

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

КАФЕДРА ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ С КУРСОМ
КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

**ПРАКТИЧЕСКИЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ ДЛЯ СТУДЕНТОВ**

Часть первая

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ЗАНЯТИЕ № 1

ТЕМА: ВВЕДЕНИЕ В БИОЛОГИЧЕСКУЮ ХИМИЮ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В РАСТВОРЕ

Цель: Повторить знания по биоорганической химии, необходимые для изучения биологической химии. Получить представление о методах биологической химии. Определить количество белка в сыворотке крови, используя клинические методы.

Биологическая химия – наука, изучающая строение, свойства и превращения молекул, входящих в состав живых организмов. Изучение основано на знаниях основных свойств природных органических веществ, поступающих с пищей, образующихся в процессе метаболизма живого организма и используемых для построения биополимеров. Инструментами биологической химии является набор определенных методов, как специфических, так и заимствованных из смежных специальностей. Основными характеристиками биологических методов исследования являются точность, специфичность, воспроизводимость и чувствительность, а также скорость и простота исполнения. Выбор метода определяется поставленными задачами, так, иногда исследователю подходит простой и легкий в исполнении, хотя и малочувствительный метод.

Почти для любого биохимического исследования необходимо измерение в биологическом материале концентрации белка. В клинической практике и научно-исследовательской медицинской работе проводят измерение концентрации белка в крови, моче, спинномозговой жидкости, слюне и экссудатах. Так, в норме содержание белков в сыворотке крови составляет 65–85 г/л или 6,5–8,5 %. Повышение содержания белков в сыворотке крови называется гиперпротеинемией, а понижение – гипопроteinемией. Причиной развития гипопроteinемии может служить снижение процесса биосинтеза белков в печени, голодание или потери белка организмом. Причиной развития гиперпротеинемии может стать сгущение крови из-за потери жидкости, усиленный синтез иммуноглобулинов при инфекционных заболеваниях, появление патологических белков.

Существует несколько методов количественного определения белка, основанных на физико-химических свойствах белков (рефрактометрический и электрофоретический) и на способности белков образовывать окрашенные продукты с различными реагентами (биуретовый и многие другие). Эти методы отличаются по точности, чувствительности и скорости исполнения.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Инструктаж по технике безопасности.
2. Введение в биологическую химию.
3. Определение понятия - белки. Классификация белков по составу, форме и биологическим функциям, примеры представителей отдельных классов. Белковые базы данных.

4. Белки с гомологичными последовательностями аминокислот. Семейства родственных белков. Базы данных белковых семейств: универсальные и специализированные.
5. Классификация и общая характеристика аминокислот, входящих в состав белков. Пептиды: образование, строение. Пептидные связи: образование, строение, свойства.
6. Общие представления об основных методах, применяемых в биологической химии для выделения индивидуальных белков. Фракционирование белков и их очистка. Электрофоретические методы фракционирования. Электрофорез белков сыворотки крови на бумаге и в полиакриламидном геле.
7. Хроматографическое разделение белков. Виды хроматографии. Использование хроматографии в аминокислотном анализе белков.
8. Методы количественного определения белка в растворе. Принцип методов, техника выполнения, преимущества и недостатки.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Количественное определение общего белка сыворотки крови рефрактометрическим методом.

Принцип метода. Метод основан на изменении коэффициента рефракции (преломления) раствора в зависимости от концентрации растворенного в нем вещества.

Техника выполнения. На промытую дистиллированной водой и насухо протертую марлевой салфеткой призму рефрактометра наносят каплю дистиллированной воды для проверки нулевой точки прибора. Закрыв камеру, добиваются хорошей освещенности поля зрения рефрактометра при помощи зеркала. Пользуясь рычагом прибора, совмещают границу светотени с точкой перекреста двух линий. Снимают отсчет показателя преломления. Для воды он равен 1,333. Удалив воду, на призму наносят каплю исследуемой сыворотки. Определив ее коэффициент преломления, по таблице находят содержание белка в г/л.

Показатель преломления	1,344	1,345	1,346	1,347	1,348	1,349	1,350	1,351
Концентрация белка в г/л	48,9	55,0	61,1	67,7	71,2	77,2	88,2	87,7

Опыт № 2: Количественное определение общего белка сыворотки крови биуретовым методом.

Принцип метода. Метод основан на способности белка давать с раствором CuSO_4 в щелочной среде фиолетовое окрашивание за счет пептидных связей, интенсивность которого пропорциональна концентрации белка (количеству пептидных групп).

Техника выполнения. В пробирки вносят реактивы по следующей схеме:

Компоненты	Контроль, мл	Эталон, мл	Опытная проба, мл
Сыворотка (задача)	–	–	0,05
Стандартный раствор белка (60 г/л)	–	0,05	–
Дистиллированная вода	0,05	–	–
Биуретовый реактив	2,5	2,5	2,5

Содержимое пробирок тщательно перемешивают, избегая образования пены, выдерживают при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 30 минут и определяют оптическую плотность при длине волны 540 нм (500-560 нм, зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против холостой пробы. Окраска стабильна в течение 1 часа. Расчет содержания белка производят по формуле:

$$C = \frac{A_{оп}}{A_{ст}} \times 60,$$

- где С – содержание белка в опытной пробе, г/л;
 $A_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы;
 $A_{ст}$ – оптическая плотность эталона;
 60 – содержание белка в калибровочном растворе,

Опыт № 3 .Электрофорез белков сыворотки крови на бумаге и в полиакриламидном геле (демонстрация).

Электрофорез – это движение заряженных частиц в растворе под влиянием внешнего электрического поля. Существует несколько разновидностей электрофоретического метода разделения белков:

- электрофорез в жидкой среде;
- электрофорез в блоках (крахмальном, агарозном, полиакриламидном);
- электрофорез на бумаге.

Наибольшей разрешающей способностью, под которой понимают число выявленных в анализируемом материале белковых фракций, отличается электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Этот гель пористый, обладает значительной механической прочностью, однороден по составу, химически инертен. ПААГ дает возможность исследовать белковые растворы разных концентраций в небольших объемах и проводить быстрое разделение. Электрофорез в ПААГ сочетает 2 принципа разделения:

по электрофоретической подвижности и на основе эффекта молекулярных сит, т.е. частицы разделяют не только по своим зарядам, но и «просеиваются» через гель в зависимости от размеров молекулы. Электрофорез белков сыворотки крови в ПААГ позволяет выделить в среднем от 10 до 25 фракций, в то время как электрофорез сыворотки крови на бумаге дает только 5 фракций.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Методы, применяемые в биологической химии для выделения белков»

Название метода	Принцип	Краткое описание	Оборудование	Применение в клинике

Избирательное осаждение				
Гель-фильтрация				
Электрофорез				
Ионообменная хроматография				
Аффинная хроматография				

ЗАНЯТИЕ № 2

ТЕМА: СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Цель: Получить современные представления о структуре белков. Использовать знания о физико-химических свойствах белков для осаждения белков из растворов.

Белки – высокомолекулярные соединения (ВМС), большинство из которых способны растворяться в воде. Растворы ВМС обладают двойственностью: по существу это истинные молекулярные растворы, так как частицы ВМС – отдельные молекулы, но по свойствам это коллоидные растворы, так как размеры частиц составляют от 1 до 100 нм, характеризуются низким осмотическим давлением, высокой вязкостью, низкой способностью к диффузии. Белковая молекула имеет два фактора устойчивости: заряд и гидратную оболочку. При потере факторов устойчивости они способны к седиментации и коагуляции. Заряд белка зависит от диссоциации его собственных ионогенных групп (-NH₂ и -COOH), следовательно, на него влияет pH среды. Снятие заряда осуществляется путем подведения pH к изоэлектрической точке. Гидратная оболочка образуется за счет заряда, а также за счет гидрофильных групп аминокислот (гидроксильных, амидных и других), расположенных на поверхности белка. Удаление гидратной оболочки производится водоотнимающими средствами, изменением температуры. Под влиянием некоторых внешних факторов (повышение температуры, изменение pH раствора и т.д.) белки теряют устойчивость, их молекулы образуют агрегаты, происходит коагуляция и выпадение белка из раствора.

КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА ПО ТЕМЕ «АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ»

- Необходимо знание структуры и номенклатуры 20 природных аминокислот.
- Составить пептид и определить его заряд.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Структурная организация белковой молекулы. Четыре уровня структурной организации белка.
2. Первичная структура белка. Методы определения первичной структуры белков. Значение первичной структуры для нормального функционирования белков (на примере наследственных нарушений первичной структуры и функций гемоглобинов А).
3. Вторичная структура белка. Силы, стабилизирующие вторичную структуру. Основные типы вторичной структуры (α -спираль, β -складчатая структура). Препятствия к образованию определенных видов вторичной структуры.

4. Третичная структура белка. Типы химических связей, участвующих в формировании третичной структуры. Взаимосвязь первичной и третичной структуры. Понятие о нативной конформации белка.
5. Образование третичной структуры белка из элементов вторичной структуры, устойчивые комбинации элементов вторичной структуры, супервторичная структура, структурные мотивы. Форма белков как результат третичной структурной организации. Глобулярные и фибриллярные белки. Доменная организация белков. Понятие о доменах.
6. Четвертичная структура белка. Принципиальное отличие четвертичной структуры от низших уровней структурной организации белка. Взаимодействия между субъединицами, стабилизирующие четвертичную структуру. Структурная организация контактов между субъединицами. Гомоолигомеры и гетероолигомеры.
7. Конформационная лабильность белков. Денатурация и ренатурация. Обратимая и необратимая денатурация. Признаки денатурации. Денатурирующие факторы. Защита от денатурации специализированными белками теплового шока (шаперонами). Применение денатурирующих агентов в биологических исследованиях и медицине.
8. Физико-химические свойства белков. Молекулярная масса, размеры и форма, растворимость, ионизация и гидратация. Зависимость физико-химических свойств от первичной и пространственной структуры белка. Использование различий в физико-химических свойствах белков в методах их выделения и исследования.
9. Коллоидные свойства растворов белков. Факторы устойчивости белка в растворе. Осаждение белков из растворов: механизм, способы устранения действия факторов устойчивости, обратимое и необратимое осаждение. Практическое применение осадителей.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Фракционное осаждение белков сыворотки крови сернокислым аммонием (высаливание)

Высаливание — это обратимое осаждение белков с помощью больших концентраций нейтральных солей: NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Этот метод используется для выделения и очистки ферментов, лечебных γ -глобулиновых препаратов.

Техника выполнения. К 1 мл белка добавить 1 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. При создавшемся 50 % насыщении раствора выпадут в осадок глобулины. Через 10 мин осадок отфильтровать. Белок с фильтра смыть в отдельную чистую пробирку избытком дистиллированной воды (4–5 мл). К фильтрату добавить сухой порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до полного насыщения. Спустя 10 мин выпавшие в осадок альбумины отфильтровать, в

безбелковый фильтрат добавить 5 мл дистиллированной воды и сохранить. Осадок альбуминов с фильтра смыть в отдельную чистую пробирку избытком дистиллированной воды. С содержимым всех трех пробирок провести биуретовую реакцию (биуретовый реактив студенты готовят самостоятельно, смешивая 10 % NaOH и 1 % CuSO₄ в соотношении 10:1). В пробирках с растворами альбумина и глобулина реакция положительная, а с безбелковым фильтратом — отрицательная.

Опыт № 2: Осаждение белков органическими кислотами.

Реакции осаждения могут быть обратимыми и необратимыми. В первом случае белки не подвергаются глубоким изменениям, поэтому могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе. Реакции осаждения дают возможность: изучить свойства белков; освободить жидкость от присутствия белка; установить наличие белка в биологических жидкостях.

Техника выполнения. В 2 пробирки наливают по 10 капель раствора белка. В одну пробирку добавляют 4–5 капель трихлоруксусной кислоты, а в другую — 4–5 капель сульфосалициловой кислоты. Эти реакции используют в лабораторной практике для обнаружения и удаления белков из растворов.

Опыт № 3: Осаждение белков спиртом или ацетоном.

Техника выполнения. К 10 каплям раствора белка добавить несколько капель ацетона или спирта. Выпадает осадок белка. При добавлении избытка дистиллированной воды осадок растворяется.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Реагенты и условия, вызывающие денатурацию белков»

Реагенты и условия	Какие изменения (разрушение водородных или ионных связей, образование новых связей и т.д.) происходят в структуре белка.
Высокая температура	
Встряхивание	
Органические кислоты	
Спирт, ацетон	
Соли тяжелых металлов	
Мочевина	

ЗАНЯТИЕ № 3

ТЕМА: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА С ЛИГАНДОМ. СВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ БЕЛКОВ

Цель: Рассмотреть современные представления о функционировании белка. Получить представление о взаимосвязи структурной организации белков с их биологическими функциями.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Многообразие белков. Классификация белков по: форме молекул, химическому строению, функциям
2. Взаимодействие белков с лигандами как основа их функционирования. Понятие об активном центре белка. Особенности формирования активного центра. Специфичность связывания белка с лигандом. Принцип комплементарности. Две гипотезы соответствия структур активного центра и лиганда (гипотеза «ключ – замок» и гипотеза индуцированного соответствия). Обратимость связывания и сродство активного центра к лиганду.
3. Вещества, влияющие на функционирование белков.
4. Доменная организация белков. Понятие о доменах. Особенности пространственной организации и функционирования доменных белков. Эволюционное значение доменной организации. Роль пространственной структуры и доменной организации в функционировании иммуноглобулинов.
5. Особенности функционирования олигомерных белков. Кооперативность. Эволюционные преимущества олигомерных белков перед мономерными (сравнение гемоглобина и миоглобина). Регуляция функционирования гемоглобина.
9. Особенности первичной и пространственной структуры мембранных белков.
10. Взаимосвязь функции и особенностей строения структурных фибриллярных белков.
11. Изменение белкового состава организма.

РЕФЕРАТЫ

- Роль доменной структуры в функционировании иммуноглобулинов, рецепторов, ферментов.
- Строение и функции мембранных белков.
- Структурно-функциональные особенности коллагена и эластина

ЗАНЯТИЕ № 4

ТЕМА: ФЕРМЕНТЫ. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ. МЕХАНИЗМ И ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА. КОФАКТОРЫ И КОФЕРМЕНТЫ.

Цель: Рассмотреть современные представления о строении ферментов, их биологической роли и особенностях ферментативного катализа. Составить представление о механизме действия ферментов, изучить строение и участие в метаболизме кофакторов и коферментов.

КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА: «КОФЕРМЕНТЫ. СТРУКТУРА И БИОРОЛЬ»

Необходимо знание структурных формул и биологической роли следующих коферментов:

1. Тиаминпирофосфат (ТПФ)
2. Никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺), НАДФ⁺.
3. Флаavinмоноклеотид и флаvинадениндинуклеотид (ФМН и ФАД)
4. Пиридоксальфосфат (ПФ)
5. Биотин
6. Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК)
7. Коэнзим ацилирования (КоА)

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Ферменты, определение. Биологическая роль ферментов. Понятие апофермент, кофермент, субстрат, продукт реакции, активаторы и ингибиторы ферментов.
2. Классификация и номенклатура ферментов.
3. Строение ферментов. Активный центр ферментов, состав, формирование, роль. Функциональные группы аминокислот, входящих в его состав.
4. Особенности ферментативного катализа. Виды специфичности.
5. Механизм действия ферментов.
6. Кофакторы ферментов: ионы металлов (на примере карбоксипептидазы А, амилазы) и нуклеотидные кофакторы: УТФ, ЦТФ, ГТФ, АТФ.
7. Коферментные функции витаминов (на примере трансаминаз и дегидрогеназ, витаминов В₆; РР; В₂).
8. Структура и биологическая роль коферментов: ТПФ, НАД и НАДФ, ФАД и ФМН, ПФ, биотин, ТГФК, КоА. Участие коферментов в метаболизме.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Обнаружение активности амилазы и уреазы.

А) Определение активности амилазы слюны.

Принцип метода: Активность амилазы слюны определяют по убыли субстрата крахмала и по исчезновению синего окрашивания крахмала с раствором йода.

Б) Определение активности уреазы.

Принцип метода: Активность уреазы из вытяжки арбузных семян определяют по повышению концентрации продукта реакции (NH_3), что вызывает защелачивание реакционной среды и, соответственно, появлению малинового окрашивания у фенолфталеина, содержащегося в реакционной смеси.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА:

Заполнить таблицу «Характеристика основных коферментов по их функциям».

Коферменты. Название.	Хим. структура кофермента и его активная группа.	Тип реакции, в которой участвует кофермент. Роль кофермента и его активной группы в катализе.	Витамин–предшественник
1. НАД, НАДФ 2. ФМН, ФАД 3. ПФ 4. ТПФ 5. Биотин 6. ТГФК 7. КоА			

ЗАНЯТИЕ № 5

ТЕМА: КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ. ПРИНЦИПЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ. МЕДИЦИНСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ (ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА, ЭНЗИМОТЕРАПИЯ, ФЕРМЕНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ)

Цель: Установить основные принципы обнаружения ферментов в биологических объектах (на примере амилазы и уреазы). Ознакомиться с основными свойствами ферментов и кинетикой ферментативных реакций. Дать количественную оценку активности некоторых гидролитических ферментов, имеющих клиническое значение.

Ферменты обнаруживают и оценивают по двум критериям: по появлению продуктов реакции или по исчезновению субстратов. Ферменты проявляют специфичность в отношении субстратов и типа реакции. Активность ферментов зависит от температуры, рН среды, концентрации субстрата [S] и концентрации фермента [E].

Количественная оценка активности ферментов в биологических жидкостях (кровь, моча, слюна) широко используются в клинической практике для диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний. Как правило, активность ферментов увеличивается при заболеваниях печени, инфаркте миокарда и других видах патологии. При диагностике болезней, связанных с врожденной недостаточностью метаболизма, определение активности ферментов становится единственным критерием болезни.

Количественная оценка активности ферментов основывается на измерении количества образовавшегося продукта реакции или убыли субстрата в единицу времени, отнесенного к 1 мг белка или 1 мл биологической жидкости.

В последнее время в клинической практике широко используются ингибиторы трипсина, такие как трасилол, контрикал, гордокс. Эти препараты используются в хирургической практике при острых панкреатитах и панкреонекрозах. Их терапевтическое действие объясняется тем, что при панкреатитах происходит секреция трипсина в активной форме, что вызывает самопереваривание тканей железы. Действие ингибиторов трипсина предотвращает этот процесс.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

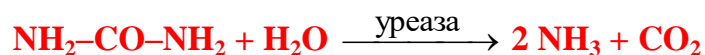
1. Кинетика ферментативных реакций. Зависимость скорости ферментативных реакций от температуры, рН среды, концентраций фермента и субстрата. Уравнение Михаэлиса – Ментен. Константа Михаэлиса, физический смысл.
2. Различия ферментативного состава органов и тканей. Органоспецифические ферменты.

3. Определение ферментов в плазме крови в диагностических целях. Происхождение ферментов плазмы крови.
4. Изоферменты. Происхождение и физиологическое значение наличия изоферментов. Изоферменты лактатдегидрогеназы, креатинкиназы и др. Принципы определения и медицинское значение изоферментов. Изофункциональные ферменты (рассмотреть на примерах глутатионтрансферазы, карбамоилфосфатсинтетазы).
5. Применение ферментов как аналитических реагентов при лабораторной диагностике (определение глюкозы, этанола, мочевой кислоты).
6. Применение ферментов как лекарственных препаратов для лечения болезней.
7. Принципы качественного и количественного определения ферментов.
8. Опыты по изучению влияния рН среды, термолабильности и специфичности ферментов (техника выполнения).
9. Количественное определение диастазы мочи, опыт по ингибированию трипсина. Принцип методов, техника выполнения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Обнаружение активности уреазы (КФ 3.5.1.5.) и установление ее специфичности.

Принцип метода. Уреаза катализирует гидролиз мочевины по следующей реакции:



В отличие от мочевины, уреазы не действует на тиомочевину – вещество, структурно сходное $\text{NH}_2\text{-CS-NH}_2$.

Техника выполнения.

Реактивы, № пробирки	1	2
1. Вытяжка арбузных семян	1 мл	1 мл
2. 1% раствор мочевины	1 мл	—
3. 1% раствор тиомочевины	—	1 мл
4. Фенолфталеин	2к	2 к

Содержимое обеих пробирок встряхивают, оставляют на несколько минут при комнатной температуре и наблюдают появление розово-малиновой окраски в пробирке с мочевиной (за счет защелачивания среды аммиаком) и отсутствие окраски в пробирке с тиомочевиной. В протоколе:

- Опишите принцип определения уреазы
- Сделайте вывод о виде специфичности уреазы

Опыт № 2: Термолабильность ферментов на примере амилазы слюны.

Амилаза слюны (К.Ф. 3.2.1.1.) расщепляет гидролитически крахмал по следующей схеме:



Активность амилазы слюны обнаруживают по исчезновению синего окрашивания крахмала при взаимодействии с раствором йода.

Техника выполнения.

Реактивы , мл	№ пробирки	1	2	3
1. 1 % раствор крахмала		0,5 (10к)	0,5	0,5
2. Слюна (разведение 1: 10) без кипячения		0,5	–	–
3.Слюна (разведение 1:10) после кипячения 2–3 мин.		–	0,5	–
4. Дистиллированная вода (контроль)		–	–	0,5
Инкубируют все пробирки в течение 10 минут				
5. Раствор йода		0,05 (1 К)	0,05	0,05

Запишите свои наблюдения.

Опыт № 3: Влияние pH на активность амилазы слюны.

Техника выполнения. В 3 пробирки наливают по 2 мл буферных растворов с различными значениями pH: 1,0; 7,0; 10,0. Затем в каждую пробирку добавляют по 1 мл слюны (разведение 1:10) и по 1 мл 1 % раствора крахмала. Через 10 минут инкубации содержимое всех пробирок проверяют на наличие крахмала реакцией с йодом. Укажите значение pH, при котором произошло полное расщепление крахмала. Нарисуйте график зависимости активности амилазы от pH среды.

Опыт № 4: Количественное определение диастазы (амилазы) в моче амилотестическим методом (по Каравею) .

В клинической практике широко применяется количественное определение диастазы (панкреатической амилазы) в моче. Появление этого фермента в моче связано с деструкцией клеток поджелудочной железы при различной патологии и попадании фермента в кровь, а затем через почки в мочу. Уровень диастазы в моче характеризует обширность и глубину поражения поджелудочной железы и, следовательно, тяжесть заболевания. В связи с этим диастаза мочи резко повышается при острых и хронических панкреатитах.

Принцип метода: α-амилаза гидролизует крахмал с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. При взаимодействии крахмала с йодом образуется окрашенный комплекс, оптическая плотность которого при 640 нм пропорциональна концентрации негидролизованного крахмала. Активность α-амилазы оценивают по уменьшению интенсивности окраски.

Ход определения. В пробирки вносят реактивы по следующей схеме:

	Холостая проба (К), мл	Опытная проба (О), мл
Субстратно-буферный раствор	0,5	0,5
Прогреть 5 мин. При 37 °С в водяном термостате; все последующие компоненты вносить в пробы, стоящие в термостате.		
Образец	–	0,1
С момента внесения образца выдержать точно 7,5 мин. При 37 °С.		
Раствор соляной кислоты 0,1 н.	4,0	4,0
Образец	0,1	–
Раствор йода 0,01 н.	0,5	0,5

Определяют оптическую плотность холостой опытной проб при 670 нм (600–700 нм, красный светофильтр), относительно дистиллированной воды в кювете с толщиной слоя 1 см. Окраска стабильна в течении 10 мин. Активность α -амилазы выражают в миллиграммах или граммах крахмала, гидролизованного 1 л исследуемого образца за 1 сек инкубации при 37 °С. Расчет производится по формуле:

$$\text{Активность, мг/л·сек} = \frac{A_x - A_o}{A_x} \times 44,4 \times K,$$

где A_x – оптическая плотность холостой пробы;

A_o – оптическая плотность опытной пробы;

K – коэффициент разведения образца (если он был разведен).

Нормальные величины:

В сыворотке (плазме) крови 3,3–8,9 мг/л·сек;

В моче до 44 мг/л·сек.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Применение ферментов в медицине».

Основные разделы	Ферменты. Название	Примеры использования в медицинской практике
Диагностика		
Лечение		
Использование ферментов в качестве аналитических реактивов		

РЕФЕРАТЫ

- Применение ферментов в диагностике и лечении различных заболеваний.
- Изоферменты. Происхождение, принципы определения и медицинское значение

ЗАНЯТИЕ № 6

ТЕМА: РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КАК МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОСНОВА РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА. РЕГУЛЯЦИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ВНЕШНИМИ СИГНАЛАМИ. ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Цель: Изучить различные виды регуляции активности ферментов. Рассмотреть регуляцию внутриклеточного метаболизма внешними сигналами, ингибирование активности ферментов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Регуляция активности фермента доступностью субстрата, доступностью кофермента, влиянием концентрации продукта и условий среды на скорость протекания ферментативных реакций.
2. Аллостерическая регуляция активности ферментов. Строение аллостерических ферментов, понятие об аллостерическом центре. Регуляция по принципу обратной связи.
3. Ассоциация и диссоциация регуляторных белков как способ регуляции ферментативной активности на примере протеинкиназы А, кальмодулин-зависимой киназы гликогенфосфоорилазы.
4. Ковалентная модификация путем фосфорилирования и дефосфорилирования, значение для регуляции активности ферментов. Субстраты фосфорилирования (серин, треонин, тирозин). Протеинкиназы. Значение протеинкиназ. Активаторы протеинкиназ (циклические нуклеотиды (цАМФ, цГМФ), кальций, инозитфосфатиды) и их участие во внутриклеточной передаче внешнего сигнала. Фосфопротеинфосфатазы.
5. Протеолитическая модификация активности ферментов. Ограниченный протеолиз как способ регуляции активности протеолитических ферментов и его значение для организма.
6. Ингибирование активности ферментов. Виды ингибирования: обратимое и необратимое, конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное. Константа ингибирования.
7. Лекарственные препараты как ингибиторы ферментов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны.

Принцип опыта: При добавлении к амилазе слюны активатора этого фермента NaCl (ионы Cl⁻) и ингибитора- CuSO₄ (ионы Cu²⁺), а также дистиллированной воды как ней-

трального соединения наблюдаем различное окрашивание с раствором йода после инкубации с крахмалом. Запишите результаты опыта, какое окрашивание наблюдалось.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Основные классы и подклассы ферментов».

Класс	Реакции, катализируемые ферментами данного класса	Основные подклассы, группы

ЗАНЯТИЕ № 7

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ: БЕЛКИ И ФЕРМЕНТЫ

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Определение понятия – белки. Распространение и разнообразие белков в живой природе. Биологические функции белков.
2. Общие представления об основных методах, применяемых в биологической химии для выделения индивидуальных белков. Фракционирование белков и их очистка. Электрофоретические методы фракционирования. Электрофорез белков сыворотки крови на бумаге и в полиакриламидном геле.
3. Хроматографическое разделение белков. Виды хроматографии. Использование хроматографии в аминокислотном анализе белков.
4. Методы количественного определения белка в растворе. Принцип методов, техника выполнения, преимущества и недостатки.
5. Форма белков. Глобулярные и фибриллярные белки. Молекулярная масса белков. Принципы методов определения молекулярной массы.
6. Классификация и общая характеристика аминокислот, входящих в состав белков. Пептиды: образование, строение. Пептидные связи: образование, строение, свойства.
7. Первичная структура белка. Методы определения первичной структуры белков. Значение первичной структуры для нормального функционирования белков.
8. Вторичная структура белка. Силы, стабилизирующие вторичную структуру. Основные типы вторичной структуры.
9. Третичная структура белка. Силы, стабилизирующие третичную структуру. Взаимосвязь первичной и третичной структуры. Образование третичной структуры белка из элементов вторичной структуры. Устойчивые сочетания элементов вторичной структуры.
10. Четвертичная структура белка. Взаимодействия между субъединицами, стабилизирующие четвертичную структуру. Структурная организация контактов между субъединицами.
11. Физико-химические свойства белков (ионизация, гидратация, растворимость).
12. Денатурация и ренатурация. Обратимая и необратимая денатурация. Признаки денатурации. Денатурирующие факторы.
13. Коллоидные свойства растворов белков. Факторы устойчивости белка в растворе. Осаждение белков из растворов. Обратимое и необратимое осаждение.

14. Классификация белков. Цели и принципы классификации белков. Классификации по различным признакам.
15. Простые и сложные белки. Простетическая группа.
16. Взаимодействие белков с лигандами как основа их функционирования. Понятие об активном центре белка. Особенности формирования активного центра.
17. Специфичность связывания белка с лигандом. Принцип комплементарности. Две гипотезы соответствия структур активного центра и лиганда.
18. Доменная организация белков. Понятие о доменах. Особенности пространственной организации и функционирования доменных белков.
19. Функциональное значение четвертичной структуры белка. Кооперативность. Эволюционные преимущества олигомерных белков перед мономерными (сравнение гемоглобина и миоглобина).
20. Взаимосвязь функции и особенностей строения структурных фибриллярных белков.
21. Взаимосвязь структуры и функции иммуноглобулинов.
22. Определение понятия-ферменты (энзимы). Биологическая роль ферментов. Особенности ферментативного катализа.
23. Понятия: холофермент, апофермент, кофактор, субстрат, продукт реакции, ингибитор, активатор. Примеры.
24. Химическая структура ферментов. Активный центр ферментов, состав, формирование, роль. Функциональные группы аминокислот, входящие в активный центр.
25. Комплементарность структуры активного центра и структуры субстрата. Теория «ключ-замок» и индуцированного соответствия.
26. Изоферменты. Происхождение и физиологическое значение наличия изоферментов. Изоферменты лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинкиназы и др. Принципы определения и медицинское значение изоферментов.
27. Кинетика ферментативных реакций. Зависимость скорости ферментативных реакций от: температуры, pH среды, концентрации фермента [E], концентрации субстрата [S]. Уравнение Михаэлиса – Ментен. Константа Михаэлиса K_m .
28. Ингибирование активности ферментов. Виды ингибирования (обратимое и необратимое; конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное). Константа ингибирования K_i . Лекарственные препараты как ингибиторы ферментов. Обнаружение действия лекарственных препаратов-ингибиторов трипсина.
29. Метаболическая регуляция активности фермента доступностью субстрата, доступностью кофермента, влиянием концентрации продукта и условий среды на скорость протекания ферментативных реакций.

30. Аллостерическая регуляция активности ферментов. Строение аллостерических ферментов, понятие об аллостерическом центре. Аллостерические активаторы и ингибиторы. Регуляция по типу обратной связи.
 31. Ковалентная модификация путем фосфорилирования и дефосфорилирования, значение для регуляции активности ферментов. Способы фосфорилирования белков. Значение протеинкиназ, понятие о цАМФ и цГМФ и их участии во внутриклеточной передаче внешнего сигнала.
 32. Ассоциация и диссоциация регуляторных протеинов как способ регуляции ферментативной активности на примере протеинкиназы, кальмодулин-зависимой киназы гликогенфосфорилазы.
 33. Протеолитическая модификация активности ферментов. ограниченный протеолиз как способ регуляции активности протеолитических ферментов и его значение для организма.
 34. Кофакторы ферментов: ионы металла и коферменты, примеры.
 35. Коферментные функции витаминов (на примере трансаминаз и дегидрогеназ, витаминов В₆, РР, В₂).
 36. Структура и биологическая роль коферментов: ТПФ, НАД и НАДФ, ФМН и ФАД, ПФ, биотин, ТГФК, КоА. Какие витамины входят в эти коферменты? Участие коферментов в метаболизме.
 37. Классификация и номенклатура ферментов. Примеры.
 38. Специфичность действия ферментов и ее виды.
 39. Механизм действия ферментов.
 40. Различия ферментного состава органов и тканей.
 41. Изменения активности ферментов при болезнях. Количественное определение диастазы мочи. Принцип метода, техника выполнения. Наследственные энзимопатии.
 42. Определение ферментов в плазме крови с целью диагностики; происхождение ферментов плазмы.
 43. Применение ферментов как лекарственных препаратов для лечения болезней.
 44. Применение ферментов как аналитических реагентов при лабораторной диагностике (определение глюкозы, этанола, мочевой кислоты и т.д.). Имобилизованные ферменты, области применения.
 45. Принципы обнаружения и количественной оценки ферментов. Единицы измерения активности и количества ферментов.
-
-

ЗАНЯТИЕ № 8

ТЕМА: ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН : ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ АТФ

Цель: Рассмотреть современные представления о механизмах, обеспечивающих энергетические потребности клетки. Обратит особое внимание на строение и функции митохондриальной цепи переноса электронов как основного поставщика АТФ в клетке.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Эндергонические и экзергонические реакции в живой клетке. Макроэргические соединения: определение, примеры.
2. Биологическое окисление. Биологические функции биологического окисления в клетке. Дегидрирование субстратов и восстановление кислорода как источник энергии для синтеза АТФ.
3. Виды фосфорилирования как реакции образования АТФ: окислительное, субстратное, фотофосфорилирование.
4. Окислительное фосфорилирование: сущность процесса, обобщенная схема, субстраты, коэффициент P/O. Строение митохондрий.
5. Дыхательная цепь — ключевой компонент митохондриальной системы окислительного фосфорилирования. Структурная организация дыхательной цепи. Митохондриальная цепь переноса электронов как часть системы дыхания всего организма.
6. НАД-зависимые и флавиновые дегидрогеназы. НАДН-дегидрогеназа. Убихинол-дегидрогеназа (цитохром с-редуктаза). Цитохром с-оксидаза. Особенности состава, строения и функций отдельных компонентов дыхательной цепи. Кофакторы, участвующие в переносе электронов и протонов.
7. Трансмембранный электрохимический потенциал как промежуточная форма энергии при окислительном фосфорилировании. H^+ -АТФ-синтаза: биологическая роль, локализация, строение, механизм синтеза АТФ.
8. Регуляция функционирования системы окислительного фосфорилирования. Дыхательный контроль.
9. Разобщение тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования. Терморегуляторная функция тканевого дыхания. Особенности энергетического обмена в бурой жировой ткани (термогенин, гормональная регуляция теплопродукции).
10. Образование активных форм кислорода в ходе биологического окисления в митохондриях. Физиологические и токсические эффекты активных форм кислорода.

11. Фотофосфорилирование – основной путь образования АТФ в зеленых растениях.

Фотосинтез: сущность процесса, общая схема переноса электронов. Фотосистемы 1 и 2. Сходство и различия систем окислительного и фотофосфорилирования.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу: «Характеристика комплексов дыхательной цепи».

Комплекс дых.цепи	Название фермента	Участвует ли в переносе:		Кофермент (название, формула)	Донор электронов (протонов)	Акцептор электронов (протонов)
		электронов по дыха- тельной цепи	протонов по дыха- тельной цепи			
I						
II						
III						
IV						

ЗАНЯТИЕ № 9

ТЕМА: ОБЩИЙ ПУТЬ КАТАБОЛИЗМА

Цель: Рассмотреть современные представления о катаболизме основных пищевых веществ и взаимосвязи этого процесса с обеспечением энергетических потребностей клетки.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Катаболизм основных пищевых веществ (углеводы, жиры, аминокислоты и белки). Понятие о специфических путях катаболизма. Специфические пути катаболизма пищевых веществ. Образование пирувата из углеводов и большинства аминокислот. Образование ацетил-КоА из жирных кислот и некоторых аминокислот.
2. Общий путь катаболизма: окисление пирувата и ацетил-КоА до конечных продуктов распада. Биологическое значение, локализация компонентов общего пути катаболизма в клетке.
3. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты: биологическое значение, последовательность реакций, строение пируватдегидрогеназного комплекса, коферменты реакций, механизм катализа. Механизмы регуляции скорости окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты.
4. Цикл лимонной кислоты: биологическая роль, последовательность реакций, характеристика ферментов. Ключевые реакции цикла лимонной кислоты. Механизмы регуляции скорости цикла лимонной кислоты. Реакции, пополняющие цикл лимонной кислоты (анаплеротические реакции).
5. Связь между общим путем катаболизма и цепью переноса электронов и протонов. Анаболические функции цикла лимонной кислоты.
6. Нарушения энергетического обмена. Гипоэнергетические состояния как результат гипоксии, гиповитаминозов и других причин.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу: «Характеристика промежуточных метаболитов общего пути катаболизма».

Промежуточные метаболиты общего пути катаболизма	Источники образования	Возможные продукты превращения
Пировиноградная кислота		
Ацетил-КоА		
Промежуточные метаболиты цикла Кребса:		
...		

ЗАНЯТИЕ № 10

ТЕМА: СТРУКТУРА, КЛАССИФИКАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ УГЛЕВОДОВ. СИНТЕЗ И РАСПАД ГЛИКОГЕНА

Цель: Отметить особенности химического состава и строения углеводов в связи с выполняемыми ими функциями. Рассмотреть переваривание и всасывание углеводов пищи. Исследовать содержание углеводов в пищевых продуктах. Изучить пути запасания глюкозы в виде гликогена и его мобилизацию, механизмы регуляции этих процессов.

КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА

Необходимо знание химической структуры и биологической роли следующих соединений:

- моносахаридов (глицеральдегида, диоксиацетона, эритрозы, рибозы, дезоксирибозы, ксилулозы, фруктозы, галактозы, маннозы)
- производных моносахаридов (фосфосахаров, аминосахаров, уроновых кислот, нейраминовой кислоты, УДФ-сахаров)
- дисахаридов (сахарозы, мальтозы, лактозы)
- гомополисахаридов (крахмала, гликогена, целлюлозы)
- гетерополисахаридов (гиалуроновой кислоты, гепарина, хондроитинсульфатов).

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Углеводы. Определение. Особенности химического состава и строения углеводов. Классификация углеводов по химической структуре.
2. Биологические функции углеводов. Соответствие химической структуры этих соединений выполняемым функциям.
3. Углеводные компоненты сложных белков. Гликопротеины и протеогликаны. Особенности строения и синтеза углеводных цепей гликопротеинов. Роль в построении сигнальных и рецепторных молекул.
4. Переваривание и всасывание углеводов в желудочно-кишечном тракте человека. Ферменты, принимающие участие в этих процессах.
5. Механизмы трансмембранного переноса углеводов. Na^+ -зависимый транспорт глюкозы. Мембранные транспортеры глюкозы (GLUT).
6. Синтез гликогена в тканях. Ферменты, участвующие в этих процессах, лимитирующие стадии. Особенности строения ферментов. Регуляция процесса.
7. Распад гликогена в тканях. Ферменты, участвующие в этих процессах, лимитирующие стадии. Особенности строения ферментов. Регуляция процесса.

8. Особенности запасаания и мобилизации глюкозы в печени и скелетной мускулатуре.
Сопряженность этих процессов с питанием и физическими нагрузками.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Обнаружение лактозы в молоке.

В молоке дисахарид лактозу обнаруживают реакцией Фелинга, содержащего комплексно связанные с виннокислой кислотой ионы Cu^{2+} . В результате реакции образуется оксид меди (I), выделяющийся в виде красного осадка Cu_2O .

Предварительно осаждают белки молока добавлением трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и фильтруют. К 10 каплям фильтрата добавляют 10 капель дистиллированной воды, 10 капель NaOH и 6 капель реактива Фелинга. Смесь нагревают. Отмечают характер появляющегося окрашивания.

Опыт № 2: Обнаружение крахмала в хлебе.

На поверхность кусочка хлеба наносят каплю раствора йода. Отмечают характер появляющегося окрашивания.

Опыт № 3: Количественное определение глюкозы крови глюкозоксидазным методом.

Принцип метода. Глюкоза окисляется кислородом воздуха при каталитическом действии глюкозоксидазы (КФ 1.1.3.4; β -D-глюкозо- O_2 -оксидоредуктаза) с образованием перекиси водорода и δ -глюконолактона. Образовавшуюся перекись водорода определяют по индофеноловой реакции аминокантипирина с хромогеном, катализируемой пероксидазой (КФ 1.11.1.7; донор: перекись водорода-оксидоредуктаза). Количество образовавшегося красителя при соблюдении рабочих условий пропорционально содержанию глюкозы. Интенсивность окраски определяют на фотоэлектроколориметре.

Техника выполнения. Готовят три пробы: опытную, эталонную и контрольную по следующей схеме:

	Опыт	Эталон	Контроль
Рабочий раствор (мл)	2,00	2,00	2,00
Инкубируют 5 мин при 37°C, после чего добавляют:			
Сыворотка крови (мл)	0,1	–	–
Калибровочный раствор (мл)	–	0,1	–
Дистиллированная вода (мл)	–	–	0,1

Содержимое пробирок встряхивают, инкубируют точно 30 мин при 37°C и фотометрируют против воды в кювете с длиной хода луча 0,5 см при 490 нм. Причем фотометрирование должно длиться не более 5 мин.

Расчет результатов. Содержание глюкозы (ммоль/л) в опытной пробе рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{A_{\text{оп}}}{A_{\text{эт}}} \times C_{\text{эт}} = \frac{A_{\text{оп}}}{A_{\text{эт}}} \times 10,$$

где $C_{\text{оп}}$ – концентрация глюкозы в крови, мМ; $A_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытной пробы; $A_{\text{эт}}$ – оптическая плотность стандартной пробы, $C_{\text{эт}}=10$ ммоль/л

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполните таблицу «Переваривание углеводов»

Название ферментов, место их синтеза	Место действия ферментов (отдел ЖКТ)	Химическая реакция	Гидролизуемая связь

ЗАНЯТИЕ № 11

ТЕМА: КАТАБОЛИЗМ ГЛЮКОЗЫ. АНАЭРОБНОЕ И АЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ.

АНАБОЛИЗМ ГЛЮКОЗЫ, ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ

Цель: Познакомиться с современными представлениями об основных путях катаболизма глюкозы в организме человека. Рассчитать энергетический выход метаболизма глюкозы в зависимости от условий.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Гликолиз. Схема процесса, локализация ферментов.
2. Энергетический эффект анаэробного окисления глюкозы. Гликолитическая оксидоредукция. Субстратное фосфорилирование. Возможность протекания анаэробного окисления глюкозы в тканях человека. Биологическое значение процесса.
3. Ключевые реакции гликолиза, механизмы регуляции скорости их протекания. Основные аллостерические регуляторы.
4. Трансмембранный перенос окислительно-восстановительных эквивалентов. Глицерофосфатный и малат-аспартатный шунты. Тканевая специфичность и биологическая значимость этих механизмов.
5. Аэробный распад глюкозы. Локализация основных этапов.
6. Энергетический эффект полного аэробного окисления глюкозы. Регуляция процесса.
7. Глюконеогенез, определение. Альтернативные реакции гликолиза. Субстратные циклы.
8. Субстраты глюконеогенеза. Биологическое значение процесса.
9. Брожение. Виды, биологическое значение. Спиртовое брожение. Эффект Пастера.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1. Спиртовое брожение. Обнаружение продуктов спиртового брожения.

Спиртовое брожение — процесс распада глюкозы под влиянием ферментов дрожжей с образованием углекислого газа и этилового спирта. Процесс гликолиза и брожение протекают одинаково до образования пировиноградной кислоты с выделением тепла и образованием 2-х молекул АТФ. Под действием дрожжевой декарбоксилазы пировиноградная кислота теряет CO_2 и превращается в уксусный альдегид, последний восстанавливается в этиловый спирт под действием алкогольдегидрогеназы за счет восстановленной формы кофактора — НАДН (H^+).

Техника выполнения.

а) Заполнение бродильного аппарата. 1 г свежих пекарских дрожжей или 0,5 г сухих дрожжей растирают в ступке, приливая небольшими порциями 5% раствор глюкозы в количестве 20 мл. Затем смесь переносят в бродильный аппарат (аппарат Эйхгорка) так, чтобы закрытое колено было заполнено полностью, а расширенная его часть только до половины. С заполненной трубкой прибор помещают в термостат при температуре 37°C на 30—50 мин. Когда произойдет накопление газа в верхней части закрытого колена прибора, можно проделать качественные реакции на CO₂ и на спирт.

б) Обнаружение CO₂. В бродильный аппарат наливают 10% раствор едкого натра до краев сосуда и, закрыв отверстие большим пальцем, перемешивают содержимое прибора. CO₂ поглощается щелочью, создавая вакуум, и кожа пальца присасывается к отверстию прибора.

в) Обнаружение этилового спирта с помощью йодоформенной пробы. 2—3 мл жидкости из бродильного аппарата отфильтровывают в пробирку, добавляют несколько капель 10% раствора йода до получения желтого окрашивания и слегка нагревают. Через некоторое время ощущается характерный запах йодоформа.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Впишите в таблицу «Энергетический эффект аэробного распада глюкозы» количество использованных (–АТФ) или синтезированных (+АТФ) молекул АТФ. Подсчитайте суммарный энергетический эффект окисления 1 молекулы глюкозы до CO₂ и H₂O.

Этапы аэробного распада глюкозы	– АТФ	+ АТФ	Способ фосфорилирования

ЗАНЯТИЕ № 12

ТЕМА: ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ

Цель: Рассмотреть современные представления о путях и механизмах регуляции обмена углеводов в организме человека. Обратит особое внимание на регуляцию отдельных путей метаболизма, особенности метаболизма углеводов в конкретных тканях и на уровне целого организма. Рассмотреть возможные нарушения углеводного обмена. Оценить биологическое значение пентозофосфатного пути метаболизма глюкозы. Составить представление о возможных причинах нарушения углеводного обмена и последствиях этих нарушений.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ:

1. Аллостерическая регуляция гликолиза и глюконеогенеза.
2. Гормональная регуляция гликолиза, глюконеогенеза и обмена гликогена. Взаимосвязь с ритмом питания.
3. Пути обмена лактата в печени и мышцах. Цикл Кори.
4. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы. Биологические функции. Схема процесса. Лимитирующая реакция. Окислительный и неокислительный этапы. Обратимость неокислительной стадии реакции.
5. Особенности обмена глюкозы в разных тканях (эритроциты, мозг, печень, мышцы, жировая ткань).
6. Метаболизм галактозы, фруктозы и лактозы. Наследственные нарушения обмена. Гликогенозы и агликогенозы.
7. Нарушения углеводного обмена. Гипо- и гипергликемия. Инсулин и углеводный обмен.

Самостоятельная работа

Заполнить таблицу «Регуляция обмена углеводов гормонами».

Название гормона	Место синтеза гормона	Сигнал для синтеза и секреции	Клетки-мишени	Влияние на обмен углеводов	Изменение концентрации глюкозы в крови как результат действия гормона

Заполнить таблицу «Аллостерические регуляторы гликолиза и глюконеогенеза в печени».

Название процесса	Ключевые ферменты	Ингибиторы	Активаторы
Гликолиз			
Глюконеогенез			

РЕФЕРАТЫ

- Наследственные нарушения обмена углеводов: галактоземия, непереносимость фруктозы, непереносимость дисахаридов, гликогенозы и агликогенозы
 - Гликирование и гликозилирование и связанные с ним патологические состояния
-
-

ЗАНЯТИЕ № 13

ТЕМА: ХИМИЯ ЛИПИДОВ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ВСАСЫВАНИЕ ЛИПИДОВ. ЛИПОПРОТЕИНЫ

Цель: Рассмотреть строение и функции основных липидов организма человека; процессы переваривания и всасывания жиров и фосфолипидов; ресинтез жиров в энтероцитах; транспорт экзогенных жиров в составе хиломикронов; современные представления о строении и функциях липопротеинов. Познакомиться с качественными реакциями на холестерин и структурные компоненты фосфолипидов.

КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА: «СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЛИПИДОВ»

Необходимо знание химического строения и биологической роли следующих соединений:

1. Предельные (C4 – C24) жирные кислоты, непредельные жирные кислоты (олеиновая, линолевая, линоленовая, арахидоновая). Обозначение с помощью цифровых символов положения и количества двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах.
2. Моно-, ди- и триацилглицеролы.
3. Глицерофосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол).
4. Сфинголипиды (сфингомиелины, цереброзиды, ганглиозиды).
5. Свободный и эстерифицированный холестерин.
6. Желчные и парные желчные кислоты (холевая, дезоксихолевая, хенодезоксихолевая, литохолевая, таурохолевая, гликохолевая).

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Липиды. Определение. Классификация. Биологическая роль.
2. Особенности строения и биороль высших жирных кислот (ВЖК) животного происхождения. Эссенциальные жирные кислоты. Биороль.
3. Триацилглицеролы (ТАГ), строение, биороль.
4. Фосфолипиды, особенности строения и физико-химических свойств. Биороль.
5. Сфинголипиды (сфингомиелины, цереброзиды, ганглиозиды). Биороль.
6. Стерины. Холестерин и его эфиры. Биороль. Желчные и парные желчные кислоты, их структура, биороль. Стероидные гормоны.
7. Суточная потребность в липидах. Незаменимые факторы питания, поступающие в организм человека в составе липидов пищи.
8. Переваривание ТАГ пищи панкреатической липазой. Переваривание фосфолипидов, эстерифицированного холестерина.

9. Всасывание продуктов гидролиза жиров в слизистую оболочку кишечника. Образование мицелл.
10. Желчные кислоты, их структура, биороль Конъюгация желчных кислот.
11. Ресинтез ТАГ и образование эфиров холестерина в стенке кишечника.
12. Нарушения переваривания и всасывания липидов. Стеаторея
13. Образование хиломикронов (ХМ) и транспорт экзогенных жиров в лимфу и кровь.
14. Использование экзогенных жиров тканями. Действие липопротеинлипазы на ХМ. Судьба жирных кислот, глицерола и остаточных хиломикронов.
15. Липопротеины (ЛП) плазмы крови. Классификация ЛП по плотности и электрофоретической подвижности. Особенности строения и липидного состава липопротеиновой частицы. Основные аполипопротеины, их функции.
16. Функции ЛП плазмы. Место образования и превращения различных видов ЛП.
17. Дислипидемии. Гиперхиломикронемия, гипертриглицеридемия..
18. Качественные реакции на холестерин. Сущность реакций. Значение. Реакция Либермана-Бурхарда. Техника проведения.
19. Гидролиз лецитина (фосфатидилхолина) и обнаружение продуктов гидролиза. Техника проведения опыта, схема гидролиза.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Гидролиз лецитина и обнаружение продуктов гидролиза.

Техника выполнения. Навеску лецитина (0,5 г) помещают в пробирку, наливают 10 мл 30 % раствора NaOH, закрывают пробкой с обратным холодильником и выдерживают 30 мин на кипящей водяной бане. Содержимое пробирки охлаждают под проточной водой и анализируют продукты гидролиза:

а) холин обнаруживают по образованию в процессе гидролиза триметиламина, который придает гидролизату запах селедочного рассола.

б) фосфорную кислоту обнаруживают реакцией с молибдатом аммония. К 0,5 мл гидролизата добавляют 1 мл раствора молибдата аммония. Реакционную смесь кипятят. Отмечают появление интенсивного желтого окрашивания раствора, обусловленного образованием фосфомолибдата аммония.

в) непредельные высшие жирные кислоты обнаруживают реакцией с йодом. К 0,5 мл гидролизата по каплям добавляют раствор йода. Отмечают обесцвечивание раствора.

г) глицерин обнаруживают по образованию глицерата меди. К 0,5 мл щелочного гидролизата добавляют 0,5 мл 1 % раствора сульфата меди (опытная пробирка). В контрольной пробе смешивают равные объемы 10 % раствора NaOH и раствора сульфата меди. Сравнить окраску растворов в опытной и контрольной пробирках.

В выводе записать схему щелочного гидролиза лецитина.

Опыт № 2: Качественная реакция на холестерин Либермана–Бурхарда.

Принцип метода. Цветные реакции на холестерин основаны на его дегидратации под действием концентрированной серной кислоты с последующим превращением в непредельные углеводороды с сопряженными двойными связями. Эти соединения дают окрашенные продукты с серной кислотой и уксусным ангидридом.

Ход определения. Реакцию Либермана–Бурхарда следует проводить параллельно с хлороформным экстрактом головного мозга и с раствором холестерина в хлороформе.

К 1 мл хлороформного экстракта головного мозга (пробирка № 1) или к 1 мл раствора холестерина в хлороформе (пробирка № 2) добавить по 10 капель уксусного ангидрида и по 2 капли концентрированной серной кислоты. Растворы перемешать. Жидкость приобретает красную окраску, затем цвет быстро меняется последовательно на красно-фиолетовый, фиолетовый, аметистово-синий, синий и зеленый.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Переваривание липидов».

	Панкреатическая липаза	Липопротеинлипаза	ТАГ-липаза
Локализация реакции			
Активаторы реакции			
Основные продукты реакции			
Судьба продуктов реакции			

ЗАНЯТИЕ № 14

ТЕМА: ОБМЕН ЛИПИДОВ 1

Цель: Рассмотреть метаболизм жирных кислот и его регуляцию; биосинтез триацилглицеролов в печени и жировой ткани; регуляцию липогенеза и липолиза; обмен фосфолипидов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Катаболизм жирных кислот (ЖК), его этапы (β -окисление, ЦТК, митохондриальная дыхательная цепь).
2. Активация ЖК под действием ацил-КоА-синтетазы в цитозоле клетки.
3. Транспорт ацил-КоА через внутреннюю мембрану митохондрий (МТХ) с участием карнитина.
4. β -окисление ацил-КоА в матриксе МТХ, связь β -окисления с циклом трикарбоновых кислот и дыхательной цепью.
5. Особенности окисления ненасыщенных ЖК.
6. Подсчет суммарного выхода АТФ при окислении ЖК.
7. Окисление глицерина, его энергетический эффект.
8. Энергетический эффект распада триацилглицеролов.
9. Биосинтез ВЖК. Образование ацетил-КоА и его транспорт из митохондрий в цитоплазму.
10. Синтез малонил-КоА. Ацетил-КоА-карбоксилаза, регуляция её активности.
11. Синтетаза ЖК как многофункциональный белок, локализация в клетке, строение. Ацилпереносящий белок (АПБ). Роль фосфопантотеиновой простетической группы.
12. Реакции катализируемые синтетазой ЖК. Синтез бутирил АПБ. Образование пальмитата. Источники водорода для синтеза ЖК.
13. Синтез ЖК из пальмитиновой кислоты. Элонгация с образованием $C_{18} - C_{24}$ ЖК. Образование непредельных ЖК.
14. Регуляция метаболизма ВЖК (β -окисления и биосинтеза ВЖК).
15. Биосинтез ТАГ в жировой ткани и печени. Образование липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) в печени и транспорт жиров в другие ткани.
16. Мобилизация жира в жировой ткани (липолиз). Триацилглицерол-, диацилглицерол-моноацилглицероллипазы.
17. Гормональная регуляция синтеза и мобилизации жиров. Ожирение.

18. Метаболизм фосфолипидов (ФЛ). Обмен глицерофосфолипидов Биологическое значение различных фосфолипаз. Биосинтез фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина
19. Обмен сфинголипидов. Синтез церамида и его производных. Катаболизм сфингомиелина и гликосфинголипидов, генетические дефекты энзимов.
20. Значение определения концентрации метаболитов липидного обмена в сыворотке крови. Гиперлипидемия (гиперлипемия) алиментарная и патологическая.
21. Определение уровня общих липидов в сыворотке крови по цветной реакции с сульфосфосфованилиновым реактивом. Принцип метода. Ход определения. Норма. Клинико-диагностическое значение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Определение общих липидов в сыворотке крови по цветной реакции с сульфосфосфованилиновым реактивом.

Группу общих липидов плазмы (сыворотки крови) составляют нейтральные жиры (триацилглицеролы), фосфолипиды (ФЛ), свободный или неэстерифицированный холестерин (НЭХС), эфирсвязанный холестерин (ЭХС), гликолипиды, неэстерифицированные (свободные) ЖК (НЭЖК). Подавляющее большинство перечисленных соединений (прежде всего ФЛ, ХС, ТАГ) образуют ассоциаты (липидно-белковые комплексы, ЛП) с белками – апопротеинами. Большая часть НЭЖК образует комплексы с альбумином крови. Содержание общих липидов в сыворотке крови здоровых людей составляет 4–8 г/л.

Гиперлипидемия (гиперлипемия) – увеличение концентрации общих липидов плазмы как физиологическое явление может наблюдаться через 1–4 ч после приема пищи. Концентрация липидов в крови изменяется при ряде патологических состояний. Гиперлипемия отмечается у больных сахарным диабетом, при нефротическом синдроме, остром и хроническом гепатитах, атеросклерозе и других заболеваниях.

Принцип метода. Продукты гидролиза липидов, образующиеся под действием серной кислоты, взаимодействуют с фосфосфосфованилиновым реактивом с образованием красного окрашивания. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию общих липидов в сыворотке крови.

Техника выполнения. Реактивы: (1) стандартный раствор (общие липиды 8 г/л) – реактив 1; (2) раствор ванилина (ванилин и кислота ортофосфорная) – реактив 2; (3) кислота серная концентрированная. Готовят опытную, стандартную и контрольную пробы, как указано в таблице.

Отмерить (мл)	Проба	Стандарт	Контрольный раствор
---------------	-------	----------	---------------------

Сыворотка	0,1	–	–
Реактив 1	–	0,1	–
Кислота серная конц.	1,50	1,50	1,50
Перемешивают и нагревают 15 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения пробирок проточной водой отмеряют			
Гидролизат	0,10	0,10	0,10
Реактив 2	1,50	1,50	1,50

Перемешивают и оставляют стоять 50 мин при температуре от 15–25 °С. Не позднее чем через 60 мин измеряют оптическую плотность пробы (A_1) и стандарта (A_2) против контрольного раствора в кювете толщиной 0,5 см при длине волны 510–550 нм.

$$\text{Расчёт: } C_{\text{оп}} (\text{г/л}) = C_{\text{ст}} \times A_1 / A_2$$

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Метаболизм жирных кислот»

Процессы	β -окисление	Биосинтез ЖК
Локализация процесса		
Переносчик субстрата через митохондриальную мембрану		
Коферменты окислительно-восстановительных реакций		
Источник присоединяемого фрагмента или отщепляемый фрагмент		
Регуляторные ферменты		
Регуляторные факторы: активаторы ингибиторы		

ЗАНЯТИЕ № 15

ТЕМА: ОБМЕН ЛИПИДОВ 2

Цель: Рассмотреть биосинтез и катаболизм кетоновых тел; метаболизм холестерина; составить представление о возможных нарушениях обмена липидов и клинико-диагностическом значении определения холестерина в сыворотке крови и кетоновых тел в моче.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Кетоновые тела. Строение и биороль. Синтез ацетоацетата и β -гидроксибутирата в митохондриях печени.
2. Использование кетоновых тел внепеченочными тканями в качестве источника энергии. Энергетическая ценность ацетоацетата и β -гидроксибутирата.
3. Биохимический механизм развития кетонемии и кетонурии. Образование ацетона.
4. Пути поступления, использования и выведения холестерина из организма.
5. Биосинтез холестерина, его этапы. Синтез мевалоната. Синтез сквалена. Циклизация сквалена и образование ланостерола. Превращение ланостерола в холестерин. Локализация процессов в клетке.
6. Регуляция биосинтеза холестерина. Естественные и синтетические ингибиторы гидроксиметилглутарил-КоА редуктазы.
7. Биосинтез желчных кислот в печени и кишечнике. Печеночно-кишечная циркуляция желчных кислот. Конъюгированные желчные кислоты. Роль желчных кислот в поддержании гомеостаза холестерина в организме. Желчнокаменная болезнь.
8. Липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП) как транспортные формы холестерина в крови, их роль в обмене холестерина. Атерогенные и антиатерогенные ЛП. Рецепторы ЛПНП.
9. Дислипидемии, типы. Гиперхолестеролемиа как фактор риска атеросклероза. Ген рецептора ЛПНП: структура и типы мутаций. Биохимические основы лечения и профилактики гиперхолестеролемиий.
10. Эйкозаноиды (простагландины, тромбоксаны, простациклины, лейкотриены), биосинтез, строение, номенклатура, биологические функции. Ингибиторы циклооксигеназы I и II и липоксигеназы.
11. Определение концентрации общего холестерина в сыворотке крови энзиматическим колориметрическим методом. Принцип метода. Техника выполнения. Уровень холестерина в сыворотке крови взрослого. Интерпретация полученных данных.

12. Обнаружение кетоновых тел в моче. Техника. Клиническое значение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

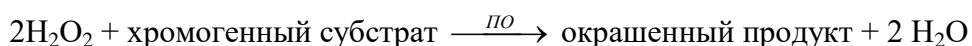
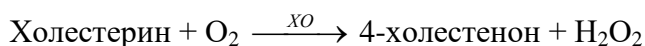
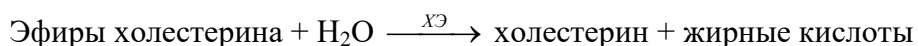
Опыт № 1: Определение концентрации общего холестерина в сыворотке крови ферментативным колориметрическим методом.

В плазме крови холестерол находится главным образом в составе ЛПНП и ЛПОНП, причём 60–70 % его представлено в форме сложных эфиров, а 30–40 % – свободного, НЭХС. Свободный и ЭХС составляют фракцию общего ХС.

С возрастом уровень ХС в плазме крови увеличивается. Так, у ребенка в возрасте 1 года содержание ХС в плазме крови равно 50 ± 10 мг/дл, а у взрослого 200 ± 40 мг /дл, или $5,2 \pm 1,3$ ммоль/л. Идеальное содержание ХС в сыворотке крови $< 5,2$ ммоль/л.

Повышение уровня ХС в сыворотке крови – гиперхолестеринемия или гиперхолестеролемиа бывает первичной (например, при семейной гиперхолестеролемии) или вторичной при сахарном диабете, липоидном нефрозе, обтурационной желтухе и др. заболеваниях.

Принцип метода. При гидролизе эфиров холестерина ферментом холестеролэстеразой (ХЭ) образуется свободный холестерин. Образовавшийся и имеющийся в пробе холестерин окисляется кислородом воздуха под действием холестеролоксидазы (ХО) с образованием эквимольного количества перекиси водорода. Под действием пероксидазы (ПО) перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации холестерина в пробе.



Реактивы: (1) Реагент – лиофилизированные ферменты + хромогены в фосфатном буфере; (2) Стандартный раствор холестерина с концентрацией 5,17 мМ (200 мг/100 мл).

Техника выполнения.

Реактивы	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Контрольная проба, мл
Сыворотка	0,1	–	–
Вода	–	–	0,1
Реагент	2,0	2,0	2,0
Раствор холестерина	–	0,1	–

Реакционную смесь тщательно перемешивают, инкубируют не менее 5 мин при комнатной температуре и измеряют на ФЭКе оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы в кюветах толщиной 0,5 см при длине волны 490 нм.

Окраска стабильна не менее 2 часов после окончания инкубации при предохранении от прямого солнечного света. Результаты рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{оп}} = E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}} \times 5,17 \text{ (мМ)} \text{ или } C_{\text{оп}} = E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}} \times 200 \text{ (мг / 100 мл)}$$

Опыт № 2: Обнаружение кетоновых тел в моче.

К компонентам мочи, которые у здорового человека не обнаруживаются обычными качественными реакциями и считаются патологическими, относят такие вещества как белок, сахар, кетоновые тела, желчные пигменты, желчные кислоты, кровь. Кетоновые тела появляются в моче при нарушениях углеводного и липидного обменов, в частности при сахарном диабете и голодании.

(1) Реакция на ацетон с йодом (проба Либена). При взаимодействии ацетона с йодом в щелочной среде образуется йодоформ, присутствие которого узнается по появлению желтого осадка и характерному запаху.

К 5 каплям исследуемой мочи добавляют 1 каплю 10% раствора гидроксида натрия и 2–3 капли раствора Люголя. При наличии ацетона выделяется желтый осадок и появляется запах йодоформа.

(2) Реакция на ацетон и ацетоуксусную кислоту с нитропруссидом натрия (проба Легалья). Ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом натрия оранжево-красное окрашивание, которое при подкислении уксусной кислотой становится вишнево-красным.

К 5 каплям мочи добавляют 1 каплю 10% раствора нитропрусида натрия и 2 капли 10% раствора гидроксида натрия, появляется оранжево-красное окрашивание. При подкислении концентрированной уксусной кислотой оно становится вишнево-красным.

(3) Реакция на ацетоуксусную кислоту с хлорным железом (проба Герхардта). Энольная форма ацетоуксусной кислоты, взаимодействуя с хлорным железом, образует комплексное соединение вишнево-красного цвета.

К 5 каплям мочи прибавляют по каплям раствор 1% хлорного железа, появляется вишнево-красное окрашивание.

(4) Экспресс-анализ кетоновых тел в моче с помощью диагностических (тест) полосок. Принцип анализа основан на появлении фиолетового окрашивания в процессе взаимодействия кетоновых тел с нитропруссидом натрия (реакция Легалья).

Диагностические полоски кетофан или диафан (для исследования мочи на глюкозу и кетоны) опускают на 1–2 секунды в исследуемую мочу так, чтобы зоны индикации были смочены. Избыток мочи снимают с полоски, соприкасаясь со стенкой сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 60 секунд сопоставляют окраску зон индикации с соответствующей цветной шкалой.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу: «Типы гиперлипидемий, вызывающих атеросклероз».

Гиперлипидемия	Молекулярный дефект
1.	
2.	
3.	
4.	

Заполнить таблицу: «Препараты, используемые при лечении атеросклероза».

Препарат	Механизм действия
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

РЕФЕРАТЫ

- Дислипидемии.
- Биохимические основы развития атеросклероза.
- Коррекция нарушений обмена липидов и липопротеидов при атеросклерозе.
- Эйкозаноиды – регуляторные молекулы с множественными мишенями действи

ЗАНЯТИЕ № 16

**ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ: ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН. ХИМИЯ И ОБМЕН
УГЛЕВОДОВ .ХИМИЯ И ОБМЕН ЛИПИДОВ.**

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Эндергонические и экзергонические реакции в живой клетке. Макроэргические соединения: определение, примеры.
2. Биологическое окисление. Биологические функции биологического окисления в клетке. Дегидрирование субстратов и восстановление кислорода как источник энергии для синтеза АТФ. Виды фосфорилирования как реакции образования АТФ: окислительное, субстратное, фотофосфорилирование.
3. Окислительное фосфорилирование: сущность процесса, обобщенная схема, субстраты, коэффициент P/O. Строение митохондрий и локализация в них компонентов системы окислительного фосфорилирования.
4. Дыхательная цепь — ключевой компонент митохондриальной системы окислительного фосфорилирования. Структурная организация дыхательной цепи. Митохондриальная цепь переноса электронов как часть системы дыхания всего организма.
5. НАД-зависимые и флавиновые дегидрогеназы. НАДН-дегидрогеназа. Убихинол-дегидрогеназа (цитохром с-редуктаза). Цитохром с-оксидаза. Особенности состава, строения, функций. Коферменты компонентов дыхательной цепи митохондрий.
6. Трансмембранный электрохимический потенциал как промежуточная форма энергии при окислительном фосфорилировании. H^+ -АТФ-синтаза: биологическая роль, локализация, строение, механизм синтеза АТФ.
7. Регуляция функционирования системы окислительного фосфорилирования. Дыхательный контроль. Нарушения энергетического обмена. Гипоэнергетические состояния как результат гипоксии, гиповитаминозов и других причин.
8. Разобщение тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования. Терморегуляторная функция тканевого дыхания. Термогенная функция энергетического обмена в бурой жировой ткани.
9. Катаболизм основных пищевых веществ (углеводы, жиры, аминокислоты и белки). Понятие о специфических и общем путях катаболизма. Общий путь катаболизма: окисление пирувата и ацетил-КоА. Биологическое значение, локализация в клетке.
10. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты: биологическое значение, последовательность реакций. Механизмы регуляции скорости окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты.

11. Пируватдегидрогеназный комплекс животных. Строение, коферменты активных центров, тонкий механизм катализа.
12. Цикл лимонной кислоты: биологическая роль, последовательность реакций, характеристика ферментов.
13. Ключевые реакции цикла лимонной кислоты. Механизмы регуляции скорости цикла лимонной кислоты.
14. Анаплеротические реакции цикла лимонной кислоты (уравнения реакций, ферменты, биологическая роль). Анаболическое значение цикла лимонной кислоты.
15. Образование активных форм кислорода в ходе биологического окисления в митохондриях. Одно-, двух-, трех- и четырехэлектронное восстановление кислорода. Физиологические и токсические эффекты активных форм кислорода.
16. Основное понятие – углеводы. Классификация углеводов. Распространение углеводов в живой природе. Их биологическая роль.
17. Моносахариды. Производные моносахаридов – фосфосахара, аминсахара, уроновые кислоты, сиаловые кислоты, УДФ-глюкоза. Строение и биологическая роль.
18. Дисахариды. Строение. Роль в питании. Олигосахариды. Их роль в рецепции. Группы крови.
19. Полисахариды. Крахмал. Гликоген. Гетерополисахариды. Строение и биологическая роль.
20. Переваривание углеводов. Всасывание углеводов. Транспорт глюкозы в тканях.
21. Синтез гликогена. Распад гликогена и мобилизация глюкозы.
22. Регуляция синтеза и распада гликогена в печени. Роль гормонов и протеинкиназ в регуляции.
23. Гликолиз и глюконеогенез. Схема процесса, необратимые реакции. Субстратные циклы.
24. Регуляция гликолиза и глюконеогенеза. Фосфофруктокиназа-2 и ее роль в гормональной регуляции обмена углеводов.
25. Превращение пировиноградной кислоты в анаэробных условиях. Цикл Кори. Лактатдегидрогеназа. Спиртовое брожение. Обнаружение продуктов спиртового брожения.
26. Аэробный распад глюкозы. Схема. Пути регенерации НАД⁺. Энергетический эффект. Регуляция аэробного распада глюкозы. Эффект Пастера.
27. Схема пентозофосфатного цикла. Биологическое значение.
28. Регуляция углеводного обмена в организме. Уровень «сахара» в крови как гомеостатический параметр внутренней среды. Глюкозоксидазный метод определения содержания глюкозы крови.

29. Нарушения углеводного обмена. Гипо- и гипергликемия. Влияние инсулина и контринсулярных гормонов на углеводный обмен. Тест толерантности к глюкозе и его значение для клинической практики.
30. Наследственные нарушения обмена моносахаридов и дисахаридов.
31. Липиды. Общая характеристика. Биологическая роль, суточная потребность в липидах. Классификация липидов. Характеристика отдельных групп.
32. Высшие жирные кислоты (ВЖК), предельные и непредельные. Особенности строения ВЖК животного происхождения. Способы обозначения числа атомов углерода, положения и количества двойных связей. Эссенциальные жирные кислоты. Биороль. Полиеновые жирные кислоты.
33. Триацилглицеролы (ТАГ). Простые и смешанные. Физико-химические свойства ТАГ. Биологическая роль.
34. Глицерофосфолипиды. Основные представители. Биологическая роль.
35. Сфинголипиды. Строение и биологическая роль.
36. Гликолипиды. Представители. Биологическая роль.
37. Холестерин свободный и эстерифицированный. Строение и биороль.
38. Переваривание ТАГ пищи панкреатической липазой. Переваривание фосфолипидов, эстерифицированного холестерина. Всасывание продуктов гидролиза жиров в слизистую оболочку кишечника. Образование мицелл.
39. Желчные кислоты, их структура, биосинтез, регуляция синтеза. Конъюгация желчных кислот. Роль желчных кислот в переваривании и всасывании липидов. Желчно-каменная болезнь. Стеаторея.
40. Ресинтез ТАГ в стенке кишечника. Образование хиломикрон и транспорт жиров. Роль аполипопротеинов. Липопротеинлипаза. Гиперхиломикронемия, гипертриглицеридемия.
41. Липопротеины (ЛП) плазмы крови. Классификация ЛП по плотности и электрофоретической подвижности. Особенности строения и липидного состава липопротеидной частицы. Основные аполипопротеины, их функции.
42. Функции ЛП плазмы. Место образования и превращения различных видов ЛП. Дислипопротеинемии. Типы дислипопротеинемий. Гиперхиломикронемия, гипертриглицеридемия, гиперхолестеролемии.
43. Катаболизм ЖК, его этапы. Активация ЖК. Транспорт ацил-КоА через внутреннюю мембрану митохондрий с участием карнитина.
44. β -окисление ацил-КоА. Связь β -окисления с циклом трикарбоновых кислот и дыхательной цепью. Регуляция окисления ЖК.

45. Особенности окисления ненасыщенных ЖК и ЖК с нечетным количеством атомов углерода. Подсчет суммарного выхода АТФ при окислении ЖК (предельных и непредельных).
46. Окисление глицерина, его энергетический эффект. Энергетический эффект распада ТАГ.
47. Синтез малонил-КоА. Ацетил-КоА- карбоксилаза, регуляция её активности.
48. Синтетаза ЖК как полифункциональный фермент. Ацилпереносящий белок (АПБ). Роль фосфопантотеиновой простетической группы. Пути образования ацетил-КоА и НАДФН₂ расходуемых на синтез ЖК.
49. Реакции, катализируемые синтетазой ЖК. Синтез бутирил-АПБ. Образование пальмитата. Элонгация с образованием С₁₈ – С₂₄ ЖК. Образование непредельных ЖК.
50. Биосинтез ТАГ (липогенез). Особенности биосинтеза ТАГ в печени и жировой ткани. Гормональная регуляция. Образование ЛПОНП в печени.
51. Мобилизация жира в жировой ткани (липолиз). Триацилглицерол-, диацилглицерол и моноацилглицероллипазы. Гормональная регуляция липолиза в адипоцитах.
52. Метаболизм фосфолипидов (ФЛ). Обмен глицерофосфолипидов. Биологическое значение различных фосфолипаз. Биосинтез фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина.
53. Обмен сфинголипидов. Синтез церамида и его производных. Катаболизм сфингомиелина и гликосфинголипидов, генетические дефекты энзимов.
54. Кетоновые тела. Биосинтез, использование в качестве источника энергии. Биохимический механизм кетонемии и кетонурии.
55. Холестерин. Пути поступления, использования и выведения из организма. Уровень холестерина в сыворотке крови взрослого. Определение концентрации общего холестерина в сыворотке крови. Клиническое значение определения.
56. Биосинтез холестерина его этапы. Регуляция.
57. Роль желчных кислот в поддержании гомеостаза холестерина в организме. Биохимия желчнокаменной болезни.
58. ЛПНП и ЛПВП как транспортные формы холестерина в крови, их роль в обмене холестерина. Атерогенные и антиатерогенные ЛП. Рецепторы ЛПНП.
59. Дислипотеинемии, типы. Гиперхолестеролемиа как фактор риска развития атеросклероза. Ген рецептора ЛПНП: структура и типы мутаций. Биохимические основы лечения и профилактики гиперхолестеролемиий.
60. Эйкозаноиды. Биосинтез, строение, номенклатура, биологические функции. Ингибиторы синтеза эйкозаноидов.
61. Липиды биомембран, их роль. Участие фосфолипаз в обмене фосфолипидов.

62. Интеграция основных путей обмена углеводов и липидов в организме. Роль инсулина и контринсулярных гормонов в регуляции переключения процессов катаболизма и анаболизма углеводов и липидов.

ЗАНЯТИЕ № 17

ТЕМА: БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ.

Цель: Рассмотреть строение, общие свойства и биороль мембран; механизмы переноса веществ через мембраны; роль мембран в восприятии и передаче внутрь клетки сигналов из внешней среды; процессы перекисного окисления липидов мембран

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Основные мембраны клетки и их функции.
2. Структура компонентов плазматических мембран
 - Амфифильные молекулы. Их поведение в водной фазе. Образование липидного бислоя.
 - Номенклатура липидов мембран. Фосфоглицериды, кардиолипин. Сфинголипиды, гликолипиды.
 - Участие фосфолипаз в обмене фосфолипидов
3. Белки мембран. Белок/липидное отношение. Белки интегральные, периферические.
 - Связь периферических белков с мембраной. Заякоривание.
 - Типы расположения интегральных белков в мембранах.
 - Функции мембранных белков. Рецепторы как интегральные белки. Цитоскелет на примере мембран эритроцитов. Белки клеточной адгезии.
 - Две основные ветви синтеза мембранных белков
4. Архитектоника и общие свойства мембран. Мозаичная модель. Способность к самосборке. Подвижность. Асимметрия липидов и белков в составе мембраны. Избирательная проницаемость.
5. Механизмы переноса веществ через мембраны
 - Унипорт, симпорт, антипорт
 - Пассивный транспорт, простая диффузия.
 - Облегченная диффузия, модель «пинг-понг»
 - Хемо- и потенциалзависимые ионные каналы
 - Первично и вторично активный транспорт.
 - Na^+ , K^+ - АТФаза, Ca^{++} – АТФаза
 - Симпорт натрия и глюкозы. Антипорт натрия-кальция
 - Эндоцитоз и экзоцитоз. Виды пиноцитоза.
6. Трансмембранная передача и усиление сигнала.

7. Повреждение мембран активными формами кислорода. Перекисное окисление липидов (ПОЛ): механизм, влияние на структуру и свойства мембран. Защита мембран от ПОЛ и репарация окислительных повреждений.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА:

Заполнить таблицу «Липиды мембран».

Название	Строение (формула)
Фосфолипиды	
Производные глицерина: Фосфатидная кислота Фосфатидилхолин Фосфатидилсерин Фосфатидилэтаноламин Фосфатидилинозитолбисфосфат Кардиолипин	
Производное сфингозина: Сфингомиелин	
Гликолипиды	
Производное сфингозина: Глюкоцереброзид Лактозилцерамид	
Холестерин	

РЕФЕРАТЫ

- Токсические формы кислорода, их физиологическая роль и токсическое действие на мембраны клеток.
- Перекисное окисление липидов, его роль в норме и патологии

**УЧЕБНО МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ
ДИСЦИПЛИНЫ.**

а).Основная литература

- 1.Биохимия:Учебник/ Под ред.Е.С.Северина.-М:ГЭОТАР-МЕД,Изд.-2009.-768с.Режим доступа:ЭБС «Консультант студента»
<http://www.studmedlib.ru>.
- 2.Николаев А.Ю.Биологическая химия.-3-е изд.Пер.и доп.-М:Медицинское информационное агенство.-2007.-566с.
- 3.Биологическая химия с упражнениями и задачами:учебник/ под ред. С.Е.Северина (авт.:С.Е.Северин,Л.В.Авдеева,А.Е.Губарева и др.).- М.:ГЭОТАР-Медия,2011.-Режим доступа:<http://www.studmedlib.ru>.

б).Дополнительная литература

1. Биологическая химия: Учебник/Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.-3-е изд., пер. и доп. – М.- Мед-на.-2002.
2. Биологическая химия: Учебник/Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – 2-е изд., перераб.и доп.- М.: Высш.Шк., 1998.
3. Биологическая химия: Учебник/Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – 3-е изд., испр.-М.: Высш.Шк., 2002.
4. Биохимия человека: в 2-х т. Т.1 / Марри Р., Грениер Д., Мейес П., Родуэлл В. – М.: Мир, 1993.
5. Биохимия человека: в 2-х т. Т.2 / Марри Р., Грениер Д., Мейес П., Родуэлл В. – М.: Мир, 1993.
6. Биохимия с упражнениями и задачами Электронный ресурс; учебник для вузов / под ред. чл.-корр. РАН Е.С. Северина. – М: ГЭОТАР-Медиа, 2010.-384с.: ил. – Режим доступа: <http://studmedlib.ru>
7. биохимия: краткий курс с упражнениями и задачами / Под ред. Члена-корреспондента РАН, проф. Е.С. Северина, проф. А.Я. Николаева / Северин Е.С., Николаев А.Я. –М: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 448с.:ил.
8. Биохимия для врача / А.Ш. Бышевский, О.А. Терсенов. – Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994.-384с.

-
9. Биохимия и молекулярная биология: Учеб. Пособие / В. Эллиот;
Под. Ред. А.И. Арчакова. – М.: Изд. НИИ биохимической химии
РАМН, 2000. – 366с.

1. Албертс Б. И др. Молекулярная биология клетки. В 3-х тт.– М., 1993
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия.– М., 1998
3. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. / Под ред. Северина Е.С., Николаева А.Я.–М., 2001
4. Биохимия. Учебник / под ред. Е.С.Северина.– М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003 -784с.
5. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача.– Екатеринбург, 1994
6. Гринстейн Б., Гринстейн А. Наглядная биохимия.– М., 2000
7. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы патохимии.– СПб., 2000.
8. Керридж Д., Типтон К. Биохимическая логика. Количественные задачи для студентов.– М., 1974.
9. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия.– М., 1998
10. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия.– М., 2000
11. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т. – М.: Мир, 1985. – Т. 1, 2, 3.
12. Марри Р. и др. Биохимия человека. В 2-х тт.– М., 1993
13. Маршалл В.Д. Клиническая биохимия.– М., 2000.
14. Мецлер Д. Биохимия.– М., 1980
15. Николаев А.Я. Биологическая химия.– М., 2001
16. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия.– М., 1987
17. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология.– М., 2000