

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

**РУКОВОДСТВО  
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА**

Практикум



Минск БГМУ 2012

УДК 577.1 (076.5)(075.8)  
ББК 24я73  
Р85

Рекомендовано Научно-методическим советом университета  
в качестве практикума 31.10.2012 г., протокол № 2

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

Рецензенты: д-р мед. наук, проф. В. К. Кухта; канд. мед. наук, доц. О. Н. Ринейская

**Руководство** к практическим занятиям по биологической химии для фармацевтиче-  
Р85 ского факультета : практикум / А. Д. Таганович [и др.]. – Минск : БГМУ, 2012. – 160 с.

ISBN 978-985-528-710-1.

По каждой теме даны: цель занятия, вопросы для обсуждения, тестовые задания различной степени сложности, литература для подготовки. Для приобретения студентами навыков самостоятельного биохимического анализа руководство содержит описание лабораторных работ и протоколы их выполнения. При описании лабораторных работ кратко излагается практическое использование данного метода в медицинской и фармацевтической практике. Приложение 1 содержит перечень экзаменационных вопросов по биологической химии. Приложение 2 содержит некоторые биохимические константы.

Предназначено для студентов 2-го – 3-го курса фармацевтического факультета, изучающих, в соответствии с программой, биологическую химию.

УДК 577.1 (076.5)(075.8)  
ББК 24я73

ISBN 978-985-528-710-1

© Оформление. Белорусский государственный  
медицинский университет, 2012

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ВВЕДЕНИЕ В ПРАКТИКУМ. БЕЛКИ: СОСТАВ И ФУНКЦИИ.  
СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ БЕЛКОВОЙ  
МОЛЕКУЛЫ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ**

**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 — 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, структурную, гормональную, защитную, сократительную и др.). Методы количественного определения белка в биологических жидкостях (растворах) широко используются в медицинской и фармацевтической практике.

**Цель занятия**

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

**Требования к исходному уровню знаний**

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

***общей химии:***

- правила работы в химических лабораториях;

***биоорганической химии:***

- аминокислотный состав белков;
- строение аминокислот, номенклатура;
- классификация и общие свойства аминокислот;
- пептиды, электронное и пространственное строение пептидной связи;
- правила написания пептидов, их названия и определения заряда;
- классификация и функции белков;

***медицинской и биологической физики:***

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

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

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

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

*Задание 4. Олигопептид — это соединение, которое содержит:*

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

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

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

*Задание 6. Какие функции присущи только белкам?*

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

*Задание 7. Объясните, почему пептидная группа является плоской и жесткой структурой? Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.*

### **Вопросы для обсуждения**

1. Предмет, цели и задачи биохимии. Объекты и методы исследований в биохимии.
2. Строение и свойства аминокислот, входящих в состав белков. Аминокислоты, как лекарственные средства (примеры).
3. Пептиды. Пептидная связь, свойства (рентгеноструктурный анализ, постулаты Полинга-Кори). Классификация и биологическая роль пептидов. Пептиды, как лекарственные средства (примеры).
4. Белки как класс органических веществ, биологические функции. Классификация белков. Сложные белки.
5. Пространственная структура белка (вторичная, надвторичная, третичная, четвертичная структуры белковой молекулы (понятие, разновидности и связи, стабилизирующие структуру).
6. Конформационные изменения при функционировании белков. Взаимодействие белков с лигандами.
7. Денатурация. Обратимость денатурации. Механизмы действия денатурирующих факторов.
8. Методы количественного определения белка (рефрактометрический, нефелометрический, фотоэлектроколориметрический, спектрофотометрический). Принципы определения, сравнительная характеристика методов, их применение в клинике, в стандартизации и контроле качества лекарственных препаратов.

### **Литература**

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 7–18, 32–42.
2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 13–19, 28–37, 42–76.

### **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. 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 внутрцепочечных 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.* В какой среде пептид Ала-Гис-Лиз-Фен будет двигаться к катоду при электрофорезе?

А. Кислой Б. Нейтральной В. Щелочной

*Задание 4.* Знать уровни структурной организации белков и основные связи, участвующие в их формировании.

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

1. Первичная структура
2. Вторичная структура
3. Надвторичная структура
4. Третичная структура
5. Четвертичная структура

- А. Пространственное расположение отдельного участка полипептидной цепи, содержащей  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры
- Б. Порядок чередования аминокислот в полипептидной цепи
- В. Объединение в определенном порядке двух или большего количества протомеров в молекуле олигомерного белка
- Г. Способ укладки отдельных участков пептидной цепи в виде  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур
- 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

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

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

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

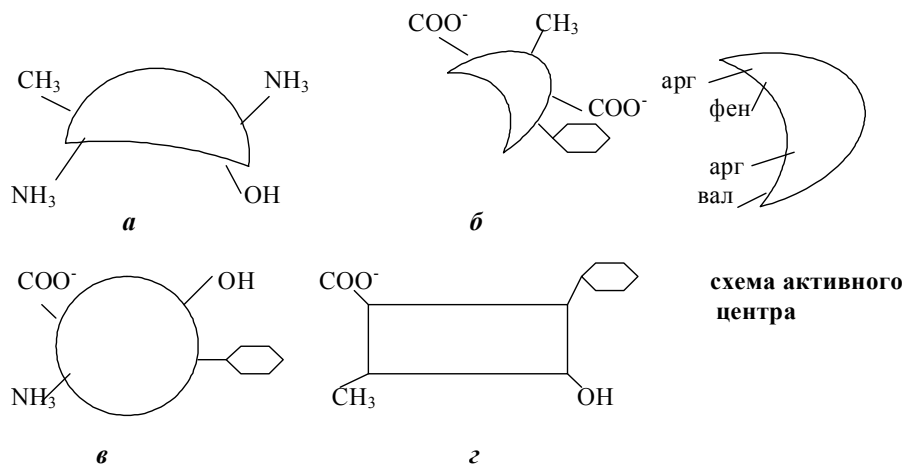
*Задание 5.* Вспомните, что:

- 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.

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



Ответьте на вопросы:

А. Какой из перечисленных лигандов (а, б, в, г) с наибольшей вероятностью будет взаимодействовать с активным центром данного белка и почему?

Б. Какие типы связей возникают в процессе образования комплекса «белок – лиганд»?

Задание 6. Выберите правильные утверждения:

А. Биуретовую реакцию дают все аминокислоты

Б. Биуретовую реакцию дает биурет

В. Биуретовую реакцию дают трипептиды

Г. Биуретовую реакцию дают белки

Задание 7. Рефрактометрический метод основан на:

А. Определении угла отражения падающего света

Б. Явлении светорассеяния

В. Определении коэффициента преломления

Г. Определении коэффициента экстинкции

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

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

Задание 1. Подберите к каждому белку соответствующую функцию:

1. Коллаген

А. Структурная

2. Иммуноглобулин

Б. Сократительная

3. Инсулин

В. Транспортная

4. Гемоглобин

Г. Каталитическая

5. Актин

Д. Защитная

6. Кератин

Е. Гормональная

7. Родопсин

Ж. Рецепторная

8. Альбумин

З. Токсическая

Задание 2. 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 3.** 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 4.** В клинической лаборатории для целей парентерального питания смесь аминокислот (Гли, Ала, Глу, Лиз, Арг, Сер, Асп) разделяют методом электрофореза при  $\text{pH} = 6,0$ . Какие аминокислоты будут двигаться к аноду, какие — к катоду, а какие останутся на месте?

**Задание 5.** 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 6.** 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 7.** Лигандом  $\alpha$ -протомера гемоглобина может быть:

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

**Задание 8.** В клинику поступил ребенок 3-х лет с пищевым отравлением. Жалобы: диарея, рвота. При биохимическом анализе крови концентрация общего белка — 100 г/л. Данный показатель характеризует:

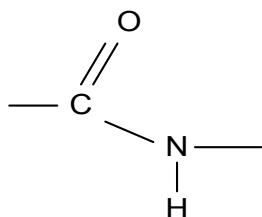
- А. Абсолютную гиперпротеинемию
- Б. Нормопротеинемию
- В. Относительную гипопроотеинемию
- Г. Относительную гиперпротеинемию

### Эталоны ответов к решению заданий

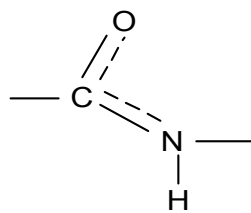
**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

1Б; 2В; 3В; 4А, Б; 5Г; 6Б.

7 Пептидная группа с позиций электронного строения представляет собой трехцентровую  $p, \pi$ -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

**Для самостоятельной работы:**

- 1Б; 2.3 А. Повороты в области каждого остатка Про – остатки # 7, 19, 28; Б. Поперечные связи по остаткам цистеина – остатки # 13, 24 могут формировать дисульфидный мостик; В. Остатки 1–3 гидрофобны; Г. Остатки 13–18 гидрофильны;  
3А, Б; 4.1 (Б, Е – 1; Г – 2; А – 3; Д – 4; В – 5);  
4.2 (А – 2, 3; Б – 4; В – 1, 3, 5, 6; Г – 1, 3, 5);  
5.1 (А – лиганд Б; Б – ионные, гидрофобные); 6Б, В, Г; 7В.

**Самостоятельная работа (60 мин)**

**Инструкция к практическому занятию**

**Определение общего белка биуретовым методом**

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

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

*Порядок выполнения работы.* В 1-ю пробирку (опыт) наливают 0,1 мл исследуемой сыворотки, во 2-ю (контроль) — 0,1 мл 0,9%-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 гипопро-теинемия (понижение концентрации белка в крови) развивается при гидремии, т. е. нагрузке водой, водном отравлении, а относительная гиперпротеинемия (повышение концентрации белка в крови) возникает при сгущении крови из-за значительных потерь жидкости при поносах, неукротимой рвоте, усиленном потоотделении, холере, ожогах. Абсолютная гипопро-теинемия наблюдается при нефритах, злокачественных опухолях, алиментарной дистрофии. Абсолютная гиперпротеинемия встречается сравнительно редко, например, при миеломной болезни, хронических полиартритах.



## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. 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.

### Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

#### общей химии:

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

#### коллоидной химии:

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

#### биоорганической химии:

- реакции гидролиза белков.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

Задание 1. Какие из перечисленных ниже реакций свойственны аминокруппам (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
- Б. Является катионом
- В. Является амфионом
- Г. Обладает наибольшей степенью ионизации

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

- А. Очистки воды
- Б. Определения заряда эритроцитов
- В. Очистки лекарственных препаратов
- 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 при вымывании их растворителем из колонки, заполненной активированным углем, 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 эталонами ответов.***

### **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. Факторы устойчивости белковых растворов (заряд белка, гидратная оболочка, молекулярная масса, форма молекулы). Изоэлектрическое состояние.

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

5) ультрацентрифугирование;

6) кристаллизация.

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

5. Сравнительный анализ гомологичных белков (метод Ингрема).

6. Методы искусственного синтеза пептидов и белков.

### ***Рекомендуемые темы для реферативных докладов***

1. Биохимический базис медицинской биотехнологии.

2. Получение лекарственных препаратов (инсулина, соматотропина, эритропоэтинов, факторов свертывания крови) искусственным и биотехнологическим синтезом.

## Литература

### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 16–32.
2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 35–43.

### Дополнительная

3. *Северин, Е.С.* Биохимия / Биохимия : учеб. для вузов. / под ред. Е. С. Северина., 2003. С. 67–73.

## Задания для самостоятельной работы

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

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

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

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

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

Ответьте на вопросы:

2.1. Хроматографию применяют для:

- |                       |                             |
|-----------------------|-----------------------------|
| А. Разделения веществ | 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 патологических 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 эталонами ответов.**

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

- |   |  |
|---|--|
| А. Ультрацентрифугирование              | 1. Метод основан на различной сорбционной способности веществ                        |
| Б. Гель-фильтрация                      | 2. Метод основан на различиях в молекулярной массе белков                            |
| В. Электрофорез в полиакриламидном геле | 3. Метод основан на комплементарном присоединении белка к иммобилизованному лиганду  |
| Г. 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  | 151 000                | 4,4 |
| γ-Глобулин     | 150 000                | 6,3 |
| β-Лактальбумин | 37 000                 | 5,2 |

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

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

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

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

gp160 — предшественник белка вирусной оболочки

gp120 — белок вирусной оболочки

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 | <b>Интерпретация полос</b>                     |
|-------|---|---|---|---|---|--|
| gp160 | — |   |   | — |   | 1 — вирус + сыворотка (положительный контроль) |
| gp120 | — |   |   | — | — | 2 — вирус – сыворотка (отрицательный контроль) |
| р55   | — |   |   | — |   | А — пациент А                                  |
| gp41  | — |   |   | — |   | В — пациент В                                  |
| р31   | — |   |   | — |   | С — пациент С                                  |
| р24   | — |   |   | — | — |  |

**Задание 5.** Пептид ферментативного гидролизата, не передвигающийся в электрическом поле при электрофорезе, дансировали и выделили дансилпроизводное Лей. Кислотный гидролиз пептида дал три пептида следующего состава: 1) Цис, Асп; 2) Тир, Лей; 3) Тир, Асп, Арг. Напишите формулу пептида, назовите пептид. В какой среде проводили электрофорез исходного гидролизата белка? Почему Вы так решили?

**Эталоны ответов к решению заданий**

**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; 2.1 А, Б, В, Г; 2.2 В;

2.3 Б, 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.

## Самостоятельная работа (70 мин)

### Инструкция к практическому занятию

#### Колоночная гель-фильтрация

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

#### Ход работы

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

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

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

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

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

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

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

6. Сформулируйте и запишите в рабочей тетради вывод.

## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ФЕРМЕНТЫ. КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

### Актуальность темы

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

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

Знание энзимологии имеет большое значение для подготовки и практической деятельности врача. Многие болезни (врожденные нарушения метаболизма) определяются генетически обусловленными нарушениями в синтезе ферментов. При повреждении клеток (вызванном, например, недостатком кровообращения или воспалением) некоторые ферменты попадают в кровь. Измерение активности тканеспецифичных ферментов в крови обычно используется для диагностики заболеваний. Ферменты применяются и в терапии.

### **Цель занятия**

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

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### ***общей химии:***

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

#### ***биоорганической химии:***

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

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

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

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

*Задание 2.* 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 эталонами ответов.***

### **Вопросы для обсуждения**

1. Особенности ферментов как белковых катализаторов.
2. Современная классификация ферментов и номенклатура ферментов (систематическое и рабочее названия). Шифр ферментов. Общая характеристика классов.

3. Строение ферментов. 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 ( $K_m$ ), использование  $K_m$  для прогнозирования протекания биохимических реакций.

8. Единицы активности ферментов.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 45–49, 53–54, 56–66.

#### Дополнительная

2. *Ленинджер, А. Основы биохимии* / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985. С. 226–241.

3. *Биохимия человека* / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993.

4. *Березов, Т. Т. Биологическая химия* / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 92–98, 108–116, 124–129.

### 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. Небиологические катализаторы

2. В процессе реакции не расходуются        Б. Ферменты

3. Неспецифичны                                    В. Обе группы катализаторов

4. Ингибируются аналогами субстрата        Г. Ни один из катализаторов

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

1.4. Назовите основные факторы, влияющие на активность ферментов.

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

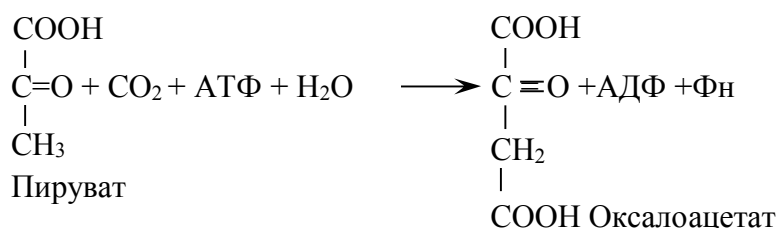
*Задание 2.* Запомните, чтобы назвать ферменты по написанным реакциям, требуется:

– сравнить структуру субстратов и продуктов;

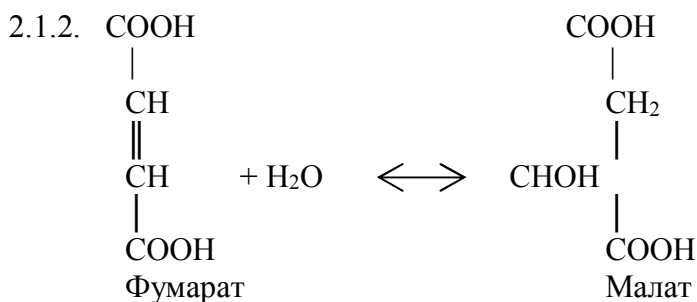
– определить тип превращения.

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

2.1.1.







*Задание 3.* Напишите схематически структуру коферментов: НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, ФАД, ФМН.

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

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

- А. Относительную    Б. Абсолютную    В. Стереоспецифичность

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

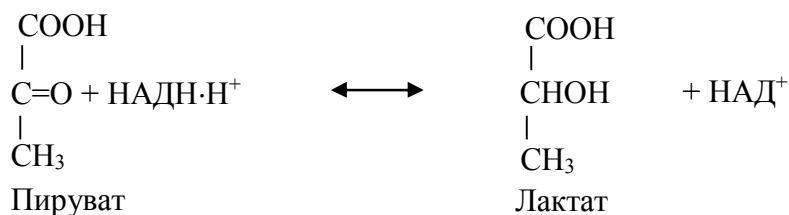
*Задание 1.* В лаборатории выделили фермент лизоцим и определили его активность при различных значениях pH среды. Установили, что ферментативная активность лизоцима максимальна при pH 5,2 и уменьшается как при снижении, так и при повышении этого значения pH. Укажите возможную причину:

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

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

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

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



3.1. Объясните причины уменьшения активности фермента:

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

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

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

#### Эталоны ответов к решению заданий

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

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.

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

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

1. Определение активности амилазы слюны и ее термолабильности

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

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

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

*Ход работы.* В чистую пробирку отливают небольшое количество неразведенной слюны (2–3 мл) и кипятят ее в течение 5 мин, после чего охлаждают. В 3 пробирки наливают по 10 капель 1%-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 едкого натра 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 рабочую тетрадь в виде таблицы:

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

## 2. Влияние pH среды на активность ферментов

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

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

Результаты опыта запишите в рабочую тетрадь в виде таблицы:

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

## 3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны

*Ход работы.* В три пробирки наливают по 1 мл слюны, разведенной в 40 раз. В 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, в какой пробирке действует активатор или ингибитор.

Результаты опыта запишите в рабочую тетрадь в виде таблицы:

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

## Работа 2. Специфичность ферментов

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

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

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

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

Результаты опыта запишите в рабочую тетрадь в виде таблицы:

| № пробирки | Фермент | Субстрат | Реакция Фелинга |
|------------|---------|----------|-----------------|
| 1          |         |          |                 |
| 2          |         |          |                 |

## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

### Актуальность темы

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

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

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

### Цель занятия

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

### Требования к исходному уровню знаний

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### *общей химии:*

— основные положения теории катализа;

#### *биоорганической химии:*

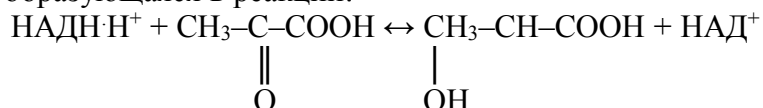
— примеры различных типов химических реакций;

— конформационные превращения белков.

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

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

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



К какому типу относится приведенная реакция?

А. Окислительно-восстановительная реакция

Б. Реакция гидролиза

Г. Реакция электролиза

В. Реакция синтеза

Д. Реакция изомеризации

*Задание 3.* Вещества А и В взаимодействуют по схеме  $\text{A} + \text{B} \leftrightarrow \text{AB}$ . При заданной концентрации А и В через 30 минут устанавливается подвижное равновесие, т. е. скорости пря-

мой и обратной реакции уравниваются. Какую из приведенных характеристик реакции изменит внесение катализатора?

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

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### Вопросы для обсуждения

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

2. Особенности строения 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. Множественные формы ферментов (изоферменты и собственно множественные формы), примеры, биологическая роль.

6. Медицинские аспекты энзимологии (энзимопатология, энзимодиагностика, энзимотерапия). Применение ферментов в анализе и синтезе лекарственных средств.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 68–86.

#### Дополнительная

2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 102–108, 115–125, 129–132.

3. *Ленинджер, А.* Основы биохимии / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985. С. 226–241.

### Задания для самостоятельной работы

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

а) в активный центр входят радикалы аминокислот различных участков полипептидного остова;

б) активный центр составляет относительно небольшую часть объема фермента;

в) активный центр располагается в углублении фермента.

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

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

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

А. Изменяется только конформация активного центра фермента

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

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

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

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

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

А. Необратимое

В. Обратимое неконкурентное

Б. Обратимое конкурентное

Г. Ингибирование по принципу «обратной связи»

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

А. Являются ферментами

Б. Участвуют в окислительно-восстановительных процессах

В. Являются аллостерическими ингибиторами

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

Д. Ингибируют всасывание фолиевой кислоты

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

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

А. Изменение степени ионизации молекул ферментов

Б. Необратимая денатурация

В. Разрыв пептидных связей

Г. Изменение концентрации ферментов

Д. Репрессия синтеза ферментов

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

А. Термолабильность

Б. Чувствительность к различным ингибиторам

В. Электрофоретическая подвижность

Г. Молекулярная масса

Д. Катализ одной и той же реакции

3.3. К какому классу относится фермент креатинкиназа?

А. Оксидоредуктазы

Б. Трансферазы

В. Лиазы

Г. Гидролазы

Д. Изомеразы

Е. Лигазы

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

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

метаболизма — формальдегида, образующегося в печени под действием алкогольдегидрогеназы:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **Эталонные ответы к решению заданий**

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

1 нет. 2А; 3Г.

*Для самостоятельной работы:*

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

#### **Самостоятельная работа (60 мин)**

##### **Инструкция к практическому занятию**

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 и в 1-ю из них добавляют 1 мл разведенной в 10 раз слюны. Содержимое этой пробирки перемешивают, несколько раз втягивая и выпуская жидкость из пипетки. Набирают в пипетку 1 мл смеси и переносят ее во 2-ю пробирку. Содержимое этой пробирки перемешивают и 1 мл смеси переносят в 3-ю пробирку и т. д. до 10-ой пробирки. Из 10-ой пробирки отбирают 1 мл смеси и выливают. Во все пробирки добавляют по 1 мл воды и 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 рабочую тетрадь в виде таблицы:

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

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

*Расчет.* Отметив пробирку, где гидролиз крахмала прошел полностью при наименьшем количестве фермента (желтая окраска раствора), по количеству неразведенной слюны в данной пробирке рассчитывают амилазную активность слюны по следующей пропорции:  $A$  мл слюны расщепили 2 мл 0,1%-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 А 38<sup>0</sup>/30/ равна 320.

Работа 2. Количественное определение активности амилазы (диастазы) мочи

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

Моча здоровых людей обладает низкой амилазной активностью по сравнению с амилазой слюны. Определение активности  $\alpha$ -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:

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

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

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ: «ХИМИЯ БЕЛКОВ. ФЕРМЕНТЫ»**

1. Классификация и физико-химические свойства аминокислот (общие и специфические). Роль в структурной организации белка.
2. Первичная структура белка и методы ее определения. Свойства пептидной связи. Значение биуретовой реакции для качественного и количественного определения белка в биологических жидкостях.
3. Вторичная, надвторичная, третичная, четвертичная структуры белковой молекулы. Особенности структурной организации, разновидности, типы стабилизирующих связей, методы изучения.
4. Основы функционирования белков и особенности функционирования олигомерных белков на примере гемоглобина.
5. Растворимость белков:
  - Почему белки растворяются в воде? Факторы устойчивости белков в растворе.
  - Высаливание и осаждение белков. Механизм и практическое использование.
  - Денатурация белка, денатурирующие факторы, использование в медицине.
6. Гидролиз белка. Типы гидролиза, роль в организме. Методы определения полноты гидролиза. Практическое использование.
7. Методы выделения и очистки белков:
  - этапы исследования структуры белка.
  - Методы очистки белка от низкомолекулярных примесей.
  - Принципы разделения и очистки белков методами хроматографии:
    - а) адсорбционной; г) аффинной;
    - б) распределительной; д) гель-хроматографией.
    - в) ионообменной;
  - Ультрацентрифугирование. Принцип метода.
  - Электрофорез. Принцип метода, практическое применение. Электрофорез в полиакриламидном геле. Изоэлектрофокусирование.

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

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

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

9. Какие функции выполняют в организме белки и пептиды?

10. Методы искусственного синтеза белков и пептидов (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 и принципы ее определения.

13. Активность фермента, единицы измерения активности.

14. Активный центр и его строение.

15. Коферменты, классификация.

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

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

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

19. Примеры использования ферментов и их регуляторов в медицинской практике. Применение ферментов в анализе и синтезе лекарственных препаратов.

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ВВЕДЕНИЕ В МЕТАБОЛИЗМ. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ. ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА (ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ПВК, ЛИМОННОКИСЛЫЙ ЦИКЛ)**

### **Актуальность темы**

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

### **Цель занятия**

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

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

**биологии:**

– понятия «обмен веществ», «ассимиляция», «диссимиляция» и связь между ними;

**общей химии:**

– понятие «окислительно-восстановительные реакции», способы окисления веществ, основы биоэнергетики, понятия «макроэргическая связь», «макроэрг»;

**биоорганической химии:**

– строение АМФ, АДФ, АТФ, пирогосфата, дикарбоновых, трикарбоновых кислот, α-кетокислот, гидроксикислот;

**нормальной физиологии:**

– понятие «основной обмен», энергетическая роль обмена веществ;

**цитологии:**

– структура митохондрий;

**биохимии:**

– класс оксидоредуктазы; дегидрогеназы; строение коферментов ФМН, ФАД, НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>; реакции декарбоксилирования.

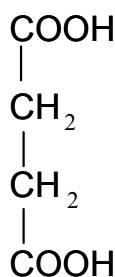
**Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

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

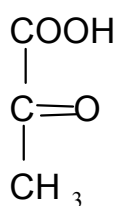
- А. Гидрохинон присоединил 2 электрона
- Б. Гидрохинон окислился
- В. Гидрохинон присоединил 2 атома водорода
- Г. Гидрохинон восстановился
- Д. Гидрохинон отдал 2 атома водорода

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

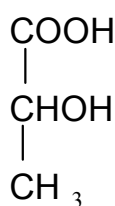
- А. Дикарбоновые кислоты
- В. Монокарбоновые кислоты
- Г. α-Кетокислоты
- Д. Гидроксикислоты
- Б. Трикарбоновые кислоты



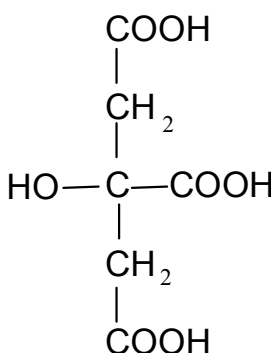
2.1



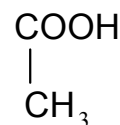
2.2



2.3

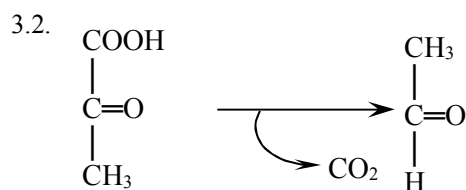
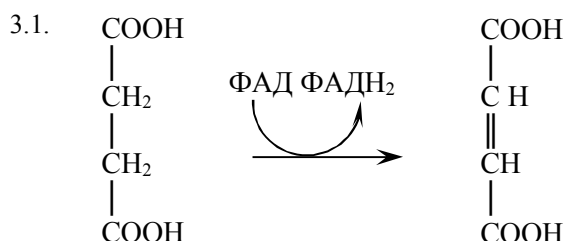


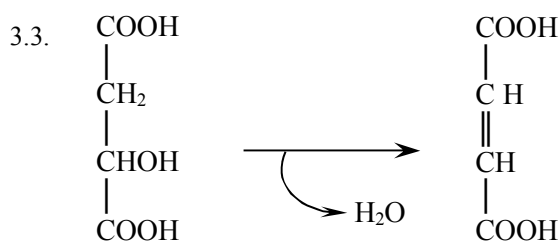
2.4



2.5

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





*Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.*

### 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 (ферменты, коферменты, схема).
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

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М.: Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 131–138, 177–182.

#### Дополнительная

2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М.: Медицина, 1990. С. 204–218, 259–267.
3. *Марри, Р.* Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М.: Мир, 1993.
4. *Страйер, Л.* Биохимия / Л. Страйер. М.: Мир, 1985. Т. 2. С. 6–21, 49–68.

### Задания для самостоятельной работы

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

1. ЦТК представляет собой конечный общий путь для окисления продуктов распада белков, жиров и углеводов.
2. ЦТК служит источником строительных блоков для процессов биосинтеза (гем, аминокислоты, глюкоза и т. д.).
3. Большинство топливных молекул вступают в цикл в виде ацетил-КоА.
4. В ходе реакций цикла дважды происходит декарбоксилирование с образованием конечного продукта — 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.
6. ЦТК функционирует только в аэробных условиях, поскольку регенерация восстановленных коферментов происходит только при переносе электронов на О<sub>2</sub>.
7. Перенос электронов на кислород сопряжен с одновременным образованием АТФ (окислительное фосфорилирование). Скорость цикла зависит, в первую очередь, от энергетического заряда клетки.

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

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

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

- |                           |              |             |
|---------------------------|--------------|-------------|
| А. Цитрат                 | Г. Малат     | Ж. Сукцинат |
| Б. $\alpha$ -Кетоглутарат | Д. Аконитат  |             |
| В. Фумарат                | Е. Изоцитрат |             |

*Задание 3.* Подберите ферменты к соответствующим реакциям:

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

- |                           |                           |
|---------------------------|---------------------------|
| А. Фумаратгидратаза       | Б. Цитратсинтаза          |
| В. Сукцинил-КоА-синтетаза | Г. Изоцитратдегидрогеназа |

*Задание 4.* К каждому ферменту подберите соответствующий кофермент:

- |   |                     |
|---|---------------------|
| 1. Сукцинатдегидрогеназа                                    | А. ФМН              |
| 2. $НАДН \cdot H^+$ -дегидрогеназа                          | Б. ФАД              |
| 3. Малатдегидрогеназа                                       | В. $НАД^+$          |
| 4. $\alpha$ -Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс ферментов | Г. ТПФ              |
|   | Д. КоА-SH           |
|   | Е. Липоевая кислота |

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

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

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

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

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

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

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

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

- |                     |                     |        |
|---------------------|---------------------|--------|
| А. $НАДФ \cdot H^+$ | В. $НАДН \cdot H^+$ | Д. АДФ |
| Б. $НАД^+$          | Г. АТФ              |        |

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

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

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

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

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

### Эталоны ответов к решению заданий

**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).

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

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

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

Схема постановки опыта:

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

Результат (окраска растворов):

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

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

Схема постановки опыта:

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

Результат (выделение углекислого газа):

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

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

Схема постановки опыта:

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

Результат (окраска растворов):

## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ. ИНГИБИТОРЫ И РАЗОБЩИТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И ТКАНЕВОГО ДЫХАНИЯ

### 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 пути утилизации кислорода в клетке в норме и патологии. Гипоэнергетические состояния, возникающие в результате недостаточного поступления субстратов окисления, нарушения работы дыхательной цепи, разобщения тканевого дыхания и фосфорилирования лежат в основе развития многих патологических состояний, для коррекции которых используются субстраты цикла Кребса — цитрат, сукцинат.

### **Цель занятия**

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

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **общей химии:**

– понятия «окисление» («окислитель»), «восстановление» («восстановитель»), «окислительно-восстановительные реакции», «редокс-потенциал», «макроэргическая связь», «макроэрги»;

#### **биоорганической химии:**

– строение АТФ, ее роль как универсального макроэрга; барбитуровая кислота и ее производные;

#### **цитологии:**

– строение митохондриальной мембраны;

#### **биологии:**

– фототрофы, хемотрофы, гетеротрофы, автотрофы;

– строение хлорофилла *a* и *b*;

#### **биохимии:**

– класс оксидоредуктазы, пиридин- и флавиновзависимые дегидрогеназы, строение и функционирование НАД<sup>+</sup>, ФМН, ФАД; водороддонорная функция цикла Кребса; субстраты ЦТК, поставляющие водород в дыхательную цепь.

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

*Задание 1.* Какие из приведенных утверждений не характеризуют АТФ?

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

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

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

*Задание 3.* Напишите формулу АТФ, обозначив макроэргические связи.

*Задание 4.* В цикле Кребса протекают четыре дегидрогеназные реакции:

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

4.1. Укажите соответствующий каждой реакции фермент

4.2. Укажите соответствующий каждой дегидрогеназе кофермент

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

*Задание 5.* Конечным продуктом световых реакций фотосинтеза являются:

- |                            |  |
|----------------------------|--|
| А. АТФ, вода, кислород     | В. НАДФН+Н <sup>+</sup> , АТФ, кислород  |
| Б. АТФ, углеводы, кислород | Г. НАДФН+Н <sup>+</sup> , вода, кислород |

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**



### Вопросы для обсуждения

1. Понятие о макроэргах. Адениловая система клетки, ее участие в энергетическом обмене. Центральная роль АТФ в процессах, связанных с затратой энергии.
2. Способы синтеза АТФ: субстратное, окислительное и фотосинтетическое фосфорилирование.
3. Тканевое дыхание — процесс окисления водорода субстратов в дыхательной цепи с образованием эндогенной воды в клетках. Отличия образования воды в процессе тканевого дыхания от такого же процесса *in vitro*.
4. Строение компонентов дыхательной цепи, комплексы ферментов, коферменты, механизм функционирования.
5. Схема дыхательной цепи, пункты фосфорилирования, механизм формирования электрохимического потенциала.
6. Механизмы митохондриального синтеза АТФ.  $H^+$ -АТФ-синтаза. Сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования. Хемисмотическая теория Митчелла. Коэффициент фосфорилирования (P/O).
7. Регуляция работы дыхательной цепи и  $H^+$ -АТФ-синтазы.
8. Причины развития гипознергетических состояний. Разобщение окислительного фосфорилирования (механизм, разобщители). Ингибиторы переноса электронов и окислительного фосфорилирования.
9. Фотосинтез: сущность процесса, общая схема переноса электронов. Фотосистемы I и II. Сходство и различия систем окислительного и фотосинтетического фосфорилирования.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М.: Бином; Минск: Асар, 2008. С. 134–154.
2. *Биологическая химия*: учебн. пособие для стом. и фарм. ф-та / А. Д. Таганович [и др.]. Минск: Беларусь, 2012.

#### Дополнительная

3. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М.: Медицина, 1990. С. 213–224.
4. *Ленинджер, А.* Основы биохимии / А. Ленинджер. М.: Мир, 1985. С. 683–700.
5. *Биохимия человека* / Р. Марри [и др.]. М.: Мир, 1993. Т. 1. С. 111–139.

### Задания для самостоятельной работы

Для усвоения темы необходимо уяснить, что:

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

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

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

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

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

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

- |   |                          |
|---|--------------------------|
| 1. НАДН·Н <sup>+</sup> : 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          | Д. Амитал (барбитуровая кислота) |
| Б. СО               | Е. Ротенон                       |
| В. H <sub>2</sub> S | Ж. Антимидин А                   |
| Г. Азид натрия      | З. Малонат                       |

**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 ретикула |

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

- |                |  |
|----------------|--|
| А. Ферредоксин | В. Ферредоксин - НАДФ <sup>+</sup> - редуктаза |
| Б. Р 700       | Г. Р 430                                       |

**Задание 8.** Расположите последовательно переносчиков электронов в цепи, по которой электроны движутся от возбужденного реакционного центра фотосистемы II (Р 680) к фотосистеме I.

- |                              |               |                 |
|------------------------------|---------------|-----------------|
| А. пластохинон               | В. цитохром f | Д. Р 680        |
| Б. цитохром b <sub>563</sub> | Г. Z          | 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 эталонами ответов.**

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

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

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

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

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

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

А. V ферментный комплекс на внутренней мембране митохондрий

Б. Ингибируется олигомицином

В. Имеет протонные каналы

Г. Может проявлять АТФ-азную активность

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

Е. Ингибируется атрактилозидом

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

А. АТФ

Б. АДФ

В. KCN

Г. Барбитуратов

Д. 2,4-Динитрофенола

*Задание 4.* Заполните таблицу сравнения окислительного и фотосинтетического фосфорилирования.

| Признак сравнения     | Фосфорилирование |                   |
|-----------------------|------------------|-------------------|
|                       | Окислительное    | Фотосинтетическое |
| Общее уравнение       |                  |                   |
| Локализация процесса  |                  |                   |
| Условия протекания    |                  |                   |
| Донор электронов      |                  |                   |
| Акцептор электронов   |                  |                   |
| Место образования АТФ |                  |                   |

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

А. Недостаток субстратов тканевого дыхания

Б. Недостаток кислорода

В. Избыток витаминов PP и B<sub>2</sub>

Г. Добавление к изолированным дышащим митохондриям олигомицина

Д. Низкая концентрация АДФ в матриксе митохондрии

Е. Разобщение с участием 2, 4-динитрофенола

*Задание 6.* В клинику поступила пациентка с отравлением снотворными препаратами — производными барбитуровой кислоты. Какие соединения нужно ввести больной для восстановления тканевого дыхания на период выведения снотворного препарата из организма?

А. Изоцитрат

В. Малат

Б. Ацил-КоА

Г. Сукцинат

*Задание 7.* Студенты в лабораторной работе *in vitro* исследовали действие малоната на ряд ферментов цикла Кребса. Накопление какого метаболита они обнаружили?

А. Малат  
Б. Изоцитрат

В. Сукцинат  
Г. Сукцинил-КоА

Д.  $\alpha$ -Кетоглутарат

**Задание 8.** Сколько моль АТФ может синтезироваться при окислении 1 моль субстрата в указанных процессах?

- |  |             |
|--|-------------|
| 1. Ацетил-КоА $\rightarrow$ $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ | А. 4 моль   |
| 2. Сукцинат $\rightarrow$ ЦУК                                  | Б. 10 моль  |
| 3. $\alpha$ -Кетоглутарат $\rightarrow$ ЦУК                    | В. 7,5 моль |
| 4. Изоцитрат $\rightarrow$ сукцинат                            | Г. 6 моль   |
| 5. Сукцинат $\rightarrow$ $\text{CO}_2, \text{H}_2\text{O}$    | Д. 24 моль  |

**Задание 9.** В экспериментах использовали инвертированные синтетические фосфолипидные пузырьки, содержавшие молекулы бактериородопсина из *Halobacterium halodium* и  $\text{H}^+$ -АТФ-синтазу из митохондрий бычьего сердца. При освещении эти пузырьки синтезировали АТФ из АДФ и  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Однако если их освещали в присутствии динитрофенола, то образования АТФ не происходило. Объясните эти результаты исходя из хемиосматической гипотезы.

### Эталоны ответов к решению заданий

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

**1В; 2Б, Г, Д, Е; 4.1** (А – изоцитрат ДГ; Б –  $\alpha$ -кетоглутарат ДГ; В – сукцинат ДГ; Г – малат ДГ); **4.2** (А –  $\text{НАД}^+$ ; Б –  $\text{НАД}^+$ , ФАД, ТПФ, КоА, липоевая кислота; В – ФАД; Г –  $\text{НАД}^+$ ); **4.3** (А, Б, Г – пиридиновые ДГ; В – флавиновая ДГ); **5В.**

**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, А, Г, В; 8Д, Г, А, Б, В, Е.**

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

##### Работа 1. *Изучение реакций окислительного фосфорилирования*

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

**Ход работы.** В четыре пробирки вносят реактивы согласно схеме:

| № п/п  | Содержимое пробирок                              | Контроль | Опыт   |        |        |
|--|--|----------|--------|--------|--------|
|  |  | 1 (мл)   | 2 (мл) | 3 (мл) | 4 (мл) |
| 1  | Инкубационная смесь                              | 1,0      | 1,0    | 1,0    | 1,0    |
| 2  | Физиологический раствор                          | 0,5      | —      | —      | —      |
| 3  | Раствор яблочной кислоты                         | —        | 0,5    | —      | —      |
| 4  | Раствор янтарной кислоты                         | —        | —      | 0,5    | —      |
| 5  | Раствор аскорбиновой кислоты + цитохром с        | —        | —      | —      | 0,5    |
| 6  | Суспензия митохондрий                            | 0,5      | 0,5    | 0,5    | 0,5    |
| Инкубация 10 минут при комнатной температуре, затем добавляют: |  |          |        |        |        |
| 7  | Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ)            | 1,0      | 1,0    | 1,0    | 1,0    |
| 8  | Раствор молибдата аммония                        | 0,5      | 0,5    | 0,5    | 0,5    |
| 9  | Редуцирующий раствор Фиске и Субарроу            | 0,5      | 0,5    | 0,5    | 0,5    |
| 10   | Содержимое всех пробирок разбавить водой в 8 раз |          |        |        |        |
| 11   | Инкубация 10 минут при комнатной температуре     |          |        |        |        |

Результаты (интенсивность окраски по четырехбальной шкале):

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

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

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

Результаты (интенсивность окраски):

## Работа 3. *Открытие альдегиддегидрогеназы в молоке*

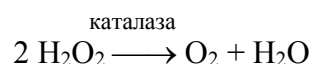
Фермент вырабатывается микроорганизмами, попадающими в молоко извне. По химической природе он относится к флавопротеинам, способным окислять альдегиды, в частности, формальдегид. При добавлении к некипяченому молоку формальдегида и метиленовой сини альдегиддегидрогеназа окисляет формальдегид в муравьиную 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. В организме млекопитающих пероксидазной активностью обладают гемоглобин, миоглобин и цитохромы. Об активности пероксидазы можно судить по изменению окраски гваяковой смолы в присутствии перекиси водорода.

*Ход работы.* В две пробирки наливают по 5 капель 1% раствора гваяковой смолы или 1% раствора бензидина в ледяной уксусной кислоте и по 5 капель 3% раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В 1-ю пробирку добавляют 1 каплю крови, во 2-ю — 1 каплю  $\text{H}_2\text{O}$ . Наблюдают за изменением окраски.

## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. УГЛЕВОДЫ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ. ОБМЕН ГЛИКОГЕНА

### Актуальность темы

Углеводы являются важнейшими химическими 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 является пища. Встречаются заболевания, сопровождающиеся нарушением переваривания и всасывания углеводов пищи. Диагностика этих состояний и правильный подход к лечению основываются на знаниях, полученных на этом занятии.

### Цель занятия

Закрепить знания о структуре углеводов животных тканей и углеводов пищи. Сформировать представление об особенностях переваривания углеводов, транспорта глюкозы в клетки, о молекулярных механизмах депонирования и мобилизации гликогена, физиологическом значении и регуляции этих процессов.

### Требования к исходному уровню знаний

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **биоорганической химии:**

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

#### **биохимии:**

- классификация ферментов, механизм действия, регуляция активности;

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

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

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

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

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

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### Вопросы для обсуждения

1. Углеводы. Функции углеводов. Классификация. Углеводы пищи. Суточная потребность. Роль клетчатки, пектинов и лактулозы в питании человека. Углеводы как лекарственные средства.
2. Переваривание углеводов. Нарушения переваривания и их молекулярные механизмы, симптомы, подходы к диагностике и лечению.
3. Всасывание продуктов переваривания углеводов, молекулярные механизмы, нарушения. Транспорт глюкозы в клетки различных органов и тканей.
4. Общая схема источников и путей расходования глюкозы в организме, их значение и взаимосвязь.

5. Синтез гликогена, назначение, последовательность реакций, энергозатраты. Механизмы регуляции. Агликогенозы.
6. Фосфоролиз и гидролиз гликогена в печени и мышцах, последовательность реакций, регуляция. Гликогенозы.
7. Спиртовое брожение.

#### Литература

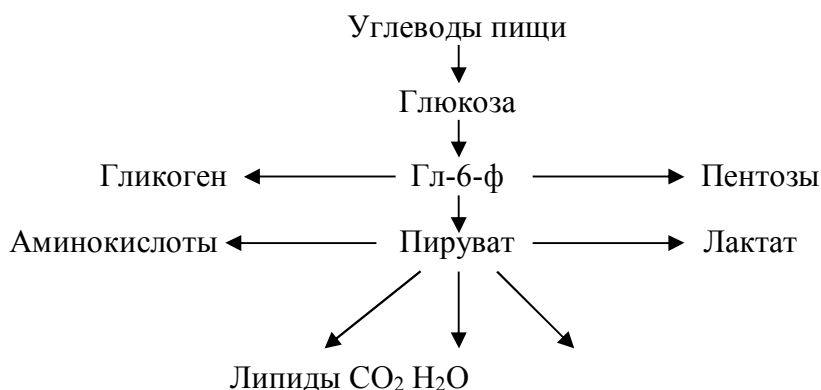
1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 155–167, 171–172.
2. *Березов, Г. Т.* Биологическая химия / Г. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М.: Медицина, 1990. С. 226–244, 251–252, 275.

#### Задания для самостоятельной работы

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

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

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



**Задание 3.** Запомнить:

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

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

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

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

**Задание 4.** Подберите к названию болезни (типу гликогеноза) молекулярную причину болезни:

- |                      |   |
|----------------------|---|
| 1. Болезнь Гирке     | А. Недостаточность фосфорилазы печени       |
| 2. Болезнь Мак-Ардла | Б. Дефицит глюкозо -6-фосфатазы             |
| 3. Болезнь Помпе     | В. Недостаточность фосфорилазы мышц         |
| 4. Болезнь Герса     | Г. Дефицит кислой $\alpha$ -1,4-глюкозидазы |

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

## Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

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

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

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

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

*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

### Эталоны ответов к решению заданий

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

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

*Для самостоятельной работы:*

4 (1 – Б; 2 – В; 3 – Г; 4 – А).

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

#### Работа 1. *Спиртовое брожение*

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



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

#### *Порядок выполнения работы*

1. Пробирку на  $\frac{1}{3}$  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, проделывают качественные реакции на  $CO_2$  и спирт.

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

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



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



## Работа 2. *Количественное определение пирувиноградной кислоты в моче*

Пирувиноградная кислота — один из промежуточных продуктов углеводного обмена. В анаэробных условиях (гипоксия) пирувиноградная кислота восстанавливается в лактат. В аэробных условиях пирувиноградная кислота 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 CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O.

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

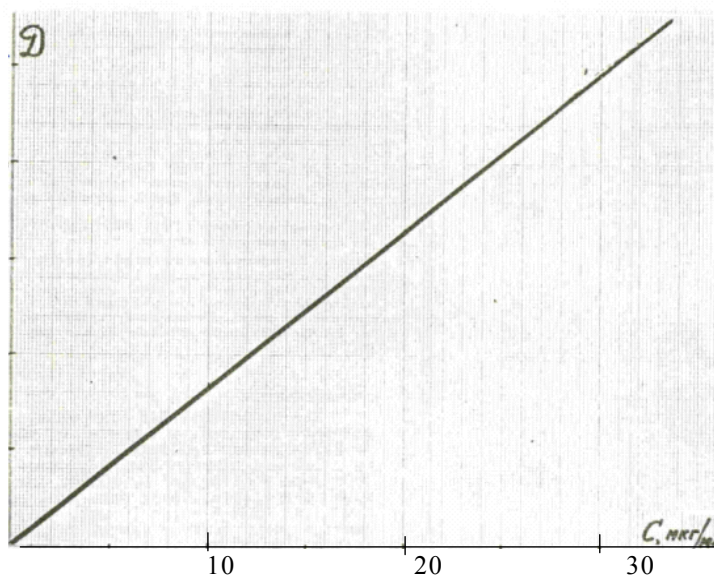
**Принцип метода.** Пирувиноградная кислота, взаимодействуя с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде, образует 2,4-динитрофенилгидразоны пирувиноградной кислоты желто-оранжевого цвета, интенсивность окрашивания которых пропорциональна концентрации пирувиноградной кислоты.

**Ход работы.**

Берут 2 пробирки:

в **контрольную** наливают 1 мл H<sub>2</sub>O, 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 готовому калибровочному графику. Найденную величину умножают на суточный диурез (1500 мл для мужчин и 1200 мл для женщин) и получают содержание пирувиноградной кислоты в суточной моче.



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

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

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. АНАЭРОБНЫЙ И АЭРОБНЫЙ ПУТИ РАСПАДА ГЛЮКОЗЫ. ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА ПИРУВАТА. ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ**

### **Актуальность темы**

Изучаются центральные пути, обеспечивающие связь анаболизма и катаболизма, пути, в которые вовлечены основные пищевые вещества (углеводы, белки, жиры). Понимание значения центральных метаболических путей, аэробных процессов обмена глюкозы для энергообеспечения клеток различных органов позволяет понять механизмы нарушения функций отдельных органов и систем при торможении этих процессов (гипогликемическая кома,

ишемия и инфаркт миокарда и др.). Знакомство с процессом гликолиза дает представление о возможностях энергетического обеспечения клеток в анаэробных условиях.

В медицинской практике некоторые промежуточные продукты этих путей используются для коррекции метаболических нарушений (лимонная кислота, никотинамид, кокарбоксилаза, компоненты адениловой системы и др.). Содержание глюкозы в крови — основной биохимический показатель состояния углеводного обмена в организме. На занятии изучаются механизмы поддержания нормального уровня глюкозы в крови.

### **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 глюкозооксидазным методом количественного определения глюкозы.

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **биоорганической химии:**

- реакции окислительного декарбоксилирования  $\alpha$ -кетокислот;
- реакции альдольной конденсации;
- природные макроэргические ацилирующие реагенты;

#### **биологической химии:**

- тканевое дыхание, субстраты, механизм;

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:

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

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

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

- |  |   |
|--|---|
| 1. 2-ФГК $\leftrightarrow$ 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 эталонами ответов.***

### Вопросы для обсуждения

1. Гликолиз, биологическая роль, субклеточная локализация, этапы (неокислительный, 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), цикл Кори. Утилизация лактата клетками.

4. Аэробное окисление глюкозы до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  (этапы, сопряжение с процессом окислительного фосфорилирования, энергетика). Челночные механизмы транспорта цитоплазматического НАДН $\cdot\text{H}^+$ .

5. Глюконеогенез (назначение, субстраты, ключевые реакции и ферменты, регуляция, энергозатраты).

### Литература

1. Биологическая химия / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 167–178.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин М. : Медицина, 1990. С. 244–250, 255–267.

### Задания для самостоятельной работы

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

4.1. Обратите внимание на то, что:

– в гликолизе можно выделить несколько этапов:

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

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

– большинство реакций гликолиза, за исключением трех, обратимы;

– все промежуточные продукты находятся в фосфорилированном состоянии;

– источником фосфата при гликолизе является АТФ;

– образование АТФ при гликолизе идет путем субстратного фосфорилирования.

*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:

а) напишите суммарное уравнение окислительного декарбоксилирования;

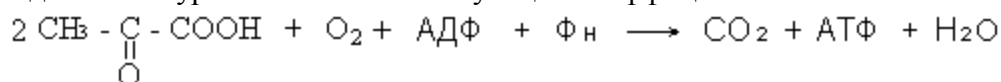
б) покажите путь от восстановленного кофермента до кислорода;

в) вспомните определение коэффициента фосфорилирования и рассчитайте его для этого процесса.

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

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

3.2. Подставьте в уравнение соответствующие коэффициенты:



Для этого:

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

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

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

г) расставьте коэффициенты в уравнении.

*Задание 4.* Выучите:

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

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

в) основные субстраты и пути их включения в глюконеогенез.

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

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

А. Фосфодиоксиацетон  $\leftrightarrow$  глицеральдегид-3-фосфат

Б. 3-Фосфоглицерат  $\leftrightarrow$  2-фосфоглицерат

В. Пируват  $\leftrightarrow$  лактат

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

Д. Глюкоза  $\rightarrow$  глюкозо-6-фосфат

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

А. Глюкоза  $\rightarrow$  глюкозо-6-фосфат

Б. Фруктозо-6-фосфат  $\rightarrow$  фруктозо-1,6-дифосфат

В. Фосфодиоксиацетон  $\leftrightarrow$  глицеральдегид-3-фосфат

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

Д. Фосфоенолпируват  $\rightarrow$  пируват

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

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

1. Пируват  $\rightarrow$   $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

А. 2,5 моль

2. Ацетил-КоА  $\rightarrow$   $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

Б. 4 моль

3. Пируват  $\rightarrow$  ацетил-КоА

В. 10 моль

4. Сукцинат  $\rightarrow$  ЩУК

Г. 12,5 моль

*Задание 2.* 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. Выбрать из перечисленных необратимую:

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

**Задание 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 НАДНН<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

### Эталоны ответов к решению заданий

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

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

**Для самостоятельной работы:**

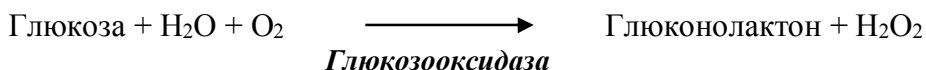
- 5** (15 АТФ); **6Г**; **7Д**.

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

**Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови ферментативным методом**

**Принцип метода.** Метод основан на следующих ферментативных реакциях:



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

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

|  | Опытная проба, мл | Стандартная проба, мл |
|--|-------------------|-----------------------|
| В центрифужные пробирки вносят:  |                   |                       |
| Сыворотка крови  | 0,1               | —                     |
| Стандартный раствор глюкозы  | —                 | 0,1                   |
| Депротеинизирующий раствор (3% ТХУ)  | 1,0               | 1,0                   |
| Перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут                                 |                   |                       |
| В сухие пробирки вносят:   |                   |                       |
| Надосадочная жидкость  | 0,2               | 0,2                   |
| Рабочий раствор ферментов  | 2,0               | 2,0                   |
| Перемешивают и инкубируют реакционную смесь 10 мин при 37°С или 30 мин при комнатной температуре |                   |                       |

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

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

Расчет производят по формуле:

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

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

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.

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ВТОРИЧНЫЕ ПУТИ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ. ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ НА УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ. ФОТОСИНТЕЗ (ТЕМНОВАЯ СТАДИЯ)**

### **Актуальность темы**

Пентозофосфатный путь (ПФП) и глюкуроновый путь обмена глюкозы не приводят к синтезу АТФ. Они выполняют следующие главные 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 восстановления CO<sub>2</sub> до углеводов.

Этанол входит в состав многих жидких лекарственных форм (настойки, капли, микстуры, аэрозоли), поэтому, знание метаболизма этанола в организме для провизоров необходимо, а также для понимания патогенеза алкоголизма и основных подходов к его терапии.

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

### **Цель занятия**

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

## Требования к исходному уровню знаний

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:  
**биоорганической химии:**

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

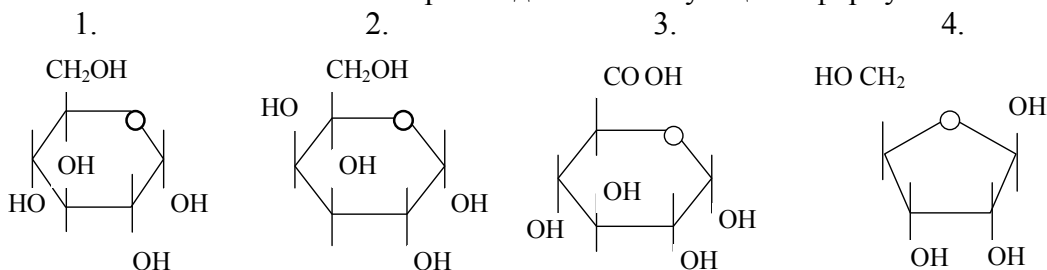
– реакции альдольной конденсации;

**нормальной физиологии:**

– нейрогормональные механизмы регуляции углеводного обмена.

Для проверки исходного уровня знаний выполните следующее задание:

Задание. Напишите названия сахаров под соответствующими формулами:



Правильность решения проверьте, сопоставив его с эталоном ответа.

## Вопросы для обсуждения

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

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

3. Фотосинтез, и его значение для жизни на Земле. Темновая стадия фотосинтеза (суммарное уравнение). Карбоксилирование рибулозо – 1,5 – бисфосфата, последовательность реакций до образования 3 – ФГА. Синтез углеводов в цикле Кальвина.

4. Метаболизм экзогенного этанола (пути, схема реакций, ферменты).

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

## Литература

### Основная

1. Биологическая химия / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 182–186, 189–192.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 268–275.
3. Биологическая химия : учеб. пособие для стом. и фарм. ф-та / А. Д. Таганович [и др.]. Минск : Беларусь, 2012.

### Дополнительная

4. Ленинджер, А. Основы биохимии / А. Ленинджер. М.: Мир, 1985. С. 683–700.
5. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М. : Мир, 1993. Т. 1. С. 199–224.

## Задания для самостоятельной работы

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

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

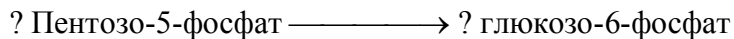
1.2. Запомните:

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 гулоновой кислоты для синтеза аскорбиновой кислоты у большинства животных.

Г. Это дополнительный путь синтеза пентоз.

Д. Выполняет энергетическую функцию.

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

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

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

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

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

Ответ подтвердите соответствующей реакцией.

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

*Задание 4.* Заполните таблицу, обобщающую сведения о влиянии гормонов на обмен углеводов, выбирая правильные варианты ответов из приведенных ниже.

#### Гормональная регуляция концентрации глюкозы в крови

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



Эти гормоны синтезируются:

- $\alpha$ -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.

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

4.2. Подберите соответствующие пары гормон — механизм действия:

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

*Задание 5.* Напишите суммарное уравнение фотосинтеза. Умейте объяснить роль фотосинтеза для жизни на Земле.

*Задание 6.* Выберите правильный ответ.

Субстратами для фотосинтетического образования углеводов являются:

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

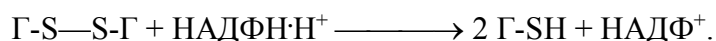
***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

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

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

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



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

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

**Задание 6.** Почечный порог для глюкозы составляет:

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

**Задание 7.** Помните, что суммарное уравнение цикла Кальвина имеет следующий вид:

6 рибулозо-1,5-бисфосфат + 6СО<sub>2</sub>+12 НАДФН+Н<sup>+</sup>+ 18 АТФ →

6 рибулозо-1,5-бисфосфат +12 НАДФ<sup>+</sup> + 18 АТФ + 18 Н<sub>3</sub> РО<sub>4</sub>+ гексоза

7.1. Расставьте недостающие коэффициенты в следующих реакциях цикла Кальвина:

А. ? ГАФ → ? ДОАФ

Б. ? ГАФ + ? ДОАФ → ? фруктозо-1,6-дифосфат → ? фруктозо-6-фосфат

В. ? ГАФ + ? фруктозо-6-фосфат → 2 ксилулоза-5-фосфат + 2 эритрозо-5-фосфат

Г. 2 ГАФ + 2 седогептулозо-7-фосфат → ? ксилулоза-5-фосфат + ? рибозо-5-фосфат

### Эталоны ответов к решению заданий

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

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

**Для самостоятельной работы:**

**2.1** (А, Б, В, Г); **3.1** а) увеличится; б) пируват снижается, лактат нарастает;

**3.2** Верно; **4.2** (1 — В; 2 — А; 3 — Б, В); **6В**.

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

##### **Изучение влияния гормонов на содержание глюкозы в крови**

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

1. Определите содержание глюкозы в каждой из проб.

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

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

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

Расчет концентрации глюкозы по формуле:

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Виды биологического окисления. Витамины РР и 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. Роль свободнорадикального окисления, ферментативная защита от свободных радикалов кислорода.

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

транспорта электронов и фосфорилирования. Можно ли использовать для окисления субстратов в митохондриях НАДФ<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. Что понимают под врожденной непереносимостью дисахаридов? Причины нарушения переваривания лактозы. Лактулоза и обоснование её использования в питании. Роль пищевых волокон (клетчатка, пектины) в питании человека. Механизмы всасывания углеводов в кишечнике. 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. Ключевые ферменты спиртового брожения. Какие соединения могут регулировать этот процесс?

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

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

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

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

18. Гликогенолиз, биологическая роль. Что такое фосфоролиз и гидролиз гликогена? Возможны ли реакции гидролиза гликогена в клетках? Схема фосфоролиза гликогена. Знать различия этого процесса в печени и мышцах. Есть ли в этих различиях биологический смысл, а если есть, то какой? Изобразить схему гликогенолиза под влиянием глюкагона, тканевая локализация. Механизмы активирования гликогенфосфорилазы адреналином (схема). Показать на схеме, что выгоднее в энергетическом отношении: сразу окислять глюкозу или вначале присо-

единить ее к гликогену или это не имеет значения (расчет провести для анаэробных условий). Что называют гликогенозами? Причины болезни Гирке, болезни Помпе.

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

20. Изобразить схематически образование УДФ-глюкозы. Какова биологическая роль процессов, использующих УДФ-глюкозу? Значение глюконового 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. Характеристика световой стадии. Нециклический и циклический перенос электронов в фотосистемах. Образование протонного градиента в тилакоидах. Конечные продукты световой стадии. Фотофосфорилирование, его отличие от окислительного.

23. Суммарное уравнение фотосинтеза. Значение фотосинтеза для жизни на Земле. Характеристика темновой стадии. Синтез углеводов в цикле Кальвина.

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ОБМЕН ЛИПИДОВ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ, ВСАСЫВАНИЕ И РЕСИНТЕЗ. ТРАНСПОРТ ЭКЗОГЕННЫХ ЛИПИДОВ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗ**

### **Актуальность темы**

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

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

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

### **Цель занятия**

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

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **общей химии:**

- свойства поверхностно-активных веществ, желчные кислоты, мицеллообразование;
- титриметрические методы анализа;

#### **биоорганической химии:**

- строение и свойства многоатомных спиртов (глицерол, инозитол), природных высших карбоновых кислот;
- строение простых липидов (восков и нейтральных жиров);

- особенности структуры и физико-химических свойств фосфолипидов;
- состав и свойства желчи, ее участие в процессах пищеварения. Механизмы регуляции желчеобразования и желчевыделения;
- состав и свойства пищеварительных соков; переваривание жиров и всасывание продуктов гидролиза жиров.

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

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

Подберите для каждой жирной кислоты соответствующее обозначение:

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

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

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

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

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

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

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

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

#### **Вопросы для обсуждения**

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

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

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

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

### Литература

#### Основная

1. Биологическая химия / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 193–210, 213–216.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 276–291, 305–309, 315–316.

#### Дополнительная

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

### Задания для самостоятельной работы

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

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

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

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

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. Смешанные мицеллы

В. Секреторные гранулы

Б. Липосомы

Г. Триацилглицеролы

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

А. Снижение секреции или активности панкреатической липазы (панкреатит).

Б. Нарушение эмульгирования жиров вследствие недостаточного поступления желчи в просвет кишечника (желчнокаменная болезнь).

В. Нарушение функции печени и уменьшение синтеза желчных кислот (гепатит).

Г. Дисбактериоз.

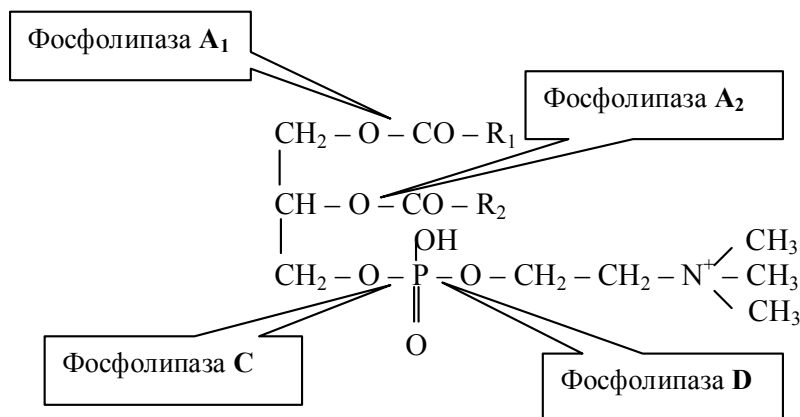
Д. Повышение уровня ТАГ в крови.

Е. Нарушение всасывания жирорастворимых витаминов («куриная слепота», кровото- чивость).

Ж. Нарушение всасывания незаменимых полиненасыщенных жирных кислот.

З. Ожирение.

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



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

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

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

А. Внутреннюю часть: 1. ... 2. ...

Б. Наружную часть: 1. ... 2. ... 3. ...

4.2. Выберите особенности, характеризующие транспорт экзогенных липидов:

А. Хиломикроны поступают непосредственно в кровоток

Б. Хиломикроны поступают в лимфу

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

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



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

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

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

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

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

*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. Пищевом |
| 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 $\alpha$ -амилаза |

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

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

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

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

**Эталонные ответы к решению заданий**

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

1 (1 – Ж; 2 – Е; 3 – Д; 4 – А; 5 – Б; 6 – Г; 7 – В); 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; 3.1 (А, Б, В, Е, Ж); 4. Верно. 4.1 А 1) ТАГ; 2) эфиры холестерина.

Б 1) фосфолипиды; 2) холестерол; 3) апобелки (апо-В48); 4.2 (Б, В, Г).

**Самостоятельная работа (60 мин)**

**Инструкция к практическому занятию**

**Работа 1. Кинетика действия панкреатической липазы**

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

*Ход работы.* В две пробирки наливают по 5 мл молока и по 1 мл 5% раствора панкреатина (сока поджелудочной железы). В одну пробирку приливают 1 мл воды, а в другую — 1 мл желчи. Жидкость в пробирках

быстро перемешивают. Из каждой пробирки отбирают по 1 мл смеси в колбы, добавляют 1–2 капли 0,5%-ного раствора фенолфталеина и титруют 0,05н раствором едкого натра до слабо-

розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд. Обе пробирки с оставшейся смесью помещают в термостат при 38 °С. Через каждые 10 минут из пробирок отбирают по 1 мл смеси и титруют 0,05н раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина до слаборозовой окраски. Проводят 5 таких определений и на основании полученных данных строят две кривые, отражающие процесс гидролиза жира под действием фермента липазы во времени и в зависимости от наличия или отсутствия желчи.

#### **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.

### **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ОБМЕН ХОЛЕСТЕРОЛА. ТРАНСПОРТ ЛИПИДОВ КРОВЬЮ. ДЕПОНИРОВАНИЕ И МОБИЛИЗАЦИЯ ЛИПИДОВ. 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. Холестерол экскретируется с желчью либо в неизменном виде, либо в виде продуктов его метаболизма — желчных кислот. С нарушением обмена липидов и холестерина связаны такие заболевания, как ожирение, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, желчнокаменная болезнь. Потому понимание вопросов синтеза, распада, транспорта и регуляции обмена липидов и холестерина необходимо при изучении этих заболеваний.

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

#### **Цель занятия**

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

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

##### ***биоорганической химии:***

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

##### ***биологической химии:***

— гликолиз и пентозофосфатный путь окисления глюкозы, окислительное фосфорилирование.

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

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

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

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### **Вопросы для обсуждения**

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

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

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

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

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

### **Литература**

#### **Основная**

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М.: Бином; Минск: Асар, 2008. С. 210–231, 254–258.
2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М.: Медицина, 1990. С. 292–293, 305–317, 443–445.

#### **Дополнительная**

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

### **Задания для самостоятельной работы**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.1. Какой фермент осуществляет внутриклеточный липолиз?

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

4.2. Каким гормоном активируется этот фермент?

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

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Задание 9.** Сравните биосинтез триацилглицеролов в печени и жировой ткани:

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

### Эталоны ответов к решению заданий

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

1Г.

*Для самостоятельной работы:*

1.1 (Б, В); 2.1 Да; 3.1 Г; 4.1 Б; 4.2 Б.

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

**Определение содержания  $\beta$ -липопротеинов (липопротеинов низкой плотности) в плазме крови.**

Большинство липидов находятся в крови не в свободном состоянии, а в составе белково-липидных комплексов (липопротеинов). Фракции липопротеинов отличаются по относительной молекулярной массе, количеству белка, процентному содержанию отдельных липидных компонентов. Липопротеины можно разделить различными методами: электрофореза, тонкослойной хроматографии, ультрацентрифугирования в солевых растворах различной плотности. При электрофоретическом разделении липопротеинов плазмы крови (на хроматографической бумаге, ацетатцеллюлозе, агаре, в полиакриламидном геле) получают фракции хиломикрон и липопротеинов различной плотности:  $\alpha$ -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.** Спектрофотометрический метод. В основу метода положена способность  $\beta$ -липопротеинов (ЛПНП) осаждаться в присутствии хлорида кальция и гепарина; при этом изменяется мутность раствора. По степени помутнения раствора и 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 составляет 3–4,5 г/л. Содержание  $\beta$ -липопротеинов колеблется в зависимости от возраста и пола.

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН ЖИРНЫХ КИСЛОТ. КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

### **Актуальность темы**

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

Один из важных показателей липидного обмена – содержание кетонových тел. Кетонových тела содержатся в крови здорового человека в небольших количествах. Однако, при сахарном диабете, голодании концентрация кетонových 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 кетонových тел.

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **биоорганической химии:**

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

#### **биологической химии:**

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

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

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

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

**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.** В моче больного с выраженной кислой реакцией определили содержание  $\beta$ -гидроксibuтирата. Из какого предшественника он может образоваться?

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

**Правильность решения проверьте, сопоставив его с эталоном ответа**

### 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. Синтез ненасыщенных жирных кислот: субстраты, ферментные системы. Высоконе-предельные жирные кислоты как незаменимые факторы питания: представители, биологическая роль.

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

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

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

### Литература

#### Основная

1. Биологическая химия / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 234–249, 258–260.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 199–202, 293–305.

#### Дополнительная

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

### Задания для самостоятельной работы

**Задание 1.** Научитесь рассчитывать энергетический выход  $\beta$ -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<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 CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O.

В. Напишите реакции катаболизма глицерола (глицерол → фосфоглицерол → диоксиацетонфосфат → глицеральдегидфосфат) до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O.

Г. Рассчитайте количество АТФ, образующееся при окислении одной молекулы глицерола до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>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<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.* Изучить пути образования кетоновых тел в печени и их метаболизм. Обратить внимание на то, что ацетоацетат и  $\beta$ -гидроксибутират образуются в норме в небольших количествах, а ацетон — лишь при значительном накоплении кетоновых тел (голодание, сахарный диабет).

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

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

4.2. Оценить энергетический эффект (в моль АТФ) окисления 1 моль ацетоацетата до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Расчет записать:

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

*Задание 1.1.* 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

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

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

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

*Задание 2.1.* Изучив метаболизм жирных кислот, заполните таблицу (в рабочей тетради):

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

### **Эталонные ответы к решению заданий**

***Для самопроверки исходного уровня знаний:***

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

*Для самостоятельной работы:*

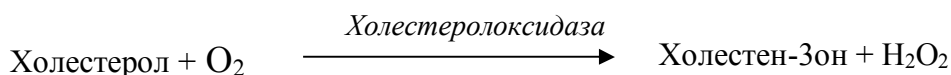
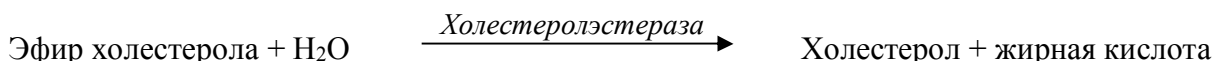
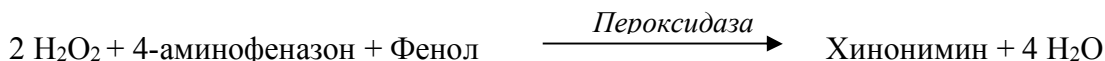
1.1. 336,5; 1.2. А; 2.3. 34 молекулы глюкозы; 2.4. (1 – Б, Г, Д; 2 – А, В); 2.5. (А, Г); 3.1.(1 – Б; 2 – А; 3 – В); 4.1. Б, Г; 4.2. 20 АТФ.

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

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

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



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

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

|  | Опытная проба, мл | Стандартная проба, мл |
|--|-------------------|-----------------------|
| В пробирки вносят:   |                   |                       |
| Сыворотка крови  | 0,02              | —                     |
| Стандартный раствор холестерина  | —                 | 0,02                  |
| Рабочий раствор ферментов  | 2,0               | 2,0                   |
| Перемешивают и инкубируют реакцию смесь 5 мин при 37°C или<br>10 мин при комнатной температуре |                   |                       |

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

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

**Расчет.** С холест. (ммоль/л) = 5,17 × (Е пробы / Е станд.)

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

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

#### Работа 2. **Качественные реакции на ацетон и ацетоуксусную кислоту**

*Порядок выполнения работы*

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

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

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

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

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

1. Какие вещества относятся к липидам, простым липидам, неомыляемым и омыляемым липидам? Структура, физико-химические свойства и функции природных восков, ацилглицеролов, глицеро- и сфингофосфолипидов, гликолипидов, сульфоллипидов. Уметь писать химические формулы ацилглицеролов, фосфатидной кислоты, фосфатидилинозита, лизолецитина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилхолина, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот, блок-схемы строения церамида, цереброзидов и ганглиозидов ( $GM_1$ ), сфингомиелина.

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

3. Уметь писать реакции  $\beta$ -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. Ферментные системы, ответственные за образование ненасыщенных жирных кислот в клетке. Ненасыщенные жирные кислоты, относящиеся к группе незаменимых факторов питания. Схема синтеза арахидоновой кислоты и пути её использования.

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

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

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

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

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

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

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

13. 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?

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

15. Синтез холестерина в клетках (схема). Регуляция этого процесса, направленная на защиту клетки от перегрузки холестерином. Составляющие механизма поддержания баланса холестерина в клетках, роль апо А<sub>1</sub>, апо D, апо В-100, ЛХАТ, клеточных рецепторов, остатков хиломикронов, ЛППП и ЛПВП.

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

17. Возможные механизмы атерогенного действия липопротеина (а).

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

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

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

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

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

23. 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.

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

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

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

27. Получение липосом и их использование для доставки лекарственных препаратов к органам и тканям.

## ТЕМА ЗАНЯТИЙ. КОНТРОЛЬ ПРАКТИЧЕСКИХ НАВЫКОВ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

### Актуальность темы

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

### Цель занятия

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

### Требования к исходному уровню знаний

Для качественного выполнения заданий необходимо вспомнить из:

#### *общей химии:*

– принципы проведения качественных реакций;

#### *биоорганической химии:*

– методы проведения цветных реакций на белки и аминокислоты.

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

### Инструкция к контрольному занятию и 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.

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.

| 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 едкого натра, 2 капли 1%-ного р-ра сульфата меди. Содержимое пробирки перемешивают | Биуретовую реакцию дают вещества, содержащие <i>не менее двух пептидных связей</i>                              |                       |       |
| 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 аминодикетонгидринден | 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 $\text{HNO}_3$ конц. образуют нитросоединения, окрашенные в желтый цвет   | К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли $\text{HNO}_3$ 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 — $\text{PbS}$  | 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:

## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. 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. Распад белков (протеолиз) существует двух типов — 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, система свертывания крови, система 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. При декарбоксилировании аминокислот образуются биогенные амины — триптамин, серотонин, гистамин, ГАМК, играющие важную роль в организме.

### Цель занятия

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

### Требования к исходному уровню знаний

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **биоорганической химии:**

- ферментативный гидролиз пептидной связи;

#### **биохимии:**

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

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

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

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

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

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

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

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

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### Вопросы для обсуждения

1. Что такое азотистый баланс? Какие виды азотистого баланса имеют место в норме и при патологии?
2. Потребность в белках. Биологическая ценность белков.
3. Что такое протеолиз? Роль ограниченного протеолиза в организме.
4. Где происходит переваривание белков? Какие ферменты участвуют в этом процессе? Общая характеристика протеаз. Их субстратная специфичность и место действия.
5. Роль желудочного сока в переваривании белков. Механизмы образования соляной кислоты в желудке.
6. Всасывание аминокислот, транспорт аминокислот в клетки.
7. Аминокислотный фонд клетки — его источники и использование.
8. Декарбоксилирование аминокислот, ферменты, кофермент. Биогенные амины (триптамин, серотонин, гистамин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота), катехоламины (дофамин, норадреналин, адреналин). Реакции образования, биологическая роль. Окисление биогенных аминов (МАО и ДАО). Лекарственные средства – ингибиторы аминоксидаз.
9. Процессы гниения белков в кишечнике. Обезвреживание продуктов гниения.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М.: Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 261–277, 296–301.
2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 318–337, 345–350.

#### Дополнительная

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

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.1.* Запомнить основные этапы переваривания белков:

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

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

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

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

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



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

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

В. Образование продуктов, лишенных антигенной специфичности.

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

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

А. Сближение аминокислот, входящих в активный центр

Б. Изменение вторичной структуры фермента

В. Образование новых связей в молекуле фермента

Г. Изменение первичной структуры

Д. Изменение третичной структуры

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

А. Наличие слизи, содержащей гетерополисахариды

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

В. Наличие гликопротеинов на наружной поверхности мембран

Г. Отсутствие субстратов

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

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

А. Какие ферменты могут активироваться при острых панкреатитах?

Б. Какие последствия может вызвать такая активация?

В. Как можно уменьшить разрушительное действие панкреатических протеаз?

Г. Биохимическим тестом на острый панкреатит в клинической практике служит определение активности  $\alpha$ -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

Г. Четвертичной структуры

Б. Вторичной структуры

Д. Более высокого уровня

В. Третичной структуры

*Задание 3.* Мужчина направлен в больницу с диагнозом острый панкреатит, при котором вследствие внутриклеточной активации панкреатических ферментов происходит разрушение тканей. Пациенту был назначен препарат контрикал — конкурентный ингибитор панкреатических ферментов. Выберите характерные особенности ингибирования:

А. Ингибитор является структурным аналогом субстрата

Б. Степень ингибирования зависит от концентрации ингибитора

В. Структура ингибитора не похожа на структуру субстрата

Г. Степень ингибирования зависит от времени действия ингибитора

Д. Образование неактивного комплекса ингибитор-субстрат

**Задание 4.** При декарбоксилировании каких аминокислот или их производных образуются следующие биогенные амины?

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

#### **Эталоны ответов к решению заданий**

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

1Г; 2А; 3Г.

**Для самостоятельной работы:**

1.5 (А, Б, В, Г); 2Г; 3А, Б, В.

### **Самостоятельная работа (60 минут)**

#### **Инструкция к практическому занятию**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**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 кис-

лоты (ахлоргидрия). При злокачественном малокровии, при раке желудка часто наблюдается полное отсутствие соляной кислоты и пепсина (ахилия).

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

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

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

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

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

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

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

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

*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.

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ПРЕВРАЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ ПО АМИНОГРУППЕ. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА КРОВИ И МОЧЕВИНЫ В МОЧЕ**

### **Актуальность темы**

Общие пути превращения аминокислот по аминокруппе 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, коматозному состоянию и смерти больного. Знание процессов обезвреживания аммиака необходимо для понимания механизма возникновения гипераммониемии, способов борьбы с ней, а также для своевременной диагностики и лечения врожденных нарушений орнитинового цикла реакций синтеза мочевины. В клини-

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

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

Для полного усвоения темы необходимо повторить из:

#### **общей химии:**

- аммиак и соли аммония как соединения азота;

#### **биоорганической химии:**

– мочевина — конечный продукт азотистого обмена в организме человека; структура и свойства мочевины;

#### **биохимии:**

- строение аминокислот;
- ферменты классов трансфераз и оксидоредуктаз; структура коферментов оксидоредуктаз (НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, ФМН, ФАД).

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

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

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

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

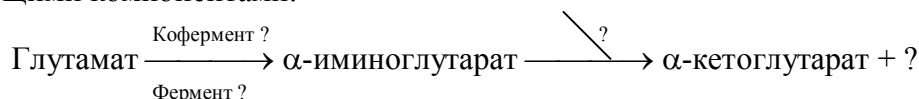
**Задание 3.** Аммиак в клетке образуется в результате:

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

**Задание 4.** Назовите ферменты, катализирующие в организме человека реакции окислительного дезаминирования аминокислот:

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

**Задание 5.** Дополните схему реакции окислительного дезаминирования глутамата недостающими компонентами:



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

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### Вопросы для обсуждения

1. Трансаминирование, аминотрансферазы, коферментная функция витамина В<sub>6</sub>. Клинико-диагностическое значение определения активности аминотрансфераз сыворотки крови.
2. Пути дезаминирования аминокислот. Окислительное дезаминирование (ферменты, коферменты). Окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты (химизм), значение глутаматдегидрогеназной реакции. Непрямое дезаминирование.
3. Пути использования безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты. Способы синтеза новых аминокислот.
4. Пути связывания аммиака в клетках (восстановительное аминирование α-кетоглутарата, синтез глутамина и аспарагина, образование карбамоилфосфата). Транспортные формы аммиака.
5. Орнитинный цикл мочевинообразования (схема цикла, субстраты, ферменты, энергетическое обеспечение, связь с лимоннокислым циклом, регуляция). Гипераммониемия, причины.
6. Образование солей аммония в почках (источник аммиака, роль глутаминазы и глутаматдегидрогеназы, значение активирования глутаминазы почек при ацидозе).
7. Остаточный азот крови (основные компоненты и их относительное содержание). Принцип определения и клинико-диагностическое значение.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М.: Бином; Минск: Асар, 2008. С. 277–288, 293–296.
2. *Березов, Г. Т.* Биологическая химия / Г. Т. Березов, Ф. М. Коровкин Б.: Медицина, 1990. С. 337–345, 350–354, 364–369.
3. *Николаев, А. Я.* Биологическая химия / А. Я. Николаев. М.: Высшая школа, 1989. С. 308–315.

#### Дополнительная

4. *Ленинджер, А.* Основы биохимии / А. Ленинджер. М.: Мир, 1985. С. 571–576, 578–597.
5. *Марри, Р.* Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М.: Мир, 1993. С. 306–309.
6. *Мак-Мюррей, У.* Обмен веществ у человека / У. Мак-Мюррей. М.: Мир, 1980. С. 280–300.

### Задания для самостоятельной работы

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

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

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

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

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

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

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

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

*Задание 5.* Подобрать соответствующие пары вопрос — ответ:

- |   |  |
|---|--|
| А. Фермент орнитинкарбамоил-<br>трансфераза (ОКТ) | 1. Участвует в синтезе аргининоянтарной<br>кислоты |
| Б. Фермент аргиназа                               | 2. Участвует в синтезе цитруллина                  |
| В. Фермент аргининосукцинатсинтетаза              | 3. Участвует в распаде аргининоянтарной<br>кислоты |
| Г. Фермент аргининосукцинатлиаза                  | 4. Участвует в реакции гидролиза арги-<br>нина     |

*Задание 6.* Назовите ферменты, катализирующие следующие реакции:

1. Образование амида глутаминовой кислоты
2. Восстановительное аминирование α-кетоглутарата
3. Гидролиз амида глутаминовой кислоты
4. Образование амида аспарагиновой кислоты
5. Образование карбамоилфосфата

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

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

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

*Задание 2.* В клинику поступил больной с повторными рвотами, судорожными припадками, с потерей сознания, вызванным отравлением аммиаком. Почему при высокой концентрации NH<sub>3</sub> в крови наступает потеря сознания и смерть?

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

*Задание 3.* Оцените функциональное состояние печени и почек у больных С. и А. с учетом биохимических показателей крови и мочи.

1. У больного С. содержание мочевины в крови 1,8 ммоль/л. С мочой выводится 12 г мочевины в сутки. Потребление белка с пищей — достаточное.
2. Больной А. потребляет в сутки 105 г полноценного белка. Содержание мочевины в крови 14 ммоль/л, с мочой выводится 8,5 г мочевины в сутки.

### **Эталонные ответы к решению заданий**

***Для самопроверки исходного уровня знаний:***

**1В; 3А, В, Д; 4А, Б, Д.**



**Для самостоятельной работы:**

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

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

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

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

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

*Принцип метода.* Метод основан на способности мочевины, содержащей аминогруппы, образовывать с *n*-диметиламинобензальдегидом в кислой среде комплексное соединение, окрашенное в желтый цвет. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации мочевины в исследуемой моче и определяется фотометрически.

*Порядок выполнения работы.* Пипетки и пробирки должны быть обязательно сухими.

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

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

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

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

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

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

##### Работа 2. *Количественное определение остаточного азота*

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

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

*Принцип метода.* Остаточный азот крови определяют в безбелковом фильтрате после осаждения белков крови различными осадителями (трихлоруксусной кислотой или вольфраматом) с последующей минерализацией безбелкового фильтрата концентрированной серной кислотой. Азот всех исследуемых фракций в виде аммиака связывается с серной кислотой, образуя сульфат аммония, который взаимодействует с реактивом Несслера (щелочной раствор

комплексной соли ртути  $K_2(HgI_4)$ ) с образованием соединения желто-оранжевого цвета. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации аммиака, а следовательно, и азота.

*Порядок выполнения работы.* Готовят три обычные пробирки. В одну из них наливают 1 мл готового минерализата и 9 мл воды (опытная проба), в другую вносят 1 мл стандартного раствора сульфата аммония и 9 мл воды (стандартная проба), а в 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:

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

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

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

*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.

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ХИМИЯ И ОБМЕН НУКЛЕОПРОТЕИНОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ И ОБЩЕГО АЗОТА В МОЧЕ**

### **Актуальность темы**

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

Знание механизмов распада и синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, регуляции этих процессов позволило разработать и применить лекарственные препараты, влияющие на процессы деления клеток (например, антифолатов в химиотерапии опухолей), и



способствует пониманию механизмов действия препаратов, используемых в коррекции гипонергетических состояний органов (ИМФ (рибоксин), оротат калия и др).

### **Цель занятия**

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

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **общей химии:**

– титрометрические методы анализа;

#### **биологии:**

– строение генетического аппарата клетки;

#### **биоорганической химии:**

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

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

*Задание 1.* Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

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

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

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

*Задание 3.* Подобрать соответствующие пары вопрос – ответ:

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

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

### **Вопросы для обсуждения**

1. Мононуклеотиды, строение, номенклатура, биологическая роль.
2. Первичная, вторичная и третичная структуры нуклеиновых кислот (особенности структуры, разновидности, типы стабилизирующих связей).

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

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

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

6. Распад пиримидиновых нуклеотидов.

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

8. Синтез дезоксирибонуклеозидфосфатов, нуклеозиддифосфатов и нуклеозидтрифосфатов.

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

#### Литература

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 307 – 338.
2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 71–73, 77–91, 369–376, 390–394

#### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Выберите положения, правильно характеризующие свойства ксантиноксидазы:

- А. Ее коферментом является производное витамина РР.
- Б. Одним из продуктов реакции является перекись водорода.
- В. Фермент катализирует две последовательные необратимые реакции образования мочевой кислоты.
- Г. Субстрат фермента — гипоксантин — имеет меньшую растворимость, чем мочевая кислота.
- Д. Фермент обладает абсолютной специфичностью к субстрату.

*Задание 2.* При обследовании больного ревматизмом после интенсивной терапии кортикостероидами установлена гиперурикемия. В результате активации какого метаболического процесса развиваются данные нарушения?

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

*Задание 3.* Дополнить недостающими компонентами реакции синтеза пуриновых рибонуклеотидов:

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

*Задание 4.* Дополнить недостающими компонентами реакции синтеза пиримидиновых нуклеотидов:

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

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

**Задание 1.** При терапии некоторых форм рака применяются ингибиторы дигидрофолатредуктазы. Торможение каких реакций определяет цитостатическое действие препарата?

- А. Синтез пиримидиновых нуклеотидов
- Б. Синтез пуринового ядра нуклеотидов
- В. Синтез дезоксицитидиловых нуклеотидов
- Г. Синтез цитидиловых нуклеотидов
- Д. Синтез дУМФ

**Задание 2.** У ребенка с синдромом Леша-Нихана — корковый паралич и гиперурикемия. Количество экскретируемых пуринов увеличено. Дефект какого фермента вызывает данную патологию?

- |   |                             |
|---|-----------------------------|
| А. Ксантиноксидазы                            | Г. Карбамоилфосфатсинтетазы |
| Б. Аденозиндезаминазы                         | Д. Тимидилатсинтазы         |
| В. Гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы |                             |

**Задание 3.** 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              |                             |

### Эталоны ответов к решению заданий

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

**1** А – 5, Б – 2, В – 4, Г – 3, Д – 1, Е – 6.

- 2**
1. Дезоксиаденозиндифосфат.
  2. Цитидинмонофосфат.
  3. Дезоксигуанозинтрифосфат.
  4. Уридиндифосфат.

**3** А – 3, Б – 1, В – 2, Г – 4, 5

**Для самостоятельной работы:**

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

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

Работа 1. **Определение содержания общего азота мочи колориметрическим методом**

Исследование общего азота мочи может быть использовано для исследования состояния азотистого баланса. Количество общего азота, выделяемого за сутки с мочой, у взрослого человека составляет 6–17 г (428–1214 ммоль/сут).

**Принцип метода.** После сжигания (минерализации) органических веществ мочи с концентрированной серной кислотой азот всех исследуемых фракций в виде аммиака связывается с серной кислотой, образуя сульфат аммония. Колориметрическое определение общего азота основано на том, что сульфат аммония образует с реактивом Несслера соединение жел-

то-оранжевого цвета, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации аммиака, а следовательно, и азота в моче.

*Порядок выполнения работы.* Готовят три обычные сухие пробирки. В две из них отмеривают соответственно 0,5 мл минерализата (опыт) и 0,5 мл стандартного раствора сульфата аммония (стандарт, содержащий 0,2 мг азота в 1 мл). Прибавляют в каждую пробирку по 6,5 мл воды и тщательно перемешивают. В 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:

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

где  $C_{он}$  — концентрация азота мочи в исследуемой пробе, мг/мл;  $C_{ст}$  — концентрация  $(NH_4)_2SO_4$  в стандартной пробе (0,2 мг в 1 мл);  $E_{оп}$  — оптическая плотность опытной пробы;  $E_{ст}$  — оптическая плотность стандарта сульфата аммония.

Содержание общего азота в моче (г/сут) рассчитывают по формуле:

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

где  $C_{он}$  — концентрация азота, найденная по стандартному раствору; 100 — разведение мочи при приготовлении минерализата; 0,5 — количество минерализата, взятого для анализа; 1000 — коэффициент перевода миллиграммов в граммы.

Суточное выделение мочи составляет в среднем 1500 мл для мужчин и 1200 мл для женщин. Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) = 71,39.

*Клинико-диагностическое значение.* Определение общего азота мочи позволяет судить о белковом обмене в организме, о количестве распавшегося белка. Для этого полученную величину общего азота умножают на 6,25, исходя из того, что в белке в среднем содержится 16% азота ( $100 : 16 = 6,25$ ).

При заболевании почек, вследствие нарушения их выделительной функции содержание общего азота в моче уменьшается. Задержка азота в организме наблюдается при заболеваниях печени и сердечно-сосудистой системы в связи с возникновением отеков, при наличии экссудатов и трансудатов.

Увеличение содержания общего азота в моче отмечается при усиленном распаде белков (отрицательный азотистый баланс), диабете, при рассасывании экссудатов и трансудатов, хроническом отравлении фосфором.

## Работа 2. *Определение содержания мочевой кислоты в моче*

Мочевая кислота у человека является конечным продуктом обмена пуриновых оснований, входящих в состав сложных белков — нуклеопротеинов.

**В норме** у человека с мочой выделяется **мочевой кислоты 1,6–3,54 ммоль/сут (270–600 мг/сут).**

*Принцип метода.* Метод основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорно-вольфрамовый реактив в фосфорно-вольфрамовую синь, интенсивность окраски которой пропорциональна содержанию мочевой кислоты. Количество фосфорно-вольфрамовой сини определяется путем титрования красной кровяной солью  $K_2[Fe(CN)_6]$ . Последняя окисляет фосфорно-вольфрамовую синь, и синее окрашивание исчезает.

*Порядок выполнения работы.* К 1,5 мл мочи прибавляют 1 мл 20% раствора карбоната натрия и 1 мл фосфорно-вольфрамового реактива Фолина, перемешивают и титруют 0,01н раствором  $K_3[Fe(CN)_6]$  до исчезновения синего окрашивания.

*Расчет.* Содержание мочевой кислоты (в мг) в суточной моче вычисляют по формуле:

$$\text{Мочевая кислота, мг/сут} = 0,8 \cdot a \cdot v / 1,5,$$

где 0,8 мг мочевой кислоты соответствует 1 мл  $K_3[Fe(CN)_6]$ ;  $a$  — количество  $K_3[Fe(CN)_6]$ , пошедшее на титрование, мл;  $v$  — суточный диурез, мл; 1,5 — объем пробы, мл.

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) равен 0,0059.

*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.

## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ (СИНТЕЗ ДНК, РНК, БЕЛКОВ). МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

### Актуальность темы

Знание строения нуклеиновых кислот позволяет понять механизмы передачи и реализации генетической информации в клетке, овладеть основами понимания причин наследственных заболеваний и разработать методы их лечения. Нуклеотиды выполняют ряд специфических функций. Некоторые из них используются в качестве лекарственных препаратов.

### Цель занятия

Усвоить молекулярные механизмы репликации, репарации, транскрипции, трансляции и механизмы их регуляции. Систематизировать эти знания и обсудить возможные механизмы нарушений реализации генетической информации для понимания последствий и подходов к лечению этих нарушений. Освоить методы анализа продуктов гидролиза нуклеопротеинов.

### Требования к исходному уровню знаний

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **курса биологии:**

- строение клетки;
- механизмы митоза и мейоза;

#### **биоорганической химии:**

- строение моноклеотидов;
- общие принципы пространственной организации нуклеиновых кислот;
- биологическая роль нуклеиновых кислот.

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

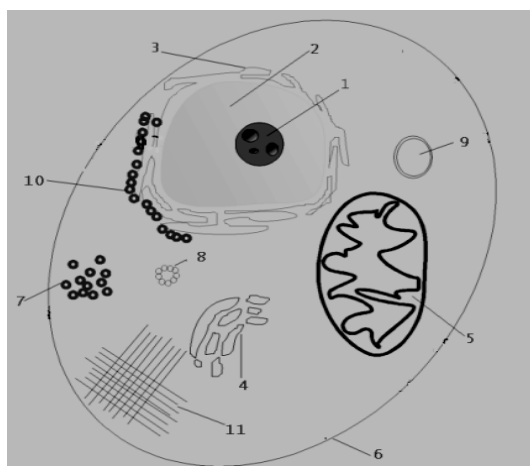
*Задание 1.* Подберите пары и напишите формулу:

| Название              | Составные части                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| А. Гуанозин           | 1. Рибоза, фосфат, аденин         |
| Б. Адениловая кислота | 2. Дезоксирибоза, тимин           |
| В. Уридин             | 3. Гуанин, рибоза                 |
| Г. ДезоксиЦМФ         | 4. Урацил, рибоза                 |
| Д. Тимидин            | 5. Фосфат, дезоксирибоза, цитозин |

**Задание 2.** Выберите, что относится только к ДНК, только к РНК, к ДНК и РНК:

- |  |  |
|--|--|
| А. Хранение генетической информации                  | Е. Реализация генетической информации              |
| Б. А, Г, Т, Ц  | Ж. Рибоза  |
| В. Цитоплазма  | З. Ядро  |
| Г. 3',5'-фосфодиэфирная связь между мононуклеотидами | И. А, Г, У, Ц                                      |
| Д. Дезоксирибоза                                     | К. Стабильность структуры поддерживается Н-связями |

**Задание 3.** Пользуясь рисунком (использовать цифру), подберите пары:



- |  |
|--|
| А. Рибосомы                            |
| Б. Гладкая эндоплазматическая сеть     |
| В. Шероховатая эндоплазматическая сеть |
| Г. Аппарат Гольджи                     |
| Д. Лизосомы                            |
| Е. Плазматическая мембрана             |
| Ж. Цитоскелет                          |
| З. Ядро                                |
| И. Ядрышко                             |
| К. Митохондрия                         |

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### Вопросы для обсуждения

1. Репликация, биологическая роль, субстраты, ферменты, молекулярный механизм.
2. Транскрипция, биологическая роль, молекулярный механизм, механизмы регуляции активности генов (схема Жакоба и Моно, схема Георгиева), процессинг РНК. Обратная транскрипция.
3. Генетический код и его свойства.
4. Рекогниция и трансляция как этапы реализации генетической информации в клетке. Рекогниция (субклеточная локализация, схема, субстратная специфичность АРСаз). Роль тРНК в синтезе белка.
5. Современное представление о биосинтезе белка. Регуляция биосинтеза белка в клетке на генетическом уровне (роль гистонов, гормонов и жирорастворимых витаминов).
6. Посттрансляционная модификация молекул белка (гидроксилирование, гликозилирование, ограниченный протеолиз, фосфорилирование, карбоксилирование).
7. Современные методы молекулярной биологии (ПЦР, блот-анализ ДНК и РНК (Саузерн-блот и Нозерн-блот), метод «отпечатков пальцев ДНК», клонирование). Принципы проведения, применение в медицине и фармации.
8. Метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК (метод Сэнджера).

### Рекомендуемые темы для реферативных докладов

- Генная инженерия. Гибридная технология. Создание высокоэффективных лекарственных препаратов на основе белков человека (на примере лактоферрина человека).
- Генная терапия. Антисмысловые рибонуклеотиды как перспективная основа создания лекарственных средств.
- Ингибиторы биосинтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот - противоопухолевые и противовирусные препараты.

## Литература

### Основная

1. Биологическая химия / В. К. Кухта [и др.]. М.: Бином; Минск: Асар, 2008. С. 338 – 418.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М.: Медицина, 1990. С. 377–389, 399–422.

### Дополнительная

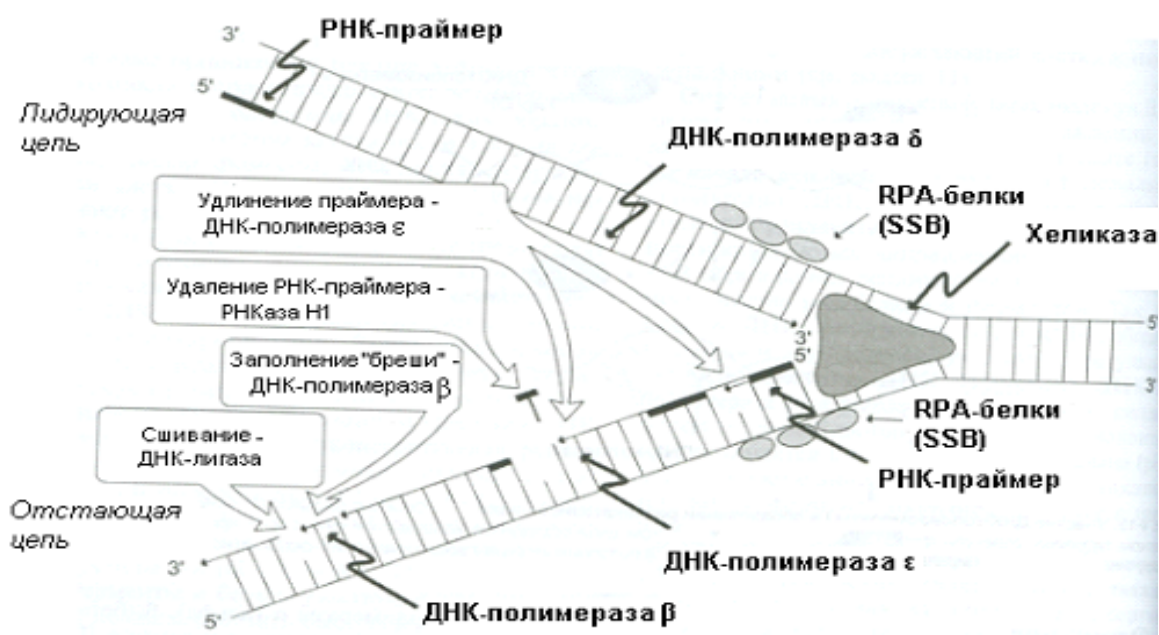
3. Марри, Р. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М.: Мир, 1993.
4. Нуклеопротеины : учеб. пособие / А. Д. Таганович [и др.]. Минск, 2000.

## Задания для самостоятельной работы

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

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

На рисунке показаны основные участники механизма репликации у эукариот:



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

**Задание 2.** Вспомните, что в процессе синтеза и во время хранения молекулы ДНК подвергаются многочисленным физическим, химическим и другого рода воздействиям, которые вызывают нарушения структуры молекул ДНК. Существует многоуровневая система репарации повреждений:

– мутации, которые возникают в процессе репликации. Репарируются (если это возможно) путем повторного считывания последовательности, удаления неправильно вставленного нуклеотида ДНК- полимеразами, обладающими экзонуклеазной активностью;

– мутации, которые не исправлены путем повторного считывания. Репарируют при помощи специальной пострепликативной репарации. Молекула родительской ДНК метилирована по отдельным азотистым основаниям, и вновь синтезируемая цепь также метилируется. Во время метилирования идет проверка правильности расположения мононуклеотидов, и в случае обнаружения мутации включается механизм эксцизионной репарации с последующим метилированием цепи;

– мутации, возникающие спонтанно, в любое время репарируются механизмом эксцизионной репарации.

2.1. На рисунке изображена последовательность событий эксцизионной репарации в случае образования димера тимина в структуре ДНК. Расставьте в последовательности, обозначенной на рисунке, следующие ферменты: А. ДНК-лигаза. Б. Эксцизионная нуклеаза. В. ДНК-β-полимераза.

В. ДНК-β-полимераза.

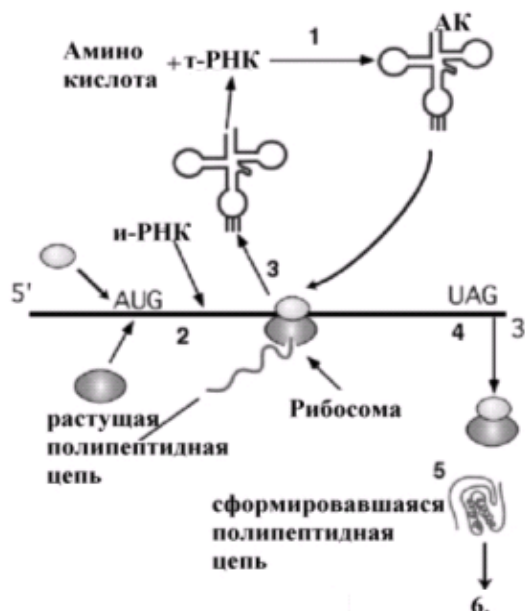
Задание 3. Вспомните, что среди механизмов узнавания белками (ферментами, факторами регуляции и т. д.) отдельных участков нуклеотидных последовательностей определенную роль играют палиндромные последовательности нуклеотидов (в частности, при узнавании ДНК-рестриктазами), которые могут формировать крестообразные структуры в молекуле ДНК.

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



Задание 4. Механизмы реализации генетической информации в клетке многоэтапны. На рисунке изображены основные этапы экспрессии генов. Подберите пары (буква – таблица, цифра – рисунок).

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



*Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.*

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

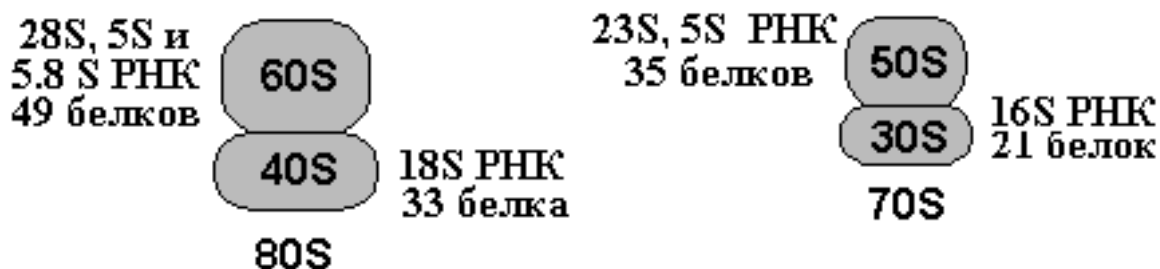
Задание 1. Напишите реакцию, катализируемую АРСазой.

Задание 2. Почему 60S+40S=80S, а 50S+30S=70S? Выберите правильный ответ.

1. Скорость седиментации зависит от массы частиц
2. Скорость седиментации зависит от формы частиц



3. От того и другого



Задание 3. На рисунке показана схема структуры lac-оперона.



CAP (катаболитами активируемый белок). Этот белок — рецептор цАМФ, уровень которой в клетке определяется уровнем глюкозы (снижение количества глюкозы в питательной среде приводит к повышению уровня цАМФ в клетке). CAP, связанный с цАМФ, присоединяется к ДНК и стимулирует РНК-полимеразу, при этом ее активность увеличивается в 20 – 50 раз.

Репрессор связан с опероном в отсутствии лактозы.

А. Дополните строку:

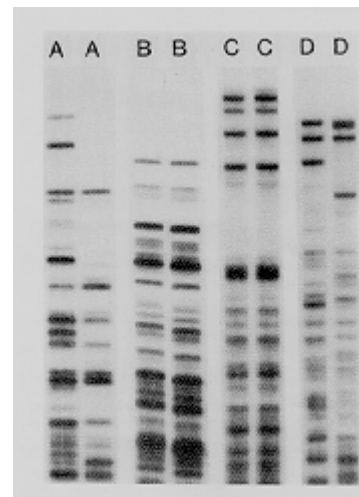
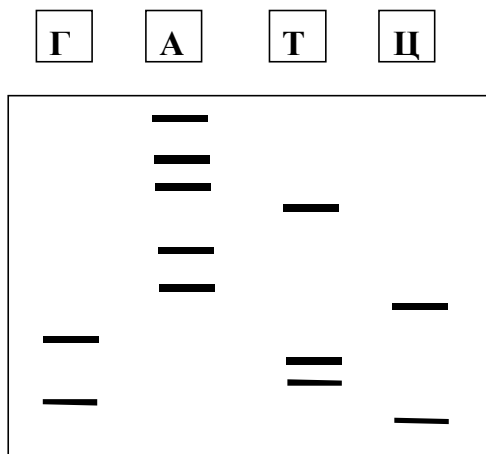
промотор – место связывания \_\_\_\_\_

оператор – место связывания \_\_\_\_\_

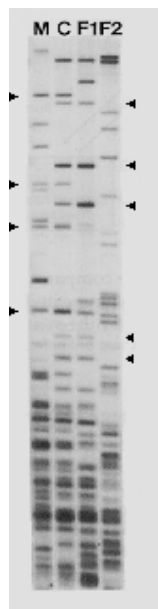
Б. Изобразите схематически, используя предлагаемые выше формы для участников, их расположение на опероне при следующих 4-х состояниях. В каком из них будут синтезированы белки, кодируемые опероном?

| Компонент среды | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|---|---|---|---|
| Лактоза         | + | - | - | + |
| Глюкоза         | + | + | - | - |

Задание 4. На рисунке ниже 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. Таблицу генетического кода смотрите в учебнике.



**Задание 5.** Электрофореграмма справа показывает результаты исследования полиморфизма длины фрагментов рестрикции 4-х пар близнецов. Ваше мнение об идентичности близнецов.



**Задание 6.** Слева «отпечатки пальцев» ДНК матери (M), ребенка (C) и двух предполагаемых отцов (F1, F2). Указатели на левой стороне указывают полосы ДНК, общие между ребенком и матерью. Указатели на правой стороне указывают полосы ДНК, общие между ребенком и предполагаемыми отцами. Ваше мнение о предполагаемом отце.

#### Эталоны ответов к решению заданий

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

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

2 ДНК – А, Б, Д; РНК – В, Е, Ж, И; ДНК и РНК – Г, К, З;

3 (А – 7; Б – 3; В – 10; Г – 4; Д – 9; Е – 6; Ж – 11, З – 2; И – 1; К – 5).

**Для самостоятельной работы:**

2 (1 – Б; 2 – В; 3 – А);

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

#### Самостоятельная работа (30 мин)

##### Инструкция к практическому занятию

##### 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, углеводов 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 едкого натра, 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 обра-

зуются 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 фосфомолибденовой кислоты.

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

1. Азотистый баланс, его состояние в норме и при патологии. Что характеризует коэффициент изнашивания?
2. Биологическая ценность белков. Нормы белка в питании.
3. Гидролиз белков (протеолиз). Классификация и свойства протеаз.
4. Переваривание белков. Характеристика протеаз желудочно-кишечного тракта (оптимум pH, механизмы активации, субстратная специфичность, эндо- и экзопептидазы). Роль HCl в переваривании белков. Кислотность желудочного сока — принцип определения, содержание в норме.
5. Гниение белков. Знать схематически происхождение фенола, крезола, скатола, индола, кадаверина, путресцина. Механизмы обезвреживания продуктов гниения белков и других ксенобиотиков.
6. Аминокислотный фонд клетки, его пополнение и использование.
7. Переаминирование. Роль витамина 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.
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 обезвреживание.
12. Синтез катехоламинов. Функции дофамина, норадреналина и адреналина в организме. Обезвреживание биогенных аминов. Роль дофамина при болезни Паркинсона.
13. Нуклеотиды — их строение и функции. Знать номенклатуру и уметь писать формулы азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов; изображать образование 3'-5'-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. Современные методы молекулярной биологии (ЦПР, блот-анализ ДНК и РНК (Саузерн-блот и Нозерн-блот), метод «отпечатков пальцев ДНК», клонирование). Принципы проведения, применение в медицине и фармации.

27. Метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК (метод Сэнджера).

*Пример задачи и вопросов на метод Сэнджера*

На рисунке приводятся результаты исследования нуклеотидной последовательности участка молекулы ДНК (метод Сэнджера).

На чем основан этот метод?

Что нужно сделать, чтобы получить такую картину (поэтапно)?

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

Что обозначают буквы в скобках и черточки на рисунке?

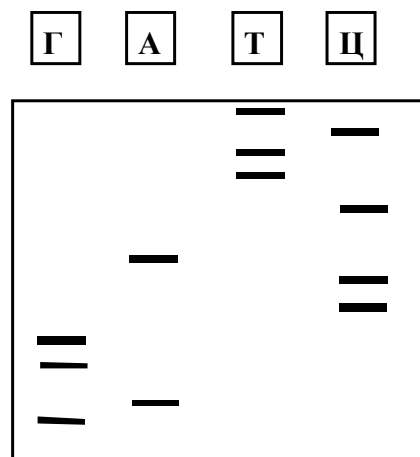
Какую роль выполняют дидезоксинуклеотиды в этом методе?

В каком направлении следует «читать» полученную электрофореграмму и почему?

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).



## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ГОРМОНЫ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГОРМОНЫ

### Актуальность темы

Гормоны — класс регуляторных химических соединений, синтезируемых железами внутренней секреции и/или специальными клетками. Значение гормональной продукции заключается в том, что секретируемые гормоны осуществляют регуляцию метаболизма отдельных органов и тканей, определяют состояние физиологических процессов и жизнедеятельности организма в целом. Нарушение синтеза, секреции, транспорта и рецепции гормонов клетками лежит в основе многообразных эндокринных расстройств. В связи с этим понимание механизма эндокринных нарушений чрезвычайно важно для диагностики и целенаправленной терапии эндокринных заболеваний.

### **Цель занятия**

Научиться применять знание классификации гормонов, типов гормональных рецепторов, G-белков и последующего каскада внутриклеточных передатчиков для понимания особенностей механизма действия гормонов на клетки. Уметь применять знания о механизме действия индивидуальных гормонов для объяснения расстройств метаболизма при нарушении образования или гиперпродукции гормонов в организме.

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### ***анатомии человека:***

- анатомию желез внутренней секреции;

#### ***гистологии:***

- гистологическое строение желез внутренней секреции и гормоны, синтезируемые ими;
- АПУД-систему;
- типы гормональной секреции: эндокринную, нейроэндокринную, пара- и аутокринную;

#### ***биоорганической химии:***

- строение и свойства белков и пептидов;
- строение и свойства стероидов (холестерола).

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

*Задание 1.* Подобрать 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.* Выбрать правильный ответ: эндокринная секреция — это:

- А. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в окружающую среду и действует на рядом расположенные клетки
- Б. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в окружающую среду и действует на клетку, в которой он был синтезирован
- В. Нейромедиатор, синтезируемый нервными клетками
- Г. Гормон, синтезируемый клеткой, выделяется в кровь и действует на отдаленные от места синтеза клетки

*Задание 3.* Какие гормоны секретируются эпифизом?

- |              |                                   |
|--------------|-----------------------------------|
| А. Окситоцин | Г. Серотонин.                     |
| Б. Либерины  | Д. Мелатонин                      |
| В. Статины   | Е. Меланоцитостимулирующий гормон |

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

### **Вопросы для обсуждения**

1. Номенклатура и 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,  $Ca^{2+}$ , диацилглицерол).

8. Растворимая и мембраносвязанная гуанилатциклаза. Оксид азота.

9. Аденилатциклаза и фосфолипаза C. Их роль в клетке.

10. Роль протеинкиназ в клетке.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 427–454.

2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 170–174.

#### Дополнительная

3. *Строев, Е. А.* Биологическая химия / Е. А. Строев. М. : Высшая школа, 1986. С. 370–412.

4. *Маршалл, В.* Клиническая биохимия / В. Маршалл. СПб., 2002. 380 с.

5. *Руководство по клинической эндокринологии* / под ред. Н. Т. Старковой. СПб., 1996. С. 7–10, 201–279, 296–376.

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Вспомните, какие гормоны связываются с внутриклеточными рецепторами, а какие — с рецепторами, встроенными в цитоплазматическую мембрану. Обратите внимание, что при патологии рецепторов ткани-мишени теряется чувствительность к гормону (гормон не вызовет соответствующего метаболического ответа).

1.1. В клинику поступил больной в состоянии гипергликемической комы. Введение инсулина не нормализовало концентрацию глюкозы крови. Какую причину гипергликемии можно предположить у больного?

А. Аномалия клеточных рецепторов

Б. Гиперфункция гормонов коры надпочечников

В. Истинная гипоинсулинемия

Г. Опухоль базофильных клеток гипофиза

Д. Опухоль мозгового слоя надпочечников

1.2. У лабораторных животных, подвергшихся действию мутагенного вещества, обнаружили в тканях измененную аденилатциклазу. К какому гормону будут нечувствительны органы-мишени у этих животных?

А. Эстрадиолу

Г. Прогестерону

Б. Тироксину

Д. Альдостерону

В. Глюкагону

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

А. Диоксифенилаланин

Г. Лизин

Б. Фенилаланин

Д. Дофамин

В. Тирозин

2.2. У больных с опухолью клубочковой зоны надпочечника в три раза увеличивается биосинтез кортизола и кортикостерона и в 70 раз возрастает биосинтез альдостерона. Укажите метаболит, использование которого резко увеличивается:

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

2.3. Какой из нижеперечисленных гормонов не является гликопротеином?

- А. Соматотропин
- Б. Тиреотропин
- В. Лютеинизирующий гормон
- Г. Фолликулостимулирующий гормон

*Задание 3.* Вторичными посредниками действия гормонов на клетку являются циклические нуклеотиды, ИТФ,  $\text{Ca}^{2+}$ , диацилглицерол. Запомните, что цАМФ по своему влиянию на метаболизм клетки является антагонистом цГМФ.

3.1. Больному в течение недели вводили препарат теofilлин — ингибитор фосфодиэстеразы цАМФ. Активность какого гормона может усилиться на фоне такого лечения?

- А. Адреналин
- Б. Дезоксикортикостерон
- В. Альдостерон
- Г. Кортизол
- Д. Эстрадиол

3.2. У больного диагностирована опухоль мозгового слоя надпочечников — феохромоцитомы. Какой посредник гормонального сигнала активно участвует в действии на ферменты при этом заболевании?

- А. цАМФ
- Б. Простагландины
- В. цГМФ
- Г. Са-кальмодулин
- Д. цГМФ

3.3. Больной поступил в клинику с гипергликемией в результате развития опухоли, продуцирующей адреналин. С помощью введения каких веществ можно уменьшить интенсивность действия адреналина на органы-мишени?

- А. Активаторы фосфодиэстеразы
- Б. цАМФ
- В. Простагландины
- Г. цГМФ
- Д. Ингибиторы кальциевых каналов

3.4. Какое из названных соединений не является вторичным посредником в действии гормонов?

- А. Диацилглицерол.
- Б. цАМФ
- В. цГМФ
- Г.  $\text{Ca}^{2+}$
- Д. ГМФ

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

*Задание 1.* Внутрядерные рецепторы обнаружены для:

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

*Задание 2.* При обследовании представителей африканского племени пигмеев обнаружили нарушение синтеза в печени белка — соматомедина С. В реализации биологического действия какого гормона участвует этот белок?

- А. Соматотропина
- Б. Пролактин
- В. Соматолиберина
- Г. Соматостатина
- Д. Лютропина

*Задание 3.* Фосфолипаза, расщепляющая фосфатидинозитол на диацилглицерол и ИТФ, это:

- А. Фосфолипаза А<sub>1</sub>
- Б. Фосфолипаза А<sub>2</sub>
- В. Фосфолипаза С
- Г. Фосфолипаза Д

**Задание 4.** Какой из нижеперечисленных гормонов не является стероидом?

- |                |                              |
|----------------|------------------------------|
| А. Кортизол    | Г. Лактогенный гормон        |
| Б. Альдостерон | Д. Дигидроксихолекальциферол |
| В. Прогестерон |                              |

**Задание 5.** Какой из нижеперечисленных гормонов не является пептидом?

- |                  |                |                 |
|------------------|----------------|-----------------|
| А. Окситоцин     | В. Глюкагон    | Д. Тиреолиберин |
| Б. Трийодтиронин | Г. Вазопрессин |                 |

**Задание 6.**  $G_s$ -белки стимулируют активность аденилатциклазы. Однако с течением времени этот эффект исчезает. Это обусловлено:

- А. АТФ-азной активностью  $\alpha$ -субъединицы
- Б. АТФ-азной активностью  $\gamma$ -субъединицы
- В. Фосфодиэстеразной активностью  $G_s$ -белка
- Г. Фосфолипазной активностью  $G_s$ -белка
- Д. ГТФ-азной активностью  $\alpha$ -субъединицы
- Е. АТФ-азной активностью  $\gamma$ -субъединицы

**Задание 7.** 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 8.** Выберите вторичный посредник действия окситоцина.

- |              |                   |                |
|--------------|-------------------|----------------|
| А. $Ca^{2+}$ | В. цГМФ           | Д. Оксид азота |
| Б. цАМФ      | Г. Диацилглицерол | Е. ИТФ         |

### Эталоны ответов к решению заданий

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

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

*Для самостоятельной работы:*

1.1 А; 1.2 В; 2.1 Г; 2.2 Д; 2.3 А; 3.1 А; 3.2 А; 3.3 А, Г; 3.4 Д.

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

В клиничко-биохимических и аналитических лабораториях фармации используются методы качественного и количественного анализа для определения гормонов в биологическом материале и лекарственных препаратах.

#### Гормоны щитовидной железы

Щитовидная железа синтезирует и секретирует высокоактивные йодсодержащие тиреоидные гормоны: тироксин ( $T_4$ ) и 3,5,3'-трийодтиронин ( $T_3$ ), а также нейодированный гормон (полипептид) тиреокальцитонин, функция которого связана с регуляцией уровня кальция и фосфора в крови.

#### Работа 1. Качественная реакция на тироксин

*Принцип метода.* При разрушении тиреоидина образуется йодид калия, из которого йод легко вытесняется йодатом калия. Вытеснение йода из соли йодистоводородной кислоты является окислительно-восстановительной реакцией, где йодид калия служит восстановителем, а йодат калия (остаток йодноватой кислоты) — окислителем. Выделившийся йод обнаруживают с помощью крахмала (синее окрашивание) в кислой среде.

*Ход работы.* В пробирку наливают 24 капли гидролизата тиреоидина, прибавляют 3 капли 1%-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 едкого натра, 2 капли 1% раствора сульфата меди и все перемешивают; содержимое пробирки приобретает фиолетовое окрашивание.

##### **Нингидриновая реакция**

*Ход работы.* К 5 каплям 1% раствора инсулина добавляют 5 капель 0,5% водного раствора нингидрина и кипятят 1–2 мин. В пробирке появляется розово-фиолетовое окрашивание, а с течением времени раствор синее.

##### **Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)**

*Ход работы.* В пробирку наливают 5 капель 1%-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 аминокгруппу.

#### **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 едкого натра и наблюдают изменение окрашивания (на вишнево-красное).

### **Диазореакция**

*Принцип метода.* При взаимодействия диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

*Ход работы.* К 6 каплям 0,5%-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 едкого натра. Жидкость окрашивается в красный цвет.

### **Работа 4. Флюоресценция продуктов окисления адреналина**

*Принцип метода.* Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, при добавлении щелочи дает флюоресцирующие продукты.

*Ход работы.* К 10 каплям воды приливают 6 капель 10%-ного раствора едкого натра и 6 капель раствора адреналина. Поместив пробирку перед включенным флюороскопом, наблюдают зеленую флюоресценцию продуктов окисления адреналина.

## **Гормоны половых желез**

Половые гормоны синтезируются в семенниках, яичниках, плаценте и надпочечниках.

Женские половые гормоны — эстрогены — можно рассматривать как производные эстрадиол (углеводорода с 18 атомами углерода). Основными природными эстрогенами являются эстрадиол, эстрон и гормон желтого цвета — прогестерон.

Мужские половые гормоны — андрогены — можно рассматривать как производные андростана (углеводорода с 19 атомами углерода). К мужским половым гормонам относятся тестостерон и андростерон.

### **Работа 5. Качественные реакции на фолликулин**

*Принцип метода.* Качественная реакция на фолликулин (эстрон) проводится с концентрированной серной кислотой и обусловлена образованием эфирного соединения соломенно-желтого цвета с зеленой флюоресценцией.

*Ход работы.* С масляным раствором фолликулина реакцию проводят при комнатной температуре. К 2 каплям масляного раствора фолликулина приливают 30 капель концентрированной серной кислоты. Постепенно развивается соломенно-желтое окрашивание.

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА.**

### **ТЕСТ НА ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ГЛЮКОЗЕ**

#### **Актуальность темы**

Механизм действия индивидуальных гормонов необходимо знать не только врачу-эндокринологу, но и медику любой специализации. Гормоны нашли широкое применение в медицине. Диагностика эндокринной патологии на основании изменения биохимических показателей метаболизма, в частности, диагностика сахарного диабета с помощью метода сахарной нагрузки широко применяется в медицинской практике.

#### **Цель занятия**

Закрепить знания о химическом строении и механизмах действия индивидуальных гормонов. Особое внимание уделить эндокринной патологии поджелудочной железы. Научиться строить и интерпретировать результаты построения различных типов сахарной кривой.

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

Требования те же, что и к предыдущему занятию. Дополнительно нужно вспомнить из курса биорганической химии о том, что глюкоза (благодаря наличию в ее формуле альдегидной группы) обладает редуцирующими свойствами. На этом основаны методы ее определения в биологических жидкостях.

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

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

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

**Правильность решения проверьте, сопоставив его с эталоном ответа.**

### **Вопросы для обсуждения**

1. Гормоны гипоталамуса: химическое строение, тип рецептора в клетках-мишенях, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, ответ клеток гипофиза на действие либеринов и статинов гипоталамуса.

2. Гормоны аденогипофиза: химическое строение, типы рецепторов в тканях-мишенях, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, реализация эффекта гормонов на уровне тканей-мишеней. Роль избыточной и недостаточной секреции гормонов.

3. Гормоны нейрогипофиза: химическое строение, тип рецептора в ткани-мишени, каскадный механизм усиления гормонального сигнала, реализация эффекта окситоцина и вазопрессина на уровне тканей-мишеней. Роль избыточной и недостаточной секреции гормонов.

4. Гормоны эпифиза: химическое строение, предшественники синтеза, реализация эффекта на уровне тканей-мишеней. Роль избыточной и недостаточной секреции гормонов.

5. Тироксин и трийодтиронин: химическое строение, предшественник синтеза, тиреоглобулин, тип рецептора в ткани-мишени, реализация эффекта тиреоидных гормонов на уровне клетки. Роль пероксидазы и дейодазы в метаболизме гормонов. Проявление гипо- и гипертиреозидизма.

6. Гормоны коры надпочечников: химическое строение, предшественник синтеза, тип рецептора в ткани-мишени, реализация эффекта глюкокортикоидов и минералокортикоидов на уровне клетки. Синдром Кушинга. «Бронзовая болезнь». Несахарный диабет.

7. Половые гормоны: химическое строение, предшественник синтеза, реализация эффекта эстрогенов, прогестерона и мужских половых гормонов на уровне клетки. Избыточная и недостаточная секреция половых гормонов.

8. Инсулин и глюкагон: химическое строение, синтез инсулина, типы рецепторов в тканях-мишенях для глюкагона и инсулина, реализация эффекта гормонов поджелудочной железы на уровне клеток. Нарушения метаболизма при диабете. Диагностическое значение сахарных кривых.

### **Литература**

#### **Основная**

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 454–514.
2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 174–203.

#### **Дополнительная**

3. *Строев, Е. А.* Биологическая химия / Е. А. Строев. М. : Высшая школа, 1986. С. 370–412.
4. *Маршалл, В.* Клиническая биохимия / В. Маршалл. СПб., 2002. 380 с.
5. *Руководство по клинической эндокринологии* / под ред. Н. Т. Старковой. СПб., 1996. С. 15–486.
6. *Charles, G. D. Brook.* Essential Endocrinology / Charles G. D. Brook, Nicholas J. Marshall. 2001, Blackwell Science (Oxford). P. 1–164.

### **Задания для самостоятельной работы**

*Задание 1.* Обратите внимание на то, что полиурия отмечается не только при сахарном диабете (*Diabetes mellitus*), но и при несахарном диабете (*Diabetes insipidus*), а также при почечном диабете (при поражении почек). Различить причину полиурии помогает определение удельного веса мочи и данные определения уровня гликемии. Не забывайте, что часто диабет носит скрытый характер и выявить заболевание можно на основании результатов сахарной нагрузки.

1.1. При обследовании больного на толерантность к глюкозе определен натощак уровень глюкозы в крови 7,0 ммоль/л, через 2 часа после нагрузки глюкозой — 10 ммоль/л. Для какого нарушения регуляции углеводного обмена характерны эти показатели?

- А. Сахарный диабет
- Б. Скрытая форма сахарного диабета
- В. Гиперинсулинизм
- Г. Болезнь Аддисона
- Д. Микседема

1.2. В клинику поступил ребенок с жалобами на усиленную жажду, частое мочеиспускание. Клинический анализ крови и общий анализ мочи патологических компонентов не обнаружили. Что можно применить для лечения ребенка?

- А. Вазопрессин
- Б. Окситоцин
- В. Альдостерон
- Г. Тиреоидин
- Д. Кортикостерон

1.3. В эндокринологическое отделение поступила больная с жалобами на жажду, частое мочеиспускание, выраженную сухость кожных покровов. При анализе мочи качественной патологии не выявлено, плотность мочи 1,009. Для какого нарушения гормональной регуляции это характерно?

- А. Несахарный диабет
- Б. Стероидный диабет
- В. Инсулярный диабет
- Г. Тиреотоксикоз
- Д. Микседема

1.4. При лабораторном анализе у больного выявлен гипергликемический тип сахарной кривой. При каком заболевании, помимо сахарного диабета, это может быть?

- А. Тиреотоксикозе
- Б. Болезни Аддисона
- В. Инсулиноме
- Г. Несахарном диабете
- Д. Гипотиреозе

1.5. В клинической лаборатории при анализе мочи в одной из проб определили низкий удельный вес. Какие изменения должны сопутствовать этому показателю?

- А. Креатинурия
- Б. Глюкозурия
- В. Кетонурия
- Г. Протеинурия
- Д. Полиурия

1.6. У больного при анализе мочи определили низкий удельный вес. Уровень какого гормона в крови нужно определить у больного для уточнения нарушения?

- А. Инсулина
- Б. Вазопрессина
- В. Кортизола
- Г. Альдостерона
- Д. Тиреокальцитонина

1.7. При профосмотре у женщины выявлена скрытая форма диабета. Лабораторные анализы позволили врачу назначить диетотерапию со сниженным количеством углеводов и увеличение липотропных веществ. Какой основной метаболический эффект достигается такой диетой?

- А. Повышение использования глюкозы на синтез жира в жировой ткани
- Б. Снижение окисления жирных кислот в печени
- В. Повышение использования глюкозы на синтез жира в печени
- Г. Увеличение синтеза фосфолипидов и уменьшение отложения нейтрального жира в печени
- Д. Снижение синтеза фосфолипидов

*Задание 2.* Инсулин и глюкагон — антагонисты. Вспомните механизм действия этих гормонов на углеводный и липидный обмены.

2.1. Пациент при лечении голоданием потерял 10 кг веса. Активация какого гормона привела к увеличению скорости катаболизма жиров при голодании?

- А. Инсулин
- Б. Соматостатин
- В. Глюкагон
- Г. Альдостерон
- Д. Окситоцин

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

- А. Ингибирование глюконеогенеза
- Б. Ингибирование гликолиза
- В. Увеличение проницаемости клеток для  $\text{Ca}^{2+}$
- Г. Активацию гликогенфосфорилазы
- Д. Активацию протеинфосфатаз

2.3. В клинику поступил больной без сознания. В выдыхаемом воздухе был запах ацетона, упругость тканей снижена (обезвоживание). Какой биохимический анализ будет вписываться в клиническую картину заболевания?

- А. Гипергаммаглобулинемия
- Б. Снижение содержания  $\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH}_2$  в крови
- В. Наличие в моче  $\text{CH}_3 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ .
- Г. Снижение удельного веса мочи
- Д. Снижение содержания аминокислот в крови

2.4. Вполне благополучный новорожденный, оставленный без кормления на длительный период, умер. Анализ взятого биопсией тканевого материала выявил отсутствие в печени фосфоенолпируваткарбоксикиназы. Какой гормон индуцирует синтез этого фермента?

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

2.5. Подростку, длительно страдающему гипогликемией, ввели глюкагон и не получили ответной реакции на гормон. Исследование ткани печени, взятой при биопсии, выявило дефект фермента. Назовите этот фермент:

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

2.6. У ребенка 2-го года жизни, страдающего мышечной слабостью, обнаружили увеличенную печень и низкий уровень глюкозы в крови натощак. После введения глюкагона гипергликемия не возникает. Исследование ткани печени, взятой при биопсии, выявило дефект фермента. Назовите этот фермент:

- А.  $\alpha$ -Амилаза
- Б. Лактатдегидрогеназа
- В. Гликогенфосфорилаза
- Г. Гексокиназа
- Д. Фруктокиназа

*Задание 3.* Вспомните механизм действия гормонов коры надпочечников.

3.1. Девушка обратилась к врачу с жалобами на резкую мышечную слабость, головокружение, усиление пигментации кожи, потерю веса, сухость кожи, повышенный диурез. При обследовании установили сниженное артериальное давление, концентрация глюкозы крови 3,0 ммоль/л, повышенное выделение натрия с мочой. Назначение какого препарата может улучшить состояние больной?

- А. Инсулин
- Б. Глюкагон
- В. Тироксин
- Г. Альдостерон
- Д. Питуитрин (вытяжка из задней доли гипофиза)

3.2. Больной обратился с жалобами на общую утомляемость, головную боль, боль в спине и конечностях, исхудание конечностей и увеличение жировых отложений в области спины и шеи, постоянную жажду. При осмотре врач заподозрил синдром Иценко-Кушинга. Изменение уровня какого гормона в крови подтверждает предположение врача?

- А. Тироксина
- Б. Кортизола
- В. Альдостерона
- Г. Прогестерона

*Задание 4.* При заболевании сахарным диабетом нарушается усвоение глюкозы тканями и усиливается распад липидов. В результате дефицита ЩУК нарушается функционирование ЦТК и избыток молекул ацетил-КоА используется на синтез ацетоновых тел.

4.1. В клинику доставлена больная с сахарным диабетом в прекоматозном состоянии кетоацидотического типа. Увеличение содержания какого метаболита к этому привело?

А. Малоната  
Б. Оксалоацетата

В.  $\alpha$ -Кетоглутарата  
Г. Ацетоацетата

Д. Аспартата

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.*

### Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

*Задание 1.* Молодой пациент, страдающий инсулинзависимым диабетом, соблюдал рекомендации врача. Больной хорошо себя чувствовал. Однако при определении уровня глюкозы в крови у него была обнаружена выраженная гипергликемия (15 ммоль/л). Содержание гликозилированного гемоглобина HbA<sub>1c</sub> составило 6,5%. Насколько компенсировано заболевание?

*Комментарии.* Несмотря на высокий уровень глюкозы содержание HbA<sub>1c</sub> у больного было нормальным, т. е. за прошедшие несколько недель лечение диабета было эффективным. Наличие гипергликемии, как удалось выяснить при более подробном анамнезе, объяснялось обильным застольем накануне.

*Задание 2.* При анализе мочи у больного обнаружена выраженная глюкозурия. Вспомните, чему равен почечный порог для глюкозы. Укажите уровень гликемии, при котором глюкоза будет экскретироваться в мочу:

А. 6 ммоль/л    Б. 10 ммоль/л    В. 15 ммоль/л    Г. 40 ммоль/л

*Задание 3.* Выберите причину, по которой глюкозурия может отмечаться у больного с нормогликемией:

А. Стресс    Б. Голод    В. Заболевания почек    Г. Тиреотоксикоз

### Эталоны ответов к решению заданий

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

1 Г.

*Для самостоятельной работы:*

1.1 А; 1.2 А; 1.3 А; 1.4 А; 1.5 Д; 1.6 Б; 1.7 Г; 2.1 В; 2.2 А; 2.3 В; 2.4 Г; 2.5 Д; 2.6 В; 3.1 Г; 3.2 Б; 4.1 Г.

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

#### Изучение углеводного обмена методом нагрузки глюкозой

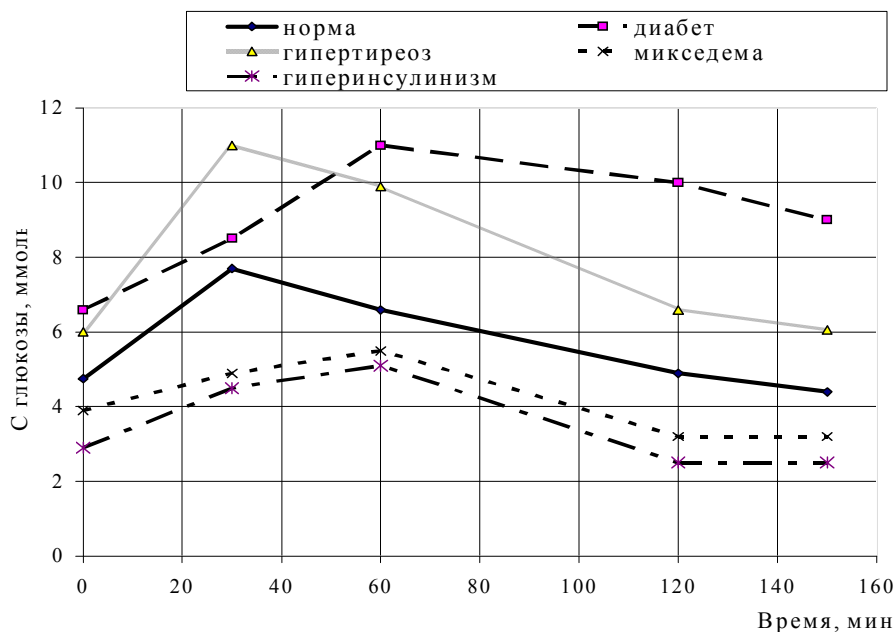
Для диагностики сахарного диабета и некоторых патологических состояний (недостаточность функции печени и почек, некоторые эндокринные заболевания, новообразования мозга, поджелудочной железы и надпочечников, гиповитаминоз В<sub>1</sub>, некоторые наследственные аферментозы) важно иметь представление 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.

#### Показания для проведения теста на толерантность к глюкозе

- Неоднозначные результаты однократных анализов крови натощак.
- Глюкозурия: панкреатическая и внепанкреатическая (первая связана с недостатком секреции или недостаточностью самого инсулина; внепанкреатическая глюкозурия развивается при поражении других органов внутренней секреции, ЦНС, при эмоциональном стрессе, заболеваниях почек, печени, избытке углеводов в диете, при беременности).
- Клинические признаки сахарного диабета или его осложнений при нормальной концентрации глюкозы крови натощак (скрытые формы диабета).

Проведение нагрузки. Утром натощак у больного берут кровь из пальца для определения содержания глюкозы, после чего ему дают выпить 200 мл раствора глюкозы (из расчета 1 г глюкозы на 1 кг массы тела) в течение 5 мин. Затем через каждые 30 мин у больного снова берут кровь из пальца (в пределах 2,5–3 ч), и результаты определения содержания глюкозы в этих пробах используют для построения сахарных кривых, откладывая на вертикальной оси значение концентрации глюкозы в каждой пробе, а на горизонтальной — время (мин или ч).



Гликеми-

*ческие кривые при однократной нагрузке глюкозой в норме и при некоторых патологических состояниях*

*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, запишите 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 (НТГ) значительное (до 10,0 ммоль/л) повышение концентрации глюкозы после нагрузки сохраняется более 3 ч.

Гликемические кривые у детей имеют такой же характер, что и у взрослых, с тем лишь отличием, что повышение концентрации сахара в крови у детей меньше.

*Клинико-диагностическое значение оценки гликемических кривых.* У больных с разными формами диабета нарастание гликемической кривой происходит медленнее, достигая через 60–150 мин значительной величины (более чем в 1,8 раза превышая исходное значение), в большинстве случаев отмечается глюкозурия. Чем тяжелее заболевание, тем позже достигается максимум гликемии и тем он выше. Понижение кривой происходит очень медленно, чаще оно растягивается на 3–4 ч.

*Заболеваниям щитовидной железы,* связанным с ее гиперфункцией, свойственны гликемические кривые с более быстрым, чем в норме, подъемом, что, возможно, вызвано более интенсивным обменом веществ и возбуждением симпатического отдела вегетативной нервной системы.

Для больных с *аденомой островков Лангерганса, гипотиреозом (микседемой), болезнью Аддисона* характерен низкий исходный уровень кривой, низкая ее вершина и высокий

постгликемический коэффициент. При некоторых тяжелых заболеваниях (энцефалит и др.) глюкоза может появляться в моче в результате ренальной глюкозурии.

Критерии ВОЗ для постановки диагноза «сахарный диабет» и НТГ

| Диагноз         | Время взятия крови          | Венозная цельная кровь, ммоль/л |
|-----------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Сахарный диабет | Натощак                     | > 6,7                           |
|                 | 2 ч после нагрузки глюкозой | > 10,0                          |
| НТГ             | Натощак                     | < 6,7                           |
|                 | 2 ч после нагрузки глюкозой | 6,7–10,0                        |

## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ. НЕЗАМЕНИМЫЕ ФАКТОРЫ ПИТАНИЯ. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

### Актуальность темы

Использование пищи живыми организмами обозначается термином «питание». Различают три важнейших категории или составных компонента пищи:

- 1) питательные вещества — источники энергии и пластического материала (белки, жиры, углеводы);
- 2) микрокомпоненты пищи (витамины и минеральные соединения, необходимые для биохимических процессов);
- 3) волокнистые структуры (неперевариваемые полисахариды, необходимые для нормального функционирования пищеварительной системы).

Осуществление теми или иными компонентами пищи, в том числе незаменимыми факторами питания, своих функций в организме происходит через биохимические превращения. Понимание того, каким образом различные компоненты пищи вовлекаются в них, поможет осмыслить необходимость и суть сбалансированного питания, своевременно распознавать и активно действовать при столь распространенном в клинической практике состоянии недостаточного питания.

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

### Цель занятия

Сформировать представление о биохимических механизмах использования компонентов пищи для поддержания нормальной жизнедеятельности организма, о патологических состояниях недостаточного питания. Закрепить знания о механизмах образования в клетках активных форм кислорода и способах антиоксидантной защиты. Познакомить студентов с методами обнаружения жирорастворимых витаминов.

### Требования к исходному уровню знаний

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **биоорганической химии:**

- строение и свойства полиизопренов, стероидов, производных токола.

#### **биохимии:**

- пути катаболизма белков, жиров, углеводов в клетках;
- источники образования активных форм кислорода.

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

*Задание 1.* Какое из нижеследующих выражений относительно панкреатических ферментов правильное?

- А. Все они секретируются в виде неактивных проферментов
- Б. Все они секретируются ацинарными клетками



- В. Все они секретируются в ответ на холецистокинин
- Г. Для оптимальной активности им требуется рН около 7
- Д. Они важны только для переваривания белков

*Задание 2.* Какое из нижеследующих выражений правильное?

- А. Действие адреналина и глюкагона направлено на увеличение уровня гликогенфосфоорилазы
- Б. Интенсивность расщепления гликогена в состоянии натошак равна интенсивности его синтеза
- В. Дефосфорилирование гликогенсинтетазы в ответ на действие инсулина приводит к увеличению её активности
- Г. цАМФ — это вторичный посредник, который образуется в ответ на действие адреналина и глюкагона в печени
- Д. Фосфорилирование гликогенфосфоорилазы в ответ на действие глюкагона увеличивает её активность

*Задание 3.* Какова функция гормон-чувствительной липазы в жировой ткани?

- А. Гидролизует гормон, который участвует в расщеплении жира
- Б. Синтезирует новые жировые клетки из простых жирных кислот
- В. Гидролизует триацилглицеролы с образованием жирных кислот для других клеток
- Г. Синтезирует длинноцепочечные жирные кислоты для синтеза липидов в других клетках

*Задание 4.* Какую роль играет генетический фактор в перспективе достижения определенного веса тела? Что такое ген Ob и какую роль ему отводят в развитии ожирения у человека? Какие аргументы можно привести в пользу того, что этот ген связан с контролем веса?

*Задание 5.* Патологическое состояние, связанное с недостатком витаминов в пище, нарушением их всасывания или нарушением их использования организмом, называется ...

*Задание 6.* Укажите компоненты ферментативной антиоксидантной защиты клетки:

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

*Задание 7.* Укажите активную форму витамина А:

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

*Задание 8.* Характерным проявлением авитаминоза А является:

- А. Себорейный дерматит
- Б. Фолликулярный гиперкератоз
- В. Ксерофтальмия
- Г. Деменция
- Д. Кератомалиция
- Е. Торможение роста, потеря массы тела

*Задание 9.* Характерным проявлением гиповитаминоза Е является:

- А. Повышение проницаемости клеточных мембран
- Б. Куриная слепота (нарушение сумеречного зрения)
- В. Бесплодие, выкидыши
- Г. Мишечная дистрофия, поражение связочного аппарата
- Г. Диарея

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

### Вопросы для обсуждения

1. Пищевая ценность белков, жиров, углеводов. Роль волокнистых полисахаридов для работы пищеварительного тракта и обменных процессов в организме. Незаменимые факторы питания.
2. Энергия — потребность, происхождение и расходование в организме.
3. Синдром недостаточного питания (квashiоркор и маразм).
4. Свободнорадикальное окисление. Физиологическое и повреждающее действие активных форм кислорода. Молекулярные механизмы действия антиоксидантов. Ферментативная и неферментативная антиоксидантная защита.
5. Каротины, витамины А и Е, источники, биологическая роль, суточная потребность. Антиоксидантное действие витамина А и Е.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 87–131.
2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 147–164.

#### Дополнительная

3. *Марри, Р.* Биохимия человека / Р. Мари [и др.]. М. : Мир, 1993.
4. *Морозкина, Т. С.* Витамины : краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармакологических и биологических специальностей / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. Минск : Асар, 2002.

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Уясните энергозатраты организма взрослого человека в состоянии покоя и лабильность этого показателя в условиях патологии. Умейте объяснить, куда используется АТФ в состоянии покоя. Запомните реальный и желательный вклад в энергопродукцию белков, жиров и углеводов.

1.1. Ответьте на вопросы. Как поступает организм с образовавшимся избытком аминокислот, когда Вы потребляете с пищей или в виде пищевых добавок большее их количество, чем требуется для синтеза новых белков? Отличаются ли механизмы использования избытка аминокислот от механизмов использования избытка углеводов или липидов? Укажите эти различия.

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

- |                              |                            |
|------------------------------|----------------------------|
| А. Реально — углеводы 60 %   | Г. Желательно — жир 40 %   |
| Б. Желательно — алкоголь 3 % | Д. Реально — алкоголь 0 %. |
| В. Реально — белок 15 %      |                            |

*Задание 2.* Запомните, что синдром недостаточного питания проявляется в двух клинических формах: квашиоркоре и маразме. Умейте указать сходство и принципиальные различия между ними.

2.1. Решите задачу. У больного после операции резекции тощей кишки, которая была произведена для удаления опухоли, в течение нескольких недель развилась гипоальбуминемия и отечность тканей. При осмотре больной не выглядел истощенным, но была заметна бледность кожных покровов. Какую патологию позволяют заподозрить врачу эти симптомы? Какой подход можно было бы предложить для преодоления этого состояния у пациента?

*Задание 3.* Запомните, что наряду с незаменимыми факторами питания имеются условно незаменимые, которые не ограничиваются только аминокислотами аргинином и гистидином; они могут стать незаменимыми при определенных состояниях организма. Умейте объяснить, почему при выборе пищевых источников незаменимых жирных кислот необходимо различать омега-3 и омега-6 кислоты. Обратите внимание на преимущества и недостатки неперевариваемых полисахаридов в составе пищи.

*Задание 4.* Какие из нижеперечисленных соединений относятся к активным формам кислорода? Назовите их:

А. NO<sub>2</sub>  
Б. СО

В. O<sub>2</sub><sup>·-</sup>  
Г. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Д. OH<sup>·</sup>  
Е. ONOO<sup>-</sup>

*Задание 5.* 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 6.* Укажите компоненты ферментативной антиоксидантной защиты клетки:

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

*Задание 7.* Выберите правильный ответ, 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 8.* 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 эталонами ответов.***

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

*Задание 1.* Потребность в белках определяется величиной энергозатрат — за счет белка организм должен получать 15 % всей расходуемой энергии. Чему равна потребность в белке человека умственного труда (энергозатрата 3000 ккал в сутки (12570 кДж)?

*Задание 2.* 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 3.* 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 4.* Какой источник энергии обеспечивает 90 % глюкозы, необходимой в качестве топлива в течение первых нескольких дней голодания?

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

**Задание 5.** Чем обусловлено преимущественное запасание жира на бедрах у женщин и вокруг живота — у мужчин?

- А. Различием уровня инсулина в крови
- Б. Разницей в активности липопротеинлипазы
- В. Разницей уровня циркуляции липидтранспортных белков
- Г. Разницей активности липопротеинсинтетазы

**Задание 6.** Выберите правильный ответ, 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

### **Эталоны ответов к решению заданий**

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

1А, В, Г; 2В, Г, Д; 3В; 5Гиповитаминоз; 6А, Б, Д; 7В; 8Б, Г, Е. Ж; 9А, В, Г.

**Для самостоятельной работы**

1.2 В; 2.1 Квashiоркор. 4 В – супероксидный анион-радикал, Г – пероксид водорода, Д – гидроксильный радикал, Е – пероксинитрит; 5А, Б, Г, Д; 6А, Б, Д; 7Б, В, Г, Д.

### **Самостоятельная работа (60 мин)**

#### **Инструкция к практическому занятию**

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 лекарствах.

#### **Работа 1. Качественные реакции на витамин А (ретинол)**

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

##### **1.1. Проба Друммонда**

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

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

##### **1.2. Реакция с хлорным железом**

*Ход работы.* В сухую пробирку вносят 1 каплю ретинола ацетата и 5 капель хлороформа. Перемешивают и добавляют 3 капли хлорида железа. Появляется 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.  $HNO_3$ . Пробирку слегка встряхивают. Через 1–2 мин наблюдают красное или желтовато-красное окрашивание.

### **2.1. Реакция с хлоридом железа**

*Принцип метода.* Спиртовой раствор  $\alpha$ -токоферола окисляется  $\text{FeCl}_3$  в токоферилхинон и раствор окрашивается в красный цвет.

*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 витамин Д (кальциферол)**

Витамин Д относится к стероидам и является производным циклопентанпергидрофенантрена. В растительных продуктах содержится эргостерин, который при действии УФ-лучей превращается в витамин Д<sub>2</sub> (эргокальциферол). В животных тканях распространен 7-дегидрохолестерол, который под действием УФ-лучей превращается в витамин Д<sub>3</sub> (холекальциферол).

#### **3.1. Анилиновая проба**

*Принцип метода.* Метод основан на взаимодействии кальциферола с гидрохлоридом анилина с образованием продуктов реакции окрашенных в красный цвет.

*Ход работы.* В сухую пробирку вносят 2 капли масляного раствора эргокальциферола, 10 капель хлороформа и 1–2 капли анилинового реактива, осторожно нагревают при постоянном помешивании и кипятят полминуты. При наличии витамина Д желтая эмульсия приобретает сначала зеленый, а затем красный цвет.

### **Работа 4. Качественная реакция на витамин К (нафтохинон)**

Известны два природных витамина К<sub>1</sub> и К<sub>2</sub>, являющиеся производными нафтохинона. Искусственно синтезированный водорастворимый аналог витамина К<sub>1</sub>-викасол обладает биологической активностью витамина.

#### **4.1. Качественная реакция на нафтохинон**

*Принцип метода.* Метод основан на взаимодействии диэтилдитиокарбамата с витамином К в щелочной среде с образованием комплекса голубого цвета.

*Ход работы.* В пробирку вносят 4 капли спиртового раствора витамина К, добавляют 8 капель 2%-ного спиртового р-ра диэтилдитиокарбамата натрия и 4 капли 4%-ного спиртового р-ра NaOH. Встряхивают и наблюдают за развитием голубой окраски.

#### **4.2. Качественная реакция на викасол**

*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 едкого натра. Появляется лимонно-желтое окрашивание.

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ. ВОДРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В ПЛОДАХ ШИПОВНИКА И МОЧЕ**

### **Актуальность темы**

Витамины — это незаменимые компоненты пищи, которые присутствуют в ней в небольших количествах. Дефицит любого витамина ведет к появлению специфических нарушений реакций обмена с характерными клиническими проявлениями. Знание коферментных функций витаминов в организме позволяет понять механизмы развития и профилактики гипо- и авитаминозов и использовать витамины с профилактической и лечебной целью.

### **Цель занятия**

Закрепить знания по химической структуре и молекулярным механизмам биологического действия коферментных форм витаминов, вовлечению в метаболизм других незаменимых факторов питания. Познакомить студентов с методами обнаружения витаминов и коли-

чественного их определения в лекарственном растительном сырье, продуктах питания и биологических жидкостях.

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **биоорганической химии:**

- строение и свойства гетероциклических соединений — пурина, пиримидина, тиазола, пиррола, порфирина, парааминобензойной кислоты, никотиновой кислоты, пиридина;
- биологически активные гетерофункциональные соединения бензольного и гетероциклического рядов, метаболиты и биорегуляторы;

#### **биохимии:**

- коферменты и их роль в процессах метаболизма;
- коферментные формы водорастворимых витаминов и их участие в метаболизме;

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

*Задание 1.* Лабораторный анализ после гидролиза вещества выявил в гидролизате аденин, рибозу и фосфорную кислоту. Какова структура исходного вещества?

- |                  |                  |
|------------------|------------------|
| А. Пептид        | Г. Пентозофосфат |
| Б. Нуклеозид     | Д. Олигосахарид  |
| В. Мононуклеотид |                  |

*Задание 2.* Вспомните, что витамины принимают участие в процессах метаболизма после их активации в клетках, т. е. превращения в коферментную форму.

2.1. Объясните, чем руководствовался врач, заменив больному нейродермитом пиридоксин на пиридоксальфосфат.

2.2. Подберите соответствующие пары витамин — кофермент:

- |                     |                                     |
|---------------------|-------------------------------------|
| А. НАД <sup>+</sup> | 1. Производное пиридоксина          |
| Б. ТПФ              | 2. Производное рибофлавина          |
| В. HS-КоА           | 3. Производное тиамина              |
| Г. ФАД              | 4. Производное никотиновой кислоты  |
| Д. ПФ               | 5. Производное пантотеновой кислоты |

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

### **Вопросы для обсуждения**

1. Химическая природа, коферментные формы, молекулярные механизмы действия витаминов: тиамин (В<sub>1</sub>); рибофлавин (В<sub>2</sub>); пантотеновой кислоты; ниацин (РР); пиридоксин (В<sub>6</sub>); фолиевой кислоты (В<sub>9</sub>); кобаламина (В<sub>12</sub>), биотин (витамин Н), витамин С. Биологическая роль. Источники. Суточная потребность. Признаки недостаточности.

2. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (вит. Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота и др.

3. Методы оценки насыщенности организма витаминами.

### **Литература**

#### **Основная**

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М.: Бином; Минск: Асар, 2008. С. 87–131.
2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М.: Медицина, 1990. С. 147–164.

#### **Дополнительная**

3. *Марри, Р.* Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. М.: Мир, 1993.
4. *Морозкина, Т. С.* Витамины: краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармакологических и биологических специальностей / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. Минск: Асар, 2002.

## Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Запомните суточную потребность человека в витаминах, существенное снижение которой неизбежно приводит к нарушению биохимических процессов и развитию заболеваний. Умейте назвать признаки гиповитаминозов.

1.1. Решите задачу. Как было установлено, синдром Вернике-Корсакова, проявляющийся нарушением тонуса мышц конечностей, снижением умственной способности и дезориентацией, связан с нарушением прочной связи апофермента и кофермента в ферменте транскетолазе. Симптомы этого синдрома могут проявляться у алкоголиков вследствие снижения поступления в организм витамина. Назовите этот витамин и его коферментные формы. С какими ферментами кроме транскетолазы работает этот витамин?

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.*

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

*Задание 1.* Данные врачебного осмотра пожилой женщины соответствовали периферической нейропатии. Лабораторные анализы подтвердили недостаточность тиамина. Активность каких процессов снижена при данном гиповитаминозе?

- А. Трансаминирование аминокислот.
- Б. Декарбоксилирование аминокислот
- В. Окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот
- Г. Трансметилирование аминокислот
- Д. Окислительное дезаминирование аминокислот

*Задание 2.* У больного после перенесенного инфаркта в течение двух суток значительно увеличилась активность аспаратаминотрансферазы в крови. Указать кофермент данного фермента и тип катализируемой им реакции. Производным какого витамина является этот кофермент?

*Задание 3.* При недостатке фолиевой кислоты страдает прежде всего кроветворение и деятельность желудочно-кишечного тракта. Какие соединения входят в состав  $B_9$ ? В реакциях какого типа участвует коферментная форма (назвать ее) этого витамина?

*Задание 4.* Гиповитаминоз пантотеновой кислоты практически не встречается, т. к. она обнаружена повсеместно: в тканях животных, растений, микроорганизмов. Указать кофермент данного витамина, назвать тип реакций, в которых он участвует. Изобразить схематически строение коферментной формы пантотеновой кислоты.

*Задание 5.* У мужчины, в течение многих лет злоупотреблявшего алкоголем, появились воспаления слизистой оболочки языка, губ, помутнение хрусталика, общая мышечная слабость. В анализе крови установлено значительное снижение активности глутатион-редуктазы эритроцитов. Активность фермента выросла после добавления в пробу рибофлавина. Какой кофермент входит в состав глутатион-редуктазы эритроцитов?

- А. ТПФ
- Б. ФАД
- В. НАД<sup>+</sup>
- Г. ТГФК
- Д. ПФ

*Задание 6.* Больному сделана операция резекции желудка, после чего вследствие недостаточности витамина  $B_{12}$  у него развилась анемия. Назовите коферментные формы этого витамина. В каких реакциях они принимают участие?

*Задание 7.* К врачу обратился пациент с жалобами на воспалительные процессы кожи (дерматит), сопровождающиеся усиленной деятельностью сальных желез, выпадением волос — типичными признаками недостаточности витамина Н. Объясните, какие реакции обмена нарушаются при этом.

## Эталоны ответов к решению заданий

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

1В; 2.2 (А – 4, Б – 3, В – 5, Г – 2, Д – 1).

*Для самостоятельной работы*

1.1 В<sub>1</sub>, его коферментные формы ТМФ, ТДФ (ТПФ), ТТФ.

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

Флуориметрические методы и цветные реакции используют для обнаружения и количественного определения витаминов в пищевых продуктах, лекарственных растениях и готовых лекарственных препаратах, а также для изучения обеспеченности организма витаминами.

#### Работа 1. *Качественные реакции на витамин В<sub>1</sub>*

Витамин В<sub>1</sub> состоит из пиримидинового и тиазолового колец. Витамин В<sub>1</sub> получил название тиамин поскольку содержит серу и азот.

##### 1. Реакция окисления

*Принцип метода.* В щелочной среде тиамин окисляется в тиохром феррицианидом калия. Тиохром обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора на флюороскопе.

*Ход работы.* К 1 капле 5%-ного раствора тиамин прибавляют 5–10 капель 10%-ного раствора едкого натра, 1–2 капли 5%-ного раствора феррицианида калия и взбалтывают смесь. После прогревания флюороскопа наблюдают синюю флюоресценцию при облучении раствора ультрафиолетовыми лучами.

##### 2. Диазореакция

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

*Ход работы.* К диазореактиву, содержащему 5 капель 1%-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 2. *Качественная реакция на витамин В<sub>2</sub>*

*Принцип метода.* Окисленная форма витамина В<sub>2</sub> представляет собой желтое флюоресцирующее в ультрафиолетовых лучах вещество. Реакция на витамин В<sub>2</sub> основана на его способности легко восстанавливаться. При этом раствор витамина В<sub>2</sub>, обладающий желтой окраской, приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, т. к. восстановленная форма витамина В<sub>2</sub> бесцветна.

*Ход работы.* В пробирку наливают 10 капель раствора витамина В<sub>2</sub>, добавляют 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и опускают зернышко металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается. Сравнивают обе формы витамина В<sub>2</sub> по флюоресценции.

#### Работа 3. *Качественная реакция на витамин РР*

*Принцип метода.* Витамин РР при нагревании с раствором ацетата меди образует плохо растворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

*Ход работы.* Наливают в пробирку 20 капель 3%-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 4. **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 5. **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 тиомочевинной 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.

#### Работа 6. **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.

##### **Определение содержания витамина С в плодах шиповника**

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

*Ход работы.* В коническую 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 вместимостью 100 мл вносят 1 мл полученного фильтрата, 1 мл 2%-ного HCl, 13 мл воды, перемешивают и титруют из микробюретки 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски, сохраняющейся в течение 30–60 с.

Для расчета содержания аскорбиновой кислоты используют формулу:

$$X = (0,088 \cdot A \cdot 100) / B,$$

где  $x$  — содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах на 100 г продукта; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, мг, соответствующее 1 мл 2,6-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.

##### **Определение содержания витамина С в моче**

Определение содержания витамина С в моче дает представление о запасах этого витамина в организме, так как имеется соответствие между концентрацией витамина в крови и количеством этого витамина, выделяемым с мочой. Однако при гиповитаминозе С содержание аскорбиновой кислоты в моче не всегда понижено. Часто оно бывает нормальным, несмотря на большой недостаток этого витамина в тканях и органах.

У здоровых людей введение *per os* 100 мг витамина С быстро приводит к повышению его концентрации в крови и в моче. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, задерживают принятый витамин С и его концентрация в моче не повышается. Моча здорового человека содержит 20–30 мг/сутки витамина С или 113,55–170,33 мкмоль/сут. У детей уровень этого витамина понижается при цинге, а также при острых и хронических инфекционных заболеваниях.

*Ход работы.* В стаканчик или колбочку отмеривают 10 мл мочи и 10 мл дистиллированной воды, перемешивают, подкисляют 20 каплями 10%-ного раствора хлористоводородной кислоты и титруют 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Для расчета содержания аскорбиновой кислоты в моче используют формулу:

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B},$$

где  $x$  — содержание аскорбиновой кислоты в мг/сут; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты (мг) соответствующее 1 мл 2,6-дихлорфенолиндофенола;  $A$  — результат титрования 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл;  $B$  — объем мочи, взятый для титрования, мл;  $B$  — среднее суточное количество мочи (для мужчин 1500 мл, для женщин 1200 мл).

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ВОДА И МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА. МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВОДНО-СОЛЕВОГО И МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА**

### **Актуальность темы**

Изменение состава минеральных веществ и нарушение распределения электролитов и жидкости в организме являются причиной многих серьёзных нарушений, коррекцией которых чаще всего приходится заниматься реаниматологам.

### **Цель занятия**

Закрепить знания электролитного состава жидкостей организма, роли микро- и макроэлементов в клетках и внеклеточной жидкости для последующего использования их во врачебной деятельности.

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### ***нормальной физиологии человека:***

- распределение воды в организме. Аквапорины;
- состав интерстициальной (межклеточной) и клеточной жидкостей организма;
- механизм действия  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - АТФазы;

#### ***общей химии:***

— понятия «осмотическое давление», «осмоляльность», «гипотоническое и гипертоническое изменение объёма», «рН», «буферные системы»;

#### ***биоорганической химии:***

- кетоновые тела, альбумины, глобулины;

#### ***биологической химии:***

- гормоны, ферменты, регуляцию активности ферментов.

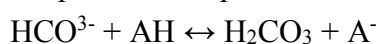
### **Для проверки исходного уровня знаний выполните следующие задания:**

*Задание 1.* В обычных условиях неизбежная суточная потеря воды взрослым человеком составляет около 2500 мл. Сколько воды теряется: а) с выдыхаемым воздухом; б) с мочой; в) через кожу в виде пота?

*Задание 2.* Что произойдет при помещении эритроцитов в гипотоническую среду?

- А. Они не изменятся
- Б. Наступит их сморщивание
- В. Произойдёт гемолиз

*Задание 3.* Кетоновые тела (АН) являются более сильными кислотами, чем угольная кислота. В какую сторону сместится равновесие реакции?



*Задание 4.* У больного появились отёки. Каковы возможные причины?

- А. Нарушение белоксинтезирующей функции печени
- Б. Сгущение крови
- В. Протеинурия
- Г. Недостаток вазопрессина

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### Вопросы для обсуждения

1. Натрий, калий, кальций, фосфор. Роль в метаболизме, гормональная регуляция их обмена.
2. Роль железа в организме (всасывание, транспорт, внутриклеточный обмен). Железодефицитные состояния и железодефицитные анемии. Биохимические подходы к созданию лекарственных препаратов для лечения железодефицитных анемий.
3. Роль серы, меди, марганца, магния, кобальта, цинка, селена, йода и фтора в метаболизме тканей.
4. Механизм действия гормонов, регулирующих водно-минеральный обмен (вазопрессина, натрий-уретического гормона, альдостерона).
5. Ренин-ангиотензиновая система и её роль в регуляции водно-солевого обмена.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 515–549.
2. *Берёзов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Берёзов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 449–452, 476–478.

#### Дополнительная

3. *Уайт, А.* Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер. М. : Мир, 1981. Т. 3. С. 1307–1314.
4. *Николаев, А.Я.* Биологическая химия / А. Я. Николаев, М : Медицинское информационное агенство, 2004. С. 399–411.

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Запомните физиологические концентрации основных катионов.

| Катионы                  | Плазма                             | Эритроциты      |
|--------------------------|------------------------------------|-----------------|
| Калий                    | 3,4–5,6 ммоль/л                    | 80–113 ммоль/л  |
| Натрий: взрослые<br>дети | 135–150 ммоль/л<br>130–145 ммоль/л | 13,5–22 ммоль/л |

Содержание **общего кальция** в сыворотке крови — **2,2–2,7 ммоль/л**,  
**ионизированного кальция** в сыворотке — **1,1–1,3 ммоль/л**.

*Задание 2.* Все минеральные вещества в зависимости от их концентрации в организме подразделяются на макро- и микроэлементы. Минеральные вещества, содержание которых превышает 50 мг/кг массы тела, относятся к макроэлементам. Перечислите эти элементы.

*Задание 3.* В состав каких хромопротеинов входит железо?

- А. Цитохрома P<sub>450</sub>
- Б. I и II комплексов дыхательной цепи
- В. III и IV комплексов дыхательной цепи
- Г. Церулоплазмина
- Д. Миоглобина

*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 (на основании материала лекции).

**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 юкстагломерулярного аппарата почек, что сопровождается выбросом в кровотоки ренина.

Используя приведенную схему, рассмотрите основные эффекты гормонов и ренина.



**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

**Задание 1.** У больного нефритом развились отёки. Что может служить их основной причиной?

- А. Уменьшение содержания в крови альбуминов
- Б. Уменьшение содержания в крови глобулинов
- В. Увеличение содержания в крови белков острой фазы
- Г. Снижение концентрации глюкозы в плазме крови
- Д. Снижение концентрации натрия в плазме

**Задание 2.** Объяснить, почему и недостаток, и избыточное поступление витамина Д в организм будет приводить к деструкции костной ткани.

**Задание 3.** Назовите минеральные вещества, выполняющие следующие функции:

- А. Поддержка электролитного баланса
- Б. Поддержка определённого осмотического давления
- В. Создание благоприятных условий растворимости белков клеток крови
- Г. Участие в механизмах возбудимости
- Д. Влияние на обменные процессы путём активирования или ингибирования ферментов
- Е. Минерализация костей скелета и зубов

**Задание 4.** Во время тиреоидэктомии хирург не заметил расположенных в толще щитовидной железы 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<sup>++</sup> в плазме крови
- Г. Вследствие увеличения содержания Ca<sup>++</sup> в плазме крови

**Задание 5.** Отёк головного мозга — опасное осложнение травм черепа. Он может также развиваться при неправильной тактике лечения кровопотери (из-за избытка введенной в организм жидкости). Нарушение функции каких классов аквапоринов при этом отмечается?

- А. Аквапоринов АQ P<sub>1</sub> и АQ P<sub>4</sub>  
Б. Акваглицеропоринов  
В. Аквапоринов АQ P<sub>2</sub>

### Эталоны ответов к решению заданий

*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.

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

Работа 1. **Определение содержания натрия в сыворотке крови фотометрическим методом**

*Принцип метода.* Метод основан на том, что содержащийся в образце натрий осаждается уранилацетатом магния. Уранил-анионы, оставшиеся в растворе, способны образовывать окрашенный комплекс с тиогликолятом. Концентрация натрия прямо пропорциональна разности между холостой (без преципитации) и опытной пробам.

*Ход работы.* Берут 2 центрифужные пробирки. В 1-ю пробирку (опытная проба) отмеривают 1,0 мл реагента 1 и затем добавляют 0,02 мл сыворотки крови. Во 2-ю пробирку (стандартная проба) вносят 1,0 мл реагента 1 + 0,02 мл стандартного раствора. **Необходимо строго соблюдать последовательность внесения реактивов в пробирки (сыворотку добавляют к реагенту)!** Закрывают пробирки и 30 с встряхивают их содержимое. Через 5 мин вновь так же встряхивают и оставляют пробы на 30 мин в темноте. Затем центрифугируют 10 мин (1000 об/мин).

Из каждой центрифужной пробирки отбирают по 0,02 мл надосадочной жидкости в обычные пробирки и добавляют в каждую по 2,0 мл реагента 2. Одновременно готовят холостую пробу (0,02 мл реагента 1 + 2,0 мл реагента 2). Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют 5 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность всех проб против воды, используя кюветы с рабочей шириной 5 мм (длина волны — 400 нм).

*Расчёт:* концентрацию Na<sup>+</sup> (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<sub>хол</sub>, E<sub>оп</sub> и E<sub>ст</sub> — оптическая плотность холостой, опытной и стандартной проб, соответственно; C<sub>ст</sub> — концентрация стандартного раствора (150 ммоль/л).

*Клинико-диагностическое значение.* Содержание Na<sup>+</sup> в сыворотке крови в норме составляет 135-150 ммоль/л.

Уменьшение концентрации натрия в сыворотке крови обуславливает клинический симптомокомплекс, характеризующийся появлением апатии, потерей аппетита, тошнотой, рвотой, нарушением рефлексов, тахикардией, падением кровяного давления, психозами.

Гипернатриемия сопровождается тяжёлым общим состоянием больных, повышением температуры тела, тахикардией.

Работа 2. **Определение содержания калия в сыворотке крови турбодиметрическим методом**

*Принцип метода.* Метод основан на способности ионов калия образовывать стабильную суспензию с ионами тетрафенилбората. Мутность суспензии пропорциональна концентрации ионов калия.

*Ход работы.* Берут три пробирки. В 1-ю пробирку (опытная проба) наливают 2,0 мл реагента и добавляют 0,04 мл сыворотки крови, во 2-ю пробирку (стандартная проба) вносят

2,0 мл реагента + 0,04 мл стандартного раствора, в 3-ю пробирку (холостая проба) добавляют только реагент (2,0 мл). **Необходимо строго соблюдать последовательность внесения реактивов в пробирки (сыворотку добавляют к реагенту)!** Перемешивают и инкубируют 2 мин. Вновь тщательно перемешивают и инкубируют точно 10 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность опытной пробы ( $E_{оп}$ ) и стандартного раствора ( $E_{ст}$ ) против холостой пробы, используя кюветы с рабочей шириной 5 мм (длина волны 590 нм). Перед фотометрированием пробы необходимо взболтать.

*Расчёт:* концентрацию  $K^+$  (ммоль/л) определяют по формуле:

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

*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 мочевой пузырь.

Гиперкалиемия сопровождается ощущением «ползания мурашек», исчезновением сухожильных рефлексов, нарушением функции сердца. При двукратном превышении содержания калия в крови сердце останавливается в фазе диастолы.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ ПО ТЕМАМ: «ГОРМОНЫ», «БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ»**

1. Свойства гормонов. Особенности биологического действия. Получение и практическое применение гормональных препаратов.
2. Рецепторы к гормонам, классификация, строение мембранных рецепторов.
3. G-белки, их роль в механизме действия гормонов, связывающихся с мембранными рецепторами.
4. Перечислить эффекторные системы и вторичные посредники проведения гормонального сигнала в клетку. Механизмы образования вторичных посредников.
5. Роль кальция в механизме передачи гормонального сигнала.
6. Растворимая и мембраносвязанная гуанилатциклазы, механизм активации, реализация эффекта.
7. Механизмы усиления гормонального сигнала в клетке.
8. Гормоны — белки: простые и сложные. Место образования, пример молекулярного действия.
9. Гормоны — производные аминокислот. Место образования, механизмы молекулярного действия.
10. Общие принципы синтеза гормонов белково-пептидной природы.
11. Общие принципы синтеза гормонов стероидной природы.
12. Вазопресин, химическая природа, механизм действия. Влияние на метаболизм.
13. Гормон роста, механизм действия, влияние на метаболизм.
14. Йодсодержащие гормоны щитовидной железы. Химическая природа, особенности синтеза, механизм действия, влияние на метаболизм.
15. Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфора в организме. Место синтеза, химическая природа, механизм действия.
16. Глюкагон. Химическая природа, место синтеза, механизм действия, влияние на метаболизм углеводов и липидов.
17. Гормоны мозгового вещества надпочечников. Химическая природа, схема синтеза, механизм действия.
18. Гормоны коры надпочечников: глюко- и минералокортикоиды. Химическая природа, особенности строения рецепторов, механизм действия, влияние на метаболизм.

19. Инсулин. Химическая природа, особенности синтеза, строение рецепторов, механизмы передачи гормонального сигнала. Влияние на метаболизм углеводов, липидов, белков.
20. Половые гормоны, химическая природа, особенности строения рецепторов, механизм передачи сигнала.
21. Сахарный диабет. Нарушения обмена углеводов, биохимическая диагностика, диагностическое значение гликемических кривых при сахарной нагрузке.
22. Сахарный диабет: механизм кетонемии и нарушение реакций гликозилирования. Метаболизм глюкозы в инсулиннезависимых тканях. Восстановительный путь обмена глюкозы, его роль в норме и при сахарном диабете.
23. Пищевая ценность углеводов, липидов и белков. Незаменимые и условно незаменимые факторы питания. Роль волокнистых полисахаридов пищи для работы пищеварительного тракта и обменных процессов в организме.
24. Энергозатраты организма взрослого человека в состоянии покоя в норме и изменения их при патологии. Пути использования АТФ в состоянии покоя. Реальный и желательный вклад в энергопродукцию белков, жиров и углеводов.
25. 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).
26. Метаболические процессы депонирования углеводов и липидов пищи.
27. Квашиоркор и маразм — клинические формы синдрома недостаточности питания. Характерные черты, сходство и принципиальные отличия.
28. 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).
29. Витаминоподобные вещества: биофлавоноиды (вит. Р), холин, липоевая кислота, парааминобензойная кислота, витамин U, карнитин, инозитол, пангамовая кислота и др.
30. Образование и физиологическая роль активных форм кислорода и азота. Повреждающее действие свободных радикалов и активных форм кислорода. Антиоксидантная защита.
31. Токоферол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гиповитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина Е.
32. Ретинол. Химическая природа, участие в метаболизме, признаки гипо- и гипервитаминоза, суточная потребность, основные источники витамина А.
33. Витамин D. Химическая природа, всасывание, механизм действия.
34. 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, электролитного состава и рН жидкостей организма.
35. Обмен натрия и калия. Особенности распределения в организме. Регуляция обмена.
36. Потребность в кальции и фосфоре. Механизмы всасывания. Распределение в организме. Гормональная регуляция обмена кальция и фосфора.
37. Микроэлементы. Биологическая роль железа, меди, кобальта, йода, магния, цинка, марганца, фтора, селена. Обмен микроэлементов в организме. Обмен железа. Трансферрин и ферритин.
38. Оценка обеспеченности организма витаминами. Биохимические основы создания поливитаминных и витаминно-минеральных комплексов.

## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА

### **Актуальность темы**

Химический состав крови отражает состояние обмена веществ в организме. Биохимический анализ крови проводится с целью диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний, установления прогноза болезни и оценки эффективности проводимого лечения. Важное диагностическое значение имеет выяснение количественных взаимоотношений между отдельными фракциями белков плазмы крови. На занятии студенты рассматривают основные показатели биохимического анализа крови, закрепляя знания о происхождении веществ крови, 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**

Закрепить знания о происхождении компонентов плазмы крови и их физиологических концентрациях, диагностическом значении наиболее важных биохимических компонентов крови. Ознакомиться с принципами исследования белкового состава крови, понять диагностическое значение определения количественного соотношения белковых фракций и отдельных белков плазмы крови. Получить представление о механизмах гемостаза и изучить функционирование системы свертывания крови.

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

**общей химии:**

- титрометрические методы анализа;

**биоорганической химии:**

- «цитратная кровь»;

**нормальной физиологии:**

- гемостаз;

**биологической химии:**

– физико-химические свойства белков, методы разделения белков (высаливание, электрофорез), количественное определение белка плазмы крови.

**Для проверки исходного уровня знаний ответьте на следующие вопросы:**

1. Что понимают под гемостазом? Виды гемостаза.
2. Что такое «цитратная кровь»?

### **Вопросы для обсуждения**

1. 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. 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).

3. Ферменты плазмы крови (секреторные, индикаторные, экскреторные). Диагностическое значение определения активности ферментов плазмы крови.

4. 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.

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

6. Витамин К (химическая природа, разновидности, природные источники, роль в гемокоагуляции).

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

8. Фибринолитическая система, механизмы фибринолиза. Плазминовая система (компоненты и их происхождение, механизм действия).

### Литература

#### Основная

1. Биологическая химия / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 549 – 585.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 143–145, 439–447, 464–472.

#### Дополнительная

3. Иванов, Е.П. Руководство по гемостазиологии / Е. П. Иванов. Минск : Беларусь, 1991. 304 с.
4. Василькова Т. В. Молекулярные механизмы гемостаза: учеб. пособие / Т. В. Василькова. Минск : МГМИ, 1999. 57 с.

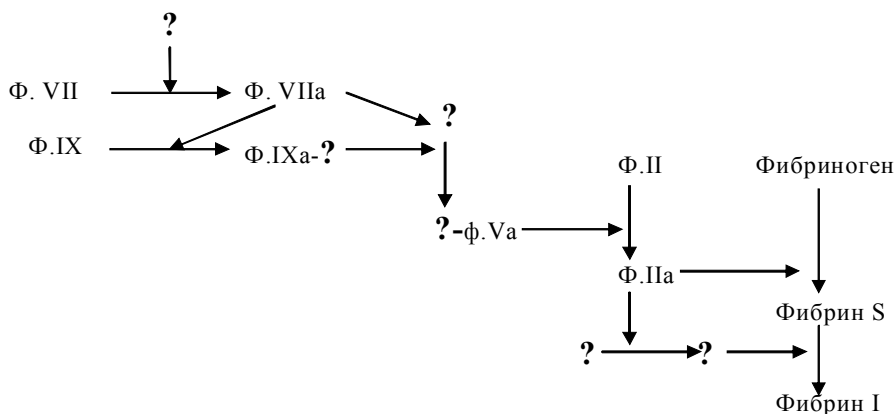
### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Назовите индикаторные ферменты крови и поясните их диагностическое значение.

*Задание 2.1.* Напишите схему внутреннего пути свертывания крови.

2.2. Запомните активаторы фактора Хагемана.

2.3. На схеме внешнего механизма свертывания крови (см. справа) замените знак вопроса соответствующими факторами.



### 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
- Б. Состояние отдельных фаз гемокоагуляции
- В. Посткоагуляционную фазу
- Г. Антикоагулянтную систему
- Д. Систему фибринолиза

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

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

*Задание 1.* Альбумины плазмы крови характеризуются:

- А. Хорошей растворимостью в воде
- Б. Молекулярной массой около 70000 Да
- В. Содержат много дикарбоновых аминокислот
- Г. Не являются гликопротеинами
- Д. Содержание в плазме крови в норме составляет 35–50 г/л

*Задание 2.* Укажите ошибочное утверждение. Альбумины плазмы крови:

- А. Синтезируются в эритроцитах
- Б. Сравнительно быстро обновляются
- В. Играют важную роль в создании онкотического давления
- Г. Выполняют роль белкового резерва организма
- Д. Осуществляют транспорт метаболитов (жирных кислот, билирубина, альдостерона,  $\text{Ca}^{2+}$ ) и лекарственных веществ (антибиотиков, сульфаниламидов, салицилатов, барбитуратов, сердечных гликозидов и др.)

*Задание 3.* Глобулины плазмы крови характеризуются:

- А. Большинство глобулинов — гликопротеины
- Б. Имеют большую молекулярную массу в сравнении с альбуминами
- В. Многие глобулины — сравнительно гидрофобные белки
- Г. Выпадают в осадок только в насыщенном растворе  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Д. Физиологические концентрации глобулинов в плазме крови — 20–35 г/л

*Задание 4.* Укажите верные утверждения. Глобулины плазмы крови:

- А. Принимают участие в создании гуморального иммунитета
- Б. Осуществляют транспорт органических веществ (метаболитов, гормонов, витаминов)
- В. Осуществляют транспорт катионов ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и др.)
- Г. Являются ингибиторами протеолитических ферментов
- Д. Играют ведущую роль в создании онкотического давления

*Задание 5.* Какие функции выполняют приведенные ниже глобулины крови?

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| 1. Церулоплазмин             | А. Участвует в транспорте железа ( $\text{Fe}^{3+}$ ) по кровеносному руслу                        |
| 2. Трансферрин               | Б. Ведущая роль в транспорте меди к тканям   |
| 3. $\alpha_2$ -Макроглобулин | В. Обладает оксидазной активностью   |
| 4. Гаптоглобин               | Г. Связывает и транспортирует свободный гемоглобин плазмы в клетки ретикулоэндотелия               |
|                              | Д. Ингибирует протеолитические ферменты крови (трипсин, химотрипсин, тромбин, плазмин, калликреин) |

*Задание 6.* Какие из приведенных утверждений характеризуют С-реактивный белок?

- А. Дает преципитат с С-полисахаридом пневмококка
- Б. Состоит из 5 субъединиц с молекулярной массой 23 000 Да каждая
- В. Постоянно в малых количествах содержится в крови практически здоровых людей
- Г. Концентрация в плазме крови при воспалении или некрозе тканей может увеличиваться в 20–25 раз
- Д. Является парапротеином

*Задание 7.* В процессе тромбообразования различают внешний и внутренний пути свертывания крови. На каком этапе свертывания крови они не совпадают?

- А. Превращение протромбина в тромбин
- Б. Превращение фибриногена в фибрин
- В. Образование протромбиназы (активного тромбoplastина крови)
- Г. Ретракция кровяного тромба
- Д. Превращение плазминогена в плазмин

*Задание 8.* Какое из приведенных утверждений не характерно для фактора Хагемана?

- А. Является сериновой протеазой
- Б. Активируется калликреином
- В. Активируется при контакте крови с чужеродной поверхностью (стекло, каолин)
- Г. Активируется тромбоцитарным тромбoplastином
- Д. Активируется тканевым тромбoplastином

*Задание 9.* Расположите в правильном порядке события, происходящие при образовании фибринового сгустка:

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

*Задание 10.* Наблюдаемая при наследственной недостаточности фактора XIII повышенная кровоточивость объясняется невозможностью образования стабильного фибринового сгустка. Какова роль плазменной трансглутаминазы (фибриназы) в образовании гемостатического тромба?

- А. Участие в синтезе фибриногена в печени
- Б. Участие в образовании фибрин-мономера
- В. Участие в образовании растворимых фибрин-мономерных комплексов
- Г. Участие в ковалентной сшивке фибриновых молекул
- Д. Участие в ретракции гемостатического тромба

*Задание 11.* Гиповитаминоз К сопровождается повышенной кровоточивостью. Какова роль витамина К в гемокоагуляции?

- А. Необходим для активации свертывающей системы после повреждения сосуда
- Б. Необходим для одновременного активирования свертывающей и противосвертывающей систем
- В. Участвует в постсинтетическом созревании II, VII, IX и X факторов свертывания крови
- Г. Участвует в связывании ионов кальция
- Д. Участвует в синтезе V и VIII факторов свертывания крови

*Задание 12.* Выберите правильные утверждения, характеризующие участие ионов кальция (ф. IV) в гемокоагуляции:

- А. Являются вторичными посредниками в действии ряда гормонов
- Б. Стимулирование процессов перекисного окисления липидов

В. Связывание на тромбопластинах кальций-зависимых факторов свертывания крови (ф. IX, ф. X, ф. VII, ф. II)

Г. Стабилизация структуры тромбопластинов

Д. Активирование некоторых факторов свертывания крови

*Задание 13.* Дефицит антитромбина III — частая причина тромбозов. Какова антикоагулянтная роль антитромбина III?

А. Образование необратимого комплекса с гепарином

Б. Ингибирует витамин К-зависимое карбоксилирование остатков глутамата

В. Необратимо инактивирует большинство сериновых протеаз свертывающей системы

Г. Затрудняет связывание факторов свертывания на тромбопластинах

Д. Разрушает V и VIII факторы свертывания крови

*Задание 14.* Что определяет противосвертывающую активность гепарина?

А. Связывает ионы кальция

Б. Активирует антитромбин III

В. Образует нестабильные комплексы с некоторыми факторами свертывающей системы, выключая их из процесса гемокоагуляции

Г. Осуществляет неферментативный фибринолиз

Д. Ингибирует витамин К-зависимое карбоксилирование остатков глутамата протеинов С и S

*Задание 15.* Отберите те протеолитические ферменты, при действии которых возможно превращение плазминогена в плазмин:

А. Тканевый активатор плазминогена

В. Протеин С (S)      Д.  $\alpha_2$ -Макроглобулин

Б. Урокиназа

Г.  $\alpha_2$ -Антиплазмин

*Задание 16.* Расположите в правильном порядке события, происходящие при фибринолизе:

А. Плазминоген осаждается на фибриновых нитях

Б. Тканевый активатор плазминогена активирует плазминоген

В. Тканевый активатор плазминогена связывается с фибрином

Г. Плазминоген превращается в плазмин

Д. Плазмин гидролизует фибрин

### Эталоны ответов к решению заданий

#### Для самостоятельной работы:

4.1 (А – 2, 3, 4, 5, 6; Б – 1, 7);

5А — 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).

### Самостоятельная работа (80 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

Работа 1. *Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза на ацетилцеллюлозе*

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

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

*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 — 52–65 %; глобулины — 29–54 %:  $\alpha_1$ -глобулины — 2–5 %,  $\alpha_2$ -глобулины — 7–13 %,  $\beta$ -глобулины — 8–14 %,  $\gamma$ -глобулины — 12–22 %.

### 1. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови

*Ход работы.* Кюветные отделения аппарата для электрофореза заполняют буферным раствором. Полоски ацетилцеллюлозы смачивают буфером и туго натягивают (не должны провисать) в промежутке между кюветными отделениями. Через полоску носителя в течение 5 минут пропускают электрический ток. Отключают электрофоретическую камеру, на поверхность ацетилцеллюлозной плёнки у катода на линию старта наносят сыворотку крови. Прибор включают вновь и проводят электрофоретическое разделение белков.

### 2. Окраска электрофореграмм

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

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

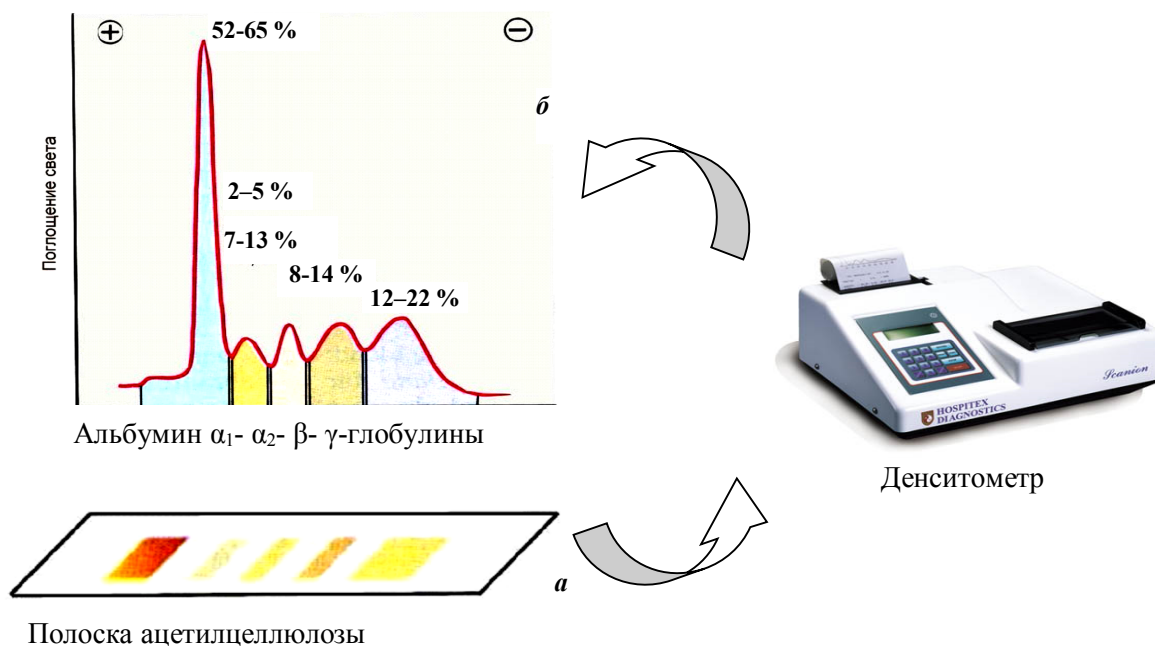
*Денситометрия электрофореграмм* проводится с использованием денситометра. Денситометр – фотометрический прибор, обеспечивающий сканирование электрофореграммы. Целью сканирования является получение денситограммы – графического изображения распределения концентрации красителя вдоль электрофореграммы,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

*Фотометрия элюатов фракций белка.* Полоски ацетилцеллюлозы промокают фильтровальной бумагой, окрашенные белковые фракции вырезают и помещают в соответствующие пронумерованные пробирки с элюирующим раствором (в 5 пробирок наливают из бюретки по 10 мл 0,1н NaOH). Через 20 мин против воды (контроль) определяют оптическую плотность каждого раствора на фотоэлектрокалориметре (кювета 10 мм, красный светофильтр с  $\lambda = 670$  нм). Зная оптические плотности растворов, соответствующие каждой фракции, вычисляют сумму оптических плотностей всех фракций и выражают относительное содержание белка в каждой фракции.

Например:

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

$$E_{\text{альбум}} = E_{\alpha_1\text{-глобул}} = E_{\alpha_2\text{-глобул}} = E_{\beta\text{-глобул}} = E_{\gamma\text{-глобул}} = \Sigma = \dots$$
$$\% = \% = \% = \% = \% =$$



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

Вывод:

## Работа 2. *Определение содержания кальция в плазме крови*

Кальций играет важную роль в осуществлении процессов жизнедеятельности. Он влияет на проницаемость биологических мембран, возбудимость нервов и мышц, участвует в нервно-мышечной проводимости, сокращении и расслаблении мускулатуры (в том числе мышцы сердца), секреторных процессах, формировании кости и хряща; воздействует на обмен веществ в клетках, является важным фактором гемостаза и посредником действия гормонов в клетке.

Количественное определение кальция в плазме крови имеет важное значение для диагностики ряда заболеваний и при наблюдении за ходом лечения.

**В норме концентрация общего кальция в плазме крови — 2,2–2,7 ммоль/л (9–11 мг%).**

*Принцип метода.* Индикатор хромоген черный ЕТ-00 образует с кальцием соединение розово-фиолетового цвета. При титровании трилоном Б (двухзамещенная натриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты, образующая прочные комплексы с ионами кальция) такого окрашенного раствора произойдет изменение окраски в сине-розовый цвет в эквивалентной точке, соответствующей связыванию трилоном Б всех ионов кальция в растворе.

*Ход работы.* В колбочку наливают 25 мл H<sub>2</sub>O и вносят 1 мл аммиачного буферного раствора. Затем приливают 1 мл исследуемой плазмы крови и 2 капли индикатора хромогена черного. Раствор приобретает розово-фиолетовый цвет. Затем раствор титруют 0,002М раствором трилона Б до сине-розовой окраски. По объему трилона Б, пошедшего на титрование, рассчитывают содержание кальция в плазме крови.

$$X \text{ (мг\%)} = \frac{0,002 \cdot 40,8 \cdot 100 \cdot V_T}{1},$$

где 0,002 — молярность раствора трилона Б; 40,8 — молекулярный вес Са; 100 — коэффициент для пересчета в мг%; 1 — объем сыворотки, взятый для анализа;  $V_T$  — объем трилона Б, израсходованный на титрование.

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/л) — 0,245.  $C \text{ (ммоль/л)} = X \cdot 0,245$

## ТЕМА ЗАНЯТИЯ. БИОХИМИЯ ПОЧЕК И МОЧИ. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МОЧИ

### Актуальность темы

Анализ мочи — обязательная составляющая плана обследования больного. На основании анализа мочи диагностируют заболевания почек — как собственно почечную патологию, так и поражение почек и мочевыводящих путей при заболеваниях других органов. Кроме того, на основании анализа мочи можно заподозрить или подтвердить наличие заболеваний печени, сердечной мышцы, поджелудочной железы, диагностировать различные виды желтухи, провести дифференциальную диагностику сахарного и несахарного диабета, определить тип некоторых гормональных нарушений и т. д.

### Цель занятия

Уметь применять знания о физиологических и патологических компонентах мочи для решения вопросов диагностики, профилактики и прогноза заболеваний, связанных с почечной и внепочечной патологией.

### Требования к исходному уровню знаний

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*  
*нормальной физиологии человека:*

- механизм образования мочи почками;
- гистологии:*
- строение нефрона.

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

*Задание 1.* Под действием гидростатического давления кровь фильтруется через полупроницаемую мембрану и попадает в пространство капсулы Шумлянско-Боумана — это первичная моча. Каков ее качественный состав?

- А. Содержит форменные элементы крови
- Б. Аналогична составу крови, но не содержит белков и форменных элементов
- В. Аналогична составу крови и содержит белки с молекулярной массой до 70 кДа, но отсутствуют форменные элементы
- Г. Состав первичной мочи отличается от состава плазмы крови по всем компонентам

*Задание 2.* Каналец нефрона состоит из 3-х отделов: проксимального канальца, петли Генле и дистального канальца. В канальцах первичная моча подвергается реабсорбции. Параллельно осуществляется и секреция определенных веществ. Какое количество глюкозы реабсорбируется в проксимальном канальце здоровой почки?

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

*Задание 3.* В дистальном канальце нефрона наряду с процессами, связанными с разведением и концентрированием мочи, осуществляются реабсорбционные и секреторные процессы, главная задача которых — сохранить кислотно-щелочное равновесие организма и, в частности, постоянство рН крови. Какие ионы секреторируются канальцами?

- А.  $K^+$     Б.  $Na^+$     В.  $H^+$     Г.  $NH_4^+$     Д.  $Cl^-$     Е.  $HPO_3^-$

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.*

### Вопросы для обсуждения

1. Нормальные показатели объема мочи, ее плотности, цвета, прозрачности. Факторы, обуславливающие изменения показателя кислотности мочи.
2. Неорганические составные части мочи.

3. Органические составные части мочи в норме: мочевины, мочевая кислота, креатинин, аминокислоты, безазотистые органические компоненты мочи, гормоны и их метаболиты.

4. Диагностическое значение определения в моче аминокислот, которыми богаты специализированные белки: гидроксипролина (в коллагене), 3-метилгистидина (в актине и миозине). Определение метаболитов аминокислот для диагностики фенилкетонурии (нарушение обмена фенилаланина), алкаптонурии (нарушение обмена тирозина), гиперпролинурии (нарушение окисления пролина), цитруллинурии (нарушение синтеза мочевины).

5. Диагностическое значение определения патологических составных частей мочи:

а) протеинурия почечная и внепочечная; ферменты, определяемые в моче с диагностической целью;

б) глюкозурия при сахарном диабете и почечная глюкозурия;

в) гематурия почечная и внепочечная, гемоглобинурия;

г) кетонурия при голодании, диабете, ацидозах иного происхождения;

д) желчные пигменты, определяемые с целью дифференциальной диагностики желтух, порфирины.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 599 – 606.

2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 473–487.

#### Дополнительная

3. *Чиркин, А. А.* Диагностический справочник терапевта / А. А. Чиркин, А. Н. Окорочков, И. И. Гончарик. Минск : Беларусь, 1993. С. 369–390.

4. *Камышиников, В. С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В. С. Камышиников. Минск : Беларусь, 2000. С. 171–208, 275–347, 358–428.

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Чтобы заподозрить у больного сахарный диабет, обратите внимание на объем выделяемой мочи и ее удельный вес. При диабете, несмотря на большую суточную экскрецию мочи, ее удельный вес остается высоким. Для уточнения диагноза необходимо определить содержание сахара в моче и сравнить эти данные с результатами определения уровня гликемии.

1.1. Решите задачу. Подберите пару симптомов, характерных для диабета:

А. D мочи = 1,02

1. Суточный диурез 6 л.

Б. D мочи = 1,022

2. Суточный диурез 2 л.

В. D мочи = 1,20

3. Суточный диурез 1 л.

Г. D мочи = 1,5

4. Суточный диурез 20 л.

1.2. Решите задачу. Подберите пару симптомов, характерных для диабета:

А. Глюкозурия — нет

1. Гликемия 5,5 ммоль/л

Б. Глюкозурия — 1 %

2. Гликемия 15,0 ммоль/л

В. Глюкозурия — следы

3. Гликемия 8,0 ммоль/л

*Задание 2.* Для дифференциальной диагностики различного рода желтух изучают цвет мочи и определяют в ней наличие желчных пигментов. Необходимо вспомнить, каким образом осуществляется распад желчных пигментов, содержание каких соединений увеличивается в крови и моче, каким образом изменяется цвет стула. Следует помнить, что через почечный фильтр способен проникать связанный билирубин (в отличие от свободного билирубина, не способного преодолеть почечный «фильтр», молекула диглюкуронида билирубина мала).

2.1. Решите задачу. Подберите параметры анализа мочи, характерные для механической желтухи:

А. Моча «цвета пива»

1. Билирубин

Б. Моча соломенно-желтая

2. Уробилин (истинный)

В. Моча красного цвета

3. Стеркобилиноген

Г. Светло-желтая моча

4. Урохром



**Задание 3.** Диагностика панкреатита во многом основывается на определении активности ферментов мочи. Вспомните, какие ферменты, способные перейти в мочу, секретирует поджелудочная железа. Назовите фермент, активность которого обязательно определяется в моче при панкреатите:

- |                 |                        |             |
|-----------------|------------------------|-------------|
| А. Фосфоорилаза | В. Лактатдегидрогеназа | Д. Сахараза |
| Б. Амилаза      | Г. Пепсин              |             |

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

**Задание 1.** В клинику поступил больной с жалобами на обильное и частое мочеиспускание, жажду, которые его беспокоят даже ночью. Суточное количество мочи = 10 л с низкой относительной плотностью. Каков предположительный диагноз?

- |                           |                     |
|---------------------------|---------------------|
| А. Сахарный диабет        | Г. Болезнь Аддисона |
| Б. Несахарный диабет      | Д. Микседема        |
| В. Болезнь Иценко-Кушинга |                     |

**Задание 2.** У больного острым гломерулонефритом суточное количество мочи = 500 мл. Как называется этот симптом?

- |             |             |                |
|-------------|-------------|----------------|
| А. Анурия   | В. Олигурия | Д. Изостенурия |
| Б. Полиурия | Г. Никтурия |                |

**Задание 3.** У больного острым гломерулонефритом выявлена макрогематурия. Какой цвет мочи у данного больного?

- |               |            |                        |
|---------------|------------|------------------------|
| А. Красный    | В. Черный  | Д. Цвета мясных помоев |
| Б. Коричневый | Г. Розовый |                        |

**Задание 4.** У больного в результате отравления солями свинца в моче появилось много протопорфиринов. Какой цвет мочи у данного больного?

- |               |            |                        |
|---------------|------------|------------------------|
| А. Зеленый    | В. Черный  | Д. Цвета мясных помоев |
| Б. Коричневый | Г. Розовый |                        |

**Задание 5.** У больного инфекционным гепатитом с желтухой в моче выявлено высокое содержание билирубина. Какой цвет мочи у данного больного?

- |                     |            |                        |
|---------------------|------------|------------------------|
| А. Соломенно-желтый | Г. Розовый | Д. Цвета мясных помоев |
| Б. Коричневый       | В. Черный  |                        |

**Задание 6.** У больного хроническим нефритом выявлено нарушение концентрационной функции почек. Как называется это состояние?

- |                |             |             |
|----------------|-------------|-------------|
| А. Никтурия    | В. Олигурия | Д. Полиурия |
| Б. Изостенурия | Г. Анурия   |             |

**Задание 7.** У больного в моче содержание мочевой кислоты составило 9,5 ммоль/24 ч. Какую патологию можно заподозрить?

- |                             |                                |
|-----------------------------|--------------------------------|
| А. Кахексия                 | Г. Печеночная недостаточность. |
| Б. Оротатацидурия           | Д. Подагра                     |
| В. Почечная недостаточность |                                |

**Задание 8.** Больному, страдающему хроническим гепатитом, была проведена нагрузка бензоатом натрия. При этом об обезвреживающей функции печени судили на основании обнаружения в моче:

- |                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| А. Бензойной кислоты    | Г. Гиппуровой кислоты |
| Б. Лимонной кислоты     | Д. Щавелевой кислоты  |
| В. Валериановой кислоты |                       |

**Задание 9.** Содержание какого из продуктов белкового обмена повысилось в моче у спортсмена с развитой мускулатурой после спортивных соревнований?

- А. Мочевой кислоты                      В. Креатинин                      Д. Аммиака  
Б. Креатин                                      Г. Мочевин

**Задание 10.** Для уточнения диагноза «прогрессирующая мышечная дистрофия» у больного был сделан анализ мочи. Какое соединение при этом будет обнаруживаться в моче?

- А. Порфирины                                В. Креатинин                      Д. Кальмодулин  
Б. Креатин                                      Г. Миоглобин

#### **Эталоны ответов к решению заданий**

**Для самопроверки исходного уровня знаний:**

1В; 2А; 3А, В, Г.

**Для самостоятельной работы:**

1.1 (Г – 1); 1.2 (Б – 2); 2.1 (А – 1); 3Б.

### **Самостоятельная работа (2 ч)**

#### **Инструкции к практическому занятию**

##### **Работа 1. *Определение удельного веса мочи***

Поскольку отдельные порции мочи отличаются по удельному весу и химическому составу, удельный вес определяют в моче, собранной за сутки. В норме удельный вес мочи коррелирует с количеством «суточной» мочи и составляет 1,010–1,025. При различных состояниях он может колебаться от 1,000 до 1,060.

*Ход работы.* В цилиндр наливают мочу и осторожно погружают в нее урометр. Отсчет ведется по делению шкалы урометра, соответствующему нижнему мениску жидкости.

##### **Работа 2. *Определение кислотности мочи***

В норме реакция мочи слабо кислая.

*Ход работы.* На лакмусовую бумажку наносят каплю мочи и определяют ее реакцию:

- 1) синяя лакмусовая бумага краснеет, красная не изменяет цвета — кислая реакция;
- 2) красная бумага синеет, синяя не изменяет цвета — щелочная реакция;
- 3) обе бумаги не изменяют своего цвета — нейтральная реакция.

Можно использовать и другие индикаторные бумаги.

##### **Работа 3. *Качественное определение неорганических составных частей мочи***

Из минеральных солей более всего с мочой выделяется хлористого натрия — 8–15 г/сутки.

1. **Определение хлоридов.** Ионы хлора реагируют с азотнокислым серебром с образованием осадка хлористого серебра, не растворяющегося в азотной кислоте.

*Ход работы.* К 1 мл мочи (20 капель) добавляют 3–5 капель 1%-ного раствора  $\text{AgNO}_3$  и 2 капли 10% раствора азотной кислоты. Выпадает белый осадок  $\text{AgCl}$ , темнеющий на свету, нерастворимый в азотной кислоте.

2. **Определение сульфатов.** В кислой среде сульфаты с хлористым барием образуют белый осадок  $\text{BaSO}_4$ .

*Ход работы.* К 20 каплям мочи приливают 5 капель 10%-ного раствора  $\text{HCl}$  и по каплям, медленно, добавляют раствор  $\text{BaCl}_2$  до образования осадка. Выпавший осадок отфильтровывают. В фильтрате обнаруживают соли эфиросерных кислот, нагревая фильтрат в кипящей водяной бане (5–10 мин). При этом снова появляется муть из-за того, что из эфиросерных кислот освобождается серная кислота.

3. **Определение фосфатов.** Фосфаты мочи при реакции с молибденовым реактивом образуют желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

*Ход работы.* В пробирку наливают 20–30 капель молибденового реактива и нагревают раствор до закипания (не кипятить). Затем добавляют несколько капель мочи. Выпадает желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

4. Определение кальция. Кальций мочи выпадает в осадок при добавлении щавелевокислого аммония.

*Ход работы.* К 20 каплям мочи приливают 1–2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и 2–3 капли 5% раствора щавелевокислого аммония. Выпадает кристаллический осадок щавелевокислого кальция.

#### Работа 4. **Качественное определение органических составных частей мочи**

1. *Определение белка.* В норме в моче определяются следы белка.

1.1. Проба Геллера. Под действием азотной кислоты белок образует нерастворимый осадок.

*Ход работы.* В пробирку осторожно наливают около 1 мл концентрированной  $\text{HNO}_3$  и сверху настилают 1 мл мочи. При наличии в моче белка на границе жидкостей появляется мутное беловатое кольцо.

1.2. Осаждение белка сульфосалициловой кислотой. Эта проба является самой чувствительной реакцией на белок.

*Ход работы.* К 20 каплям мочи добавляют 5 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка (помутнение раствора).

2. *Определение глюкозы.* В норме глюкоза в моче не определяется. Для качественного определения глюкозы в моче пользуются следующими реакциями:

2.1. Реакция Троммера. В щелочной среде в присутствии глюкозы при добавлении  $\text{CuSO}_4$  образуется желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

*Ход работы.* К 5 каплям исследуемой мочи прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натрия и 5 капель 1%-ного раствора сернокислой меди. Нагревают.

2.2. Реакция Фелинга. Проба основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Преимущество этой реакции заключается в том, что сегнетова соль в составе реактива Фелинга связывает избыток гидрата окиси меди, из которого при нагревании образуется окись меди черного цвета, мешающая реакции.

*Ход работы.* К 20 каплям исследуемой мочи приливают равный объем жидкости Фелинга и нагревают до кипения.

2.3. Реакция Ниландера. В реактив Ниландера входит азотнокислый висмут. В щелочной среде образуется гидрат окиси висмута, который, восстанавливаясь в присутствии глюкозы до металлического висмута, окрашивает жидкость в черный цвет.

*Ход работы.* К 20 каплям исследуемой мочи приливают 10–20 капель реактива Ниландера и кипятят 1–2 мин. Жидкость бурет, затем образуется черный осадок металлического висмута.

3. *Определение кровяных пигментов.* В норме в моче кровяных пигментов нет.

Гваяковая проба. Гваяковая смола в присутствии пероксида водорода под влиянием пероксидазы крови восстанавливается в азонид гваяковой смолы, имеющий синий цвет.

*Ход работы.* В пробирку наливают 20 капель мочи, 5 капель гваяковой смолы и несколько капель  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В присутствии крови появляется синее окрашивание.

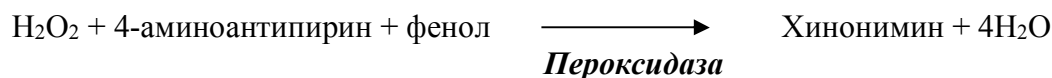
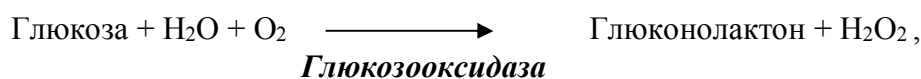
4. *Определение кетоновых тел.* Кетоновые тела обнаруживаются в моче при диабете, голодании и других ацидотических состояниях. Метод основан на цветной реакции, которую дают кетоновые тела с нитропруссидом натрия.

*Ход работы.* К 2 каплям мочи добавляют 2 капли 10%-ного  $\text{NaOH}$  и 2 капли нитропруссид натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 6 капель концентрированной уксусной кислоты — появляется вишневое окрашивание.

## Работа 5. *Количественное определение органических составных частей мочи*

5.1. Определение содержания глюкозы в моче ферментативным (глюкозооксидазным) методом. В норме сахар в моче присутствует в следовых количествах и обычными методами не определяется.

*Принцип метода.* Метод основан на следующих ферментативных реакциях:



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

### *Ход работы*

|   | Опытная проба, мл | Стандартная проба, мл |
|---|-------------------|-----------------------|
| В центрифужные пробирки вносят:   |                   |                       |
| Моча  | 0,1               | —                     |
| Стандартный раствор глюкозы   | —                 | 0,1                   |
| Дистиллированная вода   | 1,0               | 1,0                   |
| Перемешивают  |                   |                       |
| Полученный раствор отбирают в сухие пробирки  | 0,2               | 0,2                   |
| Рабочий раствор ферментов   | 2,0               | 2,0                   |
| Перемешивают и инкубируют реакционную смесь 10 мин при 37 °С или 30 мин при комнатной температуре |                   |                       |

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

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

### **Расчет производят по формуле:**

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

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

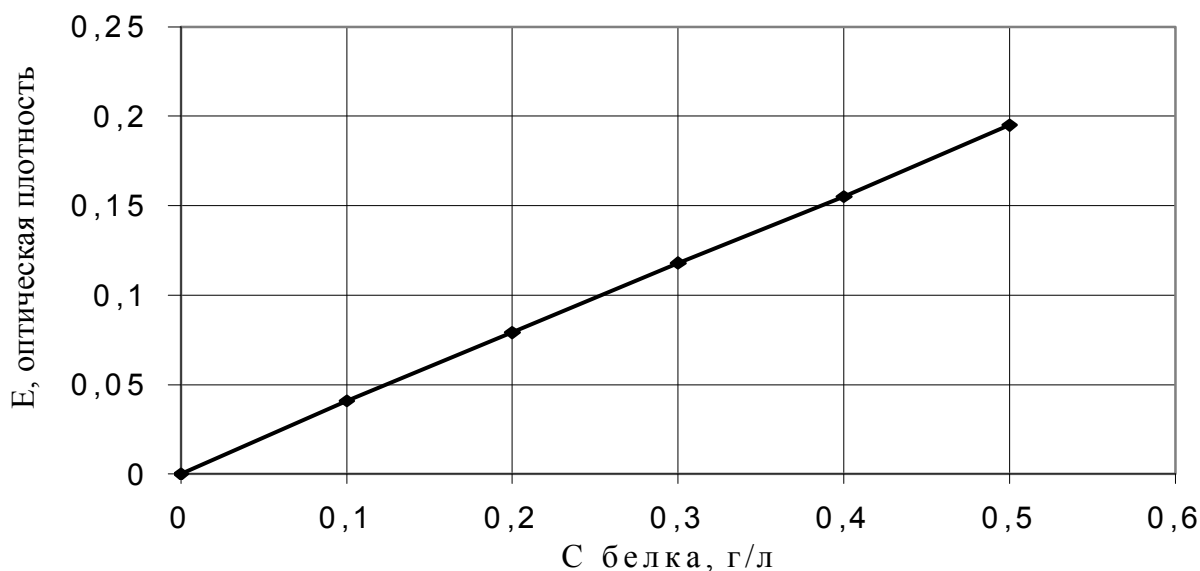
Проводят расчет суточного выделения глюкозы с мочой (с учетом диуреза 1200–1500 мл).

### 5.2. Определение концентрации белка в моче

*Принцип метода.* Метод основан на способности сульфосалициловой кислоты реагировать с белком, вызывая помутнение, интенсивность которого пропорциональна содержанию белка в моче.

*Ход определения.* К 1 мл прозрачной мочи добавляют 3 мл 3%-ного раствора сульфосалициловой кислоты, смесь перемешивают и через 5 мин измеряют оптическую плотность содежимого пробирки на ФЭК при красном светофильтре (длина волны 630–650 нм) в кювете шириной 10 мм против контрольной пробы (контрольная проба: к 1 мл мочи добавляют 3 мл изотонического раствора NaCl). Расчет производят по калибровочному графику. Расчет суточных потерь белка проводят с учетом диуреза (1200–1500 мл).

### Калибровочный график для определения содержания общего белка в моче



*Клинико-диагностическое значение определения содержания белка в моче.* В моче в норме содержатся «следы белка» (альбумин и глобулины, не более 0,15 г/сут). Повышенное содержание белка в моче — **протеинурия** — отражает нарушение баланса между процессами его фильтрации и реабсорбции и отмечается при заболеваниях почек, мочевыводящих путей, усиленном распаде белков тканей. Функциональные почечные протеинурии связаны с увеличением проницаемости почечного фильтра либо замедлением тока крови в клубочках (под влиянием переохлаждения, физического и психического перенапряжения).

### ТЕМА ЗАНЯТИЯ. БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ. ИНТЕГРАЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА

#### Актуальность темы

Печень играет центральную роль в промежуточном обмене веществ. Особенности ферментативного аппарата печени и ее анатомических связей с другими органами дают возможность печени участвовать в регуляции практически всех видов обмена веществ и поддерживать постоянство концентрации в крови многих жизненно важных соединений.

Печень — большая промежуточная станция между портальным и общим кругами кровообращения организма, поэтому все вещества, всасывающиеся из кишечника, должны пройти через печень. Функции печени обуславливают ее своеобразный «биохимический альтруизм»: многие происходящие в ней процессы настроены на синтез различных веществ для других органов, а также на защиту этих органов от образующихся в них (или поступающих извне) токсических соединений.

В состав органа входят клетки Купфера, принимающие участие в фагоцитозе. Печень выделяет желчь, необходимую для переваривания жира. Значительную роль играет печень в процессах свертывания крови, т. к. синтезирует белки-компоненты свертывающей и 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. Определение в клинике содержания общего билирубина, его фракций и продуктов их деградации имеет важное значение в дифференциальной диагностике желтух различной этиологии.

Следует отметить значительную вариабельность химического состава печени, который зависит от характера питания, состояния обмена веществ. Особенно существенные изменения в соотношении отдельных компонентов наблюдаются при голодании и патологических процессах, например, жировой инфильтрации печени, гликогенозах и др.

В связи с вышеизложенным понятна необходимость правильной оценки функционального состояния печени с использованием различных биохимических тестов, позволяющих установить факт заболевания и отслеживать его течение.

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**

Уметь применять знания о гомеостатической и интегрирующей роли печени в обмене углеводов, липидов и аминокислот для объяснения механизмов нарушений обмена веществ при болезнях печени и желчных путей. Уметь использовать знания о путях превращения в печени ксенобиотиков для понимания биохимических аспектов фармакологии и токсикологии. Понять принципы и механизмы взаимодействия различных метаболических путей для обеспечения жизнедеятельности и адаптации.

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### ***анатомии, гистологии, физиологии:***

- особенности строения и микроструктуры печени;
- функции печени;
- анатомо-физиологические взаимоотношения между печенью, желудочно-кишечным трактом и воротной веной;

#### ***биоорганической химии:***

- основные реакции введения функциональных групп в молекулы химических веществ с целью повышения их гидрофильных свойств.

#### ***биологической химии***

- метаболические пути обмена углеводов, липидов и белков, занятие 8 настоящего руководства.

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

*Задание 1.* При изучении микропрепарата печени студентам дано задание зарисовать структурную морфологическую единицу печени — ацинус.

1.1. Выберите функцию, которую выполняют элементы этой морфологической единицы — клетки Купфера:

- А. Синтетическая
- Б. Выделительная
- В. Обезвреживающая

1.2. Какую роль играет пространство Дисе?

А. Участвует в транспорте веществ между кровью синусоидов и паренхиматозными клетками

Б. Является депо желчи

В. Участвует в транспорте веществ между артериолами, венами и центральной веной

*Задание 2.* Методом «меченых атомов» была зафиксирована энтерогепатическая циркуляция желчных кислот. По каким кровеносным сосудам происходит возврат желчных кислот из кишечника к гепатоцитам в процессе этой циркуляции?

- А. По центральной вене печени  
Б. По воротной вене печени  
В. По нижней полой вене печени  
Г. По печеночной артерии

*Задание 3.* Назовите метаболит гликолиза, используемый для синтеза глицерола:

- А. Фосфодиоксиацетон  
Б. Ацетил-КоА  
В. Пировиноградная кислота  
Г. Щавелевоуксусная кислот  
Д.  $\beta$ -Гидроксимасляная кислота

*Задание 4.* Для образования глюкозы во время голодания клетки печени используют:

- А. Жирные кислоты  
Б. Аминокислоты  
В. Ацетоацетат  
Г.  $\beta$ -Гидроксипутират  
Д. Ацетил-КоА

*Задание 5.* Что (1,2,3,4) из чего (А,В,С,Д) может синтезироваться? Подберите соответствующие пары:

1. Аминокислоты заменимые  
2. Аминокислоты незаменимые  
3. Глюкоза  
4. Жирные кислоты  
А. Аминокислоты заменимые  
В. Аминокислоты незаменимые  
С. Глюкоза  
D. Жирные кислоты

*Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.*

### Вопросы для обсуждения

1. Основные функции и химический состав печени.
2. Роль печени в обмене углеводов, липидов, белков.
3. Обезвреживающая функция печени, механизмы: (защитные синтезы, ацилирование, микросомное окисление, конъюгация).
4. Роль печени в пигментном обмене. Синтез и распад гемоглобина (схемы). Обмен билирубина в норме и патологии. Порфирии, желтухи (гемолитическая, обтурационная, паренхиматозная) и их дифференциальная диагностика.
5. Биохимические методы диагностики нарушений функций печени.
6. Необходимость интеграции метаболизма, ее принципиальные составляющие или уровни обеспечения. Механизмы регуляции метаболизма.
7. Особенности метаболизма в печени в состоянии после приема пищи и натошак.
8. Межорганный метаболизм в динамике голодания.

### Литература

#### Основная

1. *Биологическая химия* / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 301-306, 607 – 612, 661-676.
2. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990. С. 212, 427–437.

#### Дополнительная

3. *Маршалл, В. Дж.* Клиническая биохимия / В. Дж. Маршалл. М., СПб. : Бином-Невский Диалект, 1999. 368 с.
4. *Марри, Р.* Биохимия человека / Р. Мари [и др.]. М. : Мир, 1993. 384 с.

### Задания для самостоятельной работы

*Задание 1.* Систематизировать знания об интеграции путей метаболизма в печени. Познакомиться с рисунком «Пути превращения углеводов и липидов в печени».

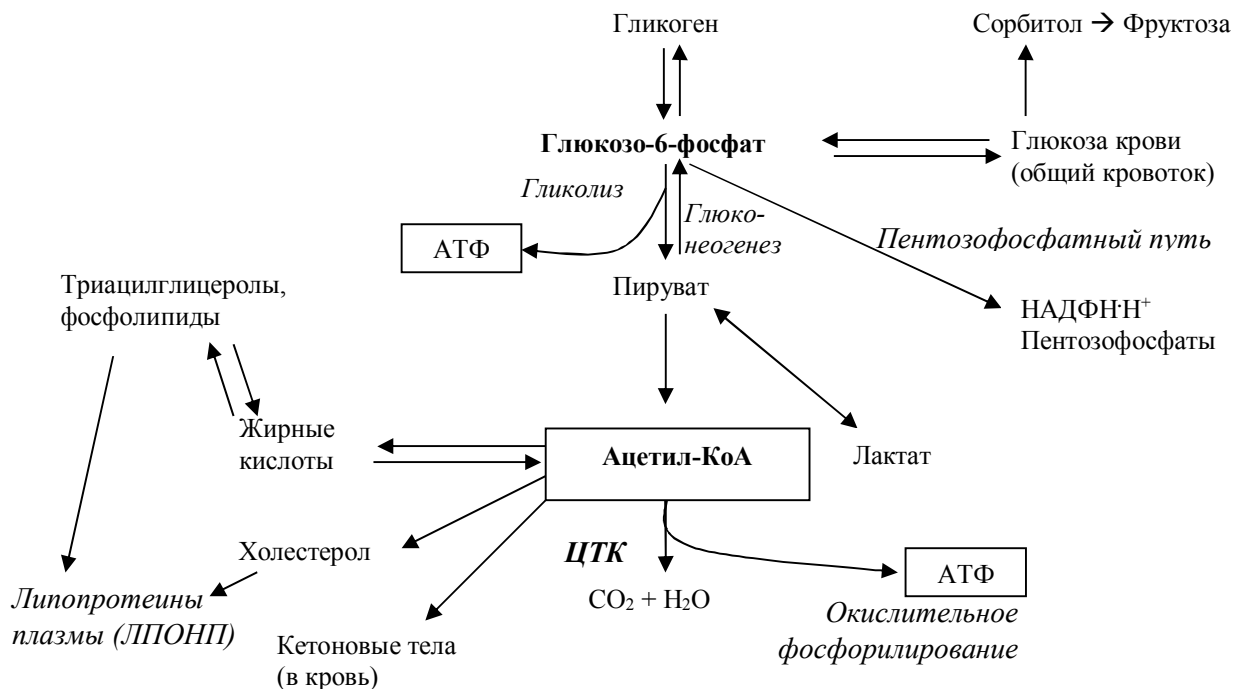
1.1. Обратить внимание на то, что большая часть потребленной свободной глюкозы в печени фосфорилируется с образованием глюкозо-6-фосфата. Метаболизм этого соединения может осуществляться по пяти основным направлениям, выбор которых зависит от соотношения между потребностями организма и количеством поступивших с пищей углеводов.

1.2. Печень поддерживает постоянный уровень глюкозы в крови при голодании за счет активации гликогенолиза и глюконеогенеза, а при избыточном ее поступлении из кишечника глюкоза депонируется в виде гликогена и липидов.

1.3. Знать, что обратимость превращения лактата в пируват (направление реакции) зависит от соотношения  $\text{НАДН}\cdot\text{Н}^+/\text{НАД}^+$ .

1.4. Знать, что жирные кислоты — основной субстрат энергетического метаболизма в печени и предшественники в биосинтезе холестерина, кетоновых тел, липидной части липопротеинов плазмы крови.

### Пути превращения углеводов и липидов в печени



1.5. Задание. Объясните:

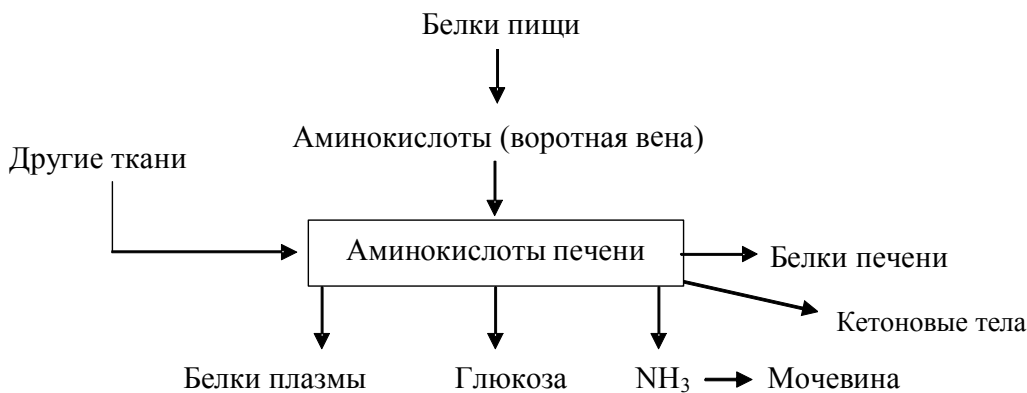
а) почему уже через три часа после удаления печени у животных развивается гипогликемия и наступает смерть, если ежедневно не вводить глюкозу;

б) почему введение галактозы, лактата или пирувата в этих условиях не эффективно.

1.6. Выбрать 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. Знать, что аминокислоты, всосавшиеся в кишечнике и поступившие затем в печень, имеют несколько основных путей метаболизма:



2.1. Задача. У больного с алкогольным циррозом печени наблюдается сильная отечность. С нарушением синтеза каких веществ в печени связано это состояние?

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





### Проверьте Ваши знания (самоконтроль усвоения темы)

*Задание 1.* Для предотвращения развития гипербилирубинемии у новорожденного вследствие несовпадения у матери и ребенка резус-фактора беременной перед родами рекомендован фенобарбитал. Выберите ответ, объясняющий, с какой целью в данном случае был назначен этот препарат:

- А. В качестве снотворного средства
- Б. Для инактивации компонентов микросомного окисления
- В. Для снижения растворимости билирубина
- Г. Как индуктора печеночных ферментов детоксикации
- Д. В качестве липотропного средства

*Задание 2.* При лабораторном обследовании больного желтухой получены следующие данные: общее содержание в сыворотке крови билирубина — 60 мкмоль/л, прямого билирубина — 43 мкмоль/л, в моче определяется прямой билирубин, и отсутствуют уробилин и стеркобилин. Какой вид желтухи у данного больного?

- А. Паренхиматозная
- Б. Гемолитическая
- В. Обтурационная

*Задание 3.* Для оценки функционального состояния печени у больного исследована экскреция животного индикана. Индикан образуется в результате обезвреживания в печени индоксила — продукта гниения аминокислоты триптофана в толстом кишечнике. Какое вещество участвует в обезвреживании этого токсического соединения?

- А. ФАФС
- Б. УДФ-глюкуроновая кислота
- В. Глицин
- Г. Церулоплазмин
- Д. Таурин

*Задание 4.* В моче больного обнаружены в большом количестве аминолевулиновая кислота, порфобилиноген и порфирины. Моча при длительном освещении приобрела темно-красный винный цвет. Какую патологию можно предположить в данном случае?

- А. Печеночная желтуха
- Б. Эритропоэтическая порфирия
- В. Гемолитическая желтуха
- Г. Печеночная порфирия
- Д. Талассемия

*Задание 5.* Больному с жировой инфильтрацией печени назначена растительно-молочная диета. Дефицит каких липотропных веществ восполняют рекомендованные продукты?

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

*Задание 6.* Какие из приведенных ниже выражений верны?

- А. При максимальном мышечном напряжении пируват восстанавливается в лактат
- Б. В норме в мышцах некоторое количество глюкозы подвергается анаэробному гликолизу, поэтому всегда имеется некоторое количество лактата, используемого для глюконеогенеза
- В. Для глюконеогенеза из лактата требуется больше АТФ, чем образуется во время анаэробного гликолиза

*Задание 7.* Каковы последствия увеличения количества свободных жирных кислот в печени?

- А. Увеличится интенсивность  $\beta$ -окисления
- Б. Увеличится интенсивность гликолиза
- В. Снизится активность пируватдегидрогеназы
- Г. Снизится интенсивность синтеза жирных кислот
- Д. Увеличится интенсивность образования кетоновых тел

**Задание 8.** Какое из приведенных ниже выражений правильное?

- А.  $\beta$ -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

**Задание 9.** Подберите соответствующие пары (цифра – орган, буква – процесс метаболизма):

Через 12 часов голодания

- |           |   |
|-----------|---|
| 1. Печень | А. Использует глюкозу в качестве источника энергии        |
| 2. Мышцы  | В. Использует кетоновые тела в качестве источника энергии |
| 3. Мозг   | С. Использует жирные кислоты в качестве источника энергии |
| 4. Почки  | Д. Активирует ферменты глюконеогенеза                     |

Через 3-е суток голодания

- |           |   |
|-----------|---|
| 1. Печень | А. Использует глюкозу в качестве источника энергии        |
| 2. Мышцы  | В. Использует кетоновые тела в качестве источника энергии |
| 3. Мозг   | С. Использует жирные кислоты в качестве источника энергии |
| 4. Почки  | Д. Активирует ферменты глюконеогенеза                     |

Через 2 недели голодания

- |           |   |
|-----------|---|
| 1. Печень | А. Использует глюкозу в качестве источника энергии        |
| 2. Мышцы  | В. Использует кетоновые тела в качестве источника энергии |
| 3. Мозг   | С. Использует жирные кислоты в качестве источника энергии |
| 4. Почки  | Д. Активирует ферменты глюконеогенеза                     |

### Эталоны ответов к решению заданий

Для самопроверки исходного уровня знаний:

**1.1 В; 1.2 А; 2Б; 3А; 4Б; 5(1 – А, В, С; 3 – А, В; 4 – А, В, С, D).**

Для самостоятельной работы:

**1.6А, Б, В, Г, Е, З; 2.1 Б; 2.2 А; 3Д; 3.1 Б; 4А; 5А, Б, Г, Д; 6А, В, Г, Д.**

### Самостоятельная работа (60 мин)

#### Инструкция к практическому занятию

Работа 1. **Исследование коллоидоустойчивости белков сыворотки крови**

Проба Вельтмана в модификации Тейля

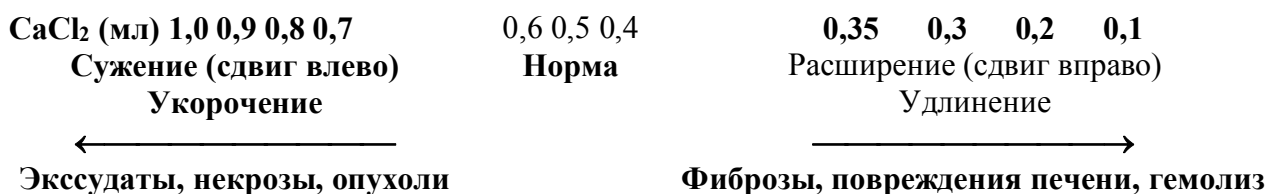
**Принцип метода.** Реакция основана на том, что белки сыворотки крови при добавлении раствора хлористого кальция определенной концентрации и последующем нагревании выпадают в виде хлопьев в осадок (происходит нарушение коллоидной устойчивости).

**Ход определения.** К 4,9 мл воды прибавляют 0,1 мл сыворотки, содержимое пробирки перемешивают путем ее опрокидывания (при этом пробирку можно закрывать большим пальцем) и затем приливают 0,1 мл 0,5%-ного раствора хлористого кальция (из пипетки на 1,0 мл или капельницы, если объем каждой капли соответствует 0,05 мл). Содержимое пробирки встряхивают и нагревают над пламенем спиртовки до однократного вскипания смеси. Затем пробирку охлаждают и смотрят через нее на свет. Если хлопья в пробирке не обнаруживаются, то в нее добавляют еще 0,1 мл  $\text{CaCl}_2$  и раствор вновь нагревают до кипения. Про-

цедуру повторяют до выпадения хлопьевидного осадка. Записывают общий объем  $\text{CaCl}_2$  (в мл), добавленный в пробирку.

*Примечание.* Сыворотка для исследования должна быть свежей (хранящейся не более 24 часов от момента взятия), без следов гемолиза.

*Клинико-диагностическое значение реакции Вельтмана.* Реакция коагуляции с хлористым кальцием (по Вельтману) может изменяться в двух направлениях: в сторону укорочения коагуляционной ленты или ее удлинения (см. схему).



Главные причины, которые ведут к удлинению полосы (коагуляция, наступающая при добавлении менее 0,4 мл  $\text{CaCl}_2$ ), — это фиброзные и пролиферативные процессы, повреждения паренхимы печени и гемолитические состояния. Сдвиг вправо отмечается при болезни Боткина, циррозах, острой желтой атрофии печени, малярии, после переливания крови, аутогемотерапии и при многих воспалительных заболеваниях. Считают, что удлинение коагуляционной полосы обусловлено повышением содержания  $\gamma$ -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.

## Работа 2. *Определение содержания общего билирубина в сыворотке крови*

*Принцип метода.* Диазореактив образует с растворимым билирубином азобилирубин, окрашенный в розовый цвет. Интенсивность окраски раствора азобилирубина пропорциональна концентрации билирубина и может быть определена колориметрически. Конъюгированный (прямой) билирубин дает прямую реакцию с диазореактивом. Неконъюгированный (непрямой) билирубин можно перевести в растворимое состояние добавлением к сыворотке крови этилового спирта.

*Ход определения.* В центрифужную пробирку отмеривают 1 мл сыворотки крови, 2 мл этилового спирта, тщательно перемешивают содержимое стеклянной палочкой и центрифугируют 15 мин при скорости 3000 об/мин. Затем сливают надосадочную жидкость в другую пробирку и добавляют к ней 0,25 мл диазореактива. При этом появляется красно-розовое окрашивание, интенсивность которого определяют через 10 минут, измеряя оптическую плотность пробы против воды в кювете шириной 5 мм при зеленом светофильтре (500–560 нм). Параллельно колориметрируют стандартный раствор азобилирубина, соответствующий концентрации билирубина 0,4 мг% ( $C_{ст}$ ).

Расчет производят по формуле:

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

В норме концентрация общего билирубина в плазме (сыворотке) крови составляет 0,5–1,2 мг% (8,55–20,52 мкмоль/л). 75 % его количества приходится на долю непрямого билирубина.

Клинико-диагностическое значение исследования пигментного обмена. Один из важных признаков нарушения пигментного обмена — появление желтухи, которое отмечается

обычно при уровне билирубина в крови 27–34 мкмоль/л и более. Кровь новорожденных, особенно недоношенных детей, отличается более высоким содержанием билирубина (физиологическая желтуха). Наблюдаемое со 2–3-го до 7–10-го дня жизни увеличение концентрации билирубина, в основном за счет непрямого, связано с функциональной недостаточностью печени, в частности, малой активностью фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы, необходимого для образования прямого билирубина.

**Гемолитическая желтуха** (надпеченочная) — усиление гемолиза эритроцитов, что приводит к усиленному образованию неконъюгированного билирубина, так как печень не успевает его связывать.

**Паренхиматозная желтуха** (печеночная) — нарушение функции печеночных клеток. Может быть вызвана также наследственно обусловленными дефектами в процессах транспорта билирубина и образования диглюкуронида билирубина.

**Механическая желтуха** (обтурационная, подпеченочная) — задержка оттока желчи. Возникает при переполнении желчных путей вследствие закупорки, разрыва их и последующего перехода желчи в кровь.

Тяжесть желтухи обычно соответствует уровню билирубинемии. Принято считать, что желтуха протекает в легкой форме, если содержание билирубина в плазме (сыворотке) не превышает 85 мкмоль/л; уровень его 86–169 мкмоль/л свидетельствует о среднетяжелой, а свыше 170 мкмоль/л — о тяжелой форме желтухи.

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. ВВЕДЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКУЮ БИОХИМИЮ. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ**

### **Актуальность темы**

Для обеспечения профессиональной деятельности провизора необходимы знания о механизмах действия природных и чужеродных веществ, способах их биотрансформации в условиях живого организма. Важным разделом для специалиста-провизора является знакомство с биохимическими методами, применяемыми для стандартизации и контроля качества лекарственных препаратов.

### **Цель занятия**

Изучить механизмы биотрансформации лекарственных веществ в организме человека на этапах введения, транспорта, метаболизма и выведения. Ознакомиться с качественными реакциями на некоторые лекарственные препараты и научиться количественно оценивать содержание метаболитов ксенобиотиков в моче.

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

*Для полного усвоения темы необходимо повторить из:*

#### **биологической химии:**

- мембраны, строение, виды транспорта;
- обезвреживающая функция печени;
- микросомальное окисление;

#### **из фармакологии:**

- пути поступления лекарственных веществ;
- понятия фармакокинетики и фармакодинамики.

**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. Пиноцитоз
- В. Активный симпорт
- Г. Простая диффузия

**Задание 3.** Для пассивного транспорта:

- А. Используется энергия, полученная при расщеплении белков
- Б. Используется энергия, полученная при расщеплении углеводов
- В. Используется энергия, полученная при расщеплении 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

**Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.**

### Вопросы для обсуждения

1. Биохимия и фармация. Биогенные и синтетические лекарственные средства. Биохимические методы, используемые в анализе и синтезе лекарственных средств.
2. Фармакокинетика. Всасывание, транспорт кровью. Факторы, влияющие на процессы фармакокинетики.
3. Обезвреживание лекарственных веществ в организме. Фазы метаболизма. Изменения активности и токсичности веществ в процессе метаболизма.
4. Основы фармакокинетики различных групп лекарственных препаратов (НСПВ, гормональные, антикоагулянты и др.). Реакции окисления, восстановления, гидролиза.
5. Фаза конъюгации в системе обезвреживания лекарственных препаратов. Виды конъюгации (глюкуронирование, ацетилирование, метилирование, сульфатирование и гидратация). Примеры реакций.
6. Выведение лекарственных препаратов из организма. Виды и способы выведения. Роль Р – гликопротеина, металлотионеина.

### Рекомендуемые темы для реферативных докладов

Липосомы, наночастицы и вирусные векторы как средства доставки лекарственных средств.

### Литература

#### Основная

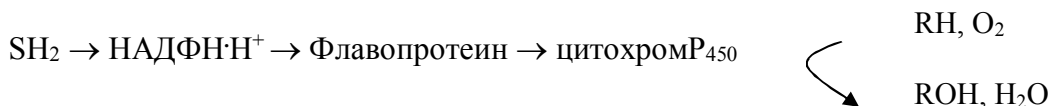
1. Биологическая химия / В. К. Кухта [и др.]. М : Бином ; Минск : Асар, 2008. С. 609– 611.
2. Северин, Е.С. Биохимия / под ред. Е. С. Северина. 4-е изд., испр. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. С. 238–245, 616–631.
3. Биологическая химия : учеб. пособие / А. Д. Таганович [др.]. Минск : Беларусь, 2012.

#### Дополнительная

4. Чиркин, А. А. Биохимия / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. М. : Медицинская литература, 2010. С. 575–584.

### Задания для самостоятельной работы

**Задание 1.** Знать 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>.

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

1.1. Выберите предложения, которые правильно характеризуют «микросомальное» окисление:

А. «Микросомальное» окисление происходит в гладком ЭПР печени и других органах, а также митохондриях коры надпочечников и половых желез.

Б. НАДН+Н<sup>+</sup> не является донором водорода для реакции «микросомального» окисления.

В. Главные ферменты системы – цитохромы а, а<sub>3</sub>.

Г. Для образования гидроксильной группы в модифицируемом гидрофобном веществе используется атом кислорода молекулы воды.

1.2. Подберите соответствия:

1. Образуется под действием метил-трансферазы.

А. Билирубинглюкуронид.

2. Конечный продукт обезвреживания аспирина.

Б. Метилгистамин.

3. Образуется под действием УДФ-глюкуронилтрансферазы.

В. Эпоксид бензантрацена.

4. Канцероген

Г. Индоксилсульфат.

5. Конечный продукт обезвреживания триптофана.

Д. Глюкуронид салициловой кислоты.

*Задание 2.* Найдите верное утверждение:

А. В результате метаболизма лекарственных веществ может произойти его инактивация;

Б. В результате биотрансформации лекарственного вещества 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

Б. Дисульфидные

В. Гидроксильные

Г. Карбоксильные

3.2. Назовите химические реакции, в результате которых в молекулы органических соединений могут быть введены указанные выше функциональные группы.

А. Гидроксилирование

Б. Карбоксилирование

В. Дезаминирование

Г. Нитрование

***Правильность решений проверьте, сопоставив их с эталонами ответов.***

## Проверьте свои знания (самоконтроль усвоения темы)

*Задание 1.* Конъюгация — как фаза метаболизма ксенобиотиков включает в себя:

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

*Задание 2.* Расставьте в правильной последовательности этапы фармакинетики лекарственных препаратов в организме:

- А. Выведение из организма
- Б. Всасывание, т.е. транспорт через биологические мембраны
- В. Распределение в тканях
- Г. Перенос кровью
- Д. Связывание с белками
- Е. Взаимодействие с рецепторами
- Ж. Метаболизм

*Задание 3.* Больной, принимающий одновременно неодикумарин и фенobarбитал, самовольно без разрешения врача прекратил прием фенobarбитала. К чему это может привести? Ответ аргументируйте.

*Задание 4.* Как можно использовать явление индукции метаболизма фармакопрепаратов в лечебных целях? Приведите примеры.

*Задание 5.* 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 аз
- Б. Цитохром с
- В. Цитохром b
- Г. Цитохром p<sub>450</sub>
- Д. Цитохром с<sub>1</sub>

### Эталоны ответов к решению заданий

*Для самопроверки исходного уровня знаний:*

1 пиноцитоз; 2А; 3Г, 4А.

*Для самостоятельной работы:*

1.1 А, Б. 2.1 – Б; 2 – Д; 3А; 4В; 5Г; 2А, Б, В; 3.1 В, Г; 3.2 А, Б.

### Самостоятельная работа (1 ч)

#### Инструкции к практическому занятию

Работа 1. **Обнаружение пенициллина в препарате «Бензилпенициллина натриевая соль»**

##### 1.1. Открытие пенициллина реакцией с гидроксиламином

*Принцип метода:* При нагревании пенициллина и гидроксиламина раскрывается лактамное кольцо пенициллина с образованием  $\alpha$ -гидроксамовой кислоты, дающий с хлорным железом продукт конденсации красного цвета.

*Ход работы:* К 5 каплям 0,5% водного раствора пенициллина добавить 2 капли 5 % раствора гидроксиламина и смесь нагреть до кипения. После охлаждения прибавить 1 каплю 5% раствора хлорного железа. Появляется розовое или красное окрашивание.

##### 1.2. Нитропруссидная реакция на пенициллин

*Принцип метода:* При щелочном гидролизе пенициллина происходит освобождение сульфгидрильных групп, взаимодействующих с нитропруссидом натрия с образованием нестойкого соединения красного цвета.

*Ход работы:* К 2 каплям раствора пенициллина добавить 2 капли концентрированного раствора едкого натра и кипятить 1-2 мин. После охлаждения добавить по каплям раствор





**ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К КОЛЛОКВИУМУ  
ПО ТЕМАМ: «БИОХИМИЯ КРОВИ», «БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ И ИНТЕГРАЦИЯ  
МЕТАБОЛИЗМА», «ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ»**

1. Печень как главный орган гомеостаза. Функции печени.
2. Роль печени в обмене углеводов. Механизм гиперлактатемии и гипогликемии при алкогольном токсикозе.
3. Роль печени в обмене белков.
4. Роль печени в обмене липидов. Механизмы развития жировой инфильтрации и дегенерации печени (в том числе при алкоголизме).
5. Антитоксическая функция печени. Обезвреживание в печени токсичных веществ, нормальных метаболитов, лекарственных препаратов.
6. Роль печени в пигментном обмене. Биосинтез гемопротеинов и его регуляция. Распад гемоглобина в клетках РЭС. Метаболизм желчных пигментов. Порфирии.
7. Желтухи. Причины возникновения. Механизмы развития патологических изменений. Лабораторная диагностика.
8. Биохимические методы диагностики заболеваний печени.
9. Внутриклеточная локализация основных метаболических путей. Метаболические профили основных органов.
10. Регуляция и направленность метаболических процессов в печени после приема пищи и натошак.
11. Межорганный метаболизм для обеспечения организма энергией в различные периоды голодания. Механизм гиперпродукции кетоновых тел.
12. Гемоглобин (структура, физиологические гемоглобины, производные гемоглобина, аномальные формы).
13. Механизмы транспорта кислорода и углекислого газа кровью. Виды гипоксий и их причины.
14. Буферные системы крови (разновидности, компоненты, механизм действия, емкость).
15. Индикаторные ферменты крови и их диагностическое значение.
16. 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).
17. Что понимают под гемостазом? Представление о механизмах гемостаза. Три основных структурно-функциональных компонента гемостаза. К каким патологическим состояниям могут привести нарушения в системе гемостаза?
18. Функциональные звенья системы свертывания крови и их биологическая роль.
19. 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.
20. Антикоагулянтная система. Классификация естественных антикоагулянтов. Наиболее значимые естественные антикоагулянты, механизм их действия. Искусственные антикоагулянты (примеры). Механизм действия дикумарола и гепарина.
21. Фибринолитическая система, механизмы фибринолиза. Плазминовая система (компоненты и их происхождение, механизм действия).
22. Витамин К. Химическая природа, разновидности, участие в процессе свертывания крови. Синтетические производные. Антивитамины.

23. Биохимия и фармация. Биогенные и синтетические лекарственные средства. Биохимические методы, используемые в анализе и синтезе лекарственных средств.

24. Биохимические основы фармакокинетики лекарственных средств. Пути поступления лекарственных препаратов в организм и механизмы всасывания. Факторы, влияющие на всасывание.

25. Транспорт лекарственных веществ. Специфические и неспецифические транспортные системы крови. Распределение в тканях, метаболизм и выведение из организма. Факторы, влияющие на процессы фармакокинетики. Пролекарства.

26. Биотрансформация лекарственных веществ. Фазы биотрансформации – метаболическая трансформация и конъюгация, их виды. Ферменты реакций конъюгации и метаболической трансформации. Примеры реакций.

27. Схемы процессов окисления веществ в системе цитохрома P450. Роль цитохрома P450 в окислении лекарственных препаратов. Индукция системы цитохрома P450 .

## **ТЕМА ЗАНЯТИЯ. КОНТРОЛЬ ПРАКТИЧЕСКИХ НАВЫКОВ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА: АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА И МОЧИ**

### **Актуальность темы**

В процессе изучения биологической химии студенты приобрели начальные знания и практические навыки качественного и количественного биохимического анализа, который находит широкое применение в лабораторной диагностике, например, анализы желудочного сока и мочи. В дальнейшем, в ходе изучения дисциплины «Клиническая лабораторная диагностика», будет осуществляться расширение и закрепление полученных знаний.

### **Цель занятия**

Проверить: 1) навыки студентов в проведении качественного и количественного анализа биологических жидкостей;

2) умение ориентироваться в результатах анализа и давать им правильную оценку;

3) понимание происхождения и диагностического значения патологических компонентов анализируемых биологических жидкостей.

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

*Для качественного выполнения задания необходимо вспомнить из:*

#### ***общей химии:***

– основы качественного и количественного анализа;

#### ***биологической химии:***

– физико-химические свойства и состав желудочного сока в норме и патологии;

– физико-химические свойства и состав мочи в норме и патологии.

### **Выполнение работы.**

Получив индивидуальные контрольные пробы желудочного сока и мочи, студенты приступают к их анализу:

1) используя методики для анализа желудочного сока на странице 74–75.

2) используя методики для анализа мочи на странице 130–133.

## ПЕРЕЧЕНЬ ЭКЗАМЕНАЦИОННЫХ ВОПРОСОВ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

### ПЕРВЫЕ ВОПРОСЫ

1. Аминокислоты. Строение, классификация, свойства, применение как лекарственных препаратов.
2. История развития представлений о структуре белков. 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; вестерн-блот анализ).
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, секвенатор Эдмана - Бэга).
7. Использование искусственного синтеза 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. Силы, 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. Сравнительные особенности транспорта кислорода гемоглобином и миоглобином.
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. Высоконеопредельные 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. Иммуобилизованные 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. Множественные формы ферментов, их классификация. Изоферменты, их молекулярные разновидности, значение в клетке.
25. Понятие об активном и аллостерическом центрах ферментов. Роль пространственной структурной организации в их формировании.
26. История развития учения о витаминах. 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 Д. Провитамины. Строение и свойства. Биологическая роль. Явления гипо-и гипервитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
29. Витамины группы Е. Строение и свойства. Биологическая роль. Явления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
30. Витамины группы К. Строение и свойства. Биологическая роль. Гиповитаминоз. Пищевые источники. Суточная потребность. Викасол. Антагонисты витамина К.
31. Биотин. Строение и свойства, коферментная форма. Биологическая роль. Комплекс биотин-авидин. Явления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
32. Витамин В<sub>1</sub>. Строение и свойства. Участие в построении коферментов. Роль в обмене веществ. Явления недостаточности. Пищевые источники. Суточная потребность.
33. Витамин В<sub>2</sub>. Строение и свойства. Участие в образовании флавиновых коферментов. Биологическая роль. Пищевые источники. Суточная потребность.
34. Витамин В<sub>6</sub>. Строение и свойства, участие в образовании коферментов. Роль в обмене веществ. Явления гиповитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
35. Витамин В<sub>12</sub>. Строение и свойства. Кобамидные коферменты. Участие в обмене веществ. Внутренний фактор. Явления гиповитаминоза. Пищевые источники. Суточная потребность.
36. Витамин С. 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 РР. 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 Р), парааминобензойная кислота, инозитол, пангамовая кислота, липоевая кислота, холин, витамин U, карнитин, антоцианины, глюкозинолаты. Биологическая роль.

## ВТОРЫЕ ВОПРОСЫ

1. Обмен веществ и энергии, как важнейший признак жизнедеятельности. Общее представление о метаболизме. Катаболические и анаболические пути. Центральные пути метаболизма. Единство процессов ассимиляции и диссимиляции. Связь на уровне субстратов, восстановленных коферментов, энергии, регуляторов обмена

2. Адениловая система (АТФ, АДФ, АМФ) и ее биологическое значение. Энергетический заряд клетки. Другие макроэргические соединения. Механизмы синтеза АТФ.

3. 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. Окислительное фосфорилирование как основной механизм синтеза АТФ в животных клетках. Этапы, регуляция. Причины гипозенергетических состояний. Разобщители и ингибиторы окислительного фосфорилирования, механизм их действия.

6. Фотосинтез. Распространение фотосинтеза и его значение для жизни на Земле. Характеристика фотосинтезирующих структур. Пигменты фотосинтеза.

7. Стадии фотосинтеза. Механизм световой стадии. Нециклический и циклический перенос электронов в фотосистемах.

8. Образование протонного градиента в тилакоидах. АТФ-аза, её характеристика. Конечные продукты световой стадии.

9. Схема и механизм фотофосфорилирования, их отличие от окислительного фосфорилирования.

10. 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.

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. Гликогеновые болезни (гликогенозы и агликогенозы).

14. Фосфоролиз 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. Темновая стадия фотосинтеза, суммарное уравнение. Фотосинтетическое образование гексоз (цикл Кальвина), его значение для жизни на Земле.
25. Механизмы образования углекислого газа и воды - конечных продуктов обмена веществ.
26. Ресинтез липидов в клетках слизистой тонкого кишечника. Пути ресинтеза триацилглицеролов, фосфолипидов, эфиров холестерина.
27. Транспорт липидов в крови. Структура, образование и метаболизм хиломикронов. Роль липопротеинлипазы в обмене хиломикронов и других липопротеинов.
28. Получение липосом и их использование для доставки лекарственных препаратов к органам и тканям.
29. Транспорт липидов в крови. Структура, образование и метаболизм ЛПОНП, ЛПВП и ЛПНП. Роль липопротеинлипазы, печеночной липазы и рецепторов клеточной поверхности.
30. Доставка липидов в клетки органов и тканей. Транспорт холестерина, жирных кислот. Механизм поддержания баланса холестерина в клетках организма.
31. Транспорт липидов. Образование и последующий метаболизм ЛПВП в организме. Роль ЛХАТ. Пути снижения повышенного уровня холестерина в плазме крови.
32. Депонирование липидов в жировой ткани и мобилизация жира из депо. Роль гормонов, лептина. Источники субстратов для синтеза триацилглицеролов в жировой ткани.
33. Транспорт, поступление в клетку и использование жирных кислот в качестве источников энергии. Окисление жирных кислот в митохондриях и пероксисомах. Энергетический выход.
34. Биосинтез жирных кислот. Происхождение субстратов. Полиферментный комплекс, синтезирующий жирные кислоты в эукариотической клетке. Значение биотина, НАДФН<sup>+</sup>. Активаторы и ингибиторы синтеза жирных кислот.
35. Биосинтез ненасыщенных жирных кислот, жирных кислот с большим числом углеродных атомов. Роль микросомных ферментов.
36. Биосинтез холестерина. Регуляция уровня холестерина в клетках. Производные холестерина. Связь нарушений обмена липидов с развитием заболеваний (атеросклероз, желчно-каменная болезнь, жировое перерождение печени).

37. Нарушения обмена холестерина. Факторы, оказывающие влияние на уровень липопротеинов плазмы крови.
38. Кетоновые тела. Образование кетоновых тел. Пути катаболизма. Причины и следствия повышения образования кетоновых тел.
39. Биосинтез фосфолипидов. Липотропные факторы как лекарственные средства.
40. Переаминирование. Ферменты. Коферменты. Роль этого процесса для жизнедеятельности клетки. Диагностическое значение определения активности трансаминаз в сыворотке крови.
41. Пути дезаминирования аминокислот. Ферменты и коферменты окислительного дезаминирования. Биологическое значение глутаматдегидрогеназной реакции.
42. Пути превращения безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты.
43. Пути обезвреживания аммиака в организме. Транспорт аммиака по крови.
44. Аминокислотный фонд клетки. Источники пополнения. Пути использования аминокислотного фонда. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Механизмы синтеза аминокислот.
45. Образование мочевины. Роль печени в образовании мочевины. Значение исследования уровня мочевины и остаточного азота в клинической практике.
46. Декарбоксилирование аминокислот. Образование биогенных аминов и их роль в организме. Окисление биогенных аминов. Лекарственные средства - ингибиторы аминоксидаз. Антигистаминные препараты.
47. Связь обмена липидов и углеводов. Их взаимопревращения.
48. Образование и использование в клетке ацил-КоА и ацетил-КоА.
49. Образование и физиологическая роль активных форм кислорода. Повреждающее действие свободных радикалов и активных форм кислорода.
50. Перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков и нуклеиновых кислот и роль этих процессов в развитии оксидативного стресса.
51. Ферментативная и неферментативная системы антиоксидантной защиты в клетке.

### **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 гипофиза, их химическая природа. Связь с гипоталамусом. Вазопрессин – молекулярный механизм проведения сигнала в клетку, влияние на метаболизм.
3. Гормоны щитовидной железы. Их строение и образование. Механизм действия, влияние на метаболизм. Гипо- и гипертиреоз.
4. Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфора. Химическая природа. Механизм действия.
5. Инсулин. Химическая природа и механизм действия. Роль инсулина в регуляции обмена углеводов, липидов и белков.
6. Метаболические нарушения при сахарном диабете. Роль гликозилирования белков, восстановительного пути обмена глюкозы.
7. Глюкагон. Химическая природа, рецепторы, механизм передачи сигнала в клетках-мишенях, влияние на метаболизм.
8. Глюкокортикоиды, строение, рецепторы, механизм передачи сигналов в клетках-мишенях. Влияние на метаболизм.



9. Минералокортикоиды, их строение, механизм передачи сигналов в клетках-мишенях. Влияние на метаболизм.
10. Гормоны мозговой части надпочечников: адреналин, норадреналин. Строение, синтез. Механизм проведения сигнала в клетки-мишени, влияние на метаболизм.
11. Мужские половые гормоны, химическая природа, механизм передачи сигналов в клетках-мишенях.
12. Женские 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. 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 медицинской практике.
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. Механизмы передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Аденилатциклаза и фосфодиэстераза. Регуляция активности этих ферментов. Значение уровня цАМФ для клетки.

33. Механизмы передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Фосфолипаза С. Субстраты и продукты. Роль этих продуктов в механизмах трансформации внешнего сигнала.

34. Механизмы передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. Инозитолфосфолипидный путь внутриклеточной сигнализации. Инозитолтрифосфат и диацилглицерол, механизмы образования и действия.

35. Механизмы передачи информации от внешних сигналов на внутриклеточные процессы. 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. Межорганый метаболизм и обеспечение организма энергосубстратами в состоянии после приема пищи.

41. Межорганый метаболизм и обеспечение организма энергосубстратами в состоянии натошак и при длительном голодании.

42. Гормональная регуляция адаптации метаболических путей к состоянию после приема пищи и голоданию (инсулин, глюкагон, катехоламины, кортикостероиды).

#### **ЧЕТВЕРТЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Предмет и задачи биологической химии. Роль биохимии в теоретической и практической медицине. Объекты и методы биохимических исследований.

2. Фармацевтическая биохимия. Предмет и задачи. Биогенные и синтетические лекарственные средства. Биохимические методы, используемые в анализе и синтезе лекарственных средств.

3. Биохимические основы фармакокинетики лекарственных средств. Пути поступления лекарственных препаратов в организм и механизмы их всасывания. Факторы, влияющие на всасывание.

4. Транспорт лекарственных веществ. Специфические и неспецифические транспортные системы крови. Распределение в тканях, метаболизм и выведение из организма. Виды и способы выведения.

5. Биотрансформация лекарственных веществ. Фазы биотрансформации, их характеристика. Факторы, влияющие на метаболизм лекарственных веществ.

6. Роль цитохрома Р450 в окислении лекарственных препаратов. Схемы процессов окисления в системе цитохрома Р450. Индукция системы цитохрома Р450.

7. Метаболическая трансформация, как I фаза обезвреживания лекарственных препаратов. Виды и ферменты.

8. Фаза конъюгации в системе обезвреживания лекарственных препаратов. Виды конъюгации (глюкуронирование, ацетилирование, метилирование, сульфатирование и гидратация). Метаболиты и ферменты конъюгации. Примеры реакций.

9. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте. Конечные продукты распада пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов. Гиперурикемия, подагра, подходы к диагностике, профилактике и лечению.
10. Азотистый баланс. Нормы белков в питании. Биологическая ценность белков.
11. Пищевая ценность белков, углеводов, липидов, усваиваемость в желудочно-кишечном тракте. Незаменимые факторы питания. Энергия – потребность, происхождение и расходование в организме.
12. Применение ферментов и их ингибиторов в медицинской практике для лечения и диагностики заболеваний. Ферменты как аналитические реагенты в лабораторных исследованиях.
13. Роль печени в обмене белков, углеводов, липидов.
14. Антитоксическая функция печени. Обезвреживание в печени токсичных веществ, нормальных метаболитов, лекарственных препаратов.
15. Синтез и распад кровяных пигментов. Роль печени в образовании желчных пигментов. Метаболизм желчных пигментов.
16. Желтухи, происхождение, методы диагностики желтух.
17. Биохимические методы диагностики поражений печени.
18. Происхождение ферментов плазмы крови. Значение определения активности ферментов в плазме крови с диагностической целью и для контроля за эффективностью лечения.
19. Химический состав плазмы крови. Методы исследования химического состава плазмы крови, используемые в клинической практике.
20. Буферные системы крови и их значение. Доказательство буферных свойств сыворотки крови.
21. Механизмы переноса углекислоты и кислорода кровью. Механизмы развития гипоксических состояний.
22. Белки плазмы крови. Функции. Клинико-биохимическое значение определения общего белка плазмы крови и белковых фракций.
23. Методы обнаружения и количественного определения белков в биологических жидкостях (моча, плазма крови) и лекарственных препаратах.
24. Дислипидопроteinемии, причины возникновения, способы распознавания и значение в развитии заболеваний.
25. Основные показатели анализа мочи здорового человека.
26. Азотсодержащие вещества мочи, их происхождение и роль в организме. Принцип определения общего азота мочи.
27. Патологические составные части мочи и их определение.
28. Протеинурия. Обнаружение и количественное определение белка. Причины протеинурии.
29. Глюкозурия, ее происхождение. Значение определения глюкозы в моче.
30. Ацетонурия, ее происхождение. Значение определения кетоновых тел.
31. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Качественный и количественный анализ желудочного сока. Роль соляной кислоты.
32. Сок поджелудочной железы. Участие в переваривании углеводов и липидов. Принципы и клиническое значение определения активности амилазы в моче.
33. Классификация и свойства протеаз. Участие в переваривании белков. Субстратная специфичность. Ингибиторы протеаз и их использование в клинической практике при нарушении функции поджелудочной железы.

34. Пищевая ценность углеводов. Переваривание и всасывание углеводов. Роль клетчатки и пектинов в питании. Нарушения переваривания углеводов, принципы диагностики и лечения. Углеводы как лекарственные препараты.

35. Этапы переваривания липидов пищи в желудочно-кишечном тракте. Роль желчных кислот, ферментов. Печеночно-кишечная рециркуляция желчных кислот. Механизмы всасывания продуктов ферментативного гидролиза жира.

36. Химические реакции, лежащие в основе гниения белков в кишечнике. Понятие о ксенобиотиках. Механизмы обезвреживания их в организме.

37. Причины гипер- и гипоферментемий при патологических процессах.

38. Вода. Значение воды. Биологическая роль натрия, калия, хлора. Механизмы регуляции водно-минерального обмена.

39. Макроэлементы (кальций, фосфор, магний). Биологическая роль.

40. Роль серы в обмене веществ. Тиоловые и дисульфидные группы белков и гормонов, их участие в формировании структуры и специфических свойств белка. Глутатион, сульфолипиды, тиамин, биотин, участие в обезвреживании.

41. Микроэлементы. Их значение. Роль ионов марганца, меди, цинка, селена, кобальта, йода, фтора. Биохимические основы создания сбалансированных витаминно-минеральных комплексов.

42. Механизмы всасывания, транспорта и депонирования железа. Роль железа в обмене веществ.

43. Синдром недостаточного питания. Причины развития, клинические формы и характерные нарушения метаболизма.

### Повторите и запомните некоторые биохимические константы

| <b>КРОВЬ</b>                        |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 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                    | 1,2–2,8 ммоль/л          |
| Холестерол                          | 3,9–6,2 ммоль/л          |
| Общий белок сыворотки               | 60–80 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) |
| Билирубин плазмы (сыворотки): общий | 3,5–20,5 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 сока общая  | 40–60 ммоль/л            |
| свободная                           | 20–40 ммоль/л            |
| связанная                           | 10–20 ммоль/л            |
| <b>МОЧА</b>                         |                          |
| Плотность                           | 1,01–1,025               |
| рН                                  | 5,0–7,0                  |
| Общий азот                          | 10–18 г/сут              |
| Мочевина                            | 25–30 г/сут              |
| Азот аммиака                        | 0,5–1,0 г/сут            |
| Белок                               | < 150 мг/сут             |

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |     |
|---|-----|
| Введение в практикум. Белки: состав и функции. Современные представления о структуре белковой молекулы. Количественное определение содержания белка в биологических жидкостях.....                            | 3   |
| Физико-химические свойства белков. Методы разделения, выделения и очистки белков .....  | 9   |
| Ферменты. Классификация, строение, свойства и механизм действия.....  | 14  |
| Регуляция действия ферментов. Количественное определение активности ферментов .....   | 20  |
| Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Химия белков, ферменты»...  | 25  |
| Введение в метаболизм. Энергетический обмен и биологическое окисление. Центральные пути Метаболизма (окислительное декарбоксилирование ПВК, лимоннокислый цикл).....  | 26  |
| Энергетический обмен. Окислительное и фотосинтетическое фосфорилирование. Ингибиторы и разобщители окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания .....  | 31  |
| Углеводы. Переваривание углеводов. Обмен гликогена.....   | 38  |
| Анаэробный и аэробный пути распада глюкозы. Пути метаболизма пирувата. Глюконеогенез. Количественное определение глюкозы в крови .....  | 41  |
| Вторичные пути обмена глюкозы. Влияние гормонов на уровень глюкозы в крови. Фотосинтез (темновая стадия).....   | 46  |
| Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Введение в метаболизм, Центральные метаболические пути, биологическое окисление, окислительное фосфорилирование. Обмен углеводов. Фотосинтез» ..... | 51  |
| Обмен липидов. Переваривание, всасывание и ресинтез. Транспорт экзогенных липидов. Количественное определение активности липаз .....  | 53  |
| Обмен холестерина. Транспорт липидов кровью. Депонирование и мобилизация липидов. Определение $\beta$ -липопротеинов в сыворотке крови .....  | 58  |
| Внутриклеточный обмен жирных кислот. Кетоновые тела. Количественное определение холестерина в сыворотке крови.....  | 62  |
| Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по теме «Обмен липидов» .....  | 67  |
| Контроль практических навыков биохимического анализа.....   | 69  |
| Азотистый баланс. переваривание белков. Пути использования аминокислот в клетке. Анализ желудочного сока.....   | 71  |
| Превращения аминокислот по аминокруппе. Обезвреживание аммиака. Количественное определение остаточного азота крови и мочевины в моче .....  | 75  |
| Химия и обмен нуклеопротеинов. определение содержания мочевой кислоты и общего азота в моче .....   | 80  |
| Матричные биосинтезы (синтез ДНК, РНК, белков). Методы молекулярной биологии .....  | 85  |
| Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Обмен простых белков и нуклеопротеинов. Биосинтез ДНК, РНК и белка. Методы молекулярной биологии».....  | 91  |
| Гормоны. Общая характеристика и особенности биологического действия гормонов. Качественные реакции на гормоны.....  | 92  |
| Гормональная регуляция метаболизма. Тест на толерантность к глюкозе .....   | 98  |
| Биохимия питания. Незаменимые факторы питания. Жирорастворимые витамины .....   | 104 |
| Биохимия питания. Водорастворимые витамины. Количественное определение витамина С в плодах шиповника и моче.....  | 109 |
| Вода и минеральные вещества. Макро- и микроэлементы. Гормональная регуляция водно-солевого и минерального обмена .....  | 114 |
| Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Гормоны», «Биохимия питания» .....  | 118 |

|   |     |
|---|-----|
| Белки плазмы крови. Система гемостаза .....   | 120 |
| Биохимия почек и мочи. Физиологические и патологические компоненты мочи.....  | 127 |
| Биохимия печени. Интеграция метаболизма .....   | 133 |
| Введение в фармацевтическую биохимию. Биотрансформация ксенобиотиков .....  | 141 |
| Перечень вопросов для подготовки к коллоквиуму по темам: «Биохимия крови», «Биохимия печени и интеграция метаболизма», «Фармацевтическая биохимия»..... | 146 |
| Контроль практических навыков биохимического анализа: анализ желудочного сока и мочи.....   | 147 |
| Приложение 1.....   | 148 |
| Приложение 2.....   | 157 |

Учебное издание

**Таганович** Анатолий Дмитриевич  
**Девина** Елена Анатольевна  
**Олецкий** Эдуард Иванович и др.

**РУКОВОДСТВО  
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА**

Практикум

Ответственный за выпуск А. Д. Таганович  
В авторской редакции  
Компьютерная вёрстка А. В. Янушкевич

Подписано в печать 01.11.12. Формат 60×84/8. Бумага писчая.  
Печать ризографическая. Гарнитура «Times».  
Усл. печ. л. 18,69. Уч.-изд. л. 10,87. Тираж 150 экз. Заказ 784.

Издатель и полиграфическое исполнение:  
учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».  
ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.  
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.