

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 вторая

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ЗАНЯТИЕ № 1

ТЕМА: ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ И ВСАСЫВАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕВАРИВАНИЯ. ОБЩИЕ ПУТИ ОБМЕНА АМИНОКИСЛОТ. ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА.

Цель: Составить представление о пуле аминокислот в клетке, путях транспорта аминокислот через клеточные мембраны и их расщепление в метаболизме. Познакомиться с процессами дезаминирования аминокислот и с путями обезвреживания аммиака.

Аминокислоты - основная составляющая часть белков, которые занимают особое место в организации структур организма, его метаболизме. Аминокислоты участвуют не только в построении белков, но их производные являются биологически активными веществами, компонентами сложных белков. Метаболизм аминокислот служит источником энергии, особенно при голодании, сахарном диабете и т.д. При распаде аминокислот (единственном источнике азота для живой клетки) выделяется токсичное вещество-аммиак, который утилизируется различными способами. При нарушении путей выведения аммиака из организма развиваются патологические состояния-гипераммониемии

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Роль белков в питании человека. Азотистый баланс и его виды. Заменимые и незаменимые аминокислоты. Норма потребления белка, коэффициент изнашивания, физиологический белковый минимум.
2. Ферменты, переваривающие белки в желудке (оптимум рН-действия, специфичность действия, результат действия). Механизм образования соляной кислоты и ее физиологическая роль.
Ферменты-пептидазы тонкого кишечника (оптимум рН-действия, специфичность действия, результат действия).
3. Протеолиз эндогенных белков. Факторы, ускоряющие их деградацию: денатурация, активация лизосом. Протеосомы, убиквитин – зависимая система деградации белков.
4. Механизмы всасывания аминокислот в кишечнике. Транспорт аминокислот через клеточные мембраны: транспортные системы для аминокислот с разными радикалами, гамма-глутамильный цикл.
5. Общая схема путей поступления аминокислот в клетку и пути их использования
6. Общие пути катаболизма аминокислот (схема, общий вид реакций).
7. Прямое окислительное дезаминирование аминокислот: условия протекания, субстраты, ферменты, кофактор, общее уравнение реакции, продукты.
8. Глутаматдегидрогеназа: строение фермента, кофактор, уравнение реакции, регуляция фермента соотношением концентраций НАДН, АТФ+ГТФ/АДФ+ГДФ. Физиологическая роль глутаматдегидрогеназы в обмене азота аминокислот.
9. Трансаминирование аминокислот. Общее уравнение процесса, субстраты, кофактор и механизм протекания процесса через образование шиффовых оснований. Биологическая роль трансаминаз, клиническое значение определения трансаминаз.
10. Непрямое дезаминирование аминокислот: общая схема процесса, ферменты, субстраты, кофакторы, роль глутамата.
11. Токсичность аммиака, пути его образования и способы утилизации.

12. Синтез и распад глутамина – основной путь утилизации аммиака. Использование амидной группы глутамина в синтезе мочевины, солей аммония, пуриновых нуклеотидов и т.д.
13. Утилизация аммиака в орнитинном цикле мочевинообразования (химизм процесса, локализация различных этапов, регуляция, количество выводимой мочевины в сутки, энергетические затраты).
14. Наследственные нарушения орнитинового цикла – гипераммониемии, их основные причины и проявления.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Характеристика протеолитических ферментов».

Фермент	Место действия	Оптimum pH	Субстратная специфичность
1. Пепсин			
2. Химотрипсин			
3. Трипсин			
4. Эластаза			
5. Карбоксипептидазы А и В			
6. Аминопептидаза			
7. Дипептидазы			
8. Реннин			
9. Гастрин			

РЕФЕРАТЫ

- Гипераммониемии, их причины и клинические проявления.
- Механизмы всасывания аминокислот в кишечнике. Транспорт аминокислот через клеточные мембраны

Литература

1. Клиническая биохимия (электронный ресурс): учебное пособие / под ред. В.А. Ткачука. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008-264с. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>.
2. Биохимия (текст): рук-во к практ. занятиям: учебное пособие / Н.Н. Чернов (и др.); под ред. Н.Н. Чернова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009-234с.: ил.

ЗАНЯТИЕ № 2

ТЕМА: ОБЩИЕ ПУТИ ОБМЕНА АМИНОКИСЛОТ. ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ. БИОГЕННЫЕ АМИНЫ, ИХ БИОРОЛЬ. ОБМЕН ФЕНИЛАЛАНИНА И ТИРОЗИНА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ. КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНИЛПИРУВАТА В МОЧЕ.

Цель: Рассмотреть судьбу безазотистого остатка аминокислот, пути получения и обезвреживания биогенных аминов и других физиологически активных веществ. Уметь оценить полученные результаты по качественному определению фенилпирувата в моче с точки зрения клинической практики и количественного определение мочевины в сыворотке крови.

Кроме общих путей распада аминокислот существуют и специфические пути превращений почти всех аминокислот, в том числе карбоксилирование. Практически все пути распада аминокислот ведут к образованию аммиака, который утилизируется, в основном, через синтез мочевины. Уровень мочевины в крови- важный гомеостатический фактор.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Судьба безазотистого остатка аминокислот.
 - а) Кетогенные (тре, илей, лей, трипт, лиз, фен, тир) аминокислоты.
 - б) Глюкогенные (ала, гли, сер, цис, тре, асп, тир, фен, вал, мет, гис, про, арг) аминокислоты.
 - в) Синтез заменимых аминокислот (ала, асп, асн, сер, гли, глу, глн, про).
 - г) Анаплеротические реакции пополнения общего пути катаболизма.
2. Декарбоксилирование аминокислот, общий вид реакции, фермент, кофермент, продукты.
 - а) продукты реакции декарбоксилирования, уравнение получения следующих биогенных аминов и их биороль:
 - путресцина и его производных – спермина, спермидина. Роль S-аденозил-метионина в их синтезе.
 - гистамина
 - серотонина
 - ГАМК
 - б) инактивация биогенных аминов
 - метилирование с участием SAM гистамина, адреналина
 - окислительное дезаминирование монооксидазами (MAO) дофамина, норадреналина, серотонина, ГАМК. Схема процесса, кофактор MAO.
3. Обмен фенилаланина и тирозина в печени и других тканях и возможные его нарушения.
 - катаболизм фенилаланина и тирозина в печени
 - превращение тирозина в меланоцитах
 - превращение тирозина в щитовидной железе
 - превращения тирозина в надпочечниках и нервной ткани
4. Участие аминокислот в обмене одноуглеродных фрагментов
 - Доноры одноуглеродных фрагментов (глицин, серин и метионин)
 - Фолиевая кислота как переносчик одноуглеродных фрагментов, ее коферментные формы и активные группы в них.

- Синтез S-аденозинметионина, его роль в обмене одноуглеродных фрагментов, регенерация гомоцистеина.
5. Количественное определение мочевины в сыворотке крови.
 6. Качественное определение фенилпирувата в моче.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Количественное определение мочевины в сыворотке крови.

Принцип метода. Диацетилмонооксим в кислой среде и в присутствии тиосемикарбазида и ионов трехвалентного железа образует с мочевиной красный комплекс.

Техника выполнения.

Реагенты	Контроль	Калибровочная проба	Опыт
1. Вода дистиллированная	0,1 мл	—	—
2. Сыворотка	—	—	0,1 мл
3. Эталонный раствор	—	0,1 мл	—
4. Рабочий реактив	2 мл	2 мл	2 мл

Смешать реактивы, на 10 минут поместить в кипящую водяную баню все три пробирки, предварительно закрыв их отверстие фольгой. Затем быстро охлаждают все пробирки водой и колориметрируют при длине волны 490-540 нм (темно-зеленый светофильтр) с опытную и калибровочную пробы против контроля в кюветах толщиной 0,5 см. Формула для расчета: $A_{оп}/A_э \times 16,6$ (ммоль/л).

Норма содержания мочевины в крови: 2,5-8,3 ммоль/л., в моче-330-580 ммоль/сут. Уровень мочевины в крови характеризует выделительную функцию почек. При повышении уровня мочевины крови свыше 10,0мМ наступает уремия. Повышение уровня мочевины может носить и внепочечный характер (потеря жидкости, усиленный распад белков, повышенное употребление белка с пищей).

Опыт № 2: Качественное определение фенилпирувата в моче.

Принцип метода. Фенилпируват образует с Fe^{3+} комплексное соединение, окрашенное в сине-зеленый цвет.

Техника выполнения. К 2 мл свежееотфильтрованной мочи приливают 1-2 капли 10% раствора $FeCl_3$. При наличии фенилпирувата через 30-60 секунд разливается сине-зеленая окраска, которая постепенно бледнеет.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу

Заболевание	Причины	Симптомы	Лечение
1. Фенилкетонурия (классическая и вариантная)			
2. Алкаптонурия			
3. Альбинизм			
4. Паркинсонизм			
5. Тирозинемия (I, II типа, новорожденных)			
6. Гиперглицинемия			
7. Глицинурия			
8. Первичная гипероксалатурия			
9. Гомоцистинурия			

РЕФЕРАТЫ

- Моноаминоксидаза, строение, формы, специфичность. Лекарственные препараты как ингибиторы моноаминоксидазы.
- S-аденозилметионин и его роль в метаболизме.

Литература

1. Клиническая биохимия (электронный ресурс): учебное пособие / под ред. В.А. Ткачука.-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008-264с. – Режим доступа:<http://www.studentlibrary.ru>.
 2. Биохимия (текст): рук-во к практ. занятиям: учебное пособие / Н.Н.Чернов (и др.); под ред. Н.Н.Чернова.-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009-234с.:ил.
-
-

ЗАНЯТИЕ № 3

ТЕМА: ОБМЕН ГЕМА И ЖЕЛЕЗА. НАРУШЕНИЯ ИХ ОБМЕНА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА – ОБЩЕГО И «ПРЯМОГО» - В КРОВИ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГЕМ.

Цель: Научиться интерпретировать клинические результаты содержания в крови «прямого» и общего билирубина на основе теоретических знаний метаболизма гема. Оценить клиническое значение проведения качественных реакций на гем.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Общая схема синтеза гема, место протекания процесса.
2. Регуляция синтеза гема:
 - Аллостерическая регуляция ферментов АЛК-синтазы и АЛК-дегидратазы (концентрацией гема, пиридоксальфосфата и его лекарственными аналогами, солями Pb^{2+})
 - Регуляция на уровне трансляции ферментов АЛК-синтазы и АЛК-дегидратазы (концентрацией железа, стероидами, барбитуратами, эстрогенами, сульфаниламидами)
3. Нарушения синтеза гема. Порфирии: причины, симптомы, лечение.
 - Острая перемежающаяся порфирия.
 - Врожденная эритропоэтическая порфирия.
 - Тяжелая кожная порфирия.
4. Катаболизм гемоглобина. Схема распада гема. Метаболизм билирубина, «прямой» и «непрямой» билирубин.
5. Желтухи: причины, симптомы.
 - Гемолитическая желтуха
 - Желтуха новорожденных
 - Обтурационная желтуха
 - Паренхиматическая желтуха
 - Наследственная желтуха
6. Обмен железа: биороль железа в организме, источники поступления
 - Условия всасывания железа в кишечнике
 - Транспорт железа в крови, депонирование и поступление в клетки; роль церулоплазмينا, ферритина, трансферрина.
 - Регуляция поступления железа в клетки. Регуляция скорости синтеза апоферритина и рецепторов трансферрина.
7. Нарушения метаболизма железа. Железодефицитная анемия, гемохроматоз.
8. Количественное определение содержания «общего» и «прямого» билирубина в сыворотке крови (норма содержания, принцип метода, расчет).
9. Методы обнаружения гема гемоглобина: физический (спектральный анализ гемоглобина и его производных); физико-химический (получение кристаллов солянокислого гема).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Определение содержания общего билирубина в сыворотке крови.

Принцип метода. Билирубин вступает в реакцию с диазотированной сульфаниловой кислотой с образованием раствора азокрасителя зеленого цвета, который фотометрируют в присутствии акцелератора.

Техника выполнения.

Реагенты	Контроль	Опыт
1.Сыворотка	0,2 мл	0,2 мл
2.Реагент I	0,2 мл	0,2 мл
3.Реагент IV	—	0,05 мл
4.Реагент III	1 мл	1 мл
5.Вода дистиллированная.	0,05 мл	—

Пробы тщательно перемешивают, инкубируют 15 минут при комнатной температуре.

6.Реагент II	1 мл	1 мл
--------------	------	------

Пробы перемешать. Через 5 минут измеряют оптическую плотность опытной пробы при 590 нм против контрольной пробы в кювете толщиной 0,5 см.

Расчет: $A_{оп} \times 325$ (мкмоль/л).

В норме общий билирубин крови составляет: 8,5-20,5 мкмоль/л.

Опыт № 2: Определение содержания «прямого» билирубина в сыворотке крови.

Принцип метода. Билирубин вступает в реакцию с диазотированной сульфаниловой кислотой с образованием раствора красителя розового- фиолетового цвета, который фотометрируют в отсутствие акцелератора.

Техника выполнения.

Реагенты	Контроль	Опыт
1.Сыворотка	0,4 мл	0,4 мл
2.Реагент I	0,4 мл	0,4 мл
3.Реагент IV	—	0,1 мл
4.0,9% NaCl	2 мл	2 мл
5.Вода дистиллированная	0,1 мл	—

Пробы перемешать. Колориметрировать опытную пробу через 5 минут при 540 нм против контроля в кювете толщиной 0,5 см.

Расчет: $A_{оп} \times 284$ (мкмоль/л)

В норме «прямой» билирубин крови составляет до 5,1 мкмоль/л.

Опыт № 3. Спектральный анализ гемоглобина крови и его производных.

Гемоглобин (Hb) состоит из белка глобина и простетической группы гема, содержащего двухвалентное железо. Гемоглобин соединяясь с кислородом воздуха, образует оксигемоглобин – HbO₂. При действии на кровь сильных окислителей двухвалентное железо гемоглобина окисляется в трехвалентное, гемоглобин превращается в метгемоглобин (МНб) и теряет способность присоединять кислород. Гемоглобин и его производные обладают способностью поглощать волны света различной длины и давать характерные спектры поглощения. Исследование спектров поглощения гемоглобина и его производных имеет большое значение в диагностике ряда отравлений (в судебно-медицинской практике и при определении степени профессиональной вредности производства). Если перед источником света поместить пробирку с водным раствором гемоглобина или его производных, то эти вещества будут поглощать часть лучей определенной длины, в результате чего в этих местах появятся чёрные полосы.

Спектр поглощения гемоглобина и его производных.

Техника выполнения.

Реагенты	HbO ₂	Hb	МетHb
Дистиллированная вода	2 мл	2 мл	2 мл
Кровь	1 капля	1 капля	1 капля

Реактив Стокса (аммиачный раствор виннокислого железа)	–	5–8 капель	–
Раствор 5 % $K_3[Fe(CN)_6]$	–	–	5–7 капель

Полученный в каждой из пробирок раствор рассматривают в спектрокопе.

Спектр поглощения оксигемоглобина

Раствор оксигемоглобина даёт две тонкие полосы поглощения в жёлто-зелёном участке спектра.

Спектр поглощения гемоглобина

Двухвалентное железо реактива Стокса легко окисляется, отнимая от оксигемоглобина кислород и превращая его в дезоксигемоглобин. В спектре появляется одна широкая полоса в желто-зеленой части.

Спектр поглощения метгемоглобина

Жидкость приобретает бурый цвет. В спектре видны три полосы поглощения: две тонкие в желто-зеленой части спектра и третья, наиболее характерная, в красной части спектра. Две полосы в сине-фиолетовой части спектра наш глаз не улавливает.

Зарисовать спектры поглощения гемоглобина и его производных в протокол.

Опыт № 4. Получение кристаллов солянокислого гемина (кристаллов Тейхмана).

Принцип метода. При нагревании крови с ледяной уксусной кислотой гемоглобин распадается на гемм и глобин. Если гидролиз проводить в присутствии уксусной кислоты, содержащей галогеновые соли, гем превратится в солянокислую соль – гемин, которая представляет собой соли ромбовидной формы. Гемин отличается от гема наличием трехвалентного железа, соединенного с атомом хлора.

Техника выполнения. На предметное стекло капнуть каплю крови и сделать мазок. Осторожно подсушить его, держа высоко над пламенем горелки. На мазок нанести 2–3 капли раствора NaCl в уксусной кислоте, покрыть покровным стеклом. Нагреть мазок над пламенем горелки до закипания жидкости под покровным стеклом. Охладить. Посмотреть под микроскопом под средним увеличением. Кристаллы солянокислого гемина видны в виде бурых палочек.

Зарисуйте их.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Дифференциальная диагностика желтух различных типов».

Тип желтухи	Кровь			Моча		Кал
	Билирубин общий	Билирубин не прямой	Билирубин прямой	Билирубин прямой	Уробилиноген	Стеркобилин-ген
Гемолитическая						
Паренхиматозная						
Обтурационная						

РЕФЕРАТЫ.

- Наследственные нарушения синтеза гема. Порфирии.
- Нарушения обезвреживания и выведения билирубина. Желтухи.
- Нарушение обмена железа: железодефицитная анемия, гемохроматоз.

ЗАНЯТИЕ № 4

ТЕМА: ТОКСИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА И МЕХАНИЗМ ИХ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ.

Цель: Составить представление о механизмах обезвреживания токсических веществ в организме, образовании и роли токсических форм кислорода. Научиться клинически оценивать значения активности каталазы сыворотки крови.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ

1. Активные формы кислорода: супероксид анион, пероксид водорода, гидроксильный радикал, пероксинитрит. Место и причины образования активных форм кислорода (АФК), причины токсичности. Физиологическая роль АФК.
2. Роль АФК в ПОЛ, окисление белков и нуклеиновых кислот (примеры).
3. Обезвреживание АФК. Ферментная антиоксидантная система (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза). Схемы процессов, биороль, место протекания.
4. Неферментная антиоксидантная система (витамины А, Е, С), механизм действия биороль.
5. Обезвреживание ксенобиотиков в организме. Микросомальная система окисления, роль цитохрома P₄₅₀ (схема процесса, место протекания, регуляция активности).
6. Фаза конъюгации в системе обезвреживания токсических веществ. Виды конъюгации, ферменты процесса (примеры реакций конъюгации с ФАФС, УДФГК).
7. Гниение белков в кишечнике, обезвреживание продуктов гниения.
8. Связывание, транспорт и выведение ксенобиотиков. Роль альбумина, металлотеоина и Р-гликопротеина.
9. Активация канцерогенов защитными ферментными системами организма. Канцерогенность нитритов и полиароматических соединений.
10. Обезвреживание этилового спирта в печени. Биологическое значение NAD-зависимой алкогольдегидрогеназы, P₄₅₀-зависимой микросомальной этанолокисляющей системы, каталазы. Метаболизм и токсичность ацетальдегида.
11. Количественное определение каталазы крови.
12. Обнаружение действия пероксидазы и 17-кетостероидов в моче.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Количественное определение каталазы крови.

Принцип метода: молибдат аммония с H₂O₂ образует комплексное соединение желтого цвета, количество которого оценивается колориметрически.

Техника выполнения.

табл.1

Реактивы	Контрольная проба	Опытная проба
1. сыворотка (кровь)	-	0,2 мл
2. H ₂ O ₂ (0,033%) разведение 1: 1000	3,0 мл	3,0 мл
инкубация 10 минут при 37 ⁰ С		

3. раствор молибдата аммония (4%)	1,5 мл	1,5 мл
4. Вода	0,2 мл	-

Пробы тщательно перемешивают, и определяют оптическую плотность опытной (Аоп) и контрольной пробы (Ак) против кюветы с дистиллированной водой на фотоэлектроколориметре при длине волны 400 нм

Расчет:

Активность каталазы = (0,391 + 2,63 *ΔА) * 33,3 (мг Н₂О₂ / мкл крови),

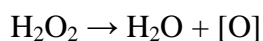
где ΔА - разница Ак - Аоп

Норма – 22,7 – 34,7 мг Н₂О₂/ мкл крови

Резкое повышение каталазы крови наблюдается при малой бета – талассемии, повышение – при бета – талассемии. Понижение – при железодефицитной анемии.

Опыт № 2 : Обнаружение действия пероксидазы.

Принцип метода: Пероксидаза вызывает окисление ряда веществ за счет атомарного кислорода, образующегося при разложении Н₂О₂ по схеме:



Субстрат +[O] → продукт окисления субстрата

Техника выполнения.

табл.2

№ пробирок	Экстракт хрена (пероксидаза)	Пирогаллол	Н ₂ О ₂ 1% р-р	вода
1	-	0,5 мл	2 капли	2 мл
2	2 мл	0,5 мл	-	-
3	2 мл	0,5 мл	2 капли	-
4	2 мл (прокипяченной вытяжки)	0,5 мл	2 капли	-

Перемешивают пробы и наблюдают за изменением цвета жидкости в пробирках. Объясните результат опыта.

Опыт № 3: Обнаружение 17 – кетостероидов в моче.

Принцип метода: метод основан на взаимодействии продуктов окисления стероидных гормонов (17 – кетостероидов) с н – динитробензолом в щелочной среде, что приводит к образованию продуктов конденсации розово – фиолетового цвета.

Техника выполнения: К 4 – 5 каплям мочи добавить 4 – 5 капель 2% раствора н – динитробензола в спирте и 2 – 3 капли концентрированного раствора КОН. Появляется розово – фиолетовое окрашивание.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Характеристика АФК»

Активные формы кислорода	Свойства	Токсичность
ОН [•]		
Н ₂ О ₂		
О ₂ ⁻		
NOO [•]		

РЕФЕРАТЫ

- Активные формы кислорода, их образование и механизм действия, биороль.
 - Система цитохрома P₄₅₀, его роль в микросомальном окислении веществ.
 - Метаболизм этанола в организме человека.
-
-

ЗАНЯТИЕ № 5

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ: ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ. ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ. ОБМЕН ГЕМА И ЖЕЛЕЗА. ЗАЩИТНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ И НЕФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Роль белков в питании, нормы, азотистый баланс, коэффициент изнашивания, физиологический белковый минимум. Белковая недостаточность.
2. Переваривание белков в ЖКТ. Характеристика пептидаз желудка, образование и роль соляной кислоты.
3. Характеристика пептидаз поджелудочной железы и тонкого кишечника (специфичность действия, рН действия, результат действия). Защита клеток от действия пептидаз.
4. Всасывание продуктов переваривания в кишечнике. γ -глутамильный цикл в гепатоцитах, его биологическое значение. Медицинское значение определения γ -глутамилтранспептидазы в крови.
5. Пул аминокислот в клетке, общая схема поступления и расходования аминокислот. Общая схема путей распада аминокислот. Особенности распада 3, 4, 5-углеродных аминокислот.
6. Биосинтез заменимых аминокислот.
7. Кетогенные и гликогенные аминокислоты. Анаплеротические реакции, синтез заменимых аминокислот (пример).
8. Дезаминирование аминокислот: прямое (окислительное, гидролитическое, внутримолекулярное, восстановительное). Схемы реакций, биороль.
9. Окислительное дезаминирование глутамата: уравнение реакции, кофактор, место протекания, регуляция процесса, биороль.
10. Трансаминирование: схема процесса, ферменты, биороль. Биороль АлАТ и АсАТ и клиническое значение их определения в сыворотке крови.
11. Непрямое дезаминирование: схема процесса, ферменты, кофакторы, биороль.
12. Декарбоксилирование аминокислот. Общий вид реакций, ферменты, кофактор. Синтез и биороль: путресцина, спермидина, спермина.
13. Синтез и биороль ГАМК, гистамина и NO.
14. Синтез и биороль серотонина и мелатонина
15. Синтез и биороль катехоламинов и меланинов.

16. Аминокислоты как источники метильных групп. Синтез S-аденозилметионина. Его роль в синтезе креатина, адреналина, фосфатадилхолина, метилирование ДНК.
17. Обезвреживание биогенных аминов. Роль моноаминоксидаз, общий вид реакций, кофактор. Метилирование катехоламинов.
18. Токсичность аммиака, его образование и обезвреживание.
19. Транспорт аммиака в печень и почки. Синтез глутамина, Распад глутамина. Роль глутамина в метаболизме клетки.
20. Синтез мочевины. Орнитиновый цикл. Субклеточная локализация. Энергетика процесса.
21. Гипераммониемии. Виды. Причины. Симптомы протекания заболевания. Метод
22. Количественного определения мочевины в сыворотке крови.
23. Метаболизм фенилаланина и тирозина. Нарушение обмена фенилаланина и тирозина: альбинизм, базедова болезнь, алкаптонурия, фенилкетонурия. Реакция качественного обнаружения фенилпирувата в моче.
24. Метаболические дефекты при классической и атипичной фенилкетонурии. Основные проявления, терапевтическая тактика.
25. Общая схема синтеза гема. Нарушения синтеза гема-порфирии. Интоксикация свинцом.
26. Регуляция синтеза гема. Аллостерическая регуляция активности ферментов АЛК-синтазы и АЛК-дегидратазы гемом, железом и лекарственными препаратами. Регуляция на уровне транскрипции ферментов.
27. Общая схема распада гема. «Прямой» и «непрямой» билирубин, клиническое значение его определения.
28. Желтухи. Виды, причины возникновения. Количественное определение содержания «общего» и «прямого» билирубина в сыворотке крови (норма, принцип метода, расчет).
29. Обмен железа: источники железа в организме, всасывание, транспорт в крови, депонирование.
30. Нарушение обмена железа: железодефицитная анемия, гемохроматоз, токсичность железа.
31. Методы обнаружения гема гемоглобина: физический (спектральный анализ гемоглобина и его производных); физико-химический (получение кристаллов солянокислого гемина).

32. Активные формы кислорода: супероксид анион, пероксид водорода, гидроксильный радикал, пероксинитрит. Их образование, причины токсичности. Физиологическая роль АФК.
33. Роль активных форм кислорода в ПОЛ, окисление белков и нуклеиновых кислот (примеры).
34. Обезвреживание активных форм кислорода. Ферментная антиоксидантная система (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза). Схемы процессов, биороль, место протекания.
35. Неферментная антиоксидантная система (витамины А, Е, С), механизм действия биороль.
36. Обезвреживание ксенобиотиков в организме. Микросомальная система окисления, роль цитохрома P₄₅₀ (схема процесса, место протекания, регуляция).
37. Фаза конъюгации в системе обезвреживания токсических веществ. Виды конъюгации, ферменты (примеры реакций с ФАФС, УДФГК).
38. Связывание, транспорт и выведение ксенобиотиков. Роль альбумина, металлопротеина и Р-гликопротеина.
39. Гниение белков в кишечнике, обезвреживание продуктов гниения.
40. Активация канцерогенов защитными ферментными системами организма. Канцерогенность нитратов и полиароматических соединений.
41. Обезвреживание этилового спирта в печени. NAD-зависимая алкогольдегидрогеназа, P₄₅₀-зависимая микросомальная этанолюкисляющая система, каталаза. Метаболизм и токсичность ацетальдегида.
42. Количественное определение каталазы крови, обнаружение действия пероксидазы и наличия 17-кетостероидов в моче.

ЗАНЯТИЕ № 6

ТЕМА: БИОСИНТЕЗ И РАСПАД ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.

Цель: Составить представление о структуре нуклеиновых кислот и рассмотреть метаболизм и регуляцию пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА

- Знать и уметь изобразить структурные формулы азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, которые входят в состав РНК и ДНК.
- Уметь изобразить фрагмент первичной структуры РНК и ДНК.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Структура, номенклатура и биологическая роль пуриновых и пиримидиновых рибозидов и дезоксирибонуклеотидов.
2. Переваривание нуклеиновых кислот пищи.
3. Биосинтез пуриновых нуклеотидов DE NOVO. Происхождение С и N в пуриновом кольце. Синтез АМФ и ГМФ из ИМФ. Образование ГТФ и АТФ. «Запасные» пути синтеза пуриновых нуклеотидов. Регуляция.
4. Катаболизм пуриновых нуклеотидов до мочевого кислоты. Нарушение обмена пуриновых нуклеотидов. Гиперурикемия, подагра и синдром Леша-Нихена. Лечение гиперурикемии.
5. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов DE NOVO. Образование УМФ, УДФ, УТФ и цитидиловых нуклеотидов. «Запасные» пути синтеза пиримидиновых нуклеотидов. Регуляция.
6. Биосинтез дезоксирибонуклеотидов. Рибонуклеотидредуктазный комплекс. Биосинтез тимидиловых нуклеотидов. «Запасные» пути синтеза дезоксирибонуклеотидов. Регуляция. Нарушение в работе РНР.
7. Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов. Нарушения обмена пиримидиновых нуклеотидов. Оротацидурия.
8. Ферменты синтеза рибозидов и дезоксирибонуклеотидов как мишени для действия противовирусных и противоопухолевых препаратов.
9. ДНК и РНК – черты сходства и различия состава, первичной структуры, локализации в клетке, функции.
10. Вторичная структура ДНК. Связи, стабилизирующие вторичную структуру ДНК. Антипараллельность. Суперспирализация. Двойная спираль ДНК. Правило Чаргаффа.
11. Гибридизация нуклеиновых кислот. Денатурация и ренатурация ДНК. Молекулярная гибридизация ДНК–ДНК и ДНК–РНК.
12. Количественное определение мочевого кислоты в сыворотке крови.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Количественное определение мочевой кислоты в сыворотке крови.

Принцип метода. Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамный реактив с образованием соединения голубого цвета.

Техника выполнения.

Реагенты	Контроль	Калибровочная проба	Опыт
1. Вода дистиллированная	—	—	4 мл
2. Сыворотка	—	—	0,5 мл
Перемешать			
3. H ₂ SO ₄ (0,35 М)	—	—	0,25 мл
4. Раствор вольфрамата натрия	—	—	0,25 мл
Перемешать, центрифугировать 5 мин при 3000 об/мин			
5. Надосадочная жидкость	—	—	2 мл
6. Калибровочный раствор мочевой кислоты	—	2 мл	—
7. Вода дистиллированная	2 мл	—	—
8. Раствор карбоната натрия	1 мл	1 мл	1 мл
9. Фосфорновольфрамный реактив	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Перемешать, через 30 минут колориметрируют при 670нм против контроля в кювете 0,5 см.			

С 1 по 4 пункты выполняет лаборант.

С 5 пункта студенты работают с надосадочной жидкостью.

Расчет: $C = A_{оп}/A_{к} \times 30 \times 10$, где 30 мкмоль/л – концентрация мочевой кислоты в калибровочном растворе, 10 – пересчет на разбавление сыворотки.

В норме: мужчины – 240–500 мкмоль/л женщины – 160–400 мкмоль/л

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Регуляторные ферменты синтеза пуриновых нуклеотидов и их ингибиторы».

Названия ферментов	Ингибиторы

Заполнить таблицу «Характеристики синтеза дезоксирибонуклеотидов».

Компоненты реакций	Биосинтез dАДФ, dГДФ, dУДФ, dЦДФ.	Биосинтез dТМФ.

РЕФЕРАТЫ

- Гиперурикемия и подагра. Синдром Леша-Нихена.
- Оротацидурия.

ЗАНЯТИЕ № 7

ТЕМА: НУКЛЕОПРОТЕИНЫ. БИОСИНТЕЗ ДНК (РЕПЛИКАЦИЯ) И РЕПАРАЦИЯ.

Цель: Составить представление о механизмах репликации и репарации ДНК. Установить состав дезоксирибонуклеопротеинов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Третичная структура ДНК. Уровни структурной организации хроматина (нить нуклеосом, нуклеосомное волокно, соленоид, петли, мини-диски, хромосома). Роль гистоновых и негистоновых белков в компактизации ДНК. Организация хроматина: эухроматин и гетерохроматин. Ковалентная модификация гистонов и ее роль в регуляции структуры и активности хроматина.
2. Матричные биосинтезы. Репликация. Определение. Принципы репликации ДНК (комплементарность, антипараллельность, полуконсервативность, униполярность, двунаправленность, согласованность репликации и клеточного деления). Стадии репликации.
3. Репликация у прокариот. Инициация. Белки и ферменты, принимающие участие в формировании репликативной вилки: ДНК-хеликаза, ДНК-топоизомеразы, SSB-белки, ДНК-праймаза.
4. Элонгация и терминация. Виды и функции ДНК полимераз, обеспечивающих репликацию у прокариот. Асимметричный синтез ДНК (лидирующая и отстающая цепи). Фрагменты Оказаки. Корректирующая активность ДНК-полимераз. Роль ДНК-лигазы в формировании непрерывной отстающей цепи.
5. Особенности репликации у эукариот
6. Строение 3', 5'- концев цепей ДНК. Теломерная ДНК. Синтез теломерной ДНК.
7. Повреждения и репарация ДНК. Спонтанные повреждения ДНК: ошибки репликации, депуринизация, дезаминирование. Индуцируемые повреждения факторами радиационной и химической природы. Способы репарации. Белки и ферменты, принимающие участие в репарации. Дефекты репарационных систем и наследственные болезни.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Гидролиз дезоксирибонуклеопротеинов (ДНП) дрожжей и обнаружение компонентов ДНП в гидролизате.

Дрожжевые клетки богаты нуклеопротеидами. Проводят кислотный гидролиз дрожжей и ниженазванными реакциями определяют продукты гидролиза.

Техника выполнения. В широкую пробирку с воздушным холодильником поместить 1 лопаточку сухих дрожжей и добавить 10 мл 10% раствора H_2SO_4 . Поставить

пробирку в кипящую водяную баню на 1 час. После гидролиза пробирку охладить и проделать с гидролизатом дрожжей качественные реакции на составные части ДНП.

Качественные реакции на составные части ДНП:

(1) Биуретовая реакция на полипептиды (белок). К 5 каплям гидролизата добавляют 10–12 капель 10 % раствора едкого натра и 2 капли 1 % раствора сульфата меди, появляется розовая или розово-фиолетовая окраска.

(2) Серебряная проба на пуриновые основания (демонстративный опыт). К 10 каплям гидролизата добавляют 10 капель раствора аммиака до щелочной реакции, затем 20 капель 2 % аммиачного раствора нитрата серебра. При стоянии через 3–5 мин. образуется светло-коричневый осадок серебряных солей пуриновых оснований.

(3) Качественная реакция на пентозу (реакция Троммера). К 10 каплям используемой жидкости прибавляют 10 капель 10 % раствора едкого натра и 5 капель 7 % раствора сульфата меди. Осторожно нагреть верхнюю часть содержимого пробирки до закипания и кипятить ровно 1 мин. Появится красное окрашивание.

(4) Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 10 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. Пробирку охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется кристаллический лимонно-желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

В выводе написать схему гидролиза ДНП.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Сравнительная характеристика процесса репликации у эу- и прокариот»

Репликация	Особенности прокариот	Особенности эукариот
Характеристика процесса		
Локализация процесса		
Субстраты		
Источники энергии		
Ферменты, субъединицы ферментов, кофакторы (по стадиям процесса)		
инициация		
элонгация		
терминация		

Заполнить таблицу «Репарация»

Характеристика процесса	
Вид повреждения	Ферменты, белки, обеспечивающие репарацию данного повреждения

ЗАНЯТИЕ № 8

ТЕМА: ГЕНЫ И ГЕНОМ. ТРАНСКРИПЦИЯ. ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ РНК (ПРОЦЕССИНГ). РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ.

Цель: Рассмотреть современные представления о первом этапе реализации генетической информации (биосинтезе белка) и его регуляции.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Ген как функциональная единица ДНК. Организация генома человека. Особенности организации генома эукариот с точки зрения регуляции транскрипции (энхансеры, сайленсоры, цис-элементы). Структура гена эукариот. Мозаичность структурных генов эукариот (экзоны и интроны). Три типа эукариотических генов. Особенности организации генома прокариот. Структура оперона.
2. Транскрипция. Определение. Принципы транскрипции (комплементарность, анти-параллельность, униполярность, беззатравочность, асимметричность). Этапы транскрипции. Транскрипция у прокариот. Характеристика компонентов системы синтеза РНК: субстраты, матрица (кодирующие и некодирующие цепи ДНК, энергетические затраты, ферменты). Структура ДНК-зависимой РНК-полимеразы: роль субъединиц ($\alpha_2\beta\beta'\delta$). Особенности структуры промоторной зоны (бокс Прибнова). Инициация процесса.
3. Элонгация и терминация транскрипции (ρ -независимая, ρ -зависимая терминация)
4. Особенности транскрипции эукариот: три вида ДНК-зависимых РНК- полимераз (I, II, III;), структуры промоторной зоны, белковые базальные факторы транскрипции. Роль белковых факторов TFIID, TFIIN в инициации транскрипции. Структура белков, регулирующих процесс транскрипции.
5. Процессинг первичных транскриптов РНК. Кэпирование 5'-конца, полиаденилирование 3'-области, сплайсинг пре-мРНК. Сплайсосома. Роль мРНК в вырезании интронов и объединении экзонов.
6. Регуляция транскрипции у прокариот. Теория оперона, регуляция по типу индукции и репрессии. Негативная индукция (лактозный оперон) и позитивный контроль работы лактозного оперона (цАМФ-зависимый CAP-белок), позитивная индукция (мальтозный оперон), негативная репрессия (триптофановый, гистидиновый опероны), позитивная репрессия (рибофлавиновый оперон).

7. Механизмы регуляции экспрессии генов у эукариот: организация хроматина в дифференцированных клетках организма, изменение количества генов, гормональная регуляция транскрипции.
8. Посттранскрипционная регуляция у эукариот, обеспечивающая разнообразие белков. Альтернативный сплайсинг. Редактирование РНК.
9. Механизмы генетической изменчивости. Наследственные болезни

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Транскрипция»

Транскрипция	Особенности прокариот	Особенности эукариот
Характеристика процесса		
Локализация процесса		
Субстраты		
Источники энергии		
Характеристика продукта		
Ферменты, субъединицы ферментов, кофакторы		

РЕФЕРАТЫ

- Международная программа «Геном человека», итоги, перспективы.
 - Молекулярные мутации: замены, делеции, вставки нуклеотидов. Частота мутации, зависимость от условий среды (радиация, химические мутагены)
-
-

ЗАНЯТИЕ № 9

ТЕМА: БИОСИНТЕЗ БЕЛКА. ПОСТТРАНЛЯЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ.

Цель: Составить представление о биосинтезе белка и основных механизмах формирования функционально активной молекулы белка.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Биосинтез белков (трансляция). Генетический код и его свойства. Основные компоненты белоксинтезирующей системы: аминокислоты, т-РНК, рибосомы, источники энергии, белковые факторы, ферменты.
2. Строение и функции рибосом. Связывающие и каталитические центры рибосом.
3. т-РНК-адапторная молекула. Активация аминокислот, образование аминоацил-т-РНК. Аминоацил-т-РНК синтетазы, субстратная специфичность.
4. Сборка полипептидной цепи на рибосоме. Образование инициаторного комплекса у прокариот. Последовательность Шайна–Дальгарно. Элонгация: образование пептидной связи (р-ция транспептидации). Транслокация. Транслоказа. Терминация. Роль белковых факторов на каждой из стадий трансляции.
5. Особенности синтеза белка у эукариот.
6. Регуляция биосинтеза белков на уровне трансляции. Изменение скорости трансляции (на примере синтеза глобина, апоферритина).
7. Процессинг первичных полипептидных цепей после трансляции: частичный протеолиз, образование ковалентных связей, присоединение простетических групп, ковалентная модификация аминокислотных остатков (гликозилирование, метилирование, фосфорилирование, ацетилирование).
8. Формирование пространственной структуры белков (фолдинг белков). Ферменты фолдинга (протеинсульфоизомераза, пептидилпролизомераза). Роль шаперонов в фолдинге белка. Классификация шаперонов. Структура шаперониновой системы. Фолдинг белковой молекулы с помощью шаперониновой системы. Прионные белки. Болезни, связанные с нарушением фолдинга белка.
9. Особенности синтеза и процессинга секретируемых белков (на примере коллагена и инсулина).
10. Различия в продолжительности жизни белков. Убиквитинзависимая система протеолиза.
11. Полиморфизм белков и происхождение разнообразия антител.
12. Ингибиторы репликации, транскрипции и трансляции: противоопухолевые и антибактериальные препараты. Вирусы и токсины как ингибиторы матричных синтезов в эукариотических клетках. Интерфероны.

РЕФЕРАТЫ

- Транспозиция V-, D-, J-участков генов иммуноглобулинов как источник многообразия специфичности антител.
 - Технология рекомбинантных ДНК, конструирование химерных молекул ДНК и их клонирование.
 - Ингибиторы биосинтеза белка. Влияние антибиотиков и токсинов на этот процесс.
-
-

ЗАНЯТИЕ № 10

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ: БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ. РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Общая схема синтеза и распада пиримидиновых нуклеотидов. Регуляция. Оротацидурия.
2. Общая схема синтеза и распада пуриновых нуклеотидов. Регуляция. Подагра.
3. Синтез дезоксирибонуклеотидов. Регуляция.
4. Общая схема распада нуклеиновых кислот, ферменты, субстраты, продукты.
5. Азотистые основания, входящие в структуру нуклеиновых кислот – пуриновые и пиримидиновые.
6. Нуклеотиды, содержащие рибозу и дезоксирибозу. Структура. Номенклатура.
7. Первичная структура нуклеиновых кислот. ДНК и РНК – черты сходства и различия состава, локализации в клетке, функции.
8. Вторичная структура ДНК (модель Уотсона и Крика). Связи, стабилизирующие вторичную структуру ДНК. Комплементарность. Правило Чаргаффа. Полярность. Антипараллельность.
9. Гибридизация нуклеиновых кислот. Денатурация и ренатурация ДНК. Гибридизация (ДНК-ДНК, ДНК-РНК). Методы лабораторной диагностики, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот.
10. Третичная структура ДНК. Роль гистоновых и негистоновых белков в компактизации ДНК. Организация хроматина. Ковалентная модификация гистонов и ее роль в регуляции структуры и активности хроматина.
11. Репликация. Принципы репликации ДНК. Стадии репликации. Инициация. Белки и ферменты, принимающие участие в формировании репликативной вилки
12. Элонгация и терминация. Ферменты. Асимметричный синтез ДНК. Фрагменты Оказаки. Роль ДНК-лигазы в формировании непрерывной отстающей цепи.
13. Теломерная ДНК. Синтез теломерной ДНК.
14. Повреждения и репарация ДНК. Виды повреждений. Способы репарации. Дефекты репарационных систем и наследственные болезни.
15. Транскрипция у прокариот. Характеристика компонентов системы синтеза РНК. Структура ДНК-зависимой РНК-полимеразы: роль субъединиц ($\alpha_2\beta\beta'\delta$). Инициация процесса.
16. Элонгация, терминация транскрипции (ρ -независимая, ρ -зависимая терминация)
17. Особенности транскрипции у эукариот. Структура белков, регулирующих процесс транскрипции.
18. Первичный транскрипт и его процессинг. Рибозимы как пример каталитической активности нуклеиновых кислот. Биороль.
19. Регуляция транскрипции у прокариот. Теория оперона, регуляция по типу индукции и репрессии (примеры).
20. Механизмы регуляции экспрессии генов у эукариот.
21. Посттранскрипционная регуляция у эукариот, обеспечивающая разнообразие белков: альтернативный сплайсинг. Редактирование РНК.
22. Механизмы генетической изменчивости. Наследственные болезни

23. Биосинтез белков (трансляция). Основные компоненты белоксинтезирующей системы: аминокислоты, т-РНК, рибосомы, источники энергии, белковые факторы, ферменты.
 24. Строение и функции рибосом. Связывающие и каталитический центры рибосом.
 25. Активация аминокислот. Аминоацил-т-РНК синтетазы, субстратная специфичность.
 26. Сборка полипептидной цепи на рибосоме. Образование инициаторного комплекса у прокариот. Особенности стадии инициации у эукариот.
 27. Элонгация: образование пептидной связи (р-ция транспептидации). Транслокация. Транслоказа. Терминация. Роль белковых факторов на каждой из стадий трансляции.
 28. Регуляция биосинтеза белков на уровне трансляции. Изменение скорости трансляции (на примере синтеза глобина, апоферритина).
 29. Процессинг первичных полипептидных цепей после трансляции: частичный протеолиз, образование ковалентных связей, присоединение простетических групп, ковалентная модификация аминокислотных остатков (гликозилирование, метилирование, фосфорилирование, ацетилирование).
 30. Фолдинг белков. Ферменты. Роль шаперонов в фолдинге белка. Фолдинг белковой молекулы с помощью шаперониновой системы. Болезни, связанные с нарушением фолдинга белка.
 31. Особенности синтеза и процессинга секретируемых белков (на примере коллагена и инсулина).
 32. Различия в продолжительности жизни белков. Убиквитинзависимая система протеолиза.
 33. Полиморфизм белков и происхождение разнообразия антител.
 34. Лекарственные препараты – ингибиторы матричных биосинтезов. Вирусы и токсины ингибиторы матричных синтезов в эукариотических клетках. Интерфероны.
-
-

ЗАНЯТИЕ № 11

ТЕМА: СИСТЕМЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ, МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ ГОРМОНАЛЬНЫХ СИГНАЛОВ.

Цель: Составить представление об основных системах межклеточной коммуникации, о роли гормонов в регуляции метаболизма и о механизмах передачи гормональных сигналов в клетку.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Основные системы межклеточной коммуникации: эндокринная, паракринная, аутокринная.
2. Роль гормонов в системе регуляции метаболизма. Нервная и гуморальная регуляция как единая система регуляции обмена веществ в ответ на изменение условий существования организма человека. Гормоны – первичные посредники в передаче информации.
3. Регуляция синтеза и секреции гормонов по принципу обратной связи.
4. Клетки-мишени и клеточные рецепторы гормонов. Рецепторы цитоплазматической мембраны: связанные с G-белками; с собственной тирозинкиназной активностью. Рецепторы, локализованные в цитозоле или ядре клетки. Рецепторы сопряженные с ионными каналами. Регуляция работы рецепторного аппарата (фосфорилирование, понижающая регуляция).
5. Механизм передачи гормональных сигналов в клетки. Механизмы трансдукции сигналов рецепторами мембран. G белки.
6. Циклические АМФ и ГМФ как вторичные посредники, активация протеинкиназ и фосфорилирование белков, ответственных за проявление эффекта.
7. Фосфатидилинозитольный цикл как механизм внутриклеточной коммуникации, инозитол 1,4,5-трифосфат, инозитол 1,3,4-трифосфат и диацилглицерол – вторичные посредники передачи сигнала.
8. Ионы кальция – вторичный посредник, регуляция уровня кальция в цитоплазме клетки, биологическая роль кальция, кальмодулин, Ca^{2+} -каналы.
9. Механизм действия стероидных гормонов.
10. Классификация гормонов по химическому строению и биологическим функциям.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполните таблицы «Гормоны как регуляторы метаболизма».

Место синтеза гормона	Название гормона	Химическая природа гормона	Клетки-мишени	Метаболический эффект

ЗАНЯТИЕ № 12

ТЕМА: ГОРМОНЫ.

Цель: Составить представление о химическом строении гормонов, о роли гормонов как факторов регуляции метаболизма, возможных механизмах их действия на биохимические процессы, а также о методах обнаружения гормонов.

Гормоны – биологически активные органические вещества, имеющие различную химическую природу и синтезирующиеся в железах внутренней секреции. Основная биологическая роль гормонов – регуляция метаболизма. В клинко-биохимических лабораториях используют методы качественного и количественного определения гормонов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Синтез и секреция пептидных гормонов на примере инсулина и проопиомеланокортина (ПОМК).
2. Регуляция энергетического метаболизма. Роль инсулина и контринсулярных гормонов в обеспечении гомеостаза.
3. Роль инсулина и глюкагона в регуляции энергетического метаболизма при нормальном питании и при голодании. Изменение гормонального статуса и метаболизма при сахарном диабете.
4. Синтез и секреция гормонов, производных аминокислот. Гормоны щитовидной железы. Изменения метаболизма при гипо- и гипертиреозе. Причины и проявления эндемического зоба.
5. Синтез и секреция кортикостероидов. Изменения метаболизма при гипо- и гиперкортицизме. Синдром Иценко–Кушинга.
6. Регуляция водно-солевого обмена. Строение и функции альдостерона и вазопрессина. Система ренин–ангиотензин–альдостерон. Ангиотензин-конвертирующий фермент. Биохимические механизмы возникновения гипертонии, отеков, дегидратации.
7. Роль гормонов в регуляции обмена кальция и фосфатов (паратгормон, кальцитонин и кальцитриол). Строение, биосинтез и механизм действия.
8. Гормон роста, строение и функции.
9. Половые гормоны, строение, влияние на обмен веществ и функции половых желез.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1. Качественные реакции на адреналин в лекарственных формах.

(1) *Реакция с хлорным железом.* Реакция характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина. К 1-2 каплям адреналина добавить 1 каплю 1% рас-

твора хлорного железа. Появляется зеленое окрашивание, переходящее в вишнево-красное при подщелачивании.

(2) *Диазореакция*. При взаимодействии диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя. К 6 каплям диазореактива прибавляют 5 капель раствора адреналина и 3 капли 10% раствора гидроксида натрия, появляется красное окрашивание.

(3) *Флюоресценция продуктов окисления адреналина*. Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, при добавлении щелочи дает флюоресцирующие продукты. К 10 каплям воды добавляют 6 капель 10% раствора гидроксида натрия и 6 капель раствора адреналина. Наблюдают зеленую флюоресценцию продуктов окисления адреналина в ультрафиолетовом свете.

Опыт № 2. Качественные реакции на инсулин в лекарственных формах.

Принцип метода. По химической природе инсулин является низкомолекулярным белком, в связи с чем он дает реакции, характерные для белков и аминокислот, входящих в его состав.

(1) *Биуретовая реакция* (на пептидную связь). К нескольким каплям раствора инсулина добавляют 5 капель 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю сульфата меди. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

(2) *Реакция Фоля* (на серосодержащие аминокислоты). К нескольким каплям раствора инсулина добавляют реактив Фоля, состоящий из 5% раствора ацетата свинца и 30% раствора гидроксида натрия. При нагревании содержимое пробирки окрашивается в бурый цвет.

ЗАНЯТИЕ № 13

ТЕМА: БИОХИМИЯ КРОВИ.

Цель: составить представление об особенностях метаболизма эритроцитов, о свойствах и клинико-диагностическом значении определения белковых фракций крови, энзимодиагностике и провести количественное определение активности аминотрансфераз, научиться выявлять ферментопатию эритроцитов, применить знания о регуляции активности ферментов при изучении свёртывающей системы крови.

Кровь – жидкая подвижная ткань, обеспечивает интеграцию обмена веществ разных органов, выполняет такие функции, как: дыхательная (транспорт кислорода и диоксида углерода), защитная (антитела и фагоцитирующие лейкоциты), трофическая (доставка продуктов пищеварения от кишечника к разным органам, перенос глюкозы и кетонных тел из печени в мышцы и т.д.), коммуникативная – регуляторная (перенос химических сигналов – гормонов к органам-мишеням), поддержание водно-солевого и кислотно-щелочного баланса, терморегуляция и другие. На долю эритроцитов приходится 36–48% объема крови. В эритроцитах содержатся ферменты гликолиза, пентозофосфатного цикла, системы глутатиона и других реакций обмена, блокада которых может быть связана с дефицитом ферментов.

Наиболее распространенной наследственной ферментопатией эритроцитов является дефицит фермента пентозофосфатного цикла глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФДГ), который приводит к снижению устойчивости эритроцитов к гемолизу. При полном отсутствии фермента гемолитическая анемия проявляется в раннем детском возрасте. Для диагностики дефицита Гл-6-ФДГ используют как количественное определение активности фермента в эритроцитах, так и качественные пробы, имеющие ориентировочное значение.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Особенности развития, строения и метаболизма эритроцитов (повторить гликолиз и пентозофосфатный путь распада глюкозы).
2. Образование и обезвреживание активных форм кислорода в эритроцитах.
3. Транспорт кислорода и диоксида углерода: влияние парциального давления кислорода; кооперативный эффект; аллостерическая регуляция сродства гемоглобина к кислороду (эффект Бора, влияние 2,3-дифосфоглицерата); пути транспорта диоксида углерода, механизм транспорта, карбоангидраза.
4. Гемоглобин плода и его физиологическое значение. Полиморфные формы гемоглобинов человека.
5. Аномальные и патологические гемоглобины. Гемоглобинопатии. Анемические гипоксии.

6. Белковые фракции крови: понятие «фракция»; происхождение белков, методы фракционирования; распределение белковых фракций крови в норме; основные свойства белковых фракций крови; примеры индивидуальных белков каждой фракции, значение.
7. Клинико-диагностическое значение определения белковых фракций крови (при воспалительном процессе, цирротическом и нефротическом типах). Диспротеинемии.
8. Энзимодиагностика:
 - секреторные и экскреторные ферменты (лейцинаминопептидаза, щелочная фосфатаза и др.);
 - индикаторные или органоспецифические ферменты (лактатдегидрогеназа, аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза и др.);
 - ферменты, изоферменты, изоформы ферментов (на примере креатинкиназы);
 - механизмы изменения уровня активности ферментов в крови;
9. Энзимодиагностика при инфаркте миокарда и заболеваниях печени.
10. Клиническое значение биохимического анализа крови.
11. Свёртывающая система крови как каскад протеаз. Этапы образования фибринового сгустка.
12. Внутренний и внешний пути свёртывания. Витамин К в свёртывании крови.
13. Противосвёртывающая система крови.
14. Нарушения свертывания крови. Гемофилии.
15. Клинико-диагностическое значение, принцип и техника выполнения пробы на ферментопатию эритроцитов (определение активности Гл-6-ФДГ по Бернштейну).
16. Количественное определение активности аминотрансфераз: принцип метода, техника выполнения, расчет, значение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1. Проба на ферментопатию эритроцитов по Бернштейну (определение активности Гл-6-ФДГ) .

Принцип метода: В присутствии Гл-6-ФДГ (КФ 1.1.1.49) образуется НАДФН₂, который обесцвечивает дихлорфенолиндофенол через 15-20 мин. Более позднее обесцвечивание реакционной смеси свидетельствует о дефиците Гл-6-ФДГ в эритроцитах.

Техника выполнения:

	Отмерить, мл
Дистиллированная вода	2,0
Кровь	0,02
Гемолиз	
Реактив № 1 (раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола в трис-НСl-буфере, рН 8,0 и раствор феназинметасульфата в соотношении 8:1)	0,5

Реактив №2 (раствор НАДФ и раствор глюкоза-6-фосфата в соотношении 1:1)	0,1
---	-----

Оставляют на 15-20 минут при комнатной температуре, затем оценивают изменение окраски смеси.

Неполное обесцвечивание через 30 мин соответствует уменьшению активности Гл-6-ФДГ, а отсутствие обесцвечивания к этому времени свидетельствует о резком снижении активности фермента. Недостаточная активность фермента проявляется острой гемолитической анемией, вызванной поступлением в организм дополнительных экзогенных факторов, обладающих окислительными свойствами (прием сульфаниламидных, противомалярийных и других лекарственных препаратов).

Опыт № 2: Количественное определение активности аминотрансфераз: аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) .

Принцип метода. Аспаратаминотрансфераза АсАТ (L-аспартат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1.) катализирует реакцию между L-аспартатом и 2-оксоглутаратом, в результате которой они превращаются в L-глутамат и оксалацетат. Оксалацетат произвольно декарбоксилируется в пируват.

АлАТ (L-аланин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза, КФ 2.6.1.2.) катализирует реакцию между L-аланином и 2-оксоглутаратом, в результате которой они превращаются в L-глутамат и пировиноградную кислоту.

Определение основано на измерении оптической плотности гидразонов 2-оксоглутаровой и пировиноградной кислот в щелочной среде. Гидразон пирувата обладает более высокой оптической плотностью.

Реактивы

1. Эталонный раствор натриевой соли пировиноградной кислоты — используют для построения калибровочного графика.

2,4-динитрофенилгидразин (1 мМ раствор в 1 М НСl).

0,4 М NaOH.

Субстраты АсАТ: L-аспартат; 2-оксоглутарат; фосфатный буфер рН 7,4.

Субстраты АлАТ: DL-α-аланин; 2-оксоглутарат; фосфатный буфер рН 7,4., 0,1 М.

Техника выполнения. Анализ производится, как указано в таблице:

Отмерить (мл)	Опыт	Контрольный раствор
Реактив 4 (или 5)	0,5	0,5
Физиологический раствор	—	0,1
Предварительно инкубируют в течение 3 мин при 37 °С		
Сыворотка крови	0,1	—
Инкубируют 60 минут при 37 °С		
Реактив №2	0,5	0,5
Перемешивают и оставляют стоять 20 минут при комнатной температуре		
Реактив № 3	4,0	4,0

Перемешивают и спустя 10 мин измеряют оптическую плотность пробы против контрольного раствора на фотоколориметре при длине волны 500-530 нм в кюветах толщиной 1 см.

Расчёт По оптической плотности опытной пробы на калибровочном графике находят активность соответственно АсАТ или АлАТ в сыворотке крови.

Нормальные величины активности аминотрансфераз 0,06–0,14 мккатал/л, предельные величины — 0,42 мккатал/л, воспроизводимость $\pm 8\%$. При активности фермента свыше 0,56 мккатал/л анализ следует повторить с сывороткой, разведенной физиологическим раствором, а результат умножить на разведение.

Повышенное содержание кетовеществ в сыворотке крови больных диабетом вызывает завышение активности ферментов. Гемолиз повышает активность АсАТ и АлАТ. Занижение результатов вызывают синтетические моющие средства. Увеличение активности АсАТ в сыворотке крови происходит при инфаркте миокарда, при некрозе или повреждении печеночных клеток любой этиологии, гепатите при алкоголизме.

Повышение активности АлАТ является наиболее специфичным признаком заболеваний печени, особенно острых.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу: «Биохимические показатели крови».

Биохимический показатель	Диапазон нормальных значений	Клинико-диагностическое значение
Общий белок		
Белковые фракции		
Мочевина		
Креатинин		
Амилаза		
АсАТ		
АлАТ		
ЛДГ		
Щелочная фосфатаза		
Гамма-глутамилтрансфераза		
Глюкоза		
Общий холестерол		
Общий билирубин		

РЕФЕРАТЫ

- Энзимодиагностика при инфаркте миокарда и заболеваниях печени.
- Нарушения коагуляционного гемостаза: гемофилии – генетически определённые аномалии или дефицит факторов плазмакоагуляции.

ЗАНЯТИЕ № 14

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ: БИОХИМИЧЕСКАЯ ИНТЕГРАЦИЯ ОРГАНИЗМА. ГОРМОНАЛЬНАЯ СИСТЕМА. БИОХИМИЯ КРОВИ.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Основные системы межклеточной коммуникации: эндокринная, паракринная, аутокринная системы.
2. Нервная и гуморальная регуляция как единая система регуляции обмена веществ. Гормоны – первичные посредники в передаче информации.
3. Регуляция синтеза и секреции гормонов по принципу обратной связи.
4. Клетки-мишени и клеточные рецепторы гормонов. Рецепторы цитоплазматической мембраны. Рецепторы, локализованные в цитоплазме. Рецепторы сопряженные с ионными каналами. Регуляция работы рецепторного аппарата.
5. Механизмы передачи гормональных сигналов в клетки: G белки, циклические АМФ и ГМФ как вторичные посредники. Протеинкиназа А и протеинкиназа G.
6. Фосфатидилинозитольный цикл как механизм внутриклеточной коммуникации. Инозитолтрифосфаты и диацилглицерол – вторичные посредники в передаче сигнала.
7. Ионы кальция – вторичный посредник в передаче сигнала. Регуляция уровня концентрации ионов кальция в цитоплазме клетки. Биологическая роль кальция. Кальмодулин. Протеинкиназа С и кальмодулин-зависимые протеинкиназы.
8. Механизм действия стероидных гормонов. Ядерные рецепторы гормонов.
9. Классификация гормонов по химическому строению и биологическим функциям. Номенклатура гормонов.
10. Гормоны гипоталамуса. Химическая природа. Биологическая роль.
11. Гормоны передней доли гипофиза. Химическая природа. Биологическая роль. Изменения метаболизма при гипо- и гиперфункции.
12. Гормоны задней доли гипофиза. Химическая природа. Биологическая роль. Изменения метаболизма при гипо- и гиперфункции.
13. Гормоны щитовидной железы. Химическая природа. Биологическая роль. Изменение метаболизма при гипо- и гиперфункции. Причины и проявления эндемического зоба.
14. Гормоны паращитовидных желез. Химическая природа. Биологическая роль. Изменения метаболизма при гипо- и гиперпаратиреозе.
15. Строение, биосинтез и механизм действия кальцитриола (витамина D₃). Причины и проявления рахита.
16. Гормоны коры надпочечников: глюкокортикоиды и минералокортикоиды. Химическая природа. Биологическая роль. Изменения метаболизма при гипо- и гиперкортицизме.

17. Регуляция водно-солевого обмена. Строение и функции альдостерона и вазопрессина. Система ренин-ангиотензин и вазопрессин. Ангиотензин-превращающий фермент. Биохимические механизмы возникновения гипертонии, отеков, дегидратации.
 18. Гормоны мозгового слоя надпочечников. Их синтез, химическая природа и биологическая роль. Изменения метаболизма при гипо- и гиперфункции.
 19. Гормоны поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта. Строение синтез и секреция инсулина. Биологические функции и механизм действия инсулина. Строение и биологическая роль глюкагона.
 20. Регуляция обмена основных энергоносителей. Изменения метаболизма в абсорбтивный и постабсорбтивный периоды. Изменения гормонального статуса и метаболизма при голодании.
 21. Изменения гормонального статуса и метаболизма при сахарном диабете.
 22. Мужские и женские половые гормоны. Химическая природа. Биологическая роль.
 23. Эйкозаноиды. Их синтез. Химическая природа. Биологическая роль.
 24. Гистамин. Синтез. Химическая природа. Биологическая роль.
 25. Серотонин. Синтез. Химическая природа. Биологическая роль.
 26. Биологические активные пептиды: брадикинины, нейропептиды, атриопептиды. Биологическая роль.
 27. Особенности развития, строения и метаболизма эритроцитов.
 28. Образование и обезвреживание активных форм кислорода в эритроцитах.
 29. Транспорт кислорода и диоксида углерода.
 30. Гемоглобин плода и его физиологическое значение. Полиморфные формы гемоглобинов человека.
 31. Гемоглобинопатии. Анемические гипоксии.
 32. Белковые фракции крови и клинико-диагностическое значение их определения (при воспалительном процессе, циррозе печени и нефротическом синдроме). Диспротеинемии.
 33. Энзимодиагностика: механизмы изменения уровня активности ферментов в крови;
 34. Энзимодиагностика при инфаркте миокарда и заболеваниях печени.
 35. Свёртывающая система крови. Этапы образования фибринового сгустка.
 36. Внутренний и внешний пути свёртывания. Витамин К в свёртывании крови.
 37. Противосвёртывающая система крови.
 38. Нарушения коагуляционного гемостаза: гемофилии.
-
-

ЗАНЯТИЕ № 15

ТЕМА: БИОХИМИЯ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.

Цель: Рассмотреть структурную организацию межклеточного матрикса и соединительной ткани и изучить химический состав протеогликанов животных тканей.

Межклеточный матрикс построен из коллагена, эластина, протеогликанов, адгезивных белков (фибронектина, ламинина). В матрикс наряду с нерастворимыми нитевидными структурами погружены клетки - хондроциты и фибробласты, макрофаги и тучные клетки. Соединительная ткань характеризуется большими промежутками между клетками и высоким содержанием межклеточного вещества.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Значение межклеточного матрикса и соединительной ткани для жизнедеятельности организма.
2. Особенности аминокислотного состава, структуры, биосинтеза и созревания коллагена. Роль аскорбиновой кислоты в гидроксировании пролина и лизина. Проявления недостаточности витамина С.
3. Полиморфизм коллагена: фибриллообразующие, ассоциированные с фибриллами, «заякоренные», микрофибрилярные типы коллагена.
4. Катаболизм коллагена. Регуляция обмена коллагена. Заболевания, связанные с нарушением синтеза коллагена.
5. Особенности строения и функции эластина.
6. Строение и функции глюкозаминогликанов (гиалуроновой кислоты, хондроитин сульфатов, гепарина) и протеогликанов.
7. Адгезивные белки межклеточного матрикса: фибронектин и ламинин, их строение и функции. Их роль в межклеточных взаимодействиях и развитии опухолей.
8. Структурная организация межклеточного матрикса: кожа, сустав, базальная мембрана.
9. Биохимия костной ткани. Природа межклеточного вещества. Особенности ферментативной активности остеокластов и остеобластов. Регуляция фосфорно-кальциевого обмена. Биохимические превращения и функциональные особенности витамина Д. Роль в фосфорно-кальциевом обмене тиреокальцитонина и паратгормона.
10. Гидролиз протеогликанов пупочного канатика и анализ продуктов гидролиза.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Гидролиз протеогликанов пупочного канатика и анализ продуктов гидролиза.

Кусочек пупочного канатика (источник протеогликанов) кипятят 30 мин в широкой пробирке с обратным холодильником в 15 мл 10% раствора NaOH. В гидролизате

обнаруживают составные компоненты протеогликанов: белок, углеводный компонент, серную кислоту.

(1) белок обнаруживают биуретовой реакцией: к 5 каплям гидролизата прибавляют 10 капель биуретового реактива.

(2) углеводы (аминосахара) обнаруживают реакцией Молиша: к 5 каплям гидролизата добавляют 2 капли раствора α -нафтола и осторожно по стенке пробирки наслаивают 10–15 капель концентрированной серной кислоты. Серная кислота опускается на дно пробирки, образуя нижний слой жидкости, исследуемый раствор остается в верхнем слое. На границе слоев возникает фиолетовое кольцо. В основе реакции лежит способность углеводов образовывать с концентрированной серной кислотой фурфурол (оксиметилфурфурол), дающий с α -нафтолом фиолетовое окрашивание.

(3) серную кислоту обнаруживают по выделению осадка сернокислого кальция после добавления к 1 мл гидролизата 2 капель раствора хлористого кальция.

В протоколе изобразить схему гидролиза протеогликанов.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполните таблицу «Сравнение некоторых биологических функций коллагена и эластина»

Белок	Роль в процессах заживления ран	Изменения, наступающие при старении
коллаген		
эластин		

ЗАНЯТИЕ № 16

ТЕМА: БИОХИМИЧЕСКИЙ БАЗИС МЕДИЦИНСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.

Цель: Ознакомиться с современными биотехнологическими подходами к разработке новых лекарственных препаратов. Научиться определять содержание лекарственных веществ природного происхождения в фармацевтических препаратах, познакомиться с биотехнологическим методом получения ГАМК ферментативным путем.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Биохимический базис медицинской биотехнологии. Получение лекарственных препаратов биотехнологическим синтезом (получение человеческого инсулина из свиного). Получение рекомбинантных белковых препаратов, генная инженерия, гибридная технология.
2. Генная терапия. Антисмысловые рибонуклеотиды как перспективная основа создания лекарственных средств.
3. Ферменты в медицине и фармацевтической промышленности. Преимущества иммобилизованных ферментов, способы иммобилизации. Иммобилизация целых клеток.
4. Биохимические основы фармакокинетики лекарственных средств. Всасывание, метаболизм, распределение и выделение лекарственных препаратов. Пролекарства.
5. Биохимические основы улучшения фармакокинетики лекарственных средств. Микронизация. Вещества, улучшающие усвоение действующего компонента. Направленная доставка лекарственных средств к мишени действия. Липосомы, наночастицы и вирусные векторы как средства доставки лекарств. Иммуноопосредованная доставка.
6. Биохимические основы фармакодинамики лекарственных средств. Взаимодействие лекарственных препаратов с рецептором. Макромолекулярная природа лекарственных рецепторов. Кривые насыщения рецептора с лигандом. Сопряжение рецептора с «эффектом». Агонисты и антагонисты рецепторов: конкурентные, парциальные и неконкурентные. Сигнальные механизмы и действие лекарств.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Опыт № 1. Получение ГАМК из глутаминовой кислоты.

γ -Аминомасляная кислота (ГАМК) представляет собой лекарственное вещество с тормозящим действием на деятельность центральной нервной системы. Наиболее рациональный способ получения ГАМК – декарбоксилирование глутаминовой кислоты.

Декарбоксилирование глутаминовой кислоты можно легко провести, используя специфический фермент – декарбоксилазу глутаминовой кислоты (ДГК). Наиболее активен данный фермент у бактерий *E. coli*. Исходный продукт – глутаминовая кислота может быть получена в результате гидролиза соляной кислотой растительного белка – глютелина. Содержание глутаминовой кислоты в этом белке достигает 30%.

Техника выполнения. К 1 мл экстракта из бактериальной массы *E. coli* в пробирку приливают 1 мл раствора глутаминовой кислоты в буфере с pH 8,9. Содержимое пробирки перемешивают и помещают на 15 минут в термостат при 37°C. После инкубации проводят обнаружение ГАМК методом электрофореза. Для этого на полоски для бумажного электрофореза наносят по центру по одной капле глутаминовой кислоты и ГАМК в качестве контроля, на опытную полоску наносят каплю инкубационной смеси. Все три полоски переносят в камеру для электрофореза. Электрофорез проводят при 200–300 В, 1,5–2 мА в течение 1–1,5 ч. Полоски извлекают из аппарата, высушивают при 70°C, смачивают 0,1 % раствором нингидрина, помещают еще раз в сушильный шкаф на 5 мин. На полоске с опытной пробой наблюдается появление двух пятен, так как за время инкубации полного декарбоксилирования обычно не наступает. Делают вывод по проведенному опыту.

Опыт № 2. Обнаружение викасола в препарате «ВИКАСОЛ».

Принцип метода. Кетогруппы викасола восстанавливаются цистеином и образуют окрашенные вещества.

Техника выполнения. К пяти каплям 0,05 % раствора «Викасола» добавляют пять капель 0,025 % раствора цистеина и одну каплю 10 % раствора NaOH. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Опыт № 3. Обнаружение ретинола в рыбьем жире.

Принцип метода. Концентрированная H₂SO₄ дегидратирует витамин А, при этом образуются окрашенные продукты конденсации.

Техника выполнения. В сухую пробирку внести одну каплю рыбьего жира и пять капель хлороформа, встряхнуть. Добавить одну каплю концентрированной серной кислоты. При наличии в препарате ретинола жидкость окрашивается в красный цвет.

Опыт № 4. Обнаружение пенициллина в препарате «Бензилпенициллина натриевая соль».

Метод 1. Принцип метода. Пенициллин образует α-гидроксановую кислоту, которая с FeCl₃ дает продукт конденсации красного цвета.

Техника выполнения. К пяти каплям 0,5 % раствора пенициллина добавить две капли 5 % раствора гидроксиламина. Смесь нагреть до кипения. Охладить. Добавить одну каплю 5 % раствора FeCl₃. При положительной реакции жидкость окрашивается в красный или розовый цвет.

Метод 2. Принцип метода. При щелочном гидролизе образуются свободные SH – группы пенициллина, которые дают нестойкое соединение с нитроруссидом натрия.

Техника выполнения. К двум каплям 0,5 % раствора пенициллина добавить две капли концентрированного раствора NaOH. Кипятить 1–2 минуты. После охлаждения добавить по каплям 5 % раствор нитропруссид натрия. Появление красного окрашивания, переходящего в желтое, свидетельствует о наличии пенициллина.

Опыт № 5. Открытие стрептомицина в препарате «Стрептомицина сульфат».

Принцип метода. При щелочном гидролизе образуется мальтол, дающий характерное окрашивание с FeCl₃.

Техника выполнения. К пяти каплям 1 % раствора стрептомицина добавить одну каплю 10 % раствора NaOH. Кипятить 5–7 секунд. Добавить 2 капли 10 % раствора HCl. Жидкость из желтой превращается в безцветную и прозрачную. Добавить 1–2 капли раствора FeCl₃. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

РЕФЕРАТЫ

- Имобилизованные ферменты как лекарственные средства.
- Липосомы – транспортная форма целенаправленной доставки лекарств.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА.

Заполнить таблицу:

Название группы	Пример вещества	Область применения
1. Интерфероны.		
2. Гормоны.		
3. Факторы роста клеток костного мозга.		
4. Интерлейкины.		
5. Факторы свертывания крови.		
6. Ферменты.		
7. Вакцины.		

ЗАНЯТИЕ № 17

ТЕМА: БИОХИМИЯ МЫШЦ. БИОХИМИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ.

Цель: Рассмотреть молекулярную структуру и особенности энергообмена мышечной и нервной ткани, биохимические механизмы мышечного сокращения и расслабления, синаптической передачи, возникновения и проведения нервного импульса.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Важнейшие белки миофибрилл: миозин, актин, актомиозин, тропомиозин, тропонин – особенности строения и выполняемые функции. Саркоплазматические белки (миоглобин). Экстрактивные вещества мышц.
2. Молекулярная структура миофибрилл (саркомер-функциональная единица, А- и I-диски, М- и Z-пластинки), состав толстых и тонких филаментов, особенности гладкомышечных клеток.
3. Биохимические механизмы мышечного сокращения и расслабления: модель скользящих нитей Хью Хаксли; механизм сокращения и расслабления поперечно-полосатой мускулатуры; механизм сокращения и расслабления гладкой мускулатуры; особенности сокращения миокарда.
4. Роль градиента одновалентных ионов и ионов кальция в регуляции мышечного сокращения.
5. Метаболические процессы в мышечном волокне, ведущие к обеспечению энергией мышечного сокращения: (аденилаткиназная реакция, концепция креатинфосфатного челнока).
6. Миелиновые мембраны: особенности состава и структуры.
7. Энергетический обмен в нервной ткани, значение аэробного распада глюкозы.
8. Биохимия возникновения и проведения нервного импульса.
9. Основные нейромедиаторные системы. Молекулярные механизмы синаптической передачи.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполните таблицу «Физиологически активные пептиды мозга».

Пептид	Выполняемая физиологическая роль

1. УЧЕБНО МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ.

2. а).Основная литература

3. 1.Биохимия:Учебник/ Под ред.Е.С.Северина.-М:ГЭОТАР-МЕД,Изд.- 2009.- 768с.Режим доступа:ЭБС «Консультант студента» <http://www.studmedlib.ru>.
4. 2.Николаев А.Ю.Биологическая химия.-3-е изд.Пер.и доп.-М:Медицинское информационное агенство.-2007.-566с.
5. 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>.

6. б).Дополнительная литература

7. Биологическая химия: Учебник/Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.-3-е изд., пер. и доп. – М.- Мед-на.-2002.
8. Биологическая химия: Учебник/Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – 2-е изд., перераб.и доп.- М.: Высш.Шк., 1998.
9. Биологическая химия: Учебник/Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – 3-е изд., испр.-М.: Высш.Шк., 2002.
10. Биохимия человека: в 2-х т. Т.1 / Марри Р., Грениер Д., Мейес П., Родуэлл В. – М.: Мир, 1993.
11. Биохимия человека: в 2-х т. Т.2 / Марри Р., Грениер Д., Мейес П., Родуэлл В. – М.: Мир, 1993.
12. 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>
13. 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.
14. Биохимия для врача / А.Ш. Бышевский, О.А. Терсенов. – Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994.-384с.
15. Биохимия и молекулярная биология: Учеб. Пособие / В. Эллиот; Под. Ред. А.И. Арчакова. – М.: Изд. НИИ биохимической химии РАМН, 2000. – 366с.