

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.Б.07 Биологическая химия

Направление подготовки : 36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»
Профиль образовательной программы: «Ветеринарно-санитарная экспертиза»
Форма обучения: очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций.....	4
1.1. Лекция №1 Строение и свойства аминокислот, входящих в состав белков. Структура белков.....	4
1.2 Лекция №2 Формирование трехмерной структуры белка в клетке. Физико-химические свойства белков.....	5
1.3 Лекция №3 Витамины. Классификация. Общая характеристика.....	6
1.4 Лекция № 4 Ферменты. Строение. Кофакторы. Механизм действия.....	9
1.5 Лекция №5 Структурная организация нуклеиновых кислот. Репликация и репарация.....	13
1.6 Лекция № 6 Транскрипция. Биосинтез белков (трансляция). Ингибиторы матричного биосинтеза.....	17
1.7 Лекция №7 Биологическое окисление. Окислительное форфорилирование АДФ. ЦПЭ.....	20
1.8 Лекция №8 Метаболизм глюкозы и гликогена в клетках.....	23
1.9 Лекция № 9 Строение основных липидов организма. Переваривание липидов....	25
1.10 Лекция № 10 Обмен ТАГ, кетонных тел, эйкозаноидов и холестерина.....	25
1.11 Лекция № 11 Источники и пути использования аминокислот в клетках. Биологическая ценность белков.....	29
1.12 Лекция №12 Переваривание белков. Катаболизм аминокислот. Обмен аммиака.	30
1.13 Лекция № 13 Основные системы регуляции метаболизма и межклеточной коммуникации.....	32
1.14 Лекция № 14 Строение, биосинтез и биологическое действие гормонов.....	34
1.15 Лекция №15 Функции крови. Белки плазмы крови. Синтез гема и его регуляция	39
1.16 Лекция №16 Биохимия мышечной ткани.....	42
2. Методические материалы по выполнению лабораторных работ.....	46
2.1 Лабораторная работа № ЛР-1 Строение и свойства аминокислот, входящих в состав белков. Структура белков.....	46
2.2 Лабораторная работа № ЛР-2 Формирование трехмерной структуры белка в клетке. Физико-химические свойства белков.....	49
2.3 Лабораторная работа № ЛР-3 Витамины. Классификация. Общая характеристика	50
2.4 Лабораторная работа № ЛР-4 Ферменты. Строение. Кофакторы. Механизм действия.....	53
2.5 Лабораторная работа № ЛР-5 Структурная организация нуклеиновых кислот. Репликация и репарация.....	54
2.6 Лабораторная работа № ЛР-6 Транскрипция. Биосинтез белков (трансляция). Ингибиторы матричного биосинтеза.....	55
2.7 Лабораторная работа № ЛР-7 Биологическое окисление. Окислительное форфорилирование АДФ. ЦПЭ.....	56
2.8 Лабораторная работа № ЛР-8 Метаболизм глюкозы и гликогена в клетках.....	57
2.9 Лабораторная работа № ЛР-9 Строение основных липидов организма. Переваривание липидов.....	59
2.10 Лабораторная работа № ЛР-10 Обмен ТАГ, кетонных тел, эйкозаноидов и холестерина.....	62
2.11 Лабораторная работа № ЛР-11 Источники и пути использования аминокислот в клетках. Биологическая ценность белков.....	63
2.12 Лабораторная работа № ЛР-12 Переваривание белков. Катаболизм аминокислот. Обмен аммиака.....	65
2.13 Лабораторная работа № ЛР-13 Основные системы регуляции метаболизма и межклеточной коммуникации.....	73
2.14 Лабораторная работа № ЛР-14 Строение, биосинтез и биологическое действие гормонов.....	75

2.15 Лабораторная работа № ЛР-15 Функции крови. Белки плазмы крови. Синтез гемоглобина и его регуляция.....	76
2.16 Лабораторная работа № ЛР-16 Биохимия мышечной ткани.....	77

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция № 1 (4 часа).

Тема: «Строение и свойства аминокислот, входящих в состав белков. Структура белков»

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Строение и свойства аминокислот
2. Пептидная связь.






1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Строение и свойства аминокислот

Общая структурная особенность аминокислот - наличие amino- и карбоксильной групп, соединённых с одним и тем же углеродным атомом. R - радикал аминокислот - в простейшем случае представлен атомом водорода (глицин), но может иметь и более сложное строение.

В водных растворах при нейтральном значении pH аминокислоты существуют в виде биполярных ионов.

Таблица Классификация основных аминокислот белков по их химическому строению

Тривиальные названия аминокислот	Сокращённые названия		Строение радикалов
	русские	латинские	
I. Аминокислоты с алифатическими радикалами			
1. Глицин	Гли	Gly G	<div>$\begin{array}{c} \text{-H} \\ \text{-CH}_3 \\ \text{-CH} < \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \\ \text{-CH}_2\text{-CH} < \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \\ \text{-CH-CH}_2\text{-CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$</div>
2. Аланин	Ала	Ala A	
3. Валин	Вал	Val V	
4. Лейцин	Лей	Leu L	
5. Изолейцин	Иле	Ile I	
II. Аминокислоты, содержащие в алифатическом радикале дополнительную функциональную группу			
Гидроксильную группу			
6. Серин	Сер	Ser S	-CH ₂ -OH
7. Треонин	Тре	Thr T	-CH(OH)-CH ₃
Карбоксильную группу			
8. Аспарагиновая кислота	Асп	Asp D	-CH ₂ -COOH
9. Глутаминовая кислота	Глу	Glu E	-CH ₂ -CH ₂ -COOH
Амидную группу			
10. Аспарагин	Асп	Asn N	-CH ₂ -CO-NH ₂
11. Глутамин	Гли	Gln Q	-CH ₂ -CH ₂ -CO-NH ₂
Аминогруппу			
12. Лизин	Лиз	Lys K	-(CH ₂) ₄ -NH ₂
Гуанидиновую группу			
13. Аргинин	Арг	Arg R	-(CH ₂) ₃ -NH-C-NH ₂ NH
Серу			
14. Цистеин	Цис	Cys C	-CH ₂ -SH
15. Метионин	Мет	Met M	-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃
III. Аминокислоты, содержащие ароматический радикал			
16. Фенилаланин	Фен	Phe F	-CH ₂ - 
17. Тирозин	Тир	Tyr Y	-CH ₂ - 
IV. Аминокислоты с гетероциклическими радикалами			
18. Триптофан	Три	Trp W	-CH ₂ - 
19. Гистидин	Гис	His H	-CH ₂ - 
V. Иминокислота			
20. Пролин	Про	Pro P	 -COOH Дана полная формула

2. Пептидная связь.

α-Аминокислоты могут ковалентно связываться друг с другом с помощью пептидных связей. Пептидная связь образуется между α-карбоксильной группой одной аминокислоты и α-аминогруппой другой, т.е. является амидной связью. При этом происходит отщепление молекулы воды.

Количество аминокислот в составе пептидов может сильно варьировать. Пептиды, содержащие до 10 аминокислот, называют **олигопептиды**. Часто в названии таких молекул указывают количество входящих в состав олигопептида аминокислот: трипептид, пентапептид, октапептид и т.д.

Пептиды, содержащие более 10 аминокислот, называют «**полипептиды**», а полипептиды, состоящие из более чем 50 аминокислотных остатков, обычно называют белками. Однако эти названия условны, так как в литературе термин «белок» часто употребляют для

обозначения полипептида, содержащего менее 50 аминокислотных остатков. Например, гормон глюкагон, состоящий из 29 аминокислот, называют белковым гормоном.

Мономеры аминокислот, входящих в состав белков, называют «аминокислотные остатки». Аминокислотный остаток, имеющий свободную аминогруппу, называется N-концевым и пишется слева, а имеющий свободную α -карбоксильную группу - С-концевым и пишется справа. Пептиды пишутся и читаются с N-конца. Цепь повторяющихся атомов в полипептидной цепи -NH-CH-CO- носит название «пептидный остов».

При названии полипептида к сокращённому названию аминокислотных остатков добавляют суффикс -ил, за исключением С-концевой аминокислоты. Например, тетрапептид Сер-Гли-Про-Ала читается как серилглицилпролил-аланин.

Пептидная связь, образуемая иминой группой пролина, отличается от других пептидных связей, так как атом азота пептидной группы связан не с водородом, а с радикалом.

Пептиды различаются по аминокислотному составу, количеству и порядку соединения аминокислот. Сер-Гис-Про-Ала и Ала-Про-Гис-Сер - два разных пептида, несмотря на то, что они имеют одинаковые количественный и качественный составы аминокислот.

1. 2 Лекция №2 (2 часа).

Тема:«Формирование трехмерной структуры белка в клетке. Физико-химические свойства белков»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Фолдинг белков
2. Ренативация белков
3. Роль шаперонов в фолдинге белков

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Фолдинг белков

Формирование трёхмерной структуры белков - важнейший биологический процесс, так как от пространственной структуры белков зависит их биологическая функция.

Процесс сворачивания полипептидной цепи в правильную пространственную структуру получил название "фолдинг белков". Индивидуальные белки, продукты одного гена, имеют идентичную аминокислотную последовательность и приобретают в одинаковых условиях клетки одинаковую конформацию и функцию. Это положение подтверждается способностью некоторых белков после денатурации (при которой происходит разрыв слабых связей, но не повреждается первичная структура белков) спонтанно восстанавливать свою уникальную конформацию и функцию.

2. Ренативация белков

Долгое время считалось, что процесс денатурации белков необратим. Однако оказалось, что некоторые очищенные и денатурированные белки способны в оптимальных условиях восстанавливать конформацию при удалении денатурирующих агентов.

Ренативация рибонуклеазы

В начале 60-х г. XX века обнаружили, что процесс денатурации белков может быть обратимым. Это открытие было сделано при изучении денатурации рибонуклеазы - фермента, расщепляющего связи между нуклеотидами в РНК. Рибонуклеаза - глобулярный белок, содержащий одну полипептидную цепь, состоящую из 124 аминокислотных остатков. Его конформацию стабилизируют 4 дисульфидные и множество слабых связей.

Обработка рибонуклеазы β -меркаптоэтанолом (формула β -меркаптоэтанола - $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$) приводит к разрыву дисульфидных связей и восстановлению SH-групп цистеиновых остатков, что нарушает компактную структуру белка. Добавление 8 М раствора мочевины или 6 М раствора гуанидинхлорида, вызывающих разрыв слабых связей в белке и образование новых водородных связей с денатурирующими агентами, приводит к образованию случайным образом свёрнутых полипептидных цепей

рибонуклеазы, лишённых ферментативной активности, т.е. к денатурации фермента. Денатурирующие агенты не разрушают первичную структуру белка.

Однако если путём диализа очистить рибонук-леазу от денатурирующих агентов и β-меркап-тоэтанола, ферментативная активность белка постепенно восстанавливается. Этот процесс называется ренатурацией, или ренативацией белка. Сульфгидрильные группы денатурированного фермента под действием кислорода воздуха окисляются, в результате вновь возникают 4 дисульфидные связи, характерные для натив-ной структуры белка. Из 105 возможных способов связывания восьми SH-групп остатков цистеина реализуется только один вариант, характерный для нативной конформации белка.

Возможность ренативации впоследствии была доказана и для других белков, в частности миог-лобина. Сохранность первичной структуры белка - необходимое условие для восстановления его конформации. На основании этих опытов был выведен фундаментальный принцип молекулярной биологии: аминокислотная последовательность белков определяет их конформацию и специфическую функцию.

Формирование пространственной структуры белка - самопроизвольный процесс, при котором белок стремится принять в данных условиях конформацию с наименьшей свободной энергией. Изменение условий окружающей среды или изменение первичной структуры данного белка могут привести к изменению его конформации и функции.

3. Роль шаперонов в фолдинге белков

В процессе синтеза полипептидных цепей, транспорта их через мембраны, при сборке олигомерных белков возникают промежуточные нестабильные конформации, склонные к агрегации. На вновь синтезированном полипептиде имеется множество гидрофобных радикалов, которые в трёхмерной структуре спрятаны внутри молекулы. Поэтому на время формирования нативной конформации реакционно-способные аминокислотные остатки одних белков должны быть отделены от таких же групп других белков.

Во всех известных организмах от прокариотов до высших эукариотов обнаружены белки, способные связываться с белками, находящимися в неустойчивом, склонном к агрегации состоянии. Они способны стабилизировать их конформацию, обеспечивая фолдинг белков. Эти белки получили название «шапероны». Классификация шаперонов.

1. 3Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Витамины.Классификация. Общая характеристика»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Общее понятие о витаминах. История учения о витаминах.
2. Понятие о гипо-, гипер- и авитаминозе.
3. Классификация витаминов.
4. Водорастворимые витамины
5. Жирорастворимые витамины.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Общее понятие о витаминах. История учения о витаминах.

Ко второй половине XIX столетия было установлено, что пищевая ценность продуктов питания определяется содержанием в них белков, жиров, углеводов, минеральных солей и воды.

Однако практический опыт врачей и клинические наблюдения, а также история морских и сухопутных путешествий указывали на возникновение ряда специфических заболеваний (цинга, бери-бери), связанных с дефектами питания, хотя последнее полностью отвечало указанным выше требованиям.

Важный вклад в развитие учения о витаминах был сделан отечественным врачом Н.И. Луниным в опытах на мышах. Одна группа мышей (контрольная) получала натуральное молоко, а вторая - смесь компонентов молока: белок, жир, молочный сахар, минеральные соли и вода. Спустя некоторое время мыши опытной группы погибали, а

мышцы контрольной группы развивались нормально. Отсюда следовал вывод о наличии в молоке дополнительных веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности.

Подтверждением правильности вывода Лунина явилось установление причины бери-бери. Оказалось, что люди, употребляющие в пищу неочищенный рис, оставались здоровыми, в отличие от больных бери-бери, которые питались полированным рисом. В 1911 г. польский учёный К. Функ выделил из рисовых отрубей вещество, которое оказывало хороший лечебный эффект при этом заболевании. Поскольку это органическое вещество содержало в своём составе аминокруппу, Функ назвал это вещество витамином, или амином жизни (от лат. *vita* - жизнь). В настоящее время известно около двух десятков витаминов, которые обеспечивают нормальный рост организма и нормальное протекание физиологических и биохимических процессов. Многие из них входят в состав коферментов (В₁, В₂, РР и другие); некоторые витамины выполняют специализированные функции (витамины А, D, Е, К).

Витамины - низкомолекулярные органические соединения различной химической природы и различного строения, синтезируемые главным образом растениями, частично - микроорганизмами. Для человека витамины - незаменимые пищевые факторы.

2. Понятие о гипо-, гипер- и авитаминозе.

Недостаток поступления витаминов с пищей, нарушение их всасывания или нарушение их использования организмом приводит к развитию патологических состояний, называемых гиповитаминозами.

Основные причины гиповитаминозов

- Недостаток витаминов в пище;
- Нарушение всасывания в ЖКТ;
- Врождённые дефекты ферментов, участвующих в превращениях витаминов;
- Действие структурных аналогов витаминов (антивитамины).

Потребность человека в витаминах зависит от пола, возраста, физиологического состояния и интенсивности труда. Существенное влияние на потребность человека в витаминах оказывают характер пищи (преобладание углеводов или белков в диете, количество и качество жиров), а также климатические условия.

3. Классификация витаминов.

По химическому строению и физико-химическим свойствам (в частности, по растворимости) витамины делят на 2 группы.

А. Водорастворимые

- Витамин В₁ (тиамин);
- Витамин В₂ (рибофлавин);
- Витамин РР (никотиновая кислота, никотинамид, витамин В₃);
- Пантотеновая кислота (витамин В₅);
- Витамин В₆ (пиридоксин);
- Биотин (витамин Н);
- Фолиевая кислота (витамин В_с, В₉);
- Витамин В₁₂ (кобаламин);
- Витамин С (аскорбиновая кислота);
- Витамин Р (биофлавоноиды).

Б. Жирорастворимые

- Витамин А (ретинол);
- Витамин D (холекальциферол);
- Витамин Е (токоферол);
- Витамин К (филлохинон).

Водорастворимые витамины при их избыточном поступлении в организм, будучи хорошо растворимыми в воде, быстро выводятся из организма.

Жирорастворимые витамины хорошо растворимы в жирах и легко накапливаются в организме при их избыточном поступлении с пищей. Их накопление в организме может вызвать расстройство обмена веществ, называемое гипервитаминозом, и даже гибель организма.

4. Водорастворимые витамины

Название	Суточная потребность, мг	Коферментная форма	Биологические функции	Характерные признаки авитаминозов
B ₁ (тиамин)	2-3	ТДФ	Декарбоксилирование α-кетокислот, перенос активного альдегида (транскетолаза)	Полиневрит
B ₂ (рибофлавин)	1,8-2,6	FAD FMN	В составе дыхательных ферментов, перенос водорода	Поражение глаз (кератиты, катаракта)
B ₅ (пантотеновая кислота)	10-12	КоА-SH	Транспорт ацильных групп	Дистрофические изменения в надпочечниках и нервной ткани
B ₆ (пиридоксин)	2-3	ПФ (пиридоксальфосфат)	Обмен аминокислот (трансаминирование, декарбоксилирование)	Повышенная возбудимость нервной системы, дерматиты
PP (ниацин)	15-25	NAD NADP	Акцепторы и переносчики водорода	Симметричный дерматит на открытых участках тела, деменция и диарея
H (биотин)	0,01-0,02	Биотин	Фиксация CO ₂ , реакции карбоксилирования (например, пирувата и ацетил-КоА)	Дерматиты, сопровождающиеся усиленной деятельностью слюнных желез
B ₉ (фолиевая кислота)	0,05-0,4	Тетрагидро-фолиевая кислота	Транспорт одноуглеродных групп	Нарушения кроветворения (анемия, лейкопении)
B ₁₂ (кобаламин)	0,001-0,002	Дезоксиаденозил-и метилкобаламин	Транспорт металлов групп	Макроцитарная анемия
C (аскорбиновая кислота)	50-75		Гидроксилирование пролина, лизина (синтез коллагена), антиоксидант	Кровоточивость десен, расшатывание зубов, подкожные кровоизлияния, отеки

Р (рутин)	Не установлена		Вместе с витамином С участвует в окислительно-восстановительных процессах, тормозит действие гиалуронидазы	Кровоточивость дёсен и точечные кровоизлияния
-----------	----------------	--	--	---

5. Жирорастворимые витамины.

Название	Суточная потребность, мг	Биологические функции	Характерные признаки авитаминозов
А (ретинол)	1-2,5	Участвует в акте зрения, регулирует рост и дифференцировку клеток	Гемералопия (куриная слепота), ксерофтальмия, кератомалиция, кератоз эпителиальных клеток
D (кальциферол)	0,012-0,025	Регуляция обмена фосфора и кальция в организме	Рахит
Е (токоферол)	5	Антиоксидант; регулирует интенсивность свободнорадикальных реакций в клетке	Недостаточно изучены; известно положительное влияние на развитие беременности и при лечении бесплодия
К (нафтохинон)	1-2	Участвует в активации факторов свёртывания крови: II, VII, IX, XI	Нарушение свёртывающей системы крови

1. 4Лекция №4 (6 часа).

Тема: «Ферменты. Строение. Кофакторы. Механизм действия»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Общее понятие о ферментах
2. Специфичность
3. Каталитическая эффективность и лабильность ферментов
4. Номенклатура ферментов
5. Классы ферментов
6. Кофакторы и коферменты

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Общее понятие о ферментах

Ферменты, как было установлено ещё в 1922 г., являются белками. Их роль уникальна: они увеличивают скорость протекания химической реакции, однако при этом не расходуются. В 1926 г. был впервые очищен и выделен в виде белковых кристаллов фермент уреазы, катализирующий реакции расщепления мочевины до аммиака и диоксида углерода. К настоящему времени в кристаллическом виде получены сотни различных ферментов, расшифрованы их аминокислотные последовательности, изучается их роль в метаболических превращениях.

В роли биокатализаторов могут выступать и небелковые соединения. Например, некоторые типы РНК вызывают гидролиз фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот. Такие молекулы РНК с каталитической активностью называют рибозимами, однако их значение в химическом превращении соединений намного меньше, чем у ферментов.

Поскольку ферменты - белковые молекулы, следовательно, они обладают всеми свойствами, характерными для белков. В то же время они имеют особенности строения, характеризующие их как катализаторы. Рассмотрим основные свойства ферментов как биологических катализаторов.

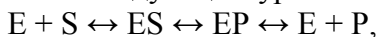
2. Свойства ферментов

А. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Биологическая функция фермента, как и любого белка, обусловлена наличием в его структуре активного центра. Лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента, называют субстратом. В активном центре фермента есть аминокислотные остатки, функциональные группы которых обеспечивают связывание субстрата, и аминокислотные остатки, функциональные группы которых осуществляют химическое превращение субстрата. Условно

эти группы обозначают как участок связывания субстрата и каталитический участок, однако следует помнить, что не всегда эти участки имеют чёткое пространственное разделение и иногда могут «перекрываться»

В участке связывания субстрат при помощи нековалентных связей взаимодействует (связывается) с ферментом, формируя фермент-субстратный комплекс. В каталитическом участке субстрат претерпевает химическое превращение в продукт, который затем высвобождается из активного центра фермента. Схематично процесс катализа можно представить следующим уравнением:

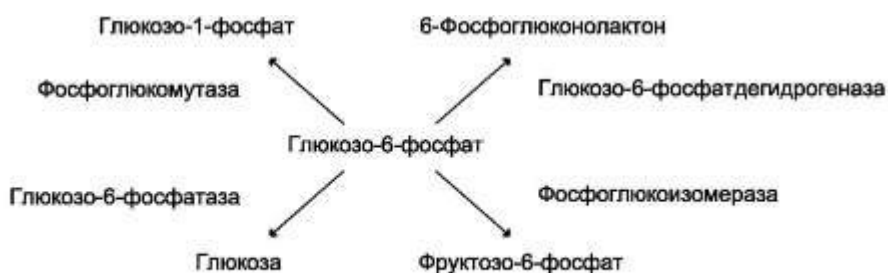


где E - фермент (энзим), S - субстрат, P - продукт. Данные обозначения общеприняты и происходят от английских слов *enzyme*, *substrat*, *product*.

Специфичность - наиболее важное свойство ферментов, определяющее биологическую значимость этих молекул. Различают субстратную и каталитическую специфичности фермента, определяемые строением активного центра

Б. КАТАЛИТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Большинство катализируемых ферментами реакций высокоэффективны, они протекают в 10^8 - 10^{14} раз быстрее, чем некатализируемые реакции. Каждая молекула фермента способна за секунду трансформировать от 100 до 1000 молекул субстрата в продукт.



Схема

Количество молекул субстрата, превращённых в продукт с помощью одной молекулы фермента за 1 с, называют числом оборотов фермента, или молярной активностью.

В. лабильность ферментов

Каталитическая эффективность фермента, как и любой белковой молекулы, зависит от его конформации, и в частности от конформации активного центра.

Для ферментов характерна конформационная лабильность - способность к небольшим изменениям нативной конформации вследствие разрыва слабых связей. Поэтому воздействие денатурирующих агентов, способных изменять конформацию молекулы фермента, приводит к изменению конформации активного центра и снижению способности присоединять субстрат. В результате этого уменьшается каталитическая эффективность фермента.

Г. способность ферментов к регуляции

Активность ферментов в клетке зависит от количества молекул субстрата, продукта, наличия кофакторов и коферментов. Действие ферментов в клетке, как правило, строго упорядочено: продукт одной ферментативной реакции является субстратом другой, образуя таким образом «метаболические пути». Среди множества ферментов практически каждого метаболического пути различают ключевые, или регуляторные, ферменты, активность которых может изменяться в зависимости от потребности клетки в конечном продукте метаболического пути. Регуляторные ферменты расположены, как правило, в начале и/или в месте разветвления метаболического пути. Они катализируют либо самые медленные (скорость-лимитирующие реакции), либо необратимые реакции.

Каждый фермент имеет 2 названия. Первое - короткое, так называемое рабочее, удобное для повседневного использования. Второе (более полное) - систематическое, применяемое для однозначной идентификации фермента.

В названии большинства ферментов содержится суффикс "аза", присоединённый к названию субстрата реакции, например уреаза, сахараза, липаза, нуклеаза или к названию химического превращения определённого субстрата, например лактатдегидрогеназа, аденилатциклаза, фосфо-глюкомутаза, пируваткарбоксилаза. Согласно российской классификации ферментов (КФ), названия ферментов пишутся слитно. Однако в употреблении сохранился ряд тривиальных, исторически закреплённых названий ферментов, которые не дают представления ни о субстрате, ни о типе химического превращения, например трипсин, пепсин, ренин, тромбин.

Международный союз биохимии и молекулярной биологии в 1961 г. разработал систематическую номенклатуру, согласно которой все ферменты разбиты на 6 основных классов в зависимости от типа катализируемой химической реакции.

2. Классы ферментов

Каждый класс ферментов состоит из многочисленных подклассов и подподклассов с учётом преобразуемой химической группы субстрата, донора и акцептора преобразуемых группировок, наличия дополнительных молекул и т.д. Каждый из 6 классов имеет свой порядковый номер, строго закреплённый за ним.

Класс ферментов	Тип реакции
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции
Трансферазы	Перенос отдельных атомов или групп атомов
Гидролазы	Гидролитическое расщепление химических связей
Лиазы	Негидролитическое расщепление двойных связей
Изомеразы	Взаимопревращения различных изомеров
Лигаза	Образование связей при взаимодействии двух или более соединений

3. Кофакторы и коферменты

Большинство ферментов для проявления ферментативной активности нуждается в низкомолекулярных органических соединениях небелковой природы (коферментах) и/или в ионах металлов (кофакторах).

Термин "кофермент" был введён в начале XX века и обозначал часть некоторых ферментов, которая легко отделялась от белковой молекулы фермента и удалялась через полупроницаемую мембрану при диализе. Несколько позже было выяснено, что большинство ферментов состоит из термолабильной белковой части и термостабильного небелкового фактора - кофермента. Белковая часть получила название "апофермент", который в отсутствие кофермента не обладает каталитической активностью. Кофермент с белковой молекулой (апоферментом) формируют молекулу холофермента, обладающую каталитической активностью.

1. Энергетические изменения при химических реакциях

Любые химические реакции протекают, подчиняясь двум основным законам термодинамики: закону сохранения энергии и закону энтропии.

Энергией активации называют дополнительное количество кинетической энергии, необходимое молекулам вещества, чтобы они вступили в реакцию.

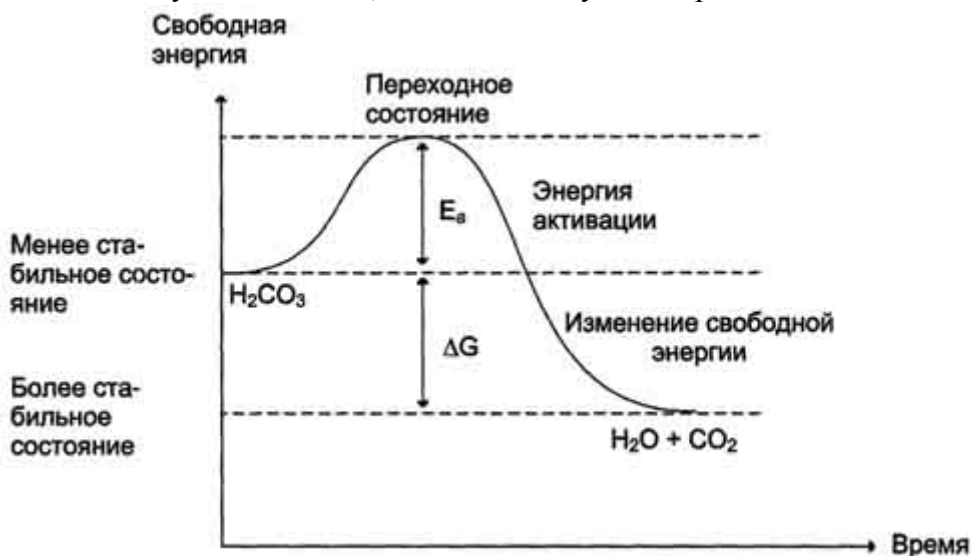


Рис.. Изменение свободной энергии при разложении угольной кислоты.

В механизме ферментативного катализа решающее значение имеет образование нестойких промежуточных соединений - фермент-субстратный комплекс ES, подвергающийся превращению в нестабильный переходный комплекс EP, который почти мгновенно распадается на свободный фермент и продукт реакции.

Таким образом, биологические катализаторы (ферменты) не изменяют свободную энергию субстратов и продуктов и поэтому не меняют равновесие реакции

Фермент, выполняя функцию катализатора химической реакции, подчиняется общим законам катализа и обладает всеми свойствами, характерными для небиологических катализаторов, однако имеет и отличительные свойства, связанные с особенностями строения ферментов.

Сходство ферментов с небиологическими катализаторами заключается в том, что:

- ферменты катализируют энергетически возможные реакции;
- энергия химической системы остаётся постоянной;
- в ходе катализа направление реакции не изменяется;
- ферменты не расходуются в процессе реакции.

Отличия ферментов от небиологических катализаторов заключаются в том, что:

- скорость ферментативных реакций выше, чем реакций, катализируемых небелковыми катализаторами;
- ферменты обладают высокой специфичностью;
- ферментативная реакция проходит в клетке, т.е. при температуре 37 °С, постоянном атмосферном давлении и физиологическом значении pH;
- скорость ферментативной реакции может регулироваться.

2. Этапы ферментативного катализа

- *Формирование фермент-субстратного комплекса*
- *Последовательность событий в ходе ферментативного катализа*
- *Роль активного центра в ферментативном катализе*

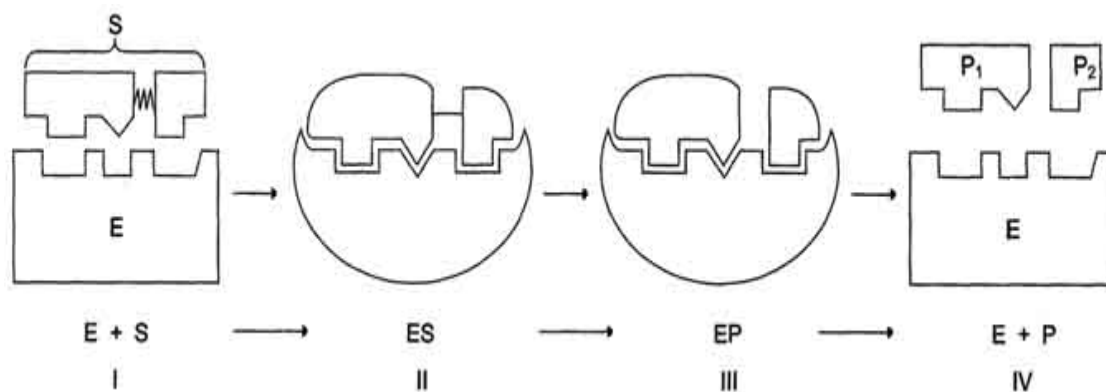


Рис. Этапы ферментативного катализа. I - этап сближения и ориентации субстрата относительно активного центра фермента; II - образование фермент-субстратного комплекса (ES) в результате индуцированного соответствия; III - деформация субстрата и образование нестабильного комплекса фермент-продукт (EP); IV - распад комплекса (EP) с высвобождением продуктов реакции из активного центра фермента и освобождением фермента.

1. 5 Лекция №5 (4 часа).

Тема: «Структурная организация нуклеиновых кислот. Репликация и репарация»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Строение нуклеотидов
2. Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)
3. Генетическая система митохондрий
4. Структура рибонуклеиновых кислот (РНК)
5. Гибридизация нуклеиновых кислот

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Строение нуклеотидов

Каждый нуклеотид содержит 3 химически различных компонента: гетероциклическое азотистое основание, моносахарид (пентозу) и остаток фосфорной кислоты. В зависимости от числа имеющихся в молекуле остатков фосфорной кислоты различают нуклеозидмонофосфаты (НМФ), нуклеозиддифосфаты (НДФ), нуклеозидтрифосфаты (НТФ)

В состав нуклеиновых кислот входят азотистые основания двух типов: пуриновые - **аденин (А)**, **гуанин (G)** и пиримидиновые - **цитозин (С)**, **тимин (Т)** и **урацил (U)**. Нумерация атомов в основаниях записывается внутри цикла (рис. 4-2). Номенклатура нуклеотидов приведена в табл.

Пентозы в нуклеотидах представлены либо рибозой (в составе РНК), либо дезоксирибозой (в составе ДНК). Чтобы отличить номера атомов в пентозах от нумерации атомов в основаниях, запись производят с внешней стороны цикла и к цифре добавляют штрих (') - 1', 2', 3', 4' и 5'.

Пентозу соединяет с основанием **N-гликозидная связь**, образованная С₁-атомом пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и N₁-атомом пиримидина или N₉-атомом пурина.

Нуклеотиды, в которых пентоза представлена рибозой, называют рибонуклеотидами, а нуклеиновые кислоты, построенные из рибонуклеотидов, - рибонуклеиновыми кислотами, или РНК.

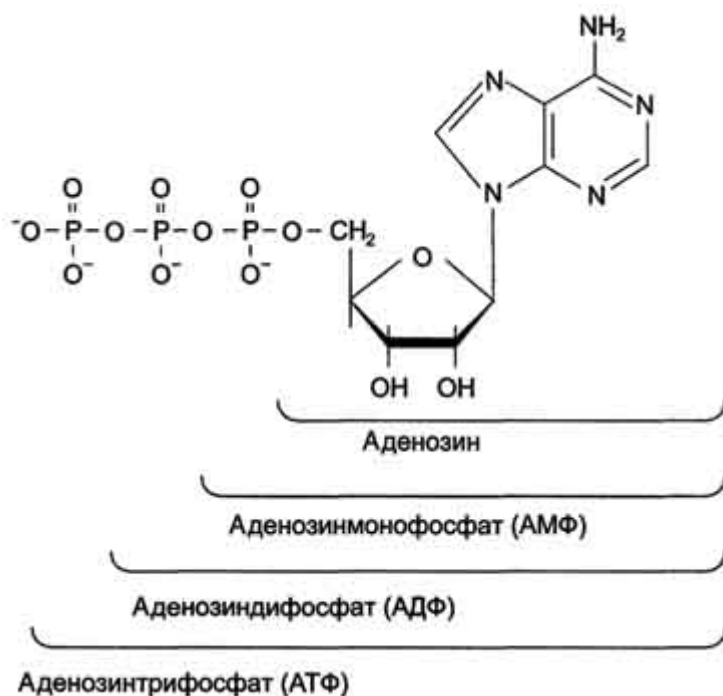


Рис. Нуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты аденозина.

Нуклеотиды - фосфорные эфиры нуклеозидов. Остаток фосфорной кислоты присоединён к 5'-углеродному атому пентозы (5'-фосфоэфирная связь).

Таблица Номенклатура нуклеотидов

Азотистое основание	Нуклеозид	Нуклеотид	Трёхбуквенное обозначение	Однобуквенный код
Аденин	Аденозин	Аденозинмонофосфат	АМФ	A
Гуанин	Гуанозин	Гуанозинмонофосфат	ГМФ	G
Цитозин	Цитидин	Цитидинмонофосфат	ЦМФ	C
Урацил	Уридин	Уридинмонофосфат	УМФ	U
Тимин	Тимидин	Тимидинмонофосфат	ТМФ	T

Нуклеиновые кислоты по своему строению относят к классу линейных полимеров. Остов нуклеиновой кислоты имеет одинаковое строение по всей длине молекулы и состоит из чередующихся групп - пентоза-фосфат-пентоза- Вариабельными группами в полинуклеотидных цепях служат азотистые основания - пурины и пиримидины. В молекулы РНК входят аденин (А), урацил (U), гуанин (G) и цитозин (C), в ДНК - аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (C). Уникальность структуры и функциональная индивидуальность молекул ДНК и РНК определяются их первичной структурой - последовательностью азотистых оснований в полинуклеотидной цепи.

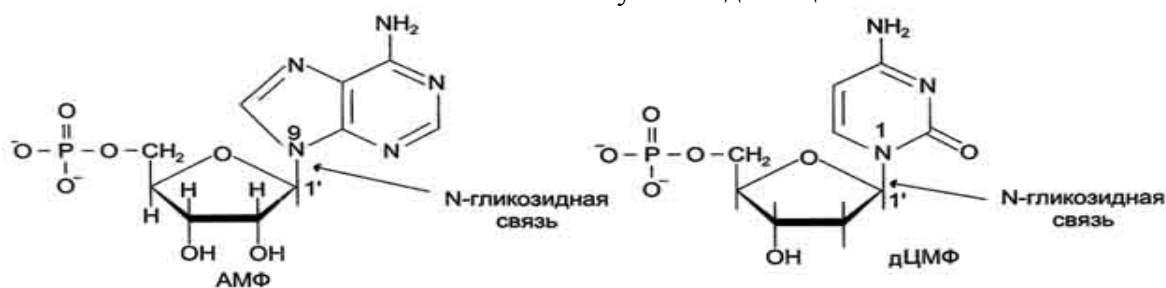
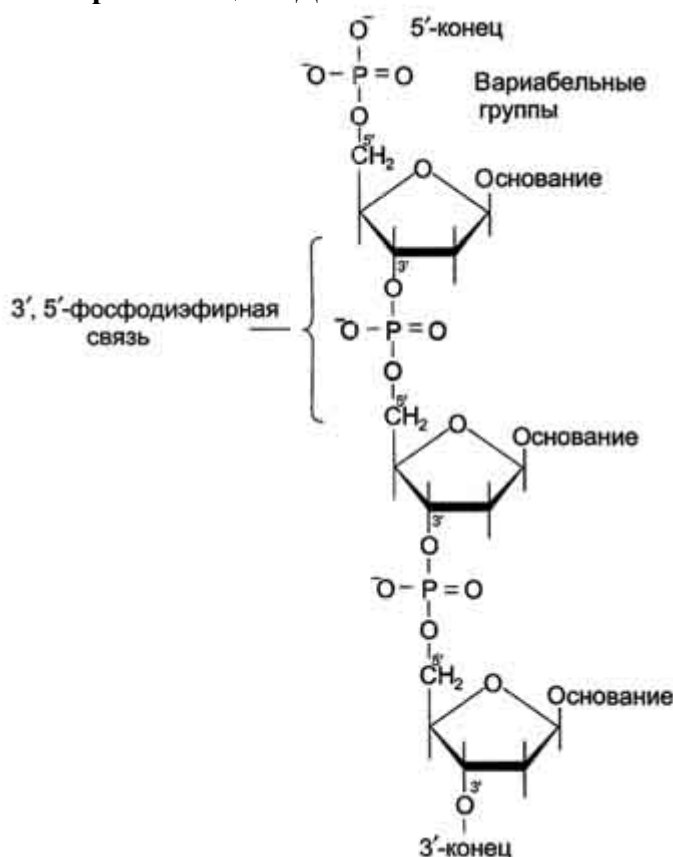


Рис. Пуриновый и пиримидиновый нуклеотиды.

2. Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)

Рис. Фрагмент цепи ДНК.



Первичная структура ДНК - порядок чередования дезоксирибонуклеозидмонофосфатов (дНМФ) в полинуклеотидной цепи.

Вторичная структура ДНК. В 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком была предложена модель пространственной структуры ДНК. Согласно этой модели, молекула ДНК имеет форму спирали, образованную двумя полинуклеотидными цепями, закрученными относительно друг друга и вокруг общей оси.

Третичная структура ДНК (суперспирализация ДНК)

Каждая молекула ДНК упакована в отдельную хромосому. В диплоидных клетках человека содержится **46 хромосом**. Общая длина ДНК всех хромосом клетки составляет 1,74 м, но она упакована в ядре, диаметр которого в миллионы раз меньше. Чтобы расположить ДНК в ядре клетки, должна быть сформирована очень компактная структура. Компактизация и суперспирализация ДНК осуществляются с помощью разнообразных белков, взаимодействующих с определёнными последовательностями в структуре ДНК. Все связывающиеся с ДНК эукариотов белки можно разделить на 2 группы: **гистоновые и негистоновые белки**. Комплекс белков с ядерной ДНК клеток называют хроматином.

3. Генетическая система митохондрий

Митохондрии - важнейшие органеллы клеток, осуществляющие синтез АТФ за счёт окисления субстратов. Митохондрии имеют собственный уникальный геном, наследуемый по материнской линии, так как он происходит из цитоплазмы яйцеклетки. Геном митохондрий сперматозоидов не попадает в оплодотворённую яйцеклетку.

Митохондриальный геном человека представлен одной кольцевой молекулой ДНК из 16 569 нуклеотидных пар. Он кодирует 13 белков, используемых на построение структурно-функциональных компонентов митохондрий.

В митохондриях отсутствуют ферменты, ответственные за репарацию, поэтому митохондриальный геном содержит немало ошибок. Митохондрии эукариотов имеют

очень маленькие рибосомы с константой седиментации 55S, тогда как рибосомы прокариотов - 70S.

4. Структура рибонуклеиновых кислот (РНК)

Первичная структура РНК - порядок чередования рибонуклеозидмонофосфатов (НМФ) в полинуклеотидной цепи. В РНК, как и в ДНК, нуклеотиды связаны между собой 3',5'-фосфодиэфирными связями. Концы полинуклеотидных цепей РНК неодинаковы. На одном конце находится фосфорилированная ОН-группа 5'-углеродного атома, на другом конце - ОН-группа 3'-углеродного атома рибозы, поэтому концы называют 5'- и 3'-концами цепи РНК. Гидроксильная группа у 2'-углеродного атома рибозы делает молекулу РНК нестабильной. Так, в слабощелочной среде молекулы РНК гидролизуются даже при нормальной температуре, тогда как структура цепи ДНК не изменяется.

Вторичная структура РНК

Молекула рибонуклеиновой кислоты построена из одной полинуклеотидной цепи. Отдельные участки цепи РНК образуют спирализованные петли - "шпильки", за счёт водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями А-У и Г-С. Участки цепи РНК в таких спиральных структурах антипараллельны, но не всегда полностью комплементарны, в них встречаются неспаренные нуклеотидные остатки или даже одноцепочечные петли, не вписывающиеся в двойную спираль. Наличие спирализованных участков характерно для всех типов РНК.

Третичная структура РНК

Одноцепочечные РНК характеризуются компактной и упорядоченной третичной структурой, возникающей путём взаимодействия спирализованных элементов вторичной структуры. Так, возможно образование дополнительных водородных связей между нуклеотидными остатками, достаточно удалёнными друг от друга, или связей между ОН-группами остатков рибозы и основаниями. Третичная структура РНК стабилизирована ионами двухвалентных металлов, например ионами Mg^{2+} , связывающимися не только с фосфатными группами, но и с основаниями.

5. Гибридизация нуклеиновых кислот

Вторичная структура нуклеиновых кислот образуется за счёт слабых взаимодействий - водородных и гидрофобных. Поэтому если водный раствор ДНК нагреть до 100 °С, то связи, удерживающие две цепи двойной спирали вместе, разрушаются. В результате разрыва водородных и гидрофобных связей цепи ДНК расходятся. Этот процесс называют "денатурация". Однако если раствор, содержащий денатурированную ДНК, очень медленно охлаждать, то могут получиться двухспиральные структуры, идентичные исходным. Такой процесс получил название "ренативация".

На явлении денатурации и ренативации основан метод, называемый "молекулярная гибридизация". Процесс гибридизации может осуществляться между двумя любыми цепями нуклеиновых кислот (ДНК-ДНК, ДНК-РНК) при условии, что они содержат комплементарные последовательности нуклеотидов. Такие гибридные структуры можно выделить центрифугированием в градиенте плотности сахарозы или наблюдать в электронном микроскопе

1. Репликация

Живые организмы в течение S-фазы клеточного цикла, которая предшествует делению клетки, удваивают содержание ДНК таким образом, что каждая дочерняя клетка после деления получает набор хромосом, идентичный родительской клетке. Процесс удвоения хромосом называют репликацией (редупликацией).

Хромосома содержит одну непрерывную двух-цепочечную молекулу ДНК. При репликации каждая цепь родительской двухцепочечной ДНК служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Вновь образованная двойная спираль имеет одну исходную (родительскую) и одну вновь синтезированную (дочернюю)

цепь. Такой механизм удвоения ДНК получил название «полуконсервативная репликация» (рис. 4-14). Первичная структура дочерней цепи определяется первичной структурой родительской цепи, потому что в основе её образования лежит принцип комплементарности оснований ($G = C$ и $A = T$).

Ферменты и белки, участвующие в репликации, должны работать быстро и точно. Эти условия выполняются с помощью особого мультиферментного комплекса.

Репликацию можно разделить на 4 этапа: образование репликативной вилки (инициация), синтез новых цепей (элонгация), исключение праймеров, завершение синтеза двух дочерних цепей ДНК (терминация).

2. Репарация

Процесс, позволяющий живым организмам восстанавливать повреждения, возникающие в ДНК, называют репарацией. Все репарационные механизмы основаны на том, что ДНК - двухцепочечная молекула, т.е. в клетке есть 2 копии генетической информации. Если нуклеотидная последовательность одной из двух цепей оказывается повреждённой (изменённой), информацию можно восстановить, так как вторая (комплементарная) цепь сохранена.

Процесс репарации происходит в несколько этапов. На первом этапе выявляется нарушение комплементарности цепей ДНК. В ходе второго этапа некомплементарный нуклеотид или только основание устраняется, на третьем и четвёртом этапах идёт восстановление целостности цепи по принципу комплементарности. Однако в зависимости от типа повреждения количество этапов и ферментов, участвующих в его устранении, может быть разным.

Очень редко происходят повреждения, затрагивающие обе цепи ДНК, т.е. нарушения структуры нуклеотидов комплементарной пары. Такие повреждения в половых клетках не репарируются, так как для осуществления сложной репарации с участием гомологичной рекомбинации требуется наличие диплоидного набора хромосом.

1. 6 Лекция №6 (4 часа).

Тема: «Транскрипция. Биосинтез белков (трансляция). Ингибиторы матричного биосинтеза»

1.6.1 Вопросы лекции:

- 1 Генетический код и его свойства
- 2 Основные компоненты белоксинтезирующей системы
- 3 Синтез полипептидной цепи на рибосоме
- 4 Полирибосомы
- 5 Посттрансляционные модификации полипептидной цепи

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Генетический код и его свойства

Необходимость кодирования структуры белков в линейной последовательности нуклеотидов мРНК и ДНК продиктована тем, что в ходе трансляции:

- нет соответствия между числом мономеров в матрице мРНК и продукте - синтезируемом белке;
- отсутствует структурное сходство между мономерами РНК и белка.

Это исключает комплементарное взаимодействие между матрицей и продуктом - принцип, по которому осуществляется построение новых молекул ДНК и РНК в ходе репликации и транскрипции.

Отсюда становится ясным, что должен существовать "словарь", позволяющий выяснить, какая последовательность нуклеотидов мРНК обеспечивает включение в белок аминокислот в заданной последовательности. Этот "словарь" получил название генетического, биологического, нуклеотидного, или аминокислотного кода. Он позволяет шифровать аминокислоты, входящие в состав белков, с помощью определённой

последовательности нуклеотидов в ДНК и мРНК. Для него характерны определённые свойства.

2. Основные компоненты белоксинтезирующей системы

Таблица . Основные компоненты белоксинтезирующей системы

Необходимые компоненты	Функции
1 . Аминокислоты	Субстраты для синтеза белков
2. тРНК	тРНК выполняют функцию адаптеров. Они акцепторным концом взаимодействуют с аминокислотами, а антикодоном - с кодоном мРНК.
3. Аминоацил-тРНК синтетазы	Каждая aa-тРНК-синтаза катализирует реакцию специфического связывания одной из 20 аминокислот с соответствующей тРНК
4.мРНК	Матрица содержит линейную последовательность кодонов, определяющих первичную структуру белков
5. Рибосомы	Рибонуклеопротеиновые субклеточные структуры, являющиеся местом синтеза белков
6. АТФ, ГТФ	Источники энергии
7. Белковые факторы инициации, элонгации, терминации	Специфические вне ribосомные белки, необходимые для процесса трансляции (12 факторов инициации: eIF; 2 фактора элонгации: eEF1, eEF2, и факторы терминации: eRF)
8. Ионы магния	Кофактор, стабилизирующий структуру рибосом

Примечания: eIF (*eukaryotic initiation factors*) - факторы инициации; eEF (*eukaryotic elongation factors*) - факторы элонгации; eRF (*eukaryotic releasing factors*) - факторы терминации.

3. Синтез полипептидной цепи на рибосоме

В ходе синтеза белка прочтение информации мРНК идёт в направлении от 5'- к 3'-концу, обеспечивая синтез пептида от N- к С-концу.

Каждая эукариотическая мРНК кодирует строение только одной полипептидной цепи (т.е. она моноцистронна), в отличие от прокариотических мРНК, которые часто содержат информацию о нескольких пептидах (т.е. они поли-цистронны). Эти различия вызваны тем, что у прокариотов ДНК лишена интронов, и РНК-полимераза транскрибирует участки, прочтение информации с которых подчиняется общему регуляторному механизму. Кроме того, на полицистронных мРНК синтез белка начинается до того, как заканчивается их собственный синтез, так как процессы транскрипции и трансляции не разделены. У эукариотов трансляция протекает в цитоплазме, куда из ядра поступают уже "зрелые" мРНК.

События на рибосоме включают этапы: инициации, элонгации и терминации.

4. Полирибосомы

В процессе синтеза белка рибосома присоединяется к 5'-концу мРНК и перемещается в направлении 3'-конца. При этом 5'-конец мРНК освобождается, и к нему может присоединиться новая рибосома, на которой начинается рост ещё одной полипептидной

цепи. Как правило, много рибосом одновременно участвует в синтезе белка на одной и той же мРНК, образуя комплекс, который называют полирибосомой, или полисомой.

Каждая рибосома занимает на мРНК участок длиной около 80 нуклеотидов, поэтому рибосомы располагаются на мРНК с интервалом примерно в 100 нуклеотидов. Чем длиннее полипептидная цепочка синтезируемого белка, тем больше рибосом может одновременно осуществлять синтез этого белка, значительно увеличивая таким образом эффективность использования матрицы.

5. Посттрансляционные модификации полипептидной цепи

Полипептидные цепи могут подвергаться структурным модификациям, либо будучи ещё связанными с рибосомами, либо после завершения синтеза. Эти конформационные и структурные изменения полипептидных цепей получили название посттрансляционных изменений. Они включают удаление части полипептидной цепи, ковалентное присоединение одного или нескольких низкомолекулярных лигандов, приобретение белком нативной конформации.

Многие модификации осуществляются в ЭР. Здесь происходят **фолдинг полипептидных цепей** и формирование уникальной третичной или четвертичной структуры белков. Причём для поддержания нативной конформации молекул огромное значение имеет правильное **формирование дисульфидных связей**.

1. Ингибиторы репликации

Антибиотики, взаимодействующие с ДНК, нарушают её матричную функцию и вызывают подавление процессов репликации и транскрипции. Их используют для лечения злокачественных новообразований и называют противоопухолевыми препаратами. Дауномицин, доксо-рубицин и некоторые другие взаимодействуют с молекулой ДНК таким образом, что циклическая структура этих антибиотиков встраивается («**интеркалирует**») между парами оснований G=C, а углеводный компонент занимает малую бороздку ДНК. Это ведёт к локальному изменению структуры ДНК и ингибированию репликации и транскрипции.

К «интеркаляторам» относят также антибиотик актиномицин D, блокирующий синтез ДНК и РНК у про- и эукариотов. Это соединение слишком токсично, чтобы использовать его в клинических целях, но его широко используют в научно-исследовательской работе для изучения процессинга первичных транскриптов РНК.

Избирательность действия противоопухолевых антибиотиков невелика и обеспечивается более высокой по сравнению с нормальными клетками скоростью синтеза ДНК и РНК, а также повышенной проницаемостью клеточных мембран опухолевых клеток. В то же время эти соединения токсичны для быстроделющихся нормальных клеток организма, таких как стволовые клетки кроветворной системы, клетки слизистой оболочки желудка и кишечника, фолликулов волос. В последние годы проводятся исследования по созданию препаратов, обеспечивающих доставку ингибитора только в опухолевые клетки. Это достигается связыванием цитотоксических антибиотиков с белками, рецепторы к которым имеются главным образом на опухолевых клетках.

К препаратам, останавливающим репликацию, относят алкилирующие агенты и ингибиторы ДНК-топоизомеразы II (одной из изоформ топо-изомераз). Последние называют ингибиторами гираз, поскольку ДНК-гиразы - ферменты прокариотических клеток, ответственные за суперспирализацию ДНК; у эукариотов аналогичную функцию выполняют ДНК-топоизомеразы.

2. Ингибиторы транскрипции и трансляции

К ингибиторам матричных синтезов, оказывающим противобактериальное действие, относят вещества, блокирующие синтез РНК или белка. В эту группу входит широко применяемый в клинике рифампицин, получаемый на основе природного антибиотика рифамицина. Антибиотики из семейства рифамицинов ингибируют только бактериальную ДНК-зависимую РНК-полимеразу, связываясь с β -субъединицей фермента и препятствуя

инициации транскрипции. Их применяют для лечения туберкулёза, так как эти препараты не влияют на работу ядерных РНК-полимераз эукариотических клеток. Однако они могут ингибировать синтез митохондриальных РНК, хотя дозы препарата, при которых блокируется образование мито-хондриальных РНК, выше тех, что используют в лечении инфекционного заболевания.

Большая группа антибиотиков является ингибиторами трансляции: тетрациклины, эритромицин, пуромицин, хлорамфеникол и аминогликозиды. Так, один из наиболее известных аминогликозидов стрептомицин ингибирует инициацию синтеза белка у прокариотов и вызывает ошибки в прочтении информации, закодированной в мРНК. Его часто назначают при лечении инфекционных заболеваний сердца. К антибиотикам широкого спектра действия относят тетрациклины

1. 7Лекция №7 (4 часа).

Тема: «Биологическое окисление. Окислительное фосфорилирование АДФ. ЦПЭ.»

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Общая схема обмена веществ и энергии
2. Биологическое окисление
3. Свободная энергия и законы термодинамики
4. Окислительно-восстановительные реакции. Окислительно-восстановительный потенциал.
5. Основные этапы трансформации энергии катаболических процессов

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1. Общая схема обмена веществ и энергии

Живые организмы находятся в постоянной и неразрывной связи с окружающей средой. Эта связь осуществляется в процессе обмена веществ. Обмен веществ включает 3 этапа: поступление веществ в организм, метаболизм и выделение конечных продуктов из организма.

Поступление веществ в организм происходит в результате дыхания (кислород) и питания. В ЖКТ продукты питания перевариваются (расщепляются до простых веществ). При переваривании происходит гидролиз полимеров (белков, полисахаридов и других сложных органических веществ) до мономеров, всасывающихся в кровь и включающихся в промежуточный обмен.



Рис. Общая схема обмена веществ и энергии. 1 - пищеварение; 2 - катаболизм; 3 - анаболизм; 4 - распад структурно-функциональных компонентов клеток; 5 - экзергонические реакции; 6,7 - эндергонические реакции; 8 - выведение из организма.

2. Биологическое окисление

Процессы катаболизма в клетках животных сопровождаются потреблением кислорода, который необходим для реакций окисления. В результате этих реакций происходит освобождение энергии, которая необходима организмам в процессах жизнедеятельности для осуществления различных видов работы. Небиологические системы могут совершать работу за счёт тепловой энергии, биологические системы функционируют в изотермическом режиме и для осуществления процессов жизнедеятельности используют химическую энергию. Изучением превращений энергии, сопровождающих химические реакции, занимается биоэнергетика, или биохимическая термодинамика.

3. Свободная энергия и законы термодинамики

Живые организмы с точки зрения термодинамики - открытые системы. Между системой и окружающей средой возможен обмен энергии, который происходит в соответствии с законами термодинамики.

Законы термодинамики

Первый закон - закон сохранения энергии; его можно сформулировать так: общая энергия системы и окружающей среды - величина постоянная.

Внутри рассматриваемой системы энергия может переходить от одной её части к другой или превращаться из одной формы в другую.

Второй закон гласит, что все физические и химические процессы в системе стремятся к необратимому переходу полезной энергии в хаотическую, неуправляемую форму. Мерой перехода или неупорядоченности системы служит величина, называемая энтропией (S), она достигает максимума, когда система приходит в истинное равновесие с окружающей средой.

4. Окислительно-восстановительные реакции. Окислительно-восстановительный потенциал.

Под окислением понимают отщепление электронов, а под восстановлением - присоединение электронов. Окисление донора электронов всегда сопровождается восстановлением акцептора электронов. Этот принцип окислительно-восстановительных процессов применим и к биохимическим системам. В любой окислительно-восстановительной реакции участвует акцептор электронов (окислитель) и донор электронов (восстановитель).

5. Основные этапы трансформации энергии катаболических процессов

Энергия освобождается в процессе ферментативного окисления метаболитов специфическими дегидрогеназами. В реакциях дегидрирования электроны и протоны переходят от органических субстратов на коферменты NAD- и FAD-зависимых дегидрогеназ. Электроны, обладающие высоким энергетическим потенциалом, передаются от восстановленных коферментов NADH и $FADH_2$ к кислороду через цепь переносчиков, локализованных во внутренней мембране митохондрий. Восстановление молекулы O_2 происходит в результате переноса 4 электронов. При каждом присоединении к кислороду 2 электронов, поступающих к нему по цепи переносчиков, из матрикса поглощаются 2 протона, в результате чего образуется молекула H_2O .

Окисление органических веществ в клетках, сопровождающееся потреблением кислорода и синтезом воды, называют тканевым дыханием, а цепь переноса электронов (ЦПЭ) - дыхательной цепью.

Электроны, поступающие в ЦПЭ, по мере их продвижения от одного переносчика к другому теряют свободную энергию. Значительная часть этой энергии запасается в форме АТФ, а часть энергии рассеивается в виде тепла. Кроме того, электроны с высоким энергетическим потенциалом, возникающие при окислении различных субстратов, могут

быть использованы в реакциях биосинтеза, для которых помимо АТФ требуются восстановительные эквиваленты, например

Перенос электронов от окисляемых субстратов к кислороду происходит в несколько этапов. В нём участвует большое количество промежуточных переносчиков, каждый из которых способен присоединять электроны от предыдущего компонента и передавать следующему. Так возникает цепь окислительно-восстановительных реакций, в результате чего происходят восстановление O_2 и синтез H_2O . В дыхательную цепь митохондрий входит большое число переносчиков

1. Механизм сопряжения окисления и фосфорилирования

Каким же образом осуществляется сопряжение этих двух процессов? Наиболее обоснованный ответ на этот вопрос даёт хемиосмотическая теория Митчелла, предложенная им в 1961 г. Основные положения были подтверждены и разработаны детально совместными усилиями многих исследователей в последующие годы

Перенос электронов по дыхательной цепи от NADH к кислороду сопровождается выкачиванием протонов из матрикса митохондрий через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство. На эту работу затрачивается часть энергии электронов, переносимых по ЦПЭ.

Протоны, перенесённые из матрикса в межмембранное пространство, не могут вернуться обратно в матрикс, так как внутренняя мембрана непроницаема для протонов. Таким образом, создаётся протонный градиент, при

котором концентрация протонов в межмембранном пространстве больше, а pH меньше, чем в матриксе. Кроме того, каждый протон несёт положительный заряд, и вследствие этого появляется разность потенциалов по обе стороны мембраны: отрицательный заряд на внутренней стороне и положительный - на внешней. В совокупности электрический и концентрационный градиенты составляют электрохимический потенциал $\Delta\mu H^+$ - источник энергии для синтеза АТФ. Так как наиболее активный транспорт протонов в межмембранное пространство, необходимый для образования $\Delta\mu H^+$, происходит на участках ЦПЭ, соответствующих расположению комплексов I, III и IV, эти участки называют пунктами сопряжения дыхания и фосфорилирования

2. Транспорт АТФ и АДФ через мембраны митохондрий

В большинстве эукариотических клеток синтез основного количества АТФ происходит внутри митохондрии, а основные потребители АТФ расположены вне её. С другой стороны, в матриксе митохондрий должна поддерживаться достаточная концентрация АДФ. Эти заряженные молекулы не могут

самостоятельно пройти через липидный слой мембран. Внутренняя мембрана непроницаема для заряженных и гидрофильных веществ, но в ней содержится определённое количество транспортёров, избирательно переносящих подобные молекулы из цитозоля в матрикс и из матрикса в цитозоль.

В мембране есть белок АТФ/АДФ-антипортер, осуществляющий перенос этих метаболитов через мембрану. Молекула АДФ поступает в митохондриальный матрикс только при условии выхода молекулы АТФ из матрикса.

Движущая сила такого обмена - мембранный потенциал переноса электронов по ЦПЭ. Расчёты показывают, что на транспорт АТФ и АДФ расходуется около четверти свободной энергии протонного потенциала. Другие транспортёры тоже могут использовать энергию электрохимического градиента. Так переносится внутрь митохондрии неорганический фосфат, необходимый для синтеза АТФ. Непосредственным источником свободной энергии для транспорта Ca^{2+} в матрикс также служит протонный потенциал, а не энергия АТФ.

3. Разобщение дыхания и фосфорилирования

Некоторые химические вещества (протонофоры) могут переносить протоны или другие ионы (ионофоры) из межмембранного пространства проходят через специфические

транспортёры, при этом затрачивается энергия электрохимического потенциала мембраны.

через мембрану в матрикс, минуя протонные каналы АТФ-синтазы. В результате этого исчезает электрохимический потенциал и прекращается синтез АТФ. Это явление называют разобщением дыхания и фосфорилирования. В результате разобщения количество АТФ снижается, а увеличивается. В этом случае скорость окисления NADH и $FADH_2$ возрастает, возрастает и количество поглощённого кислорода, но энергия выделяется в виде теплоты, и коэффициент P/O резко снижается. Как правило, разобщители - липофильные вещества, легко проходящие через липидный слой мембраны. Одно из таких веществ - 2,4-динитрофенол, легко переходящий из ионизированной формы в неионизированную, присоединяя протон в межмембранном пространстве и перенося его в матрикс.

Примерами разобщителей могут быть также некоторые лекарства, например дикумарол - антикоагулянт или метаболиты, которые образуются в организме, билирубин - продукт катаболизма гема, тироксин - гормон щитовидной железы. Все эти вещества проявляют разобщающее действие только при их высокой концентрации.

1. 8 Лекция №8 (2 часа).

Тема: «Метаболизм глюкозы и гликогена в клетках»

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Фосфорилирование глюкозы и дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата
2. Метаболизм глюкозо-6-фосфата

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

1. Фосфорилирование глюкозы и дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата

В дальнейших превращениях в клетках глюкоза и другие моносахариды участвуют только в виде фосфорных эфиров. Фосфорилирование свободных моносахаридов - обязательная реакция на пути их использования, она приводит к образованию более реакционно-способных соединений и поэтому может рассматриваться как реакция активации.

Глюкоза, поступающая в клетки органов и тканей, сразу же подвергается фосфорилированию с использованием АТФ. Эту реакцию во многих тканях катализирует фермент гексокиназа, а в печени и поджелудочной железе - фермент глюкокиназа. Фосфорилирование глюкозы - практически необратимая реакция, так как она протекает с использованием значительного количества энергии. Образование глюкозо-6-фосфата в клетке - своеобразная "ловушка" для глюкозы, так как мембрана клетки непроницаема для фосфорилированной глюкозы (нет соответствующих транспортных белков). Кроме того, Фосфорилирование уменьшает концентрацию свободной глюкозы в цитоплазме. В результате создаются благоприятные условия для облегчённой диффузии глюкозы в клетки из крови.

Фосфорилирование глюкозы в гепатоцитах в период пищеварения обеспечивается свойствами глюкокиназы, которая имеет высокое значение K_m - 10 ммоль/л. В этот период концентрация глюкозы в воротной вене больше, чем в других отделах кровяного русла и может превышать 10 ммоль/л, а следовательно, активность глюкокиназы в гепатоцитах повышается. Следует отметить, что активность глюкокиназы, в отличие от гексокиназы, не ингибируется продуктом катализируемой реакции - глюкозо-6-фосфатом. Это обстоятельство обеспечивает повышение концентрации глюкозы в клетке в фосфорилированной форме, соответственно её уровню в крови. Как уже упоминалось, глюкоза проникает в гепатоциты путём облегчённой диффузии при участии транспортёра ГЛЮТ-2 (независимого от инсулина). ГЛЮТ-2, так же, как глюкокиназа, имеет высокую K_m , что способствует повышению скорости поступления глюкозы в гепатоциты в период пищеварения, следовательно, ускоряет её фосфорилирование и дальнейшее использование для депонирования.

Хотя инсулин и не влияет на транспорт глюкозы, он усиливает приток глюкозы в гепатоциты в период пищеварения косвенным путём, индуцируя синтез глюкокиназы и ускоряя тем самым Фосфорилирование глюкозы.

2. Метаболизм глюкозо-6-фосфата

Глюкозо-6-фосфат может использоваться в клетке в различных превращениях, основными из которых являются: синтез гликогена, катаболизм с образованием CO_2 и H_2O или лактата, синтез пентоз. Распад глюкозы до конечных продуктов служит источником энергии для организма. Вместе с тем в процессе метаболизма глюкозо-6-фосфата образуются промежуточные продукты, используемые в дальнейшем для синтеза аминокислот, нуклеотидов, глицерина и жирных кислот. Таким образом, глюкозо-6-фосфат - не только субстрат для окисления, но и строительный материал для синтеза новых соединений

1. Строение и функции гликогена. Гликогеногенез. Гликогенолиз.

Многие ткани синтезируют в качестве резервной формы глюкозы гликоген. Синтез и распад гликогена обеспечивают постоянство концентрации глюкозы в крови и создают депо для её использования тканями по мере необходимости.

Гликоген - разветвлённый гомополимер глюкозы, в котором остатки глюкозы соединены в линейных участках α -1,4-гликозидной связью. В точках ветвления мономеры соединены α -1,6-гликозидными связями. Эти связи образуются примерно с каждым десятым остатком глюкозы. Следовательно, точки ветвления в гликогене встречаются примерно через каждые десять остатков глюкозы. Так возникает древообразная структура с молекулярной массой $>10^7$ Д, что соответствует приблизительно 50 000 остатков глюкозы

Синтез гликогена - гликогеногенез. Гликоген синтезируется в период пищеварения (через 1-2 ч после приёма углеводной пищи).

Распад гликогена (гликогенолиз)или его мобилизация происходят в ответ на повышение потребности организма в глюкозе. Гликоген печени распадается в основном в интервалах между приёмами пищи, кроме того, этот процесс в печени и мышцах ускоряется во время физической работы.

2. Биологическое значение обмена гликогена в печени и мышцах.

Сравнение процессов синтеза и распада гликогена позволяет сделать следующие выводы:

- синтез и распад гликогена протекают по разным метаболическими путям;
- печень запасает глюкозу в виде гликогена не столько для собственных нужд, сколько для поддержания постоянной концентрации глюкозы в крови, и, следовательно, обеспечивает поступление глюкозы в другие ткани. Присутствие в печени глюкозо-6-фосфатазы обуславливает эту главную функцию печени в обмене гликогена;
- функция мышечного гликогена заключается в освобождении глюкозо-6-фосфата, потребляемого в самой мышце для окисления и использования энергии;
- синтез гликогена - процесс эндергонический. Так на включение одного остатка глюкозы в полисахаридную цепь используется 1 моль АТФ и 1 моль УТФ;
- распад гликогена до глюкозо-6-фосфата не требует энергии;
- необратимость процессов синтеза и распада гликогена обеспечивается их регуляцией.

3. Регуляция метаболизма гликогена. Катаболизм глюкозы.

Процессы накопления глюкозы в виде гликогена и его распада должны быть согласованы с потребностями организма в глюкозе как источнике энергии. Одновременное протекание этих метаболических путей невозможно. Изменение направления процессов в метаболизме гликогена обеспечивают регуляторные механизмы, в которых участвуют гормоны. Переключение процессов синтеза и мобилизации гликогена происходит при смене абсорбтивного периода на постабсорбтивный или

состояния покоя организма на режим физической работы. В переключении этих метаболических путей в печени участвуют гормоны инсулин, глюкагон и адреналин, а в мышцах - инсулин и адреналин.

Катаболизм глюкозы - основной поставщик энергии для процессов жизнедеятельности организма.

1. 9 Лекция №9 (2 часа).

Тема: «Строение основных липидов организма. Переваривание липидов»

1.9.1 Вопросы лекции:

- 1.1. Структура, классификация и свойства основных липидов организма.
- 1.2. Переваривание и всасывание пищевых липидов.

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. Структура, классификация и свойства основных липидов организма.

Липиды разных классов существенно отличаются по структуре и функциям. Большинство липидов имеют в своём составе жирные кислоты, связанные сложноэфирной связью с глицеролом, холестерином или амидной связью с аминокислотом сфингозином.

2. Переваривание и всасывание пищевых липидов.

С пищей в организм ежедневно поступает от 80 до 150 г липидов. Основную массу составляют жиры, наряду с глюкозой служащие главными источниками энергии. Хотя калорийность жиров значительно выше, чем углеводов (9 по сравнению с 4,7 ккал/моль), при рациональном питании жиры обеспечивают не более 30% от общего количества калорий, поступающих с пищей. Жидкие жиры (масла) содержат в своём составе полиеновые жирные кислоты, которые не синтезируются в организме; поэтому жидкие жиры должны составлять не менее одной трети жиров пищи.

1. 10 Лекция №10 (4 часа).

Тема: «Обмен ТАГ, кетонных тел, эйкозаноидов и холестерина»

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Всасывание продуктов гидролиза липидов
2. Синтез экзогенных ТАГ в клетках слизистой кишечника
3. Эндогенный синтез жиров в период пищеварения. Ожирение

1.10.2 Краткое содержание вопросов:

1. Всасывание продуктов гидролиза липидов

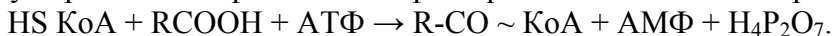
Продукты гидролиза липидов - жирные кислоты с длинным углеводородным радикалом, 2-моноацилглицеролы, холестерин, а также соли жёлчных кислот образуют в просвете кишечника структуры, называемые смешанными мицеллами. Смешанные мицеллы построены таким образом, что гидрофобные части молекул обращены внутрь мицеллы, а гидрофильные - наружу, поэтому мицеллы хорошо растворяются в водной фазе содержимого тонкой кишки. Стабильность мицелл обеспечивается в основном солями жёлчных кислот. Мицеллы сближаются со щётчатой каймой клеток слизистой оболочки тонкого кишечника, и липидные компоненты мицелл диффундируют через мембраны внутрь клеток. Вместе с продуктами гидролиза липидов всасываются жирорастворимые витамины А, D, E, K и соли жёлчных кислот. Наиболее активно соли жёлчных кислот всасываются в подвздошной кишке. Жёлчные кислоты далее попадают через воротную вену в печень, из печени вновь секретируются в жёлчный пузырь и далее опять участвуют в эмульгировании жиров. Этот путь жёлчных кислот называют "**энтерогапатическая циркуляция**". Каждая молекула жёлчных кислот за сутки проходит 5- 8 циклов, и около 5% жёлчных кислот выделяется с фекалиями.

Всасывание жирных кислот со средней длиной цепи, образующихся, например, при переваривании липидов молока, происходит без участия смешанных мицелл. Эти жирные

кислоты из клеток слизистой оболочки тонкого кишечника попадают в кровь, связываются с белком альбумином и транспортируются в печень.

2. Ресинтез экзогенных ТАГ в клетках слизистой кишечника

После всасывания продуктов гидролиза жиров жирные кислоты и 2-моноацилглицеролы в клетках слизистой оболочки тонкого кишечника включаются в процесс ресинтеза с образованием триацилглицеролов. Жирные кислоты вступают в реакцию этерификации только в активной форме в виде производных коэнзима А, поэтому первая стадия ресинтеза жиров - реакция активации жирной кислоты:



Реакция катализируется ферментом ацил-КоА-синтетазой (тиокиназой). Затем ацил-КоА участвует в реакции этерификации 2-моноацилглицерола с образованием сначала диацилглицерола, а затем триацилглицерола. Реакции ресинтеза жиров катализируют ацилтрансферазы.

В реакциях ресинтеза жиров участвуют, как правило, только жирные кислоты с длинной углеводородной цепью. В ресинтезе жиров участвуют не только жирные кислоты, всосавшиеся из кишечника, но и жирные кислоты, синтезированные в организме, поэтому по составу ресинтезированные жиры отличаются от жиров, полученных с пищей.

3. Эндогенный синтез жиров в период пищеварения. Ожирение

Приём пищи человеком и корма животными происходит иногда со значительными интервалами, поэтому в организме выработались механизмы депонирования источников энергии. Жиры - наиболее выгодная и основная форма депонирования энергии. Запасы гликогена в организме не превышают 300 г и обеспечивают организм энергией не более суток. Депонированный жир может обеспечивать организм энергией при голодании в течение длительного времени (до 7-8 нед). Синтез жиров активируется в абсорбтивный период и происходит в основном в жировой ткани и печени. Но если жировая ткань - место депонирования жира, то печень выполняет важную роль превращения части углеводов, поступающих с пищей, в жиры, которые затем секретируются в кровь в составе ЛПОНП и доставляются в другие ткани (в первую очередь, в жировую). Синтез жиров в печени и жировой ткани стимулируется инсулином. Мобилизация жира активируется в тех случаях, когда глюкозы недостаточно для обеспечения энергетических потребностей организма: в постабсорбтивный период, при голодании и физической работе под действием гормонов глюкагона, адреналина, соматотропина. Жирные кислоты поступают в кровь и используются тканями как источники энергии.

Синтез жиров происходит в абсорбтивный период в печени и жировой ткани. Непосредственными субстратами в синтезе жиров являются ацил-КоА и глицерол-3-фосфат. Метаболический путь синтеза жиров в печени и жировой ткани одинаков, за исключением разных путей образования глицерол-3-фосфата.

Синтез жиров в печени и жировой ткани идёт через образование промежуточного продукта - фосфатидной кислоты.

Предшественник фосфатидной кислоты - глицерол-3-фосфат, образующийся в печени двумя путями:

- восстановлением дигидроксиацетонфосфата - промежуточного метаболита гликолиза;
- фосфорилированием глицеролкиназой свободного глицерола, поступающего в печень из крови (продукт действия ЛП-липазы на жиры ХМ и ЛПОНП).

В жировой ткани глицеролкиназа отсутствует, и восстановление дигидроксиацетонфосфата - единственный путь образования глицерол-3-фосфата. Следовательно, синтез жиров в жировой ткани может происходить только в абсорбтивный

период, когда глюкоза поступает в адипоциты с помощью белка-переносчика глюкозы ГЛЮТ-4, активного только в присутствии инсулина, и распадается по пути гликолиза.

1. 11 Лекция 11 (2 часа).

Тема: «Обмен жирных кислот и кетоновых тел»

1.18.1 Вопросы лекции:

1. Использование жиров в качестве источника энергии
2. Синтез и использование кетоновых тел
3. Метаболизм эйкозаноидов.
4. Обмен холестерина

1.18.2. Краткое содержание вопросов:

1. Использование жиров в качестве источника энергии

Жирные кислоты поступают с пищей или синтезируются в организме (кроме полиеновых кислот). Субстраты, необходимые для синтеза жирных кислот, образуются при катаболизме глюкозы и таким образом, часть глюкозы превращается сначала в жирные кислоты, а затем в жиры. Хотя специфический путь катаболизма жирных кислот заканчивается образованием ацетил-КоА, служащим исходным субстратом для синтеза жирных кислот, процессы синтеза и окисления жирных кислот необратимы. Они происходят в разных компартментах клеток (биосинтез протекает в цитозоле, а окисление - в митохондриях) и катализируются разными ферментами. Окисление жирных кислот как источников энергии увеличивается в постабсорбтивный период, при голодании и физической работе. В этих состояниях их концентрация в крови увеличивается в результате мобилизации из жировых депо, и они активно окисляются печенью, мышцами и другими тканями. При голодании часть жирных кислот в печени превращается в другие "топливные" молекулы - кетоновые тела. Они, в отличие от жирных кислот, могут использоваться нервной тканью как источник энергии. При голодании и длительной физической работе кетоновые тела служат источником энергии для мышц и некоторых других тканей.

2. Синтез и использование кетоновых тел

При голодании, длительной физической работе и в случаях, когда клетки не получают достаточного количества глюкозы, жирные кислоты используются многими тканями как основной источник энергии. В отличие от других тканей мозг и другие отделы нервной ткани практически не используют жирные кислоты в качестве источника энергии. В печени часть жирных кислот превращается в кетоновые тела, которые окисляются мозгом, нервной тканью, мышцами, обеспечивая достаточное количество энергии для синтеза АТФ и уменьшая потребление глюкозы. К кетоновым телам относят β -гидроксibuтират, ацетоацетат и ацетон. Первые две молекулы могут окисляться в тканях, обеспечивая синтез АТФ. Ацетон образуется только при высоких концентрациях кетоновых тел в крови и, выделяясь с мочой, выдыхаемым воздухом и потом, позволяет организму избавляться от избытка кетоновых тел.

3. Метаболизм эйкозаноидов.

Эйкозаноиды, включающие в себя простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и ряд других веществ, - высокоактивные регуляторы клеточных функций. Они имеют очень короткий $T_{1/2}$, поэтому оказывают эффекты как "гормоны местного действия", влияя на метаболизм продуцирующей их клетки по аутокринному механизму, и на окружающие клетки - по паракринному механизму. Эйкозаноиды участвуют во многих процессах: регулируют тонус ГМК и вследствие этого влияют на АД, состояние бронхов, кишечника, матки. Эйкозаноиды регулируют секрецию воды и натрия почками, влияют на образование тромбов. Разные типы эйкозаноидов участвуют в развитии воспалительного

процесса, происходящего после повреждения тканей или инфекции. Такие признаки воспаления, как боль, отёк, лихорадка, в значительной мере обусловлены действием эйкозаноидов. Избыточная секреция эйкозаноидов приводит к ряду заболеваний, например бронхиальной астме и аллергическим реакциям.

4. Обмен холестерина

Холестерол - стероид, характерный только для животных организмов. Он синтезируется во многих тканях, но основное место синтеза - печень. В печени синтезируется более 50% холестерина, в тонком кишечнике - 15- 20%, остальной холестерол синтезируется в коже, коре надпочечников, половых железах. Холестерол выполняет много функций: входит в состав всех мембран клеток и влияет на их свойства, служит исходным субстратом в синтезе жёлчных кислот и стероидных гормонов. Предшественники в метаболическом пути синтеза холестерола превращаются также в убинон - компонент дыхательной цепи и долихол, участвующий в синтезе гликопротеинов. Холестерол за счёт своей гидроксильной группы может образовывать эфиры с жирными кислотами. Этерифицированный холестерол преобладает в крови и запасается в небольших количествах в некоторых типах клеток, использующих его как субстрат для синтеза других веществ. Холестерол и его эфиры - гидрофобные молекулы, поэтому они транспортируются кровью только в составе разных типов ЛП. Обмен холестерола чрезвычайно сложен - только для его синтеза необходимо осуществление около 100 последовательных реакций. Всего в обмене холестерола участвует около 300 разных белков. Нарушения обмена холестерола приводят к одному из наиболее распространённых заболеваний - атеросклерозу. Смертность от последствий атеросклероза (инфаркт миокарда, инсульт) лидирует в общей структуре смертности населения. Атеросклероз - "полигенное заболевание", т.е. в его развитии участвуют многие факторы, важнейшие из которых наследственные. Накопление холестерола в организме приводит к развитию и другого распространённого заболевания - желчнокаменной болезни.

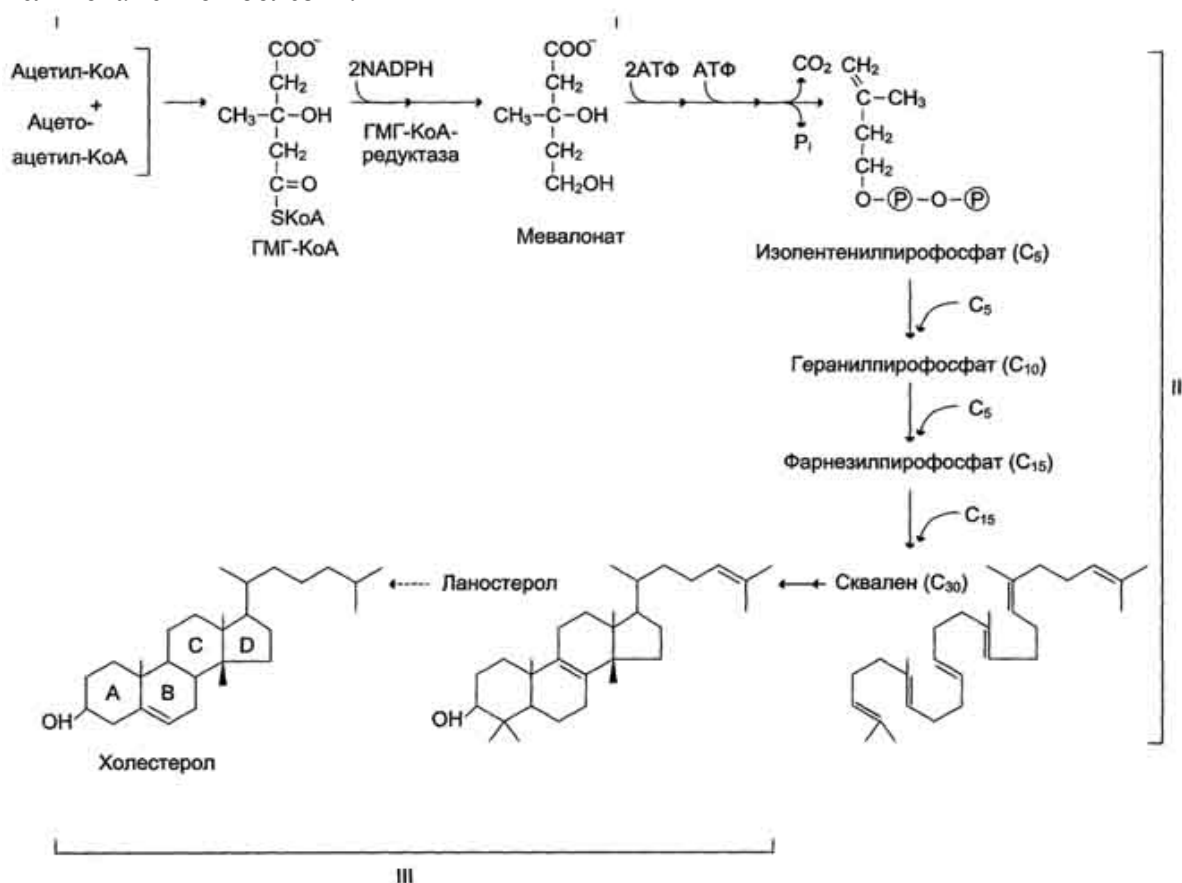


Рис. Синтез холестерина. C_5 - изопентенилпирофосфат; C_1 - Фарнезилпирофосфат. Все атомы углерода холестерина происходят из ацетил-КоА. Сквален - углеводород линейной структуры - превращается ферментом циклазой в ланостерол, содержащий 4 конденсированных кольца и гидроксильную группу. Ланостерол через ряд последовательных реакций превращается в холестерол (I, II, III - этапы синтеза).

1. 11 Лекция №11 (2 часа).

Тема: «Источники и пути использования аминокислот в клетках. Биологическая ценность белков»

1.11.1 Вопросы лекции:

1. Источники и пути использования аминокислот в клетках
2. Биологическая ценность белков

1.11.2 Краткое содержание вопросов:

1. Источники и пути использования аминокислот в клетках

Фонд свободных аминокислот организма составляет примерно 35 г. Содержание свободных аминокислот в крови в среднем равно 3565 мг/дл. Большая часть аминокислот входит в состав белков, количество которых в организме взрослого человека нормального телосложения составляет примерно 15 кг.

Источники свободных аминокислот в клетках - белки пищи, собственные белки тканей и синтез аминокислот из углеводов. Многие клетки, за исключением высокоспециализированных (например, эритроцитов), используют аминокислоты для синтеза белков, а также большого количества других веществ: фосфолипидов мембран, гема, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, биогенных аминов (катехоламинов, гистамина) и других соединений.

Какой-либо специальной формы депонирования аминокислот, подобно глюкозе (в виде гликогена) или жирных кислот (в виде триацилглицеролов), не существует. Поэтому резервом аминокислот могут служить все функциональные и структурные белки тканей, но преимущественно белки мышц, поскольку их больше, чем всех остальных.

В организме человека в сутки распадается на аминокислоты около 400 г белков, примерно такое же количество синтезируется. Поэтому тканевые белки не могут восполнять затраты аминокислот при их катаболизме и использовании на синтез других веществ. Первичными источниками аминокислот не могут служить и углеводы, так как из них синтезируются только углеродная часть молекулы большинства аминокислот, а аминогруппа поступает от других аминокислот. Следовательно, основным источником аминокислот организма служат **белки пищи**.

2. Биологическая ценность белков

Аминокислоты (свободные и в составе белков) содержат почти 95% всего азота, поэтому именно они поддерживают азотистый баланс организма. **Азотистый баланс** - разница между количеством азота, поступающего с пищей, и количеством выделяемого азота (преимущественно в виде мочевины и аммонийных солей). Если количество поступающего азота равно количеству выделяемого, то наступает **азотистое равновесие**. Такое состояние бывает у здорового человека при нормальном питании. Азотистый баланс может быть положительным (азота поступает больше, чем выводится) у детей, а также у пациентов, выздоравливающих после тяжёлых болезней. Отрицательный азотистый баланс (выделение азота преобладает над его поступлением) наблюдают при старении, голодании и во время тяжёлых заболеваний.

При безбелковой диете азотистый баланс становится отрицательным. Соблюдение подобной диеты в течение недели приводит к тому, что количество выделяемого азота перестаёт увеличиваться и стабилизируется примерно на величине 4 г/сут. Такое количество азота содержится в 25 г белка. Значит, при белковом голодании в сутки в организме расходуется около 25 г собственных белков тканей. Минимальное количество белков в пище, необходимое для поддержания азотистого равновесия, соответствует 30-50

г/сут, оптимальное же количество при средней физической нагрузке составляет ~100-120 г/сут.

1. 12 Лекция №12 (2 часа).

Тема: «Переваривание белков. Катаболизм аминокислот. Обмен аммиака»

1.12.1 Вопросы лекции:

1. Переваривание белков в желудке
2. Переваривание белков в кишечнике

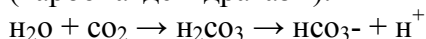
1.12.2 Краткое содержание вопросов:

1. Переваривание белков в желудке

Желудочный сок - продукт нескольких типов клеток. Обкладочные (париетальные) клетки стенок желудка образуют соляную кислоту, главные клетки секретируют пепсиноген. Добавочные и другие клетки эпителия желудка выделяют муцинсодержащую слизь. Париетальные клетки секретируют в полость желудка также гликопротеин, который называют «внутренним фактором» (фактором Касла). Этот белок связывает «внешний фактор» - витамин В₁₂, предотвращает его разрушение и способствует всасыванию.

Основная пищеварительная функция желудка заключается в том, что в нём начинается переваривание белка. Существенную роль в этом процессе играет соляная кислота. Белки, поступающие в желудок, стимулируют выделение **гистамина** и группы белковых гормонов - **гастринов**, которые, в свою очередь, вызывают секрецию НС1 и профермента - пепсиногена. НС1 образуется в обкладочных клетках желудочных желёз

Источником Н⁺ является Н₂СО₃, которая образуется в обкладочных клетках желудка из СО₂, диффундирующего из крови, и Н₂О под действием фермента карбоангидразы (карбонатдегидратазы):



2. Переваривание белков в кишечнике

Желудочное содержимое (химус) в процессе переваривания поступает в двенадцатиперстную кишку. Низкое значение рН химуса вызывает в кишечнике выделение белкового гормона секретина, поступающего в кровь. Этот гормон в свою очередь стимулирует выделение из поджелудочной железы в тонкий кишечник панкреатического сока, содержащего НСО₃⁻, что приводит к нейтрализации НС1 желудочного сока и ингибированию пепсина. В результате рН резко возрастает от 1,5-2,0 до ~7,0.

Поступление пептидов в тонкий кишечник вызывает секрецию другого белкового гормона - холецистокинина, который стимулирует выделение панкреатических ферментов с оптимумом рН 7,5-8,0. Под действием ферментов поджелудочной железы и клеток кишечника завершается переваривание белков.

1. Источник аммиака в клетках

Катаболизм аминокислот в тканях происходит постоянно со скоростью ~100 г/сут. При этом в результате дезаминирования аминокислот освобождается большое количество аммиака.

Значительно меньшие количества его образуются при дезаминировании биогенных аминов и нуклеотидов. Основные источники аммиака в клетках представлены в табл. 9-3.

Часть аммиака образуется в кишечнике в результате действия бактерий на пищевые белки (гниение белков в кишечнике) и поступает в кровь воротной вены. Концентрация аммиака в крови воротной вены существенно больше, чем в общей кровотоке. В печени задерживается большое количество аммиака, что поддерживает низкое содержание его в крови. Концентрация аммиака в крови в норме редко превышает 0,4-0,7 мг/л (или 25-40 мкмоль/л). В крови и цитозоле клеток при физиологических значениях рН аммиак переходит в ион аммония - NH₄⁺, количество неионизированного NH₃ невелико (~ 1%).

Аммиак - токсичное соединение. Даже небольшое повышение его концентрации оказывает неблагоприятное действие на организм, и прежде всего на ЦНС. Так, повышение

концентрации аммиака в мозге до 0,6 ммоль вызывает судороги. К симптомам гипераммониемии относят тремор, нечленораздельную речь, тошноту, рвоту, головокружение, судорожные припадки, потерю сознания. В тяжёлых случаях развивается кома с летальным исходом.

- Механизм токсического действия аммиака на мозг и организм в целом, очевидно, связан с действием его на несколько функциональных систем. Аммиак легко проникает через мембраны в клетки и в митохондриях сдвигает реакцию, катализируемую глутаматдегидрогеназой, в сторону образования глутамата:



Уменьшение концентрации α -кетоглутарата вызывает:

угнетение обмена аминокислот (реакции тран-саминирования) и, следовательно, синтеза из них нейромедиаторов (ацетилхолина, дофамина и др.);

гипоэнергетическое состояние в результате снижения скорости ЦТК.

Высокая интенсивность процессов дезаминирования аминокислот в тканях и очень низкий уровень аммиака в крови свидетельствуют о том, что в клетках активно происходит связывание аммиака с образованием нетоксичных соединений, которые выводятся из организма с мочой. Эти реакции можно считать реакциями обезвреживания аммиака. В разных тканях и органах обнаружено несколько типов таких реакций.

2. Связывание (обезвреживание) аммиака

Основной реакцией связывания аммиака, протекающей во всех тканях организма, является синтез глутамина под действием глутамин-синтетазы. Глутамин легко транспортируется через клеточные мембраны путём облегчённой диффузии (для глутамата возможен только активный транспорт) и поступает из тканей в кровь. Основными тканями-поставщиками глутамина служат мышцы, мозг и печень. С током крови глутамин транспортируется в кишечник и почки.

В клетках кишечника под действием фермента глутаминазы происходит гидролитическое освобождение амидного азота в виде аммиака.

3. Орнитиновый цикл

Мочевина - основной конечный продукт азотистого обмена, в составе которого из организма выделяется до 90% всего выводимого азота. Экскреция мочевины в норме составляет ~25 г/сут.

При повышении количества потребляемых с пищей белков экскреция мочевины увеличивается

ется. Мочевина синтезируется только в печени, что было установлено ещё в опытах И.П. Павлова. Поражение печени и нарушение синтеза мочевины приводят к повышению содержания в крови и тканях аммиака и аминокислот (в первую очередь, глутамина и аланина).

В 40-х годах XX века немецкие биохимики Г. Кребс и К. Гензелейт установили, что синтез мочевины представляет собой циклический процесс, состоящий из нескольких стадий, ключевым соединением которого, замыкающим цикл, является орнитин. Поэтому процесс синтеза мочевины получил название «**орнитиновый цикл**», или «**цикл Кребса-Гензелейта**».

Мочевина (карбамид) - полный амид угольной кислоты - содержит 2 атома азота. **Источником одного** из них является **аммиак**, который в печени связывается с диоксидом углерода с образованием карбамоилфосфата под действием карбамоилфосфатсинтетазы I.

1. 13 Лекция №13 (2 часа).

Тема: «Основные системы регуляции метаболизма и межклеточной коммуникации»

1.13.1 Вопросы лекции:

1. Системы регуляции метаболизма
2. Иерархия регуляторных систем
3. Роль гормонов в регуляции обмена веществ и функции
4. Классификация и номенклатура гормонов.

1.13.2 Краткое содержание вопросов:

1. Системы регуляции метаболизма

Для нормального функционирования многоклеточного организма необходима взаимосвязь между отдельными клетками, тканями и органами. Эту взаимосвязь осуществляют 4 основные системы регуляции

- Центральная и периферическая нервные системы через нервные импульсы и нейромедиаторы;
- Эндокринная система через эндокринные железы и гормоны, которые секретируются в кровь и влияют на метаболизм различных клеток-мишеней;
- Паракринная и аутокринная системы посредством различных соединений, которые секретируются в межклеточное пространство и взаимодействуют с рецепторами либо близлежащих клеток, либо той же клетки (простагландины, гормоны ЖКТ, гистамин и др.);
- Иммунная система через специфические белки (цитокины, антитела).

2. Иерархия регуляторных систем

Системы регуляции обмена веществ и функций организма образуют 3 иерархических уровня.

Первый уровень - ЦНС. Нервные клетки получают сигналы, поступающие из внешней и внутренней среды, преобразуют их в форму нервного импульса и передают через синапсы, используя химические сигналы - медиаторы. Медиаторы вызывают изменения метаболизма в эффекторных клетках.

Второй уровень - эндокринная система. Включает гипоталамус, гипофиз, периферические эндокринные железы (а также отдельные клетки), синтезирующие гормоны и высвобождающие их в кровь при действии соответствующего стимула.

Третий уровень - внутриклеточный. Его составляют изменения метаболизма в пределах клетки или отдельного метаболического пути, происходящие в результате:

- изменения активности ферментов путём активации или ингибирования;
- изменения количества ферментов по механизму индукции или репрессии синтеза белков или изменения скорости их разрушения;
- изменения скорости транспорта веществ через мембраны клеток.

3. Роль гормонов в регуляции обмена веществ и функции

Интегрирующими регуляторами, связывающими различные регуляторные механизмы и метаболизм в разных органах, являются гормоны. Они функционируют как химические посредники, переносящие сигналы, возникающие в различных органах и ЦНС. Ответная реакция клетки на действие гормона очень разнообразна и определяется как химическим строением гормона, так и типом клетки, на которую направлено действие гормона.

В крови гормоны присутствуют в очень низкой концентрации. Для того чтобы передавать сигналы в клетки, гормоны должны распознаваться и связываться особыми белками клетки - рецепторами, обладающими высокой специфичностью.

Физиологический эффект гормона определяется разными факторами, например концентрацией гормона (которая определяется скоростью инактивации в результате распада гормонов, протекающего в основном в печени, и скоростью выведения гормонов

и его метаболитов из организма), его сродством к белкам-переносчикам (стероидные и тиреоидные гормоны транспортируются по кровеносному руслу В комплексе с белками), количеством и типом рецепторов на поверхности клеток-мишеней.

Синтез и секреция гормонов стимулируются внешними и внутренними сигналами, поступающими в ЦНС.

Эти сигналы по нейронам поступают в гипоталамус, где стимулируют синтез пептидных релизинг-гормонов (от англ. *release* - освобождать) - либеринов и статинов, которые, соответственно, стимулируют или ингибируют синтез и секрецию гормонов передней доли гипофиза. Гормоны передней доли гипофиза, называемые тройными гормонами, стимулируют образование и секрецию гормонов периферических эндокринных желёз

4. Классификация и номенклатура гормонов.

Все гормоны классифицируют по химическому строению, биологическим функциям и механизму действия.

1. Классификация гормонов по химическому строению

По химическому строению гормоны делят на 3 группы: пептидные (или белковые), стероидные и непептидные производные аминокислот (табл. 1).

Таблица 1, Классификация гормонов по химическому строению

Пептидные гормоны	Стероиды	Производные аминокислот
Адренокортикотропный гормон (кортикотропин, АКТГ)	Альдостерон	Адреналин
Гормон роста (соматотропин, ГР, СТГ)	Кортизол	Норадреналин
Тиреотропный гормон (тиреотропин, ТТГ)	Кальцитриол	Трийодтиронин (Т ₃)
Лактогенный гормон (пролактин, ЛТГ)	Тестостерон	Тироксин (Т ₄)
Лютеинизирующий гормон (лютропин, ЛГ)	Эстрадиол	
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	Прогестерон	
Меланоцитстимулирующий гормон (МСГ)		
Хорионический гонадотропин (ХГ)		
Антидиуретический гормон (вазопрессин, АДГ)		
Окситоцин		
Паратиреоидный гормон (паратгормон, ПТГ)		
Кальцитонин		

Инсулин		
Глюкагон		

2. Классификация гормонов по биологическим функциям

По биологическим функциям гормоны можно разделить на несколько групп (табл. 2). Эта классификация условна, поскольку одни и те же гормоны могут выполнять разные функции. Например, адреналин участвует в регуляции обмена жиров и углеводов и, кроме этого, регулирует частоту сердечных сокращений, АД, сокращение гладких мышц. Кортизол не только стимулирует глюконеогенез, но и вызывает задержку NaCl.

Таблица 2. Классификация гормонов по биологическим функциям

Регулируемые процессы	Гормоны
Обмен углеводов, липидов, аминокислот	Инсулин, глюкагон, адреналин, кортизол, тироксин, соматотропин
Водно-солевой обмен	Альдостерон, антидиуретический гормон
Обмен кальция и фосфатов	Паратгормон, кальцитонин, кальцитриол
Репродуктивная функция	Эстрадиол, тестостерон, прогестерон, гонадотропные гормоны
Синтез и секреция гормонов эндокринных желёз	Тропные гормоны гипофиза, либерины и статины гипоталамуса
Изменение метаболизма в клетках, синтезирующих гормон	Эйкозаноиды, гистамин, секретин, гастрин, соматостатин, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), цитокины

1. 14 Лекция №14 (4 часа).

Тема: «Строение, биосинтез и биологическое действие гормонов»

1.14.1 Вопросы лекции:

1. Общая характеристика гормонов
2. Гормоны гипоталамуса
3. Гормоны гипофиза. Нарушения функций гипоталамо-гипофизарной системы
4. Гормоны щитовидной железы

1.14.2 Краткое содержание вопросов:

1. Общая характеристика гормонов

Гормоны образуются специализированными клетками, многие из них собраны в железе и секретируют гормоны непосредственно в кровоток (гипоталамус, гипофиз, островковые клетки поджелудочной железы, щитовидная и паращитовидные железы, надпочечники, половые железы). Многие эндокринные железы вырабатывают несколько гормонов, имеющих различное строение и осуществляющих различные функции.

Избыточная продукция или дефицит гормона могут быть причиной эндокринных заболеваний. Среди причин гиперсекреции гормонов первое место занимают гормонально-активные опухоли. Причинами гипосекреции часто являются генетические нарушения структуры и функции участвующих в синтезе гормонов ферментов, повреждение клеток, продуцирующих гормон, в результате инфекции, опухоли или аутоиммунных реакций. Клиническую картину гипер- и гипосекреции гормонов может вызывать и применение гормонов с лечебной целью. В некоторых случаях введение

гормона приводит к подавлению его секреции железами, поэтому резкая отмена гормонотерапии вызывает гипофункцию эндокринных желёз.

2. Гормоны гипоталамуса

Гипоталамус занимает важнейшее место в иерархической системе, объединяя высшие отделы ЦНС и эндокринные железы. В клетках нейронов гипоталамуса синтезируются пептидные гормоны 2 типов. Одни через систему гипоталамо-гипофизарных сосудов поступают в переднюю долю гипофиза, где стимулируют или ингибируют синтез тропных гормонов; другие, как окситоцин и вазопрессин, поступают через аксоны нервных клеток в заднюю долю гипофиза, где они хранятся в везикулах и секретируются в кровь в ответ на соответствующие сигналы.

В настоящее время известно несколько гипоталамических гормонов, регулирующих синтез и секрецию гормонов гипофиза (табл.).

Таблица . Строение и функции гормонов гипоталамуса

Гипоталамический гормон	Структура	Функция
Тиреотропин-рилизинг-гормон (тиреолиберин, ТРФ)	Пептид, 3 а.к.	Стимулирует секрецию тиреотропина и пролактина
Кортикотропин-рилизинг-гормон (кортиколиберин, КРФ)	Полипептид, 41 а.к.	Стимулирует секрецию кортикотропина
Гонадотропин-рилизинг-гормон (гонадолиберин, ГРФ)	Полипептид, 10 а.к.	Стимулирует секрецию ЛГ и ФСГ
Соматотропин-рилизинг-гормон (соматолиберин, СРФ)	Полипептид, 40 или 44 а.к.	Стимулирует секрецию соматотропина
Соматостатин(соматотропин-ингибирующий гормон)	Полипептид, 14 или 28 а.к.	Ингибирует секрецию соматотропина
Пролактолиберин ²		Стимулирует секрецию пролактина
Пролактостатин (дофамин) ³	Полипептид, 56 а.к.	Ингибирует секрецию пролактина

3. Гормоны гипофиза. Нарушения функций гипоталамо-гипофизарной системы

Гипофиз секретирует большое количество гормонов, участвующих в регуляции различных биохимических процессов и физиологических функций. В передней доле гипофиза (аденогипофизе) синтезируются так называемые тропные гормоны, стимулирующие синтез и секрецию гормонов других эндокринных желёз или оказывающие влияние на метаболические реакции в других тканях-мишенях.

Задняя доля гипофиза, или нейрогипофиз, секретирует гормоны, регулирующие в основном водный баланс и лактацию.

Секреция гормонов гипофиза обусловлена сочетанием нервных и гуморальных сигналов. При этом один и тот же агонист (например, норад-реналин) может вызывать противоположные изменения в секреции гипофизарных гормонов. С другой стороны, секреция каждого гормона может контролироваться многочисленными факторами.

Синтез и секреция гормонов передней доли гипофиза регулируются гормонами гипоталамуса, которые поступают в гипофиз через портальную систему кровеносных сосудов, связывающих гипоталамус и переднюю долю гипофиза. Кроме того, секреция

гормонов гипоталамуса и гипофиза регулируется по механизму обратной связи гормонами, продукцию которых они стимулируют в органах-мишенях.

В передней доле гипофиза синтезируются гормоны, которые по химическому строению являются пептидами и гликопротеинами.

По механизму их синтеза и биологическим функциям эти гормоны объединяют в 3 группы.

4. Гормоны щитовидной железы

В щитовидной железе синтезируются гормоны - йодированные производные тирозина. Они объединены общим названием йодтиронины. К ним относят 3,5,3'-трийодтиронин (трийодтиронин, T_3) и 3,5,3',5'-тетрайодтиронин (T_4), или тироксин.

Йодтиронины участвуют в регуляции многих процессов метаболизма, развития, клеточной дифференцировки, в регуляции экспрессии генов.

Заболевания, возникающие в результате нарушений синтеза, секреции и функций йодтиронинов, - наиболее распространённые заболевания эндокринной системы

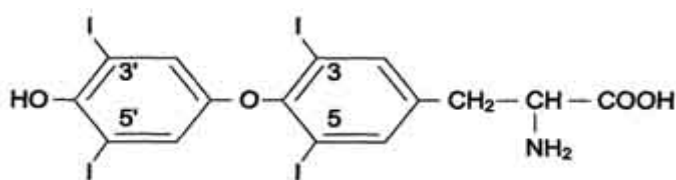
Йодтиронины синтезируются в составе белка тиреоглобулина (Тг) в фолликулах, которые представляют собой морфологическую и функциональную единицу щитовидной железы.

Тиреоглобулин - гликопротеин с молекулярной массой 660 кД, содержащий 115 остатков тирозина. 8-10% массы тиреоглобулина представлено углеводами. Содержание йодида в организме составляет 0,2-1%.

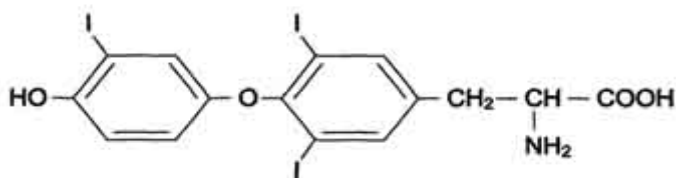
Тиреоглобулин синтезируется на рибосомах шероховатого ЭР в виде претиреоглобулина, затем переносится в цистерны ЭР, где происходит формирование вторичной и третичной структуры, включая процессы гликозилирования. Из цистерн ЭР Тиреоглобулин поступает в аппарат Гольджи, включается в состав секреторных гранул и секретируется во внеклеточный коллоид, где происходит йодирование остатков тирозина и образование йодтиронинов.

Йодирование тиреоглобулина и образование йодтиронинов осуществляется в несколько этапов.

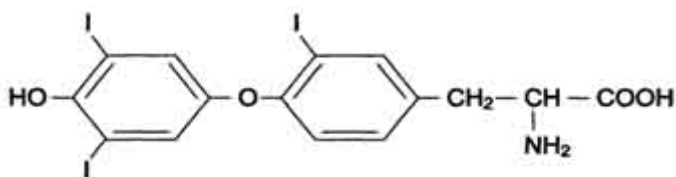
Транспорт йода в клетки щитовидной железы. Йод в виде органических и неорганических соединений поступает в ЖКТ с пищей и питьевой водой. Суточная потребность в йоде составляет 150-200 мкг. 25-30% этого количества йодидов захватывается щитовидной железой. Транспорт йодида в клетки щитовидной железы - энергозависимый процесс и происходит при участии специального транспортного белка против электрохимического градиента (соотношение концентраций I^- в железе к концентрации I^- в сыворотке крови в норме составляет 25:1). Работа этого йодид-переносящего белка сопряжена с Na^+, K^+ -АТФ-азой.



3, 5, 3', 5'-Тетрайодтиронин (Т₄)



3, 5, 3'-Трийодтиронин (Т₃)



3, 3', 5'-Трийодтиронин (реверсивный)

1 Общая характеристика рецепторов

Биологическое действие гормонов проявляется через их взаимодействие с рецепторами клеток-мишеней. Для проявления биологической активности связывание гормона с рецептором должно приводить к образованию химического сигнала внутри клетки, который вызывает специфический биологический ответ, например изменение скорости синтеза ферментов и других белков или изменение их активности. Мишенью для гормона могут служить клетки одной или нескольких тканей. Воздействуя на клетку-мишень, гормон вызывает специфическую ответную реакцию. Например, щитовидная железа - специфическая мишень для тиреотропина, под действием которого увеличивается количество ацинарных клеток щитовидной железы, повышается скорость биосинтеза тиреоидных гормонов. Глюкагон, воздействуя на адипоциты, активирует липолиз, в печени стимулирует мобилизацию гликогена и глюконеогенез. Характерный признак клетки-мишени - способность воспринимать информацию, закодированную в химической структуре гормона.

2. Регуляция количества и активности рецепторов

Концентрация рецепторов внутри клетки или на её поверхности и их сродство к данному гормону в норме регулируются различными способами, а также могут меняться при заболеваниях или при использовании гормонов или их агонистов в качестве лекарственных средств. Например, при воздействии β-адренергических агонистов на клетки в течение нескольких минут в ответ на новое добавление агониста прекращается активация аденилатциклазы, и биологический ответ исчезает. Такое снижение чувствительности рецептора к гормону (десенситизация) может происходить в результате изменения количества рецепторов по механизму понижающей регуляции. Гормон связывается с рецептором, комплекс гормон-рецептор путём эндоцитоза проникает в клетку (интернализуется), где часть рецепторов подвергается протеолитическому расщеплению под действием ферментов лизосом, а часть инактивируется, отделяясь от других мембранных компонентов. Это приводит к уменьшению количества рецепторов на плазматической мембране. Например, в случае инсулина, глюкагона, катехоламинов это происходит в течение нескольких минут или часов. При снижении концентрации гормона рецепторы возвращаются на поверхность клетки, и чувствительность к гормону

восстанавливается. Активность рецептора, т.е. его сродство к гормону, может изменяться также в результате ковалентной модификации, главным образом путём фосфорилирования. Концентрация внутриклеточных рецепторов может также регулироваться по механизму индукции и репрессии.

3. Механизмы передачи гормональных сигналов в клетки

По механизму действия гормоны можно разделить на 2 группы. К первой группе относят гормоны, взаимодействующие с мембранными рецепторами (пептидные гормоны, адреналин, а также гормоны местного действия - цитокины, эйкозаноиды). Вторая группа включает гормоны, взаимодействующие с внутриклеточными рецепторами.

Связывание гормона (первичного посредника) с рецептором приводит к изменению конформации рецептора. Это изменение улавливается другими макромолекулами, т.е. связывание гормона с рецептором приводит к сопряжению одних молекул с другими (трансдукция сигнала). Таким образом, генерируется сигнал, который регулирует клеточный ответ путём изменения активности или количества ферментов и других белков. В зависимости от способа передачи гормонального сигнала в клетках меняется скорость реакций метаболизма:

- в результате изменения активности ферментов;
- в результате изменения количества ферментов

3.1. Передача гормональных сигналов через мембранные рецепторы

Гормоны (первичные посредники), связываясь с рецепторами на поверхности клеточной мембраны, образуют комплекс гормон-рецептор, который трансформирует сигнал первичного посредника в изменение концентрации

особых молекул внутри клетки - вторичных посредников. Вторичными посредниками могут быть следующие молекулы: цАМФ, цГМФ, ИФ₃, ДАТ, Ca²⁺, NO.

Гормоны, взаимодействие которых с рецептором клетки-мишени приводит к образованию цАМФ, действуют через трёхкомпонентную систему, которая включает белок-рецептор, G-белок и фермент аденилатциклазу. Образующийся под действием аденилатциклазы цАМФ активирует протеинкиназу А, фосфорилирующую ферменты и другие белки (см. раздел 5). Известно более 200 различных G-белков, в структуре которых обнаружены 3 субъединицы α , β и γ (см. раздел 5). В отсутствие гормона α -субъединица G-белка связана с ГДФ. Образование комплекса гормонрецептора приводит к конформационным изменениям α -субъединицы, замене ГДФ на ГТФ и отщеплению димера $\beta\gamma$ от α -ГТФ. В случае рецепторов, сопряжённых с G_s-белком, субъединица α_s -ГТФ активирует аденилатциклазу

3.2 Передача сигналов через внутриклеточные рецепторы

Стероидные и тиреоидные гормоны связываются с рецепторами внутри клетки и регулируют скорость транскрипции специфических генов.

В отсутствие гормона внутриклеточные рецепторы связаны обычно с другими белками в цитозоле или ядре. Например, рецепторы глюкокортикоидов образуют в цитозоле комплекс с шапероном, что препятствует связыванию рецептора с молекулой

Взаимодействие гормона с центром связывания на С-концевом участке полипептидной цепи рецептора вызывает конформационные изменения и освобождение рецептора от шаперона. Происходит объединение 2 молекул рецептора с образованием гомодимера. Димер рецептора узнаёт специфическую последовательность нуклеотидов, которая расположена в промоторной области гена. Взаимодействие со специфическим участком ДНК HRE (от англ. *hormone response element*, элемент, реагирующий на воздействие гормона) обеспечивает центральный домен рецептора. Этот домен содержит аминокислотную последовательность, образующую 2 "цинковых пальца". В каждом "цинковом пальце" атом цинка связан с 4 остатками цистеина

3.3. Передача сигналов через рецепторы, сопряженные с ионными каналами

Рецепторы, сопряжённые с ионными каналами, являются интегральными мембранными белками, состоящими из нескольких субъединиц. Они действуют одновременно как ионные каналы и как рецепторы, которые способны специфически связывать с внешней стороны эффе́ктор, изменяющий их ионную проводимость. Эффе́кторами такого типа могут быть гормоны и нейромедиаторы

Известны рецепторы для ряда гормонов, ассоциированных с ионными каналами, и большинства медиаторов, среди которых наиболее изучен рецептор ацетилхолина. Рецептор ацетилхолина состоит из пяти цилиндрообразных субъединиц, расположенных в мембране параллельно друг другу: α_2 , β , γ , δ . Между ними вдоль оси цилиндров находится заполненный молекулами воды канал. Каждая субъединица рецептора состоит из большого количества гидрофобных аминокислотных остатков. Кроме этого, все субъединицы содержат один спирализованный трансмембранный фрагмент, аминокислотные радикалы которого (полярные незаряженные аминокислотные остатки, в основном серии и треонин) выстилают центральный канал рецептора изнутри. В средней части субъединиц, обращённой к каналу, локализованы остатки лейцина. В присутствии ацетилхолина боковые взаимодействия между субъединицами поддерживают канал в открытом состоянии и создают возможность для транспорта ионов. В отсутствие ацетилхолина в результате изменения ориентации субъединиц относительно друг друга канал закрывается, так как выступающие внутрь канала остатки лейцина образуют плотное гидрофобное кольцо, блокируя движение гидратированных ионов в этой области

1. 15Лекция №15 (2 часа).

Тема: «Функции крови. Белки плазмы крови. Синтез гема и его регуляция»

1.15.1 Вопросы лекции:

1. Функции белков крови
2. Методы выделения белков крови
3. Характеристика некоторых белков крови: альбумин крови, транстиретин, антитрипсин, гаптоглобин

1.15.2 Краткое содержание вопросов:

1. Функции белков крови

В плазме крови содержится 7% всех белков организма при концентрации 60 - 80 г/л. Белки плазмы крови выполняют множество функций. Одна из них заключается в поддержании осмотического давления, так как белки связывают воду и удерживают её в кровеносном русле.

- Белки плазмы образуют важнейшую буферную систему крови и поддерживают pH крови в пределах 7,37 - 7,43.
- Альбумин, транстиретин, транскортин, трансферрин и некоторые другие белки выполняют транспортную функцию.
- Белки плазмы определяют вязкость крови и, следовательно, играют важную роль в гемодинамике кровеносной системы.
- Белки плазмы крови являются резервом аминокислот для организма.
- Иммуноглобулины, белки свёртывающей системы крови, α_1 -антитрипсин и белки системы комплемента осуществляют защитную функцию.

Большинство сывороточных белков синтезируется в печени, однако некоторые образуются и в других тканях. Например, γ -глобулины синтезируются В-лимфоцитами, пептидные гормоны в основном секретируют клетки эндокринных желёз, а пептидный гормон эритропоэтин - клетки почки.

Для многих белков плазмы, например альбумина, α_1 -антитрипсина, гаптоглобина, транс-феррина, церулоплазмина, α_2 -макроглобулина и иммуноглобулинов, характерен полиморфизм

Почти все белки плазмы, за исключением альбумина, являются гликопротеинами. Олигосахариды присоединяются к белкам, образуя гликозидные связи с гидроксильной группой серина или треонина, или взаимодействуя с карбоксильной группой аспарагина. Концевой остаток олигосахаридов в большинстве случаев представляет собой N-ацетилнейраминовую кислоту, соединённую с галактозой. Фермент эндотелия сосудов нейраминидаза гидролизует связь между ними, и галактоза становится доступной для специфических рецепторов гепатоцитов. Путём эвдцитоза "состарившиеся" белки поступают в клетки печени, где разрушаются. $T_{1/2}$ белков плазмы крови составляет от нескольких часов до нескольких недель.

При ряде заболеваний происходит изменение соотношения распределения белковых фракций при электрофорезе по сравнению с нормой.

Такие изменения называют диспротеинемиями, однако их интерпретация часто имеет относительную диагностическую ценность. Например, характерное для нефротического синдрома снижение альбуминов, α_1 - и γ -глобулинов и увеличение α_2 - и β -глобулинов отмечают и при некоторых других заболеваниях, сопровождающихся потерей белков. При снижении гуморального иммунитета уменьшение фракции γ -глобулинов свидетельствует об уменьшении содержания основного компонента иммуноглобулинов - IgG, но не отражает динамику изменений IgA и IgM.

Содержание некоторых белков в плазме крови может резко увеличиваться при острых воспалительных процессах и некоторых других патологических состояниях (травмы, ожоги, инфаркт миокарда). Такие белки называют белками острой фазы, так как они принимают участие в развитии воспалительной реакции организма. Основным индуктором синтеза большинства белков острой фазы в гепатоцитах - полипептид интерлейкин-1, освобождающийся из мононуклеарных фагоцитов. К белкам острой фазы относят С-реактивный белок, называемый так, потому что он взаимодействует с С-полисахаридами пневмококков, α_1 -антитрипсин, гаптоглобин, кислый гликопротеин, фибриноген.

2. Методы выделения белков крови

Из ткани: гомогенизация (разрушение тканей и клеточных структур)

Из плазмы крови, мочи и др. биологических жидкостей гомогенизация не нужна

– осаждение белков (солями, спиртом или дегидратирующими растворами)

– фракционирование белков (ионообменная или гелепроницающая хроматография)

Очистка.

Существует много методов, рассмотрим детально гельфильтрацию и диализ.

Разделение белков по молекулярной массе (метод молекулярных сит) или отделение белков от низкомолекулярных веществ обычно ведут при помощи гельфильтрации.

При гельфильтрации первыми из колонки выходят белки (или вещества) с большей молекулярной массой, которые не заходят в середину гранул, а позже из колонки выходят вещества с небольшой молекулярной массой, которые застревают в порах геля.

Диализ – это метод очистки белков от низкомолекулярных примесей. Маленькие молекулы проходят через полупроницаемую мембрану, а белки, имеющие большую молекулярную массу не проходят через нее.

Количественное определение белков. Количество белка можно определять: 1) по содержанию в них азота (для этого белковый препарат сначала подвергают минерализации, а затем определяют содержание азота по реакции Несслера); 2) биуретовый метод – основан на образовании окрашенных в синефиолетовый цвет комплексов между ионами меди и пептидными связями белков; 3) метод Лоури, который основан на способности медных комплексов белков восстанавливать реактив Фолина; 4) метод Бредфорда, который основан на способности белков связывать краситель – бромфеноловый синий, кумасси голубой; 5) на кафедре разработан метод определения

белков по их взаимодействию с коллоидным раствором высокодисперсного кремнезема. Качественное определение белков используются осадочные пробы с органическими кислотами (трихлоруксусная, сульфосалициловая кислоты), цветные реакции на определенные аминокислоты в составе белка (реакция Фоля, ксантопротеиновая реакции и др).

Методом электрофореза на ацетилцеллюлозе или геле агарозы белки плазмы крови можно разделить на альбумины (55-65%), α_1 -глобулины (2- 4%), α_2 -глобулины (6-12%), β -глобулины (8-12%) и γ -глобулины (12-22%)

Применение других сред для электрофоретического разделения белков позволяет обнаружить большее количество фракций. Например, при электрофорезе в полиакриламидном или крахмальном гелях в плазме крови выделяют 16-17 белковых фракций. Метод иммуноэлектрофореза, сочетающий электрофоретический и иммунологический способы анализа, позволяет разделить белки плазмы крови более чем на 30 фракций.

3. Характеристика некоторых белков крови: альбумин крови, транстиретин, антитрипсин, гаптоглобин

Содержание и функции некоторых белков плазмы крови

Группа	Белки	Концентрация в сыворотке крови, г/л	Функция
Альбумины	Транстиретин	0,25	Транспорт тироксина и трийодтиронина
	Альбумин	40	Поддержание осмотического давления, транспорт жирных кислот, билирубина, жёлчных кислот, стероидных гормонов, лекарств, неорганических ионов, резерв аминокислот
α_1 -Глобулины	α_1 -Антитрипсин	2,5	Ингибитор протеиназ
	ЛПВП	0,35	Транспорт холестерина
	Протромбин	0,1	Фактор II свёртывания крови
	Транскортин	0,03	Транспорт кортизола, кортикостерона, прогестерона
	Кислый α_1 -гликопротеин	1	Транспорт прогестерона
	Тироксинсвязывающий глобулин	0,02	Транспорт тироксина и трийодтиронина
α_2 -Глобулины	Церулоплазмин	0,35	Транспорт ионов меди, оксидоредуктаза
	Антитромбин III	0,3	Ингибитор плазменных протеаз
	Гаптоглобин	1	Связывание гемоглобина

	α 2-Макроглобулин	2,6	Ингибитор плазменных протеиназ, транспорт цинка
	Ретинолсвязыва-ющий белок	0,04	Транспорт ретинола
	Витамин D связывающий белок	0,4	Транспорт кальциферола
β -Глобулины	ЛПНП	3,5	Транспорт холестерина
	Трансферрин	3	Транспорт ионов железа
	Фибриноген	3	Фактор I свёртывания крови
	Транскобаламин	25×10^{-9}	Транспорт витамина B ₁₂
	Глобулин связывающий белок	20×10^{-6}	Транспорт тестостерона и эстрадиола
	C-реактивный белок	<0,01	Активация комплемента
γ -Глобулины	IgG	12	Поздние антитела
	IgA	3,5	Антитела, защищающие слизистые оболочки
	IgM	1,3	Ранние антитела
	IgD	0,03	Рецепторы В-лимфоцитов
	IgE	<0,01	Реагин

1. 16 Лекция №16 (2 часа).

Тема: «Биохимия мышечной ткани »

1.16.1 Вопросы лекции:

1. Краткая история развития изучения биохимии мышечной ткани
2. Превращение химической энергии в механическую в результате работы мышц
3. Саркомер – функциональная единица мышцы
4. Основные белки мышц: актин и миозин
5. Источники энергии для мышечного сокращения

1.16.2 Краткое содержание вопросов:

1. Краткая история развития изучения биохимии мышечной ткани

Исследования в области мышечного дыхания привели Сент-Джёрджи к вопросу о том, как движутся мышцы. Русские ученые ещё в 1939 году выяснили, что мышечный белок миозин способен взаимодействовать с АТФ и расщеплять её. Несмотря на то, что АТФ была открыта ещё в 1929 году, до сих пор было неизвестно, что она является источником энергии в клетках. Сент-Джёрджи предположил, что движение мышц можно объяснить взаимодействием миозина с АТФ. Для того, чтобы лучше разобраться, как изменяется размер и форма мышечной ткани, и какие химические вещества участвуют в этом процессе, он выделил миозин из мышцы кролика, а затем при помощи подкожного шприца сформировал из него тонкие нити. Когда он добавил к ним АТФ, нити быстро сократились на треть, как при сокращении мышечного волокна. Позже Сент-Джёрджи говорил:

«Увидеть, как миозин быстро сокращается и как впервые вне организма воспроизводится наиболее древний и таинственный признак живого-движение... было самым волнующим моментом в моей работе»

Он со своей исследовательской группой в дальнейшем выяснили, что мышечная ткань содержит ещё один белок, актин, который объединяется с миозином с образованием связанных волокон, причем, чем выше содержание в мышце актина, тем сильнее она сокращается при добавлении АТФ. К 1944 году он окончательно выяснил механизм мышечных сокращений и роль АТФ в этом процессе. Был опубликован цикл статей «Исследования мышц в институте медицинской химии» с результатами пятилетней работы.

2. Превращение химической энергии в механическую в результате работы мышц

Основная функция мышц состоит в преобразовании химической энергии в механическую работу или силу. Главными биомеханическими показателями, характеризующими деятельность мышцы, являются:

а) сила, регистрируемая на ее конце (эту силу называют натяжением или силой тяги мышцы);

б) скорость изменения длины. Механические свойства мышц сложны и зависят от механических свойств элементов, образующих мышцу (мышечные волокна, соединительные образования и т.п.), и состояния мышцы (возбуждения, утомления и пр.).

Длину мышцы без нагрузки называют длиной покоя.

Сократимость - это способность мышцы сокращаться при возбуждении. В результате сокращения происходит укорочение мышцы, и возникает сила тяги.

Упругие свойства мышцы, т.е. ее способность восстанавливать первоначальную длину после устранения деформирующей силы.

Если мышцу растягивать повторно, через небольшие интервалы времени, то ее длина увеличится больше, чем при однократном воздействии. Это свойство мышц широко используется в практике при выполнении упражнений на гибкость (пружинистые движения, повторные махи и т.п.).

Прочность сухожилия в 150 раз больше прочности мышцы. Возникает вопрос: почему иногда рвется сухожилие, а мышца остается целой. По-видимому, это может происходить при очень быстрых движениях: мышца успевает амортизировать, а сухожилие - нет.

Релаксация - свойство мышцы, проявляющееся в постепенном уменьшении силы тяги при постоянной длине. Релаксация проявляется, например, при прыгивании и последующем прыжке вверх, когда человек, глубоко подседая, делает паузу (чем пауза длительнее, тем сила отталкивания и высота выпрыгивания меньше).

Проявление активности мышцы определяется изменением ее длины, либо ее напряжения, либо того и другого одновременно.

Исходя из этого, мышцы, прикрепленные сухожилиями к костям, функционируют в двух режимах: изометрическом и анизометрическом.

При изометрическом (удерживающем) режиме длина возбужденной мышцы не изменяется (изо - равный, метр - длина /греческий/). Например, в режиме изометрического сокращения работают мышцы человека, который подтянулся и удерживает свое тело в этом положении.

При анизометрическом режиме длина мышцы укорачивается или удлиняется. В анизометрическом режиме функционируют мышцы бегуна, пловца, велосипедиста и т.д.

У анизометрического режима две разновидности. В преодолевающем режиме мышца укорачивается в результате сокращения. А в уступающем режиме мышца растягивается внешней силой. Например, икроножная мышца спринтера функционирует в

уступающем режиме при взаимодействии ноги с опорой в фазе амортизации, а в преодолевающем режиме - в фазе отталкивания.

Преодолевающая работа, при которой возрастание скорости сокращения мышцы вызывает уменьшение силы тяги. А в уступающем режиме наблюдается обратная картина: увеличение скорости растяжение мышцы сопровождается увеличением силы тяги. Это является причиной многочисленных травм у спортсменов (например, разрыва ахиллова сухожилия у спринтеров и прыгунов в длину).

Существуют два случая группового взаимодействия мышц: синергизм и антагонизм.

3. Саркомер – функциональная единица мышцы

Саркомер (sarcomere) [греч. *sarx* (*sarkos*) - мясо и *meros* - часть, доля] - повторяющийся участок (сократимая единица) миофибрилл поперечно-полосатых мышц; состоит из набора взаимодействующих друг с другом филаментов актина и миозина.

Функциональной единицей мышечного волокна является миофибрилла. Миофибриллы занимают практически всю цитоплазму мышечного волокна, оттесняя ядра на периферию. Каждая миофибрилла имеет периодическое строение. Повторяющаяся структура в составе миофибриллы называется саркомером. Саркомеры соседних миофибрилл расположены друг против друга, отчего все мышечное волокно тоже приобретает периодическое строение.

Саркомер имеет длину около 2.5 мкм. Граница между двумя саркомерами имеет вид темной полосы на электронно-микроскопических фотографиях и носит название Z-диска. В Z-диске локализуется актин-связывающий белок альфа-актинин, который необходим для прикрепления актиновых филаментов к Z-диску. Колокализуются с альфа-актинином винкулин и интегрин

От Z-диска перпендикулярно ему отходят нити F-актина, ассоциированные с тропомиозином и тропонином. Актиновые филаменты, называемые также в данном случае тонкими нитями, имеют одинаковую длину около 1 мкм, таким образом, что тонкие нити, идущие от противоположных Z-дисков навстречу друг другу, не перекрываются. С тонкими нитями в скелетных мышцах ассоциирован гигантский белок небулин с молекулярной массой 500-800 кД.

В центральной части саркомера вдоль его оси расположены миозиновые биполярные филаменты, длиной около 1.6 мкм и толщиной около 15 нм. Они называются также толстыми филаментами. На поперечном срезе видно, что миозиновые филаменты располагаются на равном расстоянии друг от друга, образуя гексагональную решетку. Концы тонких и толстых филаментов перекрываются. При этом тонкие филаменты находятся в промежутках между толстыми, равномерно окружая их.

Кроме миозина природные толстые филаменты содержат или ассоциированы с С-белком, Н-белком (белок 86 кД), М-белком, миомезином, ММ-креатинкиназой, титином, АМФ-дезаминазой, скелемином. С-белок с молекулярной массой 140 кД имеется в наибольшем количестве. Функция его неизвестна. По структуре он сходен с белками межклеточной адгезии серии N-CAM. Титин или коннектин образует очень тонкие эластичные филаменты, связывающие миозиновые филаменты с Z-пластинкой и ответственные за расположение миозиновых филаментов в центре саркомера. Титин - это самый большой из описанных к настоящему времени белков. Его молекулярная масса составляет порядка 2800 кД

4. Основные белки мышц: актин и миозин

Миозин является одним из основных сократительных белков мышц, составляющий около 55% от общего количества мышечных белков. Из него состоят толстые нити миофибрилл. Молекулярная масса этого белка – около 470 000. В молекуле миозина различают длинную фибриллярную часть и глобулярные структуры (головки). Фибриллярная часть молекулы миозина имеет двуспиральную структуру. В составе

молекулы выделяют шесть субъединиц: две тяжёлые полипептидные цепи (молекулярная масса 200 000) и четыре лёгкие цепи (молекулярная масса 1500-2700), расположенные в глобулярной части. Основной функцией фибриллярной части молекулы миозина является способность образовывать хорошо упорядоченные пучки миозиновых филаментов или толстые протофибриллы. На головках молекулы миозина расположены активный центр АТФ-азы и актинсвязывающий центр, поэтому они обеспечивают гидролиз АТФ и взаимодействие с актиновыми филаментами.

Актин – второй сократительный белок мышц, который составляет основу тонких нитей. Известны две его формы – глобулярный G-актин и фибриллярный F-актин. Глобулярный актин – это шарообразный белок с молекулярной массой 42 000. На его долю приходится около 25% общей массы мышечного белка. В присутствии катионов магния, актин подвергается нековалентной полимеризации с образованием нерастворимого филамента в виде спирали, получившего название F-актин. Обе формы актина не обладают ферментативной активностью. Каждая молекула G-актина способна связывать один ион кальция, который играет важную роль в иницировании сокращения. Кроме того, молекула G-актина прочно связывает одну молекулу АТФ или АДФ. Связывание АТФ G-актином обычно сопровождается его полимеризацией с образованием F-актина и расщеплением АТФ до АДФ и фосфата. АДФ остаётся связанной с фибриллярным актином.

5. Источники энергии для мышечного сокращения

Источником энергии для сокращения мышечных волокон служит АТФ. С инактивацией тропонина ионами кальция активируются каталитические центры для расщепления АТФ на головках миозина. Фермент миозиновая АТФ-аза гидролизует АТФ, расположенный на головке миозина, что обеспечивает энергией поперечные мостики. Освобождающиеся при гидролизе АТФ молекула АДФ и неорганический фосфат используются для последующего ресинтеза АТФ. На миозиновом поперечном мостике образуется новая молекула АТФ. При этом происходит разъединение поперечного мостика с нитью актина. Повторное прикрепление и отсоединение мостиков продолжается до тех пор, пока концентрация кальция внутри миофибрилл не снижается до подпороговой величины. Тогда мышечные волокна начинают расслабляться.

При однократном движении поперечных мостиков вдоль актиновых нитей (гребковых движениях) саркомер укорачивается примерно на 1% его длины. Следовательно, для полного изотонического сокращения мышцы необходимо совершить около 50 таких гребковых движений. Только ритмическое прикрепление и отсоединение головок миозина может втянуть нити актина вдоль миозиновых и совершить требуемое укорочение целой мышцы. Напряжение, развиваемое мышечным волокном, зависит от числа одновременно замкнутых поперечных мостиков. Скорость развития напряжения или укорочения волокна определяется частотой замыкания поперечных мостиков, образуемых в единицу времени, то есть скоростью их прикрепления к актиновым миофиламентам. С увеличением скорости укорочения мышцы число одновременно прикрепленных поперечных мостиков в каждый момент времени уменьшается. Этим и можно объяснить уменьшение силы сокращения мышцы с увеличением скорости ее укорочения.

При одиночном сокращении процесс укорочения мышечного волокна заканчивается через 15-50 мс, так как активирующие его ионы кальция возвращаются при помощи кальциевого насоса в цистерны саркоплазматического ретикулула. Происходит расслабление мышцы.

Поскольку возврат ионов кальция в цистерны саркоплазматического ретикулула идет против диффузионного градиента, то этот процесс требует затрат энергии. Ее источником служит АТФ. Одна молекула АТФ затрачивается на возврат 2-х ионов кальция из межфибриллярного пространства в цистерны.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (6 часа).

Тема: «Строение и свойства аминокислот, входящих в состав белков. Структура белков»

2.1.1 Цель работы: изучить строение белков и методику выполнения цветных реакций на белки

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить некоторые физические и химические свойства аминокислот и белков, а также структуру белка.
2. Проследить при помощи хроматографии распределение аминокислот в соответствии с их растворимостью в органических растворителях.
3. Закрепить полученные знания и навыки на конкретных примерах исследования свойств аминокислот.
4. Ознакомить с побочными процессами, проходящими при проведении качественных реакций.
5. Привить навыки работы химической посудой; привить навыки работы с литературой и умение формулировать выводы.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Штатив с пробирками, спиртовка, спички, держатель для пробирок, кристаллики мочевины, 1%-ный раствор яичного белка, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди, 0,5%-ный водный раствор нингидрина, глицин, концентрированная азотная кислота, концентрированная серная кислота, 30%-ный раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор ацетата свинца, ледяная уксусная кислота, фенол, реактив миллона, раствор желатина, мед, 0,1% спиртовой раствор, 0,1г α -нафтола, 2%-ный раствор гипобромит натрия, 5%-ный раствор гидроксида натрия, лёд, раствор тирозина, раствор соды, диазореактив, раствор сахара, раствор тимола, 5%-ный раствор соляной кислоты, 20%-ный раствор сульфата меди, хроматографическая бумага, аланин, лейцин, глутаминовая кислота, чашка Петри, смеси бутанола, уксусной кислоты и воды, водонасыщенный раствор фенола, 0,1% спиртовой раствор нингидрина, 20%-ный раствор щелочи, 5%-ный раствор нитропруссиды натрия, 15%-ный раствор сульфаниловой кислоты, 0,5%-ный раствор нитрита натрия, 10%-ный раствор карбоната натрия, 0,1%-ный раствор гистидина.

2.1.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Биуретовая реакция (на обнаружение пептидных связей в белках)

Ход работы:

1. Помещают в сухую пробирку несколько кристалликов мочевины и нагревают на слабом огне. Мочевина сначала плавится. Когда сплавленная масса начнет твердеть, нагревание прекращают и дают пробирке остыть. В результате нагревания из мочевины образуется биурет, а аммиак улетучивается (об этом узнают по запаху).

2. К полученному в пробирке биурету прибавляют около 1 мл 20% раствора сульфата меди. При встряхивании получается характерное розовато-фиолетовое окрашивание. Необходимо избегать прибавления избытка раствора сульфата меди, так как голубая окраска получающегося гидроксида меди может маскировать реакцию.

3. Проводят биуретовую реакцию с раствором белка. В пробирку вносят 5-10 капель 1%-ного раствора яичного белка, 3-6 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1-2 капли 1%-ного раствора сульфата меди и перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовое окрашивание.

Нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидроксида меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

Опыт 2. Нингидриновая реакция

Ход работы:

К 5-10 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5-10 капель 0,5%-ного водного раствора нингидрина и нагревают до кипения. Через 2-3 минуты развивается розовое или сине-фиолетовое окрашивание.

1.Проделявают реакцию с какой-нибудь аминокислотой, например с глицином. Наливают в пробирку около 1 мл раствора глицина, добавляют 5-6 капель слабого (0,1%) раствора нингидрина и нагревают. Появляется фиолетово-синее окрашивание

2.Так же производят нингидриновую реакцию с 1-2 мл раствора белка, взяв 0,3-0,5 мл раствора нингидрина. Получается фиолетовое (иногда фиолетово-розовое окрашивание). С течением времени раствор синеет.

Опыт 3. Ксантопротеиновая реакция

Ход работы:

К 5-10 каплям 1%-ного раствора яичного белка добавляют 3-6 капель концентрированной азотной кислоты и (**осторожно!!!**) нагревают. Появляется осадок желтого цвета.

После охлаждения в пробирку (желательно на осадок) добавляют 5-10 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия до появления оранжевого окрашивания (оно связано с образованием натриевой соли полученных нитросоединений).

Опыт 4. Реакция Миллона

Ход работы:

1.Сначала проделяют реакцию с фенолом. Наливают в пробирку около 1-2 мл раствора фенола, прибавляют около 0,5 мл реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется розовое окрашивание.

2. Проводят миллонову реакцию с раствором белка. В пробирку наливают 1-2 мл раствора белка и прибавляют 5-6 капель реактива Миллона. Появляется осадок свернувшегося белка, так как реактив Миллона содержит соли ртути и азотную кислоту. Содержимое пробирки осторожно нагревают. Осадок окрашивается в кирпично-красный цвет.

Следует избегать прибавления избытка реактива Миллона, так как этот реактив содержит азотную кислоту, которая может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Миллона.

3.Проделяют аналогичным образом миллонову реакцию с раствором желатина. Если желатин достаточно чистый, реакция не получается, так как в молекуле желатина остаток тирозина отсутствует.

4.Проделяют миллонову реакцию с раствором меда, т.к. он содержит данную аминокислоту. Для реакции берут водный раствор меда в соотношении 1:2.

Опыт 5. Реакция Сакагучи

Ход работы:

К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия, 3 капли 0,1%-ного спиртового раствора α -нафтола и по каплям (всего 1-5 капель) 2%-ного раствора гипобромита натрия. Жидкость в пробирке приобретает красный цвет. Проделяют данную реакцию с раствором меда, т.к. он содержит данную аминокислоту. Для реакции берут водный раствор меда в соотношении 1:2.

Опыт 6. Реакция Адамкевича (на триптофан)

Ход работы:

В пробирку вносят 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и 5 капель ледяной уксусной кислоты. Раствор вначале слегка нагревают, затем охлаждают и по стенкам пробирки (**осторожно!!!**), чтобы жидкости не смешивались, приливают 10 капель концентрированной серной кислоты. При стоянии на границе двух слоев наблюдается красно-фиолетовое окрашивание в виде кольца.

Опыт 7. Реакция Фоля

Ход работы:

К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 каплю 5%-ного раствора ацетата свинца. Через 1-2 мин после интенсивного кипячения появляется бурый или черный осадок.

Ион серы S^{2-} , образующийся из цистеина или цистина в сильнощелочной среде можно обнаружить с помощью нитропруссидной реакции. К 10 каплям 1%-ного раствора яичного белка добавляют 10 капель 20%-ного раствора щелочи, интенсивно кипятят, затем после охлаждения приливают 3-5 капель свежеприготовленного 5%-ного раствора нитропрусида натрия, после чего появляется красно-фиолетовое окрашивание. Интенсивность окрашивания в данных реакциях зависит от количества аминокислот, содержащих серу, и от количества белка в растворе.

Опыт 8. Диазореакция

Ход работы:

1. Наливают в пробирку 1-2 мл раствора тирозина, 0,3-0,5 раствора соды и около 1 мл диазореактива. Появляется оранжево-красное окрашивание.

2. Прodelьывают ту же реакцию с раствором белка, беря его вместо раствора тирозина. Получается оранжево-красное окрашивание.

Опыт 9. Реакция на присутствие углеводных компонентов

Ход работы:

1. Наливают в 2 пробирки по 1-2 мл раствора сахара, добавляют в первую пробирку 5-6 капель раствора α -нафтола, а в другую пробирку - 5-6 капель раствора тимола.

2. Осторожно подслаивают в обе пробирки по 1-2 мл концентрированной серной кислоты. Наблюдают фиолетовое (в случае α -нафтола) и красное (в случае тимола) окрашивание на границе раздела серной кислоты и раствора сахара.

3. Прodelьывают те же реакции, взяв вместо раствора сахара раствор белка. Отмечают положительную реакцию, указывающую на наличие углеводных групп в белке.

Опыт 10. Реакция Паули (на гистидин и тирозин)

Ход работы:

К 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты (готовится на 5% растворе соляной кислоты) прибавляют 2 мл 0,5% раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают, добавляют 2 мл 1% раствора яичного белка и после перемешивания 6 мл 10% раствора карбоната натрия. После перемешивания смесь окрашивается в вишнево-красный цвет.

Прodelьывают эту реакцию с 0,1% раствором гистидина, сравнивают полученные результаты и делают вывод.

Опыт 11. Хроматографический метод определения аминокислот. Разделение смеси аминокислот с помощью радиальной хроматографии

Ход работы:

Бумажный диск хроматографической бумаги, диаметром 12 см делят простым карандашом на четыре части. В центре диска делают небольшой вырез (диаметром 0,5-1 см). В каждом секторе на расстоянии 3-4 мм от разреза в центре диска наносят карандашом точку (линия старта). Затем в отмеченную точку каждого сегмента наносят капилляром небольшую каплю растворов различных аминокислот (целесообразно использовать аланин, лейцин, глутаминовую кислоту и соответственно их смесь, так как коэффициенты распределения этих аминокислот сильно разнятся). Бумагу подсушивают. Из такой же бумаги делают небольшой фитилек и вставляют его в разрез в центре диска. Затем хроматограмму с фитильком помещают на чашку Петри, куда предварительно

наливают 2-3 мл смеси бутанола, уксусной кислоты и воды (4:1:5) так, чтобы фитилек касался раствора. Чашку Петри накрывают крышкой и оставляют под вытяжкой при комнатной температуре на 1 час, т.е. до тех пор, пока фронт растворителя не дойдет до конца хроматограммы около 1 см. Затем, хроматограмму вынимают и высушивают в сушильном шкафу при 80-100⁰С для испарения растворителя и фиксации аминокислот. После чего хроматограмму проявляют, обрабатывая её 0,1% спиртовым раствором нингидрина с помощью пипетки или пульверизатора, и вновь высушивают при 100⁰С 5-8 минут. На проявленной хроматограмме в трех секторах будет по одному пятну и в четвертом три пятна, соответствующих аминокислотам в исследуемой смеси. Рассчитывают коэффициенты распределения отдельных аминокислот и аминокислот, находящихся в смеси. Затем, сравнивая их, определяют, какие же аминокислоты входили в состав смеси.

2.2 Лабораторная работа №2 (6 часа).

Тема: «Формирование трехмерной структуры белка в клетке. Физико-химические свойства белков.»

2.2.1 Цель работы: изучить основы функционирования белков.

2.2.2 Задачи работы:

1. Изучить основы функционирования белков.
2. Закрепить представления о структурах белковых молекул.
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
4. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

10%-ный раствор серной кислоты, дистиллированная вода, концентрированный раствор аммиака, 1%-ный раствор нитрата серебра, 1%-ный спиртовой раствор тимола, концентрированная серная кислота, молибденовый реактив (7,5 г молибдата аммония, вода, 32%-ная азотная кислота ($\rho = 1,2$ г/мл), слюна, 2 мл молока, ледяная уксусная кислота, стеклянная палочка, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 10%-ный раствор азотной кислоты, 0,5%-ный раствора фенолфталеина, 1%-ный раствор яичного белка, круглодонная колба на 100 мл, фильтры, пробка с обратным холодильником длиной 25-30 см, стеклянные палочки, спиртовка, спички, пробирки, штативы, асбестовая сетка.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Реакции на фосфопротеиды

Выделение казеиногена из молока

Ход работы:

К 2 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды и затем 2 капли ледяной уксусной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают на фильтре 2 раза дистиллированной водой, а затем собирают стеклянной палочкой в пробирки и используют для следующих работ.

Доказательство белковой природы казеиногена

Ход работы:

С частью осадка казеиногена проделывают цветные реакции на белки и аминокислоты – биуретовую, Фоля, Миллона.

Оставшуюся часть осадка подвергают гидролизу, для чего помещают его в пробирку, куда добавляют 2 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия. Пробирку закрывают пробкой со стеклянной трубкой и кипятят 10-15 мин на асбестовой сетке. Охлаждают. В гидролизате открывают фосфорную кислоту.

Гидролизат подкисляют несколькими каплями 10%-ного раствора азотной кислоты, в присутствии 1-2 капель 0,5%-ного раствора фенолфталеина до обесцвечивания и отфильтровывают в сухую пробирку. К 5 мл фильтрата приливают 20 капель

молибденового реактива и кипятят несколько минут. Раствор окрашивается в лимонно-желтый цвет, а при стоянии выпадает осадок такого же цвета фосфомолибденовокислого аммония.

Опыт 2. Реакции на гликопротеиды

Открытие углеводного компонента в яичном белке

Ход работы:

В сухую пробирку вносят 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и проводят реакцию Молиша. К 10 каплям раствора яичного белка прибавляют 2-3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно) – 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание.

Выделение муцина из слюны

Ход работы:

В пробирку собирают 2-3 мл слюны и добавляют 4-5 капель ледяной уксусной кислоты. Выпадает осадок муцина. Жидкость из пробирки осторожно сливают, а с осадком муцина проводят реакцию Молиша для доказательства присутствия углевода в этом белке.

2.3. Лабораторная работа №3 (4 часа).

Тема: «Витамины. Классификация. Общая характеристика.»

2.3.1 Цель работы: Рассмотреть историю открытия, строение, биологическую роль водорастворимых витаминов

2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить историю открытия, строение, биологическую роль жирорастворимых витаминов.
2. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления докладов выступления.
3. Научить студентов готовить презентации
4. Научиться определять витамины.
5. Изучить их качественные реакции.
6. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
7. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
8. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

Ход работы:

В сухой пробирке смешивают при энергичном встряхивании 5 капель 0,1% спиртового раствора витамина Е и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Верхний масляный слой расслоившейся эмульсии окрашивается в красный цвет.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, проектор, презентации штатив с пробирками, 1% раствор сульфаниловой кислоты, 5% раствор нитрата натрия, порошок тиамин, 10% раствор бикарбоната натрия, 0,025% раствор рибофлавина, концентрированная соляная кислота, металлический цинк, 0,01 г никотиновой кислоты, 10 % раствор уксусной кислоты, 5% раствор ацетата меди, 10% раствор тиомочевина, витамин В₁₂ беззольный фильтр, концентрированная серная кислота, пробка с обратным холодильником, штатив, дистиллированная вода, 5% раствор пиридоксина, 5% раствор хлорного железа, 1%-ная вытяжка шиповника, аскорбиновая кислота, 5% раствор феррицианида калия, концентрированная уксусная кислота, 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндифенол, 0,1 г чая, 10мл экстракта чая, индигокармин, 0,05 N. раствор перманганата калия, сок картофеля, сок капусты (клубни картофеля или часть кочана капусты натрите на терке из нержавеющей стали или пластика, растертую массу отожмите через марлю, сложенную в два слоя), 5 %-ый раствор гексацианоферрата (III) калия, 5%-ый раствор гидроксида

калия, 10 %-ый раствор соляной кислот, 1,5 %-ый раствор хлорида железа (III), 5 %-ый раствор нитрата серебра (сохраняют в темном месте), 10 % -ый раствор аммиака, дистиллированная вода, терка из нержавеющей стали или пластика, пробирки, рыбий жир, хлороформ, анилиновый реактив, 0,1%-ный спиртовой раствор витамина Е, концентрированная азотная кислота.

2.3.4 Описание (ход) работы:

1. Витамин А
2. Витамин D
3. Витамин К
4. Витамин F
5. Витамин B₁
6. Витамин B₂
7. Витамин B₃
8. Витамин B₅
9. Витамин B₆
10. Витамин B_c
11. Витамин B₁₂
12. Витамин Н
13. Витамин С
14. Витамин Р
15. Витамин B₁₃
16. Витамин B₁₅

Опыт 1. Водорастворимые витамины

а) Качественная реакция на тиамин (витамин B₁)

Ход работы:

В пробирку приливают по 5-10 капель 1% раствора сульфаниловой кислоты и 5% раствора нитрата натрия (состав диазореактива). Сюда же вносят на кончике ножа или стеклянной палочки небольшое количество порошка тиамина и по стенке пробирки осторожно добавляют 5-7 капель 10% раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Диазореакция

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%-ного раствора нитрата натрия, добавляют 1-2 капли 5%-ного раствора тиамина и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5-7 капель 10%-ного бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

б) Открытие рибофлавина (витамин B₂)

Ход работы:

В пробирку приливают 10 капель 0,025% раствора рибофлавина, 5 капель концентрированной соляной кислоты и зернышко металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с витамином, восстанавливая его, и раствор меняет окраску (из желтого на красную и розовую), а затем обесцвечивается.

в) Открытие никотиновой кислоты (витамина PP)

Ход работы:

В пробирку вносят 0,01 г никотиновой кислоты и 20 капель 10 % раствора уксусной кислоты. Нагревают до кипения и добавляют равный объем 5% раствора ацетата меди. При постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок меди комплексной соли и никотиновой кислоты.

г) Открытие цианкобаламина (витамина B₁₂)

Ход работы:

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли 10% раствора тиомочевины и высушивают над сеткой газовой горелки. Затем на фильтр добавляют 1-2 капли минерализата витамина. Приготовление минерализата: в пробирку вносят содержимое одной ампулы витамина В₁₂ и 3-5 капель концентрированной серной кислоты, закрывают ее пробкой с обратным холодильником, закрепляют на штативе в несколько наклоненном положении и производят сжигание в вытяжном шкафу до обесцвечивания раствора. По окончании минерализации добавляют 1 мл дистиллированной воды небольшими порциями при постоянном перемешивании и вновь подсушивают. На фильтре (чаще по краям пятна) появляется зеленое окрашивание.

д) Открытие пиридоксина (витаминов В₆)

Ход работы:

В пробирке смешивают 5 капель 5% раствора пиридоксина и 1 каплю 5% раствора хлорного железа и встряхивают. Смесь окрашивается в красный цвет.

е) Открытие аскорбиновой кислоты в шиповнике

Ход работы:

В пробирку вносят по 2 капли 5% раствора феррицианида калия и 1 каплю раствора хлорного железа. Жидкость приобретает бурую окраску. Затем добавляют 5-10 капель 1% вытяжки из шиповника (приготовленной из экстракта) и цвет раствора переходит в зеленовато-синий, после чего выпадает осадок темно-синего цвета (берлинская лазурь), который при добавлении воды становится более отчетливым.

ж) Обнаружение аскорбиновой кислоты в соке картофеля или капусты

Ход работы:

Восстановление ионов железа (III)

В две пробирки налейте по 1 см³ сока картофеля и капусты, прибавьте по 2 капли раствора гидроксида калия и столько же раствора гексацианоферрата (III) калия.

Содержимое пробирок тщательно перемешайте, после чего в пробирки добавьте по 6-8 капель 10 %-го раствора соляной кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа (III). Выпадает синий или зеленовато-синий осадок берлинской лазури.

Восстановление ионов серебра

В пробирку налейте 1 см³ раствора нитрата серебра и добавьте по каплям раствор аммиака. Вначале образуется серый осадок, который растворяется в избытке аммиака.

Полученный аммиачный раствор оксида серебра разделите на две пробирки и добавьте в одну 1 см³ сока картофеля, а во вторую - 1 см³ сока капусты. Пробирки поставьте в горячую (80 °С) воду на 5-10 минут. На стенках пробирок образуется зеркальный налет металлического серебра.

з) Количественное определение рутина (витамина Р)

Ход работы:

К 0,1 г чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и кипятят 5 мин. Отбирают 10 мл экстракта чая в коническую колбу, куда добавляют 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина в качестве индикатора. Титруют 0,05 N раствором перманганата калия до устойчивости желтой окраски. Расчет производят по формуле:

$$X = 3,2 \cdot A \cdot 50 \cdot 100 / 10 \cdot 0,1 \cdot 1000$$

где: X – количество рутина (мг%); 3,2 – стандартный пересчетный коэффициент титрования (1 мл 0,05 N раствора перманганата калия окисляет 3,2 мг рутина); A – количество миллилитра перманганата калия, прошедшего на титрование; 50 – количество миллилитров воды, добавленное к чаю для экстракции; 100 – коэффициент для пересчета; 10 – количество миллилитров экстракта, взятое для титрования; 0,1 – количество сухого вещества в граммах, взятое для анализа; 1000 – коэффициент пересчета (1 мг = 1000 мкг).

После приведения формула имеет следующий вид :

$$X = A \cdot 16 \text{ мг\%}$$

Для определения рутина в граммах на 1 кг массы тела следует воспользоваться формулой:

$$X = *0,16\text{г/кг}A$$

Опыт 2. Жирорастворимые витамины

а) Открытие ретинола (витамина А) в рыбьем жире

Ход работы:

На сухом часовом стекле смешивают 1 каплю рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и 1 каплей концентрированной серной кислоты. Развивается фиолетово-красное окрашивание, быстро переходящее в бурое.

При отсутствии ретинола в пище у взрослых наблюдается потеря зрения в сумерках, у детей поражается роговая оболочка глаза и главным образом понижается сопротивляемость организма инфекционным заболеваниям.

б) Открытие холекальциферола (витамина D) в рыбьем жире

Ход работы:

На сухом часовом стекле смешивают 1 каплю рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и 1 каплей анилинового реактива (15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты). Эмульсия окрашивается в желтый цвет, который при нагревании приобретает красную окраску.

2.4 Лабораторная работа №4 (6 часа).

Тема: «Ферменты. Строение. Кофакторы. Механизм действия»

2.4.1 Цель работы: познакомиться с различными группами белков

2.4.2 Задачи работы:

1. Провести выделение альбуминов, глобулинов, проламинов из семян злаковых и бобовых

2. Привить навыки работы химической посудой, реагентами

3. Привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Растворы с массовыми долями: хлорида натрия 10 %, этанола 70 %, гидроксида натрия 10 %, сульфата меди 1 %, насыщенный раствор хлорида натрия, стеклянные палочки, спиртовка, спички, пробирки, штативы, асбестовая сетка, спектрофотометр, термостат.

2.4.4 Описание (ход) работы:

ВЫДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНОВ. Ход работы. В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл воды, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38 °С на 30 минут, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 минут. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 минут со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор альбуминов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции (см. стр. 20). По интенсивности окраски делают вывод о содержании альбуминов в исследуемых объектах.

Если к 1 мл раствора альбуминов пшеничной или гороховой муки добавить по 4 мл насыщенного раствора хлорида натрия то белки выпадут в осадок, вначале в виде мути медленно оседающей на дно пробирки. Результаты записать в журнал.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛОБУЛИНОВ. Ход работы. В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл раствора хлорида натрия с массовой долей 10 %, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38 °С на 30 минут, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10

минут. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 минут со скоростью 3000об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор глобулинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании глобулинов в исследуемых объектах.

Если к 1 мл раствора глобулинов пшеничной или гороховой муки добавить по 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия то белки выпадут в осадок, вначале в виде мути медленно оседающей на дно пробирки. Результаты записать в журнал.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОЛАМИНОВ. Ход работы. В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл раствора этанола с массовой долей 70 %, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38 °С на 30 минут, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 минут. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 минут со скоростью 3000об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор проламинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании проламинов в исследуемых объектах. Если к 2 мл раствора проламинов пшеничной или гороховой муки добавить по 2 мл воды, то белки выпадут в осадок, раствор мутнеет. Результаты записать в табл.

Таблица Содержание простых белков в пшенице и горохе

Объекты исследования	Простые белки		
	Альбумины	Глобулины	Проламины
Мука пшеничная			
Горох			

2.5 Лабораторная работа №5 (4 часа).

Тема: «Структурная организация нуклеиновых кислот. Репликация и репарация.»

2.5.1 Цель работы: изучить процессы репликации и репарации

2.5.2 Задачи работы:

1. Изучить биосинтез и катаболизм пуриновых рибонуклеотидов.
2. Определить конечный продукт обмена нуклеопротеидов – мочевую кислоту.
3. Привить навыки работы с химической посудой.
4. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
5. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
6. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

фарфоровая чашка, спиртовка, спички, порошок мочевой кислоты, концентрированная азотная кислота, аммиак, гидроксид натрия, 3%-ный раствор перекиси водорода, сыворотка крови, этиловый спирт, 5 г сульфаниловой кислоты, дистиллированная вода, концентрированная соляная кислота, 0,5% раствор нитрата натрия, концентрированный раствор хлорида бария, 25%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, желчь, концентрированная серная кислота, серный эфир

2.5.4 Описание (ход) работы:

Опыт . Обнаружение мочевой кислоты

Ход работы:

В фарфоровую чашку вносят небольшое количество (с булавочную головку) порошка мочево́й кислоты, прибавляют 1-2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно, нагревая не выше 70⁰С, выпаривают досуха, сдувая образующиеся пары низших окислов азота. Образуется коричнево-красный осадок. После охлаждения с одного края чашки добавляют 1 каплю аммиака, при этом развивается пурпурно-красное окрашивание, а с другого края добавляют 1 каплю гидроксида натрия или калия – появляется фиолетовое окрашивание.

2.6 Лабораторная работа №6 (6 часа).

Тема: «Транскрипция. Биосинтез белков (трансляция). Ингибиторы матричного биосинтеза.»

2.6.1 Цель работы: изучить физико-химические свойства белка и методы их разделения

2.6.2 Задачи работы:

1. Провести разделение белка методом диализа
2. Привить навыки работы химической посудой, реагентами
3. Привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

20 капель разведенного яичного белка в 5 % растворе NaCl (белок одного яйца разводят в 300 мл 5% раствора NaCl) и перемешивают. Края целлофана зажимают между двумя стеклянными палочками, скрепленными между собой резиновыми кольцами.

2.6.4 Описание (ход) работы:

Мешочек с солевым раствором белка помещают в стакан с дистиллированной водой так, чтобы часть мешочка с раствором белка была полностью погружена в воду. Сразу же, на просвет можно заметить струйки солевого раствора, опускающиеся из мешочка на дно стакана, что обусловлено изменением рефракции воды.

Анализ результатов диализа. Через 60 мин после начала диализа проводят качественные пробы на белок (биуретовую реакцию) и на NaCl (с AgNO₃) в соответствии с таблицей.

<i>Реактивы</i>	<i>Проба на белок в диализате</i>	<i>Проба на белок в диализируемой жидкости</i>	<i>Проба на ионы Cl⁻ в диализате</i>
Диализат	10 капель	—	10 капель
Диализируемый раствор	—	10 капель	—
10 % NaOH	5 капель	5 капель	—
1 % CuSO ₄	1 капля	1 капля	—
10 % HNO ₃	—	—	1 капля
1 % AgNO ₃	—	—	1 капля
Наблюдения			

2.7 Лабораторная работа №7 (6 часа).

Тема: «Биологическое окисление. Окислительное форфорилирование АДФ. ЦПЭ.»

2.7.1 Цель работы: изучить особенность ферментов как белковых катализаторов

2.7.2 Задачи работы:

1. Ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере сахарозы, амилазы, холинэстеразы.
2. Исследовать влияние реакции среды, концентрации фермента и субстрата, температуры на ферментативные реакции.
3. Изучить процесс ингибирования холинэстеразы фосфорорганическими соединениями.
4. Закрепить представления об особенностях строения молекул ферментов.
5. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
6. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
7. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, держатель для пробирок, 1% раствора крахмала, вода, слюна, термостат или водяная баня, 1% раствор йодида калия, 5 % раствор сульфата меди, 10% раствор гидроксида натрия, образцы молока и кисломолочных продуктов, 1%-ный раствор H_2O_2 , 1%-ный раствор йодисто-калиевого крахмала.

2.7.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Гидролиз крахмала амилазой слюны

Ход работы:

В две пробирки наливают по 10 капель 1% раствора крахмала. В одну из них (пробирка №1) вносят 4 капли воды (контроль), а во вторую (№2) – 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и ставят термостат или водяную баню на 15 мин при 37 С. Затем из пробирки №1 отбирают по 4 капли исследуемого вещества, которые вносят в две различные пробирки.

а) **реакция на крахмал.** В одну из пробирок добавляет 1 каплю 1% раствора йодида калия (реакция с йодом). В присутствии крахмала появляется синее окрашивание.

б) **Реакция Троммера.** В другую – 3 капли 5 % раствора сульфата меди и 5 капель 10% раствора гидроксида натрия и осторожно нагревают до кипения (реакция Троммера). Появление красного окрашивания указывает на присутствие в растворе конечных продуктов гидролиза крахмала – глюкозы и мальтозы. Аналогичную процедуру сделать с содержимым пробирки №2. Результаты опыта записать в виде таблицы.

Таблица. Гидролиз крахмала амилазой слюны

№ Пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция	
			с йодом	Троммера
1	Крахмал	Вода (контроль)		
2	Крахмал	Амилаза		

Результат должен показать, что в присутствии воды гидролиза крахмала не происходит, и реакция с йодом должна быть положительной, а реакция Троммера – отрицательной, тогда как в присутствии амилазы слюны результаты должны быть противоположными, так как произошел гидролиз крахмала.

Опыт 2. Реакция на пероксидазу с йодисто-калиевым крахмалом

Ход работы:

В 3 пробирки вносят образцы молока и кисломолочных продуктов по 2-3 мл., добавляют 3-5 мл. воды, 5 капель 1% раствора H_2O_2 и 5 капель 1% раствора йодисто-

калиевого крахмала. Появление синего окрашивания указывает на то, что кисломолочный продукт получен из не пастеризованного молока (сливок)

Появление окраски более чем через 2 мин не служит показателем наличия пероксидазы.

2.8. Лабораторная работа №8 (6 часа).

Тема: «Метаболизм глюкозы и гликогена в клетках»

2.8.1 Цель работы: изучить механизмы трансмембранного переноса глюкозы

2.8.2 Задачи работы:

1. Ознакомить студентов с методиками проведения ориентировочного экспресс-метода определения сахаров.
2. Изучить процесс переноса веществ через мембраны.
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
4. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

ступка, предметное стекло, спиртовка, спички, сульфат меди, безводный карбонат натрия, моча.

2.8.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Ориентировочный экспресс-метод определения сахаров

Ход работы:

В ступке растирают в тонкий порошок 1 г сульфата меди с 10 г безводного карбоната натрия Na_2CO_3 . На предметное стекло насыпают немного порошка и наносят несколько капель мочи. Подогревают до кипения. Синий цвет означает отсутствие сахара, желто-зеленый цвет свидетельствует о наличии сахара в моче в пределах 0,5% (5 г\л), зеленый – 1% (10 г\л), красно-коричневый – до 2% (20 г\л) и интенсивно-красный цвет – свыше 2% (20 г\л).

1. Изучить теоретические основы процесса гликолиза, разобрать стадии и виды гликолиза, регуляцию данного процесса;

2. Закрепить полученные знания и навыки на конкретных примерах исследования активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке и плазме крови кинетическим методом (с набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум») и количественного определения фосфотриоз в мышечной ткани

3. Привить навыки работы с химическим оборудованием и химической посудой; привить навыки работы с литературой и умение формулировать выводы.

Опыт 1. Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке и плазме крови кинетическим методом (с набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум»)

Принцип метода:

$\text{Пируват} + \text{НАДН} + \text{H}^+ \xleftarrow{\text{ЛДГ}} \text{Лактат} + \text{НАД}^+$

Скорость окисления НАДН в НАД^+ пропорциональна активности ЛДГ.

Исследуемый материал:

Свежая сыворотка или (ЭДТА-/гепарин-) плазма крови без следов гемолиза.

Активность фермента в сыворотке снижается после 3 дней хранения при 2-8°C - на 8%.

Состав набора:

Реагент № 1. Буфер (55 мл)

Реагент № 2. Лиофилизат (10 флаконов)

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Реагенты № 1 и № 2 готовы к использованию. Срок хранения - 12 месяцев при 2-8 °С. Срок годности, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Рабочий реагент: растворить содержимое 1 флакона № 2 в 5 мл буфера (из флакона № 1). Рабочий реагент готов к использованию не ранее, чем через 10 мин при температуре 18-25 °С. Тщательно закрывать флаконы после каждого использования реактивов. Реагент стабилен 24 часа при температуре хранения 2-8°С или 3 часа при 18-25°С

Процедура анализа:

Спектрофотометр - 340 нм.

Hg 334 или 365 нм

Фотометрирование против воздуха

Соотношение рабочий реагент / сыворотка: при 25°С / 30°С - 50:1, при 37°С - 100:1.

Ввести анализируемый материал в рабочий реагент, перемешать и через 1 минуту начать считывать изменения экстинкции с интервалом в 1 минуту в течение 3 минут. Вычислить среднее изменение экстинкции за 1 минуту ($\Delta E/\text{мин}$).

Расчет:

25°С / 30°С	37°С
$ME/\text{л} = 15000 \times \Delta E_{365\text{нм}} / \text{мин}$	$ME/\text{л} = 29705 \times \Delta E_{365\text{нм}} / \text{мин}$
$ME/\text{л} = 8095 \times \Delta E_{340\text{нм}} / \text{мин}$	$ME/\text{л} = 16030 \times \Delta E_{340\text{нм}} / \text{мин}$
$ME/\text{л} = 8250 \times \Delta E_{334\text{нм}} / \text{мин}$	$ME/\text{л} = 16345 \times \Delta E_{334\text{нм}} / \text{мин}$
$1 ME/\text{л} = 16,67 \text{ нмоль}/(\text{с} \cdot \text{л})$	

Если активность ЛДГ в сыворотке превышает 1200 ME/л, развести исследуемый образец 0,9% раствором NaCl в 10 раз, повторить анализ, а результат умножить на 10

Нормальные величины в сыворотке:

25°С	30°С	37°С
120 - 240 ME/л	160 - 320 ME/л	225 - 450 ME/л

Опыт 2. Количественное определение фосфотриоз в мышечной ткани

Ход работы:

1. 0,5 г измельченных мышц помещают в пробирку с 5 мл холодного раствора ТХУ и экстрагируют на льду в течение 10 мин, интенсивно помешивая палочкой. Затем к смеси приливают 5 мл дистиллированной воды и фильтруют через бумажный фильтр.

2. В опытную пробирку (мерный цилиндр на 10 мл) помещают 1 мл безбелкового фильтра и добавляют 1 мл раствора NaOH. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют стоять на 20 мин, затем в пробирку приливают 2 мл раствора HCl для нейтрализации щелочи и жидкость перемешивают.

В контрольную пробирку наливают 1 мл раствора NaOH и 1 мл раствора HCl, смесь перемешивают и только после этого добавляют 1 мл безбелкового фильтра.

Содержимое перемешивают еще раз.

3. В опытную и контрольную пробирки наливают по 0,5 мл раствора $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ и по 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты. Общий объем смеси в обеих пробирках доводят до 10 мл дистиллированной водой. Пробу оставляют стоять при комнатной температуре 10 мин, после чего колориметрируют на ФЭКе в кюветах с толщиной слоя 1 см, с красным светофильтром (длина волны 670 нм). Опытную пробу колориметрируют против контрольной пробы и по калибровочной кривой рассчитывают содержание фосфора в пробе.

2.9. Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: «Строение основных липидов организма. Переваривание липидов.»

2.9.1 Цель работы: изучить строение и функции основных липидов организма животного

2.9.2 Задачи работы:

1. Ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на липиды.
2. Закрепить представления о структурах липидов.
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами; ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
4. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, бюретка, спиртовка, спички, чаша для выпаривания, фильтровальная бумага, чашка Петри, стеклянная палочка, фарфоровая чашечка, жир (свиной, говяжий и т.п.), вода, этанол, толуол, петролейный эфир, ацетон, водяная баня, растительное масло, раствор щелочи (NaOH разб.), соляная кислота, цельное молоко, 10%-ный раствор Na_2CO_3 , диэтиловый эфир, безводный KHSO_4 , аммиачный раствор нитрата серебра, фуксинсернистая кислота, бромная вода, кусочек сала, спирт, 0,2н спиртового раствора йода, 0,1н раствор тиосульфата натрия, раствор крахмала, сливочное масло, 0,1н раствора KOH, касторовое масло, 35%-ный раствор гидроксида натрия, дистиллированная вода, фенолфталеин, раствор соляной кислоты, 5%-ная эмульсия сухих сливок, 5%-ный раствор панкреатина, 1%-ный раствор карбоната натрия, желчь, 20%-ный раствор сахарозы, концентрированная серная кислота, суспензия яичного желтка, панкреатин, молибденовый реактив, белок.

2.9.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Растворимость жиров и масел

Ход работы:

а) в 5 пробирок поместите по небольшому кусочку твердого жира (свиного, говяжьего и т.п.) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если жир не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости жира на холоде и при нагревании.

б) в 5 пробирок поместите по 0,5 мл растительного масла (подсолнечного, оливкового, кукурузного и т.п.) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если масло не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости растительного масла на холоде и при нагревании.

Опыт 2. Гидролиз жиров и масел

Ход работы:

а) В 2 пробирки поместите по небольшому кусочку жира и прилейте в 1 пробирку 1-2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1-2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5-10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе жиров на холоду и при нагревании.

б) в 2 пробирки поместите по 0,5 мл растительного масла и прилейте в 1 пробирку 1-2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1-2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5-10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе растительного масла на холоде и при нагревании.

Опыт 3. Выделение жира из молока

Ход работы:

К 6 мл цельного молока прибавляют 2 мл 10 %-ного раствора Na_2CO_3 , хорошо перемешивают и взбалтывают с 5 мл диэтилового эфира. Эфирный слой помещают в чашечку для выпаривания на водяную баню (под тягой). После испарения эфира остается сливочное масло – молочный жир.

Опыт 4. Обнаружение глицерина в жирах (акролеиновая проба)**Ход работы:**

В пробирку вносят 2-3 капли масла (жира), 0,1-0,2 г безводного KHSO_4 и нагревают на спиртовке (под тягой) до появления белых густых паров. В пары вносят фильтровальную бумажку, смоченную аммиачным раствором нитрата серебра или раствором фуксинсернистой кислоты.

Аналитический эффект: Бумажка с раствором солей серебра темнеет, а с раствором фуксинсернистой кислоты становится ярко-розовой.

Акролеиновая проба проводится для обнаружения в липидах глицерина. При нагревании в присутствии водоотнимающих средств (KHSO_4 , MgSO_4 , борная кислота) из глицерина образуется непредельный альдегид – акролеин (пропеналь).

Опыт 5. Определение ненасыщенности кислот в составе жира**Ход работы:**

В пробирки поместите образцы жиров: 2–3 капли растительного масла, 2-3 капли рыбьего жира, 2-3 капли топленого жира (масла), кусочек животного жира (свиного, бараньего) и добавьте по 8 – 10 капель бромной воды. Пробирку встряхните.

Аналитический эффект: Обесцвечивание бромной воды

Опыт 6. Определение йодного числа**Ход работы:**

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают 3-4 капли растительного масла, в другую – кусочек сала.

Колбы повторно взвешивают на аналитических весах. По разности весов рассчитывают массу навески масла (жира). В каждую колбу добавляют по 25 мл спирта (при плохой растворимости слегка подогревают на водяной бане). Затем в колбы вносят по 12,5 мл 0,2н спиртового раствора йода (из бюретки), 100 мл воды и перемешивают 5 мин. Содержимое колб титруют 0,1н раствора тиосульфата натрия до появления слабо желтого окрашивания.

Для более точного определения в колбу приливают 1 мл раствора крахмала и титрование заканчивают до исчезновения синего окрашивания.

Опыт повторяют – контроль, но без масла (жира).

Расчет йодного числа проводят по формуле:

$$\text{И.ч.} = (V_2 - V_1) \times 0,0127 \times 100 / m,$$

где V_2 – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контроля; V_1 – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование пробы масла; 0,0127 – титр тиосульфата по йоду; m – навеска масла (г)

Сравните йодное число растительного масла и сала. Объясните разницу.

Опыт 7. Определение кислотного числа**Ход работы:**

В первую предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают примерно 2 г. свежего сливочного масла, во вторую - примерно 2 г. прогорклого сливочного масла. Колбы повторно взвешивают на аналитических весах. По разности рассчитывают массу навески масла (жира) \approx 2-3 г. В каждую колбочку добавляют по 10-15 мл смеси спирта с эфиром (1:1), 1-2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н раствор КОН до появления слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5-1 мин.

Кислотное число рассчитывают по формуле:

$$\text{К.ч.} = V T / m,$$

где К.ч. – кислотное число; V – объем (мл) спиртового раствора КОН, пошедшего на титрование (мл); Т – титр 0,1 н раствора КОН; m – масса навески масла (жира), г.

Сравните кислотное число свежего и прогорклого масла.

Опыт 8. Омыление жиров

Ход работы:

В фарфоровую чашечку поместите 0,5 мл касторового масла (жира) и 4 капли 35 %-ного раствора гидроксида натрия. Тщательно размешайте смесь стеклянной палочкой до получения однородной эмульсии и поставьте на песчаную баню. Продолжайте тщательно размешивать смесь до получения однородной прозрачной слегка желтоватой жидкости. Затем добавьте 2 мл дистиллированной воды и вновь нагрейте, тщательно перемешивая до полного удаления воды. В результате получается кусочек твердого белого мыла.

Опыт 9. Определение числа омыления

Ход работы:

В 2 колбочки помещают: 1-0,5 г жира (навеска на аналитических весах), 2-0,5 мл воды. Затем в обе колбочки добавляют по 15 мл 0,5н спиртового раствора КОН. Колбочки закрывают пробками, соединенными с обратными холодильниками, и кипятят на водяной бане 30-40 минут.

После охлаждения в колбочки прибавляют по 15-20 мл воды, 3–4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,5н раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания.

Расчет числа омыления проводят по формуле:

$$\text{Ч.о.} = (V_2 - V_1) \times 28 / m,$$

где Ч.о. – число омыления; V₂ – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование контроля; V₁ – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование пробы масла; m – навеска масла (г); 28 – масса КОН в 1 мл спиртового раствора.

Опыт 10. Определение перекисного числа

Ход определения:

На аналитических весах взвешивают около 1 г жира и помещают его в коническую колбу 10-200 мл. В другую колбу (контроль) наливают 2-3 мл. воды. В обе колбы наливают по 10 мл. хлороформа и растворяют жир. Затем в колбы добавляют по 20 мл ледяной уксусной кислоты и по 1 мл. раствора йодистого калия. Смесь тщательно перемешивают и оставляют на 3 минуты. Затем проводят титрование выделившегося йода 0,01 н раствором тиосульфата натрия (Na₂S₂O₃). Титруют до исчезновения желтой окраски, после чего в колбы приливают 1 мл 1% раствора крахмала и титруют до исчезновения голубой окраски.

Вычисление результатов проводят по формуле:

$$X = (a - b) \cdot T \cdot 0,001269 \cdot 100 / H,$$

где X – перекисное число; а- количество 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованное на титрование йода, выделившегося в результате реакции жира с йодистым калием (мл); б – количество 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованное в контрольном определении (мл); Т- поправка к титру раствора тиосульфата натрия; 0,00127 — количество граммов йода, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата натрия, Н – навеска жира. .

Степень окисления порчи жира в зависимости от перекисного числа определяется по таблице 18:

Таблица 18. Оценка состояния жира в зависимости от величины перекисного числа

Перекисное число % йода	Степень окислительной порчи
-------------------------	-----------------------------

до 0,03	свежий
От 0,03 до 0,06	свежий, не подлежит хранению
От 0,06 до 0,10	сомнительной свежести
Более 0,10	испорченный

Опыт 11. Открытие липазы

Ход работы:

В две пробирки наливают по 10 капель 5% эмульсии сухих сливок. В пробирку №1 добавляют 5 капель 5% раствора панкреатина, содержащего липазу, а в пробирку №2 – такое же количество воды. В обе пробирки вносят по 1 капле 1% раствора фенолфталеина и добавляют по каплям 1% раствор карбоната натрия до появления слабо-розовой окраски (нельзя добавлять избыток карбоната натрия). Пробирки помещают на 30 мин в термостат при 37° С, по окончании инкубации замечают изменение окраски.

Опыт 12. Качественная реакция на желчные кислоты

Ход работы:

На сухую чашку Петри (под которую подложить лист белой бумаги) нанести 2 капли желчи, 2 капли 20%-ного раствора сахарозы и тщательно перемешать. Стеклопалочкой. Затем прилить 7 капель концентрированной серной кислоты и перемешать той же палочкой. Через 2-3 минуты наблюдается красное окрашивание, которое при стоянии переходит в красно-фиолетовую.

Опыт 13. Действие фосфолипаз поджелудочной железы

Ход работы:

В две пробирки наливают по 5 капель суспензии яичного желтка. В 1-ю пробирку добавляют 2 капли панкреатина, а во вторую – 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 спиртовки и охлаждают водой под краном.

Опыт 14. Эмульгирование жира

Ход работы:

В 5 пробирок помещают по 2 капли растительного масла, по 1 мл дистиллированной воды и по 5 капель соответственно в каждую пробирку, начиная с первой: желчи, гидроксида натрия, карбоната натрия, белка и воды. Пробирки встряхивают и наблюдают образование устойчивых эмульсий во всех пробирках, кроме 5-й, где происходит расслаивание на жир и воду.

Опыт 15. Проба на понижение поверхностного натяжения

Ход работы:

Берут 3 пробирки. В 1-ю вносят 2 мл желчи, в разведении 1:5, во 2-ю – 0,5 мл разведенной желчи и 1,5 мл воды, а в 3-ю – 2 мл дистиллированной воды. Затем все пробирки ставят на 5 минут в холодную воду и всыпают на конце шпателя серный цвет. Замечают результат: в 1-ой пробирке вся сера опустилась на дно, во 2-ой на дне обнаруживается часть серы, а в 3-ей вся сера опустилась на дно. Следовательно, желчные кислоты снижают поверхностное натяжение.

2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Тема: «Обмен ТАГ, кетоновых тел, эйкозаноидов и холестерина.»

2.10.1 Цель работы: изучить процесс биосинтеза высших жирных кислот.

2.10.2 Задачи работы:

1. Изучить процесс биосинтеза жирных кислот, сформировать понятие о кетоновых телах и их функции.

2. Закрепить полученные знания и навыки на конкретном примере определения кетонных тел – ацетона, ацетоуксусной кислоты.
3. Привить навыки работы с химической посудой.
4. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
5. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
6. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, 0,5%-ный раствор ацетона, 10%-ный раствор гидроксида натрия, йодид калия (раствор Люголя), моча, 0,5%-ный раствор ацетоуксусной кислоты, ледяной уксус, 10%-ный раствор нитропруссид натрия, концентрированный раствор аммиака, 10%-ный раствор хлорного железа.

2.10.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Реакция на ацетон с образованием йодоформа (проба Либена)

Ход работы:

В пробирку вносят 10 капель 0,5%-ного раствора ацетона, 10 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия, и несколько капель йода в йодиде калия (раствор Люголя) и наблюдают образование желтого осадка йодоформа. Аналогичную реакцию проводят с мочой.

Опыт 2. Реакция на ацетон с нитропруссидом натрия (проба Легала)

Ход работы:

В одну пробирку наливают 10 капель 0,5%-ного раствора ацетона, а в другую – такое же количество 0,5%-ного раствора ацетоуксусной кислоты. Затем в обе пробирки прибавляют по 5 капель ледяной уксусной кислоты и по 3 капли 10%-ного раствора нитропруссид натрия. Встряхивают, после чего осторожно наклоняют по 0,5 мл концентрированного раствора аммиака. На границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо. Аналогичную реакцию проводят с мочой.

Опыт 3. Реакция на ацетоуксусную кислоту (Проба Герхарда)

Ход работы:

Приливают в пробирку 10 капель 0,5%-ного раствора ацетоуксусной кислоты и 2 капли 10%-ного раствора хлорного железа. Возникает вишнево-красное окрашивание. При выполнении аналогичной реакции с мочой надо учесть, что после добавления первых двух капель раствора хлорного железа образуется осадок фосфата железа. Поэтому для получения характерного окрашивания необходимо добавить еще 1-2 капли раствора нитропруссид натрия.

2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: «Источники и пути использования аминокислот в клетках. Биологическая ценность белков.»

2.11.1 Цель работы: изучить процесс переваривания белков

2.11.2 Задачи работы:

1. Провести переваривание белка пепсином
2. Изучить процесс переваривание белка трипсином
3. Привить навыки работы химической посудой, реагентами.
4. Закрепить полученные знания по белковому питанию.
5. Ознакомить с реакциями обнаружения аммонийных солей
6. Привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы.

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, фильтровальная бумага, термостат, 0,2%-ная соляная кислота, желудочный сок или раствор пепсина в соляной кислоте, лакмус сода, кусочек

фибрина, водяная баня, раствор трипсина или панкреатина (щелочная среда), казеин, хлороформ, уксусная кислота, бромная вода, концентрированная серная кислота, раствор сернистой ртути, дистиллированная вода, моча, насыщенный раствор $\text{Ca}(\text{OH})_2$, лакмусовая бумага,

2.11.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Переваривание белка пепсином

Ход работы:

1. В одну пробирку наливают 3-4 мл 0,2% соляной кислоты; во вторую пробирку - 3-4 мл желудочного сока или раствора пепсина в соляной кислоте; в третью пробирку - 3-4 мл желудочного сока или раствора пепсина в соляной кислоте, предварительно нейтрализованного на лакмус содой; в четвертую пробирку - 3-4 мл предварительно прокипяченного и охлажденного желудочного сока или прокипяченного и охлажденного раствора пепсина и соляной кислоте.

2. Помещают в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины и все пробирки ставят одновременно, а водяную баню при 37-40°C.

3. Через полчаса или час вынимают пробирки из бани и наблюдают результаты исследования. В первой пробирке должно произойти лишь набухание фибрина под действием кислоты; во второй переваривание (растворение) фибрина; в третьей – фибрин остается без изменения, так как пепсин в нейтральной среде не активен; в четвертой – происходит набухание фибрина под действием соляной кислоты, но переваривание не имеет места, так как пепсин разрушен кипячением.

Опыт 2. Переваривание белка трипсином

а) Переваривание фибрина

Ход работы:

1. В одну пробирку наливают 3-4 мл раствора трипсина или панкреатина (щелочная среда); во вторую пробирку - 3-4 мл раствора трипсина или панкреатина, предварительно нейтрализованного соляной кислотой на лакмус; в третью пробирку - 3-4 мл подкисленного раствора трипсина или панкреатина.

2. Помещают в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины и одновременно ставят все пробирки в водяную баню при 37-40°C.

3. Через полчаса или час вынимают пробирки из бани и наблюдают результаты исследования. В первой пробирке должно иметь место переваривание (растворение) фибрина; во второй пробирке может быть лишь очень небольшое переваривание, так как в нейтральной среде трипсин слабо активен; в третьей пробирке наблюдается только набухание фибрина.

4. Отфильтровывают часть жидкости из каждой пробирки и проделывают с фильтратом биуретовую реакцию. Положительная реакция указывает на присутствие в фильтрате продуктов переваривания белка.

б) Переваривание казеина

Ход работы:

1. В колбочку наливают 25-30 мл вытяжки трипсина или раствора панкреатита и помещают туда 3-5 г казеина

2. Перемешивают содержимое, добавляют около 5 мл хлороформа (для предотвращения гниения), закрывают колбочку ватой и ставят в термостат при 37-40°C на 4-5 суток (до следующего занятия).

3. На следующем занятии нагревают колбочку до кипения и добавляют по каплям уксусную кислоту до слабокислой реакции. При этом осаждаются не переваренные белки.

4. Охлаждают смесь, погрузив колбочку в холодную воду, и фильтруют для освобождения от белков.

5. Отливают порцию фильтрата (3-4 мл) в пробирку и добавляют по каплям бромную воду. Появление розово-фиолетового окрашивания, исчезающего от избытка реактива, указывает на присутствие свободного триптофана.

6. К другой порции фильтрата (около 2 мл) добавляют 8-10 капель концентрированной серной кислоты и 5-6 мл раствора сернокислой ртути в серной кислоте, перемешивают содержимое и оставляют стоять на 10-15 минут.
7. Образовавшийся желтый осадок ртутного соединения триптофана отфильтровывают, сохраняя фильтрат, и промывают на фильтре 4-5 маленькими порциями (по 1-2 мл) дистиллированной воды.
8. Небольшим количеством (около 0,5 мл) воды переносят осадок в пробирку. Делят осадок и фильтрат на три части и проделывают как с осадком, так и с фильтратом реакции Адамкевича, Милона и ксантопротеиновую (см. Цветные реакции на белки).
9. Отмечают положительные реакции Адамкевича в ксантопротеиновую и отрицательную реакцию Милона с осадком, что указывает на присутствие триптофана и отсутствие тирозина.

Положительная ксантопротеиновая и милонова реакции и отрицательная реакция Адамкевича с фильтратом указывают на наличие в фильтрате тирозина и отсутствие триптофана.

Окрашивание при проведении ксантопротеиновой реакции (в особенности с осадком) появляется медленно (обычно через 15-20 минут).

Опыт 3. Обнаружение аммонийных солей

Ход работы:

В пробирку наливают 2-3 мл мочи и 1-2 мл насыщенного раствора $\text{Ca}(\text{OH})_2$, перемешивают и подносят к отверстию пробирки, не прикасаясь к её стенкам, лакмусовую бумагу, смоченную водой. Через некоторое время бумага приобретает синий цвет, за счет поглощения выделяющегося аммиака.

2.12 Лабораторная работа №12 (4 часа).

Тема: «Переваривание белков. Катаболизм аминокислот. Обмен аммиака.»

2.12.1 Цель работы: -изучить процессы трансаминирования и дезаминирования аминокислот;

- изучить обмен аммиака в организме

2.12.2 Задачи работы:

1. Использовать знания о составе белков пищи для понимания основ рационального питания.
2. Применять знания о переваривании белков в норме для объяснения патогенеза заболеваний, возникающих при нарушениях этого процесса.
3. Интерпретировать результаты анализа желудочного сока при заболеваниях желудочно-кишечного тракта.
4. Использовать данные определения активности аланин- и аспаратаминотрансфераз в сыворотке крови для диагностики заболеваний сердца и печени.

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, проектор

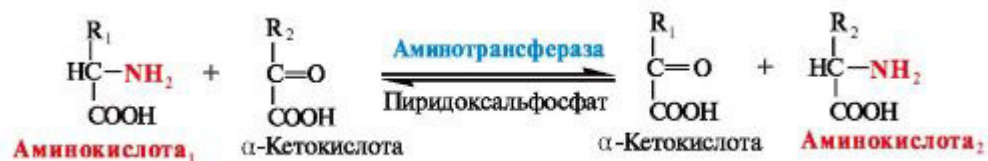
2.12.4 Описание (ход) работы:

Промежуточный обмен аминокислот чаще всего начинается с отщепления **α -аминогруппы** от аминокислоты. Это происходит с помощью двух типов реакций:

- трансаминирования;
- дезаминирования.

Основным источником аммиака является катаболизм аминокислот в тканях. Небольшая часть аммиака образуется в клетках при распаде азотсодержащих соединений (биогенных аминов, нуклеотидов и др.) (рис.), а также при гниении белков в кишечнике в результате деятельности микрофлоры, откуда он частично всасывается и поступает в воротную вену. Концентрация аммиака в крови воротной вены существенно выше, чем в общем кровотоке.

Трансаминирование - реакция переноса аминогруппы с аминокислоты (донора) на α -кетокислоту (акцептор), в результате чего образуются новая кетокислота и новая аминокислота. Реакция обратима.



Реакция трансаминирования происходит с участием ферментов аминотрансфераз (трансаминаз), которые локализованы в цитозоле и митохондриях клеток практически всех органов. Коферментом этих ферментов является производное витамина В₆ - **пиридоксальфосфат**. Трансаминированию подвергаются все аминокислоты, кроме **лизина, треонина и пролина**.

Аминотрансферазы обладают субстратной специфичностью к разным аминокислотам. В тканях человека обнаружено более 10 различных аминотрансфераз. Наиболее распространенными являются:

- **аспартатаминотрансфераза (АСТ)**, по обратной реакции - глутаматоксалоацетаттрансаминаза;
- **аланинаминотрансфераза (АЛТ)**, по обратной реакции - глутаматпируваттрансаминаза.

Название каждой аминотрансферазы включает названия субстратов:

- донора аминогруппы (аминокислоты);
- акцептора аминогруппы (α -кетокислоты). Например, фермент, катализирующий реакцию

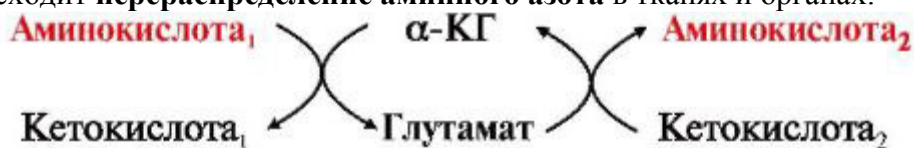


называется глутаматоксалоацетатаминотрансфераза. По субстратам обратной реакции этот фермент называется аспартатаминотрансферазой (АСТ). Название акцептора - α -кетоглутарата - из названия фермента обычно исключается, так как эта кетокислота является основным акцептором аминогрупп в организме.

Основными донорами аминогрупп в реакциях трансаминирования являются **глутамат, аспартат и аланин**.

Реакции трансаминирования играют большую роль в обмене аминокислот.

- Путем трансаминирования из соответствующих α -кетокислот **синтезируются заменимые аминокислоты**, если их в данный момент в ткани недостаточно. Таким образом происходит **перераспределение аминного азота** в тканях и органах.



Трансаминирование - один из начальных этапов **катаболизма аминокислот**. Образующиеся α -кетокислоты могут затем окисляться в цикле трикарбоновых кислот, а некоторые - использоваться для синтеза глюкозы или кетонových тел.

Трансаминирование происходит во многих тканях, но наиболее активно - **в печени**.

В клинике широко используется определение активности некоторых аминотрансфераз в сыворотке крови, особенно часто - АСТ и АЛТ. Эти ферменты являются органоспецифическими, наиболее активны в клетках печени и сердца. В норме их активность в крови мала - 5-40 ЕД/л.

Существуют изоферменты АСТ: цитозольная форма (ц-АСТ) и митохондриальная (м-АСТ). В печени, миокарде и большинстве других органов м-АСТ представляет 80%

массы фермента, но в сыворотке - лишь менее 12% как у здоровых людей, так и у больных. Повышение активности м-АСТ в сыворотке крови имеет место при острых поражениях печени, инфаркте миокарда, сопровождающихся некрозом тканей и разрушением клеточных мембран, при этом повышение активности м-АСТ отражает тяжесть болезни, поражение органа и прогноз.

Определение активности АЛТ и АСТ применяется для диагностики заболеваний миокарда и печени, в том числе при отравлении хлорорганическими соединениями, используемыми на химических производствах (CCl_4 , хлороформ и др.). В этом случае активность ферментов в сыворотке крови увеличивается до 400 ед. и больше.

- Особенно важное значение для диагностики имеет увеличение активности АЛТ при **безжелтушных формах** вирусного гепатита.

- Для определения степени поражения печени и сердца определяют соотношение активностей АСТ-АЛТ в сыворотке крови - **коэффициент де Ритиса**, который в норме составляет $1,33 \pm 0,42$.

- При **гепатитах** активность АЛТ увеличивается в 6-8 раз по сравнению с нормой, а АСТ - в 2-4 раза. Коэффициент де Ритиса уменьшается до -0,6. Однако при **циррозе печени** коэффициент де Ритиса приближается к 1,0 вследствие развивающегося некроза тканей и выхода в кровь митохондриальной фракции АСТ.

- При **инфаркте миокарда** активность АСТ увеличивается в 8-10 раз, а активность АЛТ - в 1,5-2 раза. Коэффициент де Ритиса значительно увеличивается. При **стенокардии, пороках сердца, инфаркте легкого** активность аминотрансфераз в крови не увеличивается, что дает возможность дифференциальной диагностики заболеваний сердца.

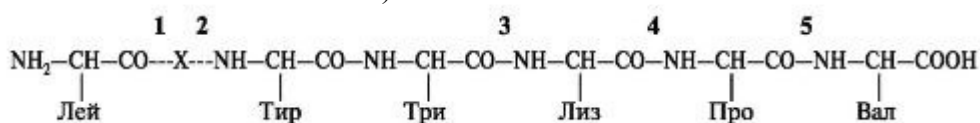
ЗАДАНИЯ ДЛЯ АУДИТОРНОЙ РАБОТЫ

1. Заполните табл., распределив аминокислоты по возможности их синтеза в организме.

Таблица . Классификация аминокислот по возможности синтеза в организме

№	Аминокислота	Формула	Группа по возможности синтеза в организме
1	Аланин		Заменимая
2	...		
...	...		
...			
20			

2. Перепишите в тетрадь пептид, радикалы аминокислот напишите формулами. Укажите, какие связи в данном пептиде будут расщепляться приведенными ниже протеазами (X - любой аминокислотный остаток):



А. Пепсин Б.

Трипсин

В. Химотрипсин

Г. Карбоксипептидаза Д. Аминопептидаза

3. Перенесите в тетрадь рис., замените цифры на названия проферментов (цифры без индекса) и ферментов (цифры с индексом «а»):



Рис. Каскадный механизм активации пептидаз панкреатического сока

4. При острых панкреатитах, а также в результате механического повреждения (травмы) поджелудочной железы в ее клетках происходит активация проферментов. Объясните, в чем заключается опасность преждевременной активации этих ферментов. Для ответа на вопрос:

- напишите, какие ферменты могут активироваться в этих случаях;
- объясните, как может повлиять на клетки железы преждевременная активация;
- назовите лекарственные препараты, применение которых уменьшит разрушительное действие панкреатических пептидаз, укажите механизм их действия.

5. В составе белков, которые человек получал с пищей, содержался избыток глутамата и мало аланина. Однако аланин присутствовал в организме в нормальных количествах. Объясните это, записав формулами реакции трансаминирования между следующими парами аминокислот и α -кетокислот:

- Глу + Пируват -
 - Глу + Оксалоацетат -
 - Асп + α -Кетоглутарат - Укажите:
 - названия продуктов, образующихся в реакциях;
 - полное название ферментов по прямой и обратной реакциям; локализацию их в клетке;
 - название кофермента, участвующего в реакциях; напишите его формулу.
- 6.** Напишите реакции дезаминирования Ала, Глу, Сер, Гис. Укажите ферменты и коферменты. Назовите типы дезаминирования этих аминокислот.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Выберите правильный ответ.

Наибольшее содержание белка отмечено в:

- Мясе
- Рыбе
- Молоке
- Капусте
- Сое

2. Выберите правильные ответы. Соляная кислота в желудке:

- Денатурирует белки
- Оказывает бактерицидное действие
- Обеспечивает всасывание белков
- Создает оптимум pH для действия пепсина
- Активирует липазу

3. Выберите правильные ответы.

Положительный азотистый баланс наблюдается:

- При голодании
- В период роста ребенка
- У взрослого человека при нормальном питании
- В период реабилитации после длительного заболевания
- При старении

4. Установите соответствие. Аминокислота:

- Гис
- Сер
- Цис

Г. Мет

Д. Арг

Характеристика:

1. Заменяемая

2. Условно заменяемая

3. Незаменяемая

5. Выберите правильные ответы.

Пищевая ценность белка зависит от:

А. Присутствия всех заменимых аминокислот Б. Порядка чередования аминокислот

В. Наличия всех незаменимых аминокислот

Г. Возможности расщепления в желудочно-кишечном тракте Д. Присутствия всех 20 аминокислот

6. Выполните «цепное» задание:

а) в расщеплении пептидной связи (-Гли-Ала-) участвует:

А. Химотрипсин Б. Эластаза

В. Карбоксипептидаза А Г. Трипсин

б) активатором данного фермента является:

А. Пепсин Б. Трипсин

В. Энтеропептидаза Г. Химотрипсин

в) этот фермент используют для лечения:

А. Гнойных ран

Б. Нарушения переваривания белков в желудке

В. Некоторых злокачественных образований Г. Вирусного конъюнктивита

7. Установите соответствие.

Протеолитический фермент:

А. Дипептидаза Б. Трипсин

В. Химотрипсин Г. Эластаза

Д. Дипептидаза

Пептидная связь:

1. ...-Арг-Ала-...

2. ...-Тир-Про- ...

3. Глу-Мет

8. Выберите правильные ответы. Аминотрансферазы:

А. Локализованы в цитозоле и митохондриях клеток Б. Взаимодействуют с двумя субстратами

В. Используют АТФ как источник энергии Г. Катализируют необратимую реакцию

Д. Используют пиридоксальфосфат в качестве кофермента

9. Выберите правильные ответы.

Для непрямого дезаминирования необходимы витамины:

А. В₁

Б. В₆

В. РР Г. С

Д. Биотин

10. Установите соответствие. Состояние:

А. Почечнокаменная болезнь Б. Гепатит

В. Инфаркт миокарда Г. Пневмония

Д. Норма **Коэффициент де Ритиса:**

1. 6,0

2. 0,5

3. 1,3

Решите задачи

1. В африканских странах дети получают пищу преимущественно растительного происхождения, содержащую белки в недостаточных количествах. При этом часто наблюдается малокровие, мышечные дистрофии, отставание в росте и развитии, светлый цвет кожи. Объясните появление этих симптомов, для чего:
- а) объясните, какие по составу белки необходимы для полноценного белкового питания;
 - б) дайте определение понятию «азотистый баланс» и укажите, какой азотистый баланс наблюдается при белковом голодании;
 - в) перечислите биологически активные вещества, которые синтезируются из аминокислот в организме;
 - г) назовите, какие пути обмена аминокислот усиливаются и тормозятся при белковом голодании.
2. У больного развился острый панкреатит, при этом стенки протока поджелудочной железы воспалились и отекли, просвет протока уменьшился, наблюдаются застойные явления. Таким больным необходима срочная медицинская помощь. Объясните, чем опасно затруднение оттока сока поджелудочной железы. Для этого:
- а) назовите ферменты, которые синтезируются в поджелудочной железе;
 - б) укажите пути их активации, назовите активаторы проферментов;
 - в) объясните, к каким последствиям приведет их активация в ткани поджелудочной железы.
3. В желудочном соке больного обнаружен высокий уровень лактата. Укажите, какие заболевания возможны в этом случае. Для ответа:
- а) назовите процесс, продуктом которого является лактат, перечислите здоровые и патологические ткани, в которых этот процесс происходит наиболее активно;
 - б) перечислите компоненты и рН желудочного сока в норме;
 - в) перечислите функции соляной кислоты желудочного сока;
 - г) предположите, какие компоненты желудочного сока нужно определить дополнительно, чтобы уточнить диагноз.
4. У больного язвенной болезнью желудка провели операцию с экстирпацией (удалением) большей части желудка. Но послеоперационное обследование показало, что процесс переваривания белков у пациента существенно не изменился. Объясните полученные результаты обследования. Для этого:
- а) назовите пептидазу, которая синтезируется в желудке, назовите механизм ее активации, перечислите активаторы;
 - б) напишите формулу пептида и укажите, какая связь расщепляется в желудке здорового человека;
- Цис-Мет-Арг-Гли-Ала-Фен-Вал-Сер-**
- в) перечислите панкреатические пептидазы и ферменты энтероцитов, назовите, под действием каких ферментов при переваривании данного фрагмента белка появятся пептиды, С-концевыми аминокислотами которых являются Арг и Фен, укажите их проферменты;
 - г) назовите, к какой группе пептидаз относятся данные ферменты.
5. При безжелтушных формах гепатита высокочувствительным тестом является повышение в крови активности фермента γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТ), которая возрастает в 10-15 раз по сравнению с нормой (10-60 МЕ/л). Объясните диагностическое значение этого фермента, для ответа:
- а) назовите основное свойство ферментов, определение активности которых в крови больных используется для диагностики заболеваний;
 - б) назовите систему, в работе которой участвует γ -ГТ, объясните ее роль в организме;
 - в) приведите примеры других ферментов, определение активности которых можно использовать для диагностики патологии печени.
6. Восточная кухня предполагает использование больших количеств глутамата в качестве приправы. Объясните, почему при вегетарианском питании с употреблением

растительной пищи, содержащей мало белков, но много крахмала и при использовании глутамата общее количество аминокислот (Ала, Асп и т.д.) не снижается. Для этого:

- назовите, к какой группе аминокислот по возможности синтеза в организме относятся Глу, Ала, Асп;
- назовите, какая реакция может использоваться для перераспределения азота аминокислот в организме;
- напишите реакции, с помощью которых можно получить Ала, Асп, назовите ферменты, катализирующие реакции, коферменты.

7. Здоровых крыс длительное время содержали на искусственной белковой диете, исключаяющей аминокислоты лейцин, валин и фенилаланин. Как изменится у этих животных азотистый баланс? Ответ поясните. Для этого:

- дайте определение азотистого баланса;
- назовите, к какой группе аминокислот по возможности синтеза в организме относятся Лей, Вал и Фен.

8. У пациента с подозрением на инфаркт миокарда определяли активность аланин- (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) в крови. Активность какой из аминотрансфераз увеличится в большей степени при такой патологии и почему? Назовите другие ферменты, активность которых определяют в крови для подтверждения указанной патологии. При ответе на вопрос:

- напишите реакции, которые катализируют АЛТ и АСТ;
- объясните значение этих реакций в метаболизме аминокислот;
- объясните принципы энзимодиагностики.

Катаболизм аминокислот и образование аммиака происходит во всех тканях организма. Однако концентрация аммиака в крови очень мала, так как он быстро связывается в клетках с образованием нетоксичных продуктов. Содержание аммиака в крови в норме составляет всего 0,4-0,7 мг/л (25-40 мкмоль/л).

Из организма аммиак выводится почками в виде конечных продуктов азотистого обмена:

- мочевины - синтезируется в печени;
- аммонийных солей - образуются в почках.



Рис. Источники аммиака и пути его превращения в разных тканях

ЗАДАНИЯ ДЛЯ АУДИТОРНОЙ РАБОТЫ

- Перечислите основные источники аммиака в организме, укажите концентрацию аммиака в сыворотке крови в норме.
- Запишите формулами основную реакцию обезвреживания аммиака в мышцах и головном мозге. Назовите фермент, укажите условия реакции.
- Часть глутамина кровью транспортируется в почки, где под действием глутаминазы распадается на глутаминовую кислоту и аммиак. Объясните значение этой реакции для организма, для этого:
 - запишите реакцию, катализируемую глутаминазой, назовите ее активатор;

- б) перечислите, в виде каких солей выводится аммиак почками;
в) укажите, какое количество солей аммония выводится почками в норме и как изменится их содержание в моче при ацидозе.

4. Напишите формулами реакцию обезвреживания аммиака, характерную только для печени. Укажите фермент, условия реакции. Какова дальнейшая судьба продукта реакции?

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Выберите правильные ответы. Источником аммиака в организме являются:

- А. Дезаминирование аминокислот Б. Катаболизм нуклеотидов
В. Инактивация биогенных аминов
Г. Процессы гниения белков в кишечнике Д. Распад мочевины

2. Выберите правильные ответы. Конечные продукты азотистого обмена:

- А. Глутамин Б. Карнитин
В. Мочевина Г. Аланин
Д. Аммонийные соли

3. Установите соответствие. Фермент:

- А. Карбамоилфосфатсинтетаза I Б. Глутаминаза
В. Глутаминсинтетаза
Г. Глутаматдегидрогеназа
Д. АЛТ (ГПТ)

Действие фермента:

1. Дезаминирует аланин в печени
2. Обезвреживает аммиак в печени
3. Расщепляет глутамин в почках

ЗАДАНИЯ ДЛЯ АУДИТОРНОЙ РАБОТЫ

1. Объясните, почему при кетонемии резко увеличивается выведение солей аммония (до 10 г/сут вместо 0,5 г/сут в норме). Для этого:

- а) вспомните пути обезвреживания аммиака в разных тканях (мозг, мышцы, печень);
б) назовите, в виде какой аминокислоты происходит перенос аммиака из мышц в почки; напишите реакцию ее синтеза, укажите фермент;
в) напишите реакцию, которая происходит в почках при ацидозе; назовите фермент, который ее катализирует;
г) объясните, какое значение имеет эта реакция для поддержания кислотно-щелочного баланса;
д) напишите формулы солей, в виде которых выводится аммиак при кетонемии.

2. У больного гриппом отмечается головокружение, тошнота, судорожные припадки. Содержание аммиака в крови составляет 1,0 мг/дл. Учитывая действие вируса гриппа на печень, объясните механизмы развития симптомов патологии. Для этого:

- а) напишите, чему равна концентрация аммиака в сыворотке крови в норме;
б) в тетради напишите схему орнитинового цикла, отметьте место ферментного блока при гриппе;
в) перечислите вещества, которые будут накапливаться в крови больного (1 - 2 - 3 - ...);
г) перечислите механизмы токсического действия аммиака;
д) укажите, для каких клеток токсическое действие NH_3 наиболее опасно.

3. Объясните, почему у больного с тяжелой формой вирусного гепатита (поражение до 80% клеток паренхимы печени) концентрация мочевины в сыворотке крови снижена и составила 1,4 ммоль/л, в моче - 16 г/сут. Для ответа:

- а) назовите, в составе какого соединения выводится из организма 90% азота, укажите место его синтеза;
б) напишите схему процесса, конечным продуктом которого является это соединение;
в) назовите вещества, концентрация которых может увеличиться в крови таких больных;
г) объясните, нужно ли ограничивать потребление белков пищи при этом

заболевании.

4. Больной аргининосукцинатурией в возрасте 22 лет вводили кетоаналоги валина, лейцина, изолейцина и фенилаланина на фоне малобелковой диеты в течение 2 недель, что вызвало снижение концентрации аммиака в плазме с 90 до 40 мкг/дл, а выведение аргининосукцината снизилось с 2 до 0,8 г в сутки. Объясните механизм лечебного действия кетоаналогов, написав соответствующие реакции и схемы.

2.13 Лабораторная работа № ЛР-13 (2 часа)

Тема: «Основные системы регуляции метаболизма и межклеточной коммуникации»

2.13.1 Цель работы: изучить основные системы регуляции метаболизма и межклеточной коммуникации

2.13.2 Задачи работы:

1. Метаболизм

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Штатив с пробирками, полоски ацетата целлюлозы, буфер, электрофорез, рамка для поддержания полосок ацетата целлюлозы, капиллярная пипетка, линейка, ванночка с раствором пунцового С, 5%-ный раствор уксусной кислоты, фотоколориметр, элюирующий раствор

2.13.4 Описание (ход) работы:

Роль гормонов в регуляции обмена веществ и функции

Интегрирующими регуляторами, связывающими различные регуляторные механизмы и метаболизм в разных органах, являются гормоны. Они функционируют как химические посредники, переносящие сигналы, возникающие в различных органах и ЦНС. Ответная реакция клетки на действие гормона очень разнообразна и определяется как химическим строением гормона, так и типом клетки, на которую направлено действие гормона.

В крови гормоны присутствуют в очень низкой концентрации. Для того чтобы передавать сигналы в клетки, гормоны должны распознаваться и связываться особыми белками клетки - рецепторами, обладающими высокой специфичностью.

Физиологический эффект гормона определяется разными факторами, например концентрацией гормона (которая определяется скоростью инактивации в результате распада гормонов, протекающего в основном в печени, и скоростью выведения гормонов и его метаболитов из организма), его сродством к белкам-переносчикам (стероидные и тиреоидные гормоны транспортируются по кровеносному руслу в комплексе с белками), количеством и типом рецепторов на поверхности клеток-мишеней.

Синтез и секреция гормонов стимулируются внешними и внутренними сигналами, поступающими в ЦНС.

Эти сигналы по нейронам поступают в гипоталамус, где стимулируют синтез пептидных релизинг-гормонов (от англ. *release* - освобождать) - либеринов и статинов, которые, соответственно, стимулируют или ингибируют синтез и секрецию гормонов передней доли гипофиза. Гормоны передней доли гипофиза, называемые тройными гормонами, стимулируют образование и секрецию гормонов периферических эндокринных желёз

Классификация и номенклатура гормонов.

Все гормоны классифицируют по химическому строению, биологическим функциям и механизму действия.

1. Классификация гормонов по химическому строению

По химическому строению гормоны делят на 3 группы: пептидные (или белковые), стероидные и непептидные производные аминокислот (табл. 1).

Таблица 1. Классификация гормонов по химическому строению

Пептидные гормоны	Стероиды	Производные аминокислот
Адренокортикотропный гормон (кортикотропин, АКТГ)	Альдостерон	Адреналин
Гормон роста (соматотропин, ГР, СТГ)	Кортизол	Норадреналин
Тиреотропный гормон (тиреотропин, ТТГ)	Кальцитриол	Трийодтиронин (Т ₃)
Лактогенный гормон (пролактин, ЛТГ)	Тестостерон	Тироксин (Т ₄)
Лютеинизирующий гормон (лютропин, ЛГ)	Эстрадиол	
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	Прогестерон	
Меланоцитстимулирующий гормон (МСГ)		
Хорионический гонадотропин (ХГ)		
Антидиуретический гормон (вазопрессин, АДГ)		
Окситоцин		
Паратиреоидный гормон (паратгормон, ПТГ)		
Кальцитонин		
Инсулин		
Глюкагон		

2. Классификация гормонов по биологическим функциям

По биологическим функциям гормоны можно разделить на несколько групп (табл. 2). Эта классификация условна, поскольку одни и те же гормоны могут выполнять разные функции. Например, адреналин участвует в регуляции обмена жиров и углеводов и, кроме этого, регулирует частоту сердечных сокращений, АД, сокращение гладких мышц. Кортизол не только стимулирует глюконеогенез, но и вызывает задержку NaCl.

Таблица 2. Классификация гормонов по биологическим функциям

Регулируемые процессы	Гормоны
Обмен углеводов, липидов,	Инсулин, глюкагон, адреналин, кортизол, тироксин,

аминокислот	соматотропин
Водно-солевой обмен	Альдостерон, антидиуретический гормон
Обмен кальция и фосфатов	Паратгормон, кальцитонин, кальцитриол
Репродуктивная функция	Эстрадиол, тестостерон, прогестерон, гонадотропные гормоны
Синтез и секреция гормонов эндокринных желёз	Тропные гормоны гипофиза, либерины и статины гипоталамуса
Изменение метаболизма в клетках, синтезирующих гормон	Эйкозаноиды, гистамин, секретин, гастрин, соматостатин, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), цитокины

2.14. Лабораторная работа №14 (2 часа).

Тема: «Строение, биосинтез и биологическое действие гормонов»

2.14.1 Цель работы: изучить роль гормонов в регуляции метаболизма

2.14.2 Задачи работы:

1. Провести кислотный гидролиз пекарских дрожжей.
2. Изучить некоторые продукты гидролиза дрожжей.
3. Привить навыки работы химической посудой, реагентами.
4. Закрепить полученные знания по строению нуклеиновых кислот.
5. Ознакомить с качественными реакциями, подтверждающими состав продуктов гидролиза.
6. Привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы.

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

таблетки тиреоидина, 10%раствор бикарбоната натрия, 10% раствор серной кислоты, синяя лакмусовая бумага, 1% раствор крахмала, . 2% раствор йодата калия (KJO^3), 10% раствор углекислого натрия, 5 % раствор нитрата натрия, 1% раствор сульфаниловой кислоты, концентрированный раствор аммиака, 1% раствора хлорида железа (II), раствор адреналина.

2.14.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Определение йода в гормонах щитовидной железы

.Гидролиз тиреоидина

В ступку помещают 10 таблеток тиреоидина и тщательно их растирают. Растертую массу пересыпают в колбочку для гидролиза, добавляют 20мл 10% раствора бикарбоната натрия. Колбу с обратным холодильником помещают на асбестовую сетку и содержимое колбы кипятят точно 15 мин и обязательно при умеренном нагревании.

б Обнаружение йода

В пробирку наливают 1 мл охлажденного гидролизата, прибавляют 10% раствора серной кислоты до кислой среды по лакмусовой бумаге, 3 капли 1% раствора и 1мл йодата калия. Выделившийся свободный йод дает синее окрашивание с крахмалом.

Опыт 2. Качественные реакции на адреналин

1.Реакция с хлорным железом

При добавлении к раствору адреналина хлорного железа жидкость окрашивается в зеленый цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа. Реакция характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина.

К 3 каплям раствора адреналина прибавляют 1 каплю 1% раствора хлорного железа. Жидкость приобретает изумрудно-зеленое окрашивание. При добавлении 1 капли концентрированного раствора аммиака окраска переходит в красную, а затем коричневую.

2.Диазореакция

В пробирку помещают 3 капли 1% раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5 % раствора нитрата натрия, 5 капель раствора адреналина и 3 капли 10% раствора карбоната натрия. Жидкость окрашивается в красный цвет.

2.15.Лабораторная работа №15 (2 часа).

Тема: «Функции крови. Белки плазмы крови. Синтез гема и его регуляция.»

2.15.1 Цель работы: изучить белки плазмы крови

2.15.2 Задачи работы:

1. Изучить свойства белковых фракций крови
2. Закрепить полученные знания при электрофоретическом разделении белковых фракций.
3. Привить навыки работы с химической посудой, с литературой и умение формулировать выводы.

2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, полоски ацетата целлюлозы, буфер, электрофорез, рамка для поддержания полосок ацетата целлюлозы, капиллярная пипетка, линейка, ванночка с раствором пунцового С, 5%-ный раствор уксусной кислоты, фотоколориметр, элюирующий раствор

2.15.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Электрофоретическое разделение белковых фракций

Ход работы:

1.Сухие полоски ацетата целлюлозы осторожно положить на поверхность буфера таким образом, чтобы они всасывали жидкость только снизу с помощью капиллярных сил. (Нельзя сразу окунать сухие плёнки в буферный раствор, так как при быстром погружении в их порах может остаться воздух).

2. Затем полоски поместить в рамку, предназначенную для поддержания их в горизонтальном положении во время электрофореза. (Следует следить за тем, чтобы полоски находились в натянутом состоянии и не провисали).

3.При установке рамки убедитесь в том, что концы плёнок соприкасаются с буфером, а камера находится в строго горизонтальном положении (уровень буфера в обоих отсеках должен быть одинаковым).

4.Перед нанесением пробы в течение 5 минут провести префорез при рабочих значениях напряжениях (180-200 В) и силы тока (0,4-0,5мА)

5.Пробы наносить капиллярной пипеткой, проводя ею вдоль линейки. Количество нанесённой сыворотки определяется в первую очередь тем, каким методом планируется оценивать полученную электрофореграмму (фото-колориметрическим или с использованием денситометра). В первом случае требуется несколько большее количество сыворотки с целью получения более интенсивно окрашенных растворов после элюции. Проба должна быть нанесена в виде тонкой полосы, так как именно от этого во многом будет зависеть качество полученной электрофореграммы.

6.Электрофорез проводить при напряжении 180-200 В в течении 20-30 мин. В процессе электрофореза камера должна быть плотно закрыта во избежание явления реофореза, связанного с использованием буфера с поверхности ацетатцеллюлозных плёнок в результате их нагревания под действием электрического тока.

7.После проведения электрофореза плёнки изымаются из камеры и помещаются на 10 мин в ванночку с раствором пунцового С.

8.Отмывку фона произвести 5% раствором уксусной кислоты.

9.Полученную электрофореграмму оценить с помощью фотоколориметрического анализа в кювете с длиной оптического пути 10мм при длине волны 540 нм (зелёный светофильтр), для чего предварительно:

- а) взять 6 пробирок;
- б) в каждую из которых за исключением первой прилить по 2,5 мл элюирующего раствора, в 1 пробирку приливают 5 мл того же раствора;
- в) полученную электрофореграмму разрезать на 5 фракций;
- г) каждую из фракций поместить в соответствующую пробирку с элюирующим раствором: альбуминовую фракцию в 1-ю пробирку, а1-глобулиновую – во 2-ю, а2-глобулиновую – в 3-ю, в-глобулиновую-в 4-ю, у-глобулиновую – в 5-ю;
- д) шестую пробирку используют в качестве раствора сравнения.

10. Произвести расчёт. Оптическую плотность всех пяти фракций складывают, причём оптическую плотность альбуминовой фракции следует предварительно умножить на 2. Полученную сумму принимают за 100%, после чего рассчитывают процентный вклад каждой фракции.

Референтные величины в протеинограмме:

- альбумины – 56-76%,
- а1-глобулины – 2-7%,
- а2 – глобулины – 4-12%,
- у- глобулины – 8-18%.

Диагностическое значение: нарушение процентного соотношения белковых фракций – диспротеинемии – встречаются при острых и хронических заболеваниях различной природы, снижение доли альбумина может быть связано как с нарушением белоксинтетической фракции печени, так и с увеличением синтеза белков, относящихся к глобулинам.

2.16 Лабораторная работа №16 (2 часа).

Тема: « Биохимия мышечной ткани»

2.16.1 Цель работы:изучить строение и свойства мышечной ткани

2.16.2 Задачи работы:

1. Изучить некоторые физические и химические свойства веществ мышечной ткани.
2. Ознакомиться с исследованиями при помощи которых устанавливают свежесть мяса.
3. Закрепить полученные знания и навыки на конкретных примерах исследования определения величины рН, бензидиновую пробу на наличие пероксидазы, определение количества аминокислотного азота, и реакции на аммиак, сероводород и пробу с сульфатом меди.
4. Привить навыки работы химической посудой; привить навыки работы с литературой и умение формулировать выводы.

2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

колба, штатив с пробирками, мясо, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, фенолфталеин, 0,1н раствор КОН, фарш мясо рыбы, 10%-ный раствор ацетата свинца, водяная баня

2.16.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Определение рН

Для определения рН готовят экстракт. Освобождают мясо от жира и соединительной ткани, отвешивают 25 г мяса, измельчают его и помещают в коническую колбу, добавляют туда 100 мл дистиллированной воды и экстрагируют в течение 15 мин, периодически встряхивая через каждые 5 мин. Затем вытяжку фильтруют через бумажный фильтр и фильтрат употребляют для исследования. Если определение рН производится

электрометрическим методом, то используют потенциометр, добавляя небольшое количество хингидрона в фильтрат мясного экстракта.

Определение проводится согласно инструкциям, приложенным к приборам.

Опыт 2. Реакция на пероксидазу:

Для исследования берут 2 мл мясной вытяжки 1:4, добавляют 5 капель раствора бензидина и 3 капли 1 %-ного раствора перекиси водорода. Смесь в пробирке взбалтывают и наблюдают за изменением окраски. В случае положительной реакции вытяжка окрашивается в сине-зеленый цвет в течение 0,5—2 мин; при сомнительной — окрашивание появляется после 2 мин. В вытяжках из мяса, полученного от больных или павших животных, первоначальный цвет не изменяется. Такое мясо необходимо подвергнуть бактериологическому исследованию для установления возбудителя заболевания.

Опыт 3. Определение продуктов первичного распада белков в бульоне

20 г фарша, приготовленного из исследуемой пробы, помещают в коническую колбу емкостью 100 мл, заливают 60 мл воды, тщательно перемешивают, закрывают часовым стеклом, ставят в кипящую водяную баню и доводят до кипения. Горячий бульон фильтруют через плотный слой ваты толщиной не менее 0,5 см в пробирку, помещенную в химический стакан с холодной водой. Если после фильтрации в бульоне видны хлопья белка, то его дополнительно фильтруют через фильтровальную бумагу. В пробирку наливают 2 мл фильтрата и добавляют три капли 5%-ного раствора сульфата меди (II). Пробирку встряхивают 2—3 раза и ставят в штатив. Учет реакции проводят через 5 мин. Мясо и мясные субпродукты считают свежими, если при добавлении раствора сульфата меди (II) бульон остается прозрачным. Мясо и мясные субпродукты относят к категории сомнительной свежести, если при добавлении раствора сульфата меди (II) происходит помутнение бульона, а в бульоне из размороженного мяса — интенсивное помутнение с образованием хлопьев. Мясо и мясные субпродукты считают несвежими, если при добавлении раствора сульфата меди (II) наблюдается образование желеобразного осадка, а в бульоне из размороженного мяса — наличие крупных хлопьев.

Опыт 4. Определение amino-аммиачного азота

Ход работы:

1. Приготовление мясной вытяжки. Для приготовления мясной вытяжки в соотношении 1:4 отвешивают 20 г. мяса, мелко измельчают ножницами и содержимое переносят в колбу, наливают 80 мл. дистиллированной воды. Содержимое колбы встряхивают 3 минуты. Затем фильтруют через бумажный фильтр.

2. Выполнение анализа. В колбу наливают 10 мл. вытяжки. Затем приливают 40 мл. дистиллированной воды и 3 капли фенолфталеина. Далее титруют 0,1 н раствором КОН до слабо-розового окрашивания.

3. Расчет. Расчет содержания amino-аммиачного азота проводят по формуле:

$X = 1,4 * Y$, где

Y – количество мл. 0,1н раствора КОН, пошедшего на титрование.

В доброкачественном мясе содержится 1,26 мг аминно-аммиачного азота. В мясе подозрительной свежести – от 1,27 до 1,68 мг., в несвежем – более 1,68 мг.

Опыт 5. Определение сероводорода с подогреванием пробы

Ход работы:

В широкую пробирку рыхло помещают 5-7 г фарша мяса рыбы. Под пробирку закрепляют полоску фильтровальной бумаги, смоченную 10%-ным щелочным раствором ацетата свинца диаметр должен быть не более 5 мм. Бумажка не должна прикасаться к мясу и стенкам пробирки. Контролем служит пробирка с фильтровальной бумагой, смоченной дистиллированной водой. Пробирки подогревают на водяной бане при температуре 48-52°C в течение 15 минут и после того немедленно проводят анализ реакции: рыба свежая - реакция отсутствует (бумага белая, как в контроле); рыба сомнительной свежести - на бумаге появляется слабо-бурые пятна (следы сероводорода);

рыба несвежая - цвет на бумаге от бурого до тёмно-коричневого.