Сравните особенности биосинтеза липидов (триацилглицеролов) в различных тканях, заполнив таблицу:

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

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

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

Задание 8. Сравните 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.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – Г;

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

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. Липопротеины можно разделить различными методами: электрофореза, тонкослойной хроматографии, ультрацентрифугирования в солевых растворах различной плотности. 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. Фотометрический метод. В основу метода положена способность β -липопротеинов (ЛПНП) осаждаться в присутствии хлорида кальция и гепарина; при этом изменяется мутность раствора. По степени помутнения раствора и 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 на колориметре 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 составляет 3–4,5 г/л. Содержание β -липопротеинов колеблется в зависимости от возраста и пола.

Ответ:

Вывод:

Подпись преподавателя:

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

Актуальность темы

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

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **биоорганической химии:**

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

§ кетоновые тела и их свойства

– **биологической химии:**

§ центральные пути метаболизма (окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, ЦТК);

§ пентозофосфатный путь;

§ дихотомический распад глюкозы;

§ окислительное фосфорилирование

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:

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

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

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

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

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

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

Правильность решения проверьте, сопоставив его с эталоном ответа

Вопросы для обсуждения

1. β -Окисление как центральный путь катаболизма жирных кислот. Субклеточная локализация процесса, активация жирных кислот, транспорт в митохондрии. Химизм окисления, участие витаминов. Сопряжение с процессом окислительного фосфорилирования и энергетический выход. 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. Метаболизм арахидоновой кислоты. Биосинтез эйкозаноидов (простагландины, простациклины, лейкотриены, тромбоксаны) и их биологическая роль.

4. Кетогенез: тканевая и субклеточная локализация, субстраты, химизм. Оксиметилглутариловый и деацилазный пути образования кетонных тел. Молекулярные механизмы кетонемий при сахарном диабете, недостаточном углеводном питании, голодании. Утилизация кетонных 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

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 234–249, 258–260.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 200–210, 212–214.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

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

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

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

В. В каждом витке β -окисления происходят две реакции дегидрирования, в которых восстанавливаются одна молекула НАД⁺ (НАДН·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 CO_2 и H_2O .

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 $\text{НАДН}\cdot\text{H}^+$ в митохондриях.

В. При гипоксии.

Г. При наличии большого количества глюкозы.

Задание 2.

2.1. Напишите реакции первого витка синтеза пальмитиновой кислоты.

2.2. Напишите суммарное уравнение синтеза пальмитиновой кислоты и посчитайте количество циклов, необходимых для ее синтеза.

2.3. Сколько молекул глюкозы и какими путями нужно затратить, чтобы синтезировать 1 молекулу трипальмитоилглицерола?

2.4. Укажите, какие из приведенных ниже жирных кислот:

1. Синтезируются в организме. А. 18:2 (9, 12).

2. Не синтезируются в организме 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. Изучить пути образования кетоновых тел в печени и их метаболизм. Обратить внимание на то, что ацетоацетат и β -гидроксibuтират образуются в норме в небольших количествах, а ацетон — лишь при значительном накоплении кетоновых тел (голодание, сахарный диабет).

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

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1.

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

- А. Окисление, дегидратация, окисление, расщепление.
- Б. Восстановление, дегидрирование, восстановление, расщепление.
- В. Дегидрирование, гидратация, дегидрирование, расщепление.
- Г. Гидрирование, дегидратация, гидрирование, расщепление.
- Д. Восстановление, гидратация, дегидрирование, расщепление.

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

- А. Как скажется на способности выполнять длительную работу снижение концентрации карнитина?
- Б. Под микроскопом в клетках таких мышц видны вакуоли жира. Объясните их происхождение.

Задание 2.

3.1. Изучив метаболизм жирных кислот, заполните таблицу:

Процессы	β -Окисление	Биосинтез
Локализация процесса		
Исходный субстрат		
Переносчик субстрата через митохондриальную мембрану		
Коферменты окислительно-восстановительных реакций		
Источник присоединяемого фрагмента или отщепляемый фрагмент		
Регуляторные ферменты		
Регулирующие факторы		
Активаторы		
Ингибиторы		

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

- А. При длительной мышечной работе.
- Б. При избытке углеводов в пище.
- В. При отсутствии жиров в пище.
- Г. При голодании.
- Д. При нарушении переваривания жиров.

Эталонные ответы к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

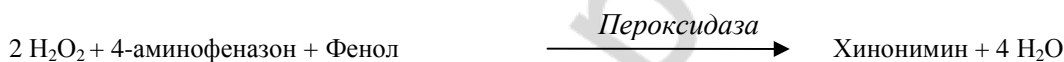
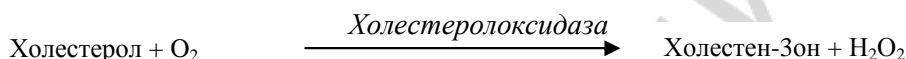
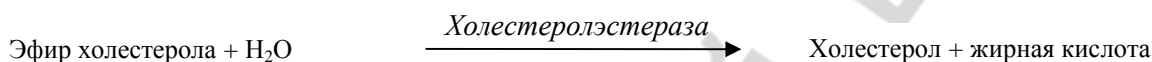
- 1.1 — 336,5. 1.2 — А.
2.3 — 34 молекулы глюкозы. 2.4 — (1 – Б, Г, Д; 2 – А, В). 2.5 — (А, Г).
3.1 — (1 – Б; 2 – А; 3 – В).
4.1. – Б, Г. 4.2. – 20 АТФ.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

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.

Ход работы. Холестерол определяют в сыворотке крови. Реактивы добавляют по следующей схеме:

	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 5 мин при 37°C или 10 мин при комнатной температуре		

По окончании инкубации измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб на колориметре (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. $C_{\text{холест.}} (\text{ммоль/л}) = 5,17 \times (E_{\text{пробы}} / E_{\text{станд.}})$

Ответ:

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

Клинико-диагностическое значение. При нарушении липидного обмена холестерол может накапливаться в крови. 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.

Вывод:

Работа 2. Качественные реакции на ацетон и ацетоуксусную кислоту

Порядок выполнения работы

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

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

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

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

Результат:

Вывод:

Подпись преподавателя:

16. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМЕ «ОБМЕН ЛИПИДОВ»

1. Какие вещества относятся к липидам, простым липидам, неомыляемым и омыляемым липидам? Структура, физико-химические свойства и функции природных восков, ацилглицеролов, глицеро- и сфингофосфолипидов, гликолипидов, сульфолипидов. Уметь писать химические формулы ацилглицеролов, фосфатидной кислоты, фосфатидилинозита, лизолецитина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилхолина, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот, блок-схемы строения церамида, цереброзидов и ганглиозидов (GM₁), сфингомиелина.

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

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

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

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

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

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

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

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

12. 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?

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

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

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

16. Возможные механизмы атерогенного действия липопротеина (а).

17. Предложить механизм развития последствий в результате снижения активности липопротеинлипазы в крови, печеночной липазы, апо С-2, недостаточности рецепторов для апо В-48/Е.

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

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

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

21. Месторасположение действия фосфолипаз А₁, А₂, С и D на структуру фосфолипидов. Реакции синтеза лецитина. Липотропные факторы, их роль в нарушении синтеза глицерофосфолипидов в печени. Механизм развития жирового перерождения печени.

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

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

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

17. ТЕМА: ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ВСАСЫВАНИЕ БЕЛКОВ. АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Актуальность темы

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

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **биохимии:**

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

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

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

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

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

- А. Окисление молочной кислоты.
- Б. Взаимопревращение оптических изомеров.
- В. Гидролиз жиров.

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Что такое азотистый баланс? Какие виды азотистого баланса имеют место в норме и 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. Всасывание аминокислот, транспорт аминокислот в клетки.
7. Процессы гниения белков в кишечнике. Обезвреживание продуктов гниения и ксенобиотиков.

Литература

Основная

1. Биологическая химия / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 261–277.
2. Биологическая химия / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 218–225.
3. Конспект лекций.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

Задание 1.

1.1. Запомнить основные этапы переваривания белков:

А. В желудке.

Б. В просвете тонкого кишечника.

В. «Пристеночное» переваривание.

1.2. Запомнить ферменты, участвующие на каждом этапе переваривания белков, и знать специфичность их действия, рН-оптимум, механизм активации.

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

1.4. Уметь объяснить причины появления в кровотоке фенола, индола, скатола, путресцина, кадаверина после переваривания белковой пищи в желудочно-кишечном тракте.

1.5. Выберите правильные ответы. Биологическое значение переваривания белков заключается в том, что благодаря этому процессу происходит:

А. Образование набора аминокислот, необходимых для синтеза собственных белков организма и биологически активных соединений.

Б. Отщепление небелковой части сложных белков (липо-, нуклеопротеинов), что облегчает расщепление белковой части молекулы.

В. Образование продуктов, лишенных антигенной специфичности.

Г. Образование продуктов, которые могут легко проникать в клетки слизистой оболочки кишечника.

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

А. Сближение аминокислот, входящих в активный центр.

Б. Изменение вторичной структуры фермента.

В. Образование новых связей в молекуле фермента.

Г. Изменение первичной структуры.

Д. Изменение третичной структуры.

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

А. Наличие слизи, содержащей гетерополисахариды.

Б. Активация фермента только в полости (желудка, кишечника).

В. Наличие гликопротеинов на наружной поверхности мембран.

Г. Отсутствие субстратов.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

А. Какие ферменты могут активироваться при острых панкреатитах?

Б. Какие последствия может вызвать такая активация?

В. Как можно уменьшить разрушительное действие панкреатических протеаз?

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

Задание 2. При 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. Мужчина направлен в больницу с диагнозом острый панкреатит, при котором вследствие внутриклеточной активации панкреатических ферментов происходит разрушение тканей. Пациенту был назначен препарат контрикал — конкурентный ингибитор панкреатических ферментов. Выберите характерные особенности ингибирования:

- А. Ингибитор является структурным аналогом субстрата.
- Б. Степень ингибирования зависит от концентрации ингибитора.
- В. Структура ингибитора не похожа на структуру субстрата.
- Г. Степень ингибирования зависит от времени действия ингибитора.
- Д. Образование неактивного комплекса ингибитор-субстрат.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – Г; 2 – А; 3 – Г.

Для самостоятельной работы:

1.5. – А, Б, В, Г; 2 – Г; 3 – А, Б, В.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. Количественное определение кислотности желудочного сока

Принцип метода. Общую кислотность желудочного сока измеряют в миллилитрах 0,1н раствора едкого натра, затраченного на нейтрализацию 1000 мл желудочного сока в присутствии индикатора фенолфталеина (зона перехода рН 8,3–10,0; ниже 8,2 — бесцветный, выше 10,0 — красный). В норме общая кислотность для взрослого человека составляет 40–60 ммоль/л, у новорожденных — 2,8 ммоль/л, у детей от 1 месяца до 1 года — 4–20 ммоль/л.

Содержание свободной соляной кислоты в желудочном соке измеряют в миллилитрах 0,1н раствора едкого натра, затраченного на нейтрализацию 1000 мл желудочного сока в присутствии индикатора диметиламиноазобензола (зона перехода рН 2,9–4,0; ниже 2,9 — розово-красный; выше 4,0 — желтый). Свободная соляная кислота почти вся оттитровывается при рН 3,0; при этом окраска диметиламиноазобензола изменяется от розово-красной до оранжевой. Содержание свободной соляной кислоты в норме составляет 20–40 ммоль/л (у новорожденных — 0,5 ммоль/л).

Определение общей кислотности, общей соляной кислоты, свободной соляной кислоты и связанной соляной кислоты проводится в одной порции желудочного сока. Титрование проводят с двумя индикаторами: диметиламиноазобензолом и фенолфталеином.

Ход работы. Отмеривают пипеткой в колбочку 10 мл желудочного сока, добавляют 1 каплю диметиламиноазобензола и 2 капли фенолфталеина. При наличии в желудочном соке свободной соляной кислоты он окрашивается в красный цвет с розовым оттенком, при ее отсутствии сразу появляется оранжевая окраска.

Титруют свободную соляную кислоту 0,1н NaOH из микробюретки до появления оранжевого окрашивания и результат записывают (1-я отметка). Не добавляя щелочи в бюретку, продолжают титрование до появления лимонно-желтого цвета и результат записыва-

ют (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 A — количество 0,1н раствора NaOH, мл; 10 — количество желудочного сока, взятого для титрования, мл; 0,1 — количество мг/экв. щелочи в 1 мл 0,1н раствора, ммоль; 1000 — пересчет на 1 литр.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. При заболеваниях желудка кислотность может быть нулевой, пониженной и повышенной. При язвенной болезни желудка или гиперацидном гастрите происходит увеличение содержания свободной соляной кислоты и общей кислотности (гиперхлоргидрия). При гипоацидном гастрите или раке желудка наблюдается уменьшение количества свободной соляной кислоты и общей кислотности (гипохлоргидрия). При раке желудка, хроническом гастрите иногда отмечается полное отсутствие соляной кислоты (ахлоргидрия). При злокачественном малокровии, при раке желудка часто наблюдается полное отсутствие соляной кислоты и пепсина (ахилия).

Вывод:

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.

Результат:

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 pH 4,9 и температуре 25°C пепсином происходит строго параллельно его способности переваривать белки. За единицу активности пепсина принимают такое 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 уро-

пепсина в моче. С мочой здорового человека за сутки обычно выделяется от 150 до 300 ед. (1,5–3 мг) уропепсина.

Ход работы. На дно пробирки с помощью микропипетки наливают 0,1 мл раствора пепсина, а в другую пробирку наливают 5 мл молочно-ацетатной смеси. Помещают обе пробирки в термостат на 10 мин. Быстро переливают молочно-ацетатную смесь в пробирку с пепсином, содержимое пробирки встряхивают. Момент приливания смеси отмечают по секундомеру. Пробирку со смесью встряхивают, наклоняют ее и наблюдают за появлением на ее стенках первых хлопьев казеина. Записывают время створаживания смеси в секундах.

Расчет. Для расчета активности пепсина в 1 мл желудочного сока делят 60 секунд на время створаживания смеси и таким путем находят количество единиц пепсина в 0,1 мл желудочного сока, а умножая на 10 — в 1 мл.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. При ахилии уропепсин в моче и пепсин в желудочном соке могут полностью отсутствовать, а при язвенной болезни желудка количество пепсина резко увеличено.

Вывод:

Подпись преподавателя:

18. ТЕМА: ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность темы

Поступившие в клетки аминокислоты образуют фонд аминокислот, который пополняется за счет распада пищевых и тканевых белков и аминокислот, образующихся из других веществ. Аминокислоты фонда клетки используются для синтеза белков и других соединений, а также подвергаются индивидуальным превращениям и общим реакциям обмена — дезаминированию, трансаминированию, декарбоксилированию и активации при биосинтезе белков. Реакции дезаминирования приводят к образованию аммиака. Важнейшую роль в обмене аминокислот играет глутаматдегидрогеназная реакция. В ходе реакций переаминирования происходит распад одних аминокислот и синтез новых аминокислот, обеспечивается взаимосвязь реакций углеводного и белкового обмена. При декарбоксилировании аминокислот образуются биогенные амины — триптамин, серотонин, гистамин, ГАМК, играющие важную роль в организме.

Цель занятия

Усвоить общие пути обмена аминокислот. Получить представление о путях обмена безазотистого остатка аминокислот, о роли аминокислот в образовании важных биологически активных соединений. На примере определения активности аминотрансфераз в сыворотке крови показать значение использования индикаторных ферментов в диагностике и прогнозе заболеваний.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **биохимии:**

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

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Данные врачебного осмотра пожилой женщины, проживающей в доме для престарелых, соответствовали периферической нейропатии. Лабораторные анализы подтвердили недостаточность тиамина. Активность каких процессов снижена при данном гиповитаминозе?

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Аминокислотный фонд клетки, источники пополнения и пути использования.
2. Трансаминирование, аминотрансферазы, коферментная функция витамина В₆. Клинико-диагностическое значение определения активности аминотрансфераз сыворотки крови.
3. Пути дезаминирования аминокислот. Окислительное дезаминирование (ферменты, коферменты). Прямое окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты (химизм), значение глутаматдегидрогеназной реакции. Непрямое дезаминирование.
4. Пути использования безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты. Способы синтеза новых аминокислот.
5. Декарбоксилирование аминокислот, ферменты, кофермент. Биогенные амины (триптамин, серотонин, гистамин, γ -аминомасляная кислота), катехоламины (дофамин, норадреналин, адреналин). Реакции образования, биологическая роль, пути обезвреживания.

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 277–281, 286–287, 296–301.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 224–231.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

1. *Ленинджер, А. Основы биохимии* / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985. С. 571–576.
2. *Марри, Р. Биохимия человека* / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993. С. 306–309.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. У мужчины, в течение длительного времени злоупотреблявшего алкоголем, значительно повышен уровень аланинаминотрансферазы крови. Какие биохимические реакции катализирует данный фермент?

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

Задание 2. У больного с инфекционным гепатитом установлено резкое увеличение активности глутаматдегидрогеназы в крови. Укажите витамин, который является коферментом данного энзима:

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

Задание 3. У больного после перенесенного инфаркта миокарда в течение 2-х суток значительно повышалась активность аспартатаминотрансферазы в крови. Укажите кофермент данного фермента:

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

Задание 4. После приступа судорог педиатром был осмотрен грудной ребенок, получающий искусственную пищу. У ребенка обнаружен также дерматит. При лабораторном обследовании установлено снижение аланин- и аспартатаминотрансферазной активности в крови. Недостатком какого кофермента обусловлено снижение скорости трансаминирования аминокислот?

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Центральная роль глутаминовой кислоты в промежуточном обмене аминокислот определяется тем, что глутаминовая кислота:

1. Участвует в трансаминировании как универсальный донор NH₂-группы.
2. Легко образуется из α-кетоглутаровой кислоты — универсального акцептора аминокислотных групп.
3. Дезаминируется НАД⁺-зависимой глутаматдегидрогеназой.
4. Является заменимой аминокислотой.

Задание 2. При декарбоксилировании каких аминокислот или их производных образуются следующие биогенные амины?

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

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — В.

Для самостоятельной работы:

1 — А; 2 — А; 3 — Г; 4 — Г.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Определение активности аланиновой аминотрансферазы (АлАТ)

Аминотрансферазы (трансаминазы) — ферменты, которые используют в качестве кофермента фосфопиридоксаль и катализируют обратимый перенос аминокислотной группы с аминокислот на кетокислоты. Определение концентрации образующихся α-кетокислот лежит в основе методов определения активности трансаминаз.

Принцип метода. В результате переаминирования аланин превращается в пировиноградную кислоту. Добавление кислого 2,4-динитрофенилгидразина останавливает ферментативный процесс. Образовавшийся гидразон пировиноградной кислоты в щелочной среде дает коричнево-красное окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшегося пирувата.

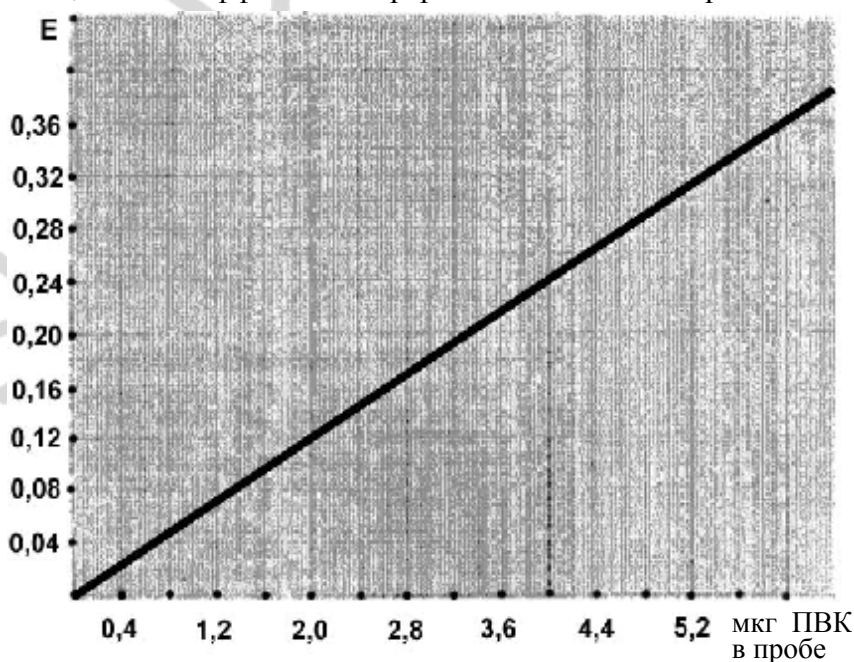
Активность аминотрансфераз выражают в микромолях пировиноградной кислоты, образованной за 1 час инкубации при температуре 37°С в расчете на 1 мл сыворотки крови. В норме активность аминотрансфераз в крови невелика и составляет для АсАТ от 0,1 до 0,45 мкмоль/ч·мл, а для АлАТ — 0,1–0,68 мкмоль/ч·мл.

Ход определения. В пробирку вносят 0,5 мл субстратной смеси, затем добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки и инкубируют в термостате 30 мин при 37°С. Затем приливают 0,5 мл раствора динитрофенилгидразина и пробы выдерживают 20 мин при комнатной температуре. После этого добавляют 5 мл 0,4н NaOH, тщательно перемешивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре для развития окраски. Оптическую плотность измеряют на колориметре с зеленым светофильтром (530 нм) в кювете с шириной 10 мм против контрольной пробы на реактивы. Контрольная проба содержит все ингредиенты опытной пробы за исключением сыворотки крови, вместо которой берут 0,1 мл дистиллированной воды.

Расчет активности производится по готовому калибровочному графику зависимости концентрации ПВК от оптической плотности окрашенного раствора. Пересчет активности фермента в микромоли пировиноградной кислоты производят по следующей формуле:

$$\text{АлАТ(мкмоль/ч} \cdot \text{мл} = a \cdot 10 \cdot 2/88,$$

где a — количество пировиноградной кислоты в 0,1 мл сыворотки, найденное по калибровочному графику в мкг; 88 — масса 1 мкмоль пировиноградной кислоты в мкг; 2 — коэффициент перерасчета на 1 час инкубации; 10 — коэффициент перерасчета на 1 мл сыворотки.



Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Аминотрансферазы относятся к индикаторным ферментам, и определение их активности широко применяется в диагностике заболеваний сердца и печени. При инфаркте миокарда через 4–6 часов наблюдается повышение уровня

АсАТ, максимальна ее активность через 24–36 часов. Активность обеих аминотрансфераз, в особенности АлАТ, повышается при инфекционном гепатите. Особенно важна диагностическая ценность определения АлАТ при безжелтушных формах болезни Боткина и в инкубационном периоде.

Вывод:

Подпись преподавателя:

19. ТЕМА: ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА КРОВИ И МОЧЕВИНЫ В МОЧЕ. НАРУШЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО ОБМЕНА

Актуальность темы

Образующийся в процессе метаболизма аммиак является токсичным соединением, в первую очередь для центральной нервной системы. Нарушение процессов его связывания и обезвреживания ведет к гипераммониемии, развитию коматозного состояния и смерти больного. Знание процессов обезвреживания аммиака необходимо для понимания механизма возникновения гипераммониемии, способов борьбы с ней, а также для своевременной диагностики и лечения врожденных нарушений орнитинового цикла реакций синтеза мочевины. Знакомство с наследственными нарушениями обмена аминокислот необходимо для своевременного выявления этих заболеваний и их лечения.

Важнейшим показателем азотистого обмена является остаточный азот крови. В клинической лабораторной практике определение остаточного азота и его фракций, а также мочевины в моче помогает оценить выделительную функцию почек, степень почечной и печеночной недостаточности.

Цель занятия

Изучить процессы обезвреживания аммиака в организме и возможные механизмы развития гипераммониемии. Закрепить представление о молекулярных механизмах наследственных патологий обмена фенилаланина и тирозина, некоторых других нарушениях обмена белков и аминокислот. Приобрести навыки количественного определения остаточного азота крови и мочевины в моче и усвоить диагностическую ценность этих показателей.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **общей химии:**
 - аммиак и соли аммония;
- **биоорганической химии:**
 - мочевины — конечный продукт азотистого обмена в организме человека; структура и свойства мочевины;
- **биологической химии:**
 - формулы циклических аминокислот;
- **биологической химии:**
 - ферменты классов трансфераз и оксидоредуктаз; структура коферментов оксидоредуктаз (НАД⁺, НАДФ⁺, ФМН, ФАД).

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Аммиак в клетке образуется в результате:

- А. Реакций дезаминирования аминокислот.
- Б. Реакций переаминирования.
- В. Реакций распада биогенных аминов.
- Г. Реакций декарбоксилирования аминокислот.
- Д. Непрямого дезаминирования.

Задание 2. Назовите ферменты, катализирующие в организме человека реакции окислительного дезаминирования аминокислот:

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

Задание 3. Дополните схему реакции окислительного дезаминирования глутамата недостающими компонентами:



- А. Глутаматдекарбоксилаза.
- Б. Глутаматдегидрогеназа.
- В. Аспаратаминотрансфераза.
- Г. НАД⁺.
- Д. ФАД.
- Е. ФМН.
- Ж. Н₂O.
- З. NH₃.
- И. CO₂.
- К. NO₂

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Пути связывания аммиака в клетках (восстановительное аминирование α -кетоглутарата, синтез глутамина и аспарагина, образование карбамоилфосфата). Транспортные формы аммиака.
2. Образование солей аммония в почках (источник аммиака, роль глутаминазы и глутаматдегидрогеназы, значение активирования глутаминазы почек при ацидозе).
3. Роль клеток печени в обезвреживании аммиака. Орнитиновый цикл мочевинообразования (схема цикла, субстраты, ферменты, энергетическое обеспечение, связь с лимоннокислым циклом, регуляция). Судьба мочевины. Гипераммониемия, причины.
4. Остаточный азот крови (основные компоненты и их относительное содержание). Принцип определения и клинико-диагностическое значение.
5. Обмен фенилаланина и тирозина. Нарушения обмена при фенилкетонурии, тирозинемии, алкаптонурии, альбинизме.

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 281–286, 293–296.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 231–240.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

1. *Ленинджер, А.* Основы биохимии / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985. С. 578–597.
2. *Мак-Мюррей, У.* Обмен веществ у человека / У. Мак-Мюррей. М. : Мир, 1980. С. 280–300.

Задания для самостоятельной работы

Для закрепления материала необходимо обратить особое внимание на химизм реакций локального обезвреживания аммиака в тканях; на последовательность реакций орнитинового цикла мочевинообразования; на связь орнитинового цикла с лимоннокислым циклом Кребса; на клинико-диагностическое значение определения остаточного азота крови и мочевины в моче.

Задание 1. 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 2. Подобрать соответствующие пары вопрос — ответ:

- | | |
|---|--|
| А. Фермент орнитинкарбамоилтрансфераза (ОКТ). | 1. Участвует в синтезе аргининоянтарной кислоты. |
| Б. Фермент аргиназа. | 2. Участвует в синтезе цитруллина. |
| В. Фермент аргининосукцинатсинтетаза. | 3. Участвует в распаде аргининоянтарной кислоты. |
| Г. Фермент аргининосукцинатлиаза. | 4. Участвует в реакции гидролиза аргинина. |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. В клинику поступил больной с повторной рвотой, судорожными припадками, потерей сознания, вызванными отравлением аммиаком. Почему при высокой концентрации NH_3 в крови наступает потеря сознания и смерть?

- А. Снижение концентрации глюкозы в крови.
- Б. Повышение содержания мочевины в крови.
- В. Повышение содержания ацетил-КоА в печени.
- Г. Снижение концентрации АТФ в клетках мозга.
- Д. Повышение содержания глюкозы в крови.

Задание 2. Подберите к каждой пронумерованной реакции обмена фенилаланина и тирозина соответствующий фермент:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| 1. Фен \longrightarrow Тир. | А. Декарбоксилаза диоксифенилаланина. |
| 2. ДОФА \longrightarrow дофамин. | Б. Оксидаза гомогентизиновой кислоты. |
| 3. Гомогентизиновая кислота \longrightarrow фумарилацетат. | В. Фенилаланингидроксилаза. |
| 4. Фен \longrightarrow фенилпироват. | Г. Фенилаланинтрансминаза. |

Задание 3. Сколько молей АТФ требуется для синтеза 1 моля мочевины? Напишите реакции (схема), идущие с затратой АТФ, укажите ферменты.

Задание 4. Больная страдает наследственным заболеванием — алкаптонурией. Жалуется на сильные боли в суставах, по ходу позвоночника. Проявление артрита в данном случае может быть вызвано накоплением определенного метаболита. Назовите этот метаболит.

- | | |
|----------------------------------|------------------------------|
| А. Фенилаланин. | Б. Ацетоацетат. |
| В. Тирозин. | Г. Гомогентизиновая кислота. |
| Д. Фенилпировиноградная кислота. | |

Задание 5. Оцените функциональное состояние печени и почек у больных С. и А. с учетом биохимических показателей крови и мочи.

1. У больного С. содержание мочевины в крови 1,8 ммоль/л. С мочой выводится 12 г мочевины в сутки. Потребление белка с пищей — достаточное.

2. Больной А. потребляет в сутки 105 г полноценного белка. Содержание мочевины в крови 14 ммоль/л, с мочой выводится 8,5 г мочевины в сутки.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 — А, В, Д.

2 — А, Б, Д.

3. Глутамат $\xrightarrow[\text{Б}]{\text{Г}}$ α -иминоглутарат $\xrightarrow{\text{Ж}}$ α -кетоглутарат + З.

Для самостоятельной работы:

1. Глутаминсинтетаза.
2. Глутамат ДГ (НАДФН · Н⁺).
3. Глутаминаза.
4. Аспарагинсинтетаза.
5. Карбамоилфосфатсинтетаза.
2. А — 2, Б — 4, В — 1, Г — 3.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. **Определение содержания мочевины в моче**

С мочой здорового человека выделяется за сутки 20–35 г или 333–583 ммоль мочевины.

Принцип метода. Метод основан на способности мочевины, содержащей аминогруппы, образовывать с *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.

В три пробирки наливают по 0,2 мл соответственно мочи (опытная проба), стандартного раствора мочевины (25 мг/мл) и воды (контроль на реактивы), добавляют в каждую по 1,2 мл 2% раствора парадиметиламинобензальдегида и тщательно перемешивают. Через 15 мин опытную и стандартную пробы фотометрируют в сухих кюветах шириной 3 мм с синим светофильтром против контрольной пробы.

Расчет. Содержание мочевины в опытной пробе рассчитывают по стандартному раствору мочевины по формуле:

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

где $C_{\text{оп}}$ — концентрация мочевины в моче в пробе мг/мл; $C_{\text{ст}}$ — концентрация мочевины в стандартной пробе, 25 мг/мл; $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность пробы; $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандартного раствора мочевины.

Полученную величину умножают на диурез (1200–1500 мл) и получают суточное содержание мочевины в моче. Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) равен 0,0167.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Пониженное содержание мочевины в моче отмечается при нефрите, ацидозе, паренхиматозной желтухе, циррозе печени, уремии, повышенное — при голодании, злокачественной анемии, лихорадке, интенсивном распаде белков в организме, после приема салицилатов, при отравлении фосфором.

Вывод:

Работа 2. *Количественное определение остаточного азота*

Азотсодержащие небелковые вещества составляют фракцию остаточного азота крови (промежуточные или конечные продукты обмена простых и сложных белков). Это мочевина, мочевая кислота, креатин, креатинин, аммиак, индикан, билирубин, полипептиды, аминокислоты и др. Азот этих веществ называют остаточным, поскольку он остается в фильтрате после осаждения белков плазмы крови.

Основной частью остаточного азота крови является азот мочевины — 50%, затем следует азот аминокислот — 25% и азот других азотсодержащих компонентов. В норме остаточный азот крови составляет 14,3–25,0 ммоль/л (20–40 мг%); у новорожденных — 42,84–71,40 ммоль/л (60–100 мг%); на 10–12-й день снижается до уровня, определяемого у взрослых.

Принцип метода. Остаточный азот крови определяют в безбелковом фильтрате после осаждения белков крови различными осадителями (трихлоруксусной кислотой или вольфраматом) с последующей минерализацией безбелкового фильтрата концентрированной серной кислотой. Азот всех исследуемых фракций в виде аммиака связывается с серной кислотой, образуя сульфат аммония, который взаимодействует с реактивом Несслера (щелочной раствор комплексной соли ртути $K_2(HgI_4)$) с образованием соединения желто-оранжевого цвета. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации аммиака, а следовательно, и азота.

Порядок выполнения работы. Готовят три обычные пробирки. В одну из них наливают 1 мл готового минерализата и 9 мл воды (опытная проба), в другую вносят 1 мл стандартного раствора сульфата аммония и 9 мл воды (стандартная проба), а в третью наливают 10 мл воды (контроль). Затем во все пробирки вносят по 0,5 мл реактива Несслера. Фотометрируют опытную (минерализат) и стандартную пробы против контроля при синем светофильтре в кювете толщиной 5 мм.

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

$$C_{оп} = (C_{ст} \cdot E_{оп} / E_{ст}) \cdot 100,$$

где $C_{оп}$ — концентрация остаточного азота в крови, мг%; $C_{ст}$ — концентрация азота в стандартной пробе (0,1 мг в 1 мл); $E_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы (минерализат); $E_{ст}$ — оптическая плотность стандарта (сульфат аммония).

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л) равен 0,714.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Определение остаточного азота и его фракций используется для диагностики нарушения выделительной функции почек и мочевинообразовательной функции печени. Повышение остаточного азота в крови обозначается термином «азотемия». Азотемия может быть двух видов: абсолютной (накопление в крови компонентов остаточного азота) и относительной (дегидратация организма при рвоте или поносе).

Причины абсолютной азотемии могут быть две: ретенционная (почечная) и продукционная (внепочечная). Ретенционная азотемия вызывается задержкой азотистых шлаков при их нормальном образовании и наблюдается при нарушении выделительной способности почек, например при острых и хронических нефритах за счет повышения уровня мочевины в крови. При хронических нефритах стойкая азотемия указывает на развивающуюся недостаточность почек. Продукционная азотемия наблюдается при усиленном распаде белков и преобладании аминокислот, например, при злокачественных новообразованиях. Повышение остаточного азота отмечается при кахексии неракового происхождения, вызванной туберкулезом, диабетом и циррозом печени, при сердечной недостаточности, инфекционных заболеваниях (скарлатине, дифтерии). У недоношенных детей азотемия может быть связана с почечной недостаточностью и усиленным распадом тканевых белков.

Понижение содержания остаточного азота наблюдается при недостаточном питании и иногда при беременности.

Вывод:

Подпись преподавателя:

20. ТЕМА: ХИМИЯ И ОБМЕН НУКЛЕОПРОТЕИНОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ И ОБЩЕГО АЗОТА В МОЧЕ

Актуальность темы

У взрослого здорового человека наблюдается азотистое равновесие. Поступающий с пищей азот в организме не задерживается и выделяется, главным образом, почками в составе многих продуктов (мочевины, аминокислот, мочевой кислоты и др.). Для изучения состояния азотистого обмена в организме пользуются определением общего азота мочи. В диагностике ряда заболеваний применяют методы определения содержания в моче отдельных азотсодержащих соединений. Например, при врожденных нарушениях обмена аминокислот исследуют содержание отдельных аминокислот или продуктов их метаболизма. Количество мочевой кислоты в моче и крови зависит от поступления нуклеопротеинов с пищей и от интенсивности их клеточного метаболизма. Этот показатель — важный критерий в диагностике и контроле лечения подагры.

Знание механизмов распада и синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, регуляции этих процессов позволило разработать и применить лекарственные препараты, влияющие на процессы деления клеток (например, антифолатов в химиотерапии опухолей), и способствует пониманию механизмов действия препаратов, используемых в коррекции гипознергетических состояний организма (ИМФ (рибоксин), оротат калия и др.).

Цель занятия

Получить представление о катаболизме нуклеопротеинов в тканях и желудочно-кишечном тракте, механизмах биосинтеза и распада нуклеотидов и регуляции этих процессов. Познакомиться с примерами использования этих знаний в диагностике и лечении болезней. Для закрепления теоретического материала провести лабораторную работу по количественному определению мочевой кислоты и общего азота в моче.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **общей химии:**

- титрометрические методы анализа;

– **биологии:**

- строение генетического аппарата клетки;

– **биоорганической химии:**

- формулы и свойства гетероциклических соединений (пурины, пиримидины);
- химические свойства и формулы гипоксантина, ксантина, мочевой кислоты;
- свойства солей мочевой кислоты (уратов);
- формулы азотистых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

- | | |
|----------------------|---|
| А. Аденозин. | 1. Пиримидиновый нуклеозид. |
| Б. Гуанин. | 2. Азотистое основание пуринового ряда. |
| В. Цитозин. | 3. Пиримидиновый нуклеотид. |
| Г. Уридинтрифосфат. | 4. Азотистое основание пиримидинового ряда. |
| Д. Тимидин. | 5. Пуриновый нуклеозид. |
| Е. Гуанозиндифосфат. | 6. Пуриновый нуклеотид. |

Задание 2. Назовите нуклеотиды, структура которых схематически изображена ниже:

- 1) аденин – дезоксирибоза – фосфат – фосфат;
- 2) цитозин – рибоза – фосфат;
- 3) гуанин – дезоксирибоза – фосфат – фосфат – фосфат;
- 4) урацил – рибоза – фосфат – фосфат.

Задание 3. Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

- | | |
|--|--|
| А. Первичная структура ДНК. | 1. Модель «двойная спираль». |
| Б. Вторичная структура ДНК. | 2. 3',5'-Фосфодиэфирные связи. |
| В. Для первичной структуры РНК характерны связи. | 3. Последовательность нуклеотидов в полинуклеотидной цепи. |
| Г. Для вторичной структуры ДНК характерны связи. | 4. Водородные связи между азотистыми основаниями. |
| | 5. Силы гидрофобного взаимодействия между выше- и нижележащими азотистыми основаниями. |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Мононуклеотиды, строение, номенклатура, биологическая роль.
2. Первичная, вторичная и третичная структуры нуклеиновых кислот (особенности структуры, разновидности, типы стабилизирующих связей).
3. Обмен нуклеопротеинов. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте (значение, этапы, ферменты). Распад нуклеиновых кислот в тканях, роль лизосомных ферментов.
4. Распад пуриновых нуклеотидов (химизм, мочевая кислота как конечный продукт катаболизма). Представление о нарушениях пуринового обмена (гиперурикемия и подагра, почечно-каменная болезнь).

5. Биосинтез пуриновых нуклеотидов *de novo* (источники азота и углерода пуринового кольца, участие фолиевой кислоты, основные промежуточные продукты, ключевой фермент, регуляция синтеза). Представление о синтезе нуклеотидов из свободных азотистых оснований и нуклеозидов.

6. Распад пиримидиновых нуклеотидов.

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

8. Синтез дезоксирибонуклеозидфосфатов, нуклеозиддифосфатов и нуклеозидтрифосфатов.

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

Литература

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 307–338.

2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 241–262.

3. *Конспект лекций*.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Выберите положения, правильно характеризующие свойства ксантиноксидазы:

А. Ее коферментом является производное витамина РР.

Б. Одним из продуктов реакции является перекись водорода.

В. Фермент катализирует две последовательные необратимые реакции образования мочевой кислоты.

Г. Субстрат фермента — гипоксантин — имеет меньшую растворимость, чем мочевая кислота.

Д. Фермент обладает абсолютной специфичностью к субстрату.

Задание 2. При обследовании больного ревматизмом после интенсивной терапии кортикостероидами установлена гиперурикемия. В результате активации какого метаболического процесса развиваются данные нарушения?

А. Интенсивного распада белков.

Б. Активация глюконеогенеза.

В. Интенсивного распада пуриновых нуклеотидов.

Г. Мобилизации липидов.

Д. Интенсивного распада пиримидиновых нуклеотидов.

Задание 3. Дополнить недостающими компонентами реакции синтеза пуриновых рибонуклеотидов:

1. ФРПФ + ? → 5-фосфорибозиламин. А. Глн.

2. ИМФ + ГТФ + Асп → ? Б. АМФ.

3. Рибозо-5-фосфат + АТФ → ? + АМФ. В. Глу.

4. ИМФ + АТФ + ? → ГМФ. Г. ФРПФ.

Д. АТФ.

Задание 4. Дополнить недостающими компонентами реакции синтеза пиримидиновых нуклеотидов:

1. Карбамоилфосфат + ? → карбамоиласпартат. А. ФРПФ.

2. Оротат + ? → ОМФ + $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Б. Асп.

3. ОМФ → CO_2 + ? В. АТФ.

4. УМФ + ? → УДФ + ? Г. АДФ.

5. УДФ + ? → УТФ + ? Д. УМФ.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. При терапии некоторых форм рака применяются ингибиторы дигидрофолат-редуктазы. Торможение каких реакций определяет цитостатическое действие препарата?

- А. Синтез пиримидиновых нуклеотидов.
- Б. Синтез пуринового ядра нуклеотидов.
- В. Синтез дезоксицитидиловых нуклеотидов.
- Г. Синтез цитидиловых нуклеотидов.
- Д. Синтез дУМФ.

Задание 2. У ребенка с синдромом Леша-Нихана — корковый паралич и гиперурикемия. Количество экскретируемых пуринов увеличено. Дефект какого фермента вызывает данную патологию?

- А. Ксантиноксидазы.
- Б. Аденозиндезаминазы.
- В. Гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы.
- Г. Карбамоилфосфатсинтетазы.
- Д. Тимидилатсинтазы.

Задание 3. Женщине с лимфолейкозом назначен противоопухолевый препарат — ингибитор тиоредоксинредуктазы. На чем основано цитостатическое действие препарата?

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

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1. А – 5, Б – 2, В – 4, Г – 3, Д – 1, Е – 6.
2. 1. Дезоксиаденозиндифосфат.
2. Цитидинмонофосфат.
3. Дезоксигуанозинтрифосфат.
4. Уридиндифосфат.
3. А – 3, Б – 1, В – 2, Г – 4, 5

Для самостоятельной работы:

1. Б, В.
2. В.
3. 3.1 – А; 3.2 – Б; 3.3 – Г; 3.4 – А.
4. 4.1 – Б; 4.2 – А; 4.3 – Д; 4.4 – В, Г; 4.5 – В, Г.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Определение содержания общего азота мочи колориметрическим методом*

Исследование общего азота мочи может быть использовано для исследования состояния азотистого баланса. Количество общего азота, выделяемого за сутки с мочой, у взрослого человека составляет 6–17 г (428–1214 ммоль/сут).

Принцип метода. После сжигания (минерализации) органических веществ мочи с концентрированной серной кислотой азот всех исследуемых фракций в виде аммиака связывается с серной кислотой, образуя сульфат аммония. Колориметрическое определение общего азота основано на том, что сульфат аммония образует с реактивом Несслера соединение жел-

то-оранжевого цвета, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации аммиака, а следовательно, и азота в моче.

Порядок выполнения работы. Готовят три обычные сухие пробирки. В две из них отмеривают соответственно 0,5 мл минерализата (опыт) и 0,5 мл стандартного раствора сульфата аммония (стандарт, содержащий 0,2 мг азота в 1 мл). Прибавляют в каждую пробирку по 6,5 мл воды и тщательно перемешивают. В третью пробирку отмеривают 7 мл воды (контроль) и во все пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Несслера. Содержимое пробирок тщательно перемешивают. *Необходимо строго соблюдать порядок приливания реагентов и тщательно перемешивать жидкость.* Фотометрируют опытную и стандартную пробы против контроля при синем светофильтре в кювете толщиной 5 мм.

Расчет. Содержание азота в опытной пробе рассчитывают по стандартному раствору сульфата аммония по формуле:

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

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.

Ответ:

Содержание общего азота в моче (г/сут) рассчитывают по формуле:

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

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) равен 71,39.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Определение общего азота мочи позволяет судить о белковом обмене в организме, о количестве распавшегося белка. Для этого полученную величину общего азота умножают на 6,25, исходя из того, что в белке в среднем содержится 16% азота ($100 : 16 = 6,25$).

При заболевании почек, вследствие нарушения их выделительной функции содержание общего азота в моче уменьшается. Задержка азота в организме наблюдается при заболеваниях печени и сердечно-сосудистой системы в связи с возникновением отеков, при наличии экссудатов и трансудатов.

Увеличение содержания общего азота в моче отмечается при усиленном распаде белков (отрицательный азотистый баланс), диабете, при рассасывании экссудатов и трансудатов, хроническом отравлении фосфором.

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:

$$\text{Мочевая кислота, мг/сут} = 0,8 \times a \times v / 1,5,$$

где 0,8 мг мочевой кислоты соответствует 1 мл $K_3[Fe(CN)_6]$; a — количество $K_3[Fe(CN)_6]$, пошедшее на титрование, мл; v — суточный диурез, мл; 1,5 — объем пробы, мл.

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) равен 0,0059.

Ответ:

Клинико-диагностическое значение. Гипоурикурия (уменьшение выделения мочевой кислоты с мочой) отмечается при подагре, нефрите, почечной недостаточности; гиперурикурия (увеличение выделения мочевой кислоты с мочой) — при лейкемии, усиленном распаде нуклеопротеинов. У детей выделяется относительно больше мочевой кислоты, чем у взрослых. Выделение мочевой кислоты зависит от содержания пуринов в пище и интенсивности обмена нуклеопротеинов.

При подагре соли мочевой кислоты (ураты) откладываются в хрящах, мышцах и слизистой сумке суставов. Содержание мочевой кислоты в крови может быть повышено, а в моче понижено.

Вывод:

Подпись преподавателя:

21. ТЕМА: МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ (СИНТЕЗ ДНК, РНК, БЕЛКОВ). СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Актуальность темы

Знание строения нуклеиновых кислот позволяет понять механизмы передачи и реализации генетической информации в клетке, овладеть основами понимания причин наследственных заболеваний и разработать методы их лечения. Нуклеотиды выполняют ряд специфических функций. Некоторые из них используются в качестве лекарственных препаратов.

Цель занятия

Усвоить молекулярные механизмы репликации, репарации, транскрипции, трансляции и механизмы их регуляции. Систематизировать эти знания и обсудить возможные механизмы нарушений реализации генетической информации для понимания последствий и подходов к лечению этих нарушений.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **курса биологии:**
 - строение клетки;
 - механизмы митоза и мейоза;
 - биологическая роль нуклеиновых кислот
- **биоорганической химии:**
 - строение мононуклеотидов;
 - общие принципы пространственной организации нуклеиновых кислот;

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

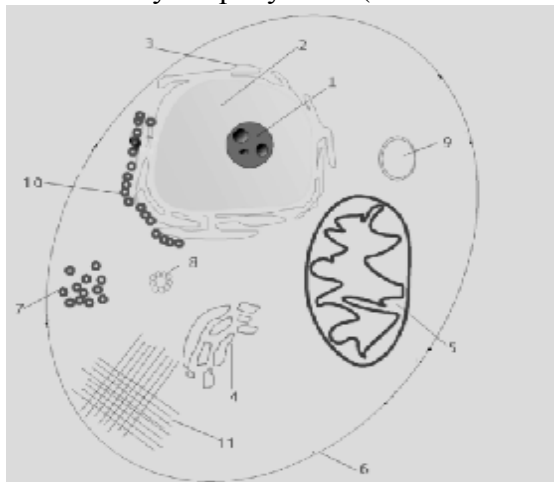
Задание 1. Подберите пары и напишите формулу:

Название	Составные части
А. Гуанозин	1. Рибоза, фосфат, аденин
Б. Адениловая кислота	2. Дезоксирибоза, тимин
В. Уридин	3. Гуанин, рибоза
Г. ДезоксиЦМФ	4. Урацил, рибоза
Д. Тимидин	5. Фосфат, дезоксирибоза, цитозин

Задание 2. Выберите, что относится только к ДНК, только к РНК, к ДНК и РНК:

- | | |
|---|---|
| А. Хранение генетической информации. | Е. Реализация генетической информации. |
| Б. А, Г, Т, Ц. | Ж. Рибоза. |
| В. Цитоплазма. | З. Ядро. |
| Г. 3',5'-фосфодиэфирная связь между мононуклеотидами. | И. А, Г, У, Ц. |
| Д. Дезоксирибоза. | К. Стабильность структуры поддерживается Н-связями. |

Задание 3. Пользуясь рисунком (использовать цифру), подберите пары:



- А. Рибосомы.
- Б. Гладкая эндоплазматическая сеть.
- В. Шероховатая эндоплазматическая сеть.
- Г. Аппарат Гольджи.
- Д. Лизосомы.
- Е. Плазматическая мембрана.
- Ж. Цитоскелет.
- З. Ядро.
- И. Ядрышко.
- К. Митохондрия.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Репликация, биологическая роль, субстраты, ферменты, молекулярный механизм.
2. Репарация ДНК, молекулярный механизм, биологическая роль.
3. Транскрипция, биологическая роль, молекулярный механизм, механизмы регуляции активности генов (схема Жакоба и Моно, схема Георгиева), процессинг РНК. Обратная транскрипция.
4. Генетический код и его свойства.
5. Рекогниция и трансляция как этапы реализации генетической информации в клетке. Компоненты белоксинтезирующей системы. Рекогниция (субклеточная локализация, схема, субстратная специфичность АРСаз). Роль тРНК в синтезе белка.
6. Современное представление о биосинтезе белка. Регуляция биосинтеза белка в клетке на генетическом уровне (роль гистонов, гормонов и жирорастворимых витаминов). Посттрансляционная модификация молекул белка (гидроксилирование, гликозилирование, ограниченный протеолиз, фосфорилирование, карбоксилирование).
7. Современные методы молекулярной биологии (ПЦР, блот-анализ ДНК и РНК (Саузерн-блот и Нозерн-блот), метод «отпечатков пальцев ДНК», клонирование). Принципы проведения, применение в медицине.
8. Метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК (метод Сэнджера).

Литература Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 338–418.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 262–277.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

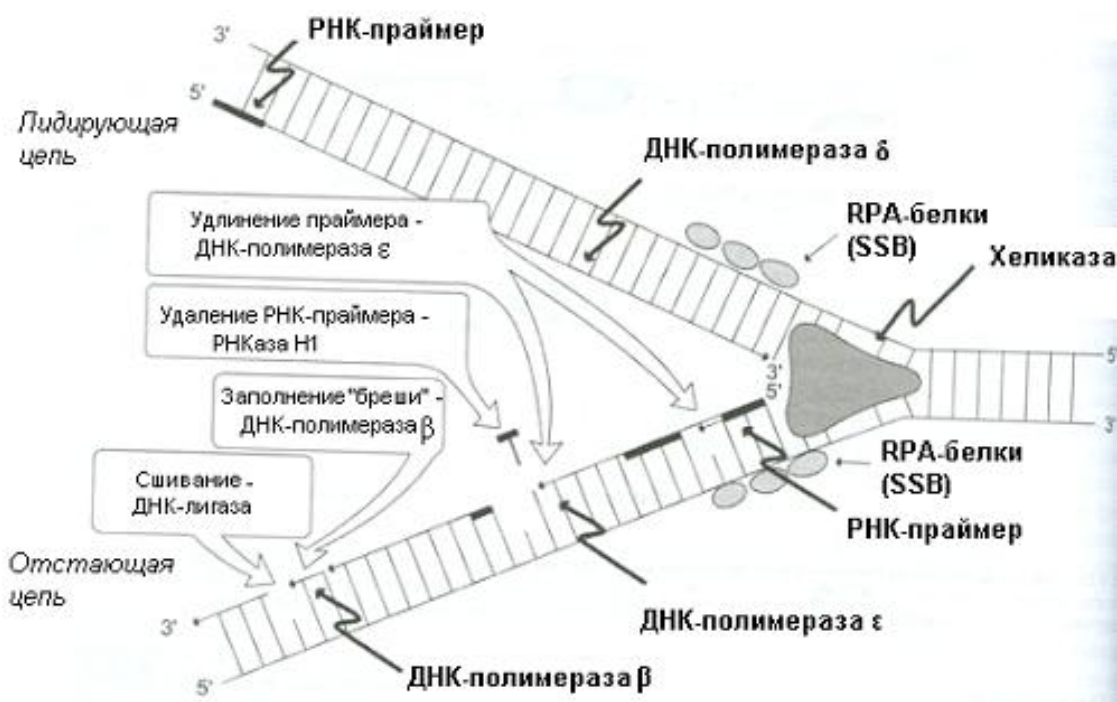
1. *Марри, Р. Биохимия человека* / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.
2. *Нуклеопротеины* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск, 2000.

Задания для самостоятельной работы

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

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

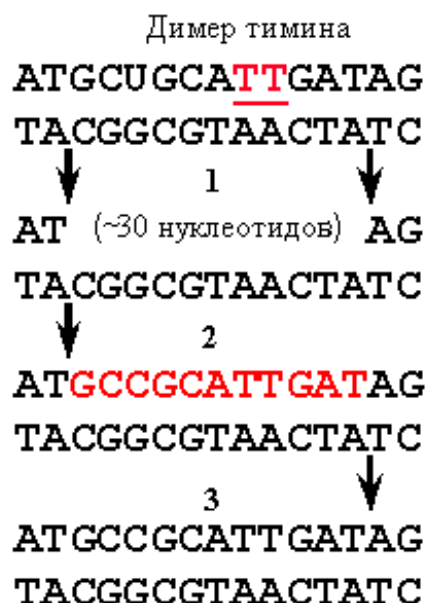
На рисунке показаны основные участники механизма репликации у эукариот:
 1.1. Напишите в общем виде суммарную реакцию, катализируемую ДНК-полимеразой.



Задание 2. Вспомните, что в процессе синтеза и во время хранения молекулы ДНК подвергаются многочисленным физическим, химическим и другого рода воздействиям, которые вызывают нарушения структуры молекул ДНК. Существует многоуровневая система репарации повреждений:

- мутации, которые возникают в процессе репликации. Репарируются (если это возможно) путем повторного считывания последовательности, удаления неправильно вставленного нуклеотида ДНК-полимеразой, обладающей экзонуклеазной активностью;
- мутации, которые не исправлены путем повторного считывания. Репарируются при помощи специальной пострепликативной репарации. Молекула родительской ДНК метилирована по отдельным азотистым основаниям, и вновь синтезируемая цепь также метилируется. Во время метилирования идет проверка правильности расположения мононуклеотидов, и в случае обнаружения мутации включается механизм эксцизионной репарации с последующим метилированием цепи;
- мутации, возникающие спонтанно, в любое время репарируются механизмом эксцизионной репарации.

2.1. На рисунке изображена последовательность событий эксцизионной репарации в случае образования димера тимина в структуре ДНК. Расставьте в последовательности, обозначенной на рисунке, следующие ферменты: А. ДНК-лигаза. Б. Эксцизионная нуклеаза. В. ДНК- β -полимераза.



Задание 3. Вспомните, что среди механизмов узнавания белками (ферментами, факторами регуляции и т. д.) отдельных участков нуклеотидных последовательностей определенную роль играют палиндромные последовательности нуклеотидов (в частности, при

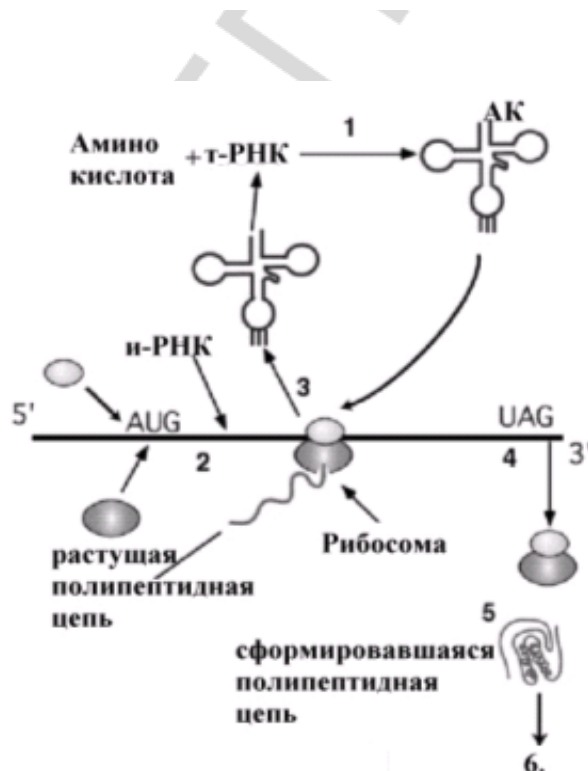
узнавании ДНК- рестриктазами), которые могут формировать крестообразные структуры в молекуле ДНК.

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



Задание 4. Механизмы реализации генетической информации в клетке многоэтапны. На рисунке изображены основные этапы экспрессии генов. Подберите пары (буква – таблица, цифра – рисунок).

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



Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

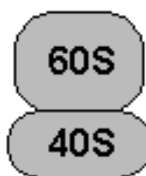
Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Напишите реакцию, катализируемую АРСазой.

Задание 2. Почему 60S+40S=80S, а 50S+30S=70S? Выберите правильный ответ.

1. Скорость седиментации зависит от массы частиц.
2. Скорость седиментации зависит от формы частиц.
3. От того и другого.

28S, 5S и
5.8 S РНК
49 белков



80S

18S РНК
33 белка

23S, 5S РНК
35 белков



70S

16S РНК
21 белок

Задание 3. На рисунке показана схема структуры lac-оперона.



CAP (катаболитами активируемый белок). Этот белок — рецептор цАМФ, уровень которой в клетке определяется уровнем глюкозы (снижение количества глюкозы в питательной среде приводит к повышению уровня цАМФ в клетке). CAP, связанный с цАМФ, присоединяется к ДНК и стимулирует РНК-полимеразу, при этом ее активность увеличивается в 20–50 раз.

Репрессор связан с опероном в отсутствие лактозы.

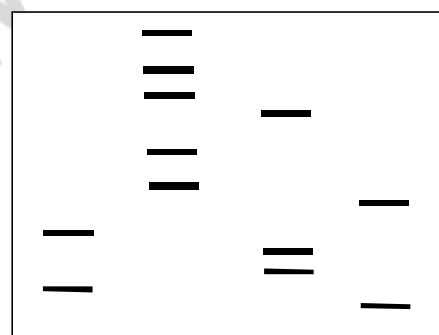
А. Дополните строку:

промотор – место связывания _____;

оператор – место связывания _____.

Б. Изобразите схематически, используя предлагаемые выше формы для участников, их расположение на опероне при следующих 4-х состояниях. В каком из них будут синтезированы белки, кодируемые опероном?

Г А Т Ц



Компонент среды	1	2	3	4
Лактоза	+	-	-	+
Глюкоза	+	+	-	-

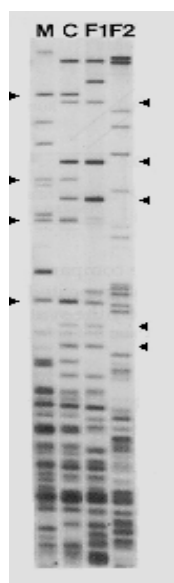
Задание 4. На рисунке справа приводятся результаты электрофореза фрагментов участка молекулы ДНК (метод Сэнджера). Попытайтесь выяснить на основании этих результатов нуклеотидную последовательность анализируемого участка ДНК. Какая аминокислотная последовательность закодирована в этом участке? Буквы в скобках обозначают соответствующие дидезоксинуклеотиды, вносимые в реакционную среду ДНК-полимеразной реакции. Таблицу генетического кода смотрите в учебнике.

Для ответа на вопросы заданий 5-6 рассмотрите электрофореграммы, представленные на рисунке ниже.

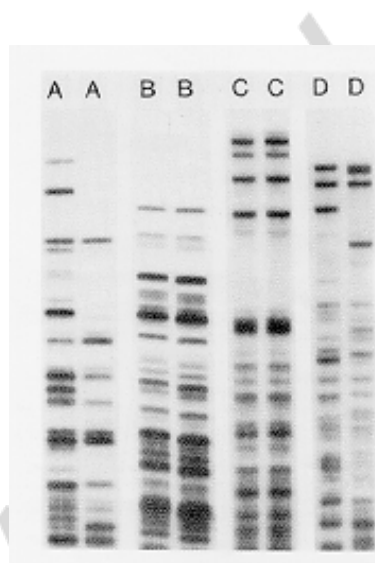
Задание 5. На электрофореграмме А (слева) «отпечатки пальцев» ДНК матери (М), ребенка (С) и двух предполагаемых отцов (F1, F2). Указатели на левой стороне указывают полосы ДНК, общие между ребенком и матерью. Указатели на правой стороне указывают полосы ДНК, общие между ребенком и предполагаемыми отцами. Ваше мнение о предполагаемом отце.

Задание 6. Электрофореграмма Б (справа) показывает результаты исследования полиморфизма длины фрагментов рестрикции 4-х пар близнецов. Ваше мнение об идентичности близнецов.

А



Б



Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1. А – 3, Б – 1, В – 4, Г – 5, Д – 2.
2. ДНК – А, Б, Д. РНК – В, Е, Ж, И. ДНК и РНК – Г, К, З.
3. А – 7; Б – 3; В – 10; Г – 4; Д – 9; Е – 6; Ж – 11, З – 2; И – 1; К – 5.

Для самостоятельной работы:

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

Лабораторная работа (30 минут)

Инструкция к практическому занятию

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% раствора едкого натра, затем 2 капли 1% раствора сульфата меди. Отмечают появление розово-фиолетовой окраски.

Вывод:

Работа 2. **Серебряная проба на пуриновые основания.** К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель концентрированного раствора аммиака, затем добавляют 10 капель 2% 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).

Вывод:

Работа 3. **Качественная реакция на пентозу (Молиша).** К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 3 капли 1% спиртового раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно приливают 20-30 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется продукт конденсации красного цвета.

Вывод:

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.

Вывод:

Подпись преподавателя:

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

1. Азотистый баланс, его состояние в норме и при патологии. Что характеризует коэффициент изнашивания?

2. Биологическая ценность белков. Нормы белка в питании.

3. Гидролиз белков (протеолиз). Классификация и свойства протеаз.

4. Переваривание белков. Характеристика протеаз желудочно-кишечного тракта (оптимум pH, механизмы активации, субстратная специфичность, эндо- и экзопептидазы). Роль HCl в переваривании белков. Кислотность желудочного сока — принцип определения, содержание в норме.

5. Гниение белков. Знать схематически происхождение фенола, крезола, скатола, индола, кадаверина, путресцина. Механизмы обезвреживания продуктов гниения белков и других ксенобиотиков.

6. Аминокислотный фонд клетки, его пополнение и использование.

7. Переаминирование. Роль витамина B₆. Уметь писать реакции переаминирования с участием аланиновой и аспарагиновой трансаминаз. Знать их диагностическое значение.

8. Виды дезаминирования. Глутаматдегидрогеназная реакция — химизм, коферменты, значение. Непрямое дезаминирование.

9. Пути использования безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты.

10. Пути обезвреживания аммиака. Уметь написать реакции синтеза и распада аспарагина, глутамина, восстановительного аминирования α -кетоглутарата, схему синтеза мочевины. Остаточный азот. Значение определения мочевины и остаточного азота в клинике.

11. Реакции декарбоксилирования аминокислот, биогенные амины. Уметь писать реакции синтеза триптамина, серотонина, гистамина, γ -аминомасляной кислоты, знать их роль в организме.

12. Синтез катехоламинов. Функции дофамина, норадреналина и адреналина в организме. Наследственные нарушения обмена фенилаланина и тирозина. Роль дофамина при болезни Паркинсона.

13. Нуклеотиды — их строение и функции. Знать номенклатуру и уметь писать формулы азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов; изображать образование 3'-5'-фосфо-диэфирной связи между нуклеотидами.

14. Особенности строения ДНК и РНК на уровне первичной, вторичной и третичной структуры (строение нуклеосом).

15. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте.

16. Пути реутилизации азотистых оснований и нуклеозидов в клетке.

17. Конечные продукты распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Реакции образования мочевой кислоты. Гиперурикемия — ее причины и последствия.

18. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов *de novo*: субстраты, ключевые ферменты, основные промежуточные продукты. Регуляция синтеза. Роль витаминов.

19. Применение в медицине синтетических структурных аналогов нуклеозидов и фолиевой кислоты.

20. Образование дезоксирибонуклеотидов для синтеза ДНК (схема).

21. Репликация. Субстраты, ферменты, механизм. Механизмы репарации ДНК, роль этого процесса.

22. Транскрипция. Ферменты, субстраты, механизм, регуляция. Обратная транскрипция.

23. Генетический код и его характеристика.

24. Рекогниция и собственно трансляция как этапы биосинтеза белка в клетке (роль т-РНК, АРСазы, строение рибосом и общие принципы механизма трансляции, источники энергии для биосинтеза белка, регуляция).

25. Виды посттрансляционной модификации белков.

26. Современные методы молекулярной биологии (ЦПР, блот-анализ ДНК и РНК (Саузерн-блот и Нозерн-блот), метод «отпечатков пальцев ДНК», клонирование). Принципы проведения, применение в медицине.

27. Метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК (метод Сэнджера).

Пример задачи и вопросов на метод Сэнджера

На рисунке приводятся результаты исследования нуклеотидной последовательности участка молекулы ДНК (метод Сэнджера).

На чем основан этот метод?

Что нужно сделать, чтобы получить такую картину (поэтапно)?

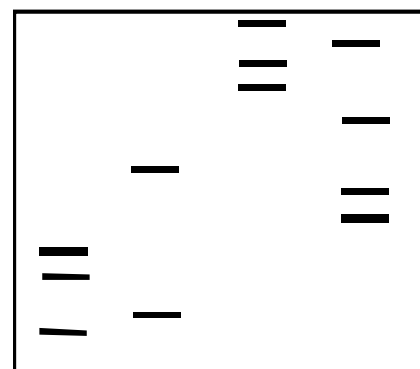
В чем проводили электрофорез, по какому принципу произошло разделение фрагментов?

Что обозначают буквы в скобках и черточки на рисунке?

Какую роль выполняют дидезоксинуклеотиды в этом методе?

В каком направлении следует «читать» полученную электрофореграмму и почему?

Г А Т Ц



Установите, в какой последовательности ДНК-полимераза включала нуклеотиды в синтезируемую цепь.

Что нужно сделать, чтобы расшифровать полученную картину и узнать последовательность нуклеотидов в анализируемом участке ДНК?

Какая аминокислотная последовательность закодирована в этом участке? (таблица генетического кода будет в Вашем распоряжении).

23. ТЕМА: ГОРМОНЫ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГОРМОНЫ

Актуальность темы

Гормоны — класс биологически активных регуляторных химических соединений, синтезируемых железами внутренней секреции и/или специальными клетками. Значение гормональной продукции заключается в том, что секретируемые гормоны осуществляют регуляцию метаболизма отдельных органов и тканей, определяют состояние физиологических процессов и жизнедеятельности организма в целом. Нарушение синтеза, секреции, транспорта и рецепции гормонов клетками лежит в основе многообразных эндокринных расстройств. В связи с этим понимание механизма эндокринных нарушений чрезвычайно важно для диагностики и целенаправленной терапии эндокринных заболеваний.

Цель занятия

Научиться применять знание классификации гормонов, типов гормональных рецепторов, G-белков и последующего каскада внутриклеточных передатчиков для понимания особенностей механизма действия гормонов на клетки. Уметь применять знания о механизме действия индивидуальных гормонов для объяснения расстройств метаболизма при нарушении образования или гиперпродукции гормонов в организме.

Рекомендуемые темы для реферативных докладов

- Механизм действия стероидных гормонов: внутриклеточная рецепция, взаимодействие с геномом клетки, активация синтеза ферментов.
- Типы гормональных рецепторов. Механизм рецепции гормонов 1-TMS и 7-TMS рецепторами. Проявления наследственного дефекта рецепторов.
- Молекулярный механизм действия инсулина и сахарный диабет.
- Молекулярный механизм действия тиреоидных гормонов. Зоб, микседема и базедова болезнь.
- Применение анаболических гормонов в спортивной медицине.
- Эндокринная функция эпифиза.
- Оксид азота: происхождение, регуляторное действие в организме, использование в лекарственной терапии.
- Факторы роста, их рецепторы, механизм действия. Значение в межклеточном взаимодействии.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **анатомии человека:**

- анатомию желез внутренней секреции;

– **гистологии:**

- гистологическое строение желез внутренней секреции и гормоны, синтезируемые ими;
- АПУД-систему;
- типы гормональной секреции: эндокринную, нейроэндокринную, пара- и аутокринную;

– **биоорганической химии:**

- строение и свойства пептидов и белков;
- холестерол и стероиды — строение и свойства.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подобрать соответствующие пары гормон – источник гормона:

- | | |
|--|------------------------|
| А. α -Клетки островков Лангерганса. | 1. Глюкагон. |
| Б. β -Клетки островков Лангерганса. | 2. Минералокортикоиды. |
| В. С-Клетки щитовидной железы. | 3. Глюкокортикоиды. |
| Г. Фолликулярные клетки щитовидной железы. | 4. Инсулин. |
| Д. Сетчатая зона коры надпочечников. | 5. Половые гормоны. |
| Е. Пучковая зона коры надпочечников. | 6. Тиреокальцитонин. |
| Ж. Клубочковая зона коры надпочечников. | 7. Тироксин. |

Задание 2. Выбрать правильный ответ: эндокринная секреция — это:

- А. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в окружающую среду и действует на рядом расположенные клетки.
- Б. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в окружающую среду и действует на клетку, в которой он был синтезирован.
- В. Нейромедиатор, синтезируемый нервными клетками.
- Г. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в кровь и действует на отдаленные от места синтеза клетки.

Задание 3. Какие гормоны секретируются эпифизом?

- | | | |
|---------------|---------------|------------------------------------|
| А. Окситоцин. | Б. Либерины. | В. Статины. |
| Г. Серотонин. | Д. Мелатонин. | Е. Меланоцитостимулирующий гормон. |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Номенклатура и классификация гормонов по месту синтеза, химической структуре.
2. Особенности синтеза гормонов белково-пептидной природы, стероидной природы, производных липидов.
3. Особенности биологического действия гормонов. Транспорт кровью.
4. Понятие «рецептор гормона». Классификация рецепторов: внутриклеточные рецепторы (ядерные и цитозольные), рецепторы цитоплазматической мембраны (лиганд-зависимые и потенциал-зависимые каналообразующие рецепторы, строение 1-TMS и 7-TMS-рецепторов).
5. Механизм действия гормонов: стероидной, аминокислотной и белково-пептидной природы.
6. Классификация G-белков и механизм их функционирования. Патология этих белков.
7. Понятие о вторичных посредниках действия гормонов (циклические нуклеотиды, ИТФ, Ca^{2+} , диацилглицерол).
8. Растворимая и мембраносвязанная гуанилатциклазы. Оксид азота.
9. Аденилатциклаза и фосфолипаза С. Их роль в клетке.
10. Роль протеинкиназ в клетке.

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 427–454.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 278–294.
3. *Конспект лекций.*

Дополнительная

1. Строев, Е. А. Биологическая химия / Е. А. Строев. М. : Высшая школа, 1986. С. 370–412.
2. Маршалл, В. Клиническая биохимия / В. Маршалл. СПб., 2002. 380 с.
3. Руководство по клинической эндокринологии / под ред. Н. Т. Старковой. СПб., 1996. С. 7–10, 201–279, 296–376.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Вспомните, какие гормоны связываются с внутриклеточными рецепторами, а какие — с рецепторами плазматической мембраны. Обратите внимание, что при патологии рецепторов ткани-мишени теряется чувствительность к гормону (гормон не вызовет соответствующего метаболического ответа).

1.1. В клинику поступил больной в состоянии гипергликемической комы. Введение инсулина не нормализовало концентрацию глюкозы крови. Какую причину гипергликемии можно предположить у больного?

- А. Аномалия клеточных рецепторов.
- Б. Гиперфункция гормонов коры надпочечников.
- В. Истинная гипоинсулинемия.
- Г. Опухоль базофильных клеток гипофиза.
- Д. Опухоль мозгового слоя надпочечников

1.2. У лабораторных животных, подвергшихся действию мутагенного вещества, обнаружили в тканях измененную аденилатциклазу. К какому гормону будут нечувствительны органы-мишени у этих животных?

- А. Эстрадиолу.
- Б. Тироксину.
- В. Глюкагону.
- Г. Прогестерону.
- Д. Альдостерону.

Задание 2. Вспомните химическую природу гормонов.

2.1. Студенту предложили смоделировать биосинтез адреналина, используя в качестве источника ферментов гомогенат мозгового слоя надпочечников, а в качестве субстрата — одно из ниженазванных веществ. Студент не справился с заданием, так как использовал для синтеза:

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

2.2. У больных с опухолью клубочковой зоны надпочечника в три раза увеличивается биосинтез кортизола и кортикостерона и в 70 раз возрастает биосинтез альдостерона. Укажите метаболит, использование которого резко увеличивается:

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

2.3. Какой из нижеперечисленных гормонов не является гликопротеином?

- А. Соматотропин.
- Б. Тиреотропин.
- В. Лютеинизирующий гормон.
- Г. Фолликулостимулирующий гормон.

Задание 3. Вторичными посредниками действия гормонов на клетку являются циклические нуклеотиды, ИТФ, Ca^{2+} , диацилглицерол. Запомните, что цАМФ по некоторым своим эффектам на метаболизм клетки является антагонистом цГМФ.

3.1. Больному в течение недели вводили препарат теофиллин — ингибитор фосфодиэстеразы цАМФ. Активность какого гормона может усилиться на фоне такого лечения?

- А. Адреналин.
- Б. Дезоксикортикостерон.
- В. Альдостерон.
- Г. Кортизол.
- Д. Эстрадиол.

3.2. У больного диагностирована опухоль мозгового слоя надпочечников — феохромоцитома. Какой посредник гормонального сигнала активно участвует в действии на ферменты при этом заболевании?

- А. цАМФ. Б. Простагландины. В. цГМФ.
Г. Са-кальмодулин. Д. цГМФ.

3.3. Больной поступил в клинику с гипергликемией в результате развития опухоли, продуцирующей адреналин. С помощью введения каких веществ можно уменьшить интенсивность действия адреналина на органы-мишени?

- А. Активаторы фосфодиэстеразы. Б. цАМФ. В. Простагландины.
Г. цГМФ. Д. Ингибиторы кальциевых каналов.

3.4. Какое из названных соединений не является вторичным посредником в действии гормонов?

- А. Диацилглицерол. Б. цАМФ. В. цГМФ.
Г. Са²⁺. Д. ГМФ.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Внутрядерные рецепторы обнаружены для:

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

Задание 2. При обследовании представителей африканского племени пигмеев обнаружили нарушение синтеза в печени белка — соматомедина С. В реализации биологического действия какого гормона участвует этот белок?

- А. Соматотропина. Б. Пролактина. В. Соматолиберина.
Г. Соматостатина. Д. Лютропина.

Задание 3. Фосфолипаза, расщепляющая фосфатидилинозитол на диацилглицерол и ИТФ, это:

- А. Фосфолипаза А₁. Б. Фосфолипаза А₂. В. Фосфолипаза С. Г. Фосфолипаза Д.

Задание 4. Какой из нижеперечисленных гормонов не является стероидом?

- А. Кортизол. Б. Альдостерон. В. Прогестерон.
Г. Лактогенный гормон. Д. Дигидроксихолекальциферол.

Задание 5. Какой из нижеперечисленных гормонов не является пептидом?

- А. Окситоцин. Б. Трийодтиронин. В. Глюкагон.
Г. Вазопрессин. Д. Тиреолиберин.

Задание 6. G_s-белки стимулируют активность аденилатциклазы. Однако с течением времени этот эффект исчезает. Это обусловлено:

- А. АТФ-азной активностью α-субъединицы.
Б. АТФ-азной активностью γ-субъединицы.
В. Фосфодиэстеразной активностью G_s-белка.
Г. Фосфолипазной активностью G_s-белка.
Д. ГТФ-азной активностью α-субъединицы.
Е. АТФ-азной активностью γ-субъединицы.

Задание 7. Фосфорилироваться в рецепторах гормонов могут аминокислоты, содержащие ОН-группы. Назовите киназу, которой не существует:

- А. Тирозинкиназа. Б. Рецептор инсулина.
В. Серин-треонинкиназа. Г. Тир/сер/тре-киназа.
Д. Рецептор соматотропина. Е. Тир/вал-киназа.

Задание 8. Выберите вторичный посредник действия окситоцина.

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

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

- 1.1. – А; 1.2 – В.
2.1. – Г; 2.2 – Д; 2.3 – А.
3.1. – А; 3.2 – А; 3.3 – А, Г; 3.4 – Д.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Качественные реакции на гормоны

Гормоны щитовидной железы

Щитовидная железа синтезирует и секретирует высокоактивные йодсодержащие тиреоидные гормоны: тироксин (Т₄) и 3,5,3'-трийодтиронин (Т₃), а также нейодированный гормон (полипептид) тиреокальцитонин, функция которого связана с регуляцией уровня кальция и фосфора в крови.

Работа 1. Качественная реакция на тироксин

Принцип метода. При разрушении тиреоидина образуется йодид калия, из которого йод легко вытесняется йодатом калия. Вытеснение йода из соли йодистоводородной кислоты является окислительно-восстановительной реакцией, где йодид калия служит восстановителем, а йодат калия (остаток йодноватой кислоты) — окислителем. Выделившийся йод обнаруживают с помощью крахмала (синее окрашивание) в кислой среде.

Ход работы. В пробирку наливают 24 капли гидролизата тиреоидина, прибавляют 3 капли 1% раствора крахмала, 1 каплю фенолфталеина, а затем 4 капли йодата калия и приблизительно 10–15 капель 10% раствора серной кислоты до обесцвечивания и появления синего окрашивания.

Гормоны поджелудочной железы

В поджелудочной железе вырабатывается ряд гормонов: инсулин, глюкагон и липокаин. Инсулин вырабатывается в β-клетках островков Лангерганса (от лат. insula — остров), откуда и получил свое название. Инсулин — белок, состоящий из двух полипептидных цепей, соединенных друг с другом дисульфидными связями.

Первичная структура инсулина полностью расшифрована и осуществлен химический синтез инсулина. Органы мишени для инсулина: печень, мышечная ткань, жировая ткань. Действие инсулина многообразно. Инсулин играет важную роль в метаболизме углеводов. Он снижает содержание глюкозы в крови, увеличивает биосинтез гликогена в печени и мышцах, усиливает липогенез, т. е. образование жиров из углеводов, стимулирует синтез белков. Инсулин является антагонистом адреналина в регуляции синтеза и мобилизации гликогена.

Работа 2. Цветные реакции на инсулин

Инсулин дает характерные реакции на белок: биуретовую, Фоля, Миллона и др.

Биуретовая реакция

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора инсулина прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натра, 2 капли 1% раствора сульфата меди и все перемешивают; содержимое пробирки приобретает фиолетовое окрашивание.

Нингидриновая реакция

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора инсулина добавляют 5 капель 0,5% водного раствора нингидрина и кипятят 1–2 мин. В пробирке появляется розово-фиолетовое окрашивание, а с течением времени раствор синее.

Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель 1% раствора инсулина, затем добавляют 3 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. В пробирке появляется осадок желтого цвета.

Реакция на тирозин (Миллона)

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель 1% раствора инсулина, добавляют 3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. В пробирке появляется осадок темно-красного цвета.

Реакция на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (Фоля)

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель 1% раствора инсулина и добавляют 5 капель реактива Фоля, интенсивно кипятят и дают постоять 1–2 мин. При этом появляется черный или бурый осадок сульфида свинца.

Гормоны мозгового слоя надпочечников

В мозговом слое надпочечников из аминокислоты тирозина синтезируются катехоламины, имеющие пирокатехиновое ядро и аминогруппу.

Работа 3. Качественные реакции на адреналин

Реакция с хлорным железом

Принцип метода. Адреналин обладает слабощелочной реакцией, легко окисляется на воздухе с образованием адренохрома, вследствие чего раствор окрашивается в красный цвет. При взаимодействии с нитритом наблюдается желто-оранжевое окрашивание, с диазореактивом — красное и с хлорным железом — зеленое. Реакция с хлорным железом характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина и норадреналина.

Ход работы. В пробирку наливают 10 капель раствора адреналина и добавляют 1 каплю хлорного железа. Появляется зеленое окрашивание вследствие присутствия пирокатехина в молекуле адреналина. Добавляют 3 капли 10% раствора едкого натра и наблюдают изменение окрашивания (на вишнево-красное).

Диазореакция

Принцип метода. При взаимодействия диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

Ход работы. К 6 каплям 0,5% раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 6 капель 0,5% раствора нитрита натрия (смесь диазореактива), 10 капель раствора адреналина и 3 капли 10% раствора едкого натра. Жидкость окрашивается в красный цвет.

Работа 4. Флюоресценция продуктов окисления адреналина

Принцип метода. Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, при добавлении щелочи дает флюоресцирующие продукты.

Ход работы. К 10 каплям воды приливают 6 капель 10% раствора едкого натра и 6 капель раствора адреналина. Поместив пробирку перед включенным флюороскопом, наблюдают зеленую флюоресценцию продуктов окисления адреналина.

Гормоны половых желез

Половые гормоны синтезируются в семенниках, яичниках, плаценте и надпочечниках.

Женские половые гормоны — эстрогены — можно рассматривать как производные эстрона (углеводорода с 18 атомами углерода). Основными природными эстрогенами являются эстрадиол, эстрон и гормон желтого цвета — прогестерон.

Мужские половые гормоны — андрогены — можно рассматривать как производные андростана (углеводорода с 19 атомами углерода). К мужским половым гормонам относятся тестостерон и андростерон.

Работа 5. Качественные реакции на фолликулин

Принцип метода. Качественная реакция на фолликулин (эстрон) проводится с концентрированной серной кислотой и обусловлена образованием эфирного соединения соломенно-желтого цвета с зеленой флюоресценцией.

Ход работы. С масляным раствором фолликулина реакцию проводят при комнатной температуре. К 2 каплям масляного раствора фолликулина приливают 30 капель концентрированной серной кислоты. Постепенно развивается соломенно-желтое окрашивание.

Вывод:

Подпись преподавателя:

24. ТЕМА: БИОХИМИЯ ГОРМОНОВ. ТЕСТ НА ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ГЛЮКОЗЕ

Актуальность темы

Механизм действия индивидуальных гормонов необходимо знать не только эндокринологу, но и врачу 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 нагрузки глюкозой 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 гликемической кривой.

Требования к исходному уровню знаний

Требования те же, что и к предыдущему занятию. Дополнительно нужно вспомнить из курса биорганической химии о том, что глюкоза (благодаря наличию в ее формуле альдегидной группы) обладает редуцирующими свойствами. На этом основаны методы ее определения в биологических жидкостях.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:

Задание 1. Какой из этих углеводов даст реакцию Троммера?

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

Правильность решения проверьте, сопоставив его с эталоном ответа.

Вопросы для обсуждения

1. Гормоны гипоталамуса: химическое строение, тип рецептора в клетках-мишенях, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, ответ клеток гипофиза на действие либеринов и статинов гипоталамуса.

2. Гормоны аденогипофиза: химическое строение, типы рецепторов в тканях-мишенях, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, реализация эффекта гормонов на уровне тканей-мишеней. Роль избыточной и недостаточной секреции гормонов.

3. Гормоны нейрогипофиза: химическое строение, тип рецептора в ткани-мишени, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, реализация эффекта окситоцина и вазопрессина на уровне тканей-мишеней. Роль избыточной и недостаточной секреции гормонов.

4. 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.

5. Гормоны коры надпочечников: химическое строение, предшественник синтеза, тип рецептора в ткани-мишени, реализация эффекта глюкокортикоидов и минералокортикоидов на уровне клетки. Синдром Кушинга. «Бронзовая болезнь». Несахарный диабет.

6. Половые гормоны: химическое строение, предшественник синтеза, реализация эффекта эстрогенов, прогестерона и мужских половых гормонов на уровне клетки. Избыточная и недостаточная секреция половых гормонов.

7. 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 гликемических кривых.

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бинوم ; Минск : Асар, 2008. С. 454–514.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 294–320.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

1. *Строев, Е. А.* Биологическая химия / Е. А. Строев. М. : Выш. шк., 1986. С. 370–412.
2. *Маршалл, В.* Клиническая биохимия / В. Маршалл. СПб., 2002. 380 с.
3. *Руководство по клинической эндокринологии* / под ред. Н. Т. Старковой. СПб., 1996. С. 15–486.
4. *Charles, G. D. Brook.* Essential Endocrinology / Charles G. D. Brook, Nicholas J. Marshall. 2001, Blackwell Science (Oxford). P. 1–164.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Обратите внимание на то, что полиурия отмечается не только при сахарном диабете (Diabetes mellitus), но и при несахарном диабете (Diabetes insipidus), а также при почечном диабете (при поражении почек). Различить причину полиурии помогает определение удельного веса мочи и данные определения уровня гликемии. Не забывайте, что часто диабет носит скрытый характер и выявить заболевание можно на основании результатов нагрузки глюкозой.

1.1. При обследовании больного на толерантность к глюкозе определен натощак уровень глюкозы в крови 7,0 ммоль/л, через 2 часа после нагрузки глюкозой — 10 ммоль/л. Для какого нарушения регуляции углеводного обмена характерны эти показатели?

- А. Сахарный диабет. Б. Скрытая форма сахарного диабета.
В. Гиперинсулинизм. Г. Болезнь Аддисона. Д. Микседема.

1.2. В клинику поступил ребенок с жалобами на усиленную жажду, частое мочеиспускание. Клинический анализ крови и общий анализ мочи патологических компонентов не обнаружили. Что можно применить для лечения ребенка?

- А. Вазопрессин. Б. Окситоцин. В. Альдостерон.
Г. Тиреоидин. Д. Кортикостерон.

1.3. В эндокринологическое отделение поступила больная с жалобами на жажду, частое мочеиспускание, выраженную сухость кожных покровов. При анализе мочи качественной патологии не выявлено, плотность мочи 1,009. Для какого нарушения гормональной регуляции это характерно?

- А. Несахарный диабет. Б. Стероидный диабет. В. Инсулярный диабет.
Г. Тиреотоксикоз. Д. Микседема.

1.4. При лабораторном анализе у больного выявлен гипергликемический тип гликемической кривой. При каком заболевании, помимо сахарного диабета, это может быть?

- А. Тиреотоксикозе. Б. Болезни Аддисона. В. Инсулиноме.
Г. Несахарном диабете. Д. Гипотиреозе.

1.5. В клинической лаборатории при анализе мочи в одной из проб определили низкий удельный вес. Какие изменения должны сопутствовать этому показателю?

- А. Креатинурия. Б. Глюкозурия. В. Кетонурия. Г. Протеинурия. Д. Полиурия.

1.6. У больного при анализе мочи определили низкий удельный вес. Уровень какого гормона в крови нужно определить у больного для уточнения нарушения?

- А. Инсулина. Б. Вазопрессина. В. Кортизола.
Г. Альдостерона. Д. Тиреокальцитонина.

1.7. При профосмотре у женщины выявлена скрытая форма диабета. Лабораторные анализы позволили врачу назначить диетотерапию со сниженным количеством углеводов и увеличение липотропных веществ. Какой основной метаболический эффект достигается такой диетой?

- А. Повышение использования глюкозы на синтез жира в жировой ткани.
Б. Снижение окисления жирных кислот в печени.
В. Повышение использования глюкозы на синтез жира в печени.
Г. Увеличение синтеза фосфолипидов и уменьшение отложения нейтрального жира в печени.
Д. Снижение синтеза фосфолипидов.

Задание 2. Инсулин и глюкагон — антагонисты. Вспомните механизм действия этих гормонов на углеводный и липидный обмены.

2.1. Пациент при лечении голоданием потерял 10 кг веса. Активация какого гормона привела к увеличению скорости катаболизма жиров при голодании?

- А. Инсулин. Б. Соматостатин. В. Глюкагон. Г. Альдостерон. Д. Окситоцин.

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

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

2.3. В клинику поступил больной без сознания. В выдыхаемом воздухе был запах ацетона, упругость тканей снижена (обезвоживание). Какой биохимический анализ будет вписываться в клиническую картину заболевания?

- А. Гипергаммаглобулинемия. Б. Снижение содержания $NH_2-CO-NH_2$ в крови.
В. Наличие в моче $CH_3-CH(OH)-CH_2-COOH$. Г. Снижение удельного веса мочи.
Д. Снижение содержания аминокислот в крови.

2.4. Вполне благополучный новорожденный, оставленный без кормления на длительный период, умер. Анализ взятого биопсией тканевого материала выявил отсутствие в печени фосфоенолпируваткарбоксихиназы. Какой гормон индуцирует синтез этого фермента?

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

2.5. Подростку, длительно страдающему гипогликемией, ввели глюкагон и не получили ответной реакции на гормон. Исследование ткани печени, взятой при биопсии, выявило дефект фермента. Назовите этот фермент:

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

2.6. У ребенка 2-го года жизни, страдающего мышечной слабостью, обнаружили увеличенную печень и низкий уровень глюкозы в крови натощак. После введения глюкагона гипергликемия не возникает. Исследование ткани печени, взятой при биопсии, выявило дефект фермента. Назовите этот фермент:

А. α -Амилаза. Б. Лактатдегидрогеназа. В. Гликогенфосфорилаза.
Г. Гексокиназа. Д. Фруктокиназа.

Задание 3. Вспомните механизм действия гормонов коры надпочечников.

3.1. Девушка обратилась к врачу с жалобами на резкую мышечную слабость, головокружение, усиление пигментации кожи, потерю веса, сухость кожи, повышенный диурез. При обследовании установили сниженное артериальное давление, концентрация глюкозы крови 3,0 ммоль/л, повышенное выделение натрия с мочой. Назначение какого препарата может улучшить состояние больной?

А. Инсулин. Б. Глюкагон. В. Тироксин. Г. Альдостерон.
Д. Питуитрин (вытяжка из задней доли гипофиза).

3.2. Больной обратился с жалобами на общую утомляемость, головную боль, боль в спине и конечностях, исхудание конечностей и увеличение жировых отложений в области спины и шеи, постоянную жажду. При осмотре врач заподозрил синдром Иценко-Кушинга. Изменение уровня какого гормона в крови подтверждает предположение врача?

А. Тироксина. Б. Кортизола. В. Альдостерона. Г. Прогестерона.

Задание 4. При заболевании сахарным диабетом нарушается усвоение глюкозы тканями и усиливается распад липидов. В результате дефицита ЦТК нарушается функционирование ЦТК и избыток молекул ацетил-КоА используется на синтез ацетоновых тел.

4.1. В клинику доставлена больная с сахарным диабетом в прекоматозном состоянии кетоацидотического типа. Увеличение содержания какого метаболита к этому привело?

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Молодой пациент, страдающий инсулинзависимым диабетом, соблюдал рекомендации врача. Больной хорошо себя чувствовал. Однако при определении уровня глюкозы в крови у него была обнаружена выраженная гипергликемия (15 ммоль/л). Содержание гликозилированного гемоглобина HbA_{1c} составило 6,5%. Насколько компенсировано заболевание?

Комментарии. Несмотря на высокий уровень глюкозы содержание HbA_{1c} у больного было нормальным, т. е. за прошедшие несколько недель лечение диабета было эффективным. Наличие гипергликемии, как удалось выяснить при более подробном анамнезе, объяснялось обильным застольем накануне.

Задание 2. При анализе мочи у больного обнаружена выраженная глюкозурия. Вспомните, чему равен почечный порог для глюкозы. Укажите уровень гликемии, при котором глюкоза будет экскретироваться в мочу:

А. 6 ммоль/л. Б. 10 ммоль/л. В. 15 ммоль/л. Г. 40 ммоль/л.

Задание 3. Выберите причину, по которой глюкозурия может отмечаться у больного с нормогликемией:

А. Стресс. Б. Голод. В. Заболевания почек. Г. Тиреотоксикоз.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – Г.

Для самостоятельной работы:

1.1 – А; 1.2 – А; 1.3 – А; 1.4 – А; 1.5 – Д; 1.6 – Б; 1.7 – Г.

2.1 – В; 2.2 – А; 2.3 – В; 2.4 – Г; 2.5 – Д; 2.6 – В.

3.1 – Г; 3.2 – Б.

4.1 – Г.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Изучение углеводного обмена методом нагрузки глюкозой

Для диагностики сахарного диабета и некоторых патологических состояний (недостаточность функции печени и почек, некоторые эндокринные заболевания, новообразования мозга, поджелудочной железы и надпочечников, гиповитаминоз 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.

Показания для проведения теста на толерантность к глюкозе

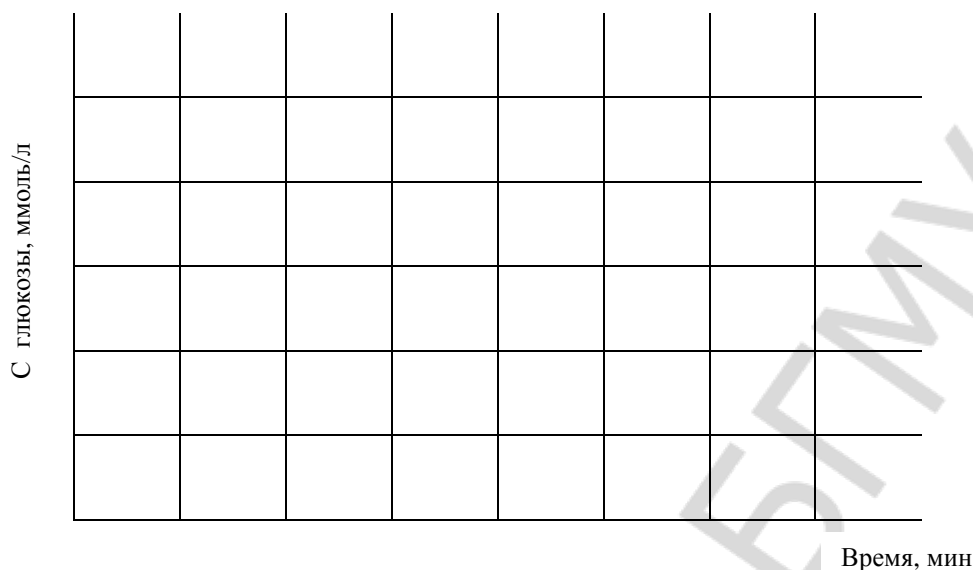
- Неоднозначные результаты однократных анализов крови натощак.
- Глюкозурия: панкреатическая и внепанкреатическая (первая связана с недостатком секреции или недостаточностью самого инсулина; внепанкреатическая глюкозурия развивается при поражении других органов внутренней секреции, ЦНС, при эмоциональном стрессе, заболеваниях почек, печени, избытке углеводов в диете, при беременности).
- Клинические признаки сахарного диабета или его осложнений при нормальной концентрации глюкозы крови натощак (скрытые формы диабета).

Проведение нагрузки. Утром натощак у больного берут кровь из пальца для определения содержания глюкозы, после чего ему дают выпить 200 мл раствора глюкозы (из расчета 1 г глюкозы на 1 кг массы тела) в течение 5 мин. Затем через каждые 30 мин у больного снова берут кровь из пальца (в пределах 2,5–3 ч), и результаты определения содержания глюкозы в этих пробах используют для построения гликемических кривых, откладывая на вертикальной оси значение концентрации глюкозы в каждой пробе, а на горизонтальной — время (мин или ч).

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

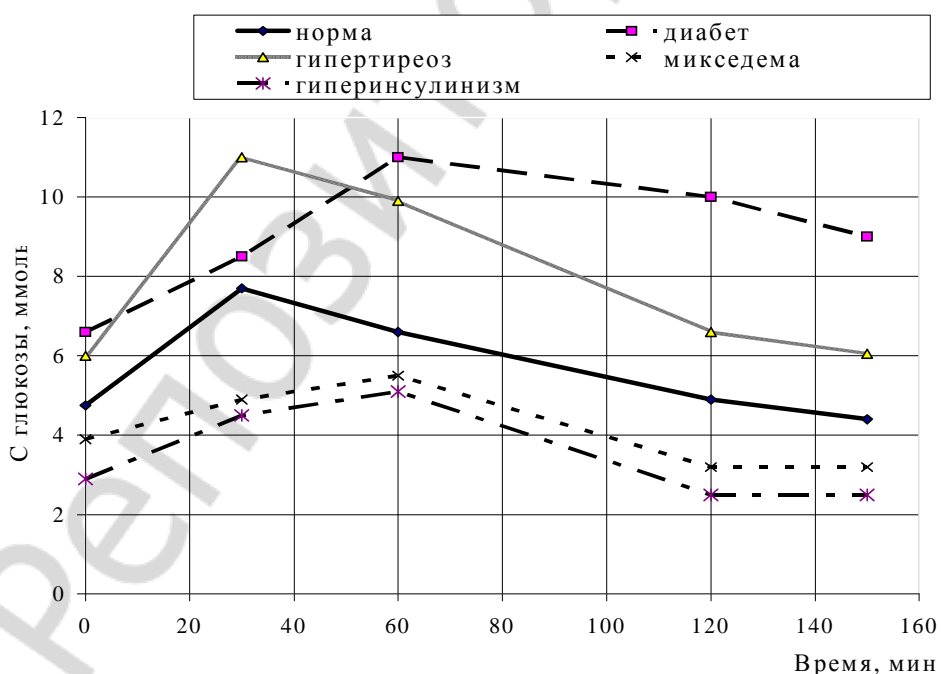
Результаты:

Полученные гликемические кривые:



В норме после нагрузки концентрация глюкозы в крови возрастает в течение первого часа на 50–80%, через 2 часа ее уровень снижается (часто ниже исходного), а через 2,5–3 часа он возвращается к исходному. В случаях нарушения толерантности к глюкозе (НТГ) значительное (до 10,0 ммоль/л) повышение концентрации глюкозы после нагрузки сохраняется более 3 ч.

Гликемические кривые у детей имеют такой же характер, что и у взрослых, с тем лишь отличием, что повышение концентрации сахара в крови у детей меньше.



На рисунке - гликемические кривые при однократной нагрузке глюкозой в норме и при некоторых патологических состояниях

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 значе-

ние), в большинстве случаев отмечается глюкозурия. Чем тяжелее заболевание, тем позже достигается максимум гликемии и тем он выше. Понижение кривой происходит очень медленно, чаще оно растягивается на 3–4 ч.

Заболеваниям щитовидной железы, связанным с ее гиперфункцией, свойственны гликемические кривые с более быстрым, чем в норме, подъемом, что, возможно, вызвано более интенсивным обменом веществ и возбуждением симпатического отдела вегетативной нервной системы.

Для больных с *аденомой островков Лангерганса, гипотиреозом (микседемой), болезнью Аддисона* характерен низкий исходный уровень кривой, низкая ее вершина и высокий постгликемический коэффициент. При некоторых тяжелых заболеваниях (энцефалит и др.) глюкоза может появляться в моче в результате ренальной глюкозурии.

Критерии ВОЗ для постановки диагноза «сахарный диабет» и НТГ

Диагноз	Время взятия крови	Венозная цельная кровь, ммоль/л
Сахарный диабет	Натощак	>6,7
	2 ч после нагрузки глюкозой	>10,0
НТГ	Натощак	<6,7
	2 ч после нагрузки глюкозой	6,7–10,0

Вывод:

Подпись преподавателя:

25. ТЕМА: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩЕЛОЧНОГО ЗАПАСА КРОВИ И ХЛОРИДОВ

Актуальность темы

Химический состав крови в определенной степени отражает состояние обмена веществ в организме. Различные заболевания сопровождаются изменением содержания в крови тех или иных веществ. Биохимический анализ крови проводится с целью диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний, установления прогноза болезни и оценки эффективности проводимого лечения. На занятии студенты рассматривают основные показатели биохимического анализа крови, закрепляя знания о происхождении веществ крови.

Цель занятия

Изучить физико-химические свойства крови, закрепить знания о происхождении компонентов плазмы крови и их физиологических концентрациях, буферных системах крови, строении и функционировании гемоглобина, транспорте газов кровью и механизмах развития гипоксии, диагностическом значении наиболее важных биохимических компонентов крови.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **общей химии:**
 - осмотическое и онкотическое давление, водородный показатель, рН крови, буферные системы, титрометрические методы анализа;
- **биоорганической химии:**
 - строение и свойства гемоглобина;
- **нормальной физиологии:**
 - гемоглобин (функции, производные и аномальные формы), общий анализ крови;
 - ацидоз и алкалоз;
- **биологической химии:**
 - структурная организация белков, классификация белков;
 - особенности метаболизма эритроцитов;
 - пути использования O_2 в клетках; пути образования CO_2 в клетках

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:

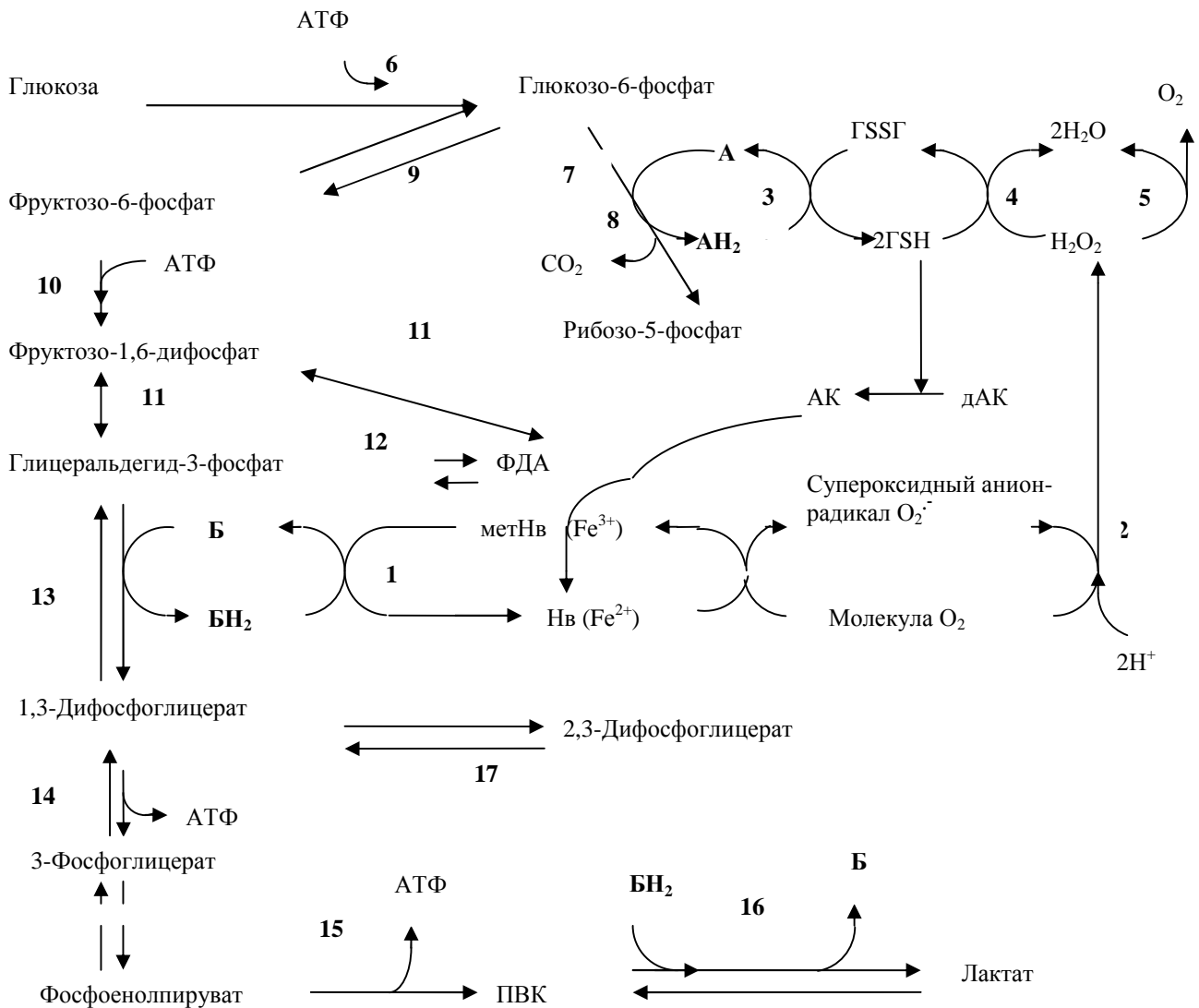
А. Ферменты, обозначенные цифрами 1, 2 и т. д. (*варианты ответов:* 6-фосфофруктокиназа, гексокиназа, пируваткиназа, альдолаза А, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, триозофосфатизомераза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, дифосфоглицератмутаза, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, фосфогексоизомераза, фосфоглицераткиназа, 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⁺. 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 эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Химический состав плазмы крови (физиологические концентрации наиболее важных компонентов плазмы крови и их происхождение). Биохимический анализ крови и его значение в характеристике состояния здоровья человека.
2. Важнейшие буферные системы крови: бикарбонатная, гемоглибиновая, фосфатная, белковая (компоненты и их соотношение, механизм действия, емкость). Представление о нарушениях кислотно-основного состояния (ацидоз, алкалоз).
3. Белки эритроцитов. Строение гемоглибина, гема, глобина; разновидности (нормальные и аномальные) и производные гемоглибина.
4. Дыхательная функция крови. Эритроциты как главный участник транспорта газов кровью (роль гемоглибина и карбангидразы). Обратимое связывание кислорода и углекислого газа как способ транспортировки (механизмы связывания CO₂ и O₂ с гемоглибином, кооперативное взаимодействие субъединиц гемоглибина, регуляция насыщения гемоглибина кислородом и диссоциации оксигемоглибина (рН, 2,3-дифосфоглицерат, температура)). Гипоксия, формы, механизмы развития.

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 549 – 551, 585–598.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 376–395, 521–541.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

1. *Марри, Р.* Биохимия человека : учеб. : В 2 т. / Р. Марри [и др.] / пер. с англ. М. : Мир, 1993. Т. 1. С. 52–62.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Повторите и запомните биохимические константы крови (табл. 1).

Таблица 1

Некоторые биохимические константы крови

Плотность крови (цельной)	1,05–1,06
pH	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	0,5–1,8 ммоль/л
Холестерол	3,65–5,2 ммоль/л
Общий белок сыворотки	68–85 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	3,5–20,5 мкмоль/л
прямой	2,2–5,1 мкмоль/л
непрямой	1,7–17,1 мкмоль/л
Na ⁺ в плазме	130–150 ммоль/л
K ⁺ в плазме	3,5–5,5 ммоль/л
Ca ²⁺ в плазме (общий)	2,2–2,6 ммоль/л

1.1. Поясните происхождение химических компонентов крови и их биологическую роль.

Задание 2. Знать механизм функционирования буферных систем крови. Уметь объяснить механизм сопряжения бикарбонатной и гемоглибиновой буферных систем крови.

Задание 3.

3.1. Какие из приведенных утверждений характеризуют гемоглобин человека?

А. Гемоглобин взрослого человека представляет собой смесь, состоящую из гемоглобина А (96–98%), гемоглобина А₂ (2–3%) и гемоглобина F (0,2–1%).

Б. Гемоглобин А содержит по две цепи α и β.

В. Гемоглобин А₂ содержит по две α- и две δ-цепи.

Г. Гемоглобин F содержит по две цепи α и γ.

Д. Эмбриональный гемоглобин (гемоглобин Р) включает в себя три фракции: гемоглобин Говер I (ζ₂ε₂), гемоглобин Говер II (α₂ε₂) и гемоглобин Портленд (ζ₂γ₂).

3.2. Какие из следующих утверждений о структуре гемоглобина верны?

А. Молекула основного гемоглобина взрослого человека состоит из двух идентичных α -субъединиц и двух идентичных β -субъединиц.

Б. Субъединица (протомер) гемоглобина состоит из одной полипептидной цепи (глобина) и гема.

В. Гем — это комплекс протопорфирина со связанным в его центре атомом железа.

Г. Железо гемоглобина остается двухвалентным независимо от присоединения или отдачи кислорода.

Д. В молекуле гемоглобина имеются центры для связывания O_2 , CO_2 , протонов (H^+) и 2,3-дифосфоглицерата.

3.3. Какие из следующих утверждений о взаимодействии кислорода и гемоглобина верны?

А. Кислород связывается с молекулой гемоглобина кооперативно.

Б. Кислород связывается с железом гема гемоглобина.

В. Углекислый газ уменьшает сродство гемоглобина к кислороду.

Г. Сродство гемоглобина к кислороду увеличивается при понижении pH и наоборот.

Д. Окись углерода, цианиды конкурируют с кислородом за место связывания в геме гемоглобина.

3.4. Укажите ошибочное утверждение о 2,3-дифосфоглицерате (2,3-ДФГК):

А. Преобладающий органический фосфат в эритроцитах.

Б. Промежуточный продукт гликолитического пути.

В. В эритроцитах находится в концентрациях приблизительно эквивалентных гемоглобину.

Г. Молекула гемоглобина связывает четыре молекулы 2,3-ДФГК.

Д. Стабилизирует дезоксиформу гемоглобина, способствуя переходу кислорода в ткани.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Определение компонентов какой буферной системы крови используется для диагностики расстройств кислотно-основного равновесия?

А. Бикарбонатной (гидрокарбонатной). Б. Фосфатной.

В. Гемоглобиновой. Г. Оксигемоглобиновой.

Д. Белковой.

Задание 2. Развитие метгемоглобинемий может быть обусловлено:

А. Отравлением окислителями (нитриты, нитраты, нитрозосоединения, бромиды и др.).

Б. Низким парциальным давлением кислорода.

В. Наследственным дефектом метгемоглобинредуктазы.

Г. Аномальной формой гемоглобина (М-гемоглобин и др.).

Д. Высоким парциальным давлением углекислого газа.

Задание 3. α -Талассемия характеризуется:

А. Нарушением синтеза α -цепи.

Б. Нарушением синтеза β -цепи.

В. Усилением синтеза β - и γ -цепей.

Г. Появлением в крови гемоглобина H (β_4).

Д. Появлением в крови гемоглобина Бартса (γ_4).

Задание 4. β -Талассемия характеризуется:

А. Нарушением синтеза α -цепи. Б. Нарушением синтеза β -цепи.

В. Появлением в крови гемоглобина Кения (содержит γ - и β -цепи наряду с α -цепями).

Г. Увеличением содержания в крови гемоглобина F ($\alpha_2\gamma_2$).

Д. Увеличением содержания в крови гемоглобина A₂ ($\alpha_2\delta_2$).

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – 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:

3.1 – А, Б, В, Г, Д. 3.2 – А, Б, В, Г, Д. 3.3 – А, Б, В, Д. 3.4 – Г.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Буферные свойства сыворотки крови*

В сыворотке крови функционируют бикарбонатная, белковая и фосфатная буферные системы.

Принцип метода. Титруют 0,1н раствором HCl 1 мл сыворотки крови (1-я пробирка) и 1 мл воды (2-я пробирка) по индикатору бромфеноловому синему (по 1 капле в каждую пробирку) до желтой окраски. Сравнивают результаты титрования.

Результат:

Вывод:

Работа 2. *Титрометрический метод определения щелочного запаса крови*

Количество всех оснований крови, в том числе связанных с гемоглобином, обозначается щелочным запасом цельной крови. Эта величина не соответствует резервной щелочности крови, т. е. количеству химически связанной плазмой углекислоты при 40 мм ее напряжения, а всегда значительно превышает ее.

Принцип метода. К цельной крови добавляют заведомо большее количество HCl, которая нейтрализует все щелочные компоненты. Избыток кислоты оттитровывают щелочью, заканчивая титрование в точке эквивалентности при pH = 5,0. Это значение pH соответствует изоэлектрическим точкам основных белков крови — альбумина, глобулина и глобина. В среде, близкой к изоэлектрической точке, белки неустойчивы и легко выпадают в осадок. Поэтому о конце титрования судят по помутнению раствора и выпадению хлопьев белка. Обычно окончание реакции (помутнение) происходит резко с добавлением одной капли щелочи. Щелочной запас крови выражают в миллиэквивалентах щелочи и соответствует количеству связанной основаниями крови HCl в пересчете на один литр крови. Физиологические пределы колебаний щелочного запаса крови — 100–115 мэкв/л.

Ход работы. К 10 мл 0,01н HCl добавляют 0,2 мл крови и тщательно перемешивают. Прозрачный бурый раствор титруют из микробюретки 0,1н NaOH до резко наступающего помутнения. Отмечают количество щелочи, пошедшее на титрование. $V_T(\text{мл}) =$.

Щелочной запас крови рассчитывают по формуле:

$$X(\text{мэкв/л}) = (1 - V_T) \cdot 0,1 \cdot 1000 / 0,2,$$

где 1 — количество HCl, взятой для анализа и выраженной в 0,1н концентрации, мл; V_T — объем щелочи, израсходованный на титрование, мл; 0,1 — количество мэкв в 1 мл щелочи; 0,2 — количество крови, взятое для анализа, мл; 1000 — 1 литр крови.

Ответ:

Вывод:

Работа 3. Количественное определение хлоридов в крови по Левинсону

Хлор находится в организме в основном в ионизированной форме. Хлорид-ион — главный внеклеточный анион. Анионы хлора — наиболее важные осмотически активные компоненты крови, лимфы, спинномозговой жидкости. Содержание хлора (хлорид-ионов) в сыворотке крови практически здоровых взрослых людей составляет 95–105 ммоль/л. В плазме и сыворотке крови грудных детей концентрация хлорид-ионов в норме равна 80–140 ммоль/л.

Принцип метода. Аргентометрический осадочный метод основан на способности ионов серебра образовывать с ионами хлора нерастворимые соли. Количество осаждающего вещества (AgNO_3) эквивалентно содержанию хлорид-ионов.

Проводят титрование хлорид-ионов крови азотнокислым серебром в присутствии индикатора K_2CrO_4 . По достижении эквивалентной точки титрования избыток ионов серебра образует с индикатором соединение кирпично-красного цвета (Ag_2CrO_4).

Ход работы

1. Осаждение белков крови. В двух пробирках готовят смесь растворов: 5 мл 0,45% ZnSO_4 + 1 мл 0,1н NaOH . Затем в 1-ю пробирку вносят 0,1 мл сыворотки, во 2-ю (контрольную) — 0,1 мл $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$. Пробирки нагревают 3 мин над пламенем спиртовки. После этого содержимое пробирок фильтруют в колбочки через вату. Осадок на ватном фильтре промывают два раза водой (по 3 мл).

2. Осаждение ионов хлора в присутствии K_2CrO_4 . К фильтрату приливают 2 капли 1–2% раствора K_2CrO_4 и титруют раствором AgNO_3 до изменения желтого цвета раствора в кирпично-красный.

Расчет. Из объема (мл) AgNO_3 , пошедшего на титрование опытного раствора ($V_{\text{оп}}$ (мл)), вычитают объем (мл) AgNO_3 , пошедший на титрование контроля ($V_{\text{контр}}$ (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.

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

Ответ:

Вывод:

Подпись преподавателя:

26. ТЕМА: БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ. СИСТЕМА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАЛЬЦИЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Актуальность темы

Наряду с определением общего белка плазмы крови важное диагностическое значение имеет выяснение количественных взаимоотношений между отдельными фракциями белков. На занятии студенты знакомятся с электрофоретическим разделением белков сыворотки крови, проводят количественную оценку протеинограмм. Тема «Гемостаз. Система свертывания крови» — традиционно сложная для студентов. Понимание процессов свертывания крови и фибринолиза — основа для дальнейшего изучения вопросов диагностики, лечения, профилактики тромбозов (тромбоэмболий) и геморрагий.

Цель занятия

Ознакомиться с принципами исследования белкового состава крови, понять диагностическое значение определения количественного соотношения белковых фракций и отдельных белков плазмы крови. Получить представление о механизмах гемостаза и изучить функционирование системы свертывания крови.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **общей химии:**
 - титрометрические методы анализа;
- **биоорганической химии:**
 - «цитратная кровь»;
- **нормальной физиологии:**
 - гемостаз;
- **биологической химии:**
 - физико-химические свойства белков, методы разделения белков (высаливание, электрофорез), количественное определение белка плазмы крови;
 - ферменты.

Для проверки исходного уровня знаний ответьте на следующие вопросы:

1. Что понимают под гемостазом? Виды гемостаза.
2. Что такое «цитратная кровь»?

Вопросы для обсуждения

1. Белки плазмы крови. Основные белковые фракции: альбумины, глобулины, фибриноген (содержание, функции); альбумино-глобулиновый коэффициент и его диагностическое значение. Биологическая роль и диагностическое значение некоторых белков плазмы крови (гаптоглобин, трансферрин, церулоплазмин, ингибиторы трипсина, С-реактивный белок, интерферон, криоглобулины).
2. Ферменты плазмы крови (секреторные, индикаторные, экскреторные). Диагностическое значение определения активности ферментов плазмы крови.
3. Представление о гемостазе (определение, структурно-функциональные компоненты, сосудисто-тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз). Система свертывания крови (функциональные звенья и их биологическая роль). Представление о нарушениях функционирования системы свертывания крови.
4. Свертывающая система (компоненты и их происхождение), гемокоагуляция (определение, фазы и их продолжительность, источники тромбопластинов). Внешний и внутренний механизмы свертывания крови.

5. Витамин К (химическая природа, разновидности, природные источники, роль в гемокоагуляции).

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

7. Фибринолитическая система, механизмы фибринолиза. Плазминовая система (компоненты и их происхождение, механизм действия).

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 551–585.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 395–402, 521–541.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

1. *Иванов, Е. П.* Руководство по гемостазиологии / Е. П. Иванов. Минск : Беларусь, 1991. 304 с.
2. *Василькова, Т. В.* Молекулярные механизмы гемостаза: учеб. пособие / Т. В. Василькова. Минск : МГМИ, 1999. 57 с.

Задания для самостоятельной работы

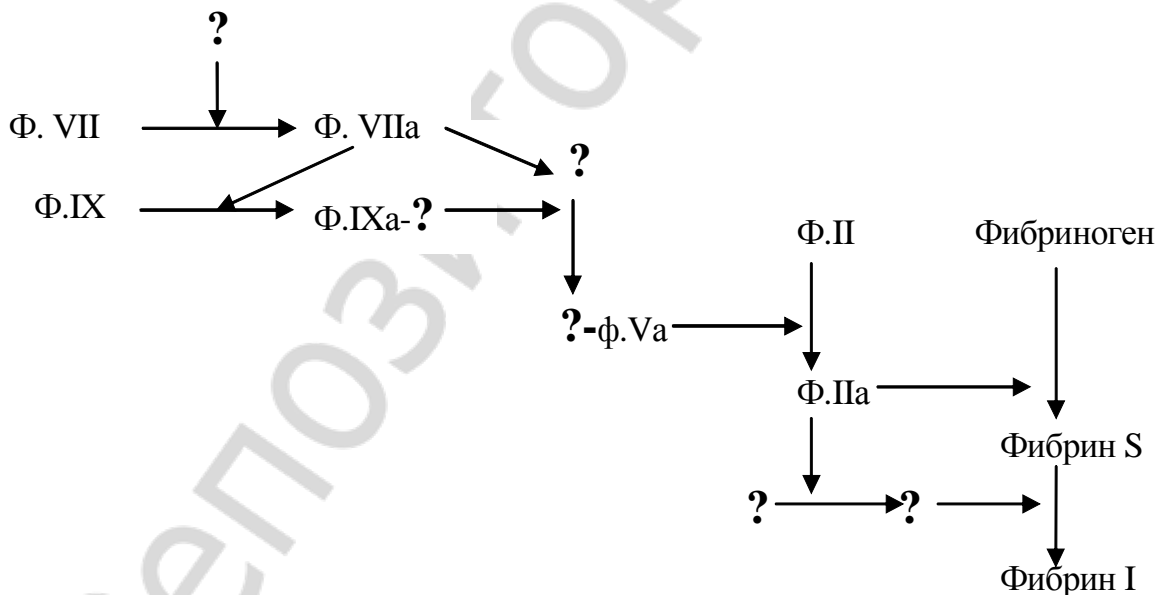
Задание 1. Назовите индикаторные ферменты крови и поясните их диагностическое значение.

Задание 2.

2.1. Напишите схему внутреннего пути свертывания крови.

2.2. Запомните активаторы фактора Хагемана.

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



Внешний механизм свертывания крови

Задание 3. Назовите витамин К-зависимые факторы системы свертывания крови.

Задание 4. Умейте объяснить механизм действия основных физиологических антикоагулянтов.

4.1. Выберите из приведенных физиологических антикоагулянтов:

- | | | |
|---------------|---------------------|--------------------------------------|
| А. Первичные. | 1. Фибрин. | 4. Протеины С и S. |
| Б. Вторичные. | 2. Антитромбин III. | 5. α_2 -Макроглобулин. |
| | 3. Гепарин. | 6. Ингибитор пути тканевого фактора. |
| | | 7. Продукты деградации фибрина. |

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

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

Задание 5. Назовите ориентировочные тесты коагулограммы, характеризующие:

- А. Общее состояние свертывания крови.
- Б. Состояние отдельных фаз гемокоагуляции.
- В. Посткоагуляционную фазу.
- Г. Антикоагулянтную систему.
- Д. Систему фибринолиза.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Альбумины плазмы крови характеризуются:

- А. Хорошей растворимостью в воде.
- Б. Молекулярной массой около 70000 Да.
- В. Содержат много дикарбоновых аминокислот.
- Г. Не являются гликопротеинами.
- Д. Содержание в плазме крови в норме составляет 35–50 г/л.

Задание 2. Укажите ошибочное утверждение. Альбумины плазмы крови:

- А. Синтезируются в эритроцитах.
- Б. Сравнительно быстро обновляются.
- В. Играют важную роль в создании онкотического давления.
- Г. Выполняют роль белкового резерва организма.
- Д. Осуществляют транспорт метаболитов (жирных кислот, билирубина, альдостерона, Ca^{2+}) и лекарственных веществ (антибиотиков, сульфаниламидов, салицилатов, барбитуратов, сердечных гликозидов и др.).

Задание 3. Глобулины плазмы крови характеризуются:

- А. Большинство глобулинов — гликопротеины.
- Б. Имеют большую молекулярную массу в сравнении с альбуминами.
- В. Многие глобулины — сравнительно гидрофобные белки.
- Г. Выпадают в осадок только в насыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- Д. Физиологические концентрации глобулинов в плазме крови — 20–35 г/л.

Задание 4. Укажите верные утверждения. Глобулины плазмы крови:

- А. Принимают участие в создании гуморального иммунитета.
- Б. Осуществляют транспорт органических веществ (метаболитов, гормонов, витаминов).
- В. Осуществляют транспорт катионов (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} и др.).
- Г. Являются ингибиторами протеолитических ферментов.
- Д. Играют ведущую роль в создании онкотического давления.

Задание 5. Какие функции выполняют приведенные ниже глобулины крови?

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

Задание 6. Какие из приведенных утверждений характеризуют С-реактивный белок?

- А. Дает преципитат с С-полисахаридом пневмококка.
- Б. Состоит из 6 субъединиц с молекулярной массой 23000 Да каждая.
- В. Постоянно в малых количествах содержится в крови практически здоровых людей.
- Г. Концентрация в плазме крови при воспалении или некрозе тканей может увеличиваться в 20–25 раз.
- Д. Является парапротеином.

Задание 7. В процессе тромбообразования различают внешний и внутренний пути свертывания крови. На каком этапе свертывания крови они не совпадают?

- А. Превращение протромбина в тромбин.
- Б. Превращение фибриногена в фибрин.
- В. Образование протромбиназы (активного тромбoplastина крови).
- Г. Ретракция кровяного тромба.
- Д. Превращение пламиногена в плазмин.

Задание 8. Какое из приведенных утверждений не характерно для фактора Хагемана?

- А. Является сериновой протеазой.
- Б. Активируется калликреином.
- В. Активируется при контакте крови с чужеродной поверхностью (стекло, каолин).
- Г. Активируется тромбоцитарным тромбoplastином.
- Д. Активируется тканевым тромбoplastином.

Задание 9. Расположите в правильном порядке события, происходящие при образовании фибринового сгустка:

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

Задание 10. Наблюдаемая при наследственной недостаточности фактора XIII повышенная кровоточивость объясняется невозможностью образования стабильного фибринового сгустка. Какова роль плазменной трансглутаминазы (фибриназы) в образовании гемостатического тромба?

- А. Участие в синтезе фибриногена в печени.
- Б. Участие в образовании фибрин-мономера.
- В. Участие в образовании растворимых фибрин-мономерных комплексов.
- Г. Участие в ковалентной сшивке фибриновых молекул.
- Д. Участие в ретракции гемостатического тромба.

Задание 11. Гиповитаминоз К сопровождается повышенной кровоточивостью. Какова роль витамина К в гемокоагуляции?

- А. Необходим для активации свертывающей системы после повреждения сосуда.
- Б. Необходим для одновременного активирования свертывающей и противосвертывающей систем.
- В. Участвует в постсинтетическом созревании II, VII, IX и X факторов свертывания крови.
- Г. Участвует в связывании ионов кальция.
- Д. Участвует в синтезе V и VIII факторов свертывания крови.

Задание 12. Выберите правильные утверждения, характеризующие участие ионов кальция (ф. IV) в гемокоагуляции:

- А. Являются вторичными посредниками в действии ряда гормонов.
- Б. Стимулирование процессов перекисного окисления липидов.
- В. Связывание на тромбопластинах кальций-зависимых факторов свертывания крови (ф. IX, ф. X, ф. VII, ф. II).
- Г. Стабилизация структуры тромбопластинов.
- Д. Активирование некоторых факторов свертывания крови.

Задание 13. Дефицит антитромбина III — частая причина тромбозов. Какова антикоагулянтная роль антитромбина III?

- А. Образование необратимого комплекса с гепарином.
- Б. Ингибирует витамин 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 14. Что определяет противосвертывающую активность гепарина?

- А. Связывает ионы кальция.
- Б. Активирует антитромбин III.
- В. Образует нестабильные комплексы с некоторыми факторами свертывающей системы, выключая их из процесса гемокоагуляции.
- Г. Осуществляет неферментативный фибринолиз.
- Д. Ингибирует витамин К-зависимое карбоксилирование остатков глутамата протеинов С и S

Задание 15. Отберите те протеолитические ферменты, при действии которых возможно превращение плазминогена в плазмин:

- А. Тканевый активатор плазминогена.
- Б. Урокиназа.
- В. Протеин С (S).
- Г. α_2 -Антиплазмин.
- Д. α_2 -Макроглобулин.

Задание 16. Расположите в правильном порядке события, происходящие при фибринолизе:

- А. Плазминоген осаждается на фибриновых нитях.
- Б. Тканевый активатор плазминогена активирует плазминоген.
- В. Тканевый активатор плазминогена связывается с фибрином.
- Г. Плазминоген превращается в плазмин.
- Д. Плазмин гидролизует фибрин.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самостоятельной работы:

4.1 А — 2, 3, 4, 5, 6; Б — 1, 7.

5. А — 1) время свертывания крови по Ли-Уайту; 2) время рекальцификации; Б — I фаза: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), II фаза: протромбиновый

индекс (ПТИ), протромбиновый показатель; *III фаза*: 1) количество фибриногена; 2) активность фибриназы; В — 1) ретракция тромба; 2) гематокрит тромба; Г — 1) тромбиновое время (ТВ); 2) толерантность плазмы к гепарину; 3) активность антитромбина III; Д — фибринолитическая активность (спонтанный фибринолиз).

Лабораторная работа (80 минут)

Инструкция к практическому занятию

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, белокдефицитных 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%.

1. *Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови*

Ход работы. 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 пропускают 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.

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

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.

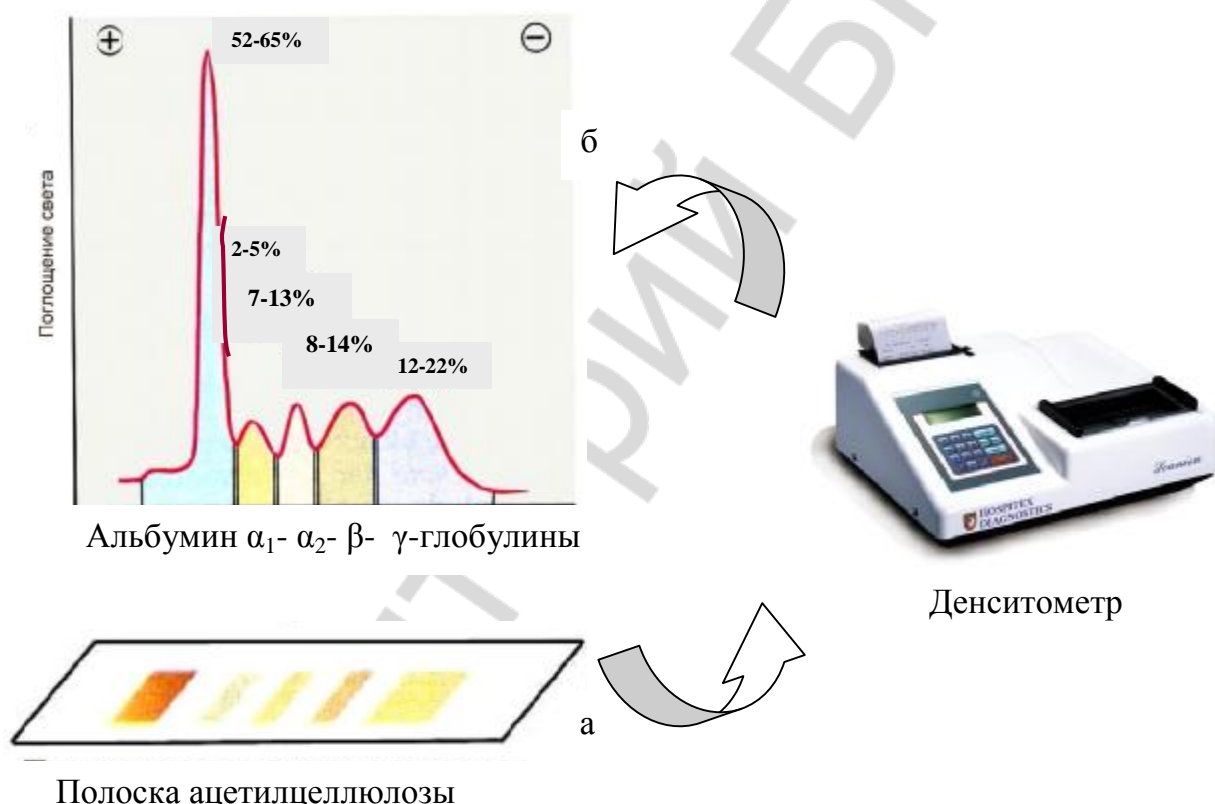
Фотометрия элюатов фракций белка. Полоски ацетилцеллюлозы промокают фильтровальной бумагой, окрашенные белковые фракции вырезают и помещают в соответствующие пронумерованные пробирки с элюирующим раствором (в 5 пробирок наливают из бюретки

по 10 мл 0,1н 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 выражают относительное содержание белка в каждой фракции.

Например:

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

Ответ:



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

Вывод:

Работа 2. *Определение содержания кальция в плазме крови*

Кальций играет важную роль в осуществлении процессов жизнедеятельности. Он влияет на проницаемость биологических мембран, возбудимость нервов и мышц, участвует в нервно-мышечной проводимости, сокращении и расслаблении мускулатуры (в том числе мышцы сердца), секреторных процессах, формировании кости и хряща; воздействует на обмен веществ в клетках, является важным фактором гемостаза и посредником действия гормонов в клетке.

Количественное определение кальция в плазме крови имеет важное значение для диагностики ряда заболеваний и при наблюдении за ходом лечения.

В норме концентрация общего кальция в плазме крови — 2,2–2,6 ммоль/л (9–11 мг%).

Принцип метода. Индикатор хромоген черный ЕТ-00 образует с кальцием соединение розово-фиолетового цвета. При титровании трилоном Б (двухзамещенная натриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты, образующая прочные комплексы с ионами кальция) такого окрашенного раствора произойдет изменение окраски в сине-розовый цвет в эквивалентной точке, соответствующей связыванию трилоном Б всех ионов кальция в растворе.

Ход работы. В колбочку наливают 25 мл H₂O и вносят 1 мл аммиачного буферного раствора. Затем приливают 1 мл исследуемой плазмы крови и 2 капли индикатора хромогена черного. Раствор приобретает розово-фиолетовый цвет. Затем раствор титруют 0,002М раствором трилона Б до сине-розовой окраски. По объему трилона Б, пошедшего на титрование, рассчитывают содержание кальция в плазме крови.

$$X \text{ (мг\%)} = \frac{0,002 \cdot 40,8 \cdot 100 \cdot V_T}{1},$$

где 0,002 — молярность раствора трилона Б; 40,8 — молекулярный вес Са; 100 — коэффициент для пересчета в мг%; 1 — объем сыворотки, взятый для анализа; V_T — объем трилона Б, израсходованный на титрование.

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л) — 0,245. C (ммоль/л) = X · 0,245

Ответ:

Вывод:

Подпись преподавателя:

27. ТЕМА: БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ. ПРОБЫ КОЛЛОИДОУСТОЙЧИВОСТИ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛЛИРУБИНА 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 порталным и общим кругами кровообращения организма. Как правило, все вещества, всасывающиеся из кишечника, проходят через печень. Функции печени обуславливают ее своеобразный «биохимический альтруизм»: многие происходящие в ней процессы обеспечивают 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 анти-свертывающей систем крови.

В печени депонируются железо, медь и витамин В₁₂, необходимые для эритропоэза. Продолжительность жизни эритроцитов составляет 110–120 дней. После этого они разрушаются с освобождением гемоглобина. В печени, селезенке, костном мозге гемоглобин распадается с образованием билирубина. Дальнейшая судьба желчных пигментов (билирубина) связана с их метаболизмом в печени и в кишечнике. Определение в клинике содержания общего билирубина, его фракций и продуктов их деградации имеет важное значение в дифференциальной диагностике желтух различной этиологии.

Следует отметить значительную вариабельность химического состава печени, который зависит от характера питания, состояния обмена веществ. Особенно существенные изменения в соотношении отдельных компонентов наблюдаются при голодании и патологических процессах, например, жировой инфильтрации печени, гликогенозах и др.

В связи с вышеизложенным понятна необходимость правильной оценки функционального состояния печени с использованием различных биохимических тестов, позволяющих установить факт заболевания и отслеживать его течение.

Цель занятия

Уметь применять знания о гомеостатической и интегрирующей роли печени в обмене углеводов, липидов и аминокислот для объяснения механизмов нарушений обмена веществ при болезнях печени и желчных путей. Уметь использовать знания о путях превращения в печени ксенобиотиков для понимания биохимических аспектов фармакологии и токсикологии.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **анатомии, гистологии, физиологии:**
 - особенности строения и микроструктуры печени;
 - функции печени;
 - анатомо-физиологические взаимоотношения между печенью, желудочно-кишечным трактом и воротной веной;
- **биоорганической химии:**
 - основные реакции введения функциональных групп в молекулы химических веществ с целью повышения их гидрофильных свойств.
- **биологической химии**
 - метаболические пути обмена углеводов, липидов и белков, занятие 8 настоящего руководства.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. При изучении микропрепарата печени студентам дано задание зарисовать структурную морфологическую единицу печени — ацинус.

1.1. Выберите функцию, которую выполняют элементы этой морфологической единицы — клетки Купфера:

А. Синтетическая. Б. Выделительная. В. Обезвреживающая.

1.2. Какую роль играет пространство Дисе?

А. Участвует в транспорте веществ между кровью синусоидов и паренхиматозными клетками.

Б. Является депо желчи.

В. Участвует в транспорте веществ между артериолами, венулами и центральной веной.

Задание 2. Методом «меченых атомов» была зафиксирована энтерогепатическая циркуляция желчных кислот. По каким кровеносным сосудам происходит возврат желчных кислот из кишечника к гепатоцитам в процессе этой циркуляции?

- А. По центральной вене печени. Б. По воротной вене печени.
В. По нижней полой вене печени. Г. По печеночной артерии.

Задание 3. На лабораторном практикуме студенты получили задание сравнить растворимость различных веществ в воде. Сравнив результаты исследования, студенты убедились, что введение некоторых функциональных групп повышает гидрофильность молекул органических соединений.

3.1. Какие функциональные группы могут обеспечить гидрофильные свойства этих молекул?

- А. Изопропильные. Б. Дисульфидные. В. Гидроксильные. Г. Карбоксильные.

3.2. Назовите химические реакции, в результате которых в молекулы органических соединений могут быть введены указанные выше функциональные группы.

- А. Гидроксилирование.
Б. Карбоксилирование.
В. Дезаминирование.
Г. Нитрование.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов

Вопросы для обсуждения

1. Основные функции и химический состав печени.
2. Роль печени в обмене углеводов, липидов, белков.
3. Обезвреживающая функция печени, механизмы: (защитные синтезы, ацилирование, микросомное окисление, конъюгация).
4. Роль печени в пигментном обмене. Синтез и распад гемоглобина (схемы). Обмен билирубина в норме и патологии. Порфирии, желтухи (гемолитическая, обтурационная, паренхиматозная) и их дифференциальная диагностика.
5. Биохимические методы диагностики нарушений функций печени.

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 301–306, 607–612, 661–676.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 321–331, 403–429.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

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

Задания для самостоятельной работы

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

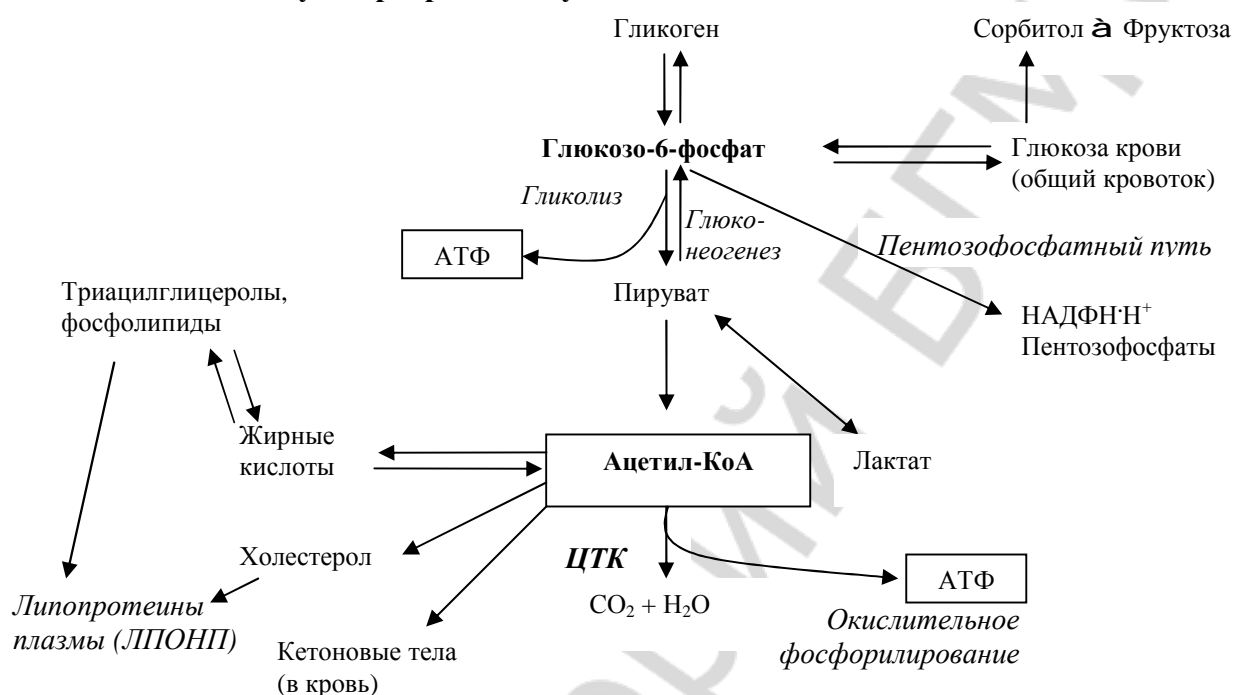
1.1. Обратить внимание на то, что большая часть потребленной свободной глюкозы в печени фосфорилируется с образованием глюкозо-6-фосфата. Метаболизм этого соединения может осуществляться по нескольким направлениям, выбор которых зависит от соотношения между потребностями организма и количеством поступивших с пищей углеводов.

1.2. Печень поддерживает постоянный уровень глюкозы в крови при голодании за счет активации гликогенолиза и глюконеогенеза, а при избыточном ее поступлении из кишечника глюкоза депонируется в виде гликогена и липидов.

1.3. Знать, что обратимость превращения лактата в пируват (направление реакции) зависит от соотношения $\text{НАДН}\cdot\text{Н}^+/\text{НАД}^+$.

1.4. Знать, что жирные кислоты — основной субстрат энергетического метаболизма в печени и предшественники в биосинтезе холестерина, кетоновых тел, липидной части липопротеинов плазмы крови.

Пути превращения углеводов и липидов в печени



1.5. Задание. Этанол окисляется, главным образом, в печени, где при участии НАД-зависимых дегидрогеназ, последовательно превращаясь в уксусный альдегид и уксусную кислоту, приводит к увеличению отношения $\text{НАДН}\cdot\text{Н}^+/\text{НАД}^+$. Объясните, почему при алкогольном токсикозе наблюдается гиперлактатемия и гипогликемия. Напишите реакции, подтверждающие указанные явления.

1.6. Объясните:

а) почему уже через три часа после удаления печени у животных развивается гипогликемия и наступает смерть, если ежечасно не вводить глюкозу;

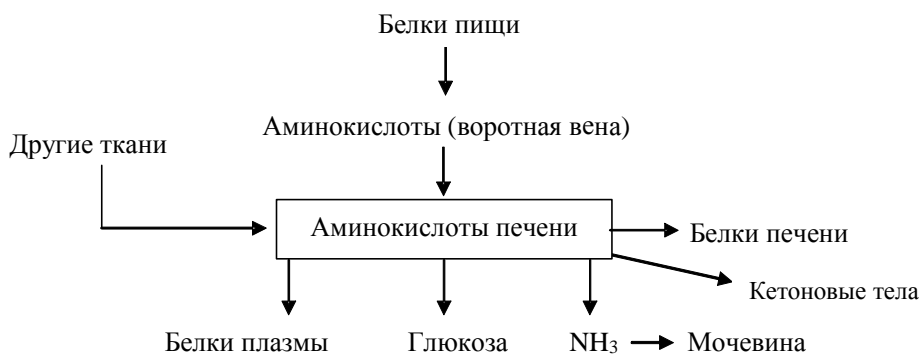
б) почему введение галактозы, лактата или пирувата в этих условиях не эффективно.

1.7. Выбрать продукты липидного обмена, синтезирующиеся преимущественно в печени:

А. Холестерол. Б. ТАГ. В. Фосфолипиды. Г. Кетоновые тела.

Д. Хиломикроны. Е. ЛПВП. Ж. Свободный билирубин. З. ЛПОНП.

Задание 2. Знать, что аминокислоты, всосавшиеся в кишечнике и поступившие затем в печень, имеют несколько основных путей метаболизма:



2.1. Задача. У больного с алкогольным циррозом печени наблюдается сильная отечность. С нарушением синтеза каких веществ в печени связано это состояние?

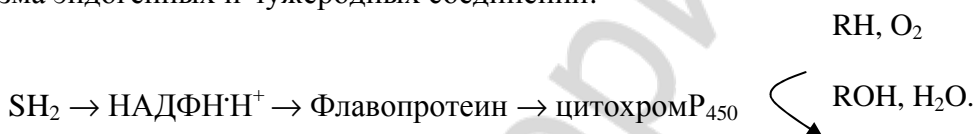
- А. Мочевины. Б. Альбуминов. В. Холестерола.
Г. Гаптоглобина. Д. Фибриногена.

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

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

Задание 3. Усвоить механизмы обезвреживания веществ в печени.

3.1. Знать основы функционирования микросомной системы окисления как пути метаболизма эндогенных и чужеродных соединений:



Таким способом гидроксилируются стероиды в процессе образования гормонов коры надпочечников, ряд лекарственных препаратов и чужеродных соединений.

В результате гидроксилирования уменьшается токсичность и повышается растворимость ксенобиотиков, что способствует выведению их из организма. Многие лекарственные вещества, например, фенобарбитал, способны индуцировать синтез микросомных ферментов и цитохрома P₄₅₀.

3.2. Знать, что конъюгационная фаза необходима для образования малотоксичных и легковыводимых продуктов метаболизма лекарств и может протекать как самостоятельный этап обезвреживания.

3.3. Задача. Для исследования обезвреживающей функции печени пациенту назначена проба Квика. После приема бензоата натрия уровень гиппуровой кислоты в моче обследуемого повысился, что свидетельствует о нормальной детоксикационной функции печени. Какое вещество принимает участие в обезвреживании этой соли?

- А. ФАФС. Б. Церулоплазмин. В. УДФ-глюкуроновая кислота.
Г. Таурин. Д. Глицин.

3.4. Задача. У больного инфекционным гепатитом произошло обесцвечивание кала. С отсутствием в кишечнике какого продукта распада билирубина это связано?

- А. Копропорфирина. Б. Стеркобилина. В. Биливердина. Г. Вердоглобина.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Для предотвращения развития гипербилирубинемии у новорожденного вследствие несовпадения у матери и ребенка резус-фактора беременной перед родами рекомендован фенobarбитал. Выберите ответ, объясняющий, с какой целью в данном случае был назначен этот препарат:

- А. В качестве снотворного средства.
- Б. Для инактивации компонентов микросомного окисления.
- В. Для снижения растворимости билирубина.
- Г. Как индуктора печеночных ферментов детоксикации.
- Д. В качестве липотропного средства.

Задание 2. При лабораторном обследовании больного желтухой получены следующие данные: общее содержание в сыворотке крови билирубина — 60 мкмоль/л, прямого билирубина — 43 мкмоль/л, в моче определяется прямой билирубин и отсутствуют уробилин и стеркобилин. Какой вид желтухи у данного больного?

- А. Паренхиматозная.
- Б. Гемолитическая.
- В. Обтурационная.

Задание 3. Для оценки функционального состояния печени у больного исследована экскреция животного индикана. Индикан образуется в результате обезвреживания в печени индоксила — продукта гниения аминокислоты триптофана в толстом кишечнике. Какое вещество участвует в обезвреживании этого токсического соединения?

- А. ФАФС.
- Б. УДФ-глюкуроновая кислота.
- В. Глицин.
- Г. Церулоплазмин.
- Д. Таурин.

Задание 4. Методом дифференциального центрифугирования клеток печени была получена микросомная фракция. Микросомное окисление — это способ обезвреживания токсических веществ в печени. Выберите компонент этой цепи окисления:

- А. Цитохром a₃.
- Б. Цитохром с.
- В. Цитохром b.
- Г. Цитохром p₄₅₀.
- Д. Цитохром с₁.

Задание 5. В моче больного обнаружены в большом количестве аминолевулиновая кислота, порфобилиноген и порфирины. Моча при длительном освещении приобрела темно-красный винный цвет. Какую патологию можно предположить в данном случае?

- А. Печеночная желтуха.
- Б. Эритропоэтическая порфирия.
- В. Гемолитическая желтуха.
- Г. Печеночная порфирия.
- Д. Талассемия.

Задание 6. Больному с жировой инфильтрацией печени назначена растительно-молочная диета. Дефицит каких липотропных веществ восполняют рекомендованные продукты?

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

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1.1 – В; 1.2 – А; 2 – Б; 3.1 – В, Г; 3.2 – А, Б.

Для самостоятельной работы:

1.5 – пируват + НАДН·Н⁺ ↔ лактат + НАД⁺.

При приеме алкоголя отмечается гипогликоземия, потому что в этих условиях в клетках печени снижается концентрация пирувата, что приводит к снижению скорости глюконеогенеза, являющегося важным источником глюкозы крови.

1.7 – А, Б, В, Г, Е, З; 2.1 – Б; 2.2 – А; 3.3 – Д; 3.4 – Б.

Лабораторная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Исследование коллоидоустойчивости белков сыворотки крови*

Проба Вельтмана в модификации Тейля

Принцип метода. Реакция основана на том, что белки сыворотки крови при добавлении раствора хлористого кальция определенной концентрации и последующем нагревании выпадают в виде хлопьев в осадок (происходит нарушение коллоидной устойчивости).

Ход определения. К 4,9 мл воды прибавляют 0,1 мл сыворотки, содержимое пробирки перемешивают путем ее опрокидывания (при этом пробирку можно закрывать большим пальцем) и затем приливают 0,1 мл 0,5% раствора хлористого кальция (из пипетки на 1,0 мл или капельницы, если объем каждой капли соответствует 0,05 мл). Содержимое пробирки встряхивают и нагревают над пламенем спиртовки до однократного вскипания смеси. Затем пробирку охлаждают и смотрят через нее на свет. Если хлопья в пробирке не обнаруживаются, то в нее добавляют еще 0,1 мл CaCl₂ и раствор вновь нагревают до кипения. Процедуру повторяют до выпадения хлопьевидного осадка. Записывают общий объем CaCl₂ (в мл), добавленный в пробирку.

Примечание. Сыворотка для исследования должна быть свежей (хранящейся не более 24 часов от момента взятия), без следов гемолиза.

Результат:

Клинико-диагностическое значение реакции вельтмана. реакция коагуляции с хлористым кальцием (по вельтману) может изменяться в двух направлениях: в сторону укорочения коагуляционной ленты или ее удлинения (см. схему).

CaCl ₂ (мл)	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,35	0,3	0,2	0,1		
Сужение (сдвиг влево)						Норма						Расширение (сдвиг вправо)	
Укорочение												Удлинение	
←								→					
Экссудаты, некрозы, опухоли								Фиброзы, повреждения печени, гемолиз					

Главные причины, которые ведут к удлинению полосы (коагуляция, наступающая при добавлении менее 0,4 мл CaCl_2), — это фиброзные и пролиферативные процессы, повреждение паренхимы печени и гемолитические состояния. Сдвиг вправо отмечается при болезни Боткина, циррозах, острой желтой атрофии печени, малярии, после переливания крови, аутогемотерапии и при многих воспалительных заболеваниях. Считают, что удлинение коагуляционной полосы обусловлено повышением содержания γ -глобулинов, снижающих стабильность сыворотки.

Укорочение коагуляционной полосы (коагуляция, наступающая при добавлении более 0,6 мл CaCl_2) обнаруживается при острых воспалительных и экссудативных процессах. В этих случаях увеличивается количество α - и β -глобулинов и за счет этого повышается стабильность сыворотки (экссудативная фаза ревматизма, активный процесс туберкулеза легких, нефрозы, макроглобулинемия Вальденштрема, α_2 -, β -плазмоцитомы, злокачественные опухоли, экссудативный перитонит, некрозы, большие потери жидкости, острые инфекционные заболевания). Крайнее укорочение коагуляционной ленты (отрицательная проба) наблюдается при остром ревматизме.

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 (500–560 нм). Параллельно колориметрируют стандартный раствор азобилирубина, соответствующий концентрации билирубина 0,4 мг% ($C_{ст}$).

Расчет производят по формуле:

$$C_{оп} (\text{мг}\%) = E_{оп} \cdot C_{ст} / E_{ст}$$

Ответ:

В норме концентрация общего билирубина в плазме (сыворотке) крови составляет 0,5–1,2 мг% (8,55–20,52 мкмоль/л). 75% его количества приходится на долю непрямого билирубина.

Клинико-диагностическое значение исследования пигментного обмена. один из важных признаков нарушения пигментного обмена — появление желтухи, которое отмечается обычно при уровне билирубина в крови 27–34 мкмоль/л и более. кровь новорожденных, особенно недоношенных детей, отличается более высоким содержанием билирубина (физиологическая желтуха). наблюдаемое со 2–3-го до 7–10-го дня жизни увеличение

концентрации билирубина, в основном за счет непрямого, связано с функциональной недостаточностью печени, в частности, малой активностью фермента удф-глюкуронилтрансферазы, необходимого для образования прямого билирубина.

Гемолитическая желтуха (надпеченочная) — усиление гемолиза эритроцитов, что приводит к усиленному образованию неконъюгированного билирубина, так как печень не успевает его связывать.

Паренхиматозная желтуха (печеночная) — нарушение функции печеночных клеток. Может быть вызвана также наследственно обусловленными дефектами в процессах транспорта билирубина и образования диглюкуронида билирубина.

Механическая желтуха (обтурационная, подпеченочная) — задержка оттока желчи. Возникает при переполнении желчных путей вследствие закупорки, разрыва их и последующего перехода желчи в кровь.

Тяжесть желтухи обычно соответствует уровню билирубинемии. Принято считать, что желтуха протекает в легкой форме, если содержание билирубина в плазме (сыворотке) не превышает 85 мкмоль/л; уровень его 86–169 мкмоль/л свидетельствует о среднетяжелой, а свыше 170 мкмоль/л — о тяжелой форме желтухи.

Вывод:

Подпись преподавателя:

28. ТЕМА: БИОХИМИЯ МОЧИ. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МОЧИ.

Актуальность темы

Анализ мочи — обязательная составляющая плана обследования больного. На основании анализа мочи диагностируют заболевания почек — как собственно почечную патологию, так и поражение почек и мочевыводящих путей при заболеваниях других органов. Кроме того, на основании анализа мочи можно заподозрить или подтвердить наличие заболеваний печени, сердечной мышцы, поджелудочной железы, диагностировать различные виды желтухи, провести дифференциальную диагностику сахарного и несахарного диабета, определить тип некоторых гормональных нарушений и т. д.

Изменение состава минеральных веществ и нарушение распределения электролитов и жидкости в организме являются причиной многих серьезных нарушений, коррекцией которых чаще всего приходится заниматься реаниматологам.

Цель занятия

Уметь применять знания о физиологических и патологических компонентах мочи для решения вопросов диагностики, профилактики и прогноза заболеваний, связанных с почечной и внепочечной патологией.

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

- **нормальной физиологии человека:**
 - механизм образования мочи почками;
 - распределение воды в организме, аквапорины;
 - состав интерстициальной (межклеточной) и клеточной жидкостей организма;
 - механизм действия Na^+/K^+ - АТФазы;

- **гистологии:**
 - строение нефрона.
- **общей химии:**
 - понятия «осмотическое давление», «осмоляльность», «гипотоническое и гипертоническое изменение объёма», «рН», «буферные системы»;
- **биоорганической химии:**
 - кетоновые тела, альбумины, глобулины;

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Под действием гидростатического давления кровь фильтруется через полупроницаемую мембрану и попадает в пространство капсулы Шумлянско-Боумена — это первичная моча. Каков ее качественный состав?

- А. Содержит форменные элементы крови.
- Б. Аналогична составу крови, но не содержит белков и форменных элементов.
- В. Аналогична составу крови и содержит белки с молекулярной массой до 70 кДа, но отсутствуют форменные элементы.
- Г. Состав первичной мочи отличается от состава плазмы крови по всем компонентам.

Задание 2. Каналец нефрона состоит из 3-х отделов: проксимального канальца, петли Генле и дистального канальца. В канальцах первичная моча подвергается реабсорбции. Параллельно осуществляется и секреция определенных веществ. Какое количество глюкозы реабсорбируется в проксимальном канальце здоровой почки?

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

Задание 3. В дистальном канальце нефрона наряду с процессами, связанными с разведением и концентрированием мочи, осуществляются реабсорбционные и секреторные процессы, главная задача которых — сохранить кислотно-щелочное равновесие организма и, в частности, постоянство рН крови. Какие ионы секреторируются канальцами?

- А. K^+ .
- Б. Na^+ .
- В. H^+ .
- Г. NH_4^+ .
- Д. Cl^- .
- Е. HPO_3^- .

Задание 4. У больного появились отёки. Каковы возможные причины?

- А. Нарушение белоксинтезирующей функции печени.
- Б. Стужение крови.
- В. Протеинурия.
- Г. Недостаток вазопрессина.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Нормальные показатели объема мочи, ее плотности, цвета, прозрачности. Факторы, обуславливающие изменения показателя кислотности мочи.
2. Неорганические составные части мочи.
3. Органические составные части мочи в норме: мочевины, мочевая кислота, креатинин, аминокислоты, безазотистые органические компоненты мочи, гормоны и их метаболиты.
4. Диагностическое значение определения в моче аминокислот, которыми богаты специализированные белки: гидроксипролина (в коллагене), 3-метилгистидина (в актине и миозине). Определение метаболитов аминокислот для диагностики фенилкетонурии (нарушение обмена фенилаланина), алкаптонурии (нарушение обмена тирозина), гиперпролинурии (нарушение окисления пролина), цитруллинурии (нарушение синтеза мочевины).

5. Диагностическое значение определения патологических составных частей мочи:
- а) протеинурия почечная и внепочечная; ферменты, определяемые в моче с диагностической целью;
 - б) глюкозурия при сахарном диабете и почечная глюкозурия;
 - в) гематурия почечная и внепочечная, гемоглобинурия;
 - г) кетонурия при голодании, диабете, ацидозах иного происхождения;
 - д) желчные пигменты, определяемые с целью дифференциальной диагностики желтух, порфирины.
6. Механизм действия гормонов, регулирующих водно-минеральный обмен (вазопрессина, натрий-уретического гормона, альдостерона).

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 599–606.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 359–375, 541–543.

Дополнительная

1. *Чиркин, А. А.* Диагностический справочник терапевта / А. А. Чиркин, А. Н. Окорочков, И. И. Гончарик. Мн. : Беларусь, 1993. С. 369–390.
2. *Камышников, В. С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В. С. Камышников. Мн. : Беларусь, 2000. С. 171–208, 275–347, 358–428.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Чтобы заподозрить у больного сахарный диабет, обратите внимание на объем выделяемой мочи и ее удельный вес. При диабете, несмотря на большую суточную экскрецию мочи, ее удельный вес остается высоким. Для уточнения диагноза необходимо определить содержание глюкозы в моче и сравнить эти данные с результатами определения уровня гликемии.

1.1. Решите задачу. Подберите пару симптомов, характерных для диабета:

- | | |
|--------------------|--------------------------|
| А. D мочи = 1,02. | 1. Суточный диурез 6 л. |
| Б. D мочи = 1,022. | 2. Суточный диурез 2 л. |
| В. D мочи = 1,20. | 3. Суточный диурез 1 л. |
| Г. D мочи = 1,5. | 4. Суточный диурез 20 л. |

1.2. Решите задачу. Подберите пару симптомов, характерных для диабета:

- | | |
|------------------------|---------------------------|
| А. Глюкозурия — нет. | 1. Гликемия 5,5 ммоль/л. |
| Б. Глюкозурия — 1%. | 2. Гликемия 15,0 ммоль/л. |
| В. Глюкозурия — следы. | 3. Гликемия 8,0 ммоль/л. |

Задание 2. Для дифференциальной диагностики различного рода желтух изучают цвет мочи и определяют в ней наличие желчных пигментов. Необходимо вспомнить, каким образом осуществляется распад желчных пигментов, содержание каких соединений увеличивается в крови и моче, каким образом изменяется цвет стула. Следует помнить, что через почечный фильтр способен проникать связанный билирубин (в отличие от свободного билирубина, не способного преодолеть почечный «фильтр», молекула диглюкуронида билирубина мала).

2.1. Решите задачу. Подберите параметры анализа мочи, характерные для механической желтухи:

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| А. Моча «цвета пива». | 1. Билирубин. |
| Б. Моча соломенно-желтая. | 2. Уробилин (истинный). |
| В. Моча красного цвета. | 3. Стеркобилиноген. |
| Г. Светло-желтая моча. | 4. Урохром. |

Задание 3. Диагностика панкреатита во многом основывается на определении активности ферментов мочи. Вспомните, какие ферменты, способные перейти в мочу,

секретирует поджелудочная железа. Назовите фермент, активность которого обязательно определяется в моче при панкреатите:

А. Фосфоорилаза. Б. Амилаза. В. Лактатдегидрогеназа. Г. Пепсин. Д. Сахараза.

Задание 4. Усвоить, что в случае снижения объема крови включаются два механизма:

- 1) раздражаются рецепторы гипоталамуса, что приводит к активации синтеза вазопрессина;
- 2) раздражаются рецепторы юстагломерулярного аппарата почек, что сопровождается выбросом в кровоток ренина.

Используя приведенную схему, рассмотрите основные эффекты гормонов и ренина.



Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. В клинику поступил больной с жалобами на обильное и частое мочеиспускание, жажду, которые его беспокоят даже ночью. Суточное количество мочи = 10 л с низкой относительной плотностью. Каков предположительный диагноз?

- А. Сахарный диабет. Б. Несахарный диабет.
В. Болезнь Иценко-Кушинга. Г. Болезнь Аддисона.
Д. Микседема.

Задание 2. У больного острым гломерулонефритом суточное количество мочи = 500 мл. Как называется этот симптом?

- А. Анурия. Б. Полиурия. В. Олигурия.
Г. Никтурия. Д. Изостенурия.

Задание 3. У больного острым гломерулонефритом выявлена макрогематурия. Какой цвет мочи у данного больного?

- А. Красный. Б. Коричневый. В. Черный.
Г. Розовый. Д. Цвета мясных помоев.

Задание 4. У больного в результате отравления солями свинца в моче появилось много протопорфиринов. Какой цвет мочи у данного больного?

- А. Зеленый. Б. Коричневый. В. Черный.
Г. Розовый. Д. Цвета мясных помоев.

Задание 5. У больного инфекционным гепатитом с желтухой в моче выявлено высокое содержание билирубина. Какой цвет мочи у данного больного?

- А. Соломенно-желтый. Б. Коричневый.
В. Черный. Г. Розовый.
Д. Цвета мясных помоев.

Задание 6. У больного хроническим нефритом выявлено нарушение концентрационной функции почек. Как называется это состояние?

- А. Никтурия. Б. Изостенурия. В. Олигурия.
Г. Анурия. Д. Полиурия.

Задание 7. У больного в моче содержание мочевой кислоты составило 9,5 ммоль/24 ч. Какую патологию можно заподозрить?

- А. Кахексия. Б. Оротатацидурия.
В. Почечная недостаточность. Г. Печеночная недостаточность.
Д. Подагра.

Задание 8. Больному, страдающему хроническим гепатитом, была проведена нагрузка бензоатом натрия. При этом об обезвреживающей функции печени судили на основании обнаружения в моче:

- А. Бензойной кислоты. Б. Лимонной кислоты. В. Валериановой кислоты.
Г. Гиппуровой кислоты. Д. Щавелевой кислоты.

Задание 9. Содержание какого из продуктов белкового обмена повысилось в моче у спортсмена с развитой мускулатурой после спортивных соревнований?

- А. Мочевой кислоты. Б. Креатина. В. Креатинина.
Г. Мочевины. Д. Аммиака.

Задание 10. Для уточнения диагноза «прогрессирующая мышечная дистрофия» у больного был сделан анализ мочи. Какое соединение при этом будет обнаруживаться в моче?

- А. Порфирины. Б. Креатин. В. Креатинин.
Г. Миоглобин. Д. Кальмодулин.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – В; 2 – А; 3 – А, В, Г; 4. А, В.

Для самостоятельной работы:

1.1 — Г – 1. 1.2 — Б – 2.

2.1 — А – 1.

3 — Б.

Самостоятельная работа (2 часа)

Инструкции к практическому занятию

Работа 1. Определение удельного веса (плотности) мочи

Поскольку отдельные порции мочи отличаются по удельному весу и химическому составу, удельный вес определяют в моче, собранной за сутки. В норме удельный вес мочи коррелирует с количеством «суточной» мочи и составляет 1,010–1,025. При различных состояниях он может колебаться от 1,000 до 1,060.

Ход работы. В цилиндр наливают мочу и осторожно погружают в нее урометр. Отсчет ведется по делению шкалы урометра, соответствующему нижнему мениску жидкости.

Ответ:

Работа 2. *Определение кислотности мочи*

В норме реакция мочи слабокислая.

Ход работы. На лакмусовую бумажку наносят каплю мочи и определяют ее реакцию:

- 1) синяя лакмусовая бумага краснеет, красная не изменяет цвета — кислая реакция;
- 2) красная бумага синееет, синяя не изменяет цвета — щелочная реакция;
- 3) обе бумаги не изменяют своего цвета — нейтральная реакция.

Можно использовать и другие индикаторные бумаги.

Ответ:

Работа 3. *Качественное определение неорганических составных частей мочи*

Из минеральных солей более всего с мочой выделяется хлористого натрия — 8–15 г/сутки.

1. **Определение хлоридов.** Ионы хлора реагируют с азотнокислым серебром с образованием осадка хлористого серебра, не растворяющегося в азотной кислоте.

Ход работы. К 1 мл мочи (20 капель) добавляют 3–5 капель 1% раствора AgNO_3 и 2 капли 10% раствора азотной кислоты. Выпадает белый осадок AgCl , темнеющий на свету, нерастворимый в азотной кислоте.

2. **Определение сульфатов.** В кислой среде сульфаты с хлористым барием образуют белый осадок BaSO_4 .

Ход работы. К 20 каплям мочи приливают 5 капель 10% раствора HCl и по каплям, медленно, добавляют раствор BaCl_2 до образования осадка. Выпавший осадок отфильтровывают. В фильтрате обнаруживают соли эфирокислот, нагревая фильтрат в кипящей водяной бане (5–10 мин). При этом снова появляется муть из-за того, что из эфирокислот освобождается серная кислота.

3. **Определение фосфатов.** Фосфаты мочи при реакции с молибденовым реактивом образуют желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

Ход работы. В пробирку наливают 20–30 капель молибденового реактива и нагревают раствор до закипания (не кипятить). Затем добавляют несколько капель мочи. Выпадает желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

4. **Определение кальция.** Кальций мочи выпадает в осадок при добавлении щавелевокислого аммония.

Ход работы. К 20 каплям мочи приливают 1–2 капли 10% раствора уксусной кислоты и 2–3 капли 5% раствора щавелевокислого аммония. Выпадает кристаллический осадок щавелевокислого кальция.

Результат:

Работа 4. *Качественное определение органических составных частей мочи*

1. **Определение белка.** В норме в моче определяются следы белка.

1.1. **Проба Геллера.** Под действием азотной кислоты белок образует нерастворимый осадок.

Ход работы. В пробирку осторожно наливают около 1 мл концентрированной HNO_3 и сверху настилают 1 мл мочи. При наличии в моче белка на границе жидкостей появляется мутное беловатое кольцо.

1.2. **Осаждение белка сульфосалициловой кислотой.** Эта проба является самой чувствительной реакцией на белок.

Ход работы. К 20 каплям мочи добавляют 5 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка (помутнение раствора).

2. *Определение глюкозы.* В норме глюкоза в моче не определяется. Для качественного определения глюкозы в моче пользуются следующими реакциями:

2.1. Реакция Троммера. В щелочной среде в присутствии глюкозы при добавлении CuSO_4 образуется желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

Ход работы. К 5 каплям исследуемой мочи прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натрия и 5 капель 1% раствора сернокислой меди. Нагревают.

2.2. Реакция Фелинга. Проба основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Преимущество этой реакции заключается в том, что сегнетова соль в составе реактива Фелинга связывает избыток гидрата окиси меди, из которого при нагревании образуется окись меди черного цвета, мешающая реакции.

Ход работы. К 20 каплям исследуемой мочи приливают равный объем жидкости Фелинга и нагревают до кипения.

2.3. Реакция Ниландера. В реактив Ниландера входит азотнокислый висмут. В щелочной среде образуется гидрат окиси висмута, который, восстанавливаясь в присутствии глюкозы до металлического висмута, окрашивает жидкость в черный цвет.

Ход работы. К 20 каплям исследуемой мочи приливают 10–20 капель реактива Ниландера и кипятят 1–2 мин. Жидкость бурет, затем образуется черный осадок металлического висмута.

Результат:

3. *Определение кровяных пигментов.* В норме в моче кровяных пигментов нет.

Гваяковая проба. Гваяковая смола в присутствии пероксида водорода под влиянием пероксидазы крови восстанавливается в азонид гваяковой смолы, имеющий синий цвет.

Ход работы. В пробирку наливают 20 капель мочи, 5 капель гваяковой смолы и несколько капель H_2O_2 . В присутствии крови появляется синее окрашивание.

Результат:

4. *Определение кетоновых тел.* Кетоновые тела обнаруживаются в моче при диабете, голодании и других ацидотических состояниях. Метод основан на цветной реакции, которую дают кетоновые тела с нитропруссидом натрия.

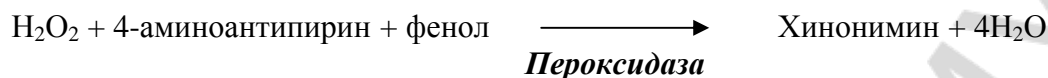
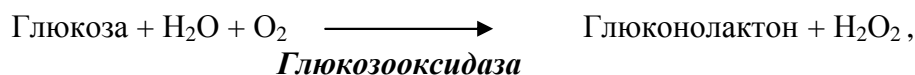
Ход работы. К 2 каплям мочи добавляют 2 капли 10% NaOH и 2 капли нитропрусида натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 6 капель концентрированной уксусной кислоты — появляется вишневое окрашивание.

Результат:

Работа 5. *Количественное определение органических составных частей мочи*

5.1. Определение содержания глюкозы в моче ферментативным (глюкозооксидазным) методом. В норме глюкоза в моче присутствует в следовых количествах и обычными методами не определяется.

Принцип метода. Метод основан на следующих ферментативных реакциях:



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

Ход работы

	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл
В центрифужные пробирки вносят:		
Моча	0,1	—
Стандартный раствор глюкозы	—	0,1
Дистиллированная вода	1,0	1,0
Перемешивают		
Полученный раствор отбирают в сухие пробирки	0,2	0,2
Рабочий раствор ферментов	2,0	2,0
Перемешивают и инкубируют реакционную смесь 10 мин при 37°C или 30 мин при комнатной температуре		

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

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

Расчет производят по формуле:

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

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

Проводят расчет суточного выделения глюкозы с мочой (с учетом диуреза 1200–1500 мл).

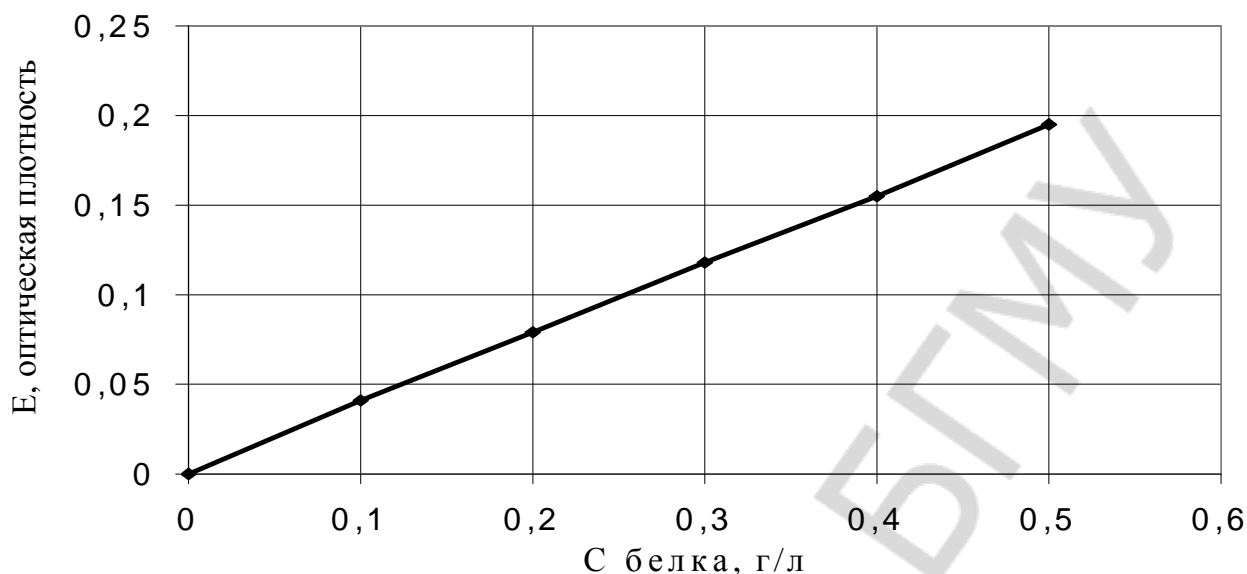
Ответ:

5.2. Определение концентрации белка в моче

Принцип метода. Метод основан на способности сульфосалициловой кислоты реагировать с белком, вызывая помутнение, интенсивность которого пропорциональна содержанию белка в моче.

Ход определения. К 1 мл прозрачной мочи добавляют 3 мл 3% раствора сульфосалициловой кислоты, смесь перемешивают и через 5 мин измеряют оптическую плотность содержимого пробирки на колориметре при красном светофильтре (длина волны 630–650 нм) в кювете шириной 10 мм против контрольной пробы (контрольная проба: к 1 мл мочи добавляют 3 мл изотонического раствора NaCl). Расчет производят по калибровочному графику. Расчет суточных потерь белка проводят с учетом диуреза (1200–1500 мл).

Калибровочный график для определения содержания общего белка в моче



Ответ:

Клинико-диагностическое значение определения содержания белка в моче. В моче в норме содержатся «следы белка» (альбумин и глобулины, не более 0,15 г/сут). Повышенное содержание белка в моче — **протеинурия** — отражает нарушение баланса между процессами его фильтрации и реабсорбции и отмечается при заболеваниях почек, мочевыводящих путей, усиленном распаде белков тканей. Функциональные почечные протеинурии связаны с увеличением проницаемости почечного фильтра либо замедлением тока крови в клубочках (под влиянием переохлаждения, физического и психического перенапряжения).

Вывод:

Подпись преподавателя:

29. ТЕМА: БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ. РОЛЬ БЕЛКОВ, ЛИПИДОВ, УГЛЕВОДОВ И ВИТАМИНОВ.

Актуальность темы

Использование пищи живыми организмами обозначается термином «питание». Различают три важнейших категории или составных компонента пищи:

1) питательные вещества — источники энергии и пластического материала (белки, липиды, углеводы);

2) микрокомпоненты пищи – (витамины и минеральные соединения, необходимые для биохимических процессов);

3) волокнистые структуры (неперевариваемые полисахариды, необходимые для нормального функционирования пищеварительной системы).

Осуществление теми или иными компонентами пищи, в том числе незаменимыми факторами питания, своих функций в организме происходит через биохимические превращения. Понимание того, каким образом различные компоненты пищи вовлекаются в них, поможет осмыслить необходимость и суть сбалансированного питания, своевременно распознавать и активно действовать при столь распространенном в клинической практике состоянии недостаточного питания. Дефицит любого витамина ведет к появлению специфических нарушений реакций обмена с характерными клиническими проявлениями. Знание коферментных функций витаминов в организме позволяет понять механизмы развития и профилактики гипо- и авитаминозов и использовать витамины с профилактической и лечебной целью.

Цель занятия

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

Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

– **биоорганической химии:**

- строение и свойства гетероциклических соединений — пиридина, пиримидина, пиррола, тиазола, порфирина, парааминобензойной кислоты, никотиновой кислоты;
- биологически активные гетерофункциональные соединения бензольного и гетероциклического рядов, метаболиты и биорегуляторы;

– **биохимии:**

- коферменты и их роль в процессах метаболизма;
- коферментные формы водорастворимых витаминов и их участие в метаболизме;
- пути катаболизма белков, жиров, углеводов в клетках.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Какое из нижеследующих выражений относительно панкреатических ферментов правильное?

- А. Все они секретируются в виде неактивных проферментов.
- Б. Все они секретируются ацинарными клетками.
- В. Все они секретируются в ответ на холецистокинин.
- Г. Для оптимальной активности им требуется рН около 7.
- Д. Они важны только для переваривания белков.

Задание 2. Какое из нижеследующих выражений правильное?

А. Действие адреналина и глюкагона направлено на увеличение уровня гликогенфосфоорилазы.

Б. Интенсивность расщепления гликогена в состоянии натощак равна интенсивности его синтеза.

В. Дефосфорилирование гликогенсинтетазы в ответ на действие инсулина приводит к увеличению её активности.

Г. цАМФ — это вторичный посредник, который образуется в ответ на действие адреналина и глюкагона в печени.

Д. Фосфорилирование гликогенфосфоорилазы в ответ на действие глюкагона увеличивает её активность.

Задание 3. Какова функция гормон-чувствительной липазы в жировой ткани?

А. Гидролизует гормон, который участвует в расщеплении жира.

Б. Синтезирует новые жировые клетки из простых жирных кислот.

В. Гидролизует триацилглицеролы с образованием жирных кислот для других клеток.

Д. Синтезирует длинноцепочечные жирные кислоты для синтеза липидов в других клетках.

Задание 4. Какую роль играет генетический фактор в перспективе достижения определенного веса тела? Что такое ген Ob и какую роль ему отводят в развитии ожирения у человека? Какие аргументы можно привести в пользу того, что этот ген связан с контролем веса?

Задание 5. Лабораторный анализ после гидролиза вещества выявил в гидролизате аденин, рибозу и фосфорную кислоту. Какова структура исходного вещества?

А. Пептид. Б. Нуклеозид. В. Мононуклеотид. Г. Пентозофосфат. Д. Олигосахарид.

Задание 6. Вспомните, что витамины принимают участие в процессах метаболизма после их активации в клетках, т. е. превращения в коферментную форму.

6.1. Объясните, чем руководствовался врач, заменив больному нейродермитом пиридоксин на пиридоксальфосфат.

6.2. Подберите соответствующие пары витамин — кофермент:

А. НАД⁺. 1. Производное пиридоксина.

Б. ТПФ. 2. Производное рибофлавина.

В. NS-КоА. 3. Производное тиамина.

Г. ФАД. 4. Производное никотиновой кислоты.

Д. ПФ. 5. Производное пантотеновой кислоты.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Вопросы для обсуждения

1. Пищевая ценность белков, жиров, углеводов. Роль волокнистых полисахаридов для работы пищеварительного тракта и обменных процессов в организме. Незаменимые факторы питания.

2. Энергия — потребность, происхождение и расходование в организме.

3. Синдром недостаточного питания – причины развития и характерные проявления квашиоркора и маразма.

4. Химическая природа, коферментные формы, молекулярные механизмы действия и роль в процессах метаболизма водорастворимых витаминов: а) тиамина (В₁); б) рибофлавина (В₂); в) пантотеновой кислоты; г) ниацина (РР); д) пиридоксина (В₆); е) фолиевой кислоты (В₉); ж) кобаламина (В₁₂); з) биотина (Н); и) аскорбиновой кислоты (С).

5. Химическая природа, механизмы действия и роль в процессах метаболизма жирорастворимых витаминов А, Е, D, К.

6. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (вит. Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота и др.

Литература

Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М. : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 87–130.
2. *Биологическая химия* / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Выш. шк., 2013. С. 332–358.
3. *Конспект лекций*.

Дополнительная

1. *Марри Р. Биохимия человека* / Р. Мари [и др.]. М. : Мир, 1993.
2. *Морозкина Т. С. Витамины: краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармакологических и биологических специальностей* / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. Мн. : Асар, 2002.

Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Запомните суточную потребность человека в витаминах, существенное снижение которой неизбежно приводит к нарушению биохимических процессов и развитию заболеваний. Умейте назвать признаки гиповитаминозов.

1.1. Решите задачу. Как было установлено, синдром Вернике-Корсакова, проявляющийся нарушением тонуса мышц конечностей, снижением умственной способности и дезориентацией, связан с нарушением прочной связи апофермента и кофермента в ферменте транскетолазе. Симптомы этого синдрома могут проявляться у алкоголиков вследствие снижения поступления в организм витамина. Назовите этот витамин и его коферментные формы. С какими ферментами кроме транскетолазы работает этот витамин?

Задание 2. Уясните энергозатраты организма взрослого человека в состоянии покоя и лабильность этого показателя в условиях патологии. Умейте объяснить, куда используется АТФ в состоянии покоя. Запомните реальный и желательный вклад в энергопродукцию белков, жиров и углеводов.

2.1. Ответьте на вопросы. Как поступает организм с образовавшимся избытком аминокислот, когда Вы потребляете с пищей или в виде пищевых добавок большее их количество, чем требуется для синтеза новых белков? Отличаются ли механизмы использования избытка аминокислот от механизмов использования избытка углеводов или липидов? Укажите эти различия.

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

А. Реально — углеводы 60%. Б. Желательно — алкоголь 3%.

В. Реально — белок 15%. Г. Желательно — жир 40%. Д. Реально — алкоголь 0%.

Задание 3. Запомните, что синдром недостаточного питания проявляется в двух клинических формах: квашиоркоре и маразме. Умейте указать сходство и принципиальные различия между ними.

3.1. Решите задачу. У больного после операции резекции тощей кишки, которая была произведена для удаления опухоли, в течение нескольких недель развилась гипоальбуминемия и отечность тканей. При осмотре больной не выглядел истощенным, но была заметна бледность кожных покровов. Какую патологию позволяют заподозрить врачу эти симптомы? Какой подход можно было бы предложить для преодоления этого состояния у пациента?

Задание 4. Запомните, что наряду с незаменимыми факторами питания имеются условно незаменимые, которые не ограничиваются только аминокислотами аргинином и гистидином; они могут стать незаменимыми при определенных состояниях организма. Умейте объяснить, почему при выборе пищевых источников незаменимых жирных кислот необходимо различать омега-3 и омега-6 кислоты. Обратите внимание на преимущества и недостатки неперевариваемых полисахаридов в составе пищи.

Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.

Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. Данные врачебного осмотра пожилой женщины соответствовали периферической нейропатии. Лабораторные анализы подтвердили недостаточность тиамина. Активность каких процессов снижена при данном гиповитаминозе?

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

Задание 2. У больного после перенесенного инфаркта в течение двух суток значительно увеличилась активность аспаратаминотрансферазы в крови. Указать кофермент данного фермента и тип катализируемой им реакции. Производным какого витамина является этот кофермент?

Задание 3. При недостатке фолиевой кислоты страдает прежде всего кроветворение и деятельность желудочно-кишечного тракта. Какие соединения входят в состав B_9 ? В реакциях какого типа участвует коферментная форма (назвать ее) этого витамина?

Задание 4. Гиповитаминоз пантотеновой кислоты практически не встречается, т. к. она обнаружена повсеместно: в тканях животных, растений, микроорганизмов. Указать кофермент данного витамина, назвать тип реакций, в которых он участвует. Изобразить схематически строение коферментной формы пантотеновой кислоты.

Задание 5. У мужчины, в течение многих лет злоупотреблявшего алкоголем, появились воспаления слизистой оболочки языка, губ, помутнение хрусталика, общая мышечная слабость. В анализе крови установлено значительное снижение активности глутатион-редуктазы эритроцитов. Активность фермента выросла после добавления в пробу рибофлавина. Какой кофермент входит в состав глутатион-редуктазы эритроцитов?

- А. ТПФ.
- Б. ФАД.
- В. НАД⁺.
- Г. ТГФК.
- Д. ПФ.

Задание 6. Больному сделана операция резекции желудка, после чего вследствие недостаточности витамина B_{12} у него развилась анемия. Назовите коферментные формы этого витамина. В каких реакциях они принимают участие?

Задание 7. К врачу обратился пациент с жалобами на воспалительные процессы кожи (дерматит), сопровождающиеся усиленной деятельностью сальных желез, выпадением волос — типичными признаками недостаточности витамина Н. Объясните, какие реакции обмена нарушаются при этом.

Задание 8. Какие из нижеперечисленных продуктов питания содержат много эйкозопентаеновой и докозагексаеновой кислот?

- А. Креветки.
- Б. Семга.
- В. Грудное молоко человека.
- Г. Соевое масло.

Задание 9. Каким образом растворимые волокна в составе принимаемой пищи помогают снизить уровень холестерина в крови? Выберите правильный ответ.

- А. Они денатурируют холестерол в желудке.
- Б. Они гидролизуют холестерол в кишечнике.
- В. Они задерживают холестерол в кишечнике и таким образом замедляют его всасывание.
- Г. Они усиливают экскрецию желчи, ускоряя обмен холестерола.

Задание 10. Какой источник энергии обеспечивает 90% глюкозы, необходимой в качестве топлива в течение первых нескольких дней голодания?

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

Задание 11. Чем обусловлено преимущественное запасание жира на бедрах у женщин и вокруг живота — у мужчин?

- А. Различием уровня инсулина в крови.
- Б. Разницей в активности липопротеинлипазы.
- В. Разницей уровня циркуляции липидтранспортных белков.
- Г. Разницей активности липопротеинсинтетазы.

Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1 – А, В, Г. 2 – В, Г, Д. 3 – В. 5 – В. 6.2 — А – 4, Б – 3, В – 5, Г – 2, Д – 1.

Для самостоятельной работы

1.1 – В₁, его коферментные формы ТМФ, ТДФ (ТПФ), ТТФ.

2.2 – В.

3.1 – Квashiоркор.

Самостоятельная работа (60 минут)

Инструкция к практическому занятию

Для обнаружения витаминов и определения их количества в различных веществах и биологических жидкостях существуют реакции, основанные на цветных реакциях, характерных для той или иной группировки, входящей в витамин.

Работа 1. *Качественные реакции на витамин В₁*

Витамин В₁ состоит из пиримидинового и тиазольного колец. Витамин В₁ получил название тиамин поскольку содержит серу и азот.

1. Реакция окисления

Принцип метода. В щелочной среде тиамин окисляется феррицианидом калия в тioxром, раствор которого флюоресцирует синим цветом при облучении ультрафиолетовыми лучами.

Ход работы. В пробирку вносят 1 каплю 5% раствора тиамин, прибавляют 5–10 капель 10% раствора едкого натра, 1–2 капли 5% раствора феррицианида калия, взбалтывают полученную смесь. Ставят пробирку в штатив предварительно прогретого флюороскопа и наблюдают синюю флюоресценцию.

2. Диазореакция

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

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

Вывод:

Работа 2. *Качественная реакция на витамин В₂*

Принцип метода. Окисленная форма витамина В₂ представляет собой желтое флюоресцирующее в ультрафиолетовых лучах вещество. Реакция на витамин В₂ основана на его способности легко восстанавливаться. При этом раствор витамина В₂, обладающий желтой

окраской, приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, т. к. восстановленная форма витамина В₂ бесцветна.

Ход работы. В пробирку наливают 10 капель раствора витамина В₂, добавляют 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и опускают зернышко металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается. Сравнивают обе формы витамина В₂ по флюоресценции.

Работа 3. *Качественная реакция на витамин РР*

Принцип метода. Витамин РР при нагревании с раствором ацетата меди образует плохо растворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Ход работы. Наливают в пробирку 20 капель 3% раствора витамина РР (перед определением раствор обязательно следует взболтать) и нагревают до кипения; при этом мутный раствор становится прозрачным. Взболтав 5% раствор ацетата меди, приливают 20 капель его к нагретому раствору витамина РР. Содержимое пробирки доводят до кипения и сразу охлаждают под струей холодной воды. На дне пробирки выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Вывод:

Работа 4. *Качественная реакция на витамин В₆*

Принцип метода. Витамин В₆ при взаимодействии с раствором хлорного железа образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора витамина В₆ приливают равное количество 1% раствора хлорного железа и перемешивают. Развивается красное окрашивание.

Вывод:

Работа 5. *Качественная реакция на витамин В₁₂*

В₁₂ — единственный витамин, содержащий в своей структуре металл (кобальт).

Принцип метода. При взаимодействии ионов кобальта с тиомочевинной при нагревании образуется роданид кобальта зеленого цвета.

Ход работы. На бумажный фильтр наносят 2–3 капли раствора тиомочевины и высушивают над пламенем спиртовки. После этого наносят на фильтр 1–2 капли минерализата (В₁₂) и снова нагревают фильтр над спиртовкой. На фильтре, чаще по краю, появляется зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

Вывод:

Работа 6. *Количественное определение витамина С*

Принцип метода. Метод основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, а при восстановлении обесцвечивается; в щелочной среде окраска синяя. Для предохранения витамина С от разрушения исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления розового окрашивания.

Определение содержания витамина С в картофеле

Ход работы. Отвешивают 1 г картофеля и растирают его в ступке с 2 мл 10% раствора соляной кислоты (чтобы картофель не темнел), постепенно приливая 8 мл дистиллированной воды. Полученный гомогенат фильтруют через марлю в стаканчик, и фильтрат титруют 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 с.

Для расчета содержания аскорбиновой кислоты в таких продуктах, как капуста, картофель, хвоя, шиповник и др., используют формулу:

$$X = (0,088 \cdot A \cdot 100) / B,$$

где x — содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах на 100 г продукта; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, мг, соответствующее 1 мл 2,6-дихлорфенолиндофенола; A — результат титрования 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл; B — количество продукта, взятое для анализа, г; 100 — пересчет на 100 г продукта.

В 100 г картофеля обычно содержится 1–5 мг витамина С.

Ответ:

Вывод:

Определение содержания витамина С в моче

Определение содержания витамина С в моче дает представление о запасах этого витамина в организме, так как имеется соответствие между концентрацией витамина в крови и количеством этого витамина, выделяемым с мочой. Однако при гиповитаминозе С содержание аскорбиновой кислоты в моче не всегда понижено. Часто оно бывает нормальным, несмотря на большой недостаток этого витамина в тканях и органах.

У здоровых людей введение *per os* 100 мг витамина С быстро приводит к повышению его концентрации в крови и в моче. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, задерживают принятый витамин С и его концентрация в моче не повышается. Моча здорового человека содержит 20–30 мг/сутки витамина С или 113,55–170,33 мкмоль/сут. У детей уровень этого витамина понижается при цинге, а также при острых и хронических инфекционных заболеваниях.

Ход работы. В стаканчик или колбочку отмеривают 10 мл мочи и 10 мл дистиллированной воды, перемешивают, подкисляют 20 каплями 10% раствора хлористоводородной кислоты и титруют 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Для расчета содержания аскорбиновой кислоты в моче используют формулу:

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B},$$

где x — содержание аскорбиновой кислоты в мг/сут; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты (мг) соответствующее 1 мл 2,6-дихлорфенолиндофенола; A — результат титрования 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл; B — объем мочи, взятый для титрования, мл; B — среднее суточное количество мочи (для мужчин 1500 мл, для женщин 1200 мл).

Ответ:

Вывод:

Подпись преподавателя:

30. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ: «ГОРМОНЫ, БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ, БИОХИМИЯ КРОВИ, БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ»

1. Свойства гормонов. Особенности биологического действия.
2. Рецепторы к гормонам, классификация, строение мембранных рецепторов.
3. G-белки, их роль в механизме действия гормонов, связывающихся с мембранными рецепторами.
4. Перечислить эффекторные системы и вторичные посредники проведения гормонального сигнала в клетку. Механизмы образования вторичных посредников.
5. Роль кальция в механизме передачи гормонального сигнала.
6. Растворимая и мембраносвязанная гуанилатциклазы, механизм активации, реализация эффекта.
7. Механизмы усиления гормонального сигнала в клетке.
8. Гормоны — белки: простые и сложные. Место образования, пример молекулярного действия.
9. Гормоны — производные аминокислот. Место образования, механизмы молекулярного действия.
10. Общие принципы синтеза гормонов белково-пептидной природы.
11. Общие принципы синтеза гормонов стероидной природы.
12. Вазопресин, химическая природа, механизм действия. Влияние на метаболизм.
13. Гормон роста, механизм действия, влияние на метаболизм.
14. Йодсодержащие гормоны щитовидной железы. Химическая природа, особенности синтеза, механизм действия, влияние на метаболизм.
15. Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфора в организме. Место синтеза, химическая природа, механизм действия.
16. Глюкагон. Химическая природа, место синтеза, механизм действия, влияние на метаболизм углеводов и липидов.
17. Гормоны мозгового вещества надпочечников. Химическая природа, схема синтеза, механизм действия.
18. Гормоны коры надпочечников: глюко- и минералокортикоиды. Химическая природа, особенности строения рецепторов, механизм действия, влияние на метаболизм.
19. Инсулин. Химическая природа, особенности синтеза, строение рецепторов, механизмы передачи гормонального сигнала. Влияние на метаболизм углеводов, липидов, белков.
20. Половые гормоны, химическая природа, особенности строения рецепторов, механизм передачи сигнала.
21. Сахарный диабет. Нарушения обмена углеводов, биохимическая диагностика, диагностическое значение гликемических кривых при сахарной нагрузке.
22. Сахарный диабет: механизм кетонемии и нарушение реакций гликозилирования. Метаболизм глюкозы в инсулиннезависимых тканях. Восстановительный путь обмена глюкозы, его роль в норме и при сахарном диабете.
23. Печень как главный орган гомеостаза. Функции печени.
24. Роль печени в обмене углеводов. Механизм гиперлактатемии и гипогликемии при алкогольном токсикозе.
25. Роль печени в обмене белков.
26. Роль печени в обмене липидов. Механизмы развития жировой инфильтрации и дегенерации печени (в том числе при алкоголизме).
27. Антитоксическая функция печени. Обезвреживание в печени токсичных веществ, нормальных метаболитов, лекарственных препаратов.
28. Роль печени в пигментном обмене. Биосинтез гемопroteинов и его регуляция. Распад гемоглобина в клетках РЭС. Метаболизм желчных пигментов. Порфирии.

29. Желтухи. Причины возникновения. Механизмы развития патологических изменений. Лабораторная диагностика.
30. Биохимические методы диагностики заболеваний печени.
31. Гемоглобин (структура, физиологические формы гемоглобина, производные гемоглобина, аномальные формы гемоглобина).
32. Механизмы транспорта кислорода и углекислого газа кровью. Виды и причины гипоксии.
33. Буферные системы крови (разновидности, компоненты, механизм действия, буферная емкость).
34. Индикаторные ферменты крови и их диагностическое значение.
35. 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).
36. Что понимают под гемостазом? Представление о механизмах гемостаза. Три основных структурно-функциональных компонента гемостаза. К каким патологическим состояниям могут привести нарушения в системе гемостаза?
37. Функциональные звенья системы свертывания крови и их биологическая роль.
38. Свертывающая система крови (компоненты и их происхождение). Гемокоагуляция (определение, время свертывания крови, фазы и их продолжительность). Внутренний и внешний механизм гемокоагуляции (схемы), общие этапы и отличия. Активаторы фактора Хагемана. Роль тромбоцитов в гемокоагуляции. Физиологические концентрации фибриногена в крови. Схема превращения фибриногена в фибрин. Молекулярные различия фибрина S и I. Физиологические концентрации кальция в крови и его участие в свертывании крови. Витамин К (химическая природа, разновидности, природные источники, роль в гемокоагуляции, викасол).
39. Антикоагулянтная система. Классификация естественных антикоагулянтов. Наиболее значимые естественные антикоагулянты, механизм их действия. Искусственные антикоагулянты (примеры). Механизм действия дикумарола и гепарина.
40. Фибринолитическая система, механизмы фибринолиза. Плазминовая система (компоненты и их происхождение, механизм действия).
41. Витамин В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), пантотеновая кислота, РР (никотиновая кислота), В₆ (пиридоксин), В₉ (фолиевая кислота), В₁₂ (кобаламин), Н (биотин), С (аскорбиновая кислота). Узнать витамин по нарисованной формуле, назвать химическую природу. Знать коферментные формы и участие в метаболизме, признаки гиповитаминоза, суточную потребность. Уметь нарисовать блок-схемы для коферментных форм витамина РР (НАД⁺ и НАДФ⁺) и витамина В₂ (ФМН и ФАД). Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (вит. Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота и др. Оценка обеспеченности организма витаминами.
42. Токоферол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гиповитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина Е.
43. Ретинол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гипо- и гипервитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина А.
44. Витамин К. Химическая природа, участие в процессе свертывания крови. Синтетические производные. Антивитамины.
45. Витамин D. Химическая природа, всасывание, механизм действия.
46. Энергозатраты организма взрослого человека в состоянии покоя в норме и изменения их при патологии. Пути использования АТФ в состоянии покоя. Вклад в энергопродукцию белков, жиров и углеводов.
47. 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).

48. Метаболические процессы депонирования углеводов и липидов пищи.

49. Пищевая ценность углеводов, липидов и белков. Незаменимые и условно незаменимые факторы питания. Роль пищевых волокон для работы пищеварительного тракта и обменных процессов в организме.

50. Квашиоркор и маразм — клинические формы синдрома недостаточности питания. Характерные черты, сходство и принципиальные отличия.

31. ТЕМА: КОНТРОЛЬ ПРАКТИЧЕСКИХ НАВЫКОВ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА: АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА И МОЧИ

Актуальность темы

В процессе изучения биологической химии студенты приобрели начальные знания и практические навыки качественного и количественного биохимического анализа, который находит широкое применение в лабораторной диагностике, например, анализы желудочного сока и мочи. В дальнейшем, в ходе изучения клинических дисциплин, будет осуществляться расширение и закрепление знаний по биохимической лабораторной диагностике.

Цель занятия

Проверить: 1) навыки студентов в проведении качественного и количественного анализа биологических жидкостей;

2) умение ориентироваться в результатах анализа и давать им правильную оценку;

3) понимание происхождения и диагностического значения патологических компонентов анализируемых биологических жидкостей.

Требования к исходному уровню знаний

Для качественного выполнения задания необходимо вспомнить из:

– **общей химии:**

▪ основы качественного и количественного анализа;

– **биологической химии:**

▪ физико-химические свойства и состав желудочного сока в норме и патологии;

▪ физико-химические свойства и состав мочи в норме и патологии.

Выполнение работы.

Получив индивидуальные контрольные пробы желудочного сока и мочи, студенты приступают к их анализу:

1) в желудочном соку определяют содержание свободной и связанной соляной кислоты, а также общую кислотность, используя методики занятия № 17. Полученный результат выражают в ммоль/л.

Результат:

2) в моче с помощью качественных реакций выявляют наличие патологических примесей (глюкозы, кетоновых тел, белка и эритроцитов). Если в моче присутствуют глюкоза или белок, проводят количественное определение веществ. Для исследования мочи используют методики, описанные в занятии № 28.

Результат:

Подпись преподавателя:

ПЕРЕЧЕНЬ ЭКЗАМЕНАЦИОННЫХ ВОПРОСОВ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

ПЕРВЫЕ ВОПРОСЫ

1. Аминокислоты. Строение, классификация, свойства, применение как лекарственных препаратов.
2. История развития представлений о структуре белков. Теория Фишера. Принципы классификации белков. Сходства и отличия белков и пептидов. Биологическая роль пептидов.
3. Физико-химические свойства белков. Растворимость белков в воде. Факторы устойчивости белковых растворов. Общие реакции на белки: цветные и осадения. Использование этих реакций в медицинской практике.
4. Методы разделения белков, пептидов и аминокислот (электрофорез; распределительная хроматография). Использование вестерн-блот анализа для идентификации белков.
5. Этапы исследования первичной структуры белков и пептидов. Методы очистки, разделения и определения молекулярной массы белков и пептидов (диализ, гель-хроматография, гель-электрофорез, изоэлектрофокусирование, аффинная хроматография).
6. Методы исследования аминокислотного состава (ионообменная хроматография) и аминокислотной последовательности белков и пептидов (Сэнджер, Эдман, Акабори, секвенатор Эдмана - Бэга). Сравнительный анализ гомологичных белков.
7. Первичная и вторичная структура белковой молекулы. Связи, стабилизирующие их. Особенности строения пептидной связи и их роль в формировании пространственной структуры белка (постулаты Полинга-Кори). Виды вторичной структуры.
8. Понятие о надвторичной структуре белка. Структурные и функциональные домены. Причины формирования третичной структуры белковой молекулы.
9. Третичная структура белка. Силы, стабилизирующие третичную структуру. Конформационные изменения при функционировании белков. Денатурация белка и факторы, ее вызывающие. Использование явления денатурации в медицинской практике.
10. Четвертичная структура белков. Преимущества существования белков с четвертичной структурой. Кооперативные изменения конформации полипептидных цепей при функционировании белков с четвертичной структурой на примере гемоглобина.
11. Белок-лигандное взаимодействие. Сложные белки. Типы связей между белковой и небелковой частями молекулы. Функции сложных белков в организме.
12. Мононуклеотиды, их строение и роль в клетке. Роль циклических нуклеотидов. Первичная структура нуклеиновых кислот. Особенности строения, функции и распределения в клетке ДНК и РНК. Метод анализа первичной структуры ДНК (Сэнджер).
13. Вторичная структура ДНК и РНК. Виды РНК и их функции. Взаимодействие нуклеиновых кислот с белками. Строение нуклеопротеинов. Особенности строения хромосом и рибосом.
14. Блот-анализ ДНК (Саузерн-блот) и метод «отпечатков пальцев» ДНК. Основные этапы и применение в медицинской практике.
15. Липиды, классификация липидов. Функции ацилглицеролов, фосфо- и гликолипидов в организме.
16. Сложные липиды. Представители. Строение, полярность, биологическая роль.
17. Жирные кислоты, классификация и номенклатура. Полиненасыщенные жирные кислоты. Происхождение и биологическая роль эйкозаноидов.
18. Углеводы. Классификация. Биологическая роль отдельных групп углеводов (моносахаридов, дисахаридов, гомо- и гетерополисахаридов).

19. Роль ферментов в процессах жизнедеятельности. Принципы номенклатуры и классификации ферментов. Единицы активности.
20. Химическая природа и общие свойства ферментов.
21. Коферменты, классификация и роль.
22. Механизм действия ферментов и ферментативная кинетика. Уравнения Михаэлиса-Ментен и Лайнуивера-Бэрка.
23. Множественные формы ферментов, их классификация. Изоферменты, их молекулярные разновидности, значение в клетке.
24. Понятие об активном и аллостерическом центрах ферментов. Роль пространственной структурной организации в их формировании.
25. История развития учения о витаминах. Общая характеристика и классификация витаминов, гипер-, гипо- и авитаминозы. Авитамины. Оценка обеспеченности организма витаминами.
26. Витамины группы А. Провитамины (каротины). Биологическая роль. Всасывание в кишечнике. Явления гипо-и гипервитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
27. Витамины группы Д. Провитамины. Биологическая роль. Явления гипо-и гипервитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
28. Витамины группы Е. Биологическая роль. Явления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
29. Витамины группы К. Биологическая роль. Гиповитаминоз. Пищевые источники. Суточная потребность. Викасол. Антагонисты витамина К.
30. Биотин, коферментная форма. Биологическая роль. Комплекс биотин-авидин. Явления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
31. Витамин В₁. Участие в построении коферментов. Роль в обмене веществ. Явления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
32. Витамин В₂. Состав и участие в образовании флавиновых коферментов. Биологическая роль. Пищевые источники. Суточная потребность.
33. Витамин В₆, участие в образовании коферментов. Роль в обмене веществ. Явления гиповитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
34. Витамин В₁₂. Кобамидные коферменты. Участие в обмене веществ. Внутренний фактор. Явления гиповитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
35. Витамин С. Биологическое значение. Признаки гиповитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
36. Пантотеновая кислота. Коферменты, содержащие пантотеновую кислоту. Биологическая роль. Пищевые источники. Суточная потребность.
37. Витамин РР. Участие в образовании никотинамидных коферментов. Биологическое значение. Проявления гиповитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
38. Фолиевая кислота, состав, участие в образовании коферментов. Роль в обмене веществ. Основные проявления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
39. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (витамин Р), парааминобензойная кислота, инозитол, пангамовая кислота, липоевая кислота, холин, витамин U, карнитин, антоцианины, глюкозинолаты. Биологическая роль.

ВТОРЫЕ ВОПРОСЫ

1. Обмен веществ и энергии, как важнейший признак жизнедеятельности. Общее представление о метаболизме. Катаболические и анаболические пути. Центральные пути метаболизма. Единство процессов ассимиляции и диссимиляции. Связь на уровне субстратов, восстановленных коферментов, энергии, регуляторов обмена

2. Адениловая система (АТФ, АДФ, АМФ) и ее биологическое значение. Энергетический заряд клетки. Другие макроэргические соединения. Механизмы синтеза АТФ.

3. Современное представление о тканевом дыхании. Субстраты тканевого дыхания. Дыхательная цепь митохондрий и ее характеристика: пиридинзависимые и флавинзависимые дегидрогеназы, убихинон (коэнзим Q), цитохромы. Химическое строение, участие в транспорте электронов на кислород.

4. Окислительное фосфорилирование как основной механизм синтеза АТФ в животных клетках. Этапы, регуляция. Причины гипознергетических состояний. Разобщители и ингибиторы окислительного фосфорилирования, механизм их действия.

5. Митохондрии, особенности строения мембран митохондрий. Комплексы дыхательной цепи: состав, топология, участие в процессах биологического окисления. Митохондриальный синтез АТФ. АТФ-синтетаза. Сопряжение процессов тканевого дыхания и фосфорилирования.

6. Дегидрогеназы, оксидазы, оксигеназы. Биологическая роль в клетке.

7. Транспорт глюкозы в клетки различных органов и тканей. Пути метаболизма глюкозы, их значение и взаимосвязь.

8. Метаболизм гликогена: гликогенез и гликогенолиз, назначение. Последовательность реакций. Механизмы регуляции.

9. Фосфолиз и гидролиз гликогена в печени и мышцах. Влияние адреналина, глюкагона и инсулина на гликогенолиз.

10. Анаэробное и аэробное окисление глюкозы как путь получения энергии в клетках. Этапы, конечные продукты. Энергетический выход.

11. Гликолиз. Этапы, реакции, регуляция, биологическая роль. Энергетический выход и механизм образования АТФ в анаэробных условиях. Связь гликолиза с другими метаболическими процессами.

12. Спиртовое брожение глюкозы. Общие реакции для спиртового брожения и гликолиза, различия этих двух процессов. Обмен экзогенного этанола.

13. Пируват как центральный метаболит. Пути превращения пирувата в зависимости от энергетического статуса и особенностей окислительного метаболизма клетки.

14. Глюконеогенез. Субстраты, ферменты, энерготраты, биологическая роль. Регуляция глюконеогенеза.

15. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты и других α -кетокислот, ферменты, коферменты, биологическое значение. Отличие от простого декарбоксилирования.

16. Лимоннокислый цикл как центральный метаболический путь (локализация, последовательность химических превращений). Биологическое значение цикла. Связь с процессом окислительного фосфорилирования.

17. Пентозофосфатный путь распада глюкозы, этапы, назначение.

18. Глюкуроновая кислота. Путь образования. Пути метаболизма глюкуроновой кислоты.

19. Механизмы образования углекислого газа и воды - конечных продуктов обмена веществ.
20. Ресинтез липидов в клетках слизистой тонкого кишечника. Пути ресинтеза триацилглицеролов, фосфолипидов, эфиров холестерина.
21. Транспорт липидов в крови. Структура, образование и метаболизм хиломикронов. Роль липопротеинлипазы в обмене хиломикронов и других липопротеинов.
22. Транспорт липидов в крови. Структура, образование и метаболизм ЛПОНП, ЛПВП и ЛПНП. Роль липопротеинлипазы, печеночной липазы и рецепторов клеточной поверхности.
23. Доставка липидов в клетки органов и тканей. Транспорт холестерина, жирных кислот. Механизм поддержания баланса холестерина в клетках организма.
24. Транспорт липидов. Образование и последующий метаболизм ЛПВП в организме. Роль ЛХАТ. Пути снижения повышенного уровня холестерина в плазме крови.
25. Депонирование липидов в жировой ткани и мобилизация жира из депо. Роль гормонов, лептина. Источники субстратов для синтеза триацилглицеролов в жировой ткани.
26. Транспорт, поступление в клетку и использование жирных кислот в качестве источников энергии. Окисление жирных кислот в митохондриях и пероксисомах. Энергетический выход.
27. Катаболизм жирных кислот в клетках. Особенности окисления ненасыщенных жирных кислот, с нечетным числом углеродных атомов, с разветвленным радикалом, с большим числом углеродных атомов.
28. Биосинтез жирных кислот. Происхождение субстратов. Полиферментный комплекс, синтезирующий жирные кислоты в эукариотической клетке. Значение биотина, НАДФН⁺. Активаторы и ингибиторы синтеза жирных кислот.
29. Биосинтез холестерина. Регуляция уровня холестерина в клетках. Производные холестерина. Связь нарушений обмена липидов с развитием заболеваний (атеросклероз, желчекаменная болезнь, жировое перерождение печени).
30. Нарушения обмена холестерина. Факторы, оказывающие влияние на уровень липопротеинов плазмы крови.
31. Кетоновые тела. Образование кетоновых тел. Пути катаболизма. Причины и следствия повышения образования кетоновых тел.
32. Биосинтез фосфолипидов. Роль липотропных факторов.
33. Переаминирование. Ферменты. Коферменты. Роль этого процесса для жизнедеятельности клетки. Диагностическое значение определения активности трансаминаз в сыворотке крови.
34. Пути дезаминирования аминокислот. Ферменты и коферменты окислительного дезаминирования. Биологическое значение глутаматдегидрогеназной реакции.
35. Пути превращения безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты.
36. Пути обезвреживания аммиака в организме. Транспорт аммиака по крови.
37. Аминокислотный фонд клетки. Источники пополнения. Пути использования аминокислотного фонда. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Механизмы синтеза аминокислот.
38. Общие пути метаболизма аминокислот. Особенности обмена отдельных аминокислот на примере обмена фенилаланина и тирозина.
39. Образование мочевины. Роль печени в мочевинообразовании. Значение исследования уровня мочевины и остаточного азота в клинической практике.

40. Декарбоксилирование аминокислот. Образование биогенных аминов и их роль в организме. Пути их распада.
41. Связь обмена липидов и углеводов. Их взаимопревращения.
42. Образование и использование в клетке ацил-КоА и ацетил-КоА.

ТРЕТЬИ ВОПРОСЫ

1. Гормоны. Химическая природа. Классификация. Связь структуры гормонов с механизмом их действия.
2. Гормоны гипофиза, их химическая природа. Связь с гипоталамусом. Гормоны аденогипофиза. Соматотропин – молекулярный механизм проведения сигнала в клетку, влияние на метаболизм. Гормоны нейрогипофиза, вазопрессин – молекулярный механизм проведения сигнала в клетку, влияние на метаболизм.
3. Гормоны щитовидной железы. Их строение и образование. Механизм действия, влияние на метаболизм. Гипо- и гипертиреоз.
4. Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфора. Химическая природа. Механизм действия.
5. Инсулин. Химическая природа и механизм действия. Роль инсулина в регуляции обмена углеводов, липидов и белков.
6. Метаболические нарушения при сахарном диабете. Роль гликозилирования белков, восстановительного пути обмена глюкозы.
7. Глюкагон. Химическая природа, рецепторы, механизм передачи сигнала в клетках–мишенях, влияние на метаболизм.
8. Глюкокортикоиды, их строение, рецепторы, механизм передачи сигналов в клетках-мишенях. Влияние на метаболизм.
9. Минералокортикоиды, их строение, механизм передачи сигналов в клетках-мишенях. Влияние на метаболизм.
10. Гормоны мозговой части надпочечников: адреналин, норадреналин. Строение, синтез. Механизм проведения сигнала в клетки-мишени, влияние на метаболизм.
11. Половые гормоны, химическая природа, механизм передачи сигналов в клетках-мишенях. Биологическая роль.
12. Биосинтез пуриновых нуклеотидов. Исходные субстраты синтеза. Регуляция синтеза. Роль витаминов в механизмах синтеза.
13. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов. Оротовая кислота. Источники пентоз. Регуляция синтеза. Роль витаминов в синтезе пиримидиновых нуклеотидов.
14. Матричный механизм синтеза ДНК. Ферменты и субстраты синтеза. Особенности синтеза у эукариот.
15. Полимеразная цепная реакция и клонирование как методы искусственного размножения ДНК. Основные этапы и применение в медицинской практике.
16. Синтез РНК. Ферменты и субстраты синтеза. Особенности синтеза у эукариот. Регуляция синтеза.
17. Генетический код и его свойства.
18. Роль т-РНК в синтезе белка. Специфичность АРСаз. Адапторная функция т-РНК.
19. Рекогниция и трансляция как этапы реализации генетической информации в клетке. Субстраты, ферменты, механизм.
20. Регуляция биосинтеза белка в клетке на генетическом уровне. Роль гистонов, гормонов, жирорастворимых витаминов, антибиотиков.
21. Посттрансляционная модификация молекул белка. Гидроксилирование, гликозилирование, ограниченный протеолиз. Другие механизмы посттрансляционных модификаций.

22. Обратимая и необратимая регуляция биохимических реакций. Представление о механизме изостерической регуляции. Использование принципов изостерической регуляции в медицинской практике.

23. Представление о механизме аллостерической регуляции биохимических реакций. Аллостерические эффекторы. Виды аллостерической регуляции.

24. Ковалентная модификация структуры ферментов как механизм регуляции биохимических реакций. Роль реакций фосфорилирования в ковалентной модификации. Регуляторы фосфорилирования ферментов.

25. Гуморальная регуляция обмена липидов. Роль отдельных гормонов в механизмах регуляции липидного обмена (инсулин, адреналин, глюкагон, стероидные гормоны).

26. Гуморальная регуляция обмена углеводов. Роль отдельных гормонов в механизмах регуляции обмена углеводов (инсулин, адреналин, глюкагон, глюкокортикоиды).

27. Гуморальная регуляция содержания глюкозы в крови. Механизмы регуляторного действия гормонов.

28. Общие представления о молекулярной организации биологических мембран. Участие структурных компонентов мембран в межклеточной сигнализации. Рецепторы, классификация рецепторов.

29. Механизмы передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Механизмы усиления сигналов. Вторичные посредники и механизмы их образования.

30. Механизмы передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Механизмы усиления сигналов. Роль G- белков в этих процессах.

31. Аденилатциклазный механизм передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Роль фосфодиэстеразы в этом процессе. Значение уровня цАМФ для клетки.

32. Механизм передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы с участием фосфолипазы С.

33. Инозитолтрифосфат и диацилглицерол как вторичные посредники при передаче информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Механизмы образования и действие.

34. Роль ионов кальция в механизмах передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Калмодулин.

35. Роль ограниченного протеолиза в механизмах регуляции процессов жизнедеятельности. Свертывание крови. Факторы и механизмы свертывания. Значение ионов кальция и витамина К в процессах свертывания крови.

36. Роль ограниченного протеолиза в механизмах регуляции процессов жизнедеятельности. Фибринолиз. Биологическая роль фибринолиза. Плазминовая система.

37. Антикоагулянтная система. Первичные и вторичные антикоагулянты.

38. Межорганный метаболизм и обеспечение организма энергосубстратами в состоянии после приема пищи.

39. Межорганный метаболизм и обеспечение организма энергосубстратами в состоянии натошак и при длительном голодании.

40. Гормональная регуляция адаптации метаболических путей к состоянию после приема пищи и голоданию (инсулин, глюкагон, катехоламины, кортикостероиды).

ЧЕТВЕРТЫЕ ВОПРОСЫ

1. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте. Конечные продукты распада пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов. Гиперурикемия, подагра, подходы к диагностике, профилактике и лечению
2. Азотистый баланс. Нормы белков в питании. Биологическая ценность белков.
3. Пищевая ценность белков, углеводов, липидов, усваиваемость в желудочно-кишечном тракте. Незаменимые факторы питания. Энергия – потребность, происхождение и расходование в организме.
4. Применение ферментов и их ингибиторов в медицинской практике.
5. Роль печени в обмене белков, углеводов, липидов.
6. Антитоксическая функция печени. Обезвреживание в печени токсичных веществ, нормальных метаболитов, лекарственных препаратов.
7. Синтез и распад кровяных пигментов. Роль печени в образовании желчных пигментов. Метаболизм желчных пигментов.
8. Желтухи, происхождение, методы лабораторной диагностики желтух.
9. Биохимические методы диагностики поражений печени.
10. Происхождение ферментов плазмы крови. Значение определения активности ферментов в плазме крови с диагностической целью и для контроля за эффективностью лечения.
11. Химический состав плазмы крови. Методы исследования химического состава плазмы крови, используемые в клинической практике.
12. Буферные системы крови и их значение. Доказательство буферных свойств сыворотки крови. Общие представления о регуляции кислотно-основного состояния (КОС). Значение определения показателей КОС в медицинской практике.
13. Механизмы переноса углекислоты и кислорода кровью. Механизмы развития гипоксических состояний.
14. Белки плазмы крови. Функции. Клинико-биохимическое значение определения общего белка плазмы крови и белковых фракций.
15. Методы обнаружения и количественного определения белков в биологических жидкостях (моча, плазма крови).
16. Основные показатели анализа мочи здорового человека.
17. Азотсодержащие вещества мочи, их происхождение и роль в организме. Принцип определения общего азота мочи.
18. Патологические составные части мочи и их определение.
19. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Качественный и количественный анализ желудочного сока. Роль соляной кислоты.
20. Сок поджелудочной железы. Участие в переваривании углеводов и липидов. Принципы и клиническое значение определения активности амилазы в моче.
21. Классификация и свойства протеаз. Участие в переваривании белков. Субстратная специфичность. Ингибиторы протеаз и их использование в клинической практике при нарушении функции поджелудочной железы.
22. Пищевая ценность углеводов. Переваривание и всасывание углеводов. Роль клетчатки и пектинов в питании. Нарушения переваривания углеводов, принципы диагностики и лечения.

23. Этапы переваривания липидов пищи в желудочно-кишечном тракте. Роль желчных кислот, ферментов. Печеночно-кишечная рециркуляция желчных кислот. Механизмы всасывания продуктов ферментативного гидролиза жира.

24. Химические реакции, лежащие в основе гниения белков в кишечнике. Понятие о ксенобиотиках. Механизмы обезвреживания их в организме.

25. Причины гипер- и гипоферментемий при патологических процессах.

26. Биологическая роль натрия, калия, хлора. Механизмы гормональной регуляции водно-минерального обмена.

27. Макроэлементы (кальций, фосфор, магний). Биологическая роль.

28. Роль серы в обмене веществ. Тиоловые и дисульфидные группы белков и гормонов, их участие в формировании структуры и специфических свойств белка. Глутатион, сульфолипиды, тиамин, биотин, участие в обезвреживании.

29. Микроэлементы. Их значение. Роль ионов марганца, меди, цинка, селена, кобальта, йода, фтора.

30. Механизмы всасывания, транспорта и депонирования железа. Роль железа в обмене веществ.

31. Клинические формы синдрома недостаточного питания. Происхождение, характерные нарушения метаболизма.

32. Синдром недостаточного питания. Основные причины развития при заболеваниях.

Учебное издание

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

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

ПРАКТИКУМ ДЛЯ СТУДЕНТОВ МЕДИКО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА

Ответственный за выпуск А. Д. Таганович
Компьютерная верстка А. В. Янушкевич

Подписано в печать 19.03.15. Формат 60×84/8. Бумага офсетная.
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 19,53. Уч.-изд. л. 13,44. Тираж 120 экз. Заказ 238.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.