

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

# БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ. ПРАКТИКУМ

Для студентов фармацевтического факультета

Рекомендованно Учебно-методическим объединением по высшему  
медицинскому, фармацевтическому образованию в качестве  
учебно-методического пособия для студентов учреждений  
высшего образования, обучающихся по специальности  
1-79 01 08 «Фармация»

*3-е издание, исправленное*



Минск БГМУ 2019

УДК 577.1(076.5)(075.8)

ББК 24я73

Б63

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

Р е ц е н з е н т ы: д-р биол. наук, проф. каф. биохимии, проректор по учебной работе и международным связям Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета Н. Ю. Коневалова; каф. биологической химии Гродненского государственного медицинского университета

**Биологическая химия. Практикум** : учебно-методическое пособие для студентов  
Б63 фармацевтического факультета / А. Д. Таганович [и др.]. – 3-е изд., испр. – Минск : БГМУ, 2019. – 152 с.

ISBN 978-985-21-0339-8.

Изложены рекомендации по лабораторно-практическим занятиям. По каждой теме занятия даны: цель, актуальность, литература для подготовки, вопросы для обсуждения, тестовые задания, описание лабораторных работ, протоколы их выполнения. Приведены вопросы к итоговым контрольным занятиям. Приложения содержат перечень экзаменационных вопросов и некоторые биохимические константы. Первое издание вышло в 2017 году.

Предназначено для студентов 3-го курса фармацевтического факультета.

УДК 577.1(076.5)(075.8)

ББК 24я73

---

Учебное издание

**Таганович** Анатолий Дмитриевич  
**Девина** Елена Анатольевна  
**Колб** Александр Владимирович и др.

## **БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ. ПРАКТИКУМ**

Для студентов фармацевтического факультета

Учебно-методическое пособие

*3-е издание, исправленное*

Ответственный за выпуск А. Д. Таганович  
Компьютерная верстка А. В. Янушкевич

Подписано в печать 10.06.19. Формат 60×84/8. Бумага офсетная.

Ризография. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 17,67. Уч.-изд. л. 9,58. Тираж 107 экз. Заказ 364.

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.

ISBN 978-985-21-0339-8

© УО «Белорусский государственный  
медицинский университет», 2019

## **ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ**

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

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

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

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

Работать в помещении лаборатории разрешается только в присутствии преподавателя.

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Занятие 1. ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ. СТРОЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ**

### **Актуальность темы**

Аминокислоты после всасывания используются в организме для синтеза специфических тканевых белков, ферментов, гормонов, гема, биогенных аминов, пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований. В печени из аминокислот синтезируются белки плазмы крови. В лечебных целях применяется смесь аминокислот для парентерального питания. Отдельные аминокислоты и пептиды применяются в качестве лекарственных средств. Широко используются в медицинской практике методы количественного определения белка в биологических жидкостях, при стандартизации и контроле качества белковых препаратов.

### **Цель занятия**

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

### **Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

*Задание 1.* Какая из перечисленных аминокислот является нейтральной?

А. Аргинин    Б. Лейцин    В. Аспаргат    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  $\alpha$ -аминокислоту:

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

*Задание 5.* Олигопептид — это соединение, которое содержит:

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

*Задание 6.* Какие функции присущи только белкам?

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Вопросы для обсуждения**

1. Предмет, цели и задачи биохимии. Объекты и методы исследований в биохимии.
2. Аминокислоты, классификация. Общие свойства. Формулы протеиногенных аминокислот, номенклатура. Аминокислоты, как лекарственные средства (примеры).
3. Пептиды, строение. Пептидная связь, свойства (постулаты Полинга-Кори). Классификация и биологическая роль пептидов. Применение в медицине.
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 стандартизации и контроле качества лекарственных препаратов.
6. Общие принципы спектрофотометрии. Молярный коэффициент экстинкции. Построение калибровочного графика и работа с ним.
7. Количественное определение белка биуретовым методом.

### **Литература для подготовки**

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 22–33.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 4–9.
3. *Конспект лекций*.

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Молекула аминокислоты, находящаяся в изоэлектрической точке:

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

*Задание 2.* В изоэлектрической точке белок:

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

*Задание 3.* В какой среде пептид Лей-Гис-Лиз-Тир будет двигаться к катоду при электрофорезе?

- А. Кислой              Б. Нейтральной              В. Щелочной

*Задание 4.* Выберите правильные утверждения:

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

*Задание 5.* Рефрактометрический метод основан на:

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

*Задание 2.* Препараты для парентерального белкового питания — это гидролизаты, получаемые из белков крови крупного рогатого скота (Гидролизин, Фибриносол) и человека (Амикровин, Инфузамин) а также казеина молока (Гидролизат казеина). Они содержат смесь L-аминокислот. Эту смесь аминокислот (Гли, Асн, Глу, Лиз, Арг, Тир, Асп) можно разделить методом электрофореза при pH = 6,0. Какие аминокислоты будут двигаться к аноду, какие — к катоду, а какие останутся на месте?

*Задание 3.* Подобрать к каждому белку соответствующую функцию:

- |                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| 1. Коллаген       | А. Структурная    |
| 2. Иммуноглобулин | Б. Сократительная |
| 3. Инсулин        | В. Транспортная   |
| 4. Гемоглобин     | Г. Каталитическая |
| 5. Актин          | Д. Защитная       |
| 6. Амилаза        | Е. Гормональная   |

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

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

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

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

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

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

**Задание 7.** В клинику поступил ребенок 3-х лет с пищевым отравлением. Жалобы: диарея, рвота. При биохимическом анализе крови концентрация общего белка — 100 г/л. Данный показатель характеризует:

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

#### **ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

1Б; 2. В; 3В; 4. Г; 5А, Б, В; 6Б.

**Для самостоятельной работы:**

1Б; 2. А; 3А, Б; 4Б, В, Г; 5В.

#### **Лабораторная работа**

##### **Определение концентрации общего белка в сыворотке крови биуретовым методом**

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

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

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

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

**Клинико-диагностическое значение.** **Нормальное содержание общего белка в сыворотке крови (нормопротеинемия) у взрослых — 65–85 г/л, у детей до 6 лет — 56–85 г/л.** Изменения концентрации общего белка могут быть как абсолютные, так и относительные. Относительные изменения связаны с изменением объема крови (плазмы). Так, *относительная гипопроотеинемия* (понижение концентрации белка в крови) развивается при гидремии, т. е. нагрузке водой, водном отравлении, а *относительная гиперпротеинемия* (повышение концентрации белка в крови) возникает при сгущении крови из-за значительных

потерь жидкости при поносах, неукротимой рвоте, усиленном потоотделении, холере, ожогах. *Абсолютная гипопроотеинемия* наблюдается при нефритах, злокачественных опухолях, алиментарной дистрофии. *Абсолютная гиперпротеинемия* встречается сравнительно редко, например, при миеломной болезни, хронических полиартритах.

Результат:



C, г/л	20	40	60	80	100
E					

$E_{оп.} =$

$C_{оп.} =$

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

## ЗАНЯТИЕ 2. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ И ОСНОВЫ ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ. РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

### Актуальность темы

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

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

### **Цель занятия**

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

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

*Задание 1.* Белок — это соединение, которое содержит:

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

*Задание 2.* Что понимают под изменением конформации белков?

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

*Задание 3.* Для пептидной связи характерны следующие свойства:

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

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

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

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

*Задание 6.* Укажите свойства, характеризующие коллоидные растворы:

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Вопросы для обсуждения**

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

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

3. Особенности строения и функционирования олигомерных белков (на примере гемоглобина). Многообразие белков.

4. Сложные белки. Их строение и функции.

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

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



### Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 34–45, 49–51.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 9–15.
3. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. Москва : Медицина, 1990. С. 13–19, 28–37, 42–76.
4. *Конспект лекций.*

### Задания для самостоятельной работы

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

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

**Задание 2.** Вспомните, что в основе полипептидной цепи, построенной из  $\alpha$ -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  $\alpha$ -спиралью и  $\beta$ -складчатой структурой. Главное условие стабильности такой структуры — максимум водородных связей, возникающих в ее пределах. Включение иминокислоты пролина в цепь нарушает указанные условия.

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

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

2.3. В следующем полипептиде выберите:

- А. Возможные места образования изгибов  
Б. Возможные места образования внутрицепочечных ковалентных связей  
В. Ряд из трех остатков с боковыми цепями гидрофобной природы  
Г. Ряд из шести остатков с боковыми цепями гидрофильной природы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Иле -	Ала -	Три -	Лей -	Тир -	Фен -	Про -	Фен -	Глу -	Ала -	
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Ала -	Мет -	Цис -	Лиз -	Гис -	Глу -	Глн -	Глу -	Про -	Асп -	
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Гли -	Мет -	Глу -	Цис -	Ала -	Фен -	Гис -	Про -	Тир -	Лей -	Мет

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

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

- |                           |   |
|---------------------------|---|
| 1. Первичная структура    | А. Пространственное расположение отдельного участка полипептидной цепи, содержащей $\alpha$ -спирали и $\beta$ -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 $\alpha$ -спиралей и $\beta$ -структур                         |
| 5. Четвертичная структура | Д. Расположение в пространстве всей полипептидной цепи, имеющей в своем составе $\alpha$ -спирали и $\beta$ -структуры    |
|                           | Е. Полипептидная цепь, которая стабилизируется пептидными связями между остатками аминокислот                             |

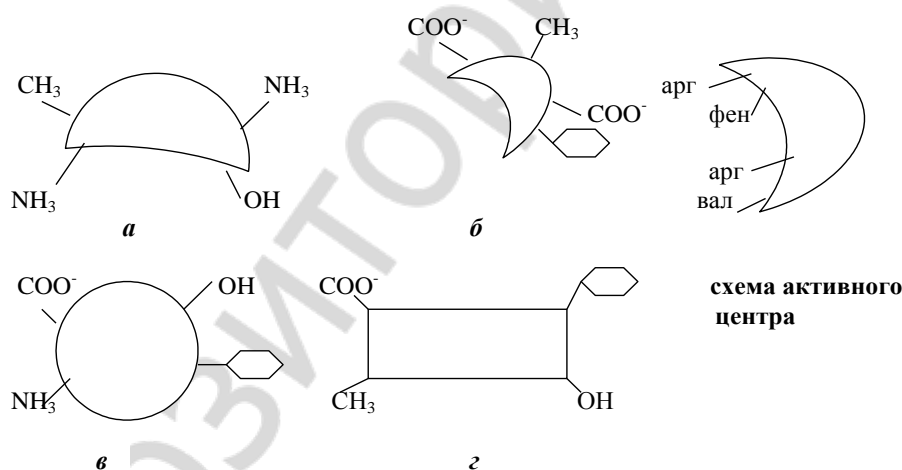
3.2. Какому уровню структурной организации белка соответствует каждый пронумерованный тип связи? Подберите пары:

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

Задание 4. Вспомните, что:

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

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



Ответьте на вопросы:

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

**Задание 2.** В ядерных белках-гистонах содержится большое количество аминокислотных остатков аргинина и лизина, а в белке крови альбумине — много остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. Ответьте на вопросы:

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

**Задание 3.** Подберите верные пары утверждений:

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

**Задание 4.** Центр связывания белка с лигандом представляет собой (выберите наиболее полный ответ):

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

**Задание 5.** Лигандом  $\alpha$ -протомера гемоглобина может быть:

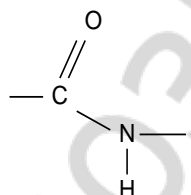
- |             |                        |                       |
|-------------|------------------------|-----------------------|
| А. Гем      | В. $\beta$ -Протомер   | Д. $\alpha$ -Протомер |
| Б. Кислород | Г. 2,3-Дифосфоглицерат |                       |

### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

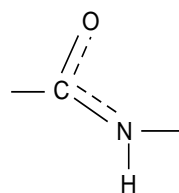
**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

1Г; 2Б,Г; 3А, Б, Д; 4Б;

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



Пептидная связь



Резонанс придает обеим связям частично двойной характер

6А, Б, В.

**Для самостоятельной работы:**

1Д; 2.3А. Повороты в области каждого остатка Про-остатки # 7, 19, 28; Б. Поперечные связи по остаткам цистеина-остатки # 13, 24 могут формировать дисульфидный мостик; В. Остатки 1–3 гидрофобны; Г. Остатки 13–18 гидрофильны;

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

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

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

## Лабораторная работа

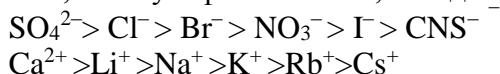
### Работа 1. *Высаливание белков*

Высаливание — обратимая реакция осаждения белков из раствора с помощью больших концентраций нейтральных солей: NaCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.

При высаливании происходит дегидратация молекул белка. 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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а глобулины — в полунасыщенном р-ре (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и перемешивают. Выпадает осадок яичного глобулина. Через 5 мин осадок отфильтровывают, используя бумажный фильтр. В фильтрате остается другой белок — яичный альбумин. К фильтрату добавляют измельченный порошок сульфата аммония до полного насыщения, т. е. пока новая порция порошка остается нерастворенной. Выпавший осадок альбумина также отфильтровывают. С фильтратом проводят биуретовую реакцию: к фильтрату добавляют 2 капли 1% р-ра CuSO<sub>4</sub> + 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 <sub>3</sub> (конц.)	10 капель	–
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (конц.)	–	10 капель
Осторожно, по стенке пробирки, добавляют белок	10 капель	10 капель
<i>Отметить появление осадка на границе раздела фаз</i>		
Избыток HNO <sub>3</sub> (конц.)	10 капель	–
Избыток H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (конц.)	–	10 капель
<i>Отметить растворение осадка</i>		

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

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

#### Актуальность темы

Для исследования физико-химических и биологических свойств белков, а также для изучения их аминокислотного состава и структуры, белки необходимо выделить из биологических объектов (органы, ткани, клетки, органеллы) и очистить от других белков и низкомолекулярных примесей. Изучение физико-химических свойств белков необходимо для понимания механизмов развития многих патологических состояний (например, отеков), механизмов транспорта веществ (в том числе лекарственных препаратов). На знании физико-химических свойств белков основано их получение и использование в качестве лекарственных препаратов.

#### Цель занятия

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

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

*Задание 1.* Какие из перечисленных ниже реакций свойственны аминокетонам (1), а какие карбоксильным группам (2) аминокислот?

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

*Задание 2.* В изоэлектрической точке белок:

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

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

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

*Задание 4.* Скорость электрофореза растворов белков зависит от:

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

*Задание 5.* Все хроматографические методы основаны на:

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

*Задание 6.* Количественно степень распределения разделяемых веществ между стационарной и подвижной фазами (коэффициент распределения) выражается:

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

*Задание 7.* В какой последовательности выйдут из колонки, заполненной активированным углем, при вымывании растворителем, следующие пигменты, если степень их полярности возрастает в ряду: каротин < ксантофиллы <  $\alpha$ -хлорофилл <  $\beta$ -хлорофилл?

- А. Ксантофиллы, каротин,  $\alpha$ -хлорофилл,  $\beta$ -хлорофилл  
Б. Каротин, ксантофиллы,  $\alpha$ -хлорофилл,  $\beta$ -хлорофилл  
В.  $\beta$ -хлорофилл,  $\alpha$ -хлорофилл, ксантофиллы, каротин  
Г. Каротин, ксантофиллы,  $\beta$ -хлорофилл,  $\alpha$ -хлорофилл

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Вопросы для обсуждения**

1. Общие физико-химические свойства белков (вязкость растворов, незначительная диффузия, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, поглощение УФ-лучей, растворимость в воде).

2. Методы разделения и очистки белков: 1) осаждение белков (высаливание); 2) диализ; 3) хроматография (адсорбционная, распределительная, ионообменная, аффинная, гель-хроматография); 4) электрофорез (на бумаге, в полиакриламидном геле с использованием DDS-Na, изоэлектрофокусирование); 5) ультрацентрифугирование; 6) кристаллизация.

3. Иммуноэлектрофорез. Вестерн-блот (назначение, этапы, молекулярные зонды);

4. Этапы и методы исследования аминокислотного состава и аминокислотной последовательности белков и пептидов (методы Сэнджера, Эдмана, Акабори, ферментативные).

5. Правила написания пептидов, название пептида, определение заряда.

6. Методы искусственного синтеза пептидов и белков (в растворе, твердофазный синтез, биоинженерный синтез). Достоинства и недостатки методов.

### **Литература для подготовки**

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 45–46, 51–73.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 14–21.
3. *Конспект лекций*.

### **Задания для самостоятельной работы**

*Задание 1.* Вспомните, что заряд белка или пептида зависит от суммы зарядов аминокислот, которые входят в его состав, и от 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.* Знайте физико-химические свойства, лежащие в основе методов разделения и очистки белков. Умейте объяснить принцип каждого метода. Ответьте на вопросы:

2.1. Хроматографию применяют для:

- А. Разделения веществ                      В. Идентификации веществ  
Б. Очистки веществ                          Г. Концентрирования веществ

2.2. Метод ионообменной хроматографии основан на:

- А. Различия в размерах молекул разделяемых веществ  
Б. Избирательном взаимодействии молекул разных веществ со специфическим лигандом  
В. Ионообменной адсорбции

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

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

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

- А. Различия по величине заряда                      1. Гель-фильтрация  
Б. Различия по молекулярной массе                      2. Электрофорез в полиакриламидном геле  
В. Различия по величине заряда и молекулярной массе                      3. Аффинная хроматография  
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.* 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-спектроскопия

*Задание 6.* Гомологичные белки выполняют одну и ту же функцию, но различаются по первичной структуре (например, локализованы в разных органах или появляются при па-

тологических состояниях). Например: HbA (содержит Глу) → HbS (содержит Вал) при серповидноклеточной анемии. Объясните, на чем основан метод, который позволяет обнаружить отличия в первичной структуре таких белков.

**Задание 7.** Вспомните, что высаливание — это обратимая реакция осаждения белков из раствора с помощью больших концентраций нейтральных солей (NaCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>). 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. Объясните, почему альбумины осаждаются в насыщенном р-ре (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а глобулины — в полунасыщенном р-ре (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>?

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

- |   |  |
|---|--|
| А. Ультрацентрифугирование              | 1. Метод основан на 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 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	151000	4,4
γ-Глобулин	150000	6,3
β-Лактальбумин	37000	5,2

**Задание 3.** В какой последовательности выйдут из колонки, заполненной сефадексом G-200, следующие белки: пепсин (M=36 000), миоглобин (M=17 000), каталаза (M=250 000) при вымывании их растворителем:

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

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

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

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

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

**Вопрос 1.** Что выявляет этот тест?



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

*Вопрос 2.* Вторичные антитела связывают:

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

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

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

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

*Задание 4.* Пептид ферментативного гидролизата, не передвигающийся в электрическом поле при электрофорезе, дансировали и выделили дансипроизводное Лей. Кислотный гидролиз пептида дал три пептида следующего состава: 1) Цис, Асп; 2) Тир, Лей; 3) Тир, Асп, Арг. Напишите формулу пептида, назовите пептид. В какой среде проводили электрофорез исходного гидролизата белка? Почему Вы так решили?

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

#### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

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

*Для самостоятельной работы:*

1.1«0» а) «++»; б)«—»; 1.2– 1)к аноду;2)к катоду; 2.1А,Б,В,Г; 2.2В;

2.3Б,В,Г; 2.4(1–Б,2 – В,3–Г,4–А); 3А; 4Б; 5(А –6,7; Б – 5; В – 1, 3,5; Г– 2,4);

7 У глобулинов большая молекулярная масса и меньший заряд, чем у альбуминов.

#### Лабораторная работа

##### Колоночная гель-фильтрация

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

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

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

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

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

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

6. Результаты опыта запишите в таблицу.

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

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

#### **ЗАНЯТИЕ 4. ФЕРМЕНТЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ**

##### **Актуальность темы**

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

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

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

##### **Цель занятия**

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

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

*Задание 1.* Катализаторы увеличивают скорость реакции, так как:

- А. Изменяют свободную энергию реакции
- Б. Уменьшают скорость обратной реакции
- В. Изменяют состояние равновесия реакции
- Г. Уменьшают энергию активации

Д. Избирательно увеличивают скорость прямой реакции, но не увеличивают скорость обратной реакции

*Задание 2.* Подберите соответствующие пары вопрос–ответ:

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

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

3.1. Изоаллоксазин – рибитол – остаток фосфорной кислоты – остаток фосфорной кислоты – рибоза – аденин.

3.2. Никотинамид – рибоза – остаток фосфорной кислоты – остаток фосфорной кислоты – рибоза – аденин.

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

4.1. В какой пробирке произошел полный гидролиз крахмала?

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

4.2. Какое вещество образовалось при кратковременном гидролизе крахмала?

- А. Глюкоза                      Б. Декстрины                      В. Сахароза

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Вопросы для обсуждения**

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

### **Литература для подготовки**

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 74–88.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 23–27.
3. *Конспект лекций*.

### **Задания для самостоятельной работы**

*Задание 1.* Обратите внимание на то, что катализаторы:

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

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

1.2. Подберите соответствующие пары вопрос – ответ:

- |                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Увеличивают энергию активации     | А. Не биологические катализаторы |
| 2. В процессе реакции не расходуются | Б. Ферменты                      |
| 3. Неспецифичны                      | В. Обе группы катализаторов      |
| 4. Ингибируются аналогами субстрата  | Г. Ни один из катализаторов      |

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

1.4. Назовите основные факторы, влияющие на активность ферментов.

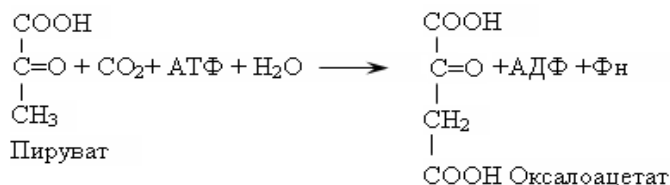
Решите задачу. Оптимальные условия для действия глутаматдегидрогеназы:  $t = 37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 4,5$ . При повышении температуры инкубационной среды до  $75^\circ\text{C}$  и  $\text{pH}$  инкубационной среды до 8,0 скорость ферментативной реакции снизилась на 50 %. Объясните причину снижения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

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

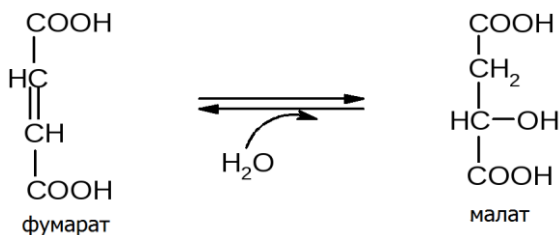
- сравнить структуру субстратов и продуктов;
- определить тип превращения.

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

2.1.1.



2.1.2.



**Задание 3.** Изобразите схематически структуру коферментов:  $\text{НАД}^+$ ,  $\text{НАДФ}^+$ ,  $\text{ФАД}$ ,  $\text{ФМН}$ .

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

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

- А. Относительную    Б. Абсолютную    В. Стереоспецифичность

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

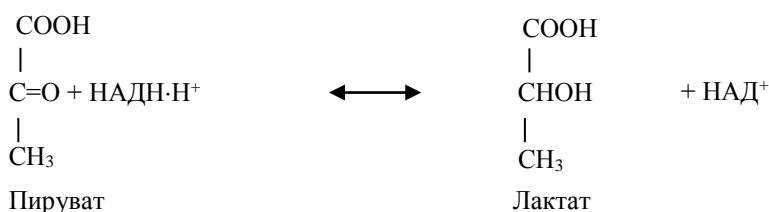
**Задание 1.** В лаборатории выделили фермент лизоцим и определили его активность при различных значениях  $\text{pH}$  среды. Установили, что ферментативная активность лизоцима максимальна при  $\text{pH} 5,2$  и уменьшается как при снижении, так и при повышении этого значения  $\text{pH}$ . Укажите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

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

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

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

**Задание 3.** Температура 37°C, 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 рН5,0.

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

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

#### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

**1Г; 2(1 – А; 2 – Г; 3–А,Б,В,Д; 4–А,Б,В,Д); 3.1. ФАД; 3.2. НАД<sup>+</sup>; 4.1.В; 4.2.Б.**

*Для самостоятельной работы:*

**1.2.** (1–Г; 2–В; 3–А; 4–Б); **1.4.** При повышении температуры до 75 °С скорость ферментативной реакции снижается, так как вследствие денатурации количество активных молекул фермента уменьшается.

От рН зависят:

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

**2.1.1.** Лигаза, пируваткарбоксилаза.

**2.1.2.** Лиаза, фумаратгидратаза.

**4** Международные единицы: 1,33 мккатал/мг фермента; стандартные единицы: 80 мкмоль/мин/мг фермента; 5Б.

#### Лабораторная работа

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

##### **1.Определение активности амилазы слюны и ее термоллабильности**

Одним из характерных свойств ферментов является термоллабильность, 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 (2–3мл) и кипятят ее в течение 5 мин, после чего охлаждают. В 3 пробирки наливают по 10 капель 1%-ного 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 NaOH и 3 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Осторожно кипятят 1 мин до появления красного окрашивания, которое указывает на наличие глюкозы.

Результаты опыта запишите в таблицу:

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

**Вывод:**

## **2. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны**

*Ход работы.* В три пробирки наливают по 1мл слюны, разведенной в 10 раз. В 1-ю пробирку добавляют 2 капли воды, во 2-ю — 2 капли 1%-ного раствора NaCl, в 3-ю — 2 капли 1%-ного раствора CuSO<sub>4</sub>. После этого во все пробирки добавляют по 5 капель 1%-ного раствора крахмала и оставляют их при комнатной температуре на 2 мин. Затем во все пробирки добавляют по 1 капле раствора Люголя, перемешивают, наблюдают окраску и определяют действие активатора или ингибитора. Результаты опыта заносят в таблицу:

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

**Вывод:**

## **Работа 2. Специфичность действия ферментов**

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

*Ход работы.* Для исследования специфичности амилазы берут слюну, разведенную в 10 раз, и наливают по 1 мл в 2 пробирки.

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

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

Результаты опыта запишите в таблицу:

№ пробирки	Фермент	Субстрат	Реакция Фелинга
1			
2			

## Вывод:

Подпись преподавателя:

## ЗАНЯТИЕ 5. РЕГУЛЯЦИЯ РАБОТЫ ФЕРМЕНТОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

### Актуальность темы

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

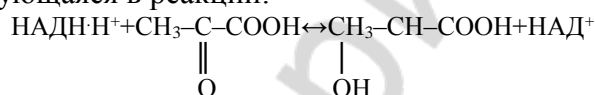
### Цель занятия

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

### Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

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

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



К какому типу относится приведенная реакция?

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

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

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Вопросы для обсуждения

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

2. Особенности строения аллостерических ферментов, аллостерический центр. Ключевые ферменты, характеристика.

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

4. Ковалентная модификация структуры ферментов (фосфорилирование / дефосфорилирование, ограниченный протеолиз).

5. Изоферменты, примеры, биологическая роль.

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

#### *Литература для подготовки*

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 88–112.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие /А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013.С. 28–32.
3. *Конспект лекций*.

#### **Задания для самостоятельной работы**

*Задание 1.* Имейте представление о механизмах ферментативного катализа. Обратите внимание на то, что:

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

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

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

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

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

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

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

- А. Необратимое
- 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. Усвойте основные способы регуляции каталитической активности ферментов и понятие «множественные формы ферментов».*

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

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

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

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

3.3. К какому классу относится фермент креатинкиназа?

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

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

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

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

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

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

- А. Регуляция по принципу обратной связи  
Б. Частичный протеолиз молекулы фермента  
В. Присоединение или отщепление белка-регулятора

Г. Присоединение или отщепление низкомолекулярного эффектора (модулятора)

Д. Фосфорилирование молекулы

*Задание 4.* В клетках *E. coli* синтез пиримидиновых нуклеотидов осуществляется по схеме метаболического пути:  $\text{CO}_2 + \text{NH}_3 + 2\text{ATP} \rightarrow \text{P}_1 \rightarrow \text{P}_2 \rightarrow \text{УТФ} \rightarrow \text{ЦТФ}$ . При увеличении в клетке концентрации ЦТФ синтез пиримидиновых нуклеотидов прекращается. Какой вид регуляции описан?

А. Аллостерическая регуляция

Б. Частичный протеолиз

В. Фосфорилирование молекулы фермента

Г. Присоединение белков ингибиторов

Д. Отщепление белков ингибиторов

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

А. Ферменты катализируют одну и ту же реакцию

Б. Ферменты катализируют один тип реакций

В. Являются изоферментными формами

Г. Осуществляют передачу нервных импульсов

Д. Обладают групповой специфичностью

#### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

1 нет. 2А;3Г.

*Для самостоятельной работы:*

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

#### Лабораторная работа

##### Работа 1. *Количественное определение активности $\alpha$ -амилазы слюны*

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

*Порядок выполнения работы.* В 10 пробирок наливают по 1 мл воды. В 1-ю 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-ой пробирки. Из 10-ой пробирки отбирают 1 мл смеси и выливают. Во все пробирки добавляют по 2 мл 0,1%-ного раствора крахмала, перемешивают, встряхивая пробирки, и помещают в термостат при 38 °С на 30 мин. После инкубации пробирки охлаждают водопроводной водой, добавляют по 1 капле 0,1%-ного раствора йода и перемешивают. При реакции с йодом жидкость в пробирках окрашивается в желтый, розовый и фиолетовый цвета. Отмечают последнюю пробирку с желтой окраской, где гидролиз крахмала прошел полностью и делают расчет. Полученные данные заносят в таблицу:

*Гидролиз крахмала в присутствии ферментов слюны при различном ее разведении*

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

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

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

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

Расчет:

**Вывод:**

**Работа 2. Количественное определение активности амилазы (диастаны) 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  $\alpha$ -амилазы в моче и сыворотке крови широко используется в клинике при диагностике заболеваний поджелудочной железы. В первые сутки заболевания амилазная активность увеличивается в моче и сыворотке крови в десятки раз, а затем постепенно возвращается к норме. При почечной недостаточности амилаза в моче отсутствует.

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

**Порядок выполнения работы.** На сухое предметное стекло капают в разных местах по одной капле 0,1%-ного раствора йода в йодиде калия (всего 8–10 капель). В пробирку вносят 2 мл 0,1%-ного раствора крахмала, содержащего 2 мг крахмала, 1 мл 0,85%-ного раствора хлорида натрия и помещают пробирку в водяную баню при температуре 37 °С 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:

$$X_{ед} = 15 / (T \cdot 0,5),$$

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

Полученные данные и расчет:

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

## **Занятие 6. ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ «БЕЛКИ. ФЕРМЕНТЫ»**

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

2. Первичная структура белка и методы ее определения. Свойства пептидной связи. Значение биуретовой реакции для качественного и количественного определения белка в биологических жидкостях.

3. Вторичная, надвторичная, третичная, четвертичная структуры белковой молекулы. Особенности структурной организации, разновидности, типы стабилизирующих связей, методы изучения.

4. Основы функционирования белков. Особенности функционирования олигомерных белков на примере гемоглобина.

5. Физико-химические свойства белков (молекулярная масса, растворимость, ионизация, ИЭТ). Денатурация белка, денатурирующие факторы, использование в медицине.

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

7. Методы выделения и очистки белков. Этапы исследования структуры белка.

– Методы очистки белка от низкомолекулярных примесей. Высаливание и осаждение белков. Механизм и практическое использование.

– Принципы разделения и очистки белков методами хроматографии (адсорбционной, распределительной, ионообменной, гель-хроматографией, аффинной).

– Ультрацентрифугирование. Принцип метода.

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

– Вестерн-блот. Основные этапы, практическое применение. Понятие «молекулярный зонд».

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

9. Функции белков и пептидов в организме.

10. Методы искусственного синтеза белков и пептидов (примеры получения лекарственных препаратов с использованием методов полусинтеза и искусственного синтеза).

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

12. Свойства ферментов. Термолабильность, специфичность, влияние pH и концентрации субстрата на активность фермента. Понятие о кинетике ферментативных реакций. Константа Михаэлиса.

13. Активность фермента, единицы измерения активности.

14. Активный центр и его строение.

15. Коферменты, классификация.

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

17. Изоферменты, примеры, биологическая роль.

18. Примеры использования ферментов и их регуляторов в медицинской практике. Им- мобилизованные ферменты. Применение ферментов в качестве аналитических реагентов.

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

### **Актуальность темы**

Знание закономерностей и особенностей метаболизма необходимо для дальнейшего изучения обмена углеводов, липидов и белков на уровне клетки и организма, для понимания механизмов регуляции их метаболизма и возможной коррекции нарушений обмена веществ. Поскольку нарушения энергетического обмена лежат в основе патогенеза многих заболеваний, знание центральных путей метаболизма позволит провизуориентироваться в коррекции метаболических нарушений и понимать механизм действия лекарственных препаратов (кокарбоксилазы, сукцината и др.).

### **Цель занятия**

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

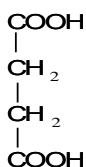
### **Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

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

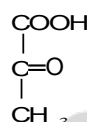
- А. Гидрохинон присоединил 2 электрона
- Б. Гидрохинон окислился
- В. Гидрохинон присоединил 2 атома водорода
- Г. Гидрохинон восстановился
- Д. Гидрохинон отдал 2 атома водорода

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

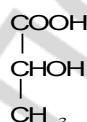
- А. Дикарбоновые кислоты
- Б. Трикарбоновые кислоты
- В. Монокарбоновые кислоты
- Д. Гидроксикислоты



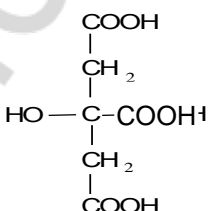
2.1



2.2



2.3

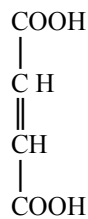
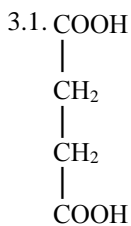


2.4

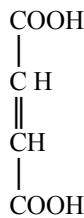
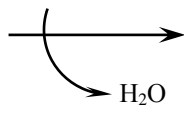
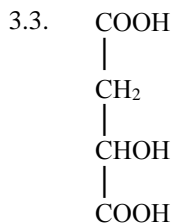
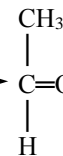
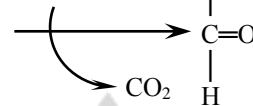
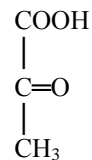


2.5

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



3.2.



Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

### Вопросы для обсуждения

1. Понятие о метаболизме. Линейные и циклические метаболические пути, регуляторные (ключевые) ферменты.
2. Катаболизм и анаболизм, различия и взаимосвязь между ними.
3. Реакции дегидрирования как основной способ окисления веществ в организме. Пиридинзависимые и флаavinзависимые дегидрогеназы. Роль витаминов РР и В<sub>2</sub> в окислительно-восстановительных реакциях. Схематическое строение коферментов НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, ФАД, ФМН.
4. Окислительное декарбоксилирование ПВК. Пируватдегидрогеназный комплекс (строение, ферменты, коферменты), регуляция.
5. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) как центральный метаболический путь. Локализация ферментов ЦТК, схема процесса, ферменты, коферменты.
6. Дегидрогеназные реакции ЦТК как источник водорода для системы тканевого дыхания. Декарбоксилирование в цикле Кребса как механизм образования в клетках СО<sub>2</sub> — конечного продукта катаболизма соединений углерода.
7. Функции ЦТК: интегративная, катаболическая, анаболическая, энергетическая, водороднодонорная. Регуляция. Анаэробные реакции.

### Литература для подготовки

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

### Задания для самостоятельной работы

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

1. ЦТК представляет собой конечный общий путь для окисления продуктов распада белков, жиров и углеводов.
2. ЦТК служит источником строительных блоков для процессов биосинтеза (гем, аминокислоты, глюкоза и т. д.).
3. Большинство топливных молекул вступают в цикл в виде ацетил-КоА.
4. В ходе реакций цикла дважды происходит декарбоксилирование с образованием конечного продукта — СО<sub>2</sub>.
5. В результате четырех дегидрогеназных реакций восстанавливаются три молекулы НАД<sup>+</sup> и одна молекула ФАД. Эти восстановленные переносчики окисляются затем в цепи переноса электронов внутренней мембраны митохондрий.



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

- А. Обезвоживание    Б. Снижение уровня АТФ  
 В. Снижение уровня глюкозы в крови  
 Г. Образование большого количества эндогенной воды

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

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

**ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

1Б, 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:*

1А; 2Б, 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**

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

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

Схема постановки опыта:

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

**Вывод:**

**Работа 2. Изучение функционирования ЦТК по образованию углекислого газа**

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

Схема постановки опыта:

Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
---------------------	---------------	-----------



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

**Вывод:**

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

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

Схема постановки опыта:

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

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

## Занятие 8. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН. ТКАНЕВОЕ ДЫХАНИЕ. ФОТОСИНТЕЗ (СВЕТОВАЯ СТАДИЯ). ИЗУЧЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

### Актуальность темы

Гетеротрофные и фотосинтезирующие организмы существуют в сбалансированном стационарном состоянии. Фотосинтезирующие растения улавливают солнечную энергию и запасают ее в форме АТФ и НАДФН·Н<sup>+</sup>, используя эту энергию для синтеза углеводов, при этом они выделяют кислород. Аэробные гетеротрофы используют этот кислород для расщепления богатых энергией органических продуктов фотосинтеза до СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub>О, чтобы генерировать таким путем АТФ. Знание этих процессов необходимо для понимания основного



5. Схема дыхательной цепи. Сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования. Хемосмотическая теория Митчелла. Коэффициент фосфорилирования (P/O).  $H^+$ -АТФ-синтаза. Регуляция работы дыхательной цепи и  $H^+$ -АТФ-синтазы.

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

7. Оксигеназный путь утилизации кислорода в клетках. Ферменты. Окисление в микросомах. Схема микросомной цепи. Сравнить оксидазный и оксигеназный пути утилизации кислорода. Роль этих процессов в клетке.

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

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

#### *Литература для подготовки*

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э.И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 134–162, 163–175.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 43–51.
3. *Конспект лекций*.

#### **Задания для самостоятельной работы**

Для усвоения темы необходимо уяснить, что:

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

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

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

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

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

6. Коэффициент фосфорилирования (P/O) — это число молей АТФ, образованных в расчете на один атом кислорода, использованный в процессе тканевого дыхания.

7. Оксигеназный путь утилизации кислорода осуществляется в мембранах эндоплазматического ретикулума и способствует включению кислорода в субстрат. Таким способом происходит обезвреживание многих токсичных веществ (микросомное окисление).

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

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

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

А. Химической структурой переносчика электронов

Б. Величиной редокс-потенциала ( $E_0'$ )

В. Величиной протонного электрохимического потенциала ( $\Delta\mu H^+$ )

Г. Является произвольной

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

1. НАДН· $H^+$ : убихинон оксидоредуктаза                      А. ФАД

2. Убихинол: цитохром с оксидоредуктаза                      Б. Гем

3. Сукцинатдегидрогеназа    В. ФМН

#### 4. Цитохромоксидаза

Г. НАД<sup>+</sup>  
Д. Гем, Cu<sup>2+</sup>

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

- |                     |                                   |                |
|---------------------|-----------------------------------|----------------|
| А. Цианиды          | Г. Азид натрия                    | Ж. Антимидин А |
| Б. СО               | Д. Амита́л (барбитуровая кислота) | З. Малонат     |
| В. H <sub>2</sub> S | Е. Ротенон                        |                |

*Задание 6.* Подберите к каждому из путей утилизации кислорода соответствующие характеристики:

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

*Задание 7.* Расположите в правильной последовательности переносчики в цепи переноса электронов, ведущей от P<sub>700</sub>к НАДФ<sup>+</sup>, где P<sub>700</sub> — реакционный центр фотосистемы I.

- |                     |  |
|---------------------|--|
| А. Ферредоксин      | В. Ферредоксин - НАДФ <sup>+</sup> - оксидоредуктаза |
| Б. P <sub>700</sub> | Г. Филлохинон  |

*Задание 8.* Расположите последовательно переносчики электронов в цепи, по которой электроны движутся от возбужденного реакционного центра фотосистемы II(P<sub>680</sub>) к фотосистеме I(P<sub>700</sub>).

- |                            |               |                     |
|----------------------------|---------------|---------------------|
| А. Пластохинон             | В. Цитохром f | Д. P <sub>680</sub> |
| Б. Цитохром b <sub>5</sub> | Г. Феофитин   | Е. Пластоцианин     |

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

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

#### **Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

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

А. В процессе функционирования дыхательной цепи происходит перенос H<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>-АТФ-синтазы сопровождается синтезом АТФ.

*Задание 2.* Какие из следующих утверждений характеризуют H<sup>+</sup>-АТФ-синтазу?

- А. V ферментный комплекс внутренней мембраны митохондрий
- Б. Ингибируется олигомицином
- В. Имеет протонные каналы
- Г. Может проявлять АТФ-азную активность
- Д. Переходит в рабочее состояние под влиянием движущихся через нее протонов
- Е. Ингибируется аттрактилозидом

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

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

*Задание 4.* Сколько моль АТФ может синтезироваться при окислении 1 моль субстрата в указанных процессах?

- |  |             |
|--|-------------|
| 1. Ацетил-КоА → CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O | А. 4 моль   |
| 2. Сукцинат → ЦУК                                  | Б. 10 моль  |
| 3. α-Кетоглутарат → ЦУК                            | В. 7,5 моль |
| 4. Изоцитрат → сукцинат                            | Г. 6 моль   |
| 5. Сукцинат → CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O   | Д. 24 моль  |

*Задание 5.* Причинами гипоэнергетических состояний (нарушение синтеза АТФ) в митохондриях могут быть:

- А. Недостаток субстратов тканевого дыхания      Б. Недостаток кислорода
- В. Избыток витаминов РР и В<sub>2</sub>
- Г. Добавление к изолированным дышащим митохондриям олигомицина
- Д. Низкая концентрация АДФ в матриксе митохондрий
- Е. Разобщение с участием 2, 4-динитрофенола

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

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

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

*Задание 8.* Выберите верное утверждение:

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

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

- А. Ферредоксин      В. Хлорофилл а
- Б. Цитохром f      Г. Феофитин

*Задание 10.* В световую фазу фотосинтеза происходит:

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

### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

- 1В;** **2Б, Г, Д, Е;** **4.1**(А – изоцитрат ДГ; Б – α-кетоглутарат ДГ; В – сукцинат ДГ; Г – малат ДГ); **4.2** (А – НАД<sup>+</sup>; Б – НАД<sup>+</sup>, ФАД, ТПФ, КоА, липоевая кислота; В – ФАД; Г – НАД<sup>+</sup>); **4.3** (А, Б, Г – пиридиновые ДГ; В – флавиновая ДГ); **5** фотосинтетическое; **6 Д; 7В.**

**Для самостоятельной работы:**

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

**Лабораторная работа**

**Работа 1. Изучение реакций окислительного фосфорилирования**

*Принцип метода.* При окислении различных субстратов в дыхательной цепи высвобождается энергия, часть которой используется на реакцию окислительного фосфорилирования. Степень последнего (энергетическая ценность субстратов) определяется по убыли неорганического фосфата (коэффициент  $P/O = 0,5-2,5$ ). Используя различные субстраты (яблочная, янтарная, аскорбиновая кислоты), оцениваем степень окислительного фосфорилирования. Содержание фосфорной кислоты определяем в реакции с молибдатом аммония и редуцирующим раствором аскорбиновой кислоты по интенсивности окраски образующейся молибденовой сини.

Схема постановки опыта:

Содержимое пробирок	Контрольная проба, мл	Опытные пробы, мл		
		1	2	3
Инкубационная смесь	1,0	1,0	1,0	1,0
Физиологический раствор	0,5	–	–	–
Раствор яблочной кислоты	–	0,5	–	–
Раствор янтарной кислоты	–	–	0,5	–
Раствор аскорбиновой кислоты + цитохром с	–	–	–	0,5
Суспензия митохондрий	0,5	0,5	0,5	0,5
Инкубация 10 мин при комнатной температуре, затем добавить:				
Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ)	1,0	1,0	1,0	1,0
Раствор молибдата аммония	0,5	0,5	0,5	0,5
Редуцирующий раствор Фиске и Субарроу	0,5	0,5	0,5	0,5
Содержимое всех пробирок разбавить водой в 8 раз				
Инкубация 10 минут.				
<b>Результат:</b>				
1. Оцените интенсивность окраски по 4-бальной шкале:				
2. Коэффициент $P/O$ :				

**Вывод:**

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

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

Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
Раствор яблочной кислоты	0,5	0,5
Раствор 2,4-ДНФ	–	0,5
Физиологический раствор	0,5	–
Суспензия митохондрий	0,5	0,5
Содержимое пробирок	Контроль (мл)	Опыт (мл)
Инкубация 10 мин при комнатной температуре		
Раствор ТХУ	1,0	1,0
Раствор молибдата аммония	0,5	0,5
Редуцирующий раствор	1,0	1,0

Результат (интенсивность окраски):		
------------------------------------	--	--

**Вывод:****Работа 3. Открытие альдегиддегидрогеназы в молоке**

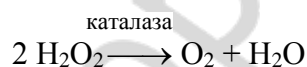
Фермент вырабатывается микроорганизмами, попадающими в молоко извне. По химической природе он относится к флавопротеинам, способным окислять альдегиды, в частности, формальдегид. При добавлении к некипяченому молоку формальдегида и метиленовой сини альдегиддегидрогеназа окисляет формальдегид в муравьиную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

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

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

**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 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 1 каплю крови. Отмечают выделение пузырьков кислорода.

**Работа 5. Открытие пероксидазы**

Как и каталаза, пероксидаза — гемсодержащий фермент. Пероксидаза катализирует окисление некоторых веществ (фенолы, ароматические амины) в присутствии перекиси водорода. 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В 1-ю пробирку добавляют 1 каплю крови, во 2-ю — 1 каплю  $\text{H}_2\text{O}$ . Наблюдают за изменением окраски.

**Выводы:**

Подпись преподавателя:

## ЗАНЯТИЕ 9. УГЛЕВОДЫ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ. ОБМЕН ГЛИКОГЕНА. СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ.

### Актуальность темы

Углеводы являются важнейшими органическими соединениями живых организмов. Функции углеводов разнообразны и важны. Это энергетическая, пластическая, защитная, опорная, регуляторная. Особенно интересны специфические функции углеводов, такие как, антигенная, узнавание молекулами и клетками друг друга, проведение нервного импульса. Гликопротеины служат рецепторами для некоторых фармакологически активных соединений. Главным источником углеводов для человека является пища.

### Цель занятия

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

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

*Задание 1.* Какие из перечисленных ниже углеводов имеют свободный полуацетальный гидроксил и будут обладать восстанавливающими свойствами?

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

*Задание 2.* Источником глюкозы для человека являются углеводы пищи, за исключением:

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

*Задание 3.* Гликоген — это:

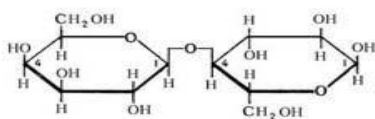
- А. Неразветвленный полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, связанных  $\beta$ -1,4- и  $\beta$ -1,6-гликозидными связями  
Б. Сильно разветвленный полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, связанных  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями  
В. Линейный полисахарид, состоящий из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

*Задание 4.* Установите соответствие между структурой и названием дисахарида:

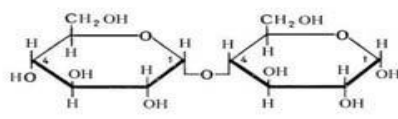
1. Мальтоза

2. Сахароза

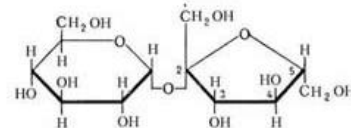
3. Лактоза



А



Б



В

*Задание 5.* В какой форме депонируются углеводы у человека? Выберите правильный ответ:

А. Хитина

Б. Гликогена

В. Крахмала

Г. Глюкозо-6-фосфата

Д. Клетчатки

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Вопросы для обсуждения

1. Классификация и функции углеводов. Углеводы как лекарственные средства.
2. Углеводы пищи. Суточная потребность. Роль клетчатки, пектинов и лактулозы в питании человека.
3. Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте.



4. Молекулярные механизмы всасывания продуктов переваривания углеводов. Транспорт глюкозы в клетки различных органов и тканей.
5. Общая схема источников и путей расходования глюкозы в организме, их значение и взаимосвязь.
6. Синтез гликогена: назначение, последовательность реакций, энергозатраты, механизмы регуляции.
7. Фосфоролит и гидролиз гликогена в печени и мышцах, последовательность реакций, регуляция.
8. Спиртовое брожение глюкозы.

#### Литература для подготовки

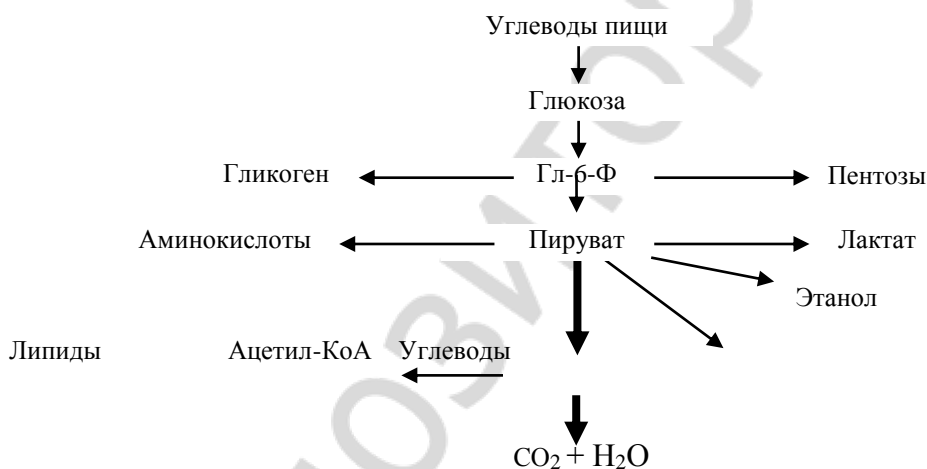
1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 178–202, 216–217.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 58–64.
3. *Конспект лекций*.

#### Задания для самостоятельной работы

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

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

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



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

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

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

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

**Задание 4.** Какой из перечисленных нуклеотидов является переносчиком остатков глюкозы в реакции биосинтеза гликогена?

- А. ФАД    Б. УТФ    В. УДФ    Г. НАД<sup>+</sup>    Д. АТФ

*Задание 5.* Выберите лекарственные средства, относящиеся к углеводам:

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

*Задание 1.* Суточная норма углеводов в питании человека составляет:

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

*Задание 2.* Выберите правильные ответы. Всасывание глюкозы из полости кишечника в энтероцит осуществляется путем:

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

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

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

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

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

*Задание 5.* Укажите фермент, катализирующий реакцию:



- А. Амилаза      Б. Глюкозо-6-фосфатаза      В. Гликогенсинтаза  
Г. Гликогенфосфорилаза      Д. Гексокиназа

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

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

#### **ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

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

*Для самостоятельной работы: 4В; 5 А, Б, В, Д.*

### **Лабораторная работа**

#### **Обнаружение продуктов дрожжевого сбраживания глюкозы**

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

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

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

2. Обнаружение  $\text{CO}_2$ . В бродильный аппарат наливают 10%-ный раствор  $\text{NaOH}$  почти до краев пробирки и, закрыв отверстие большим пальцем, перемешивают ее содержимое. Углекислый газ поглощается щелочью, создавая вакуум, и палец присасывается к отверстию пробирки.

3. Обнаружение этилового спирта. Спирт можно открыть с помощью реакции получения йодоформа:  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 4\text{I}_2 + 6\text{NaOH} \rightarrow \text{CHI}_3 + 5\text{NaI} + \text{HCOONa} + 5\text{H}_2\text{O}$ .

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

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

## **Занятие 10. АНАЭРОБНЫЙ И АЭРОБНЫЙ ПУТИ РАСПАДА ГЛЮКОЗЫ. МЕТАБОЛИЗМ ПИРУВАТА. ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ. МЕТАБОЛИЗМ ЭКЗОГЕННОГО ЭТАНОЛА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ**

### **Актуальность темы**

Знание значения центральных метаболических путей 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.). Знакомство с процессом гликолиза дает представление о возможностях энергетического обеспечения клеток в анаэробных условиях.

Промежуточные продукты этих путей используются в качестве лекарственных препаратов (лимонная кислота, никотинамид, кокарбоксилаза, компоненты адениловой системы и др.) для коррекции метаболических нарушений.

### **Цель занятия**

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

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

*Задание 1.* Подберите к каждому ферменту соответствующий кофермент:

- |                                       |                       |
|---------------------------------------|-----------------------|
| 1. НАДН· $\text{H}^+$ – дегидрогеназа | А. ФАД                |
| 2. $\text{QH}_2$ – дегидрогеназа      | Б. Гем                |
| 3. Цитохромоксидаза                   | В. ФМН                |
| 4. Малатдегидрогеназа                 | Г. Гем, $\text{Cu}^+$ |
| 5. Сукцинатдегидрогеназа              | Д. $\text{НАД}^+$     |
|                                       | Е. $\text{НАДФ}^+$    |

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

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

*Задание 3.* Укажите, к какому классу относятся перечисленные ферменты:

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Вопросы для обсуждения**

1. Гликолиз, биологическая роль, субклеточная локализация, этапы (подготовительный, гликолитической оксидоредукции), реакции, ферменты, энергетический выход и механизм образования АТФ. Регуляция гликолиза, ключевые ферменты.
2. Пируват как центральный метаболит. Пути превращения ПВК в зависимости от энергетического статуса и особенностей окислительного метаболизма клеток.
3. Восстановление пирувата в лактат (реакция, изоферменты ЛДГ, назначение реакций). Утилизация лактата клетками. Цикл Кори.
4. Аэробное окисление глюкозы до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  (этапы, сопряжение с процессом окислительного фосфорилирования, энергетика).
5. Глюконеогенез (назначение, субстраты, ключевые реакции и ферменты, регуляция, энергозатраты).
6. Метаболизм экзогенного этанола (пути, схема реакций). Механизм развития алкогольной гипогликемии и лактацидемии.

### **Литература для подготовки**

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 203–216, 635–636.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 66–73.
3. *Конспект лекций.*

### **Задания для самостоятельной работы**

*Задание 1.* Усвойте, что гликолиз — серия реакций, в результате которых глюкоза распадается на две молекулы пирувата. Умейте писать эти реакции.

1.1. Обратите внимание на то, что:

в гликолизе можно выделить 2 этапа:

- а) подготовительный (активирование глюкозы и распад глюкозо-6-фосфата на две молекулы глициральдегид-3-фосфата);
- б) гликолитической оксидоредукции (окисление глициральдегид-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.

*Задание 2.* Запомните, что аэробный распад глюкозы — это процесс полного окисления ее до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Он включает реакции аэробной дихотомии (сравнить с анаэробной) и последующее окисление пирувата в общем пути катаболизма.

2.1. Напишите реакции, катализируемые отдельными ферментами пируватдегидрогеназного комплекса.

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

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

*Задание 3.* Вспомните последовательность реакций, составляющих цитратный цикл, название ферментов, катализирующих эти реакции, и их коферменты.

*Задание 4.* Выучите:

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

*Задание 5.* Образовавшийся в кардиомиоцитах лактат наряду с диффузией в кровь окисляется в самих миоцитах в аэробных условиях. Укажите этапы окисления лактата и энергетический баланс этого процесса.

*Задание 6.* В гликолизе имеются реакции, приводящие к образованию макроэргических соединений. Выберите такую реакцию:

- Фосфодиоксиацетон  $\leftrightarrow$  глицеральдегид-3-фосфат
- 3-Фосфоглицерат  $\leftrightarrow$  2-фосфоглицерат
- Пируват  $\leftrightarrow$  лактат
- Глицеральдегид-3-фосфат  $\leftrightarrow$  1,3-дифосфоглицерат
- Глюкоза  $\rightarrow$  глюкозо-6-фосфат

*Задание 7.* Известно, что в гликолизе имеются реакции, сопряженные с синтезом АТФ путем субстратного фосфорилирования. Назовите такую реакцию:

- Глюкоза  $\rightarrow$  глюкозо-6-фосфат
- Фруктозо-6-фосфат  $\rightarrow$  фруктозо-1,6-дифосфат
- Фосфодиоксиацетон  $\leftrightarrow$  глицеральдегид-3-фосфат
- Глицеральдегид-3-фосфат  $\leftrightarrow$  1,3-дифосфоглицерат
- Фосфоенолпируват  $\rightarrow$  пируват

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

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

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

*Задание 2.* Глюконеогенез — ферментативный процесс, имеющий необратимые реакции. Выберите фермент, участвующий в одной из них:

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

*Задание 3.* В глюконеогенезе имеются необратимые реакции. Выберите из перечисленных необратимую:

- Фруктозо-6-фосфат  $\rightarrow$  глюкозо-6-фосфат
- 2-Фосфоглицерат  $\rightarrow$  3-фосфоглицерат
- Лактат  $\rightarrow$  пируват
- Пируват  $\rightarrow$  фосфоенолпируват
- Фосфодиоксиацетон  $\rightarrow$  глицеральдегид-3-фосфат

**Задание 4.** 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

**Задание 5.** В одной из реакций гликолиза образуется НАДН·Н<sup>+</sup>. Какова его судьба в анаэробных условиях?

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

#### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

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

3(1 – Г, 2 – Б, 3 – Г, 4 – Г, 5 – А, 6 – Б, 7 – Г, 8 – Е).

*Для самостоятельной работы:* 5 (15 АТФ); 6Г; 7Д.

#### Лабораторная работа

##### Работа 1. Количественное определение пировиноградной кислоты в моче

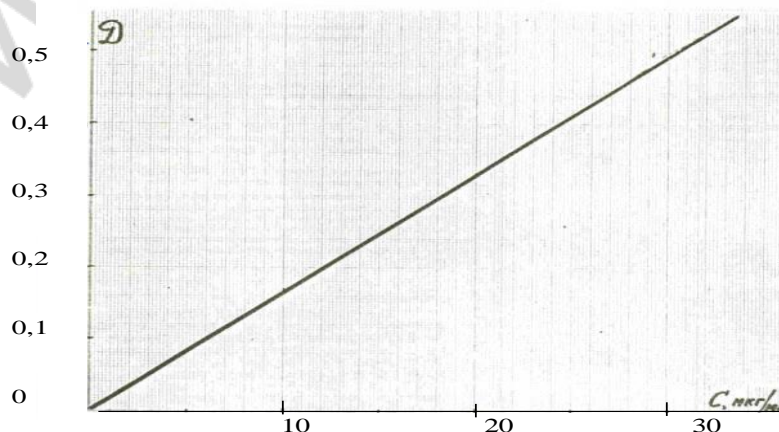
Пировиноградная кислота — один из промежуточных продуктов углеводного обмена. В анаэробных условиях ПВК восстанавливается в лактат. В аэробных условиях ПВК под влиянием пируватдегидрогеназного комплекса (коферменты: ТПФ, липоевая кислота в виде амида, КоА–SH, НАД<sup>+</sup>, ФАД) в результате окислительного декарбоксилирования превращается в ацетил-КоА, который в цикле Кребса окисляется до СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub>О.

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 Н<sub>2</sub>О, а в **опытную** — 1 мл мочи. Затем в обе пробирки приливают по 0,5 мл 2,4 динитрофенилгидразиновой р-ра и оставляют на 20 мин при комнатной температуре. После этого в каждую пробирку добавляют по 5 мл 0,4н NaOH и через 10 мин колориметрируют опытную пробу против контрольной пробы на реактивы (кюветы 10 мм), с зеленым светофильтром.

Расчет проводят по калибровочному графику. Найденную величину умножают на суточный диурез (1500 мл для мужчин и 1200 мл для женщин) и получают содержание пировиноградной кислоты в суточной моче. Коэффициент пересчета в единицы СИ (мкмоль/сут) – 11,4.



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

**Клинико-диагностическое значение.** При авитаминозе и гиповитаминозе В<sub>1</sub> в крови и других тканях, особенно в мозге, накапливается большое количество пировиноградной кислоты и увеличивается ее выделение с мочой. Содержание этой кислоты в крови возрастает при сахарном диабете, сердечной недостаточности. Количество пировиноградной кислоты увеличивается после введения некоторых лекарств — камфоры, стрихнина, адреналина. При наркозе содержание этой кислоты в крови снижается.

Результат: Д =

С =

Расчет:

Вывод:

Подпись преподавателя:

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

### Актуальность темы

Пентозофосфатный путь (ПФП) и глюкуроновый путь обмена глюкозы не приводят к синтезу АТФ. Они выполняют другие функции: 1) образование НАДФН·Н<sup>+</sup> для восстановительных синтезов (ПФП); 2) обеспечение рибозой синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот (ПФП); 3) образование глюкуроновой кислоты для синтеза гетерополисахаридов соединительной ткани и детоксикации продуктов метаболизма и ксенобиотиков в печени путем их связывания и выведения в виде глюкуронидов (глюкуроновый путь). У растений, дополнительно к ПФП образование углеводов происходит в цикле Кальвина в процессе темновой стадии фотосинтеза. Во время темновой фазы атомы водорода, поставляемые световыми реакциями, используются для синтеза углеводов из СО<sub>2</sub> и воды.

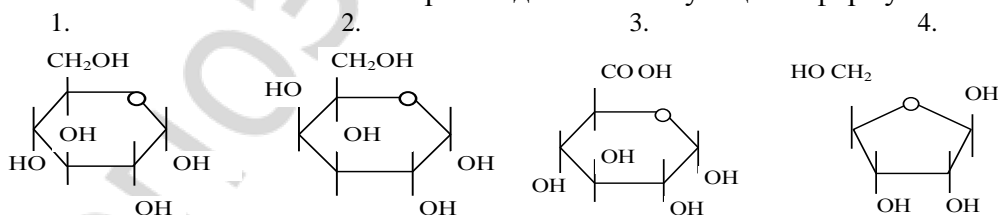
Концентрация глюкозы в крови поддерживается на постоянном уровне и находится под строгим гормональным контролем. Патологические изменения со стороны эндокринной системы (недостаток инсулина, избыток йодтиронинов и др.) сопровождаются нарушением углеводного обмена и приводит к гипергликемии сахарному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

### Цель занятия

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

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задания:

Задание 1. Напишите названия сахаров под соответствующими формулами:



Задание 2. Выберите правильные утверждения:

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

Задание 3. Выберите правильные утверждения:

- |                            |                                      |
|----------------------------|--------------------------------------|
| А. Арабиноза – это пентоза | Г. Галактоза относится к дисахаридам |
| Б. Фруктоза – это гексоза  | Д. Ксилулоза – это пентоза           |
| В. Эритроза – это тетроза  |                                      |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

## Вопросы для обсуждения

1. Пентозофосфатный путь (субклеточная локализация, этапы, ключевые ферменты, метаболиты, биологическая роль).
2. Глюкуроновый путь (тканевая и субклеточная локализация, пути метаболизма глюкуроновой кислоты, биологическая роль).
3. Регуляция содержания глюкозы в крови. Механизмы регуляторного действия гормонов (инсулин, адреналин, глюкагон, глюкокортикоиды и др.).
4. Темновая стадия фотосинтеза (суммарное уравнение). Карбоксилирование рибулозо – 1,5 – бисфосфата, последовательность реакций до образования 3 – ФГА. Синтез углеводов в цикле Кальвина.

### Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 217–225, 176–177.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 53–54, 74–78.
3. *Конспект лекций*.

### Задания для самостоятельной работы

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

1.1. Вспомните и укажите сходство и различия в структуре и функциях НАДН·Н<sup>+</sup> и НАДФН·Н<sup>+</sup>.

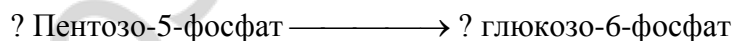
1.2. Запомните:

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

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

Умейте объяснить значение ПФП для этих клеток и тканей.

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



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

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

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

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

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

Г. Это дополнительный путь синтеза пентоз

Д. Выполняет энергетическую функцию

*Задание 3.* Заполните таблицу, обобщающую сведения о влиянии гормонов на обмен углеводов, выбирая правильные варианты ответов из приведенных ниже:



### Гормональная регуляция концентрации глюкозы в крови

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

Эти гормоны синтезируются:

- $\alpha$ -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы;
- клетками коркового слоя надпочечников;
- клетками мозгового слоя надпочечников;
- $\beta$ -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы.

По химической природе представляют собой: белок; полипептид; производное тирозина; стероид.

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

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

*Задание 4.* Подберите соответствующие пары гормон — механизм действия:

- |              |   |
|--------------|---|
| 1. Кортизол  | А. Активация аденилатциклазы → повышение уровня цАМФ в клетке → 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  |

*Задание 5.* Механизмы действия адреналина на углеводный обмен включают:

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

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

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

*Задание 7.* Темновая фаза фотосинтеза называется:

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

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

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

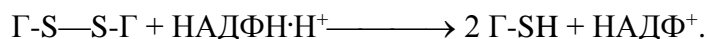
*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

#### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

**Задание 2.** Применение некоторых лекарственных препаратов может вызвать гемолиз эритроцитов и развитие желтухи (лекарственная гемолитическая анемия). Причиной является нарушение в эритроцитах реакции восстановления дисульфидной формы глутатиона в сульфгидрильную:



Восстановленный глутатион ( $\Gamma-SH$ ) — 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 <sup>+</sup> | В. УТФ          | Д. Жирных кислот    |
| Б. ФАД              | Г. Кофермента А | Е. Половых гормонов |

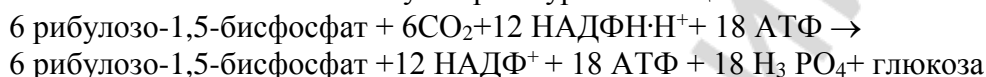
**Задание 4.** Кофеин ингибирует 3',5'-фосфодиэстеразу, превращающую цАМФ в АМФ. Какой из перечисленных эффектов будет наблюдаться после воздействия кофеина?

- 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 5.** Почечный порог для глюкозы составляет:

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

**Задание 6.** Запомните суммарное уравнение цикла Кальвина:



**Задание 7.** В ходе темновой стадии фотосинтеза в первой реакции карбоксилирования  $\text{CO}_2$  связывается с:

- |                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| А. Глюкозобисфосфатом | В. Рибулозобисфосфатом  |
| Б. Рибозобисфосфатом  | Г. Ксилулозобисфосфатом |

**Задание 8.** Установите правильную последовательность образования продуктов в ходе реакций темновой фазы фотосинтеза:

- |                              |                               |
|------------------------------|-------------------------------|
| А. Фосфоглицериновая кислота | Б. Фосфоглицериновый альдегид |
| В. Рибулозо-5-фосфат         |                               |

### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

- 1.1. Глюкоза, 2. Галактоза, 3. Глюкуроновая кислота, 4. Рибоза;  
 2А, Г, Д; 3А, Б, В, Д.

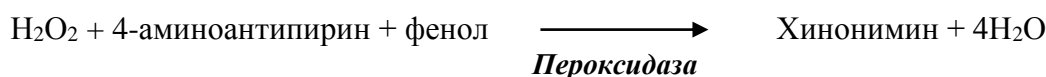
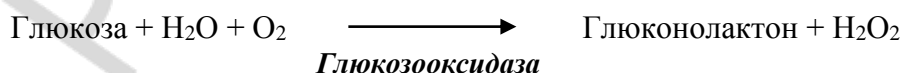
**Для самостоятельной работы:**

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

### Лабораторная работа

#### 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 °С		

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

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

Расчет производят по формуле:

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

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

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

#### **Результаты:**

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

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

Вывод:

Подпись преподавателя:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Виды биологического окисления. Витамины РР и В<sub>2</sub> как участники окислительно-восстановительных реакций. Нарисовать блок-схемы НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, ФМН и ФАД. Оксигеназный путь утилизации кислорода в клетках. Ферменты. Окисление в микросомах. Схема микросомной цепи. Сравнить оксидазный и оксигеназный пути утилизации кислорода. Роль этих процессов в клетке.

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

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

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

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

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

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

12. Химизм спиртового брожения (неокислительный этап, окислительный этап). Реакции, общие для спиртового брожения и гликолиза. Различия этих двух процессов.

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

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

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

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

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

18. Гликогенолиз, биологическая роль. Что такое фосфоролиз и гидролиз гликогена? Возможны ли реакции гидролиза гликогена в клетках? Схема фосфоролиза гликогена. Знать различия этого процесса в печени и мышцах. Изобразить схему гликогенолиза под влиянием глюкагона, тканевая локализация. Механизмы активирования гликогенфосфорилазы адреналином (схема). Показать на схеме, что выгоднее в энергетическом отношении: сразу окислять глюкозу или вначале присоединить ее к гликогену (расчет провести для анаэробных условий).

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

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

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

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

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

### **Занятие 13. ОБМЕН ЛИПИДОВ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ, ВСАСЫВАНИЕ И РЕСИНТЕЗ. ТРАНСПОРТ ЭКЗОГЕННЫХ ЛИПИДОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ**

#### **Актуальность темы**

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



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

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

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

#### *Литература для подготовки*

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

#### **Задания для самостоятельной работы**

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

- |                                    |   |
|------------------------------------|---|
| А. Холестерол                      | 1. Энергетическая   |
| Б. Триацилглицерол                 | 2. Структурная  |
| В. Жирные кислоты                  | 3. Предшественник стероидных гормонов, витамина Д <sub>3</sub> , 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            | В. Гликохолевая | Д. Дезоксихолевая |
| Б. Хенодезоксихолевая | Г. Литохолевая  |                   |

2.1. Подберите место образования для вышеперечисленных желчных кислот:

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

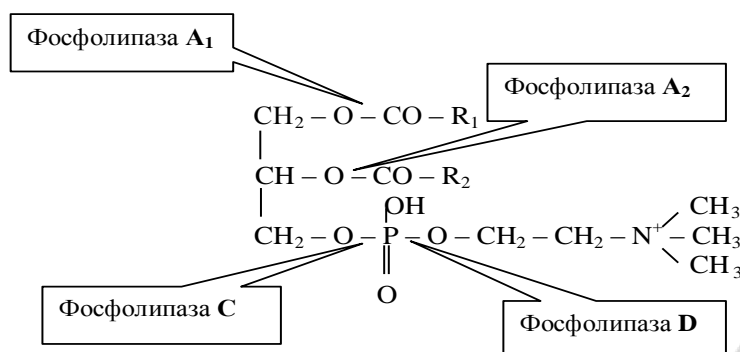
2.2. Изучите схему печеночно-кишечной рециркуляции желчных кислот и обратите внимание на то, что ежедневно с калом выделяется 0,5–1 г желчных кислот. Это единственный значимый путь выведения холестерина из организма.

*Задание 3.* Эмульгирование гидрофобных жиров — одно из условий эффективной работы панкреатической липазы. Напишите в общем виде реакцию поэтапного гидролиза ТАГ под действием этого фермента с учетом того, что панкреатическая липаза с большей скоростью расщепляет в жирах сложно-эфирные связи в  $\alpha$ -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  $\beta$ -моноацилглицеролов) образуются:

- |             |                        |
|-------------|------------------------|
| А. Мицеллы  | В. Секреторные гранулы |
| Б. Липосомы | Г. Триацилглицеролы    |

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



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

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

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

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

**Задание 6.** Выберите особенности, характеризующие транспорт экзогенных липидов:

- А. Хиломикроны поступают непосредственно в кровоток
- Б. Хиломикроны поступают в лимфу
- В. После гидролиза ТАГ в составе хиломикронов липопротеинлипазой, располагающейся на эндотелии сосудов, жирные кислоты поступают в клетки различных тканей
- Г. Окончательное расщепление обломков хиломикронов на составные компоненты происходит в гепатоцитах

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

**Задание 1.** Все перечисленные липиды относятся к глицерофосфолипидам, кроме:

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

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

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

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

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



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

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

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

- А. Фосфолипаза А<sub>1</sub>      В. Панкреатическая липаза  
 Б. Фосфолипаза А<sub>2</sub>      Г. Гормон-чувствительная липаза

**ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

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

*Для самостоятельной работы:*

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

**Лабораторная работа**

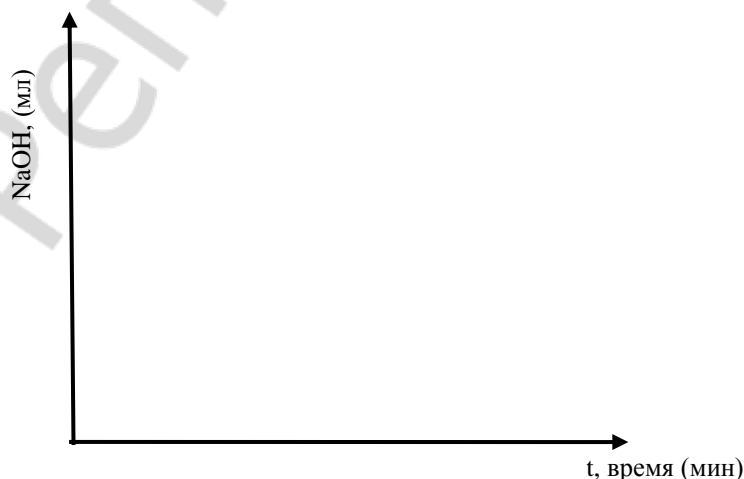
**Работа 1. Кинетика действия панкреатической липазы**

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

*Ход работы.* В пробирку наливают 5 мл молока и добавляют 1 мл 5% раствора панкреатина (сока поджелудочной железы). Приливают 1 мл желчи, содержимое пробирки быстро перемешивают. Отбирают 1 мл смеси в колбу, добавляют 1–2 капли 0,5% раствора фенолфталеина и титруют 0,05н раствором NaOH до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд. Пробирку с оставшейся смесью помещают в термостат при 38°C. Через каждые 10 минут из пробирки отбирают по 1 мл смеси и титруют 0,05н раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до слаборозовой окраски. Проводят 5 таких определений, записывают результаты и на основании полученных данных строят кривую, отражающую процесс гидролиза жира под действием фермента липазы во времени.

Результаты:

	Время инкубации					
	0 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин
Объем NaOH, мл						



**Результат:**

**Вывод:**

**Работа 2. Действие фосфолипаз поджелудочной железы**

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

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

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

**Занятие 14. ДЕПОНИРОВАНИЕ И МОБИЛИЗАЦИЯ ЛИПИДОВ. ОБМЕН ХОЛЕСТЕРОЛА. ТРАНСПОРТ ЛИПИДОВ КРОВЬЮ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ В -ЛИПОПРОТЕИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

**Актуальность темы**

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

Холестерол — важный элемент мембранной структуры, предшественник стероидных гормонов, витамина Д, желчных кислот. Холестерол присутствует в пищевых жирах и может синтезироваться многими тканями. Механизм его синтеза находится под строгим метаболическим контролем. С нарушением обмена липидов и холестерина связаны такие заболевания, как ожирение, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, желчнокаменная болезнь.

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

**Цель занятия**

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

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:**

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

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

*Правильность решения проверьте, сопоставив его с ответами.*

**Вопросы для обсуждения**

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

2. Мобилизация липидов из жировой ткани (схема, цАМФ-зависимый механизм активации гормон-чувствительной липазы, гормональная регуляция). Роль депонирования и мобилизации жиров.

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

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

5. Механизмы поддержания баланса холестерина в клетках. Транспорт холестерина (ЭХ) во внепеченочные клетки, роль апоВ<sub>100</sub>. Роль ЛПВЛП и ЛХАТ в разгрузке клеток от избытка холестерина. Метаболизм эфиров холестерина, роль АХАТ, холестеролэстеразы.

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

#### *Литература для подготовки*

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 255–263, 265–270, 285–289.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 87–91, 98–101.
3. *Конспект лекций*.

#### **Задания для самостоятельной работы**

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

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

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

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

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

*Задание 3.* Знайте строение и роль различных липопротеинов в транспорте холестерола в организме, участие ЛПНП и ЛПВЛП в переносе холестерола из кровотока в ткани и избытка холестерола из тканей в печень.

3.1. Выберите, в какой форме пищевой холестерол поступает в кровотоки:

- |         |          |          |                 |
|---------|----------|----------|-----------------|
| А. ЛПНП | Б. ЛПВЛП | В. ЛПОНП | Г. Хиломикронов |
|---------|----------|----------|-----------------|

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

4.1. Какой фермент осуществляет внутриклеточный липолиз?

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

4.2. Каким гормоном активизируется этот фермент?

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*



пидных компонентов. При электрофоретическом разделении липопротеинов плазмы крови (на хроматографической бумаге, ацетатцеллюлозе, агаре, в полиакриламидном геле) получают фракции хиломикронов и липопротеинов различной плотности:  $\alpha$ -липопротеины (ЛПВП) имеют подвижность  $\alpha$ -глобулинов,  $\beta$ -липопротеины (ЛПНП) обладают подвижностью  $\beta$ -глобулинов. Пре- $\beta$ -липопротеины (ЛПОНП) на электрофореграмме располагаются от линии старта перед  $\beta$ -липопротеинами, поэтому у них такое название.

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

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

*Ход работы.* В пробирку вносят 2 мл 0,025М раствора  $\text{CaCl}_2$  и 0,2 мл сыворотки крови, перемешивают. Определяют оптическую плотность раствора ( $E_1$ ) против раствора  $\text{CaCl}_2$  в кюветах толщиной 5 мм при красном светофильтре (630 нм). В кювету добавляют 0,1 мл раствора гепарина, перемешивают и точно через 4 мин снова определяют оптическую плотность раствора ( $E_2$ ) в тех же условиях.

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

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

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

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

## **ЗАНЯТИЕ 15. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН ЖИРНЫХ КИСЛОТ. КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

### **Актуальность темы**

Жирные кислоты — неотъемлемый составной компонент большинства липидов. Нарушение соотношения незаменимых жирных кислот в питании может приводить к существенным изменениям в составе эйкозаноидов и, как следствие, к различной патологии.

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

### **Цель занятия**

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

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

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

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

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

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

**Задание 3.** Из какого предшественника может образоваться  $\beta$ -гидроксibuтират?

- |                          |                     |                                   |
|--------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| А. Ацетон                | В. Масляная кислота | Д. $\gamma$ -Оксимасляная кислота |
| Б. Ацетоуксусная кислота | Г. Янтарная кислота |                                   |

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Вопросы для обсуждения

1.  $\beta$ -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.  $\beta$ -окисление жирных кислот с нечетным количеством углеродных атомов, ненасыщенных жирных кислот. Особенности  $\beta$ -окисления в пероксисомах.

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

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

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

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

### Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 264–265, 270–285, 289–295.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013, С. 92–97.
3. *Конспект лекций*.

### Задания для самостоятельной работы

**Задание 1.** Научитесь рассчитывать энергетический выход  $\beta$ -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  $\beta$ -окисления происходят две реакции дегидрирования, в которых восстанавливаются одна молекула НАД<sup>+</sup> (НАДН-Н<sup>+</sup>) и одна молекула ФАД (ФАДН<sub>2</sub>), 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

В. Напишите реакции катаболизма глицерола (глицерол  $\rightarrow$  фосфоглицерол  $\rightarrow$  диоксиацетонфосфат  $\rightarrow$  глицеральдегидфосфат) до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

Г. Рассчитайте количество АТФ, образующееся при окислении одной молекулы глицерола до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

Д. Рассчитайте суммарный выход АТФ при полном окислении трипальмитоилглицерола.

1.2. При каком условии активируется  $\beta$ -окисление жирных кислот?

А. При уменьшении синтеза малонил-КоА в цитозоле.

Б. При увеличении концентрации НАДН·Н<sup>+</sup> в митохондриях.

В. При гипоксии.

Г. При наличии большого количества глюкозы.

*Задание 2.2.1.* Напишите реакции первого витка синтеза пальмитиновой кислоты.

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

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

2.4. Укажите, какие из приведенных ниже жирных кислот

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

2. Не синтезируются в организме                Б. 18:1 (9)

и должны поступать с пищей                    В. 18:3 (9, 12, 15)

Г. 18:0.

Д. 16:0.

2.5. При каких условиях будет увеличиваться синтез жирных кислот?

А. При повышении концентрации глюкозы в крови после еды

Б. При снижении секреции инсулина

В. При увеличении секреции глюкагона

Г. При дефосфорилировании ацетил-КоА-карбоксилазы

Д. При избыточном поступлении жиров с пищей

*Задание 3.3.1.* Укажите, какие функции регулируют перечисленные ниже эйкозаноиды:

1. Лейкотриены                    А. Сокращение гладких мышц, липолиз, секреция, проницаемость, электролитный баланс, свертывание крови

2. Простагландины                Б. Хемотаксис, воспаление, аллергические реакции, сокращение гладкой мускулатуры бронхов и ЖКТ

3. Тромбоксаны                    В. Агрегация тромбоцитов, сужение сосудов и бронхов, регуляция уровня цАМФ в тромбоцитах

3.2. Известно, что аспирин необратимо ингибирует циклооксигеназу.

А. Объясните, почему аспирин в малых дозах может применяться для предотвращения образования тромбов.

Б. У некоторых людей (с генетической предрасположенностью) принятие аспирина может вызвать приступ бронхиальной астмы — так называемую аспириновую астму. Помогут ли данному больному стероидные препараты?

**Задание 4.** Изучите пути образования кетоновых тел в печени и их метаболизм. Обратите внимание на то, что ацетоацетат и  $\beta$ -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. Оцените энергетический эффект (в моль АТФ) окисления 1 моль ацетоацетата до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Расчет запишите:

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

**Задание 1.** Один цикл  $\beta$ -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

**Задание 2.** Изучив метаболизм жирных кислот, заполните таблицу:

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

**Задание 3.** 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

### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

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

*Для самостоятельной работы:*

1.1. 336,5; 1.2. А; 2.3. 34 молекулы глюкозы; 2.4. (1 – Б, Г, Д; 2 – А, В); 2.5. (А, Г);

3.1. (1 – Б; 2 – А; 3 – В); 4.1. Б, Г; 4.2. 20 АТФ.

### Лабораторная работа

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

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





## Результат:

## Вывод:

Подпись преподавателя:

### Занятие 16. ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМЕ «ОБМЕН ЛИПИДОВ»

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

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

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

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

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

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

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

8. Схемы путей образования НАДФН·Н<sup>+</sup> для кетоацилредуктазной и еноилредуктазной реакций биосинтеза жирных кислот в гепатоцитах и адипоцитах.

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

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

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

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

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

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

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

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

17. Месторасположение действия фосфолипаз А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>, С и D на структуру фосфолипидов. Реакции синтеза лецитина. Липотропные факторы, их роль в нарушении синтеза глицерофосфолипидов в печени. Механизм развития жирового перерождения печени. Липотропные факторы как лекарственные препараты.

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

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

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

21. Получение липосом и их использование для доставки лекарственных веществ к органам и тканям.

## **Занятие 17. КОНТРОЛЬ ПРАКТИЧЕСКИХ НАВЫКОВ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

### **Актуальность темы**

Качественный и количественный биохимический анализ находит широкое применение в клинических и аналитических исследованиях. Так, некоторые цветные реакции нашли широкое применение в фармацевтической практике для количественного определения белка и аминокислот (биуретовая реакция лежит в основе биуретового метода количественного определения белка, нингидриновая реакция используется для количественного определения аминокислот).

### **Цель занятия**

Закрепить приобретенные практические навыки качественного и количественного биохимического анализа. Проведением цветных реакций на белки и аминокислоты проверить умение студентов применять методы качественного анализа для решения прикладных аспектов фармации.

### **Требования к исходному уровню знаний**

Для качественного выполнения заданий необходимо вспомнить из:

#### ***биоорганической химии:***

– методы проведения цветных реакций на белки и аминокислоты.

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

#### **Работа 1. *Цветные реакции на белки и аминокислоты***

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

Название реакции	Принцип реакции	Краткий ход работы	Примечания	Наблюдаемые изменения	Вывод
Биуретовая реакция (Пиотровского)	Данная реакция открывает пептидную связь в белке. Обусловлена образованием в щелочной среде биуретового комплекса в результате соединения меди с пептидной группировкой белка. При этом раствор приобретает сине-фиолетовый цвет	К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 5 капель 10%-ного р-ра NaOH, 2 капли 1%-ного р-ра сульфата меди. Содержимое пробирки перемешивают	Биуретовую реакцию дают вещества, содержащие <b>не менее двух пептидных связей</b>		
Нингидриновая реакция	Аминокислоты, полипептиды и белки при кипячении с водным р-ром нингидрина дают синее или сине-фиолетовое окрашивание. В результате взаимодействия $\alpha$ -аминокислоты с нингидрином образуется шиффово основание, которое перегруппировывается, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден	К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 5 капель 0,5 % водного раствора нингидрина и кипятят 1–2 мин. Отмечают появление окраски	Характерна для аминогрупп в $\alpha$ -положении, входящих в состав белков, полипептидов и свободных аминокислот		
Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)	При обработке р-ра белка концентрированной азотной кислотой появляется желтое окрашивание. Ароматические АК при взаимодействии с HNO <sub>3</sub> конц. образуют нитросоединения, окрашенные в желтый цвет	К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли HNO <sub>3</sub> конц. и осторожно (!) кипятят	Положительная реакция Мульдера доказывает присутствие в растворе ароматических аминокислот (три, фен, тир)		
Реакция на тирозин (Миллона)	Тирозин при взаимодействии с реактивом Миллона и при кипячении образует кроваво-красный осадок ртутной соли динитротирозина благодаря наличию у тирозина фенольного ядра	К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли реактива Миллона и осторожно (!) нагревают	Соединения, имеющие в своем составе фенольное ядро, также дают положительную реакцию Миллона		
Реакция Фоля	Сульфгидрильные группы (-SH) в белке или в пептиде подвергаются щелочному гидролизу, в результате чего происходит отщепление серы в виде сульфида свинца, который с плюмбитом дает черный или бурый нерастворимый осадок сульфида свинца — PbS	К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 5 капель реактива Фоля. Прокипятить и дать постоять 1–2 мин	Положительна только с аминокислотами, которые содержат слабосвязанную серу (цистеин)		

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

Существует два типа цветных реакций:

1) универсальные — биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все  $\alpha$ -аминокислоты и белки);

2) специфические — только на определенные аминокислоты как в молекуле белка, так и в растворах аминокислот, например, реакция Фоля (на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу), реакция Сакагучи (на аргинин) и др.

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

1) раствор яичного белка (содержит ароматические, алифатические и серосодержащие аминокислоты);

2) раствор желатина (желатин — денатурированный коллаген, не содержит ароматических аминокислот);

3) раствор ароматических  $\alpha$ -аминокислот;

4) раствор алифатических  $\alpha$ -аминокислот.

## **Занятие 18. АЗОТИСТЫЙ БАЛАНС. ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ. ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В КЛЕТКЕ. АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА**

### **Актуальность темы**

Об обмене белков судят по азотистому балансу — разнице между поступлением азота в составе белков пищи и выделению азота из организма. Белки пищи могут быть использованы организмом человека только после предварительного переваривания и расщепления в пищеварительном тракте до свободных аминокислот. От переваривания зависит полноценное снабжение организма азотом и незаменимыми аминокислотами. Существует два типа распада белков (протеолиза) — тотальный (неограниченный), при котором белки распадаются до аминокислот, и ограниченный (частичный), при котором отщепляется несколько аминокислот. Катализируют этот процесс — протеазы. Ограниченный протеолиз имеет регуляторное значение (активация ферментов, гормонов белковой природы, системы свертывания крови, системы комплемента и другие процессы). Поступившие в клетки аминокислоты образуют фонд аминокислот, который пополняется за счет распада пищевых и тканевых белков и аминокислот, образующихся из других веществ. Аминокислоты фонда клетки используются для синтеза белков и других соединений, а также подвергаются индивидуальным превращениям и общим реакциям обмена — дезаминированию, трансаминированию, декарбоксилированию.

### **Цель занятия**

Сформировать представление об обмене белка в организме как главном пищевом источнике азота и аминокислот. Получить представление о молекулярных основах переваривания белков в ЖКТ, особенностях действия различных протеаз и использовании их ингибиторов в клинической практике, всасывании аминокислот и транспорте их в клетки. Освоить методы клинического анализа желудочного сока.

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

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

А. Аланин

Г. Метионин

Б. Валин

Д. Тирозин

В. Глутаминовая кислота

Е. Фенилаланин

*Задание 2.* При исследовании желудочного сока методом гель-фильтрации выделили неактивную форму пепсина с молекулярной массой 42 кДа. После добавления к ферменту соляной кислоты молекулярная масса пепсина уменьшилась до 35 кДа и фермент стал активным. Какой вид регуляции характерен для данного фермента?

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

*Задание 3.* Выберите, какая из перечисленных реакций протекает с участием НАД<sup>+</sup>-зависимого фермента:

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

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

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Вопросы для обсуждения

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

### Литература для подготовки

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

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.1.* Запомните основные этапы переваривания белков:

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

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

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

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

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

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

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

В. Образование продуктов, лишенных антигенной специфичности

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

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

А. Сближение аминокислот, входящих в активный центр

Б. Изменение вторичной структуры фермента

В. Образование новых связей в молекуле фермента

Г. Изменение первичной структуры

Д. Изменение третичной структуры

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

А. Наличие слизи, содержащей гетерополисахарида

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

В. Наличие гликопротеинов на наружной поверхности мембран

Г. Отсутствие субстратов

*Задание 4.* Какие ферменты относятся к экзопептидазам?

А. Карбоксипептидазы А и В

Б. Пепсин

В. Аминопептидаза

Г. Трипсин

Д. Эластаза

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

А. Аланинаминотрансфераза

Б. Пепсин

В. Трипсин

Г. Аминопептидаза

Д. Эластаза

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

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

А. Какие ферменты могут активироваться при острых панкреатитах?

Б. Какие последствия может вызвать такая активация?

В. Как можно уменьшить разрушительное действие панкреатических протеаз?

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

*Задание 2.* При гипоацидном гастрите снижение кислотности желудочного сока вызывает торможение частичного протеолиза молекулы пепсиногена. Изменения какого уровня структурной организации фермента имеют решающее значение при его активации?

А. Первичной структуры    Б. Вторичной структуры    В. Третичной структуры

Г. Четвертичной структуры    Д. Более высокого уровня

*Задание 3.* Препарат контрикал — конкурентный ингибитор панкреатических ферментов назначается при остром панкреатите, при котором вследствие внутриклеточной активации панкреатических ферментов происходит разрушение тканей. Выберите характерные особенности ингибирования:

А. Ингибитор является структурным аналогом субстрата

Б. Степень ингибирования зависит от концентрации ингибитора

В. Структура ингибитора не похожа на структуру субстрата

Г. Степень ингибирования зависит от времени действия ингибитора

Д. Образование неактивного комплекса ингибитор-субстрат

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

**ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

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

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

**Лабораторная работа**

**Работа 1. Количественное определение кислотности желудочного сока**

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

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

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

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

Титруют свободную соляную кислоту 0,1н NaOH из микробюретки до появления оранжевого окрашивания и результат записывают (1-я отметка). Не добавляя щелочи в бюретку, продолжают титрование до появления лимонно-желтого цвета и результат записывают (2-я отметка от 0). Продолжают титрование до появления розового окрашивания (3-я отметка от 0).

*Расчет.* **Содержание свободной HCl** (1-я отметка), **связанной HCl** (2-я отметка) и **общую кислотность** (3-я отметка) рассчитывают по формуле:

$$X \text{ (ммоль/л)} = A \times 1000 \times 0,1/10,$$

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

Результаты:

	<b>Свободная HCl</b>	<b>Связанная HCl</b>	<b>Общая кислотность</b>
<b>Желудочный сок №1</b>	A <sub>1</sub> = X (ммоль/л) =	A <sub>2</sub> =    A <sub>2</sub> – A <sub>1</sub> = X (ммоль/л) =	A <sub>3</sub> = X (ммоль/л) =
<b>Желудочный сок №2</b>	A <sub>1</sub> = X (ммоль/л) =	A <sub>2</sub> =    A <sub>2</sub> – A <sub>1</sub> = X (ммоль/л) =	A <sub>3</sub> = X (ммоль/л) =
<b>Желудочный сок №3</b>	A <sub>1</sub> = X (ммоль/л) =	A <sub>2</sub> =    A <sub>2</sub> – A <sub>1</sub> = X (ммоль/л) =	A <sub>3</sub> = X (ммоль/л) =

**Вывод:**



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

#### **Работа 2. Обнаружение молочной кислоты реакцией Уффельмана**

Молочная кислота относится к патологическим составным частям желудочного сока и обнаруживается при ахлоргидрии вследствие усиления процессов брожения в желудке.

*Принцип метода.* При добавлении к реактиву Уффельмана, имеющему фиолетовую окраску, патологического желудочного сока появляется желто-зеленое окрашивание вследствие образования лактата железа (положительная реакция Уффельмана).

*Ход работы.* Готовят в пробирке реактив Уффельмана (20 капель 1% раствора фенола и 2 капли 1% раствора хлорного железа). Добавляют в пробирку 5 капель желудочного сока. При наличии молочной кислоты появляется желто-зеленая окраска.

**Вывод:**

#### **Работа 3. Количественное определение активности пепсина желудочного сока**

*Принцип метода.* В основе метода лежит способность пепсина в желудочном соке створаживать белок молока — казеиноген. Створаживание молочно-ацетатной смеси при pH 4,9 и температуре 25 °С пепсином происходит строго параллельно его способности переваривать белки. За единицу активности пепсина принимают то его количество, которое при указанных условиях створаживает 5 мл молочно-ацетатной смеси за 60 с (эта условная единица соответствует 0,010 мг кристаллического пепсина). Желудочный сок человека в норме содержит в 1 мл 40–60 ед. пепсина. Таким же методом можно определить активность уропепсина в моче. С мочой здорового человека за сутки обычно выделяется от 150 до 300 ед. (1,5–3 мг) уропепсина.

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

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

Полученные данные и расчет:

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

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

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

### Актуальность темы

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

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

### Цель занятия

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

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

### Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

*Задание 1.* Активность каких процессов снижается при недостатке тиамина?

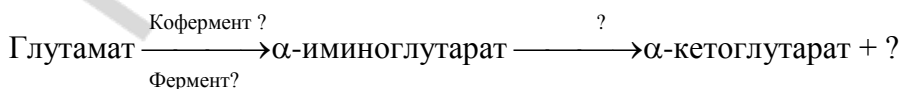
- А. Трансаминирование аминокислот
- Б. Декарбоксилирование аминокислот
- В. Окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокилот
- Г. Окислительное дезаминирование аминокислот

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

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

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

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



- |                            |                     |                     |                    |
|----------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| А. Глутаматдекарбоксилаза  | Г. НАД <sup>+</sup> | Ж. H <sub>2</sub> O | К. NO <sub>2</sub> |
| Б. Глутаматдегидрогеназа   | Д. ФАД              | З. NH <sub>3</sub>  |                    |
| В. Аспаратаминотрансфераза | Е. ФМН              | И. CO <sub>2</sub>  |                    |

**Задание 5.** Аммиак в клетке образуется в результате:

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

**Задание 6.** Назовите ферменты, катализирующие в организме человека реакции окислительного дезаминирования аминокислот:

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Вопросы для обсуждения

1. Декарбоксилирование аминокислот, ферменты, кофермент. Биогенные амины (трип-тамин, серотонин, гистамин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота), катехоламины (дофамин, норадрена-лин, адреналин). Реакции образования, биологическая роль. Окисление биогенных аминов (MAO и DAO). Лекарственные средства – ингибиторы аминоксидаз.

2. Трансаминирование, аминотрансферазы, коферментная функция витамина B<sub>6</sub>. Кли-нико-диагностическое значение определения активности аминотрансфераз сыворотки крови.

3. Пути дезаминирования аминокислот. Окислительное дезаминирование (ферменты, коферменты). Окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты (химизм), значение глутаматдегидрогеназной реакции. Непрямое дезаминирование.

4. Пути использования безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты. Способы синтеза новых аминокислот.

5. Пути образования и связывания аммиака в клетках (восстановительное аминирова-ние  $\alpha$ -кетоглутарата, синтез глутамина и аспарагина, образование карбамоилфосфата). Транспортные формы аммиака.

6. Орнитиновый цикл мочевинообразования (схема цикла, субстраты, ферменты, энер-гетическое обеспечение, связь с лимоннокислым циклом, регуляция). Гипераммониемия.

7. Образование солей аммония в почках (источник аммиака, роль глутаминазы и глута-матдегидрогеназы, значение активирования глутаминазы почек при ацидозе).

8. Остаточный азот крови (основные компоненты и их относительное содержание). Принцип определения и клинико-диагностическое значение.

### Литература для подготовки

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

### Задания для самостоятельной работы

**Задание 1.** Какие биохимические реакции катализирует аланинаминотрансфераза?

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

**Задание 2.** Укажите витамин, который является коферментом глутаматдегидрогеназы:

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

**Задание 3.** Укажите кофермент аспартатаминотрансферазы:

- А. НАД<sup>+</sup>  
Б. ФАД
- В. НАДФ<sup>+</sup>  
Г. Пиридоксальфосфат
- Д. Тиаминпирофосфат

*Задание 4.* Недостатком какого кофермента обусловлено снижение скорости трансминирования аминокислот?

- |                      |                       |                      |
|----------------------|-----------------------|----------------------|
| А. НАД <sup>+</sup>  | В. ФАД                | Д. Тиаминпирофосфата |
| Б. НАДФ <sup>+</sup> | Г. Пиридоксальфосфата |                      |

*Задание 5.* При декарбоксилировании каких аминокислот или их производных образуются следующие биогенные амины?

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

*Задание 6.* Подберите соответствующие пары вопрос — ответ:

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

*Задание 7.* Назовите ферменты, катализирующие следующие реакции:

1. Образование амида глутаминовой кислоты
2. Восстановительное аминирование  $\alpha$ -кетоглутарата
3. Гидролиз амида глутаминовой кислоты
4. Образование амида аспарагиновой кислоты
5. Образование карбамоилфосфата

*Задание 8.* Напишите реакцию преобразования аммиака в карбамоилфосфат.

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

*Задание 1.* Сравните процессы трансминирования и дезаминирования аминокислот. Установите соответствие:

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

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

1. Участвует в трансминировании как универсальный донор NH<sub>2</sub>-группы
2. Легко образуется из  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты — универсального акцептора аминогрупп
3. Дезаминируется НАД<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназой
4. Является заменимой аминокислотой

*Задание 3.* Установите соответствие между безазотистым остатком и аминокислотой:

- |                           |             |
|---------------------------|-------------|
| 1. Пируват                | А. Аспартат |
| 2. $\alpha$ -Кетоглутарат | Б. Аланин   |
| 3. Оксалоацетат           | В. Глутамат |

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

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

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

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

**Задание 6.** Подберите к реакциям орнитинового цикла недостающий компонент:

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

**Задание 7.** Назовите конечные продукты азотистого обмена:

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

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

### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

1В; 3А, Б, Д.



5А, В, Д; 6А, Б, Д.

**Для самостоятельной работы:**

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

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

### Лабораторная работа

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

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

**Принцип метода.** Метод основан на способности мочевины, содержащей аминогруппы, образовывать с *n*-диметиламинобензальдегидом в кислой среде комплексное соединение, окрашенное в желтый цвет. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации мочевины в исследуемой моче и определяется фотометрически.

**Порядок выполнения работы.** Пипетки и пробирки должны быть обязательно сухими.

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

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

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

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

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

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

**Расчет:**

**Вывод:**

**Клинико-диагностическое значение.** Пониженное содержание мочевины в моче отмечается при нефрите, ацидозе, паренхиматозной желтухе, циррозе печени, уремии, по-

вышенное — при голодании, злокачественной анемии, лихорадке, интенсивном распаде белков в организме, после приема салицилатов, при отравлении фосфором.

## Работа 2. *Количественное определение остаточного азота*

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

Основной частью остаточного азота крови является азот мочевины — 50 %, затем следует азот аминокислот — 25 % и азот других азотсодержащих компонентов. **В норме остаточный азот крови составляет 14,3–25,0 ммоль/л.**

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

*Порядок выполнения работы.* Готовят три обычные пробирки. В 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 3-ю наливают 10 мл воды (контроль). Затем во все пробирки вносят по 0,5 мл реактива Несслера. Фотометрируют опытную (минерализат) и стандартную пробы против контроля при синем светофильтре в кювете толщиной 5 мм.

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

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

где  $C_{оп}$  — концентрация остаточного азота в крови, ммоль/л;  $C_{ст}$  — 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); 71,4 — коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л).

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

**Расчет:**

*Клинико-диагностическое значение.* Определение остаточного азота и его фракций используется для диагностики нарушения выделительной функции почек и мочевинообразовательной функции печени. Повышение остаточного азота в крови обозначается термином «азотемия». Азотемия может быть двух видов: абсолютной (накопление в крови компонентов остаточного азота) и относительной (дегидратация организма при рвоте или поносе). Причины абсолютной азотемии могут быть две: **ретенционная** (почечная) и **продукционная** (внепочечная). Ретенционная азотемия вызывается задержкой азотистых шлаков при их нормальном образовании и наблюдается при нарушении выделительной способности почек, например при острых и хронических нефритах за счет повышения уровня мочевины в крови. При хронических нефритах стойкая азотемия указывает на развивающуюся недостаточность почек. Продукционная азотемия наблюдается при усиленном распаде белков и преобладании аминокислот, например, при злокачественных новообразованиях. Повышение остаточного азота отмечается при кахексии неракового происхождения, вызванной туберкулезом, диабетом и циррозом печени, при сердечной недостаточности, инфекционных заболеваниях (скарлатине, дифтерии). У недоношенных детей азотемия может быть связана с почечной недостаточностью и усиленным распадом тканевых белков.

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

## **Вывод:**

Подпись преподавателя:

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

### **Актуальность темы**

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

Для изучения состояния азотистого обмена в организме пользуются определением общего азота мочи. В диагностике ряда заболеваний применяют методы определения содержания в моче отдельных азотсодержащих соединений. Количество мочевой кислоты в моче и крови зависит от поступления нуклеопротеинов с пищей и от интенсивности их клеточного метаболизма. Этот показатель — важный критерий в диагностике и контроле лечения подагры.

### **Цель занятия**

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

### **Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

*Задание 1.* Подберите соответствующие пары вопрос – ответ:

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

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

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

*Задание 3.* Подберите соответствующие пары вопрос – ответ:

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

## Вопросы для обсуждения

1. Мононуклеотиды, строение, номенклатура, биологическая роль.
2. Первичная, вторичная и третичная структуры нуклеиновых кислот (особенности структуры, разновидности, типы стабилизирующих связей).
3. Обмен нуклеопротеинов. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте (значение, этапы, ферменты). Распад нуклеиновых кислот в тканях, роль лизосомных ферментов.
4. Распад пуриновых нуклеотидов (химизм, мочевая кислота как конечный продукт катаболизма). Представление о нарушениях пуринового обмена (гиперурикемия и подагра, почечно-каменная болезнь).
5. Биосинтез пуриновых нуклеотидов *de novo* (источники азота и углерода пуринового кольца, участие фолиевой кислоты, основные промежуточные продукты, ключевой фермент, регуляция синтеза). Представление о синтезе нуклеотидов из свободных азотистых оснований и нуклеозидов.
6. Распад пиримидиновых нуклеотидов.
7. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов (субстраты, схема процесса, ключевой фермент, регуляция синтеза, роль витаминов). Представление о нарушениях пиримидинового обмена (оротацидурия).
8. Синтез дезоксирибонуклеозидфосфатов, нуклеозиддифосфатов и нуклеозидтрифосфатов.
9. Общий азот мочи (количество, компоненты и их происхождение).

### Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 345–368.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 113–125.
3. *Конспект лекций*.

## Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Выберите положения, правильно характеризующие свойства ксантиноксидазы:

- А. Ее коферментом является производное витамина РР
- Б. Одним из продуктов реакции является перекись водорода
- В. Фермент катализирует две последовательные необратимые реакции образования мочевой кислоты
- Г. Субстрат фермента — гипоксантин — имеет меньшую растворимость, чем мочевая кислота
- Д. Фермент обладает абсолютной специфичностью к субстрату

*Задание 2.* В результате активации какого метаболического процесса развивается гиперурикемия?

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

*Задание 3.* Дополните недостающими компонентами реакции синтеза пуриновых рибонуклеотидов:

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

*Задание 4.* Дополните недостающими компонентами реакции синтеза пиримидиновых нуклеотидов:



- |  |         |
|--|---------|
| 1. Карбамоилфосфат + ? → карбамоиласпартат | А. ФРПФ |
| 2. Оротат + ? → ОМФ + $H_4P_2O_7$          | Б. Асп  |
| 3. ОМФ → $CO_2$ + ?                        | В. АТФ  |
| 4. УМФ + ? → УДФ + ?                       | Г. АДФ  |
| 5. УДФ + ? → УТФ + ?                       | Д. УМФ  |

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

*Задание 1. Установите соответствие между нуклеотидом и его функцией:*

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

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

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

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

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

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

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

*Задание 5. При терапии некоторых форм рака применяются ингибиторы дигидрофолатредуктазы. Торможение каких реакций определяет цитостатическое действие препарата?*

- |  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| А. Синтез пиримидиновых нуклеотидов      | Б. Синтез пуринового ядра нуклеотидов |
| В. Синтез дезоксицитидиловых нуклеотидов | Г. Синтез цитидиловых нуклеотидов     |
| Д. Синтез дУМФ                           |                                       |

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

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

### **ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

*Для самопроверки исходного уровня знаний: 1А – 5, Б – 2, В – 4, Г – 3, Д – 1, Е – 6.*

- 2** 1. Дезоксиаденозиндифосфат.  
2. Цитидинмонофосфат.  
3. Дезоксигуанозинтрифосфат.  
4. Уридиндифосфат.

**3** А – 3, Б – 1, В – 2, Г – 4, 5

*Для самостоятельной работы:*

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

## Лабораторная работа

### Работа 1. *Определение содержания общего азота мочи колориметрическим методом*

Исследование общего азота мочи может быть использовано для исследования состояния азотистого баланса. Количество общего азота, выделяемого за сутки с мочой, у взрослого человека составляет 6–17 г (**428–1214 ммоль/сут**).

*Принцип метода.* После сжигания (минерализации) органических веществ мочи с концентрированной серной кислотой азот всех исследуемых фракций в виде аммиака связывается с серной кислотой, образуя сульфат аммония. Колориметрическое определение общего азота основано на том, что сульфат аммония образует с реактивом Несслера соединение желто-оранжевого цвета, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации аммиака, а следовательно, и азота в моче.

*Порядок выполнения работы.* Готовят три сухие пробирки. В одну из них отмеривают 0,5 мл минерализата (опыт), во 2-ю — 0,5 мл стандартного раствора сульфата аммония (стандарт, содержащий 0,2 мг азота в 1 мл). Прибавляют в каждую пробирку по 6,5 мл воды и тщательно перемешивают. В 3-ю пробирку отмеривают 7 мл воды (контроль) и во все пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Несслера. Содержимое пробирок тщательно перемешивают. *Необходимо строго соблюдать порядок приливания реагентов и тщательно перемешивать жидкость.* Фотометрируют опытную и стандартную пробы против контроля при синем светофильтре в кювете толщиной 5 мм.

*Расчет.* Содержание азота в опытной пробе рассчитывают по стандартному раствору сульфата аммония по формуле:

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

где  $C_{оп}$  — концентрация азота мочи в исследуемой пробе, мг/мл;  $C_{ст}$  — концентрация  $(NH_4)_2SO_4$  в стандартной пробе (0,2 мг в 1 мл);  $E_{оп}$  — оптическая плотность опытной пробы;  $E_{ст}$  — оптическая плотность стандарта сульфата аммония.

Содержание общего азота в моче (г/сут) рассчитывают по формуле:

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

где  $C_{оп}$  — концентрация азота, найденная по стандартному раствору; 100 — разведение мочи при приготовлении минерализата; 0,5 — количество минерализата, взятого для анализа; 1000 — коэффициент перевода миллиграммов в граммы.

Суточное выделение мочи составляет в среднем 1500 мл для мужчин и 1200 мл для женщин. Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) = 71,39.

**Полученные данные:**  $E_{оп} =$        $E_{ст} =$       **Расчет:**  $C_{оп} =$

*Клинико-диагностическое значение.* Определение общего азота мочи позволяет судить о белковом обмене в организме, о количестве распавшегося белка. Для этого полученную величину общего азота умножают на 6,25, исходя из того, что в белке в среднем содержится 16% азота ( $100 : 16 = 6,25$ ).

При заболевании почек, вследствие нарушения их выделительной функции содержание общего азота в моче уменьшается. Задержка азота в организме наблюдается при заболеваниях печени и сердечно-сосудистой системы в связи с возникновением отеков, при наличии экссудатов и трансудатов.

Увеличение содержания общего азота в моче отмечается при усиленном распаде белков (отрицательный азотистый баланс), диабете, при рассасывании экссудатов и трансудатов, хроническом отравлении фосфором.

**Вывод:**

## Работа 2. *Определение содержания мочевой кислоты в моче*

Мочевая кислота у человека является конечным продуктом обмена пуриновых оснований, входящих в состав сложных белков — нуклеопротеинов.

**В норме** у человека с мочой выделяется **мочевой кислоты 1,6–3,54 ммоль/сут (270–600 мг/сут)**.

*Принцип метода.* Метод основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорно-вольфрамовый реактив в фосфорно-вольфрамовую синь, интенсивность окраски которой пропорциональна содержанию мочевой кислоты. Количество фосфорно-вольфрамовой сини определяется путем титрования красной кровяной солью  $K_2[Fe(CN)_6]$ . Последняя окисляет фосфорно-вольфрамовую синь, и синее окрашивание исчезает.

*Порядок выполнения работы.* К 1,5 мл мочи прибавляют 1 мл 20% раствора карбоната натрия и 1 мл фосфорно-вольфрамового реактива Фолина, перемешивают и титруют 0,01н раствором  $K_3[Fe(CN)_6]$  до исчезновения синего окрашивания.

*Расчет.* Содержание мочевой кислоты (в мг) в суточной моче вычисляют по формуле:

$$\text{Мочевая кислота, мг/сут} = 0,8 \cdot a \cdot v / 1,5,$$

где 0,8 мг мочевой кислоты соответствует 1 мл  $K_3[Fe(CN)_6]$ ;  $a$  — количество  $K_3[Fe(CN)_6]$ , пошедшее на титрование, мл;  $v$  — суточный диурез, мл; 1,5 — объем пробы, мл.

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) равен 0,0059.

**Полученные данные и расчет:**  $a =$

*Клинико-диагностическое значение.* Гипоурикурия (уменьшение выделения мочевой кислоты с мочой) отмечается при подагре, нефрите, почечной недостаточности; гиперурикурия (увеличение выделения мочевой кислоты с мочой) — при лейкемии, усиленном распаде нуклеопротеинов. У детей выделяется относительно больше мочевой кислоты, чем у взрослых. Выделение мочевой кислоты зависит от содержания пуринов в пище и интенсивности обмена нуклеопротеинов.

При подагре соли мочевой кислоты (ураты) откладываются в хрящах, мышцах и слизистой сумке суставов. Содержание мочевой кислоты в крови может быть повышено, а в моче понижено.

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

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

### **Актуальность темы**

Знание строения нуклеиновых кислот позволяет понять механизмы передачи и реализации генетической информации в клетке, овладеть основами понимания причин наследственных заболеваний и разработать методы их лечения. Нуклеотиды и их аналоги используются в качестве лекарственных препаратов. Различные группы антибиотиков влияют на процессы репликации, транскрипции и трансляции.

### **Цель занятия**

Усвоить молекулярные механизмы репликации, репарации, транскрипции, трансляции и механизмы их регуляции. Систематизировать эти знания и обсудить возможные механизмы нарушений реализации генетической информации для понимания последствий и подходов к лечению этих нарушений. Освоить методы анализа продуктов гидролиза нуклеопротеинов.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Подберите пары и напишите формулу:

Название	Составные части
А. Гуанозин	1. Рибоза, фосфат, аденин
Б. Адениловая кислота	2. Дезоксирибоза, тимин
В. Уридин	3. Гуанин, рибоза
Г. ДезоксиЦМФ	4. Урацил, рибоза
Д. Тимидин	5. Фосфат, дезоксирибоза, цитозин

Задание 2. Выберите, что относится только к ДНК, только к РНК, к ДНК и РНК:

- |  |  |
|--|--|
| А. Хранение генетической информации                  | Е. Реализация генетической информации              |
| Б. А, Г, Т, Ц  | Ж. Рибоза  |
| В. Цитоплазма  | З. Ядро  |
| Г. 3',5'-фосфодиэфирная связь между мононуклеотидами | И. А, Г, У, Ц                                      |
| Д. Дезоксирибоза                                     | К. Стабильность структуры поддерживается Н-связями |

Задание 3. Выберите правильное утверждение, характеризующее каждый из перечисленных методов:

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

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

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

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

### Вопросы для обсуждения

- Репликация, биологическая роль, субстраты, ферменты, молекулярный механизм.
- Транскрипция, биологическая роль, молекулярный механизм, механизмы регуляции активности генов (схема Жакоба – Моно, схема Георгиева), процессинг РНК. Обратная транскрипция.
- Генетический код и его свойства.
- Рекогниция (субклеточная локализация, схема, субстратная специфичность АРСаз). Роль тРНК в синтезе белка.
- Трансляция, как этап реализации генетической информации в клетке. Современное представление о биосинтезе белка, регуляция биосинтеза белка (роль гистонов, гормонов и жирорастворимых витаминов).
- Посттрансляционная модификация молекул белка (гидроксилирование, гликозилирование, ограниченный протеолиз, фосфорилирование, карбоксилирование).
- Ингибиторы биосинтеза белка (лекарственные препараты, токсины).
- Современные методы молекулярной биологии (ПЦР, блот-анализ ДНК (Саузерн-блот), метод «отпечатков пальцев ДНК», клонирование). Принципы проведения, применение.
- Метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК (метод Сэнджера).

### Литература для подготовки

1. Фармацевтическая биохимия : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 369–425.
2. Биологическая химия : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 113–125.
3. Нуклеопротеины : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск, 2000.
4. Конспект лекций.

### Задания для самостоятельной работы

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

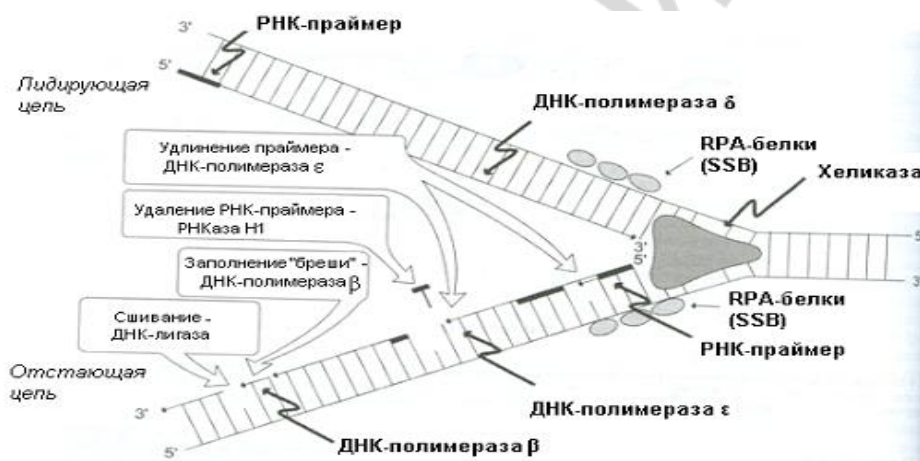
- А. Хранение и передача информации (репликация и репарация).
- Б. Реализация генетической информации — экспрессия генов (рекогниция, транскрипция и трансляция).

На рисунке показаны основные участники механизма репликации у эукариот:

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

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

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

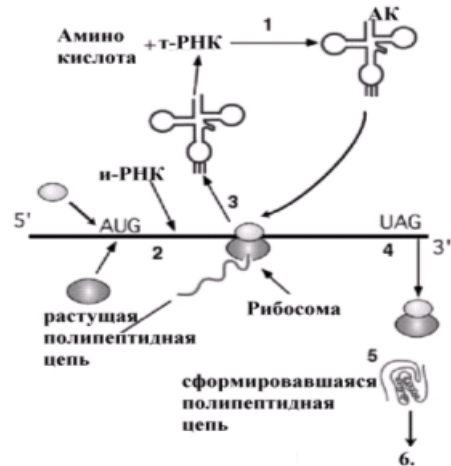


**Задание 2.** Вспомните, что среди механизмов узнавания белками (ферментами, факторами регуляции и т. д.) отдельных участков нуклеотидных последовательностей определенную роль играют палиндромные последовательности нуклеотидов (в частности, при узнавании ДНК-рестриктазами), которые могут формировать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

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



**Задание 3.** Механизмы реализации генетической информации в клетке 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	

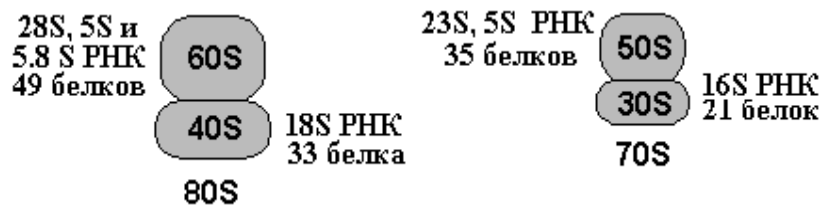
Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

**Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

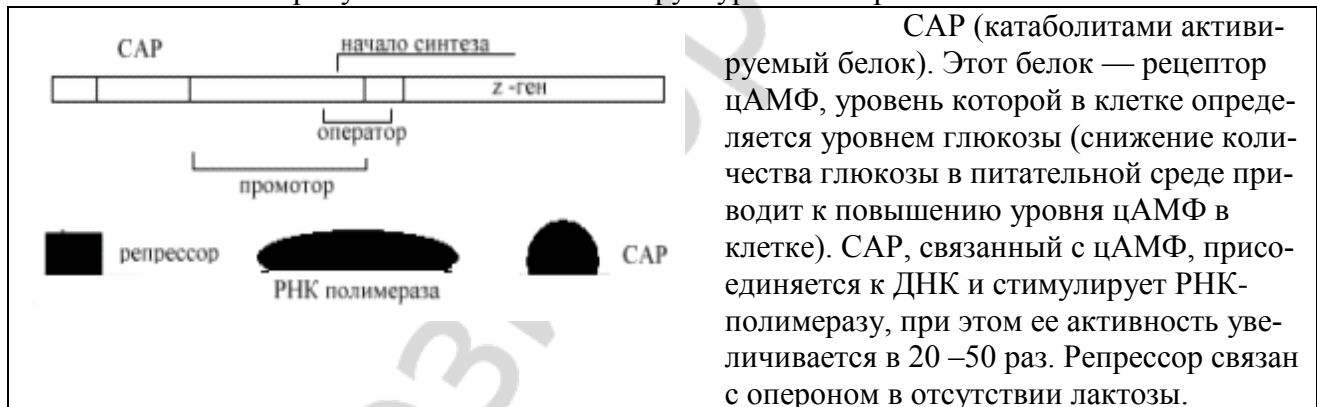
Задание 1. Напишите реакцию, катализируемую АРСазой.

Задание 2. Почему  $60S+40S=80S$ , а  $50S+30S=70S$ ? Выберите правильный ответ.

1. Скорость седиментации зависит от массы частиц
2. Скорость седиментации зависит от формы частиц
3. От того и другого



Задание 3. На рисунке показана схема структуры lac-оперона.



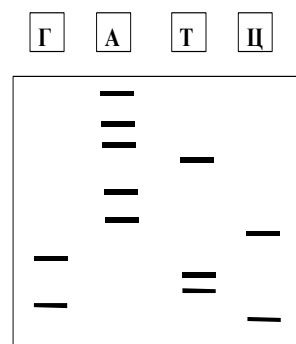
А. Дополните строку:  
 промотор – место связывания \_\_\_\_\_  
 оператор – место связывания \_\_\_\_\_

Задание 4. Из приведенных веществ выберите те, которые ингибируют биосинтез белка на рибосомах:

- А. Стрептомицин
- Б. Хлорамфеникол (левомицетин)
- В. Альфа-аманитин
- Г. Рифампицин
- Д. Эритромицин

Каковы эффекты и механизмы действия всех перечисленных препаратов?

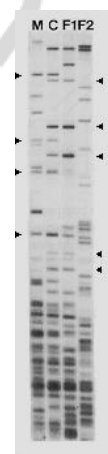
**Задание 5.** На рисунке справа приводятся результаты электрофореза фрагментов участка молекулы ДНК (метод Сэнджера). Попробуйте выяснить на основании этих результатов нуклеотидную последовательность анализируемого участка ДНК. Какая аминокислотная последовательность закодирована в этом участке? Буквы в скобках обозначают соответствующие дидезоксинуклеотиды, вносимые в реакционную среду ДНК-полимеразной реакции. Какую роль выполняют дидезоксинуклеотиды в этом методе? Таблицу генетического кода смотрите в учебнике.



**Задание 6.** В генно-инженерных технологиях используются ферменты - рестриктазы. Найдите верное утверждение:

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

**Задание 7.** Справа «отпечатки пальцев» ДНК матери (М), ребенка (С) и двух предполагаемых отцов (F1, F2). Указатели на левой стороне указывают полосы ДНК, общие между ребенком и матерью. Указатели на правой стороне указывают полосы ДНК, общие между ребенком и предполагаемыми отцами. Ваше мнение о предполагаемом отце.



#### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

- 1 (А – 3, Б – 1, В – 4, Г – 5, Д – 2);
- 2 ДНК – А, Б, Д; РНК – В, Е, Ж, И; ДНК и РНК – Г, К, З;
- 3 (1 – В, 2 – А, 3 – Б); 4 А, Б, Г.

**Для самостоятельной работы:**

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

#### Лабораторная работа

##### *Анализ продуктов гидролиза нуклеопротеинов дрожжей*

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

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

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

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

**Работа 3. Качественная реакция на пентозу (Молиша).** К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно приливают 20–30 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется продукт конденсации красного цвета.

Работа 4. **Молибденовая проба на фосфорную кислоту.** К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 20 капель молибденового реактива и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет (не осадок). Пробирку сразу охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется кристаллический лимонно-желтый осадок фосфорномолибденовой кислоты.

**Выводы:**

Подпись преподавателя:

## **Занятие 22. ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ: «ОБМЕН ПРОСТЫХ БЕЛКОВ И НУКЛЕОПРОТЕИНОВ. БИОСИНТЕЗ ДНК, РНК 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, нормальные значения.
5. Гниение белков. Уметь схематически показать происхождение фенола, крезола, скатола, индола, кадаверина, путресцина. Механизмы обезвреживания продуктов гниения белков
6. Аминокислотный фонд клетки, его пополнение и использование.
7. Переаминирование. Роль витамина B<sub>6</sub>. 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. Умейте привести примеры конкретных метаболических путей.
10. Пути обезвреживания аммиака. Уметь написать реакции синтеза и распада аспарагина, глутамина, восстановительного аминирования  $\alpha$ -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,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, знать их роль в организме и способы обезвреживания.
12. Синтез катехоламинов. Функции дофамина, норадреналина и адреналина в организме. Обезвреживание катехоламинов. Применение ингибиторов MAO.
13. Нуклеотиды — их строение и функции. Знать номенклатуру и уметь писать формулы азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов; изображать образование 3'-5'-фосфодиэфирной 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. Ингибиторы биосинтеза белка (лекарственные препараты, токсины).
27. Современные методы молекулярной биологии (ЦПР, блот-анализ ДНК (Саузерн-блот), метод «отпечатков пальцев ДНК», клонирование). Принципы проведения, применение.
28. Метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК (метод Сэнджера).

*Пример задачи и вопросов на метод Сэнджера*

На рисунке приводятся результаты исследования нуклеотидной последовательности участка молекулы ДНК (метод Сэнджера). На чем основан этот метод? Что нужно сделать, чтобы получить такую картину (поэтапно)?

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

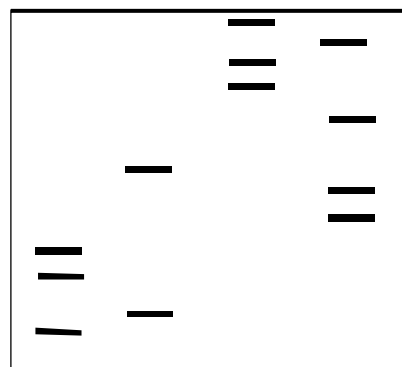
Что обозначают буквы в скобках и черточки на рисунке?

Какую роль выполняют дидезоксинуклеотиды в этом методе?

В каком направлении следует «читать» полученную электрофореграмму и почему? Установите, в какой последовательности ДНК-полимераза включала нуклеотиды в синтезируемую цепь. Что нужно сделать, чтобы расшифровать полученную картину и узнать последовательность нуклеотидов в анализируемом участке ДНК?

Какая аминокислотная последовательность закодирована в этом участке? (таблица генетического кода будет в Вашем распоряжении).

Г      А      Т      Ц



### **Занятие 23. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГОРМОНЫ**

#### **Актуальность темы**

Гормоны — класс регуляторных химических соединений, синтезируемых железами внутренней секреции и/или специальными клетками. Значение гормональной продукции заключается в том, что секретируемые гормоны осуществляют регуляцию метаболизма отдельных органов и тканей, определяют состояние физиологических процессов и жизнедеятельности организма в целом. Нарушение синтеза, секреции, транспорта и рецепции гормонов клетками лежит в основе многообразных эндокринных расстройств. Гормоны широко используются в качестве лекарственных препаратов и понимание механизма эндокринных нарушений чрезвычайно важно для целенаправленной терапии эндокринных заболеваний. Методы качественного и количественного анализа используются в клинико-биохимических и аналитических лабораториях для определения гормонов в биологическом материале и лекарственных препаратах.

#### **Цель занятия**

Научиться применять знание классификации гормонов, типов гормональных рецепторов, G-белков и последующего каскада внутриклеточных передатчиков для понимания особенностей механизма действия гормонов на клетки. Уметь применять знания о механизме действия индивидуальных гормонов для объяснения расстройств метаболизма при нарушении образования или гиперпродукции гормонов в организме.

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

*Задание 1.* Подберите соответствующие пары гормон – источник гормона:

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| А. $\alpha$ -Клетки островков Лангерганса | 1. Глюкагон           |
| Б. $\beta$ -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.* Выберите правильный ответ: эндокринная секреция — это:

- А. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в окружающую среду и действует на рядом расположенные клетки
- Б. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в окружающую среду и действует на клетку, в которой он был синтезирован
- В. Нейромедиатор, синтезируемый нервными клетками
- Г. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в кровь и действует на отдаленные от места синтеза клетки

*Задание 3.* Какие гормоны секретируются аденогипофизом?

- |                 |                                   |
|-----------------|-----------------------------------|
| А. Окситоцин    | Г. Серотонин.                     |
| Б. Либерины     | Д. АКТГ                           |
| В. Соматотропин | Е. Меланоцитостимулирующий гормон |

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Вопросы для обсуждения**

1. Классификация гормонов по месту синтеза, химической структуре. Гормоны как лекарственные препараты.
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,  $\text{Ca}^{2+}$ , диацилглицерол).
8. Растворимая и мембраносвязанная гуанилатциклазы. Оксид азота.
9. Аденилатциклаза и фосфолипаза С. Их роль в клетке.
10. Роль протеинкиназ в клетке.

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 426–468.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С.144–152.
3. *Конспект лекций*

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Вспомните, какие гормоны связываются с внутриклеточными рецепторами, а какие — с рецепторами, встроенными в цитоплазматическую мембрану. Обратите внимание, что при патологии рецепторов ткани-мишени теряется чувствительность к гормону (гормон не вызовет соответствующего метаболического ответа).

1.1. В клинику поступил больной в состоянии гипергликемической комы. Введение инсулина не нормализовало концентрацию глюкозы крови. Какую причину гипергликемии можно предположить у больного?

- А. Аномалия клеточных рецепторов
- Б. Гиперфункция гормонов коры надпочечников
- В. Истинная гипоинсулинемия
- Г. Опухоль базофильных клеток гипофиза
- Д. Опухоль мозгового слоя надпочечников

1.2. У лабораторных животных, подвергшихся действию мутагенного вещества, обнаружили в тканях измененную аденилатциклазу. К какому гормону будут нечувствительны органы-мишени у этих животных?

- А. Эстрадиолу
- Б. Тироксину
- В. Глюкагону
- Г. Прогестерону
- Д. Альдостерону

*Задание 2.* Вспомните химическую природу гормонов.

2.1. Студенту предложили смоделировать биосинтез адреналина, используя в качестве источника ферментов гомогенат мозгового слоя надпочечников, а в качестве субстрата — одно из нижеперечисленных веществ. Студент не справился с заданием, так как использовал для синтеза:

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

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

- А. Сукцинил-КоА
- Б. 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,  $\text{Ca}^{2+}$ , диацилглицерол. Запомните, что цАМФ по своему влиянию на метаболизм клетки является антагонистом цГМФ.

3.1. Препарат теofilлин является ингибитором фосфодиэстеразы цАМФ. Активность какого гормона может усилиться на фоне лечения теофилином?

- А. Адреналин
- Б. Дезоксикортикостерон
- В. Альдостерон
- Г. Кортизол
- Д. Эстрадиол

3.2. Какой вторичный посредник активно участвует в действии гормонов мозгового слоя надпочечников?

- А. цАМФ
- Б. Простагландины
- В. цГМФ
- Г. Са-кальмодулин
- Д. цГМФ

3.3. Введение каких веществ может уменьшить интенсивность действия адреналина на органы-мишени?

- А. Активаторы фосфодиэстеразы    Г. цГМФ  
 Б. цАМФ    Д. Ингибиторы кальциевых каналов  
 В. Простагландины

3.4. Какое из названных соединений не является вторичным посредником в действии гормонов?

- А. Диацилглицерол.    В. цГМФ    Д. ГМФ  
 Б. цАМФ    Г. Ca<sup>2+</sup>

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

**Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)**

*Задание 1.* Внутривидные рецепторы обнаружены для:

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

*Задание 2.* Фосфолипаза, расщепляющая фосфатидилинозитол на диацилглицерол и ИТФ, это:

- А. Фосфолипаза А<sub>1</sub>    Б. Фосфолипаза А<sub>2</sub>    В. Фосфолипаза С    Г. Фосфолипаза Д

*Задание 3.* Какой из нижеперечисленных гормонов не является стероидом?

- А. Кортизол    В. Прогестерон  
 Б. Альдостерон    Г. Пролактин    Д. Дигидроксихолекальциферол

*Задание 4.* Какой из нижеперечисленных гормонов не является пептидом?

- А. Окситоцин    В. Глюкагон    Д. Тиреолиберин  
 Б. Трийодтиронин    Г. Вазопрессин

*Задание 5.* G<sub>s</sub>-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<sub>s</sub>-белка  
 Г. Фосфолипазной активностью G<sub>s</sub>-белка  
 Д. ГТФ-азной активностью α-субъединицы  
 Е. ГТФ-азной активностью γ-субъединицы

*Задание 6.* Фосфорилироваться в рецепторах гормонов могут аминокислоты, содержащие ОН-группы. Назовите киназу, которой не существует:

- А. Тирозинкиназа    Г. Тир/сер/тре-киназа  
 Б. Рецептор инсулина    Д. Рецептор соматотропина  
 В. Серин-треонинкиназа    Е. Тир/вал-киназа

*Задание 7.* Выберите вторичные посредники действия окситоцина:

- А. Ca<sup>2+</sup>    В. цГМФ    Д. Оксид азота  
 Б. цАМФ    Г. Диацилглицерол    Е. ИТФ

**ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

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

*Для самостоятельной работы:*

**1.1 А**; **1.2В**; **2.1 Г**; **2.2 Д**; **2.3А**; **3.1 А**; **3.2 А**; **3.3 А, Г**; **3.4 Д**.

**Лабораторная работа**

**Гормоны щитовидной железы**

Работа 1. **Качественная реакция на тироксин**

Щитовидная железа синтезирует и секретирует высокоактивные йодсодержащие тиреоидные гормоны: тироксин (Т<sub>4</sub>) и 3,5,3'-трийодтиронин (Т<sub>3</sub>), а также нейодированный гормон (полипептид) тиреокальцитонин, функция которого связана с регуляцией уровня кальция и фосфора в крови.

*Принцип метода.* При разрушении тиреоидина образуется йодид калия, из которого йод легко вытесняется йодатом калия. Вытеснение йода из соли йодистоводородной кислоты является окислительно-восстановительной реакцией, где йодид калия служит восстановителем, а йодат калия (остаток йодноватой кислоты) — окислителем. Выделившийся йод обнаруживают с помощью крахмала (синее окрашивание) в кислой среде.

*Ход работы.* В пробирку наливают 24 капли гидролизата тиреоидина, прибавляют 3 капли 1%-ного раствора крахмала, 1 каплю фенолфталеина, а затем 4 капли йодата калия и приблизительно 10–15 капель 10%-ного раствора серной кислоты до обесцвечивания и появления синего окрашивания.

### **Гормоны поджелудочной железы**

В поджелудочной железе вырабатывается ряд гормонов: инсулин, глюкагон и липокаин. Инсулин вырабатывается в  $\beta$ -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 NaOH, 2 капли 1% раствора сульфата меди и все перемешивают; содержимое пробирки приобретает фиолетовое окрашивание.

##### **Нингидриновая реакция**

*Ход работы.* К 5 каплям 1% раствора инсулина добавляют 5 капель 0,5% водного раствора нингидрина и кипятят 1–2 мин. В пробирке появляется розово-фиолетовое окрашивание, а с течением времени раствор синее.

##### **Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)**

*Ход работы.* В пробирку наливают 5 капель 1%-ного раствора инсулина, затем добавляют 3 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. В пробирке появляется осадок желтого цвета.

##### **Реакция на тирозин (Миллона)**

*Ход работы.* В пробирку наливают 5 капель 1%-ного раствора инсулина, добавляют 3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. В пробирке появляется осадок темно-красного цвета.

##### **Реакция на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (Фоля)**

*Ход работы.* В пробирку наливают 5 капель 1%-ного раствора инсулина и добавляют 5 капель реактива Фоля, интенсивно кипятят и дают постоять 1–2 мин. При этом появляется черный или бурый осадок сульфида свинца.

### **Гормоны мозгового слоя надпочечников**

В мозговом слое надпочечников из аминокислоты тирозина синтезируются катехоламины, имеющие пирокатехиновое ядро и аминогруппу.

#### **Работа 3. Качественные реакции на адреналин**

##### **Реакция с хлорным железом**

*Принцип метода.* Адреналин обладает слабощелочной реакцией, легко окисляется на воздухе с образованием адренохрома, вследствие чего раствор окрашивается в красный цвет. При взаимодействии с нитритом наблюдается желто-оранжевое окрашивание, с диазореактивом — красное и с хлорным железом — зеленое. Реакция с хлорным железом характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина и норадреналина.

*Ход работы.* В пробирку наливают 10 капель раствора адреналина и добавляют 1 каплю хлорного железа. Появляется зеленое окрашивание вследствие присутствия пирокатехина в молекуле адреналина. Добавляют 3 капли 10%-ного раствора NaOH и наблюдают изменение окрашивания на вишнево-красное.

#### **Диазореакция**

*Принцип метода.* При взаимодействия диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

*Ход работы.* К 6 каплям 0,5%-ного раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 6 капель 0,5%-ного раствора нитрита натрия (смесь диазореактива), 10 капель раствора адреналина и 3 капли 10%-ного раствора NaOH. Жидкость окрашивается в красный цвет.

#### **Работа 4. Флюоресценция продуктов окисления адреналина**

*Принцип метода.* Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, при добавлении щелочи дает флюоресцирующие продукты.

*Ход работы.* К 10 каплям воды приливают 6 капель 10%-ного раствора NaOH и 6 капель раствора адреналина. Поместив пробирку перед включенным флюороскопом, наблюдают зеленую флюоресценцию продуктов окисления адреналина.

### **Гормоны половых желез**

Половые гормоны синтезируются в семенниках, яичниках, плаценте и надпочечниках.

Женские половые гормоны — эстрогены — можно рассматривать как производные эстрана (углеводорода с 18 атомами углерода). Основными природными эстрогенами являются эстрадиол, эстрон и гормон желтого цвета — прогестерон.

Мужские половые гормоны — андрогены — можно рассматривать как производные андростана (углеводорода с 19 атомами углерода). К мужским половым гормонам относятся тестостерон и андростерон.

#### **Работа 5. Качественные реакции на фолликулин**

*Принцип метода.* Качественная реакция на фолликулин (эстрон) проводится с концентрированной серной кислотой и обусловлена образованием эфирного соединения соломенно-желтого цвета с зеленой флюоресценцией.

*Ход работы.* С масляным раствором фолликулина реакцию проводят при комнатной температуре. К 2 каплям масляного раствора фолликулина приливают 30 капель концентрированной серной кислоты. Постепенно развивается соломенно-желтое окрашивание.

**Выводы:**

Подпись преподавателя:

## **Занятие 24. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА. ТЕСТ НА ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ГЛЮКОЗЕ**

### **Актуальность темы**

Механизм действия индивидуальных гормонов необходимо знать не только врачу-эндокринологу, но и медику любой специализации. Гормоны нашли широкое применение в медицине. Диагностика эндокринной патологии на основании изменения биохимических по-

казателей метаболизма, в частности, диагностика сахарного диабета с помощью метода сахарной нагрузки широко применяется в медицинской практике.

#### **Цель занятия**

Закрепить знания о химическом строении и механизмах действия индивидуальных гормонов. Особое внимание уделить эндокринной патологии поджелудочной железы. Научиться строить и интерпретировать результаты построения различных типов сахарной кривой.

#### **Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

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

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

*Задание 2.* Выберите правильные варианты ответа. По химической природе гормоны бывают:

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

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

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

#### **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. Инсулин и глюкагон: химическое строение, синтез инсулина, типы рецепторов в тканях-мишенях для глюкагона и инсулина, реализация эффекта гормонов поджелудочной железы на уровне клеток. Нарушения метаболизма при диабете. Диагностическое значение сахарных кривых.

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

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

8. Половые гормоны: химическое строение, предшественник синтеза, реализация эффекта эстрогенов, прогестерона и мужских половых гормонов на уровне клетки. Избыточная и недостаточная секреция половых гормонов.

### Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 456–476.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 153–159.
3. *Конспект лекций*.

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Особенностью биологического действия гормонов является все ниже перечисленное, кроме:

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

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

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

*Задание 3.* Выберите правильный ответ. Через 1 ТМС рецепторы действуют:

- |                         |                |
|-------------------------|----------------|
| А. Соматотропный гормон | Г. Альдостерон |
| Б. Инсулин              | Д. Пролактин   |
| В. Глюкагон             |                |

*Задание 4.* Инсулин и глюкагон — антагонисты. Вспомните механизм действия этих гормонов на углеводный и липидный обмены.

4.1. Пациент при лечении голоданием потерял 10 кг веса. Активация какого гормона привела к увеличению скорости катаболизма жиров при голодании?

- |                 |                |
|-----------------|----------------|
| А. Инсулин      | Г. Альдостерон |
| Б. Соматостатин | Д. Окситоцин   |
| В. Глюкагон     |                |

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

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

4.3. Какой гормон индуцирует синтез фосфоенолпируваткарбоксикиназы в печени ?

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

4.4. Какие из нижеследующих выражений правильные?

- А. Действие адреналина и глюкагона направлено на увеличение количества гликогенфосфоорилазы
- Б. Интенсивность расщепления гликогена равна интенсивности его синтеза





*Задание 4.* Выберите правильные утверждения. Инсулин:

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

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

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

*Задание 6.* Выберите правильные высказывания, характеризующие кортизол:

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

#### **ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

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

*Для самостоятельной работы:*

1Е; 2 (1-Б,2-А, 3-В,4-Г,5-Д); 3А,Б,Д;4.1 В; 4.2 А4.3 Г; 4.4В, Г, Д;  
5Г; 6Г; 7А,Б,В,Г,Д.

### **Лабораторная работа**

#### **Изучение углеводного обмена методом нагрузки глюкозой**

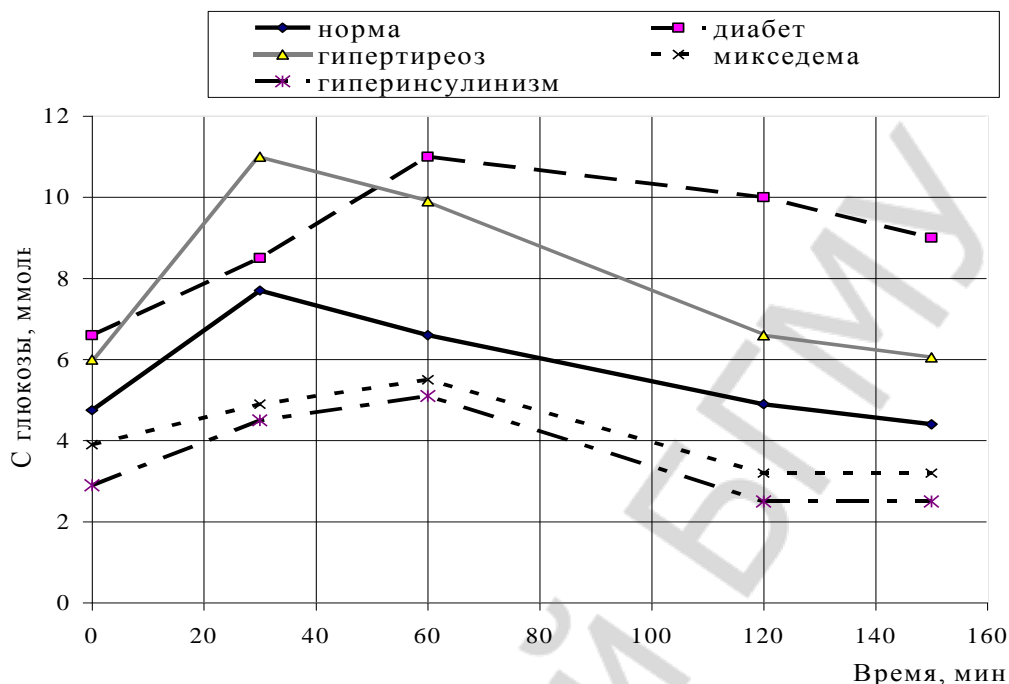
Для диагностики сахарного диабета и некоторых патологических состояний (недостаточность функции печени и почек, некоторые эндокринные заболевания, новообразования мозга, поджелудочной железы и надпочечников, гиповитаминоз В<sub>1</sub>, некоторые наследственные аферментозы) важно иметь представление о состоянии углеводного обмена у больных, одним из показателей которого является уровень глюкозы в крови. **В норме концентрация глюкозы в крови** взрослого человека составляет **3,9–6,1 ммоль/л**.

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

**Проведение нагрузки.** Утром натощак у больного берут кровь из пальца для определения содержания глюкозы, после чего ему дают выпить 200 мл раствора глюкозы (из расчета 1 г глюкозы на 1 кг массы тела) в течение 5 мин. Затем через каждые 30 мин у больного снова берут кровь из пальца (в пределах 2,5–3 ч), и результаты определения содержания глюкозы в этих пробах используют для построения сахарных кривых, откладывая на вертикальной оси значение концентрации глюкозы в каждой пробе, а на горизонтальной — время (мин или ч).

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

Гликемические кривые при однократной нагрузке глюкозой в норме и при некоторых патологических состояниях



**Результаты:**

		0 мин	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин
<b>Пациент 1</b>	Е <sub>оп.</sub>						
	С ГЛЮКОЗЫ (ММОЛЬ/Л)						
<b>Пациент 2</b>	Е <sub>оп.</sub>						
	С ГЛЮКОЗЫ (ММОЛЬ/Л)						

**Выводы:**

В норме после нагрузки концентрация глюкозы в крови возрастает в течение первого часа на 50–80 %, через 2 часа ее уровень снижается (часто ниже исходного), а через 2,5–3 часа он возвращается к исходному. В случаях нарушения толерантности к глюкозе значительное (до 10,0 ммоль/л) повышение концентрации глюкозы после нагрузки сохраняется более 3 ч.

**Клинико-диагностическое значение оценки гликемических кривых.** У больных с разными формами диабета нарастание гликемической кривой происходит медленнее, достигая через 60–150 мин значительной величины (более чем в 1,8 раза превышая исходное значение), в большинстве случаев отмечается глюкозурия. Чем тяжелее заболевание, тем позже достигается максимум гликемии и тем он выше. Понижение кривой происходит очень медленно, чаще оно растягивается на 3–4 ч.

Заболеваниям щитовидной железы, связанным с ее гиперфункцией, свойственны гликемические кривые с более быстрым, чем в норме, подъемом, что, возможно, вызвано более интенсивным обменом веществ и возбуждением симпатического отдела вегетативной нервной системы.

Для больных с аденомой островков Лангерганса, гипотиреозом (микседемой), болезнью Аддисона характерен низкий исходный уровень кривой, низкая ее вершина и высокий постгликемический коэффициент. При некоторых тяжелых заболеваниях (энцефалит и др.) глюкоза может появляться в моче в результате ренальной глюкозурии.

Подпись преподавателя:

## Занятие 25. БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО БИЛИРУБИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

### Актуальность темы

Печень играет центральную роль в промежуточном обмене веществ. Особенности ферментативного аппарата печени и ее анатомических связей с другими органами дают возможность печени участвовать в регуляции практически всех видов обмена веществ и поддерживать постоянство концентрации в крови многих жизненно важных соединений.

Печень — большая промежуточная станция между портальным и общим кругами кровообращения организма, поэтому все вещества, всасывающиеся из кишечника, должны пройти через печень. Функции печени обуславливают ее своеобразный «биохимический альтруизм»: многие происходящие в ней процессы настроены на синтез различных веществ для других органов, а также на защиту этих органов от образующихся в них (или поступающих извне) токсических соединений.

В состав органа входят клетки Купфера, принимающие участие в фагоцитозе. Печень выделяет желчь, необходимую для переваривания жира. Значительную роль играет печень в процессах свертывании крови, т. к. синтезирует белки-компоненты свертывающей и антисвертывающей систем крови.

В печени депонируются железо, медь и витамин В<sub>12</sub>, необходимые для эритропоэза. Продолжительность жизни эритроцитов составляет 110–120 дней. После этого они разрушаются с освобождением гемоглобина. В печени, селезенке, костном мозге гемоглобин распадается с образованием билирубина. Дальнейшая судьба желчных пигментов (билирубина) связана с их метаболизмом в печени и в кишечнике.

### Цель занятия

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

### Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

*Задание 1.* Больному, страдающему хроническим гепатитом, была проведена нагрузка бензоатом натрия. При этом об обезвреживающей функции печени судили на основании обнаружения в моче:

- |                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| А. Бензойной кислоты    | Г. Гиппуровой кислоты |
| Б. Лимонной кислоты     | Д. Щавелевой кислоты  |
| В. Валериановой кислоты |                       |

*Задание 2.* Методом «меченых атомов» была зафиксирована энтерогепатическая циркуляция желчных кислот. По каким кровеносным сосудам происходит возврат желчных кислот из кишечника к гепатоцитам в процессе этой циркуляции?

- |                               |                                |
|-------------------------------|--------------------------------|
| А. По центральной вене печени | В. По нижней полой вене печени |
| Б. По воротной вене печени    | Г. По печеночной артерии       |

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Вопросы для обсуждения

1. Химический состав и основные функции печени.
2. Роль печени в обмене углеводов, липидов, белков. Запасающая функция печени.
3. Обезвреживающая функция печени, механизмы: защитные синтезы, восстановление, гидролиз, микросомное окисление, конъюгация (примеры).
4. Роль печени в пигментном обмене. Синтез и распад гемоглобина (схемы). Регуляция синтеза гема.

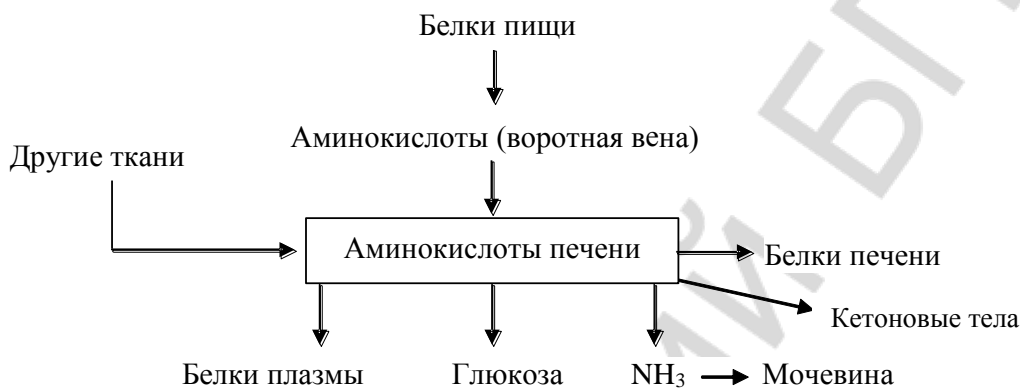
5. Обмен билирубина в желудочно-кишечном тракте.
6. Желтуха: виды и причины ее возникновения.
7. Лабораторная диагностика заболеваний печени.

**Литература для подготовки**

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 598–609, 618–621.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 160–173.
3. *Конспект лекций*.

**Задания для самостоятельной работы**

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



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

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

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

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

**Задание 2.** Для исследования обезвреживающей функции печени пациенту назначена проба Квика. После приема бензоата натрия уровень гиппуровой кислоты в моче обследуемого повысился, что свидетельствует о нормальной детоксикационной функции печени. Какое вещество принимает участие в обезвреживании этой соли?

- |                  |                             |           |
|------------------|-----------------------------|-----------|
| А. ФАФС          | В. УДФ-глюкуроновая кислота | Д. Глицин |
| Б. Церулоплазмин | Г. Таурин                   |           |

**Задание 3.** Выберите правильные ответы. Изоформы цитохрома P450 различаются по:

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

**Задание 4.** Установите правильную последовательность событий при катаболизме гема:

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

*Задание 5.* Выберите правильные ответы. Глюкуронилтрансфераза:

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

**Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

*Задание 1.* Индикан образуется в результате обезвреживания в печени индоксила — продукта гниения аминокислоты триптофана в толстом кишечнике. Какое вещество участвует в обезвреживании этого токсического соединения?

- А. ФАФС
- В. Глицин
- Д. Таурин
- Б. УДФ-глюкуроновая кислота
- Г. Церулоплазмин

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

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

*Задание 3.* Каковы последствия увеличения количества свободных жирных кислот в печени?

- А. Увеличится интенсивность  $\beta$ -окисления
- Б. Увеличится интенсивность гликолиза
- В. Снижится активность пируватдегидрогеназы
- Г. Снижится интенсивность синтеза жирных кислот
- Д. Увеличится интенсивность образования кетоновых тел

*Задание 4.* Выберите правильные ответы. Синтез гема:

- А. Происходит в эритроцитах
- Б. Снижается при гиповитаминозе В6
- В. Регулируется гемом и гемоглобином
- Г. Тормозится при дефиците железа в организме

*Задание 5.* Выберите правильные ответы. Феррохелатаза:

- А. Активируется аскорбиновой кислотой
- Б. Содержит кофермент биотин
- В. Присоединяет железо к порфибилиногену
- Г. Присоединяет железо к протопорфиру

*Задание 6.* Выберите правильные ответы. При паренхиматозной желтухе:

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

**ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

Для самопроверки исходного уровня знаний:

**1Г; 2Б**

Для самостоятельной работы:

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

## Лабораторная работа

### Работа 1. Исследование коллоидоустойчивости белков сыворотки крови

Проба Вельтмана в модификации Тейля

**Принцип метода.** Реакция основана на том, что белки сыворотки крови при добавлении раствора хлористого кальция определенной концентрации и последующем нагревании выпадают в виде хлопьев в осадок (происходит нарушение коллоидной устойчивости).

**Ход определения.** К 4,9 мл воды прибавляют 0,1 мл сыворотки, содержимое пробирки перемешивают путем ее опрокидывания (при этом пробирку можно закрывать большим пальцем) и затем приливают 0,1 мл 0,5%-ного раствора хлористого кальция (из пипетки на 1,0 мл или капельницы, если объем каждой капли соответствует 0,05 мл). Содержимое пробирки встряхивают и нагревают над пламенем спиртовки до однократного вскипания смеси. Затем пробирку охлаждают и смотрят через нее на свет. Если хлопья в пробирке обнаруживаются, то в нее добавляют еще 0,1 мл  $\text{CaCl}_2$  и раствор вновь нагревают до кипения. Процедуру повторяют до выпадения хлопьевидного осадка. Записывают общий объем  $\text{CaCl}_2$  (в мл), добавленный в пробирку.

**Результат: V ( $\text{CaCl}_2$ ) =**

**Примечание.** Сыворотка для исследования должна быть свежей (хранящейся не более 24 часов от момента взятия), без следов гемолиза.

**Клинико-диагностическое значение реакции Вельтмана.** Реакция коагуляции с хлористым кальцием (по Вельтману) может изменяться в двух направлениях: в сторону укорочения коагуляционной ленты или ее удлинения (см. схему).

<b>CaCl<sub>2</sub> (мл)</b>	<b>1,0 0,9 0,8 0,7</b>	<b>0,6 0,5 0,4</b>	<b>0,35 0,3 0,2 0,1</b>
<b>Сужение (сдвиг влево)</b>		<b>Норма</b>	<b>Расширение (сдвиг вправо)</b>
<b>Укорочение</b>			<b>Удлинение</b>
←			→
<b>Экссудаты, некрозы, опухоли</b>			<b>Фиброзы, повреждения печени, гемолиз</b>

Главные причины, которые ведут к удлинению полосы (коагуляция, наступающая при добавлении менее 0,4 мл  $\text{CaCl}_2$ ), — 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  $\gamma$ -глобулинов, снижающих стабильность сыворотки.

Укорочение коагуляционной полосы (коагуляция, наступающая при добавлении более 0,6 мл  $\text{CaCl}_2$ ) обнаруживается при острых воспалительных и экссудативных процессах. В этих случаях увеличивается количество  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов и за счет этого повышается стабильность сыворотки (экссудативная фаза ревматизма, активный процесс туберкулеза легких, нефрозы, макроглобулинемия Вальденштрема,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -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. Конъюгиро-

ванный (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:

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

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.

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

### **Вывод:**

*Клинико-диагностическое значение* исследования пигментного обмена. Один из важных признаков нарушения пигментного обмена — появление **желтухи**, которое отмечается обычно при уровне билирубина в крови 27–34 мкмоль/л и более. Кровь новорожденных, особенно недоношенных детей, отличается более высоким содержанием билирубина (физиологическая желтуха). Наблюдаемое со 2–3-го до 7–10-го дня жизни увеличение концентрации билирубина, в основном за счет непрямого, связано с функциональной недостаточностью печени, в частности, малой активностью фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы, необходимого для образования прямого билирубина.

*Гемолитическая желтуха* (надпеченочная) — усиление гемолиза эритроцитов, что приводит к усиленному образованию неконъюгированного билирубина, так как печень не успевает его связывать.

*Паренхиматозная желтуха* (печеночная) — нарушение функции печеночных клеток. Может быть вызвана также наследственно обусловленными дефектами в процессах транспорта билирубина и образования диглюкуронида билирубина.

*Механическая желтуха* (обтурационная, подпеченочная) — задержка оттока желчи. Возникает при переполнении желчных путей вследствие закупорки, разрыва их и последующего перехода желчи в кровь.

Тяжесть желтухи обычно соответствует уровню билирубинемии. Принято считать, что желтуха протекает в легкой форме, если содержание билирубина в плазме (сыворотке) не превышает 85 мкмоль/л; уровень его 86–169 мкмоль/л свидетельствует о среднетяжелой, а свыше 170 мкмоль/л — о тяжелой форме желтухи.

Подпись преподавателя:



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

### Актуальность темы

Способность организма животных к поддержанию постоянства состава внутренней среды организма осуществляется за счет интеграции метаболических путей и является одним из наиболее существенных достижений эволюции. Изменение интегративных связей нарушает сбалансированную продукцию энергии, пластического материала и служит основой развития заболеваний.

### Цель занятия

Понять принципы и механизмы взаимодействия различных метаболических путей для обеспечения жизнедеятельности и адаптации.

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

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

- |                            |                                      |
|----------------------------|--------------------------------------|
| А. Фосфодиоксиацетон       | Г. Щавелевоуксусная кислота          |
| Б. Ацетил-КоА              | Д. $\beta$ -Гидроксимасляная кислота |
| В. Пировиноградная кислота |                                      |

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

- |                   |                             |               |
|-------------------|-----------------------------|---------------|
| А. Жирные кислоты | В. Ацетоацетат              | Д. Ацетил-КоА |
| Б. Аминокислоты   | Г. $\beta$ -Гидроксипутират |               |

*Задание 3.* Что (1,2,3,4) из чего (А,В,С,Д) может синтезироваться? Подберите соответствующие пары:

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. Аминокислоты заменимые   | А. Аминокислоты заменимые   |
| 2. Аминокислоты незаменимые | В. Аминокислоты незаменимые |
| 3. Глюкоза                  | С. Глюкоза                  |
| 4. Жирные кислоты           | Д. Жирные кислоты           |

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Вопросы для обсуждения

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

### Литература для подготовки

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 630–642.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 160–173.
3. *Конспект лекций*.

### Задания для самостоятельной работы

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

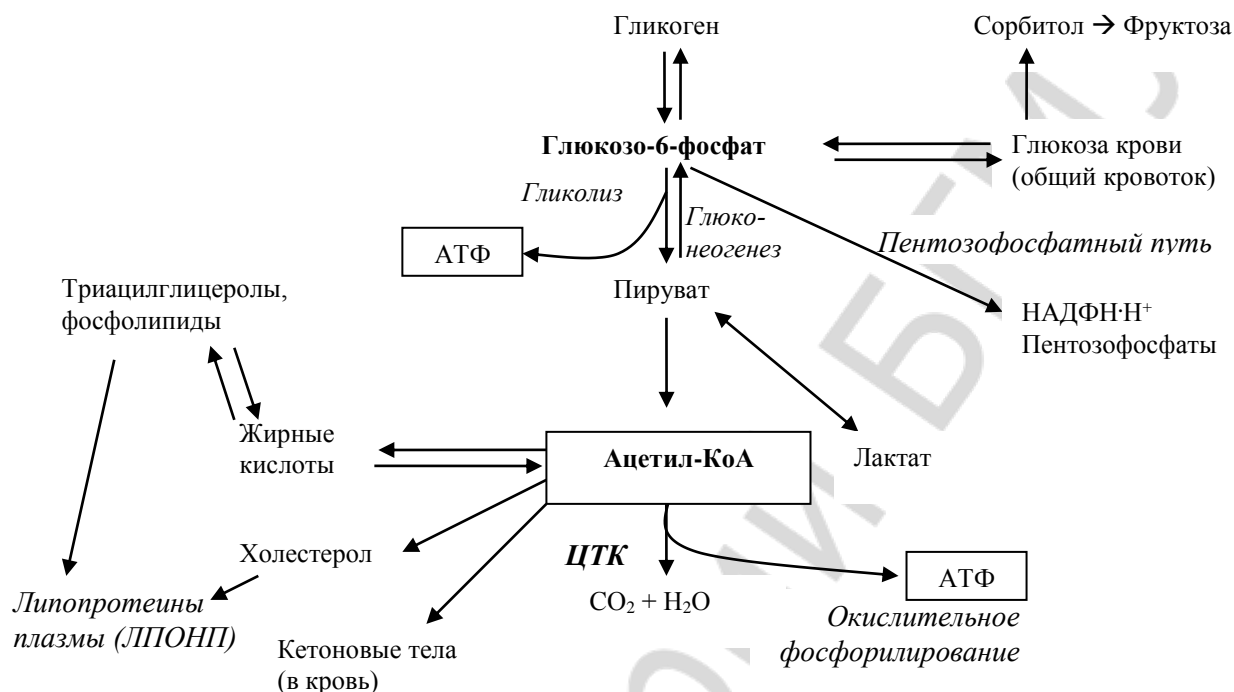
1.1. Обратите внимание на то, что большая часть потребленной свободной глюкозы в печени фосфорилируется с образованием глюкозо-6-фосфата. Метаболизм этого соединения может осуществляться по пяти основным направлениям, выбор которых зависит от соотношения между потребностями организма и количеством поступивших с пищей углеводов.

1.2. Печень поддерживает постоянный уровень глюкозы в крови при голодании за счет активации гликогенолиза и глюконеогенеза, а при избыточном ее поступлении из кишечника глюкоза депонируется в виде гликогена и липидов.

1.3. Знайте, что обратимость превращения лактата в пируват (направление реакции) зависит от соотношения  $\text{НАДН}\cdot\text{Н}^+/\text{НАД}^+$ .

1.4. Знайте, что жирные кислоты — основной субстрат энергетического метаболизма в печени и предшественники в биосинтезе холестерина, кетоновых тел, липидной части липопротеинов плазмы крови.

### Пути превращения углеводов и липидов в печени



1.5. Объясните:

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

1.6. Выберите продукты липидного обмена, синтезирующиеся преимущественно в печени:

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

Задание 2. Обратите внимание на то, что:

- благодаря интеграции метаболизма (а не отдельным метаболическим путям) организм снабжается энергией и пластическим материалом за счет постоянного обновления его участников на уровне ключевых метаболитов, коферментов;
- ключевой составляющей взаимодействия метаболических путей является наличие сходных механизмов регуляции. Через эти механизмы реализуют свое действие гормоны и другие биологически активные соединения;
- центральным органом в интеграции метаболизма является печень, благодаря которой в крови поддерживается необходимый уровень веществ для использования их мозгом, мышцами и другими тканями.

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

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

*Задание 3.* Выберите правильные ответы. В печени натошак:

- А. Активируется глюконеогенез
- Б. Усиленно окисляются жирные кислоты
- В. Активно синтезируется гликоген
- Г. Образуются кетоновые тела
- Д. Глюкоза высвобождается в кровь

*Задание 4.* Какие из нижеследующих выражений относительно синтеза и использования гликогена правильные?

- А. Действие адреналина и глюкагона направлено на увеличение активности гликогенфосфорилазы
- Б. В состоянии натошак интенсивность расщепления гликогена соизмерима с интенсивностью его синтеза
- В. Дефосфорилирование гликогенсинтазы под влиянием инсулина ведет к увеличению активности этого фермента
- Г. цАМФ – вторичный посредник, который образуется в ответ на действие адреналина и глюкагона в печени
- Д. Фосфорилирование гликогенфосфорилазы под влиянием глюкагона приводит к увеличению активности этого фермента

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

*Задание 1.* Выберите правильный ответ. Глюкагон в жировой ткани активизирует:

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

*Задание 2.* Выберите правильные ответы. Инсулин:

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

*Задание 3.* Какие из приведенных ниже выражений верны?

- А. При максимальном мышечном напряжении пируват восстанавливается в лактат
- Б. В норме в мышцах некоторое количество глюкозы подвергается анаэробному гликолизу, поэтому всегда имеется некоторое количество лактата, используемого для глюконеогенеза
- В. Для глюконеогенеза из лактата требуется больше АТФ, чем образуется во время анаэробного гликолиза

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

- А.  $\beta$ -гидроксibuтират является важным метаболическим источником энергии в состоянии натошак
- Б. Ацетоацетат является важным метаболическим источником энергии в состоянии натошак
- В. Кетоновые тела являются основным источником энергии для скелетных мышц в состоянии натошак
- Г. Кетоновые тела являются основным источником энергии для печени в состоянии натошак
- Д. Кетоновые тела являются важным субстратом для глюконеогенеза в состоянии натошак

### **ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

Для самопроверки исходного уровня знаний:

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

Для самостоятельной работы:

**1.6А, Б, В, Г, Е, З; 2.1А; 3А, Б, Г, Д; 4А, В, Г, Д.**

## Лабораторная работа

### Изучение влияния гормонов на содержание глюкозы в крови

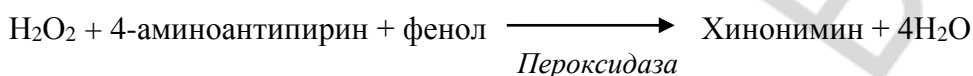
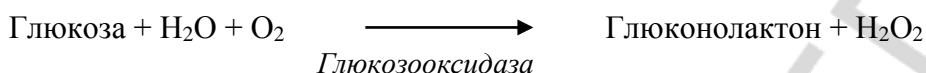
Для изучения влияния гормонов на уровень глюкозы в крови предлагаются три пробы крови (опытные). Одна из них взята до введения гормонов, другая — после введения инсулина, а третья — после введения адреналина.

1. Определите содержание глюкозы в каждой из проб.

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

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

*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 (до введения гормонов, другая — после введения инсулина, а третья — после введения адреналина).	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		

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

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

**Расчет** производят по формуле:

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

где  $C_{\text{оп.}}$  — концентрация глюкозы в крови (ммоль/л);  $C_{\text{ст.}}$  — концентрация глюкозы в стандартном растворе (5,55 ммоль/л);  $E_{\text{оп.}}$  — экстинкция опытной пробы;  $E_{\text{ст.}}$  — экстинкция стандартной пробы.

**Результаты:**

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

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

**Вывод:**

*Клинико-диагностическое значение определения концентрации глюкозы в крови. 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.*

Подпись преподавателя:

**Занятие 27. ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ:  
«ГОРМОНЫ. БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ. ИНТЕГРАЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА»**

1. Свойства гормонов. Особенности биологического действия.
2. Рецепторы к гормонам, классификация, строение рецепторов. При ответе на вопрос необходимо приводить примеры гормонов, реализующих свое действие через различные рецепторы.
3. G-белки, их виды и роль в механизме действия гормонов, связывающихся с мембранными рецепторами.
4. Перечислить эффекторные системы и вторичные посредники проведения гормонального сигнала в клетку. Механизмы образования вторичных посредников.
5. Роль кальция в механизме передачи гормонального сигнала.
6. Растворимая и мембраносвязанная гуанилатциклазы, механизм активации, реализация эффекта.
7. Механизмы усиления гормонального сигнала в клетке.
8. Гормоны — белки: простые и сложные. Место образования, пример молекулярного действия.
9. Гормоны — производные аминокислот. Место образования, механизмы передачи гормонального сигнала в клетке.
10. Общие принципы синтеза гормонов белково-пептидной природы.
11. Общие принципы синтеза гормонов стероидной природы.
12. Вазопресин, химическая природа, механизмы передачи гормонального сигнала в клетке, эффекты. Несахарный диабет (причины развития, симптомы, лечение).
13. Гормон роста, рецептор соматотропина, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, органы-мишени, влияние на метаболизм. Избыток и недостаточность соматотропина.

14. Йодсодержащие гормоны щитовидной железы. Химическая природа, особенности синтеза, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, влияние на метаболизм, гипо- и гипертиреоз.
15. Глюкагон. Химическая природа, место синтеза, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, влияние на метаболизм углеводов и липидов.
16. Гормоны мозгового вещества надпочечников. Химическая природа, схема синтеза, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, влияние на метаболизм.
17. Гормоны коры надпочечников: глюко- и минералокортикоиды. Химическая природа, особенности строения рецепторов, механизм передачи гормонального сигнала в клетке, влияние на метаболизм.
18. Инсулин. Химическая природа, особенности синтеза, строение инсулинового рецептора, механизмы передачи гормонального сигнала. Влияние на метаболизм углеводов, липидов, белков.
19. Половые гормоны, химическая природа, особенности строения рецепторов, механизм передачи сигнала, влияние на метаболизм.
20. Сахарный диабет. Нарушения обмена углеводов, липидов, белков. Механизм развития кетонемии. Биохимическая диагностика сахарного диабета.
21. Метаболизм глюкозы в инсулиннезависимых тканях при сахарном диабете. Восстановительный путь обмена глюкозы, его роль в норме и при сахарном диабете. Нарушение реакций гликозилирования.
22. Печень как главный орган гомеостаза. Функции печени.
23. Роль печени в обмене углеводов. Необходимо знать схемы основных путей обмена углеводов, ключевые ферменты этих процессов и их регуляторы, а также уметь объяснить значение пентозофосфатного и глюкуронового путей метаболизма глюкозы.
24. Роль печени в обмене белков. Необходимо знать реакции превращения аминокислот по аминокислотной группе, пути образования заменимых аминокислот, как обезвреживаются продукты гниения белков и аммиак. Уметь привести примеры схем включения углеродного скелета аминокислот в цикл Кребса.
25. Роль печени в обмене липидов. Необходимо знать схемы основных путей обмена липидов, механизмы развития жировой инфильтрации печени (в том числе при алкоголизме). липотропные факторы.
26. Поясните центральную роль ацетил-КоА в обмене липидов. Необходимо знать схему образования кетонных тел и реакции, с которых начинаются синтез жирных кислот и синтез холестерина.
27. Антитоксическая функция печени. Обезвреживание в печени токсичных веществ, нормальных метаболитов, лекарственных препаратов. Уметь привести примеры реакций окисления, конъюгации, синтеза. Необходимо знать схему процесса окисления веществ в системе цитохрома P<sub>450</sub> и реакции окисления этанола и ацетальдегида в клетках печени.
28. Роль печени в пигментном обмене. Биосинтез гемоглобина, регуляция. Вспомните белки, содержащие в качестве простетической группы гем и их функции в организме.
29. Распад гемоглобина в клетках РЭС. Метаболизм желчных пигментов.
30. Желтуха: виды и причины ее возникновения.
31. Метаболические процессы использования углеводов, жиров и белков в качестве источников энергии (гликогенолиз, дихотомическое расщепление глюкозы и последующее окисление ПВК, мобилизация жира из депо и  $\beta$ -окисление жирных кислот).
32. Метаболические процессы депонирования углеводов и липидов пищи. Необходимо знать схему синтеза гликогена, схемы ресинтеза и синтеза триацилглицеролов, фосфолипидов. Знать отличие синтеза триацилглицеролов в печени и жировой ткани.
33. Интеграция метаболизма, ее составляющие. Механизмы регуляции метаболизма.
34. Регуляция и направленность метаболических процессов в печени после приема пищи и натошак. Механизм гиперпродукции кетонных тел при голодании.

## **Занятие 28. БИОХИМИЯ КРОВИ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ. ИССЛЕДОВАНИЕ БУФЕРНЫХ СВОЙСТВ СЫВОРОТКИ КРОВИ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИДОВ В КРОВИ**

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 химических компонентов крови. Аномальные гемоглобины — одна из причин гипоксии.

Цель занятия: изучить физико-химические свойства крови, закрепить знания о происхождении компонентов плазмы крови и их физиологических концентрациях, буферных системах крови, строении и функционировании гемоглобина, транспорте газов кровью и механизмах развития гипоксии, диагностическом значении наиболее важных биохимических компонентов крови.

### **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ**

*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:

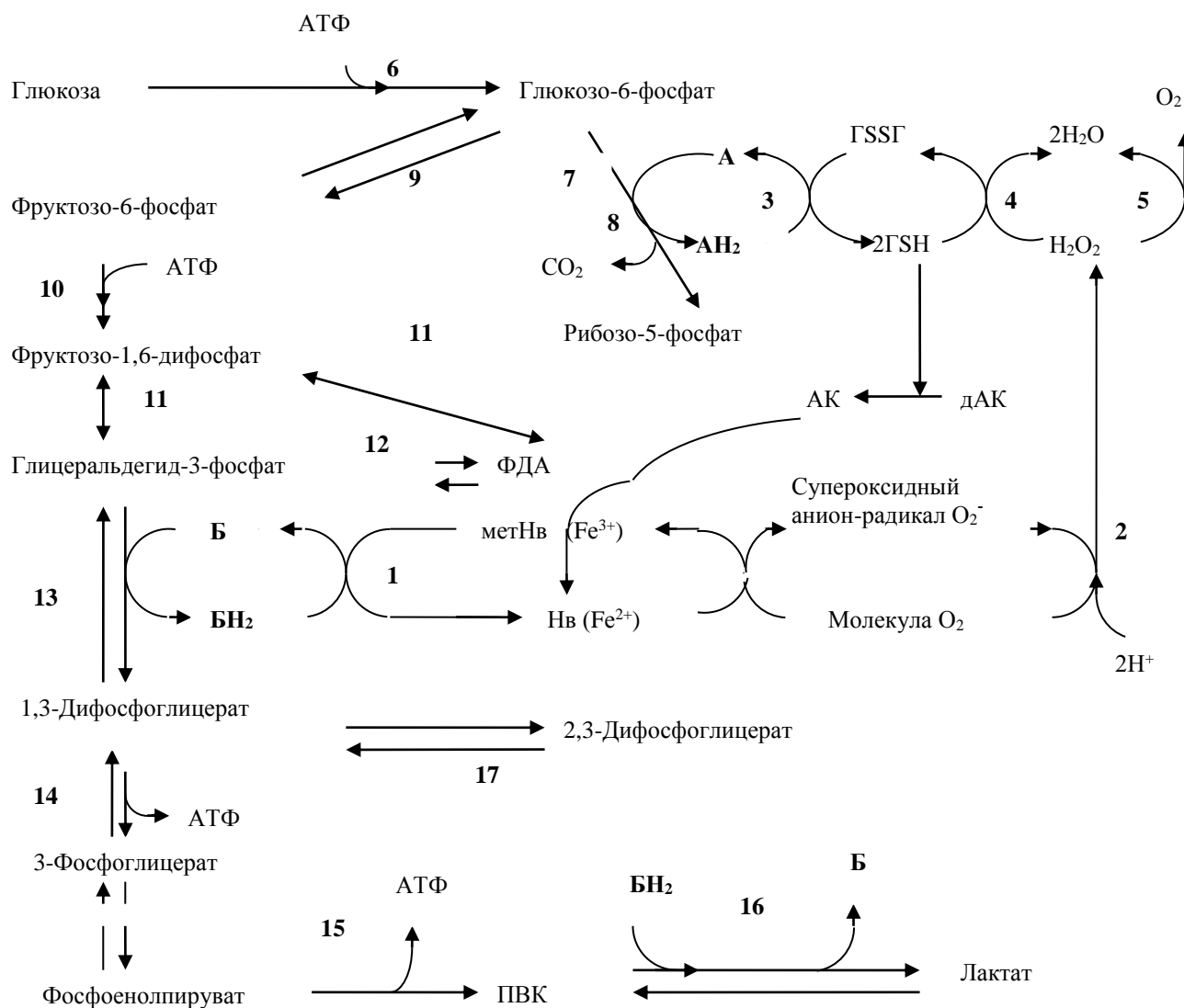
А. Ферменты, обозначенные цифрами 1, 2 и т. д. (*варианты ответов:* 6-фосфофруктокиназа, гексокиназа, пируваткиназа, альдолаза А, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, триозофосфатизомераза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, дифосфоглицератмутаза, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, фосфогексоизомераза, фосфоглицераткиназа, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, каталаза, супероксиддисмутаза, лактатдегидрогеназа, метгемоглобинредуктаза).

Б. Коферменты, обозначенные буквами А, Б (*варианты ответов:* НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>).

В. Реакции, обеспечивающие эритроциты АТФ.

Г. Процесс, обеспечивающий эритроциты НАДФН<sup>+</sup>. Д. Ферменты антиоксидантной защиты.

Е. Аллостерический регулятор, снижающий сродство гемоглобина к кислороду.



Метаболизм эритроцитов.  
 АК — аскорбиновая кислота, дАК — дегидроаскорбиновая кислота,  
 А, Б — коферменты; АН<sub>2</sub>, БН<sub>2</sub> — восстановленные коферменты.

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

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 гемоглобина, гема, глобина; разновидности (нормальные и аномальные) и производные гемоглобина.
4. Дыхательная функция крови. Эритроциты как главный участник транспорта газов кровью (роль гемоглобина и карбангидразы). Обратимое связывание кислорода и углекислого газа как способ транспортировки (механизмы связывания CO<sub>2</sub> и O<sub>2</sub> с гемоглобином, кооперативное взаимодействие субъединиц гемоглобина, регуляция насыщения гемоглобина



кислородом и диссоциации оксигемоглобина (рН, 2,3-дифосфоглицерат, температура). Гипоксия, формы, механизмы развития.

**Литература для подготовки**

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое издание, 2019. С. 558–565, 583–591.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 204–208.
3. *Конспект лекций*.

**ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

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

**Некоторые биохимические константы крови**

Плотность крови (цельной)		1,05–1,06
рН		7,37–7,44
Осмотическое давление		7,6–8,1 атм
Онкотическое давление		0,03–0,04 атм
Глюкоза плазмы (сыворотки)		3,9–6,1 ммоль/л
Общие липиды		3,5–6,5 г/л
Триацилглицеролы		0,85–2,0 ммоль/л
Холестерол		3,9–6,2 ммоль/л
Общий белок сыворотки		65–85 г/л
Альбумин		35–50 г/л
Глобулины		20–35 г/л
Фибриноген		2–4 г/л
Остаточный азот плазмы (сыворотки)		14,3–25 ммоль/л
Мочевина плазмы (сыворотки)		2,5–8,3 ммоль/л
Аммиак крови		6–65 мкмоль/л
Мочевая кислота:	мужчины	0,20–0,42 ммоль/л
	женщины	0,12–0,34
Гемоглобин крови:	мужчины	130–170 г/л
	женщины	120–150 г/л
Билирубин плазмы (сыворотки):	общий	8,5–20,5 мкмоль/л
	прямой	2,2–5,1 мкмоль/л
	непрямой	1,7–17,1 мкмоль/л
Na <sup>+</sup> в плазме		130–150 ммоль/л
K <sup>+</sup> в плазме		3,5–5,6 ммоль/л
Ca <sup>2+</sup> в плазме (общий)		2,2–2,7 ммоль/л

Поясните происхождение химических компонентов крови и их биологическую роль.

**Задание 2.** Знайте механизм функционирования буферных систем крови. Умейте объяснить механизм сопряжения бикарбонатной и гемоглобиновой буферных систем крови.

**Задание 3.**

3.1. Какие из приведенных утверждений характеризуют гемоглобин человека?

А. Гемоглобин взрослого человека представляет собой смесь, состоящую из гемоглобина А (96–98 %), гемоглобина А<sub>2</sub> (2–3 %) и гемоглобина F (0,2–1 %).

- Б. Гемоглобин А содержит по две цепи  $\alpha$  и  $\beta$ .
- В. Гемоглобин А<sub>2</sub> содержит по две  $\alpha$ - и две  $\delta$ -цепи.
- Г. Гемоглобин F содержит по две цепи  $\alpha$  и  $\gamma$ .
- Д. Эмбриональный гемоглобин (гемоглобин Р) включает в себя три фракции: гемоглобин Говер I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), гемоглобин Говер II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) и гемоглобин Портленд ( $\zeta_2\gamma_2$ ).

3.2. Какие из следующих утверждений о структуре гемоглобина верны?

- А. Молекула основного гемоглобина взрослого человека состоит из двух идентичных  $\alpha$ -субъединиц и двух идентичных  $\beta$ -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<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, протонов (H<sup>+</sup>) 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 рН 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 ответами.*

### **Проверьте ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

*Задание 1.* Определение компонентов какой буферной системы крови используется для диагностики расстройств кислотно-основного состояния ?

- 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.*  $\alpha$ -Талассемия характеризуется:

- А. Нарушением синтеза  $\alpha$ -цепи.
- Б. Нарушением синтеза  $\beta$ -цепи.
- В. Усилением синтеза  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей.

- Г. Появлением в крови гемоглобина H ( $\beta_4$ ).  
Д. Появлением в крови гемоглобина Бартса ( $\gamma_4$ ).

*Задание 4.*  $\beta$ -Талассемия характеризуется:

- А. Нарушением синтеза  $\alpha$ -цепи.  
Б. Нарушением синтеза  $\beta$ -цепи.  
В. Появлением в крови гемоглобина Кения (содержит  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепи наряду с  $\alpha$ -цепями).  
Г. Увеличением содержания в крови гемоглобина F ( $\alpha_2\gamma_2$ ).  
Д. Увеличением содержания в крови гемоглобина A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ).

#### ОТВЕТЫ К РЕШЕНИЮ ЗАДАНИЙ

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

1 — А, Б. 2 — А. 3. Б: А – НАДФ<sup>+</sup>, Б – НАД<sup>+</sup>; 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

##### Работа 1. Буферные свойства сыворотки крови.

В сыворотке крови функционируют бикарбонатная, белковая и фосфатная буферные системы.

*Принцип метода.* Титруют 0,1 н 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:  $V_{\text{сыв.}} =$

$V_{\text{H}_2\text{O}} =$

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.

Щелочной запас крови рассчитывают по формуле:

$$X (\text{мэкв/л}) = (1 - V_T) \cdot 0,1 \cdot 1000 / 0,2,$$

где  $l$  — количество  $\text{HCl}$ , взятой для анализа и выраженной в 0,1 н концентрации, мл;  $V_T$  — объем щелочи, израсходованный на титрование, мл; 0,1 — количество экв в 1 мл щелочи; 0,2 — количество крови, взятое для анализа, мл; 1000 — 1 литр крови.

Результат:  $V_T(\text{мл}) =$

Расчет:

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.* Argentometric осадочный метод основан на способности ионов серебра образовывать с ионами хлора нерастворимые соли. Количество осаждающего вещества ( $\text{AgNO}_3$ ) эквивалентно содержанию хлорид-ионов.

Проводят титрование хлорид-ионов крови азотнокислым серебром в присутствии индикатора  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . По достижении эквивалентной точки титрования избыток ионов серебра образует с индикатором соединение кирпично-красного цвета ( $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$ ).

*Ход работы.*

1. *Осаждение белков крови.*

В двух пробирках готовят смесь растворов: 5 мл 0,45 %  $\text{ZnSO}_4$  + 1 мл 0,1н  $\text{NaOH}$ . 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  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ .* К фильтрату приливают 2 капли 1–2% раствора  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  и титруют раствором  $\text{AgNO}_3$  до изменения желтого цвета раствора в кирпично-красный.

*Расчет.* Из объема (мл)  $\text{AgNO}_3$ , пошедшего на титрование опытного раствора ( $V_{\text{оп}}$  (мл)), вычитают объем (мл)  $\text{AgNO}_3$ , 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.

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

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

$V_{\text{контр}}(\text{мл}) =$

Расчет:

Вывод:

Подпись преподавателя:

## **ЗАНЯТИЕ 29. БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА АЦЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЕ. 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.

**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: альбумин, глобулины, фибриноген (содержание, функции); альбумин-глобулиновый коэффициент и его диагностическое значение. Биологическая роль и диагностическое значение некоторых белков плазмы крови (гаптоглобин, трансферрин, церулоплазмин, ингибиторы трипсина, С-реактивный белок, интерферон, криоглобулины).

2. Ферменты плазмы крови (секреторные, индикаторные, экскреторные). Диагностическое значение определения активности ферментов плазмы крови.

3. 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 для подготовки**

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое издание, 2019. С. 566–582.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С. 204–208.
3. *Конспект лекций*.

### **Задания для самостоятельной работы**

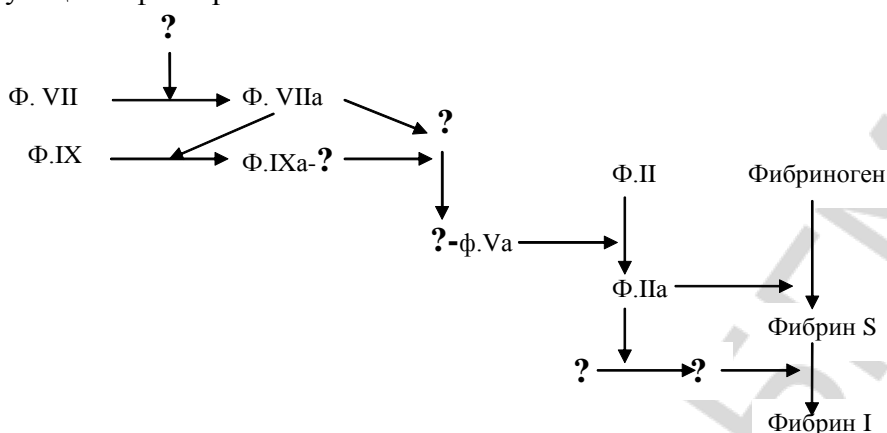
**Задание 1.** Назовите индикаторные ферменты крови и поясните их диагностическое значение.

### 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. $\alpha_2$ -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.      | Г. Антикоагулянтную систему. |
| Б. Состояние отдельных фаз гемокоагуляции. | Д. Систему фибринолиза.      |
| В. Посткоагуляционную фазу.                |                              |

Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

Задание 1. В процессе тромбообразования различают внешний и внутренний пути свертывания крови. На каком этапе свертывания крови они не совпадают?

- А. Превращение протромбина в тромбин.
- Б. Превращение фибриногена в фибрин.
- В. Образование протромбиназы (активного тромбопластина крови).
- Г. Ретракция кровяного тромба.
- Д. Превращение плазминогена в плазмин.

Задание 2. Какое из приведенных утверждений не характерно для фактора Хагемана?

- А. Является сериновой протеазой.
- Б. Активируется калликреином.
- В. Активируется при контакте крови с чужеродной поверхностью (стекло, каолин).

- Г. Активируется тромбоцитарным тромбопластином.
- Д. Активируется тканевым тромбопластином.

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

- А. 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 4.* Наблюдаемая при наследственной недостаточности фактора XIII повышенная кровоточивость объясняется невозможностью образования стабильного фибринового сгустка. Какова роль плазменной трансглутаминазы (фибриназы) в образовании гемостатического тромба?

- А. Участие в синтезе фибриногена в печени.
- Б. Участие в образовании фибрин-мономера.
- В. Участие в образовании растворимых фибрин-мономерных комплексов.
- Г. Участие в ковалентной сшивке фибриновых молекул.
- Д. Участие в ретракции гемостатического тромба.

*Задание 5.* Гиповитаминоз К сопровождается повышенной кровоточивостью. Какова роль витамина К в гемокоагуляции?

- А. Необходим для активации свертывающей системы после повреждения сосуда.
- Б. Необходим для одновременного активирования свертывающей и противосвертывающей систем.
- В. Участвует в постсинтетическом созревании II, VII, IX и X факторов свертывания крови.
- Г. Участвует в связывании ионов кальция.
- Д. Участвует в синтезе V и VIII факторов свертывания крови.

*Задание 6.* Выберите правильные утверждения, характеризующие участие ионов кальция (ф. IV) в гемокоагуляции:

- А. Являются вторичными посредниками в действии ряда гормонов.
- Б. Стимулирование процессов перекисного окисления липидов.
- В. Связывание на тромбопластинах кальций-зависимых факторов свертывания крови (ф. IX, ф. X, ф. VII, ф. II).
- Г. Стабилизация структуры тромбопластинов.
- Д. Активирование некоторых факторов свертывания крови.

*Задание 7.* Дефицит антитромбина III — частая причина тромбозов. Какова антикоагулянтная роль антитромбина III?

- А. Образование необратимого комплекса с гепарином.
- Б. Ингибирует витамин К-зависимое карбоксилирование остатков глутамата.
- В. Необратимо инактивирует большинство сериновых протеаз свертывающей системы.
- Г. Затрудняет связывание факторов свертывания на тромбопластинах.
- Д. Разрушает V и VIII факторы свертывания крови.

*Задание 8.* Что определяет противосвертывающую активность гепарина?

- А. Связывает ионы кальция.
- Б. Активирует антитромбин III.
- В. Образует нестабильные комплексы с некоторыми факторами свертывающей системы, выключая их из процесса гемокоагуляции.
- Г. Осуществляет неферментативный фибринолиз.
- Д. Ингибирует витамин К-зависимое карбоксилирование остатков глутамата протеинов C и S.

*Задание 9.* Отберите те протеолитические ферменты, при действии которых возможно превращение плазминогена в плазмин:

А. Тканевый активатор пламиногена. Б. Урокиназа.  
В. Протеин С (S). Г.  $\alpha_2$ -Антиплазмин. Д.  $\alpha_2$ -Макроглобулин.

*Задание 10.* Расположите в правильном порядке события, происходящие при фибринолизе:

- А. Пламиноген осаждается на фибриновых нитях.
- Б. Тканевый активатор пламиногена активирует пламиноген.
- В. Тканевый активатор пламиногена связывается с фибрином.
- Г. Пламиноген превращается в плазмин.
- Д. Плазмин гидролизует фибрин.

#### ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

*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

**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  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , содержание которых определяется фотометрически. Относительное содержание белковых фракций в сыворотке крови здорового человека выражается следующими цифрами: альбумин — 53–66 %; глобулины — 29–54 %:  $\alpha_1$ -глобулины — 2–5 %,  $\alpha_2$ -глобулины — 6–12 %,  $\beta$ -глобулины — 8–15 %,  $\gamma$ -глобулины — 11–22 %. Альбумин-глобулиновый коэффициент — отношение количества альбуминов к количеству глобулинов в биологических жидкостях. В крови величина альбумин-глобулинового коэффициента в норме относительно постоянна и равна 1,5–1,7. Снижение альбумин-глобулинового коэффициента, характерное для многих патологических состояний, может быть связано как с увеличением абсолютного количества глобулинов (при острых и хронических воспалительных процессах), так и с уменьшением абсолютного количества альбуминов (при циррозе печени, гепатите и других заболеваниях печени).

#### 1. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови.

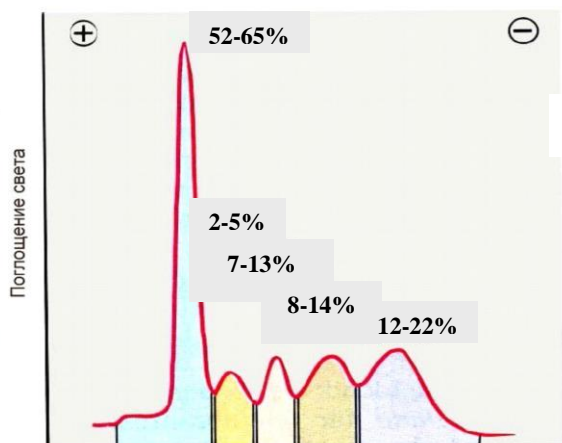
Кюветные отделения аппарата для электрофореза заполняют буферным раствором. Полоски ацетилцеллюлозы смачивают буфером и туго натягивают (не должны провисать) в промежутке между кюветными отделениями. Через полоску носителя в течение 5 минут пропускают электрический ток. Отключают электрофоретическую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



Альбумин  $\alpha_1$ -  $\alpha_2$ -  $\beta$ -  $\gamma$ -глобулины



Полоска ацетилцеллюлозы

зрачном фоне ацетилцеллюлозной плёнки.

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



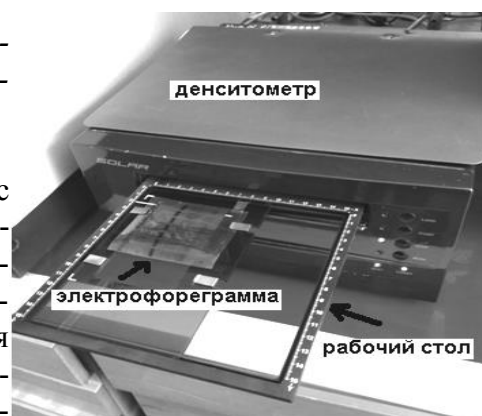
Денситометр

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

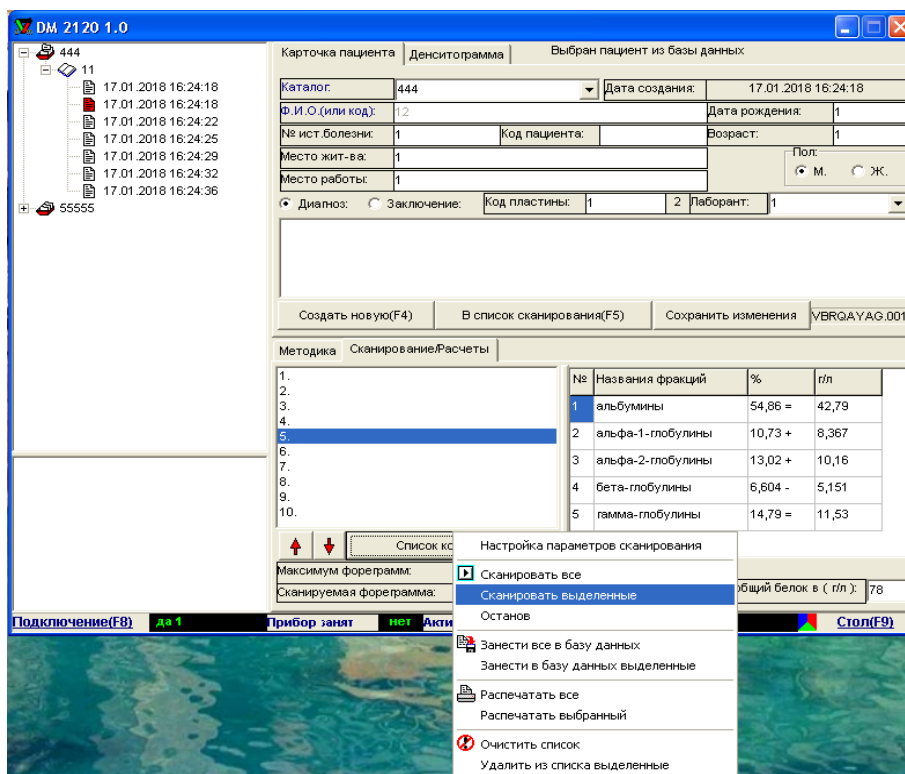
3.1. **Денситометрия электрофореграмм** проводится с использованием денситометра. Денситометр — фотометрический прибор, обеспечивающий сканирование электрофореграммы. Целью сканирования является получение денситограммы — графического изображения распределения концентрации красителя вдоль электрофореграммы,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

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

В программе, управляющей прибором, выберите номер дорожки электрофореграммы. Выберите команду «Сканировать выделенное». Прибор в автоматическом режиме отскани-



рует выбранную электрофореграмму, определит границы фракций и выдаст их процентное соотношение. В случае необходимости границы фракций можно выставить путем нажатия левой клавишей мышки.



Полученные результаты заносят в таблицу.

Фракция	альбумины	$\alpha_1$ -глобулины	$\alpha_2$ -глобулины	$\beta$ -глобулины	$\gamma$ -глобулины
Содержание, %					

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

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

Расчет:  $A/\Gamma =$

Вывод:

### 3.2. Фотометрия элюатов фракций белка

**Ход работы.** Полоски ацетилцеллюлозы промокают фильтровальной бумагой, окрашенные белковые фракции вырезают и помещают в соответствующие пронумерованные пробирки с элюирующим раствором (в 5 пробирок наливают из бюретки по 5 мл 0,1 н NaOH). Через 20 минут против воды (контроль) определяют оптическую плотность каждого раствора на фотоэлектрокалориметре (кювета 10 мм, красный светофильтр с  $\lambda = 670$  нм). Зная оптические плотности растворов, соответствующие каждой фракции, вычисляют сумму оптических плотностей всех фракций и рассчитывают относительное содержание белка в каждой фракции, вычисляют альбумин-глобулиновый коэффициент.

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

## Результаты:

	альбумины	$\alpha_1$ -глобулины	$\alpha_2$ -глобулины	$\beta$ -глобулины	$\gamma$ -глобулины	$\Sigma$
Е (оптич. плотн.)						
Относит. сод-е, %						

**Расчет:**  $A/\Gamma =$

**Вывод:**

### Работа 2. Определение содержания кальция в плазме крови.

Кальций играет важную роль в осуществлении процессов жизнедеятельности. Он влияет на проницаемость биологических мембран, возбудимость нервов и мышц, участвует в нервно-мышечной проводимости, сокращении и расслаблении мускулатуры (в том числе мышцы сердца), секреторных процессах, формировании кости и хряща; воздействует на обмен веществ в клетках, является важным фактором гемостаза и посредником действия гормонов в клетке.

Количественное определение кальция в плазме крови имеет важное значение для диагностики ряда заболеваний и при наблюдении за ходом лечения.

В норме концентрация общего кальция в плазме крови — 2,2–2,7 ммоль/л.

**Принцип метода.** Индикатор хромоген черный ЕТ-00 образует с кальцием соединение фиолетового цвета. При титровании трилоном Б (двухзамещенная натриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты, образующая прочные комплексы с ионами кальция) такого окрашенного раствора произойдет изменение окраски в синий цвет в эквивалентной точке, соответствующей связыванию трилоном Б всех ионов кальция в растворе.

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

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. 0,245 - коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л).

**Результат:**  $V_T =$

**Расчет:**  $X$  (ммоль/л) =

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

## Занятие 30. БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ. ВИТАМИНЫ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В ПЛОДАХ ШИПОВНИКА И В МОЧЕ

### Актуальность темы

Использование пищи живыми организмами обозначается термином «питание». Различают три важнейших категории или составных компонента пищи:

1) питательные вещества — источники энергии и пластического материала (белки, жиры, углеводы);

2) микрокомпоненты пищи (витамины и минеральные соединения, необходимые для биохимических процессов);

3) волокнистые структуры (неперевариваемые полисахариды, необходимые для нормального функционирования пищеварительной системы).

Осуществление компонентами пищи своих функций в организме происходит через биохимические превращения. Понимание того, каким образом различные компоненты пищи вовлекаются в них, поможет осмыслить необходимость и суть сбалансированного питания. Знание коферментных функций витаминов в организме позволяет понять механизмы развития и профилактики гипо- и авитаминозов и использовать витамины с профилактической и лечебной целью.

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

### Цель занятия

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

### Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

*Задание 1.* Какова функция гормон-чувствительной липазы в жировой ткани?

- А. Гидролизует гормон, который участвует в расщеплении жира
- Б. Синтезирует новые жировые клетки из простых жирных кислот
- В. Гидролизует триацилглицеролы с образованием жирных кислот для других клеток
- Г. Синтезирует длинноцепочечные жирные кислоты для синтеза липидов в других клетках

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

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

3.1. Подберите соответствующие пары витамин — кофермент:

- |                     |                                     |
|---------------------|-------------------------------------|
| А. НАД <sup>+</sup> | 1. Производное пиридоксина          |
| Б. ТПФ              | 2. Производное рибофлавина          |
| В. HS-KoA           | 3. Производное тиамина              |
| Г. ФАД              | 4. Производное никотиновой кислоты  |
| Д. ПФ               | 5. Производное пантотеновой кислоты |

*Задание 4.* Укажите активную форму витамина А:

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

*Задание 5.* Характерным проявлением авитаминоза А является:

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

*Задание 6.* Характерным проявлением гиповитаминоза Е является:

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

*Задание 7.* Укажите компоненты неферментативной антиоксидантной защиты клетки:

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Вопросы для обсуждения**

1. Незаменимые факторы питания. Понятие о сбалансированном питании.
2. Характеристика питательных веществ (белков, жиров, углеводов), их пищевая ценность
3. Водорастворимые витамины: тиамин (В<sub>1</sub>), рибофлавин (В<sub>2</sub>), пантотеновая кислота, ниацин (РР), пиридоксин (В<sub>6</sub>), фолиевая кислота (В<sub>9</sub>), кобаламин (В<sub>12</sub>), биотин (витамин Н), витамин С; химическая природа, коферментные формы, биологическая роль, источники, суточная потребность. Признаки недостаточности.
4. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (вит. Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота.
5. Каротины, витамины А и Е, молекулярные механизмы действия, биологическая роль, источники, суточная потребность. Признаки недостаточности.
6. Понятие о свободных радикалах и активных формах кислорода, их физиологическое и повреждающее действие. Ферментативная и неферментативная антиоксидантная защита. Антиоксидантное действие витаминов С, А и Е.
7. Методы оценки насыщенности организма витаминами.

### **Литература для подготовки**

1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина, Э. И. Олецкий. Минск : Новое знание, 2019. С. 478–487, 500–525.
2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2013. С.174–183, 186–189.
3. *Морозкина, Т. С.* Витамины : краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармакологических и биологических специальностей / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. Минск : Асар, 2002.
4. *Конспект лекций.*

### **Задания для самостоятельной работы**

*Задание 1.* Уясните энергозатраты организма взрослого человека в состоянии покоя и лабильность этого показателя в условиях патологии. Умейте объяснить, куда используется АТФ в состоянии покоя. Запомните реальный и желательный вклад в энергопродукцию белков, жиров и углеводов.

1.1. Ответьте на вопросы. Как поступает организм с образовавшимся избытком аминокислот, когда Вы потребляете с пищей или в виде пищевых добавок большее их количество, чем требуется для синтеза новых белков? Отличаются ли механизмы использования избытка аминокислот от механизмов использования избытка углеводов или липидов? Укажите эти различия.

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

- А. Реально — углеводы 60 %
- Б. Желательно — алкоголь 3 %
- В. Реально — белок 15 %
- Г. Желательно — жир 40 %
- Д. Реально — жир 10 %.

*Задание 2.* Запомните, что наряду с незаменимыми факторами питания имеются условно незаменимые, которые не ограничиваются только аминокислотами аргинином и гистидином; они могут стать незаменимыми при определенных состояниях организма. Умейте объяснить, почему при выборе пищевых источников незаменимых жирных кислот необходимо разли-

чать омега-3 и омега-6 кислоты. Обратите внимание на преимущества и недостатки неперевариваемых полисахаридов в составе пищи.

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

- А. NO<sub>2</sub>                                      В. O<sub>2</sub><sup>·-</sup>                                      Д. OH<sup>·</sup>  
Б. CO    Г. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>                                      Е. ONOO<sup>-</sup>

**Задание 4.** Выберите правильный ответ. Свободные радикалы кислорода:

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

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

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

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

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

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

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)**

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

- А. Креветки      Б. Семга      В. Грудное молоко человека      Г. Соевое масло

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

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

**Задание 4.** Активность каких процессов снижена при недостаточности тиамин?

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

**Задание 5.** При недостатке фолиевой кислоты страдает прежде всего кроветворение и деятельность желудочно-кишечного тракта. Какие соединения входят в состав В<sub>9</sub>? В реакциях какого типа участвует коферментная форма (назвать ее) этого витамина?

**Задание 6.** Гиповитаминоз пантотеновой кислоты практически не встречается, т. к. она обнаружена повсеместно: в тканях животных, растений, микроорганизмов. Указать кофермент данного витамина, назвать тип реакций, в которых он участвует.

**Задание 7.** Больному сделана операция резекции желудка, после чего вследствие недостаточности витамина В<sub>12</sub> у него развилась анемия. Назовите коферментные формы этого витамина. В каких реакциях они принимают участие?

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

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

#### **ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ**

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

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

**Для самостоятельной работы**

1.2 В; 3 В – супероксидный анион-радикал, Г – пероксид водорода,

Д – гидроксильный радикал, Е – пероксинитрит; 4А, Б, Г, Д; 5А, Б, Д; 6Б, В, Г, Д.

#### **Лабораторная работа**

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

##### **Работа 1. Качественные реакции на витамин А (ретинол)**

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

###### **1.1. Проба Друммонда**

*Принцип метода.* Метод основан на способности концентрированной Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> отнимать воду от ретинола с образованием окрашенных продуктов реакции.

*Ход работы.* В сухую пробирку вносят 1 каплю ретинола ацетата и 5 капель хлороформа, перемешивают и добавляют 1 каплю конц. Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Появляется голубое или красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в буро-красное.

###### **1.2. Реакция с хлорным железом**

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

##### **Работа 2. Качественные реакции на витамин Е (α-токоферол)**

###### **2.1. Реакция с азотной кислотой**

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

*Ход работы.* В сухую пробирку вносят 6 капель 0,1% спиртового раствора витамина Е, добавляют несколько крупинок сахарозы. Осторожно по стенке пробирки прибавляют

10 капель конц.  $\text{HNO}_3$ . Пробирку слегка встряхивают. Через 1–2 мин наблюдают красное или желтовато-красное окрашивание.

### **2.1. Реакция с хлоридом железа**

*Принцип метода.* Спиртовой раствора-токоферола окисляется  $\text{FeCl}_3$  в токоферилхинон и раствор окрашивается.

*Ход работы.* В сухую пробирку берут 4–5 капель 0,1%-ного спиртового раствора  $\alpha$ -токоферола, прибавляют 0,5 мл 1%-ного раствора  $\text{FeCl}_3$ , тщательно перемешивают. Содержимое пробирки приобретает красное окрашивание.

### **Работа 3. Качественная реакция на викасол (витамин К)**

Известны два природных витамина  $\text{K}_1$  и  $\text{K}_2$ , являющиеся производными нафтохинона. Искусственно синтезированный водорастворимый аналог витамина  $\text{K}_1$ -викасол обладает биологической активностью витамина.

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

*Ход работы.* На сухое часовое стекло наносят 5 капель раствора викасола, добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю 10%-ного  $\text{NaOH}$ . Появляется лимонно-желтое окрашивание.

### **Работа 3. Качественные реакции на витамин $\text{B}_1$**

Витамин  $\text{B}_1$  состоит из пиримидинового и тиазолового колец. Витамин  $\text{B}_1$  получил название тиамин поскольку содержит серу и азот.

#### **3.1. Реакция окисления.**

*Принцип метода.* В щелочной среде тиамин окисляется в тиохром феррицианидом калия. Тиохром обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора на флюороскопе.

*Ход работы.* К 1 капле 5%-ного раствора тиамин прибавляют 5–10 капель 10%-ного раствора  $\text{NaOH}$ , 1–2 капли 5%-ного раствора феррицианида калия и взбалтывают смесь. После прогревания флюороскопа наблюдают синюю флюоресценцию при облучении раствора ультрафиолетовыми лучами.

#### **3.2. Диазореакция**

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

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

### **Работа 4. Качественная реакция на витамин $\text{B}_2$**

*Принцип метода.* Окисленная форма витамина  $\text{B}_2$  представляет собой желтое флюоресцирующее в ультрафиолетовых лучах вещество. Реакция на витамин  $\text{B}_2$  основана на его способности легко восстанавливаться. При этом раствор витамина  $\text{B}_2$ , обладающий желтой окраской, приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, т. к. восстановленная форма витамина  $\text{B}_2$  бесцветна.

*Ход работы.* В пробирку наливают 10 капель раствора витамина  $\text{B}_2$ , добавляют 5 капель концентрированной  $\text{HCl}$  и опускают зернышко металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается. Сравнивают обе формы витамина  $\text{B}_2$  по флюоресценции.

### **Работа 5. Качественная реакция на витамин PP**

*Принцип метода.* Витамин PP при нагревании с раствором ацетата меди образует плохо растворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.



*Ход работы.* Наливают в пробирку 20 капель 3%-ного раствора витамина РР (перед определением раствор обязательно следует взболтать) и нагревают до кипения; при этом мутный раствор становится прозрачным. Взболтав 5%-ный раствор ацетата меди, приливают 20 капель его к нагретому раствору витамина РР. Содержимое пробирки доводят до кипения и сразу охлаждают под струей холодной воды. На дне пробирки выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

#### **Работа 6. Качественная реакция на витамин В<sub>6</sub>**

*Принцип метода.* Витамин В<sub>6</sub> при взаимодействии с раствором хлорного железа образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

*Ход работы.* К 5 каплям 1% раствора витамина В<sub>6</sub> приливают равное количество 1% раствора хлорного железа и перемешивают. Развивается красное окрашивание.

#### **Работа 7. Качественная реакция на витамин В<sub>12</sub>**

В<sub>12</sub> — 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 (В<sub>12</sub>) и снова нагревают фильтр над спиртовкой. На фильтре, чаще по краю, появляется зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

### **Вывод:**

#### **Количественное определение витамина С**

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

*Принцип метода.* Метод основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, а при восстановлении обесцвечивается; в щелочной среде окраска синяя. Для предохранения витамина С от разрушения исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления розового окрашивания.

#### **Работа 8. Определение содержания витамина С в плодах шиповника**

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

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

$$X = (0,088 \cdot A \cdot 100) / B,$$

где  $x$  — содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах на 100 г продукта; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, мг, соответствующее 1 мл 2,6-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 плодов шиповника (розы собачьей) содержится 800 мг витамина С.

**Полученные данные и расчет: А =**

**Вывод:**

### **Работа 9. 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 *peros* 100 мг витамина С быстро приводит к повышению его концентрации в крови и в моче. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, задерживают принятый витамин С и его концентрация в моче не повышается. Моча здорового человека содержит 20–30 мг/сутки витамина С или 113,55–170,33 мкмоль/сут. У детей уровень этого витамина понижается при цинге, а также при острых и хронических инфекционных заболеваниях.

*Ход работы.* В стаканчик или колбочку отмеривают 10 мл мочи и 10 мл дистиллированной воды, перемешивают, подкисляют 20 каплями 10%-ного раствора хлористоводородной кислоты и титруют 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Для расчета содержания аскорбиновой кислоты в моче используют формулу:

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B}$$

где  $x$  — содержание аскорбиновой кислоты в мг/сут; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты (мг) соответствующее 1 мл 2,6-дихлорфенолиндофенола;  $A$  — результат титрования 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл;  $B$  — объем мочи, взятый для титрования, мл;  $B$  — среднее суточное количество мочи (для мужчин 1500 мл, для женщин 1200 мл).

**Полученные данные и расчет: А =**

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

### **Занятие 31. ВОДА И МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА. МАКРО-И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВОДНО-МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НАТРИЯ И КАЛИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

#### **Актуальность темы**

Изменение состава минеральных веществ и нарушение распределения электролитов и жидкости в организме являются причиной многих серьезных нарушений, коррекцией которых чаще всего приходится заниматься реаниматологам.

#### **Цель занятия**

Закрепить знания об электролитном составе жидкостей организма, роли микро- и макроэлементов в клетках и внеклеточной жидкости. Получить навыки определения натрия и калия в сыворотке крови.



Б. I и II комплексов дыхательной цепи Д. Миоглобина

В. III и IV комплексов дыхательной цепи

**Задание 4.** Муковисцидоз — наследственное заболевание, характеризующееся поражением желез внешней секреции. Клинически проявляется сгущением слизи в выводных протоках (главным образом, поджелудочной железы и бронхов). Этиология болезни — генетический дефект CFTR (перевод: кистозно-фиброзный транспортёр-регулятор), т. е. хлорного канала. Предложите способ лечения этого заболевания.

**Задание 5.** После назначения препаратов селена в крови у пациента:

А. Снизилось содержание продуктов ПОЛ

Б. Увеличилось содержание продуктов ПОЛ

В. Увеличилась активность глутатионпероксидазы эритроцитов

Г. Снизилась активность глутатионпероксидазы эритроцитов

**Задание 6.** Усвоить, что в случае снижения объёма 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 ответами.

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

**Задание 1.** У больного нефритом развились отёки. Что может служить их основной причиной?

А. Уменьшение содержания в крови альбуминов

Б. Уменьшение содержания в крови глобулинов

В. Увеличение содержания в крови белков острой фазы

Г. Снижение концентрации глюкозы в плазме крови

Д. Снижение концентрации натрия в плазме

**Задание 2.** Объясните, почему и недостаток, и избыточное поступление витамина D в организм будет приводить к деструкции костной ткани.

**Задание 3.** Назовите минеральные вещества, выполняющие следующие функции:

А. Поддержка электролитного баланса

Б. Поддержание определённого осмотического давления

В. Создание благоприятных условий растворимости белков клеток крови

Г. Участие в механизмах возбудимости

Д. Влияние на обменные процессы путём активирования или ингибирования ферментов

Е. Минерализация костей скелета и зубов

**Задание 4.** Во время тиреоидэктомии хирург не заметил расположенных в толще щитовидной железы паращитовидных желёз. У больного начались судороги. Почему?

А. В результате падения содержания в крови тиреокальцитонина

Б. В результате снижения содержания в крови паратирина

В. Вследствие снижения содержания  $Ca^{++}$  в плазме крови

Г. Вследствие увеличения содержания  $Ca^{++}$  в плазме крови

## ОТВЕТЫ К ЗАДАНИЯМ

Для самопроверки исходного уровня знаний:

1. а) 300–400 мл; б) 1200–1500 мл; в) 500–600 мл.

2В; 3. Вправо; 4А, В.

Для самостоятельной работы:

2 Na, K, Ca, Mg, P, Cl, S.      3А, В, Д.      4 Генная инженерия.      5А, В.

## Лабораторная работа

### Работа 1. *Определение содержания натрия в сыворотке крови фотометрическим методом*

*Принцип метода.* Метод основан на том, что содержащийся в образце натрий осаждается уранилацетатом магния. Уранил-анионы, оставшиеся в растворе, способны образовывать окрашенный комплекс с тиогликолятом. Концентрация натрия прямо пропорциональна разности между холостой (без преципитации) и опытной пробам.

*Ход работы.* Берут 2 центрифужные пробирки. В первую пробирку (опытная проба) отмеривают 1,0 мл реагента 1 и затем добавляют 0,02 мл сыворотки крови. Во вторую пробирку (стандартная проба) вносят 1,0 мл реагента 1 + 0,02 мл стандартного раствора. **Необходимо строго соблюдать последовательность внесения реактивов в пробирки (сыворотку добавляют к реагенту)!** Закрывают пробирки и встряхивают их содержимое. Через 5 мин вновь так же встряхивают (в течение 30 сек) и оставляют пробы на 30 мин в темноте. Затем центрифугируют 10 мин (1000 об/мин).

Из каждой центрифужной пробирки отбирают по 0,02 мл надосадочной жидкости в обычные пробирки и добавляют в каждую по 2,0 мл реагента 2. Одновременно готовят холостую пробу (0,02 мл реагента 1 + 2,0 мл реагента 2). Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют 5 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность всех проб против воды, используя кюветы с рабочей шириной 5 мм (длина волны — 405 нм).

Расчёт: концентрацию  $\text{Na}^+$  (ммоль/л) определяют по формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{E_{\text{хол}} - E_{\text{оп}}}{E_{\text{хол}} - E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

где  $E_{\text{хол}}$ ,  $E_{\text{оп}}$  и  $E_{\text{ст}}$  — оптическая плотность холостой, опытной и стандартной проб, соответственно;  $C_{\text{ст}}$  — концентрация стандартного раствора (**150 ммоль/л**).

Полученные данные и расчёт концентрации  $\text{Na}^+$  (ммоль/л):

$$C_{\text{оп}} =$$

### **Вывод:**

*Клинико-диагностическое значение.* Содержание  $\text{Na}^+$  в сыворотке крови в норме составляет 135–150 ммоль/л.

Уменьшение концентрации натрия в сыворотке крови обуславливает клинический симптомокомплекс, характеризующийся появлением апатии, потерей аппетита, тошнотой, рвотой, нарушением рефлексов, тахикардией, падением кровяного давления, психозами.

Гипернатриемия сопровождается тяжёлым общим состоянием больных, повышением температуры тела, тахикардией.

### Работа 2. *Определение содержания калия в сыворотке крови турбодиметрическим методом*

*Принцип метода.* Метод основан на способности ионов калия в безбелковой щелочной среде образовывать стабильную суспензию с ионами тетрафенилбората (ТФБ-Na). Мутность суспензии пропорциональна концентрации ионов калия.

Ход работы. 1) Берут три пробирки. В первую пробирку (опытная проба) вносят 2,0 мл реагента (ТФБ-Na) и 0,04 мл сыворотки крови, во вторую пробирку (стандартная проба) вносят 2 мл реагента (ТФБ-Na) и 0,04 мл стандартного раствора калия, в третью пробирку (холостая проба) добавляют только 2 мл реагента (ТФБ-Na). После чего реакционную смесь (без перемешивания!) инкубируют 2 мин. Затем перемешивают и инкубируют точно 10 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность опытной пробы ( $E_{оп}$ ) и стандартного раствора ( $E_{ст}$ ) против холостой пробы, используя кюветы с шириной 3 мм (длина волны 590 нм). *Перед фотометрированием пробы необходимо взболтать.*

Расчёт: концентрацию  $K^+$  (ммоль/л) определяют по формуле:

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

где  $C_{ст}$  - концентрация  $K^+$  в стандартной пробе = 5 ммоль/л.

Полученные данные и расчёт концентрации  $K^+$  (ммоль/л).

$C_{оп} =$

*Клинико-диагностическое значение.* Содержание  $K^+$  в сыворотке крови в норме составляет 3,4–5,6 ммоль/л.

Уменьшение концентрации калия в сыворотке крови приводит к тяжёлым нарушениям — вплоть до появления вялых параличей. Ухудшаются психическая и умственная деятельность, угнетается перистальтика кишечника, развивается метеоризм, расширяются желудок и мочевого пузыря.

Гиперкалиемия сопровождается ощущением «ползания мурашек», исчезновением сухожильных рефлексов, нарушением функции сердца. При двукратном превышении содержания калия в крови сердце останавливается в фазе диастолы.

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

## **Занятие 32. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ВЕЩЕСТВ И ИХ ВЫВЕДЕНИЕ ИЗ ОРГАНИЗМА. БИОХИМИЯ МОЧИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ, ФЕНАЦЕТИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА В МОЧЕ**

### **Актуальность темы**

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

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

### **Цель занятия**

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

**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

*Задание 1.* Процесс поглощения клеткой жидкости и растворенных в ней веществ, называется \_\_\_\_\_.

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

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

*Задание 3.* Для пассивного транспорта:

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

*Задание 4.* Облегченная диффузия:

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

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

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

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

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

*Задание 7.* В дистальном канальце нефрона наряду с процессами, связанными с разведением и концентрированием мочи, осуществляются реабсорбционные и секреторные процессы, главная задача которых — сохранить кислотно-щелочное равновесие организма и, в частности, постоянство рН крови. Какие ионы секретируются канальцами?

- А.  $K^+$  Б.  $Na^+$  В.  $H^+$  Г.  $NH_4^+$  Д.  $Cl^-$  Е.  $HPO_3^-$

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### **Вопросы для обсуждения**

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

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

3. Реакции окисления, восстановления, гидролиза. Микросомальная система окисления, роль цитохрома P<sub>450</sub>. Метаболизм экзогенного этанола.

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

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

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

7. Неорганические и органические компоненты мочи в норме.

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

#### Литература для подготовки

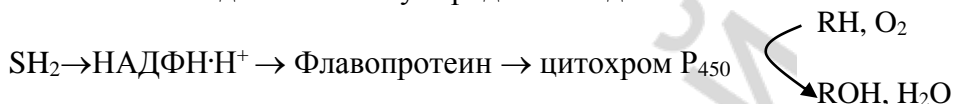
1. *Фармацевтическая биохимия* : учеб. пособие / А.Д. Таганович, Е.А. Девина, Э.И. Олецкий. – Минск : Новое знание, 2019. С. 622–648.

2. *Биологическая химия* : учеб. пособие / А. Д. Таганович [др.]. Минск : Беларусь, 2013. С 235–250.

3. *Конспект лекций*

#### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Знайте основы функционирования микросомальной системы окисления как пути метаболизма эндогенных и чужеродных соединений:



Таким способом гидроксилируются стероиды в процессе образования гормонов коры надпочечников, ряд лекарственных препаратов и чужеродных соединений.

В результате гидроксилирования уменьшается токсичность и повышается растворимость ксенобиотиков, что способствует выведению их из организма. Многие лекарственные вещества, например, фенobarбитал, способны индуцировать синтез микросомальных ферментов и цитохрома P<sub>450</sub>.

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

1.1. Выберите предложения, которые правильно характеризуют «микросомальное» окисление:

А. «Микросомальное» окисление происходит в гладком ЭПР печени и других органах, а также митохондриях коры надпочечников и половых желез

Б. НАДФН·Н<sup>+</sup> не является донором водорода для реакции «микросомального» окисления

В. Главные ферменты системы – цитохромы a, аз

Г. Для образования гидроксильной группы в модифицируемом гидрофобном веществе используется атом кислорода молекулы воды

1.2. Подберите соответствия:

1. Образуется под действием метилтрансферазы

2. Конечный продукт обезвреживания аспирина

3. Образуется под действием УДФ-глюкуронилтрансферазы

4. Канцероген

5. Конечный продукт обезвреживания триптофана

А. Билирубинглюкуронид

Б. Метилгистамин

В. Эпоксид бензантрацена

Г. Индоксилсульфат

Д. Глюкуронид салициловой кислоты



*Задание 2.* Найдите верное утверждение:

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

*Задание 3.* На лабораторном практикуме студенты получили задание сравнить растворимость различных веществ в воде. Сравнив результаты исследования, студенты убедились, что введение некоторых функциональных групп повышает гидрофильность молекул органических соединений.

3.1. Какие функциональные группы могут обеспечить гидрофильные свойства этих молекул?

- А. Изопропильные
- В. Гидроксильные
- Б. Дисульфидные
- Г. Карбоксильные

*Задание 4.* Какие из ниже перечисленных реакций относятся к первой фазе метаболизма ксенобиотиков:

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

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

- А. Сульфотрансферазы
- Д. Глутатионредуктазы
- Б. Фосфорилазы
- Е. УДФ – глюкуронилтрансферазы
- В. Метилтрансферазы
- Ж. Глутатиотрансферазы
- Г. Ацетилтрансферазы

*Задание 6.* Индикан образуется в результате обезвреживания в печени индоксила — продукта гниения аминокислоты триптофана в толстом кишечнике. Какие вещества участвуют в обезвреживании этого токсического соединения?

- А. ФАФС
- В. Глицин
- Д. Таурин
- Б. УДФ-глюкуроновая кислота
- Г. Церулоплазмин

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

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

*Задание 8.* Чему равен рН мочи при смешанном питании?

- А. 7,6 – 8,9
- Г. 3,9 – 5,5
- Б. 7,3 – 7,4
- Д. 7,1– 10,2
- В. 5,3 – 6,5

*Задание 9.* Какая пища вызывает подкисление мочи?

- А. Мясо и рыба
- В. Мучные продукты
- Б. Овощи и фрукты
- Г. Молоко

*Задание 10.* Концентрация какого из продуктов обмена белков повышается в моче при голодании?

- А. Мочевая кислота
- В. Глюкоза
- Б. Мочевина
- Г. Прямой билирубин

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с ответами.*

### Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

*Задание 1.* 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  $a_3$                       В. Цитохром b                      Д. Цитохром  $c_1$   
Б. Цитохром c                      Г. Цитохром  $P_{450}$

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

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

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

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

*Задание 4.* Выберите основной метаболит производных барбитуровой кислоты:

- А. Эпоксид                      Г. Индоксилсульфат  
Б. о-карбоксифенилглюкуронид                      Д. Метилгистидин  
В. Барбитуратглюкуронид

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

*Задание 6.* Для предотвращения развития гипербилирубинемии (желтухи) у новорожденного вследствие несовпадения у матери и ребенка резус-фактора беременной перед родами рекомендован фенobarбитал. Выберите ответ, объясняющий, с какой целью в данном случае был назначен этот препарат:

- А. В качестве снотворного средства  
Б. Для инактивации компонентов микросомного окисления  
В. Для снижения растворимости билирубина  
Г. Как индуктора печеночных ферментов микросомного окисления  
Д. В качестве липотропного средства

*Задание 7.* В каких пределах колеблется относительная плотность мочи у взрослого человека в течение суток?

- А. 1,002–1,035                      Г. 1,000–1,010  
Б. 1,010–1,020                      В. 1,030–1,050

*Задание 8.* Выберите правильные ответы. При голодании в моче можно обнаружить:

- А. Ацетоацетат                      Д. Мочевину  
Б. Белки                      Е. Кровяные пигменты  
В. Глюкозу                      Ж. Ацетон  
Г. Ацетил-КоА

*Задание 9.* Выберите правильные ответы. При сахарном диабете в моче можно обнаружить:

- А. Ацетоацетат                      Г. Ацетил-КоА  
Б. Белки                      Д. Мочевину  
В. Глюкозу                      Е. Кровяные пигменты  
Г. Ацетил-КоА



натрия и 2–3 капли свежеприготовленного 1%-го раствора  $\alpha$ -нафтола в 10%-м растворе NaOH. Появление красной окраски свидетельствует о наличии *p*-аминофенола в моче. Большой избыток раствора  $\alpha$ -нафтола мешает этой реакции.

**Вывод:**

Подпись преподавателя:

### **Занятие 33. ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ: «БИОХИМИЯ КРОВИ. БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ. ВОДНО- МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ»**

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. Индикаторные ферменты крови и их диагностическое значение.

3. Что понимают под гемостазом? Представление о механизмах гемостаза. Три основных структурно-функциональных компонента гемостаза. К каким патологическим состояниям могут привести нарушения в системе гемостаза?

4. Функциональные звенья системы свертывания крови и их биологическая роль.

5. 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.

6. Антикоагулянтная система. Классификация естественных антикоагулянтов. Наиболее значимые естественные антикоагулянты, механизм их действия. Искусственные антикоагулянты (примеры). Механизм действия дикумарола и гепарина.

7. Фибринолитическая система, механизмы фибринолиза. Плазминовая система (компоненты и их происхождение, механизм действия).

8. Витамин К. Химическая природа, разновидности, участие в процессе свертывания крови. Синтетические производные. Антивитамины.

9. Пищевая ценность углеводов, липидов и белков. Незаменимые и условно незаменимые факторы питания.

10. Реальный и желательный вклад белков, жиров и углеводов в энергопродукцию. Пути использования АТФ.

11. Витамин В<sub>1</sub> (тиамин), В<sub>2</sub> (рибофлавин), пантотеновая кислота, РР (никотиновая кислота), В<sub>6</sub> (пиридоксин), В<sub>9</sub> (фолиевая кислота), В<sub>12</sub> (кобаламин), Н (биотин), С (аскорбиновая кислота). Назвать химическую природу. Знать коферментные формы и участие в метаболизме, признаки гиповитаминоза, суточную потребность. Уметь нарисовать блок-схемы для коферментных форм витамина РР (НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>) и витамина В<sub>2</sub> (ФМН и ФАД).

12. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (вит. Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота.

13. Образование и физиологическая роль активных форм кислорода и азота. Повреждающее действие свободных радикалов и активных форм кислорода. Антиоксидантная защита.

14. Токоферол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гиповитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина Е.

15. Ретинол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гипо- и гипervитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина А. Каротины.

16. Витамин D. Химическая природа, всасывание, механизм действия, участие в метаболизме, признаки гипо- и гипервитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина D.

17. Минеральные вещества как незаменимые факторы питания. Классификация. Пути поступления минеральных веществ в организм, механизмы всасывания. Функции минеральных веществ. Электролитный состав биологических жидкостей. Механизмы регуляции объема и электролитного состава жидкостей организма.

18. Макроэлементы. Биологическая роль магния, серы, кальция и фосфора. Распределение в организме. Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфора в организме (кальцитонин, паратгормон, кальцитриол): место синтеза, химическая природа, механизмы передачи гормонального сигнала в клетке и эффекты.

19. Обмен натрия, хлора и калия. Регуляция обмена. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) и ее регуляторы.

20. Микроэлементы. Биологическая роль железа, меди, кобальта, йода, цинка, марганца, фтора, селена. Обмен микроэлементов в организме. Обмен железа. Трансферрин и ферритин.

21. Оценка обеспеченности организма витаминами. Биохимические основы создания поливитаминных и витаминно-минеральных комплексов.

22. Фармацевтическая биохимия. Задачи и биохимические методы, используемые в анализе и контроле качества лекарственных препаратов.

23. Основы фармакокинетики. Пути поступления лекарственных веществ в организм и механизмы всасывания. Факторы, влияющие на всасывание.

24. Транспорт лекарственных веществ. Специфические и неспецифические транспортные системы крови. Распределение лекарственных веществ в тканях. Факторы, влияющие на процессы фармакокинетики.

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

26. Реакции окисления, восстановления, гидролиза. Микросомальная система окисления, роль цитохрома P<sub>450</sub> (схема процесса окисления веществ в системе цитохрома P<sub>450</sub>). Индукция цитохрома P<sub>450</sub>. Метаболизм экзогенного этанола.

27. Фаза конъюгации в системе обезвреживания лекарственных препаратов. Виды конъюгации (глюкуронирование, ацетилирование, метилирование, сульфатирование), ко-субстраты и ферменты. Примеры реакций.

28. Выведение лекарственных веществ из организма (пути и механизмы). Роль Р – гликопротеина, металлотioneина.

## ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЕ ВОПРОСЫ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

### ПЕРВЫЕ ВОПРОСЫ

1. Аминокислоты. Строение, классификация, свойства. Применение в качестве лекарственных препаратов.
2. Пептидная теория строения белковых молекул (теория Фишера). Принципы классификации белков. Сходства и отличия белков и пептидов.
3. Физико-химические свойства белков. Растворимость белков в воде. Факторы устойчивости белковых растворов. Общие реакции на белки: цветные и осаднения. Использование этих реакций в фармацевтической практике.
4. Методы разделения белков, пептидов и аминокислот (электрофорез; адсорбционная, ионообменная, распределительная хроматографии). 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 (Сэнджера, Эдмана, Акабори).
7. Методы и подходы к искусственному синтезу белков и пептидов для получения лекарственных препаратов.
8. 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.
9. Понятие о надвторичной структуре белка. Структурные и функциональные домены. Причины формирования третичной структуры белковой молекулы.
10. Третичная структура белка. Связи, стабилизирующие третичную структуру. Конформационные изменения при функционировании белков. Денатурация белка и факторы, ее вызывающие. Использование явления денатурации в медицинской практике.
11. Четвертичная структура белков. Преимущества существования белков с четвертичной структурой. Кооперативные изменения конформации полипептидных цепей при функционировании белков с четвертичной структурой на примере гемоглобина.
12. Белок-лигандное взаимодействие. Сложные белки. Типы связей между белковой и небелковой частями молекулы. Функции сложных белков в организме.
13. 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).
14. Вторичная структура ДНК и РНК. Виды РНК и их функции. Взаимодействие нуклеиновых кислот с белками. Строение нуклеопротеинов. Особенности строения хромосом и рибосом.
15. Блот-анализ ДНК (Саузерн-блот) и метод «отпечатков пальцев» ДНК. Основные этапы и применение в медицинской практике.
16. Липиды, классификация липидов. Функции ацилглицеролов, фосфо- и гликолипидов в организме.
17. Сложные липиды. Представители. Строение, полярность, биологическая роль.
18. Жирные кислоты, классификация и номенклатура. Высоконепредельные жирные кислоты. Происхождение и биологическая роль простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов.

19. Углеводы. Классификация. Биологическая роль отдельных групп углеводов (моносахаридов, дисахаридов, гомо- и гетерополисахаридов).
20. Роль ферментов в процессах жизнедеятельности. Принципы номенклатуры и классификации ферментов. Единицы активности.
21. Химическая природа и общие свойства ферментов. Имобилизованные ферменты, их характеристика и использование. Ферменты как аналитические реагенты в лабораторных исследованиях.
22. Коферменты, классификация и роль.
23. Механизм действия ферментов и ферментативная кинетика. Уравнения Михаэлиса-Ментен и Лайнуивера-Бэрка.
24. Изоферменты, их молекулярные разновидности, значение в клетке.
25. Понятие об активном и аллостерическом центрах ферментов. Роль пространственной структурной организации в их формировании.
26. Общая характеристика и классификация витаминов. Гипер-, гипо- и авитаминозы. Антивитамины. Оценка обеспеченности организма витаминами. Биохимические подходы к созданию поливитаминных комплексов.
27. Витамины группы А. Провитамины (каротины). Строение, свойства и биологическая роль. Всасывание в кишечнике. Явления гипо-и гипервитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
28. Витамины группы D. Провитамины. Строение и свойства. Биологическая роль. Явления гипо-и гипервитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
29. Витамины группы E. Строение и свойства. Биологическая роль. Явления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
30. Витамины группы K. Строение и свойства. Биологическая роль. Гиповитаминоз. Пищевые источники. Суточная потребность. Викасол. Антагонисты витамина K.
31. Биотин. Строение и свойства, коферментная форма. Биологическая роль. Комплекс биотин-авидин. Явления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
32. Витамин B<sub>1</sub>. Строение и свойства. Участие в построении коферментов. Роль в обмене веществ. Явления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
33. Витамин B<sub>2</sub>. Строение и свойства. Участие в образовании флавиновых коферментов. Биологическая роль. Пищевые источники. Суточная потребность.
34. Витамин B<sub>6</sub>. Строение и свойства, участие в образовании коферментов. Роль в обмене веществ. Явления гиповитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
35. Витамин B<sub>12</sub>. Строение и свойства. Кобамидные коферменты. Участие в обмене веществ. Внутренний фактор. Явления гиповитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
36. Витамин C. Строение и свойства. Биологическое значение. Признаки гипо- и гипервитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
37. Пантотеновая кислота. Строение и свойства. Коферменты, содержащие пантотеновую кислоту. Биологическая роль. Пищевые источники. Суточная потребность.
38. Витамин PP. Строение и свойства. Участие в образовании никотинамидных коферментов. Биологическое значение. Проявления гиповитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
39. Фолиевая кислота, строение и свойства, участие в образовании коферментов. Роль в обмене веществ. Основные проявления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.

40. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (витамин P), парааминобензойная кислота, инозитол, пангамовая кислота, липоевая кислота, холин, витамин U, карнитин. 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,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) и ее биологическое значение. Энергетический заряд клетки. Другие макроэргические соединения. Механизмы синтеза АТФ.

3. Окислительно-восстановительные процессы в тканях. Оксидоредуктазы, коферменты оксидоредуктаз. Роль кислорода в процессах биологического окисления. Участие митохондрий в процессах биологического окисления.

4. 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.

5. Митохондрии, особенности строения мембран митохондрий. Комплексы дыхательной цепи: состав, топология, участие в процессах биологического окисления. Митохондриальный синтез АТФ. АТФ - синтаза. Сопряжение процессов тканевого дыхания и фосфорилирования.

6. Окислительное фосфорилирование как основной механизм синтеза АТФ в животных клетках. Этапы, регуляция. Причины гипознергетических состояний. Разобщители и ингибиторы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, механизм их действия.

7. Фотосинтез, суммарное уравнение. Значение фотосинтеза для жизни на Земле. Характеристика фотосинтезирующих структур. Пигменты фотосинтеза.

8. Стадии фотосинтеза. Механизм световой стадии. Конечные продукты световой стадии.

9. Образование протонного градиента в тилакоидах. АТФ-синтаза, её характеристика. Механизм фотофосфорилирования. Нециклический и циклический перенос электронов в фотосистемах.

10. Темновая стадия фотосинтеза, суммарное уравнение. Фотосинтетическое образование гексоз (цикл Кальвина), его значение для жизни на Земле.

11. Дегидрогеназы, оксидазы, оксигеназы. Биологическая роль в клетке. Система микросомного окисления.

12. Транспорт глюкозы в клетки различных органов и тканей. Пути метаболизма глюкозы, их значение и взаимосвязь.

13. Метаболизм гликогена: гликогенез и гликогенолиз, назначение. Последовательность реакций. Механизмы регуляции.

14. Фосфолиз и гидролиз гликогена в печени и мышцах. Влияние адреналина, глюкагона и инсулина на гликогенолиз.

15. Дихотомический распад углеводов как путь получения энергии в клетках. Анаэробное и аэробное окисление глюкозы, этапы, конечные продукты. Энергетический выход.

16. Гликолиз. Этапы, реакции, регуляция, биологическая роль. Энергетический выход и механизм образования АТФ в анаэробных условиях. Связь гликолиза с другими метаболическими процессами.



17. Спиртовое брожение углеводов. Общие реакции для спиртового брожения и гликолиза, различия этих двух процессов. Обмен экзогенного этанола.
18. Пируват как центральный метаболит. Пути превращения пирувата в зависимости от энергетического статуса и особенностей окислительного метаболизма клетки.
19. Глюконеогенез. Субстраты, ферменты, энерготраты, биологическая роль. Регуляция глюконеогенеза.
20. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты и других  $\alpha$ -кетокислот, ферменты, коферменты, биологическое значение. Отличие от простого декарбоксилирования.
21. Лимоннокислый цикл как центральный метаболический путь (локализация, последовательность химических превращений). Биологическое значение цикла. Связь с процессом окислительного фосфорилирования.
22. Пентозофосфатный путь распада глюкозы, этапы, назначение.
23. Глюкуроновая кислота. Путь образования. Пути метаболизма глюкуроновой кислоты.
24. Механизмы образования углекислого газа и воды — конечных продуктов обмена веществ.
25. Ресинтез липидов в клетках слизистой тонкого кишечника. Пути ресинтеза триацилглицеролов, фосфолипидов, эфиров холестерина.
26. Транспорт липидов в крови. Структура, образование и метаболизм хиломикрон. Роль липопротеинлипазы в обмене хиломикрон и других липопротеинов.
27. Получение липосом и их использование для доставки лекарственных препаратов к органам и тканям.
28. Транспорт липидов в крови. Структура, образование и метаболизм ЛПОНП, ЛПВП и ЛПНП. Роль липопротеинлипазы, печеночной липазы и рецепторов клеточной поверхности.
29. Доставка липидов в клетки органов и тканей. Транспорт холестерина, жирных кислот. Механизм поддержания баланса холестерина в клетках организма.
30. Транспорт липидов. Образование и последующий метаболизм ЛПВП в организме. Роль ЛХАТ. Факторы, оказывающие влияние на уровень липопротеинов плазмы крови.
31. Депонирование липидов в жировой ткани и мобилизация жира из депо. Роль гормонов, лептина. Источники субстратов для синтеза триацилглицеролов в жировой ткани.
32. Транспорт, поступление в клетку и использование жирных кислот в качестве источников энергии. Окисление жирных кислот в митохондриях и пероксисомах. Энергетический выход.
33. Биосинтез жирных кислот. Происхождение субстратов. Полиферментный комплекс, синтезирующий жирные кислоты в эукариотической клетке. Значение биотина, НАДФН·Н<sup>+</sup>. Активаторы и ингибиторы синтеза жирных кислот.
34. Биосинтез холестерина. Регуляция уровня холестерина в клетках. Производные холестерина. Связь нарушений обмена липидов с развитием заболеваний (атеросклероз, желчно-каменная болезнь, жировое перерождение печени).
35. Кетоновые тела. Образование кетоновых тел. Пути катаболизма. Причины и следствия повышения образования кетоновых тел.
36. Биосинтез фосфолипидов. Липотропные факторы как лекарственные средства.
37. Переаминирование. Ферменты. Коферменты. Роль этого процесса для жизнедеятельности клетки. Диагностическое значение определения активности трансаминаз в сыворотке крови.
38. Пути дезаминирования аминокислот. Ферменты и коферменты окислительного дезаминирования. Биологическое значение глутаматдегидрогеназной реакции.

39. Пути превращения безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты.

40. Пути обезвреживания аммиака в организме. Транспорт аммиака по крови.

41. Аминокислотный фонд клетки. Источники пополнения. Пути использования аминокислотного фонда. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Механизмы синтеза аминокислот.

42. Образование мочевины. Роль печени в образовании мочевины. Значение исследования уровня мочевины и остаточного азота в клинической практике.

43. Декарбоксилирование аминокислот. Образование биогенных аминов и их роль в организме. Окисление биогенных аминов. Лекарственные средства — ингибиторы аминоксидаз. Антигистаминные препараты.

44. Связь обмена липидов и углеводов. Их взаимопревращения.

45. Образование и использование в клетке ацил-КоА и ацетил-КоА.

46. Образование и физиологическая роль активных форм кислорода. Повреждающее действие свободных радикалов и активных форм кислорода.

47. Ферментативная и неферментативная системы антиоксидантной защиты в клетке. Антиоксиданты как лекарственные препараты.

### ТРЕТЬИ ВОПРОСЫ

1. Гормоны. Химическая природа. Классификация. Связь структуры гормонов с механизмом их действия. Гормоны как лекарственные препараты, источники получения и их применение в медицине.

2. Гормоны аденогипофиза. Связь с гипоталамусом. Роль в регуляции периферических желез внутренней секреции. Соматотропный гормон, химическая природа, механизм действия, влияние на метаболизм.

3. Гормоны задней доли гипофиза: вазопрессин, окситоцин. Их химическая природа, молекулярный механизм проведения сигнала в клетку, влияние на метаболизм.

4. Гормоны щитовидной железы. Их строение и образование. Механизм действия, влияние на метаболизм. Гипо- и гипертиреоз.

5. Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфора. Химическая природа. Механизм действия, эффекты.

6. Инсулин. Химическая природа и механизм действия. Роль инсулина в регуляции обмена углеводов, липидов и белков.

7. Метаболические нарушения при сахарном диабете. Роль гликозилирования белков, восстановительного пути обмена глюкозы.

8. Глюкагон. Химическая природа, рецепторы, механизм передачи сигнала в клетках-мишенях, влияние на метаболизм.

9. Глюкокортикоиды, строение, рецепторы, механизм передачи сигналов в клетках-мишенях. Влияние на метаболизм.

10. Минералокортикоиды, их строение, механизм передачи сигналов в клетках-мишенях. Влияние на метаболизм.

11. Гормоны мозговой части надпочечников: адреналин, норадреналин. Строение, синтез. Механизм проведения сигнала в клетки-мишени, влияние на метаболизм.

12. Половые гормоны, химическая природа, механизм передачи сигналов в клетках-мишенях.

13. Биосинтез пуриновых нуклеотидов. Исходные субстраты синтеза. Регуляция синтеза. Роль витаминов в механизмах синтеза.

14. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов. Исходные субстраты синтеза. Оротовая кислота. Источники пентоз. Регуляция синтеза. Роль витаминов в синтезе пиримидиновых нуклеотидов.
15. Матричный механизм синтеза ДНК. Ферменты и субстраты синтеза. Особенности синтеза у эукариот.
16. Полимеразная цепная реакция и клонирование как методы искусственного размножения ДНК. Основные этапы и применение в фармацевтической практике и в диагностике заболеваний.
17. Синтез РНК. Ферменты и субстраты синтеза. Особенности синтеза у эукариот. Регуляция синтеза.
18. Генетический код и его свойства.
19. Роль т-РНК в синтезе белка. Специфичность АРСаз. Адапторная функция т-РНК.
20. Рекогниция и трансляция как этапы реализации генетической информации в клетке. Субстраты, ферменты, механизм.
21. Регуляция биосинтеза белка в клетке на генетическом уровне. Роль гистонов, гормонов, жирорастворимых витаминов, антибиотиков.
22. Посттрансляционная модификация молекул белка. Гидроксилирование, гликозилирование, ограниченный протеолиз. Другие механизмы посттрансляционных модификаций.
23. Обратимая и необратимая регуляция биохимических реакций. Представление о механизме изостерической регуляции. Использование принципов изостерической регуляции в медицинской практике.
24. Представление о механизме аллостерической регуляции биохимических реакций. Аллостерические эффекторы. Виды аллостерической регуляции.
25. Ковалентная модификация структуры ферментов как механизм регуляции биохимических реакций. Роль реакций фосфорилирования в ковалентной модификации. Регуляторы фосфорилирования ферментов.
26. Гуморальная регуляция обмена липидов. Роль отдельных гормонов в механизмах регуляции липидного обмена (инсулин, адреналин, глюкагон, стероидные гормоны).
27. Гуморальная регуляция обмена углеводов. Роль отдельных гормонов в механизмах регуляции обмена углеводов (инсулин, адреналин, глюкагон, глюкокортикоиды).
28. Гуморальная регуляция содержания глюкозы в крови. Механизмы регуляторного действия гормонов.
29. Общие представления о молекулярной организации биологических мембран. Участие структурных компонентов мембран в межклеточной сигнализации. Рецепторы, классификация рецепторов.
30. Механизмы передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Механизмы усиления сигналов. Вторичные посредники и механизмы их образования.
31. Механизмы передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Механизмы усиления сигналов. Роль G- белков в этих процессах.
32. Аденилатциклазный механизм передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Роль фосфодиэстеразы. Значение уровня цАМФ для клетки.
33. Механизмы передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы с участием фосфолипазы С.
34. Инозитолфосфолипидный путь внутриклеточной сигнализации. Инозитолтрифосфат и диацилглицерол, механизмы образования и действия.
35. Роль ионов кальция в механизмах трансформации внешних сигналов. Кальмодулин.

36. Роль ограниченного протеолиза в механизмах регуляции процессов жизнедеятельности. Свертывание крови. Факторы и механизмы свертывания. Значение ионов кальция и витамина К в процессах свертывания крови.

37. Роль ограниченного протеолиза в механизмах регуляции процессов жизнедеятельности. Фибринолиз. Биологическая роль фибринолиза. Плазминовая система.

38. Антикоагулянтная система. Первичные и вторичные антикоагулянты.

39. Важнейшие характеристики и составляющие интеграции метаболизма.

40. Особенности метаболизма в печени после принятия пищи.

41. Особенности метаболизма в печени натошак.

#### ЧЕТВЕРТЫЕ ВОПРОСЫ

1. Фармацевтическая биохимия. Предмет и задачи. Биогенные и синтетические лекарственные средства. Биохимические методы, используемые в анализе и контроле качества лекарственных средств.

2. Биохимические основы фармакокинетики лекарственных средств. Пути поступления лекарственных препаратов в организм и механизмы их всасывания. Факторы, влияющие на всасывание.

3. Транспорт лекарственных веществ. Специфические и неспецифические транспортные системы крови. Распределение лекарственных веществ в тканях. Пути и механизмы выведения лекарственных веществ из организма.

4. Биотрансформация лекарственных веществ. Фазы биотрансформации, их характеристика. Факторы, влияющие на метаболизм лекарственных веществ.

5. Роль цитохрома P450 в метаболизме эндогенных соединений и лекарственных препаратов. Схема процесса окисления в системе цитохрома P450. Индукция системы цитохрома P450.

6. Метаболическая трансформация, как I фаза обезвреживания лекарственных препаратов. Виды и ферменты.

7. Фаза конъюгации в системе обезвреживания эндогенных соединений и лекарственных препаратов. Виды конъюгации (глюкуронирование, ацетилирование, метилирование, сульфатирование). Косубстраты и ферменты конъюгации. Примеры реакций.

8. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте. Конечные продукты распада пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов. Гиперурикемия, подагра, подходы к диагностике, профилактике и лечению.

9. Азотистый баланс. Нормы белков в питании. Биологическая ценность белков.

10. Пищевая ценность белков, углеводов, липидов, усваиваемость в желудочно-кишечном тракте. Незаменимые факторы питания. Энергия – потребность, происхождение и расходование в организме.

11. Применение ферментов и их ингибиторов в медицинской практике для лечения и диагностики заболеваний. Ферменты как аналитические реагенты в лабораторных исследованиях.

12. Роль печени в обмене белков, углеводов, липидов.

13. Антитоксическая функция печени. Обезвреживание в печени токсичных веществ, нормальных метаболитов, лекарственных препаратов.

14. Синтез и распад кровяных пигментов. Роль печени в образовании желчных пигментов. Метаболизм желчных пигментов.

15. Происхождение ферментов плазмы крови. Значение определения активности ферментов в плазме крови с диагностической целью и для контроля за эффективностью лечения.

16. Химический состав плазмы крови. Методы исследования химического состава плазмы крови, используемые в клинической практике.
17. Буферные системы крови и их значение. Доказательство буферных свойств сыворотки крови. Общее представление о регуляции кислотно-основного состояния (КОС).
18. Механизмы переноса углекислоты и кислорода кровью. Механизмы развития гипоксических состояний.
19. Белки плазмы крови. Функции. Клинико-биохимическое значение определения общего белка плазмы крови и белковых фракций.
20. Методы обнаружения и количественного определения белков в биологических жидкостях (моча, плазма крови) и лекарственных препаратах.
21. Основные показатели анализа мочи здорового человека.
22. Патологические составные части мочи и их определение.
23. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Качественный и количественный анализ желудочного сока. Роль соляной кислоты.
24. Сок поджелудочной железы. Участие в переваривании углеводов и липидов. Принципы и клиническое значение определения активности амилазы в моче.
25. Классификация и свойства протеаз. Участие в переваривании белков. Субстратная специфичность. Ингибиторы протеаз и их использование в клинической практике.
26. Пищевая ценность углеводов. Переваривание и всасывание углеводов. Роль клетчатки и пектинов в питании. Углеводы как лекарственные препараты.
27. Этапы переваривания липидов пищи в желудочно-кишечном тракте. Роль желчных кислот, ферментов. Печеночно-кишечная рециркуляция желчных кислот. Механизмы всасывания продуктов ферментативного гидролиза жира.
28. Химические реакции, лежащие в основе гниения белков в кишечнике. Механизмы обезвреживания их в организме.
29. Вода. Значение воды. Биологическая роль натрия, калия, хлора. Механизмы регуляции водно-минерального обмена.
30. Макроэлементы (кальций, фосфор, магний). Биологическая роль.
31. 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 серы в процессах обезвреживания).
32. Микроэлементы. Их значение. Роль ионов марганца, меди, цинка, селена, кобальта, йода, фтора. Биохимические основы создания сбалансированных витаминно-минеральных комплексов.
33. Механизмы всасывания, транспорта и депонирования железа. Роль железа в организме.

**Повторите и запомните некоторые биохимические константы**

<b>КРОВЬ</b>	
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	0,85–2,0 ммоль/л
Холестерол	3,9–6,2 ммоль/л
Общий белок сыворотки	65–85 г/л
Альбумин	35–50 г/л
Глобулины	20–35 г/л
Фибриноген	2–4 г/л
Остаточный азот плазмы (сыворотки)	14,3–25 ммоль/л
Мочевина плазмы (сыворотки)	2,5–8,3 ммоль/л
Аммиак крови	6–65 мкмоль/л
Мочевая кислота	0,15–0,5 ммоль/л
Гемоглобин :мужчины	130–160 г/л
женщины	120–140 г/л(до 150 г/л)
Билирубинплазмы (сыворотки): общий	8,5–20,5 мкмоль/л
прямой	до 5 мкмоль/л
непрямой	до 16 мкмоль/л
Na <sup>+</sup> в плазме	135–150 ммоль/л
K <sup>+</sup> в плазме	3,4–5,6 ммоль/л
Ca <sup>2+</sup> в плазме (общий)	2,2–2,7 ммоль/л
<b>ЖЕЛУДОЧНЫЙ СОК</b>	
Кислотность желудочного сокаобщая	40–60 ммоль/л
свободная HCl	20–40 ммоль/л
связанная HCl	10–20 ммоль/л
<b>МОЧА</b>	
Плотность	1,01–1,025
pH	5,0–7,0
Общий азот	10–18 г/сут
Мочевина	20–35 г/сут
Азот аммиака	0,5–1,0 г/сут
Белок	< 150 мг/сут

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Правила техники безопасности при работе в химической лаборатории.....	3
Занятие 1. Введение в биохимию. Строение аминокислот и пептидов. Количественное определение содержания белка в биологических жидкостях.....	4
Занятие 2. Структурная организация белков и основы их функционирования. Реакции осаждения белков.....	7
Занятие 3. Физико-химические свойства белков. Методы разделения, выделения и очистки белков.....	13
Занятие 4. Ферменты: классификация, строение, свойства. Кинетика ферментативных реакций.....	18
Занятие 5. Регуляция работы ферментов. Определение активности ферментов.....	23
Занятие 6. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам «Белки. Ферменты».....	28
Занятие 7. Введение в метаболизм. Биологическое окисление. Центральные пути метаболизма (окислительное декарбоксилирование ПВК, лимоннокислый цикл). Изучение функционирования ЦТК.....	29
Занятие 8. Энергетический обмен. Тканевое дыхание. Фотосинтез (световая стадия). Изучение окислительного фосфорилирования.....	33
Занятие 9. Углеводы. Переваривание углеводов. Обмен гликогена. Спиртовое брожение глюкозы.....	40
Занятие 10. Анаэробный и аэробный пути распада глюкозы. Метаболизм пирувата. Глюконеогенез. Метаболизм экзогенного этанола. Количественное определение пировиноградной кислоты в моче.....	43
Занятие 11. Пентозофосфатный и глюкуроновый пути обмена глюкозы. Фотосинтез (темновая стадия). Регуляция уровня глюкозы в крови. Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови.....	47
Занятие 12. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам: «Введение в метаболизм и биоэнергетику. Обмен углеводов. Фотосинтез».....	51
Занятие 13. Обмен липидов. Переваривание, всасывание и ресинтез. Транспорт экзогенных липидов. Определение активности липазы.....	53
Занятие 14. Депонирование и мобилизация липидов. Обмен холестерина. Транспорт липидов кровью. Определение $\beta$ -липопротеинов в сыворотке крови.....	58
Занятие 15. Внутриклеточный обмен жирных кислот. Кетоновые тела. Количественное определение холестерина в сыворотке крови.....	61
Занятие 16. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по теме «Обмен липидов».....	66
Занятие 17. Контроль практических навыков биохимического анализа.....	67
Занятие 18. Азотистый баланс. Переваривание белков. Пути использования аминокислот в клетке. Анализ желудочного сока.....	69
Занятие 19. Внутриклеточный обмен аминокислот. Обезвреживание аммиака. Количественное определение остаточного азота крови и мочевины в моче.....	74
Занятие 20. Химия и обмен нуклеопротеинов. Определение содержания мочевой кислоты и общего азота в моче.....	79
Занятие 21. Матричные биосинтезы (синтез ДНК, РНК, белков). Методы молекулярной биологии. Анализ продуктов гидролиза нуклеопротеинов.....	83
Занятие 22. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам: «Обмен простых белков и нуклеопротеинов. Биосинтез ДНК, РНК и белка. Методы молекулярной биологии».....	88
Занятие 23. Общая характеристика и особенности биологического действия гормонов. Качественные реакции на гормоны.....	89
Занятие 24. Гормональная регуляция метаболизма. Тест на толерантность к глюкозе.....	94

Занятие 25. Биохимия печени. Определение содержания общего билирубина в сыворотке крови.....	100
Занятие 26. Интеграция метаболизма изучение влияния гормонов на содержание глюкозы в крови.....	105
Занятие 27. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам: «Гормоны. Биохимия печени. Интеграция метаболизма».....	109
Занятие 28. Биохимия крови. Физико-химические свойства крови. Исследование буферных свойств сыворотки крови. Количественное определение хлоридов в крови.....	111
Занятие 29. Белки плазмы крови. Система гемостаза. Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза на ацетилцеллюлозе. Определение содержания кальция в плазме крови.....	117
Занятие 30. Биохимия питания. Витамины. Качественные реакции на витамины и определение содержания витамина С в плодах шиповника и в моче.....	124
Занятие 31. Вода и минеральные вещества. Макро-и микроэлементы. Гормональная регуляция водно-минерального обмена. Определение содержания натрия и калия в сыворотке крови.....	130
Занятие 32. Фармацевтическая биохимия. Биотрансформация веществ и их выведение из организма. Биохимия мочи. Определение салициловой кислоты, фенаcetина и парацетамола в моче.....	134
Занятие 33. Вопросы для подготовки к коллоквиуму по темам: «Биохимия крови. Биохимия питания. Водно-минеральный обмен. Фармацевтическая биохимия».....	140
Приложение 1. Экзаменационные вопросы по биологической химии.....	142
Приложение 2. Повторите и запомните некоторые биохимические константы.....	150