

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ  
АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**Методические рекомендации к дисциплине «Биохимия обмена веществ»  
по специальности 31.05.01 «Лечебное дело»**

**Владикавказ**

Составители:

зав. кафедрой биохимии, к.м.н. – Гурина А.Е.,  
ст. преподаватель Габолаева Н.А.

Рецензенты:

Заведующий кафедрой химии и физики ФГБОУ ВО СОГМА  
Минздрава России, доцент, д.х.н. Калагова Р. В.

Директор Института биомедицинских исследований  
Владикавказского научного центра РАН, д.м.н. Датиева Ф.С.

## **Тема: Шапероны – новый класс белков, классификация, биологическая роль. Прионовые болезни.**

### **I Научно-методическое обоснование темы:**

Однажды в 1962 г. во время проведения опытов на плодовых мушках (дрозофилах) температура в инкубаторе с насекомыми поднялась выше положенного. Когда **Ферручио Ритосса** (Ferruccio Ritossa), молодой ученый из Института генетики в г. Павия (Италия), поместил под микроскоп клетки мушек, получивших «тепловой удар», он увидел на хромосомах «пуфы» — утолщения, свидетельствующие об активности находящихся в этих местах генов. Области утолщений получили название **сайтов теплового шока**. Вначале считалось, что данный феномен характерен только для дрозофилы. И лишь через 15 лет белки, кодируемые генами в сайтах теплового шока (**HSP, heat shock protein**), были обнаружены в клетках млекопитающих и других организмов. Но что самое удивительное — оказалось, что они играют ключевую роль в функционировании биологических систем всех уровней — от отдельных клеток до организмов и даже целых популяций.

Термин «молекулярный шаперон» впервые был использован в 1978 году в работе Рона Ласкей, профессора эмбриологии из Кембриджского Университета при описании ядерного белка нуклеоплазмина, способного предотвращать агрегирование белков-гистонов с ДНК при образовании нуклеосом.

**Шапероны** (англ. *chaperones*) — класс белков, главная функция которых состоит в восстановлении правильной третичной структуры повреждённых белков, а также образование и диссоциация белковых комплексов.

- ❖ **Молекулярные шапероны** – группа вспомогательных специализированных белков, предохраняющих растущую цепь от ошибочных внутренних и внешних контактов.
- ❖ В настоящее время к шаперонам относят, главным образом, белки, способствующие фолдингу вновь синтезирующихся или рефолдингу денатурированных вследствие стресса полипептидных цепей, а также их последующей сборке в биологически активные олигомерные структуры.

Эти вездесущие белки являются самыми древними и консервативными среди всех белков. Образуясь в условиях стресса, HSP помогают клеткам поддерживать в рабочем состоянии все механизмы и избегать гибели. Десять лет назад биологи обнаружили, что у высших организмов, в том числе у человека, HSP выполняют и другие важные функции. Они участвуют в работе иммунной системы, защищая организм от патогенов, и в то же время предотвращают апоптоз раковых клеток.

У многих внутриклеточных белков имеется всего один или совсем небольшое число «партнеров», с которыми они взаимодействуют. В качестве примера можно привести рецептор и его лиганд, подходящие друг к другу, как замок и ключ. На другие типы рецепторов данный лиганд не действует, и каждый рецептор, как правило, активируется своим структурно близким лигандом или веществом. В отличие от этого, шапероны взаимодействуют с широким кругом

белков, что позволяет им выполнять различную работу. Например, они помогают новосинтезированным аминокислотным цепочкам принимать правильную пространственную конфигурацию, при которой те могут выполнять свои функции; демонтируют поврежденные белковые молекулы; сопровождают белки к месту назначения, охраняя их от разного рода опасностей, и т.д.

Антигенпрезентирующие клетки присутствуют практически во всех тканях человеческого тела. Они «представляют» свои находки Т-клеткам, те разыскивают антигенсодержащие клетки (раковые, инфицированные) и уничтожают их. Как оказалось, антигенпредставляющие клетки несут на своей поверхности рецепторы, с которыми могут связываться шапероны, нагруженные пептидами. Первый такой рецептор, CD91, был идентифицирован Робертом Байндером (Robert J. Binder)

Шапероны – белки, способные связываться с белками, находящимися в неустойчивом, склонном к агрегации состоянии. Шапероны стабилизируют их конформацию, обеспечивая фолдинг белков (правильная пространственная структура полипептидной цепи).

Классификация шаперонов по молекулярной массе:

1. высокомолекулярные (от 100 до 110 кДа);
2. Ш-90 (83-90 кДа);
3. Ш-70 (66-70 кДа);
4. Ш-60;
5. Ш-40;
6. низкомолекулярные шапероны (15-30 кДа)

Среди шаперонов различают:

1. конституитивные белки (высокий базальный синтез которых не зависит от стрессовых воздействий на клетки организма);
2. индуцибельные (синтез, которых в нормальных условиях идет слабо, но при стрессовых воздействиях на клетку резко увеличивается).

При синтезе N-концевая область полипептида синтезируется раньше, чем C-концевая область. В период синтеза на рибосоме защиту реакционно-способных радикалов осуществляет Ш-70.

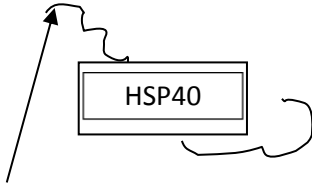
Ш-70 – высококонсервативный класс белков, который присутствует во всех отделах клетки. С C-конца расположен участок называется **бороздкой**. Он может взаимодействовать с участками белковых молекул и развернутых полипептидных цепей длиной в 7-9 амк, обогащенными гидрофобными радикалами.

**Шапероны участвуют в:**

1. формировании третичной структуры;
2. ренативации частично денатурированных белков;
3. сборке олигомерных белков;
4. контроле за изменением между активностью и неактивностью конформации белков;
5. транспорте белков через мембрану;
6. узнавании денатурированных белков и транспорте в лизосомы.

### **Шапероны и фолдинг белков.**

Белки теплового шока, «конвоируют» к месту назначения, способствуют правильной пространственной упаковке белковых молекул, разрушают аномальные комплексы между белками.



Полипептидная цепь белка

HSP40 доставляет новосинтезированный полипептид или денатурированную белковую молекулу другому шаперону, HSP70, который берет белок в «клещи», придает ему нужную форму и высвобождает биологически активную молекулу.

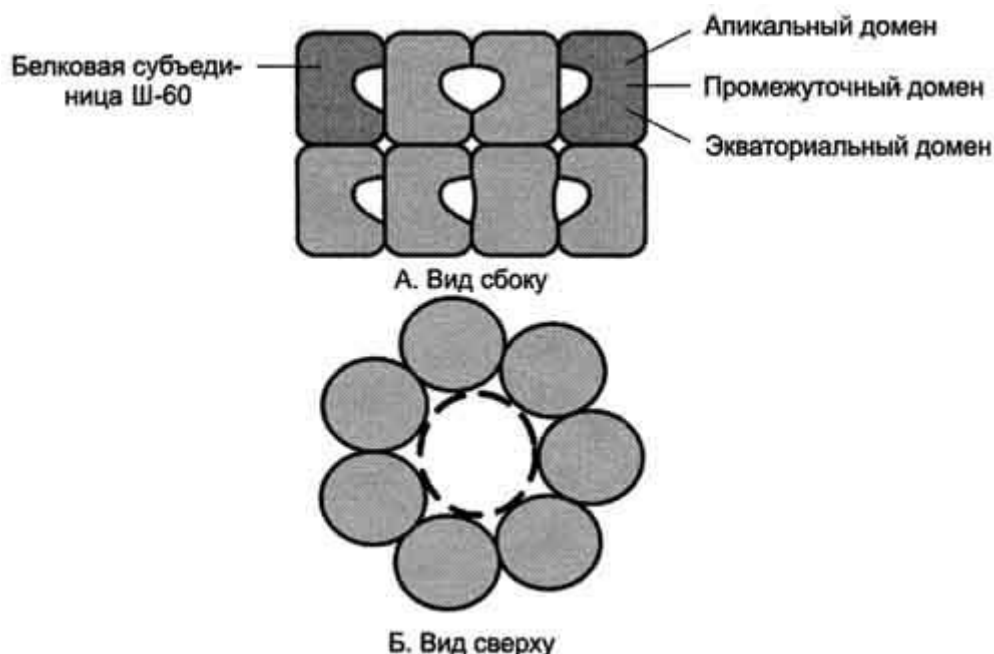
Рефолдинг ненативных (нефункциональных) полипептидов, представляющих собой как цепи, новообразованные в процессе биосинтеза, так и денатурированные формы белков, возникшие в результате клеточного стресса, осуществляется с помощью шаперониновой системы.

Шаперонины (или шапероны Hsp60) – это двухкамерные бочкообразные структуры, сформированные двумя состыкованными олигомерными (обычно – гептамерными) кольцами Hsp60, которые способны на своих противоположных поверхностях попеременно связывать и инкапсулировать белки, подлежащие рефолдингу. При этом шаперонины узнают гидрофобные кластеры белковых мишеней, находящихся в состоянии «расплавленной глобулы» – промежуточном между нативным и развернутым состояниями белка, характеризующимся ослаблением взаимодействий между боковыми группами в аминокислотной цепи.

Ш-60 функционируют в виде олигомерного комплекса, состоящего из 14 субъединиц. Высвобождение белка со сформированной нативной конформацией сопровождается гидролизом АТФ в экваториальном домене. Если белок не приобрёл нативной конформации, то он вступает в повторную связь с шапероновым комплексом. Такой шаперонзависимый фолдинг белков требует затрат большого количества энергии.

Таким образом, синтез и фолдинг белков протекают при участии разных групп шаперонов, препятствующих нежелательным взаимодействиям белков с другими молекулами клетки и сопровождающих их до окончательного формирования нативной структуры.

Наиболее изученным является шаперонин GroEL *E. coli*, функционирующий в комплексе с кошаперонином GroES. Каждая субъединица гептамерного «кольца» GroEL (M 57 кДа) состоит из трех доменов: апикального («верхушечного», Ap), содержащего общий центр связывания ненативных белков и кошаперонина, шарнирного промежуточного (In) и С-концевого экваториального (Eq), несущего АТФ-азный центр



Правильное сворачивание вновь синтезируемых белков в клетке и белков с частично нарушенной структурой, а также сохранение структуры белков в условиях стресса обусловлено функционированием шаперонов семейств Hsp70, Hsp60 и Hsp90. Фолдинг растущего в процессе трансляции полипептида обеспечивается его взаимодействием сначала с фактором TF, а затем, при достаточном удлинении полипептидной цепи – с системой шаперона Hsp70, включающей собственно шаперон, кошаперон Hsp40 и факторы нуклеотидного обмена (nucleotide exchange factor, NEF). Наиболее изученной является каноническая Hsp70-система *Escherichia coli*, состоящая из шаперона DnaK, кошаперона DnaJ и NEF-белка GrpE, причем, белки DnaJ и GrpE функционируют в системе в форме димеров.

Образование временных комплексов Hsp70 с ненативными белками-мишенями предотвращает неспецифическую агрегацию и деградацию последних внутриклеточными протеиназами и, тем самым, способствует правильному фолдингу диссоциированной мишени, происходящему либо спонтанно, либо с участием других шаперонов.

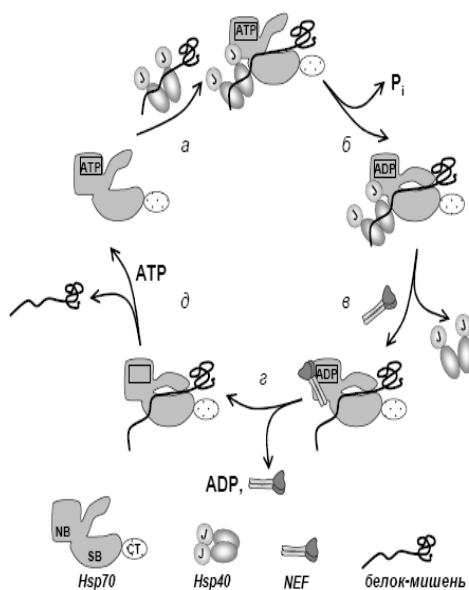
Шапероны Hsp70 состоят из трех доменов:

высококонсервативный N-концевой нуклеотидсвязывающий домен (NB, около 450 а.о.) объединен чувствительным к действию протеиназ линкерным участком с варибельным субстратсвязывающим доменом (SB, около 200 а.о.). Короткий C-концевой домен (CT, около 100 а.о.) способен к взаимодействию с различными партнерными белками и модулированию шапероновой функции Hsp70.

Связывание полипептидных субстратов-мишеней с Hsp70 опосредовано предварительным образованием комплексов мишень–кошаперон с участием C-концевого домена Hsp40 (а). На следующей стадии N-концевой J-домен Hsp40 взаимодействует с NB-доменом шаперона, а находящийся в вытянутой конформации специфический фрагмент белка-мишени (4–5 гидрофобных остатков, ограниченных основными аминокислотами) – с

его SB-доменом (б). Кошаперон Hsp40 влияет на этот цикл, стимулируя гидролиз нуклеотида шапероном Hsp70, в то время как взаимодействие фактора NEF с NB-доменом шаперона (в) способствует высвобождению ADP (г) и последующему связыванию ATP, что приводит к диссоциации белка-мишени и возобновлению цикла (д).

Считается, что от 10 до 20% вновь синтезирующихся белков как в прокариотах, так и в эукариотах подвергаются правильному фолдингу с участием системы Hsp70–Hsp40–NEF.



**Рис. 1.** Цикл функционирования системы шаперона Hsp70 (по данным работ [7 и 34]). Шаперон Hsp70: NB – нуклеотидсвязывающий домен, SB – субстратсвязывающий домен, CT – C-концевой домен; кошаперон Hsp40: J – консервативный N-концевой домен; NEF – фактор нуклеотидного обмена.

Группа шаперонов Hsp90 обеспечивает сохранение в условиях стресса структуры и свойств целого ряда белков, участвующих в различных сигнальных путях в клетке. Эти шапероны являются основными компонентами комплексных систем, включающих как другие шапероны, так и многочисленную сеть разнообразных кошаперонов. Шапероны Hsp90, необходимые для выживаемости клеток, широко распространены в бактериях и Эукариотах.

При нормальных условиях они играют основную роль в секреторных путях и внутриклеточном транспорте; в

условиях стресса белки Hsp90 вовлекаются в клеточный цикл, мейоз и цитокинез.

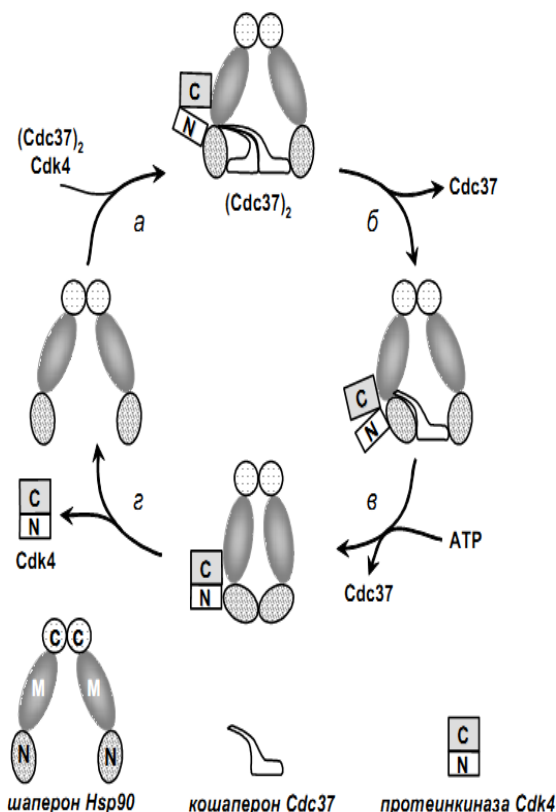
Hsp90-система участвует в конформационной регуляции и поддержании активности так называемых «клиентных» белков, которые подразделяются на три основные группы. Наибольшая группа включает протеинкиназы, другая представляет факторы транскрипции и ядерные рецепторы стероидных гормонов, в то время как последняя группа объединяет структурно неродственные белки, в том числе белки вирусной репликации (viral-replication) и внутриклеточные рецепторы, связанные с врожденным иммунитетом. Кроме того, совместно с Hsp70, шапероны Hsp90 стабилизируют вновь синтезированные белки, пребывающие в метастабильном состоянии, а также участвуют в сборке/разборке мультибелковых комплексов. Вместе с тем, полный объем клеточных функций и механизм действия Hsp90 до сих пор до конца не установлены.

Субъединица шаперона Hsp90 построена из трех последовательно связанных доменов(рис. 3): N-концевого АТР-связывающего (N-домен, ~25 кДа), центрального (M-домен, ~35кДа), включающего каталитическую петлю с остатком аргинина, важным для гидролиза АТР, и С-концевого (С-домен, ~20 кДа) [26, 45–48]. Hsp90-белки в апоформе образуют «раскрытые» V-образные димеры за счет межсубъединичных контактов С-доменов.Связывание АТР приводит к сближению субъединиц и возникновению контакта между N-омедами с бразованием закрытой формы шаперона. Регуляция функциональной активности Hsp90 осуществляется с помощью набора кошаперонов, которые могут связываться с азными доменами Hsp90.

Недавно с помощью электронной микроскопии была впервые установлена оследовательность событий в процессе ремоделирования одной из протеинкиназ омплексом Hsp90–кошаперон (рис. 3) [48]. Оказалось, что димер Hsp90 дрожжей связывает имер кошаперона Cdc37 (cell-division cycle 37 homologue) в центральной щели, образованной N-доменами, а мономер

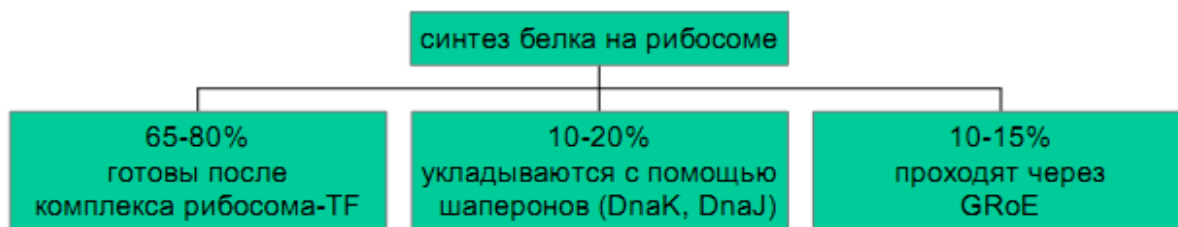


протеинкиназы Cdk4 (cyclin-dependent kinase 4) – на ковой поверхности комплекса (рис. 3а). При этом один из доменов киназы взаимодействует с N-концевой, а другой – с центральной (М) областями шаперона Hsp90. оследовательное высвобождение субъединиц Cdc37 (б, в) и реализация АТР-азного цикла вызывают ряд конформационных изменений в димере Hsp90, что приводит к возникновению напряжений в связанном белке-клиенте, его ремоделированию и высвобождению (в, г).



**Рис. 3.** Цикл конформационных превращений в комплексе шаперон Hsp90–кошаперон Cdc37, приводящих к ремоделированию структуры киназы Cdk4 (по данным работ [45, 48 и 52]).

Таблица 2. Синтез белка на рибосомах.



Расчёты показали, что лишь небольшая часть теоретически возможных вариантов полипептидных цепей может принимать одну стабильную пространственную структуру. Большинство же таких белков может принимать множество конформаций с примерно одинаковой энергией

Гиббса, но с различными свойствами. Первичная структура большинства известных белков, отобранных эволюцией, обеспечивает исключительную стабильность одной конформаций.

Однако некоторые растворимые в воде белки при изменении условий могут приобретать конформацию плохо растворимых, способных к агрегации молекул, образующих в клетках фибриллярные отложения, именуемые амилоидом (от лат. *amyllum* - крахмал). Так же как и крахмал, амилоидные отложения выявляют при окраске ткани йодом. Это может происходить:

при гиперпродукции некоторых белков, в результате чего увеличивается их концентрация в клетке;

при попадании в клетки или образовании в них белков, способных влиять на конформацию других молекул белка;

при активации протеолиза нормальных белков организма, с образованием нерастворимых, склонных к агрегации фрагментов;

в результате точечных мутаций в структуре белка.

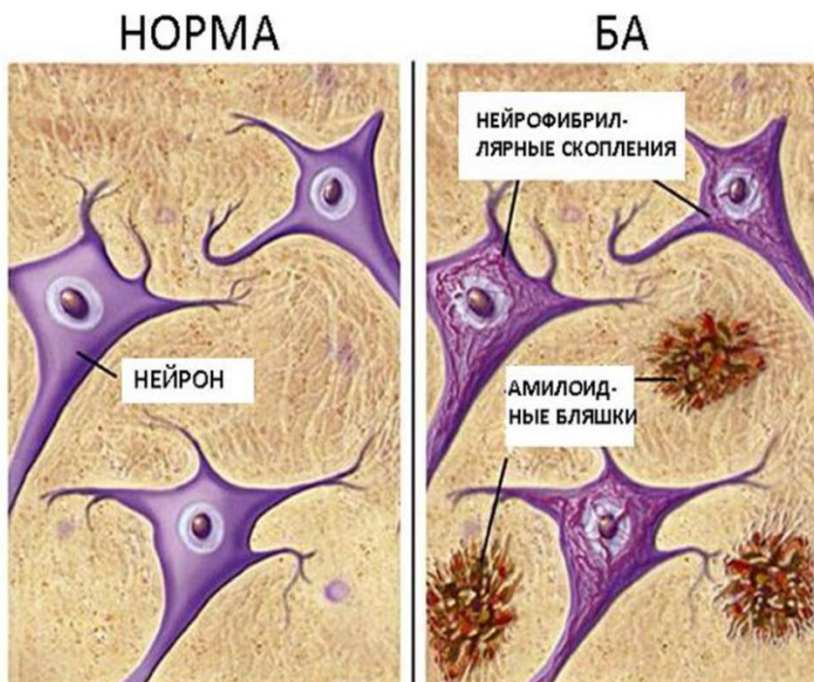
В результате отложения амилоида в органах и тканях нарушаются структура и функция клеток, наблюдают их дегенеративные изменения и разрастание соединительнотканых или глиальных клеток. Развиваются болезни, называемые амилоидозами. Для каждого вида амилоидоза характерен определённый тип амилоида. В настоящее время описано более 15 таких болезней.

Болезнь Альцгеймера (также сенильная деменция альцгеймеровского типа) — наиболее распространённая форма деменции, нейродегенеративное заболевание, впервые описанное в 1907 году немецким психиатром Алоисом Альцгеймером.

В 1991 году была предложена «амилоидная гипотеза», согласно которой базовой причиной заболевания являются отложения бета-амилоида (A $\beta$ ). Ген, кодирующий белок (APP), из которого образуется бета-амилоид, расположен на 21 хромосоме



наиболее часто отмечаемый  $\beta$ -амилоидоз нервной системы, как правило поражающий лица преклонного возраста и характеризующийся прогрессирующим расстройством памяти и полной деградацией личности. По данным Ю.В Попова, В.Д.Вида болезнь Альцгеймера диагностируется у 50-60% больных с деменцией. Считают, что болезнь Альцгеймера может быть наследственной или возникающей спорадически. Проявляется она в возрасте 45-65 лет(деменция при болезни Альцгеймера с ранним началом) или в 65-75 лет и позже (деменция при болезни Альцгеймера с поздним началом) , и постепенно выраженность ее нарастает в течение 2-3 лет и более.

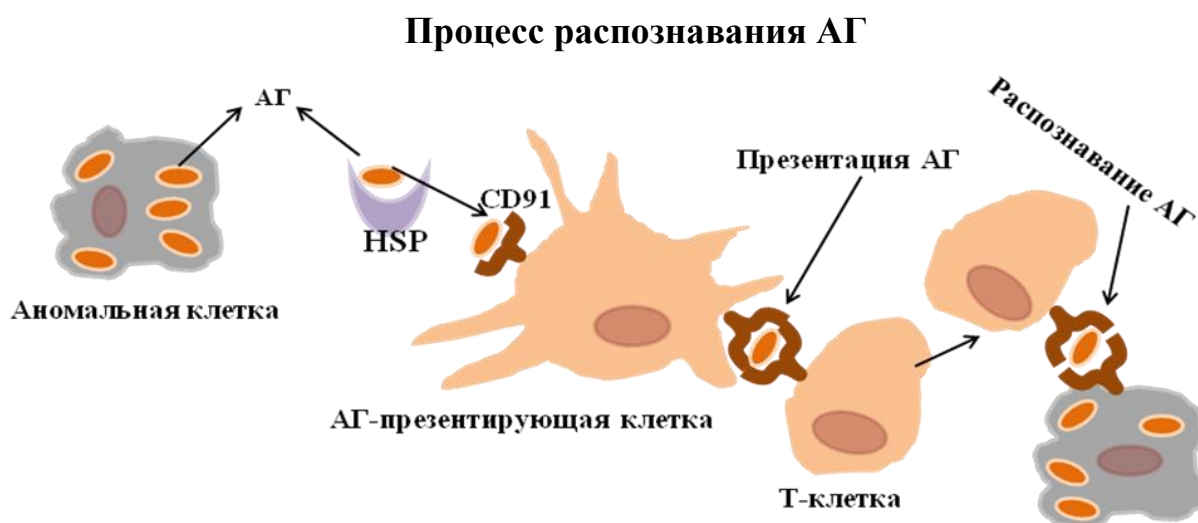


Немецкие и голландские ученые получили структурную модель Hsp90 в комплексе с его естественным, связанным с болезнью Альцгеймера, субстратом- внутренне неупорядоченным белком тау. Субстрат связывающий интерфейс Hsp90 длиной 106 ангстрем делает возможными многие контакты с низкой аффинностью и узнавание рассеянных гидрофобных остатков в поздних интермедиатах свертывания, остающихся после раннего связывания сайтов шаперона Hsp70. Это модель разрешает парадокс, как Hsp90 одновременно специфически выбирает поздние интермедиаты фолдинга и некоторые внутренние неупорядоченные белки: с точки зрения Hsp90 они выглядят одинаково. Учеными доказано, что Hsp-70 снижает степень токсичности бета-амилоидных бляшек, препятствуя их образованию.

### Активация иммунной системы

Когда клетка превращается в раковую, или в нее проникает какой-нибудь патоген, в ней начинается синтез необычных белков. Фрагменты белков — антигены — провоцируют иммунный ответ. Но для этого иммунные клетки должны быть поставлены в известность о возникшей аномалии. Белки теплового шока, прежде всего члены семейств HSP90 и HSP70, берут на себя функции глашатаев. Они включаются в систему оповещения и идентификации возмутителей спокойствия.

HSP доставляет антигены от пораженных клеток, к так называемым антигенпрезентирующим клеткам (АПК), используя для этого рецептор CD91. Проглотив АГ АПК, посылает сигналы к началу воспалительной реакции, привлекающие к ней другие клетки иммунной системы, и предъявляет АГ Т-клетке. Распознав АГ, Т-клетки пролиферируют и совместно разрушают дефектную клетку (рис. Процесс распознавания АГ).



### Основные положения

- Белки-телохранители (шапероны), присутствующие в клетках всех без исключения организмов, сглаживают последствия стрессовых воздействий на клетки.
- Шапероны охотно вступают во взаимодействие с самыми разными пептидами и несут на себе «антигенный отпечаток» каждой клетки. Благодаря этому они принимают непосредственное участие в активации иммунной системы.
- Применение шаперонов в медицине предполагает подавление их активности в одних ситуациях и стимулирование — в других.
- Белки теплового шока (шапероны) способствуют правильной пространственной укладке белковых молекул, доставляют их к месту назначения, предотвращают нежелательные контакты с другими клеточными компонентами

### ПРИОНОВЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

**Прионовые заболевания** – класс нейродегенеративные заболеваний человека и животных, возбудителем которых является прион. **Прионы** – мембранные белки, которые в основном экспрессируются в клетках ЦНС и лимфоретикулярной ткани. Они не содержат нуклеиновых кислот, входят в состав наружных клеточных мембран, связанных с внешней поверхностью клеток якорем гликолипида и участвуют в эндоцитозе и катаболизме клеток. Прионы могут синтезировать не только нейроны, но и другие клетки организма. Прион протеин необходимый для нормальной синаптической функции. Предполагается, что прионы участвуют в межклеточном узнавании и клеточной активации, а так же участвуют в подавлении возрастных процессов.

На основании первичной структуры был идентифицирован кодирующий ген протеин-приона, который находится на 20 хромосоме у всех млекопитающих. Он состоит у человека приблизительно из 254 аминокислот. Молекулярная масса равна 33000-35000 дальтон, или 33-35 кД.

Прионы представляют собой белки, обладающие уникальной способностью к самовоспроизведению, устойчивы к воздействию высоких температур, пищеварительных соков и, следовательно, могут передаваться животным, поедающих мясо зараженных животных. Патогенные прионы попав в организм, транспортируются в богатые нормальными прионами ткани иммунной системы (селезенка). Под действием патогенных прионов происходит превращение нормальных прионов организма в патогенные формы, которые далее мигрируют в ткани нервной системы, способствуя патогенной трансформации прионов в нервных клетках ЦНС.

Спонгиозные изменения и вакуолизация цитоплазмы нейронов отмечаются по ходу зубчатой фасции, в области подкорковых ядер, таламусе и коре мозжечка.

В эксперименте с использованием трансгенных мышей, гомозиготных по делеции гена Prnp, что организмы лишены приона, устойчивы к его инфекции

Последовательность аминокислот в белке PrP определяет набор конформаций, которые он может приобрести. Если наборы допустимых конформаций приона у двух различных видов организмов пересекаются, то может происходить преодоление межвидового барьера.

Протеин-прион существует в двух формах:

1. в виде клеточной нормальной, неинфекционной формы, которая встречается в головном мозге, как в норме, так и у инфицированных больных – клеточный протеин-прион PrP<sup>c</sup>;
2. изоформа, патологическая, инфекционная форма, при которой происходит накопление этого белка в головном мозге только у больных людей и животных, страдающих спонгиозной трансмиссивной энцефалопатией – PrP<sup>sc</sup> («scrabie»)-болезнь овец)

М.Гриффит предположил, что инфекционный агент - измененная форма одного из клеточных белков.

Патологическая форма неотличима от нормальной формы, но имеет другую конформацию. Пространственная структура рекомбинантной нормальной формы впервые была определена методом ядерного магнитного резонанса. Было обнаружено, что нормальная форма содержит 42%  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур, тогда как патологическая форма содержит 30%  $\alpha$ -спиралей и 43%  $\beta$ -структур. Вследствие этого предложили, что приобретение инфекционных свойств белком прионом связано с конформационным переходом, при котором происходит образование  $\beta$ -складчатого слоя.

Одним из свойств прионов является штамовое разнообразие – способность прионового белка приобретать и наводить различные прионовые конформации. Последовательность аминокислот в белке приона определяет набор конформаций, которые он может приобрести. Если наборы допустимых конформаций приона у двух различных видов организмов пересекаются, то может происходить преодоление межвидового барьера.

#### **Модели перехода нормальной формы в измененную:**

- **гетеродимерная модель** (прионное состояние присущее мономеру белка приона, и физическое взаимодействие патологической формы с нормальной катализирует превращение нормальной формы в патологическую; но данный переход является медленным энергозависимым и маловероятным, при этом образуются гомодимеры PrP<sup>c</sup>/ PrP<sup>c</sup>, которые могут диссоциировать запуская новые раунды конформационного превращения);
- **Полимеризационная модель** (прионовое превращение неотделимо от агрегации т.к. прионную конформацию может поддерживать только олигомер или мультимер протеина-приона; при образовании «ядра» олигомера патологической формы (PrP<sup>sc</sup>) протеина (медиатора превращения), происходит увеличение скорости перехода нормальной формы в патологическую).

Нормальная форма необходима для транспорта инфекционного агента периферическими нервами к ЦНС.

С. Прузинер сформулировал прионную концепцию (1982 г.):

- ✓ Инфекционным агентом является белок PrP<sup>sc</sup>;



- ✓ Он может реплицироваться в себя в отсутствие нуклеиновой кислоты;
- ✓ Превращение нормальной формы в патологическую происходит путем конформационного перехода.

Организмы лишённые нормальной формы приона устойчивы к прионной инфекции (межвидовой барьер).

**В настоящее время у человека известны следующие прионные заболевания:**

- ✓ Бычья губчатая энцефалопатия или коровье бешенство;
- ✓ Скрейпи овец;
- ✓ Некоторые нейродегенеративные заболевания человека – болезни Крейтцфельда-Якоба и Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, семейная фатальная бессонница и куру.

*Группа прионовых подострых трансмиссивных спонгиформных энцефалопатий человека включает:*

- болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ);
- синдром Герстмана-Страусслера-Шейнкера, (ГСШ);
- синдром "фатальной семейной бессонницы" (ФСБ);
- болезнь Куру;
- хроническую прогрессирующую энцефалопатию детского возраста или болезнь Альперса

*Болезнь Крейтцфельда-Якоба представлена тремя классическими формами:*

- спорадическая форма (85-90% всех случаев);
- семейная форма (10-15%);
- ятрогенная форма (% еще окончательно не установлен).

**Болезнь Крейтцфельда-Якоба(БКЯ):**

- Патогенез: деменция, зрительные и мозжечковые нарушения.
- Пути инфицирования: 1) при употреблении термически не обработанных продуктов животного происхождения; 2) при трансплантации тканей (например, роговицы глаза); 3) при использовании недостаточно простерилизованных хирургических инструментов
- Инкубационный период-до 20 лет.

**Куру:**

- Патогенез: поражение ЦНС, нарушение координации. эйфория.
- Пути инфицирования: в результате ритуального каннибализма (Новая Гвинея)
- Инкубационный период-1 год.

**Синдром Герстманна-Штраусслера-Шейнкера:**

- Патогенез: деменция, гипотония, нарушение глотания, дизартрия.
- Наследственное заболевание.
- Инкубационный период - от 5-30 лет

**Фатальная семейная бессонница:**

- Аутосомно-доминантное заболевание.

- Патогенез: гипертензия, тахикардия, нарушение сердечных ритмов и Скрепи-прионная болезнь овец и коз:
- Патогенез: сильный кожный зуд, поражение ЦНС, нарушение координации.

### **Перспективы лечения прионных заболеваний:**

- Размножение может быть остановлено с помощью пептидов, обогащенных пролином;
- Дрожжи представляют собой удобную модель для поиска и изучения факторов, способных излечивать клетки от прионов

## **II Цель деятельности студентов на занятии**

### **Студент должен знать:**

1. Что такое шапероны?
2. В каких процессах они участвуют?
3. Функции шаперонов?
4. Классификацию шаперонов по молекулярной массе. Виды шаперонов.
5. Особенности синтеза шаперонов.
6. Механизм действия шаперонов HSP40, HSP60, HSP70, HSP90.
7. Болезнь Альцгеймера.
8. Как осуществляется активация иммунной системы. Процесс распознавания АГ.
9. Что такое прионы?
10. Какие заболевания называются прионовыми?
11. Существуют ли в норме прионы? Для чего они необходимы?
12. Какие существуют формы приона
13. Отличие нормальной формы приона от инфекционной изоформы.
14. Свойства прионов.
15. Модели перехода нормальной формы в измененную. Их особенности.
16. Основные пункты прионовой концепции С. Прузинера, сформулированной в 1982 г.
17. Какие известны прионные заболевания?
18. Особенности течения болезни Крейтцфельда-Якоба?
19. Особенности течения болезни Куру?
20. Особенности течения фатальной семейной бессонницы.

### **Студент должен уметь:**

1. Объяснить процесс распознавания АГ.
2. Рассказать о биологической роли шаперонов.
3. Распознать прионные заболевания, по клиническим проявлениям.

## **III Содержание обучения:**

### **Основные вопросы:**

1. Шапероны, определение, функции.
2. Классификация шаперонов по молекулярной массе. Виды шаперонов.



3. Особенности синтеза шаперонов.
4. Механизм действия шаперонов HSP40, HSP60, HSP70, HSP90.
5. Активация иммунной системы. Процесс распознавания АГ.
6. Прионы, определение, свойства. Процессы, в которых участвуют прионы.
7. Отличие нормальной формы приона от инфекционной изоформы.
8. Модели перехода нормальной формы в измененную. Их особенности.
9. Прионные заболевания. Примеры, особенности течения.
10. Основные пункты прионовой концепции С. Прузинера, сформулированной в 1982 г.
11. Особенности течения болезни Крейтцфельда-Якоба?
12. Особенности течения болезни Куру?
13. Особенности течения фатальной семейной бессонницы.

#### **IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.**

##### **Решение ситуационных задач (прилагаются)**

##### **Задачи:**

##### **Наглядные пособия:**

Рис. 1. Процесс распознавания АГ, рис. 2. Модели перехода конформации приона, рис.3. Схема процесса накопления молекул инфекционного прионного белка, таблица 1. Основные симптомы, наблюдаемые при прионных заболеваниях, таблица 2. Синтез белка на рибосомах.

##### **Таблицы названия**

##### **V Наименование лабораторной работы:**

##### **VI Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:**

1. Белки, определение, функции.
2. Аминокислотный состав белков организма человека. Понятие заменимые и незаменимые аминокислоты (амк), их представители.
3. Структурная организация белковой молекулы. Формирование первичной, вторичной, третичной, четвертичной структур.
4. Образование пептидной связи.

##### **VII Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:**

1. Шапероны, определение, функции.
2. Классификация шаперонов по молекулярной массе. Виды шаперонов.
3. Особенности синтеза шаперонов.
4. Механизм действия шаперонов HSP40, HSP60, HSP70, HSP90.
5. Болезнь Альцгеймера.
6. Активация иммунной системы. Процесс распознавания АГ.
7. Прионы, определение, свойства. Процессы, в которых участвуют прионы.
8. Отличие нормальной формы приона от инфекционной изоформы.
9. Модели перехода нормальной формы в измененную. Их особенности.
10. Прионные заболевания. Примеры, особенности течения.

11. Основные пункты прионовой концепции С. Прузинера, сформулированной в 1982 г.
12. Особенности течения болезни Крейтцфельда-Якоба?
13. Особенности течения болезни Куру?
14. Особенности течения фатальной семейной бессонницы.

**Тестовый контроль:**

**VIII Хронокарта учебного занятия:**

1. Общий бюджет времени: 2ч;
2. Переключка 5 минут;
3. Разбор основных вопросов темы 60 минут;
4. Тестовый опрос 20 минут;

**IX Самостоятельная работа студентов:**

**Вопросы для самостоятельного обучения:**

1. Особенности течения других прионных заболеваний.

**X Список используемой литературы:**

**Обязательная:**

1. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
2. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;
3. Научная статья от М.В. Гришниковой, Н.М. Кутузовой
4. Учебник по общей неврологии от А.С. Никифорова, Е.И. Гусева 2007

**Дополнительная:**

5. Интернет ресурсы:
6. Сайт pubmed.com
7. Сайт rpubmed.com
8. Портал «вечная молодость»

**Рис. 2. Модели перехода конформации приона**



Симптомы	Частота (%)
Умственные нарушения (деменция, психические или поведенческие нарушения)	100
Миоклонус	>80
Пирамидные знаки	>50
Мозжечковые симптомы	>50
Экстрапирамидные симптомы	>50
Корковые зрительные нарушения	>20
Глазодвигательные нарушения	>20
Поражения нижнего мотонейрона	<20
Вестибулярные нарушения	<20
Припадки	<20
Чувствительные нарушения	<20
Вегетативные нарушения	<20

## Тема: Ферментодиагностика.

### I Научно-методическое обоснование темы:

Одним из основных объектов определения ферментативной активности при заболевании служит кровь: сыворотка или плазма. Чаще с диагностическими целями анализируют сыворотку.

В сыворотке крови присутствуют ферменты, имеющие различное происхождение:

- клеточные ферменты – попадают в кровь из тканей в результате физиологического старения и гибели клеток, повышения проницаемости мембран. Уровень этих ферментов в крови зависит от их концентрации в тканях, молекулярной массы и локализации в клетке. Неспецифические клеточные ферменты обнаруживаются в большинстве органов. Органоспецифические ферменты (или маркерные) обнаруживаются в определенных тканях (аргиназа – в паренхиме печени, креатинкиназа – в мышечной ткани).
- Секреторные ферменты выполняют в крови свою специфическую функцию (ферменты свертывающей системы крови и системы фибринолиза постоянно вырабатываются в печени и секретируются в кровь, где и участвуют в процессах гемостаза; аналогично – церулоплазмин из печени поступает в кровь, где осуществляет транспорт меди). Секреторные ферменты специфичны для плазмы.
- Экскреторные ферменты синтезируются пищеварительными железами (поджелудочная железа, слизистая кишечника, эндотелий желчевыводящих путей). Появление этих ферментов в сыворотке в норме обусловлено естественным разрушением клеточных структур. К экскреторным ферментам относится щелочная фосфатаза, амилаза, липаза. Это ферменты неспецифичные для плазмы. В норме их в плазме мало и следовательно активность низка, но она резко увеличивается при патологии органа.

Присутствие ферментов в плазме может быть оценено как: гиперферментопатия, гипоферментопатия и дисферментопатия.

Гипоферментопатия касается большей степени секреторных ферментов и регистрируется редко. Она может быть обусловлена:

1. генетическими нарушениями, приводящими к нарушению синтеза фермента;
2. ингибированием синтеза фермента;
3. усилением деградации фермента.

Гиперферментопатия может быть обусловлена:

1. выходом ферментов из поврежденных органов и тканей;
2. результатом действия сильных раздражителей, сопровождающихся метаболическими перестройками (вместе с появлением лейкоцитоза, увеличением СОЭ);
3. усилением синтеза белка.

Дисферментопатии в основном связаны с появлением в крови органоспецифических ферментов. Диагностически значимые ферменты дают достаточную информацию для установления факта развивающейся патологии, оценки тяжести заболевания, контроля проводимой терапии.

#### **Лактатдегидрогеназа (КФ. 1.1.1.27) – ЛДГ.**

Лактатдегидрогеназа – ЛДГ (КФ. 1.1.1.27) катализирует окисление лактата в пировиноградную кислоту. Для реакции необходимо присутствие НАД. Фермент присутствует во всех органах и тканях в разных количествах, включая эритроциты.

11

Определяется спектрофотометрически и колориметрически. Имеет диагностическое значение при:

- острый инфаркт миокарда – возрастает активность фермента, достигая максимального значения к 48 часам. При стенокардии увеличение активности фермента в сыворотке не регистрируется;
- паренхиматозный гепатит – регистрируется повышение активности в сыворотке в первую неделю желтушного периода;
- механическая желтуха – активность повышена на поздних стадиях заболевания, вследствие вторичных повреждений печени;
- злокачественные заболевания печени – повышение активности в плазме регистрируется не всегда;

хронический гепатит и цирроз – активность фермента повышена при обострении процесса, а в стадии ремиссии близка к норме. В сыворотке крови постоянно присутствуют 5 изоферментов, которые можно проанализировать (количественно и качественно) после электрофоретического разделения ЛДГ. Изоферментный спектр и преимущественные изменения соотношения изоформ в сыворотке характерны для разных патологий и органов

#### **Ферменты, наиболее часто используемые в диагностике.**

Фермент	Органы	Патология
Альдолаза	Скелетные мышцы	Заболевания мышц
Аланинаминотрансфераза (АлАТ)	Печень, скелетные мышцы, сердце	Паренхиматозные заболевания печени
Амилаза	Слюнные железы, поджелудочная железа	Патология поджелудочной железы
Аспартатаминотрансфераза (АсАТ)	Печень, скелетные мышцы, сердце, почки.	Инфаркт миокарда, паренхиматозные заболевания печени, патология мышц
Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ)	Печень, почки	Алкогольная интоксикация Патология гепатобилиарного тракта
Кислая фосфатаз (КФ)	Простата.	Опухоль простаты
Креатинкиназа (КК) Креанинфосфокиназа (КФК)	Скелетные мышцы, мозг, сердце, гладкие мышцы	Инфаркт миокарда, заболевания мышц
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	Сердце, печень, скелетные мышцы, эритроциты,	Инфаркт миокарда, гемолиз, паренхиматозные заболевания

	тромбоциты, лимфатические узлы	печени, острые пневмония, злокачественные новообразования
Липаза	Поджелудочная железа	Патология поджелудочной железы
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	Печень, кость, слизистая кишечника.	Патология костной ткани, патология гепатобилиарного тракта

#### Диагностическая значимость изоферментов ЛДГ.

Патология	Изоферменты в крови	Примечания
инфаркт миокарда	ЛДГ <sub>1</sub> ↑ и частично ЛДГ <sub>2</sub> ↑	Изменения активности изоферментов в крови сохраняются дольше, чем изменения суммарной активности ЛДГ
гепатит	ЛДГ <sub>5</sub> ↑ ЛДГ <sub>4</sub> ↑ ЛДГ <sub>1</sub> ↓ ЛДГ <sub>2</sub> ↓	
цирроз печени	ЛДГ <sub>5</sub> ↑ ЛДГ <sub>4</sub> ↑	
калькулезный холецистит, обтурационная желтуха опухолевого происхождения	ЛДГ <sub>5</sub> ↑	
миопатия	ЛДГ <sub>1</sub> ↑, ЛДГ <sub>2</sub> ↑, ЛДГ <sub>3</sub> ↑, ЛДГ <sub>4</sub> ↓, ЛДГ <sub>5</sub> ↓	Снижение активности ... соответствует тяжести заболевания
лейкозы	ЛДГ <sub>2</sub> ↑, ЛДГ <sub>3</sub> ↑,	В сыворотке крови и в лейкоцитах увеличение активности изоферментов параллельно увеличению количества незрелых клеток
опухолевой процесс	ЛДГ <sub>3</sub> ↑, ЛДГ <sub>4</sub> ↑, ЛДГ <sub>5</sub> ↑	Изменения в спектре изоферментов зависят от активности метастазирования
заболевания легких	ЛДГ <sub>3</sub> ↑	При выраженной гипоксии иногда увеличивается

#### Аминотрансферазы

Аминотрансферазы принимают участие в переаминировании аминокислот. Диагностически значимы:

- аспартатаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1) – АСТ
- аланинаминотрансфераза (КФ 2.6.1.2) – АЛТ

Клеточные ферменты - аминотрансферазы встречаются во всех органах и тканях. Большое количество АСТ содержится в эритроцитах, поэтому для определения активности трансфераз в сыворотке гемолизированная кровь не используется. Активность ферментов определяется хроматографическими, спектрофотометрическими и колориметрическими методами. Диагностически значимым при определении активности трансфераз является коэффициент де Ритиса АСТ/АЛТ, изменение которого характерно для патологических процессов.

#### Глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.2) – ГлДГ.

Катализирует превращение глутамата в альфа-кетоглутарат. Фермент локализован в митохондриях и определяется при диагностике заболеваний печени. Отношение активности двух ферментов: сорбитолдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы СДГ/ГлДГ может быть использовано для дифференциальной диагностики желтух. В норме в сыворотке крови фермент практически отсутствует, его активность в сыворотке повышается при повреждении гепатоцитов. При патологиях, некрозом печеночной ткани, активность ферментов резко увеличивается. Аналогичный эффект вызывает отравление гепатогенными ядами.

Патология	Фермент	Примечания
инфаркт миокарда	АСТ повышени е  АЛТ повышени е	через 6-12 часов после возникновения инфаркта. Максимум повышения концентрации наблюдается через 24-48 часов. Возвращается к норме через 4-5 дней. Возрастает с увеличением размера очага и некроза повышение активности менее резко выражено
стенокардия	АСТ повышени е	в пределах нормы за исключением тяжелых приступов
заболевания печени	АЛТ повышени е	первым появляется в крови, активность возрастает при инфекционном гепатите, активность возрастает в инкубационном периоде, максимум увеличения приходится на 6-10 день заболевания.

	АСТ повышени е	появляется при углублении деструктивных процессов в клетках
--	----------------------	---

#### **Сорбитолдегидрогеназа (КФ 1.1.1.14) – СДГ.**

Катализирует превращение сорбитола во фруктозу, обладает органоспецифичностью – содержится в основном в печени, простате, почках. Имеет диагностическое значение при оценке поражения печени. При всех формах острого гепатита в первые 10 дней растет активность этого фермента, поэтому он удобен для ранней диагностики. При хроническом гепатите и циррозе печени увеличение активности фермента характерно для периода обострения заболевания. При механических желтухах – повышение активности фермента регистрируется в первые недели желтушного периода.

#### **γ-Глутамилтранспептидаза (КФ 2.3.2.2) – ГГТП.**

γ-Глутамилтранспептидаза катализирует образование новых γ-глутамилпептидов за счет переноса γ-глутамилтранспептидного остатка. Увеличение активности фермента в крови регистрируется при патологии печени разного генеза, наиболее выражено отклонение активности фермента от нормы при циррозе печени алкогольного происхождения. Активность может также быть увеличена при остром инфаркте миокарда, опухолях головки поджелудочной железы. Активность ферментов в крови таким образом часто определяется сопутствующими заболеваниями.

#### **Превышение нормальных величин активности ГГТП в крови:**

Более, чем в 10 раз	В 5-10 раз	Менее, чем в 5 раз
Алкогольное поражение печени	Гепатит	Алкоголизм
Холестаз	Цирроз	Отравления
Рак головки поджелудочной железы	Заболевания печени	Хроническая сердечная недостаточность
	Панкреатит	

#### **Холинэстераза – ХЭ.**

Различают два типа ферментов (ХЭ): одна группа – это истинная ХЭ (ацетилхолинэстераза КФ 3.1.1.7), вторая - псевдохолинэстеразы (КФ 3.1.1.8), отличающиеся более широкой субстратной специфичностью.

Повышение активности ХЭ в сыворотке крови наблюдается при тяжелой форме болезни Боткина (на протяжении всего желтушного периода). Увеличение активности наблюдается также при циррозе печени, при онкологических заболеваниях, в случае метастазирования в печень, нефротическом синдроме, бронхиальной астме, ревматическом эндокардите.

Миорелаксанты могут приводить к длительному выраженному снижению ХЭ.

Ингибирование ХЭ имеет место при отравлении пестицидами, инсектицидами, фосфорорганическими соединениями. При интоксикации угнетение активности ХЭ в сыворотке крови наступает уже при низких дозах яда, и оценивается как один из первых симптомов интоксикации, что и является результатом изменения активности синтеза белков в печени. Гипоферментемия регистрируется при тяжелых инфекционных заболеваниях, мышечной дистрофии, недостаточности питания.

#### **Креатинкиназа (КФ 2.7.3.2) – КК.**

Креатинкиназа – фермент, который присутствует в тканях, нуждающихся в больших количествах энергии в малые промежутки времени. Фермент определяется колориметрически и спектрофотометрически в сыворотке крови. Для определения изоформ может быть использован метод электрофореза или колоночной хроматографии.

Изоферменты КК:

1. ВВ – изофермент мозгового типа, обладает наибольшей подвижностью в электрическом поле;
2. ВМ – изофермент, содержащийся преимущественно в сердечной мышце, обладает наименьшей подвижностью при электрофорезе;
3. ММ – изофермент, характерный для скелетной мускулатуры.

Активность фермента возрастает:

- при повреждении скелетной мускулатуры;
- при прогрессирующей мышечной дистрофии (изоформа ММ)
- при остром инфаркте миокарда (изоформа ВМ), при этом возрастание активности фермента обнаруживается через 3-4 часа после начала заболевания, опережая изменения других ферментов, но не повышается при инфаркте легкого или поражении паренхимы печени, и достигает максимума активности через 18-24 часа;
- при заболеваниях центральной нервной системы, таких как шизофрения, маниакально-депрессивный психоз и других (изоформа ВВ).

На активность фермента могут влиять анестезирующие средства, и изменение активности КК может быть зарегистрировано в послеоперационном периоде.

#### **Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) – ЩФ.**

Щелочная фосфатаза активна при pH = 8,6-10,1 и сосредоточена в основном в костной ткани, слизистой кишечника, почках, печени.

Активность фермента определяется по используемому субстрату и отщепившемуся в результате реакции неорганическому фосфату или органическому соединению.

Около 10. фосфаты, бораты, оксалаты подавляют активность ферментов

Активность фермента в сыворотке крови у детей выше, чем у взрослых за счет высокой функциональной активности остеобластов. Активность фермента повышается при рахите, остеосаркомах, болезни Педжета, при метастазах опухолей в костную ткань.

Значительное возрастание активности фермента отмечается при патологии гепатобилиарной системы при желтухах различного генеза.

Фермент представлен в сыворотке несколькими изоформами (ИЗФ), что может быть использовано для диагностики заболеваний печени и костной системы:

Наибольшее диагностическое значение имеют

Костная Изф- характеризует патологию костных систем, активность фермента заметно повышена при усиленном росте костей, рахите, гиперпаратиреозе, опухолях костей, переломе. Определение костной ИЗФ наиболее рационально радиоиммунными и изоферментными методами.

Печеночная Изф- представлена двумя изоферментами, активность которых повышается при гепатоцеллюлярном раке печени, при васкулитах, а также в период беременности.

Кишечная Изф- может быть увеличена у лиц 1 и 3 групп крови при патологиях кишечника, сопровождающихся нарушениями всасывания.

Почечная Изф- экскретируется с мочой и также может быть использована в диагностике заболеваний почек

#### **Кислая фосфатаза (КФ 3.11.3.3) – КФ.**

Оптимум рН для этого фермента 5,0-5,5. Большое количество КФ содержится в предстательной железе человека. Активность фермента определяет состояние предстательной железы, ее сохранность и повышается при опухолевых процессах.

#### **Диагностическая значимость ферментов**

фермент	Повышение активности в сыворотке	Понижение активности в сыворотке	Примечание
Аспаратаминотрансфераза АСТ	Инфаркт миокарда Цирроз печени Мышечная дистрофия Дерматомиозит Опухоли печени	Авитаминоз В6 Почечная недостаточность Беременность Повторный гемодиализ	
Аланиламинотрансфераза АЛТ	Цирроз печени Опухоли печени Метастазы в печени Острый инфекционный гепатит	Авитаминоз В6 Почечная недостаточность Беременность Повторный гемодиализ	
Альфа-амилаза сыворотки	Острый панкреатит Киста поджелудочной железы Закупорка протока поджелудочной железы В случае почечной недостаточности, диабетического ацидоза, воспаления поджелудочной железы на фоне перфорации пептической язвы	Острый и хронический гепатит Недостаточность поджелудочной железы Токсикоз при беременности	
Креатинкиназа (КК)	Инфаркт миокарда Травма мышц Мышечная дистрофия Полимиозит, отравления Гипотиреоз Инсульт		Фермент нестабилен, сыворотку необходимо быстро отделить от сгустка, возможно замораживание
Изофермент КК ММ	Заболевания мышц Дистрофия Гипотиреоз Дерматомиозит. Состояния Рабдомиолиз, Рак, болезни печени. Физическая нагрузка		
Изофермент КК МВ	Инфаркт миокарда Рабдомиолиз Тяжелые поражения мышц Пятнистая лихорадка скалистых гор		
Изофермент ВВ	Тяжелый шок, роды Некоторые формы рака (легкие, молочная железа, яичники, простата) Заболевания соединительных тканей		
Гамма-	Алкогольная интоксикация		Высокочувствитель



глутамилтранспептидаза ГТТП	Острый инфекционный, токсический гепатит Хронический или подострый гепатит Патология гепатобилиарной системы Опухоли печени		ный критерий состояния печени
Липаза (сыворотки)	Острый и хронический в стадии обострения панкреатит Закупорка протока поджелудочной железы		Образец может храниться замороженным до суток Повышенная активность сохраняется дольше, чем у амилазы, в моче не обнаруживается
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	Некроз тканей Гемолитические анемии В12-дефицитная анемия Эритремия Острый инфекционный гепатит (острая фаза) Острые повреждения эритроцитов, почек, мышц, печени, легких, кожи		Нельзя использовать гемолизированную кровь Определению активности фермента мешает гепарин и оксалат

Кислая фосфатаза (КФ)	Карцинома простаты Болезнь Гоше Злокачественные поражения костей		Нельзя брать кровь в течение 24 часов после массажа простаты или ее инструментального исследования Активность фермента быстро падает Необходимо исключить гемолиз
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	У детей (нормальный рост костей) Костные заболевания, связанные с увеличением количества остеобластов Гиперпаратиреоз Рахит Остеомаляция Опухоли костей Закупорка желчных протоков Заболевания печени, вызванные лекарствами беременность	Гипотиреоз Замедленный рост у детей	Хранить в холодильнике сыворотку не более 48 часов Нельзя использовать фтористые соединения и оксалат

### Тестовый контроль:

#### II Цель деятельности студентов на занятии

##### Студент должен знать:

1. Классификацию ферментов по месту расположения.
2. Роль органоспецифических ферментов в диагностике заболеваний:
  - сердца,
  - печени,

- поджелудочной железы
- и др.

3. Определение активности аминотрансфераз:  
аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови.  
Определение коэффициента де Ритиса. Диагностическое значение.

**Студент должен уметь:**

Дифференцировать заболевания :

- сердца -знать динамику сывороточных ферментов после типичного инфаркта миокарда
- печени-гепатит, цирроз и др.
- поджелудочной железы –острый панкреатит

**III Содержание обучения:**

**Основные вопросы:**

Ферменты, наиболее часто используемые в диагностике.

Роль органоспецифических ферментов в диагностике заболеваний:сердца, печени, поджелудочной железы

**IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.**

Определение АСТ, АЛТ в сыворотке крови

**Решение ситуационных задач (прилагаются)**

**Задачи:**

**VIII Хронокарта учебного занятия:**

5. Общий бюджет времени: 3 (125);
6. Переключка 5 минут;
7. Разбор основных вопросов темы 60 минут;
8. Тестовый опрос 20 минут;
9. Проведение лабораторной работы;
10. Оформление протоколов 10 минут

**IX Самостоятельная работа студентов:**

**Вопросы для самостоятельного обучения:**

Особенности течения других заболеваний –какие ферменты определяются в крови

**X Список используемой литературы:**

**Обязательная:**

9. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004; 2007, 2009
- 10.Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

**Дополнительная:**

- 11.Интернет ресурсы

### Биохимия обмена веществ

**Тема: Перекисное окисление липидов в норме и патологии.**

**Ферментативное звено антиоксидантной системы защиты.**

**I Научно-методическое обоснование темы:**

## 1. Активные формы кислорода – классификация и свойства.

Кислород, необходимый организму для функционирования ЦПЭ и многих других реакций, является одновременно и токсическим веществом, если из него образуются так называемые активные формы.

- К активным формам кислорода относят:
- $\text{OH}^\bullet$  - гидроксильный радикал;
- $\text{O}_2^{\bullet -}$  - супероксидный анион;
- $\text{H}_2\text{O}_2$  - пероксид водорода.

А так же пергидроксильный ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), пероксильный ( $\text{RO}_2^\bullet$ ) и алкоксильный ( $\text{RO}^\bullet$ ) радикалы, оксид азота ( $\text{NO}^\bullet$ ), пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), гипохлорит ( $\text{HOCl}$ ), перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и др. Помимо продуктов восстановления  $\text{O}_2$ , к АФК относят также озон ( $\text{O}_3$ ) и синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ , то есть кислород, находящийся в возбужденном (синглетном) состоянии [Владимиров, 1998; Осипов, Азизова, Владимиров, 2003].

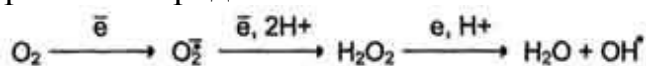
Активные формы кислорода образуются во многих клетках в результате последовательного одноэлектронного присоединения 4 электронов к 1 молекуле кислорода. Конечный продукт этих реакций - вода, но по ходу реакций образуются химически активные формы кислорода. Наиболее активен гидроксильный радикал, взаимодействующий с большинством органических молекул. Он отнимает от них электрон и инициирует таким образом цепные реакции окисления. Эти свободнорадикальные реакции окисления могут выполнять полезные функции, например, когда клетки белой крови с участием активных форм кислорода разрушают фагоцитированные клетки бактерий. Но в остальных клетках свободнорадикальное окисление приводит к разрушению органических молекул, в первую очередь липидов, и, соответственно, мембранных структур клеток, что часто заканчивается их гибелью. Поэтому в организме функционирует эффективная система ингибирования перекисного окисления липидов (ПОЛ).

### Источники активных форм кислорода

#### ЦПЭ как источник активных форм кислорода

Утечка электронов из ЦПЭ и непосредственное их взаимодействие с кислородом - основной путь образования активных форм кислорода в большинстве клеток.

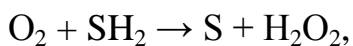
Кофермент Q в ЦПЭ принимает от доноров последовательно по одному электрону, превращаясь в форму семихинона (рис. 8-55) -  $\text{CoQH}^\bullet$  (см. раздел 6). Этот радикал может непосредственно взаимодействовать с кислородом, образуя супероксидный анион  $\text{O}_2^{\bullet -}$ , который, в свою очередь, может превращаться в другие активные формы кислорода:





**Рис. 1. Реакции последовательного восстановления убихинона дыхательной цепи.**

Многие оксидазы - ферменты, непосредственно восстанавливающие кислород, образуют пероксид водорода - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Оксидазы образуют пероксид водорода по схеме:

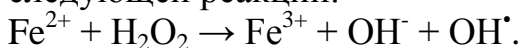


где SH<sub>2</sub> - окисляемый субстрат.

Примеры таких оксидаз - оксидазы аминокислот, супероксид дисмутаза, оксидазы, локализованные в пероксисомах. Оксидазы пероксидом окисляют, в частности, жирные кислоты с очень длинной углеродной цепью (более 20 углеродных атомов) до более коротких, которые далее подвергаются β-окислению в митохондриях.

Моноксигеназы, например цитохром P<sub>450</sub>, включающий один атом кислорода в окисляемую молекулу, и диоксигеназы, включающие оба атома кислорода, также служат источниками активных форм кислорода.

Пероксид водорода химически не очень активен, но способствует образованию наиболее токсичной формы кислорода - гидроксильного радикала (OH<sup>•</sup>) по следующей реакции:



Наличие в клетках Fe<sup>2+</sup> или ионов других переходных металлов увеличивает скорость образования гидроксильных радикалов и других активных форм кислорода. Например, в эритроцитах окисление иона железа гемоглобина способствует образованию супероксидного аниона.

Супероксидный анион-радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Среди кислородных свободных радикалов ему отводят наиболее значительную роль, так как считается, что именно он является родоначальником многих других активных форм кислорода. **Супероксидный радикал (СОР)** образуется при присоединении одного электрона к молекуле кислорода в основном состоянии [Chen, Warden, Stenken, 2004]. Химическая активность O<sub>2</sub><sup>-</sup> в значительной степени зависит от физико-химического состояния окружающей его клеточной или внеклеточной среды. В водных растворах O<sub>2</sub><sup>-</sup> способен окислять аскорбиновую кислоту, адреналин и тиоловые соединения, выступая как слабый окислитель [Хавинсон, Баринов, Арутюнян 2003]. Значительно более выражены восстановительные свойства супероксидного радикала. В присутствии ионов

негемового железа СОР достаточно активно восстанавливает его из 3+ в 2+. Это свойство СОР чрезвычайно важно, поскольку двухвалентное железо играет большую роль в образовании агрессивных липидных и гидроксильных радикалов. Супероксидный радикал также может восстанавливать содержащие трехвалентное железо комплексы (цитохром с, ферри-ЭДТА) и нитросиний тетразолий.

Супероксиданион-радикал – пусковое звено каскада радикальных реакций, приводящих к возникновению большинства АФК и продуктов перекисного окисления липидов. Он участвует в синтезе хемотаксических пептидов, усиливает митогенстимулированную пролиферацию лимфоцитов, ингибирует действие эндотелиального фактора расслабления, может повреждать мембраны эритроцитов, ингибировать Са-АТФазу, синтез РНК и белка эндотелиальных клеток, окислять белки сыворотки, в тоже время его непосредственная цитотоксичность невелика.

## **2. Перекисное окисление липидов**

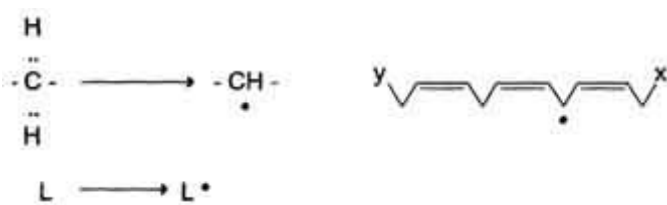
Все активные формы кислорода обладают высокой цитотоксичностью в отношении любых типов клеток и клеточных образований, что определяется их химической активностью. Можно выделить 4 наиболее вероятные мишени окислительной цитотоксической атаки АФК: индукция процессов ПОЛ в биологических мембранах, повреждение мембраносвязанных белков, инактивация ферментов и повреждение ДНК клеток.

Реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются свободнорадикальными и постоянно происходят в организме. Свободнорадикальное окисление нарушает структуру многих молекул. В белках окисляются некоторые аминокислоты. В результате разрушается структура белков, между ними образуются ковалентные "сшивки", всё это активирует протеолитические ферменты в клетке, гидролизующие повреждённые белки. Активные формы кислорода легко нарушают и структуру ДНК. Неспецифическое связывание  $Fe^{2+}$  молекулой ДНК облегчает образование гидроксильных радикалов, которые разрушают структуру азотистых оснований. Но наиболее подвержены действию активных форм кислорода жирные кислоты, содержащие двойные связи, расположенные через  $CH_2$ -группу. Именно от этой  $CH_2$ -группы свободный радикал (инициатор окисления) легко отнимает электрон, превращая липид, содержащий эту кислоту, в свободный радикал.

ПОЛ - цепные реакции, обеспечивающие расширенное воспроизводство свободных радикалов, частиц, имеющих неспаренный электрон, которые инициируют дальнейшее распространение перекисного окисления.

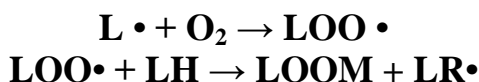
### **Стадии перекисного окисления липидов**

#### **1) Инициация: образование свободного радикала ( $L\bullet$ )**



Иницирует реакцию чаще всего гидроксильный радикал, отнимающий водород от  $\text{CH}_2$ -групп полиеновой кислоты, что приводит к образованию липидного радикала.

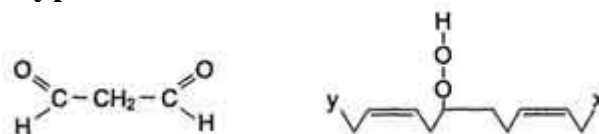
## 2) Развитие цепи:



Развитие цепи происходит при присоединении  $\text{O}_2$ , в результате чего образуется липопероксирадикал  $\text{LOO} \cdot$  или пероксид липида  $\text{LOOH}$ .

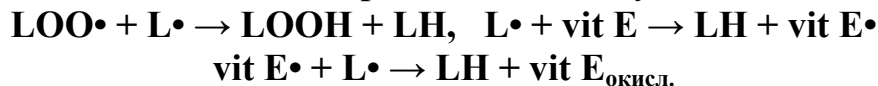
ПОЛ представляет собой свободнорадикальные цепные реакции, т.е. каждый образовавшийся радикал иницирует образование нескольких других.

## 3) Разрушение структуры липидов



Конечные продукты перекисного окисления полиеновых кислот - малоновый диальдегид и гидропероксид кислоты.

## 4) Обрыв цепи - взаимодействие радикалов между собой:



Развитие цепи может останавливаться при взаимодействии свободных радикалов между собой или при взаимодействии с различными антиоксидантами, например, витамином E, который отдаёт электроны, превращаясь при этом в стабильную окисленную форму.

## 3. Антиоксидантная система (АОС).

Образование АФК, известных как прооксиданты, наблюдается во многих метаболических процессах и является обязательным атрибутом нормальной аэробной жизни. Функционирование и развитие клеток, а так же организма в целом, в кислородсодержащем окружении не могло бы быть возможным без существования защитных систем, основу которых составляют ферментативные и неферментативные антиоксиданты. Постоянное образование прооксидантов в живых организмах уравновешено их дезактивацией антиоксидантами, поэтому для поддержания гомеостаза необходима непрерывная регенерация антиоксидантной способности. Отсутствие или сбой этой непрерывности сопровождаются накоплением окислительных повреждений и приводят к возникновению окислительного стресса.

### Классификация АОС системы:

#### А. Специфическая АОС:

- Специализированные ферментные системы:

- ✓ Супероксиддисмутаза (СОД);
- ✓ Кatalаза (КАТ);
- ✓ Глутатионпероксидаза и глутатион трансфераза (ГПО и ГТ)  
(локализуются преимущественно в ядре и цитоплазме)
- Специализированные неферментные системы:
  - ✓ Жирорастворимые антиоксиданты (АО): витамины Е,А,К; стероидные гормоны; венопроstagландины; полифенолы (витамин Р, убихинон).
  - ✓ Аскорбатная АО-система;
  - ✓ Тиолдисульфидная система на основе глутатиона;
  - ✓ Ароматические соединения.

## Б. Неспецифическая АОС

**Основными функциями специфической АОС являются:**

1. ограничение интенсивности реакции свободнорадикального и перекисного окисления, т.е. разрушение, образующихся АФК и продуктов их дальнейших превращений;
2. защита чувствительных к окислительным повреждениям биомолекул мембран, внутри - и внеклеточных структур от действия свободных радикалов и перекисных соединений;
3. восстановление окислительных молекулярных повреждений. В целом основная задача системы антиоксидантной защиты состоит в предотвращении и ограничении развития патологических состояний, вызываемых окислительными повреждениями структур организма.

## Неспецифическая АОС

Функция: предотвратить условия в процессе аутоокисления субстратов (микросомальное окисление).

### 4. Ферментативное звено АОС

К ферментам, защищающим клетки от действия активных форм кислорода, относят супероксиддисмутазу, кatalазу и глутатионпероксидазу; Наиболее активны эти ферменты в печени, надпочечниках и почках, где содержание митохондрий, цитохрома P<sub>450</sub> и пероксином особенно велико.

СОД - это ключевой водорастворимый фермент. Превращает супероксидные анионы в пероксид водорода:  $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$  интка, железа и имидазол гистидина. Локализуется в цитоплазме. Обладает высокой

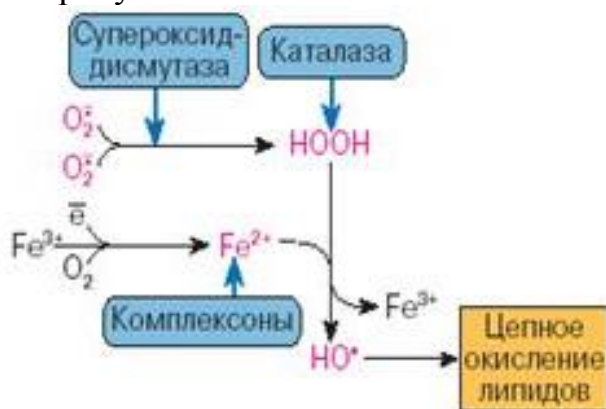
термоустойчивостью, устойчив к действию протеаз, обладает широким оптимумом рН каталитической активности.

Изоферменты СОД находятся и в цитозоле и в митохондриях и являются как бы первой линией защиты, потому что супероксидный анион образуется обычно первым из активных форм кислорода при утечке электронов из дыхательной цепи.

СОД - индуцируемый фермент, т.е. синтез его увеличивается, если в клетках активируется перекисное окисление. Пероксид водорода, который может инициировать образование самой активной формы  $\text{OH}\cdot$ , разрушается ферментом каталазой:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ .

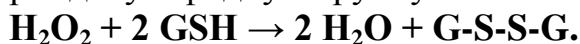
**Каталаза (КАТ)** находится в основном в пероксисомах, где образуется наибольшее количество пероксида водорода, а также в лейкоцитах, где она защищает клетки от последствий "респираторного взрыва".

КАТ обеспечивает расщепление перекиси водорода до двух молекул воды и кислорода. Из-за большого молекулярного веса практически не проникает через мембрану клетки.



**РИС.2. АНТИОКСИДАНТЫ ВОДНОЙ ФАЗЫ**

**Глутатионпероксидаза (ГПО)** - важнейший фермент, обеспечивающий инактивацию АФК, так как он разрушает и пероксид водорода и гидропероксиды липидов. Он катализирует восстановление пероксидов с помощью трипептида глутатиона ( $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин). Сульфгидрильная группа глутатиона (GSH) служит донором электронов и, окисляясь, образует дисульфидную форму глутатиона, в которой 2 молекулы глутатиона связаны через дисульфидную группу.



Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой:



Глутатионпероксидаза, которая восстанавливает гидропероксиды липидов в составе мембран, в качестве кофермента использует **селен** (необходимый микроэлемент пищи). При его недостатке активность антиоксидантной защиты снижается.

ГПО является главной ферментативной системой плазмы крови: внеклеточных жидкостей и гидроперекисей липидов (ГПО 4), которая будучи липофильным соединением эффективно взаимодействует с гидроперекисями



фосфотидилхолина, холестерина и эфиров холестерина в липопротеинах низкой плотности (ЛПНП), восстанавливая их, следовательно, защищая от окислительной модификации. Кроме того ГПО 4 совместно с токоферолом практически полностью подавляет ПОЛ в биологических мембранах благодаря тому, что витамин Е эффективно восстанавливает пероксирадикалы, а фермент разлагает гидроперекиси, препятствуя тем самым их вовлечению в окислительный цикл.

### **Глутатионтрансфераза (ГТ)**

ГТ, в отличие от селенсодержащей ГПО, для которой лучшими субстратами являются гидрофильные гидроперекиси с малым размером молекул, эффективно восстанавливает гидрофобные гидроперекиси с большим объемом молекулы: гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (линолевой и арахидоновой), фосфолипидов.

Вместе с тем во всех водных и липидных фазах организма могут протекать радикальные окислительные процессы, в защите от которых важную роль играют антиоксиданты-ингибиторы органических радикалов, среди которых важное место занимают соединения фенольного типа.

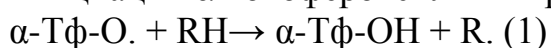
В настоящее время выделено несколько тысяч фенольных соединений, среди которых выраженным антиоксидантным эффектом обладают витамины Е и К, убихиноны, триптофан и фенилаланин, а так же большинство растительных (флавоноиды) и животных пигментов.

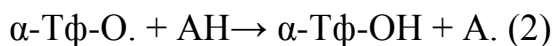
### **Неферментативное звено АОС**

**Витамин Е** ( $\alpha$ -токоферол) - наиболее распространённый антиоксидант в природе - является липофильной молекулой, способной инактивировать свободные радикалы непосредственно в гидрофобном слое мембран и таким образом предотвращать развитие цепи перекисного окисления. Различают 8 типов токоферолов, но  $\alpha$ -токоферол наиболее активен.

Витамин Е отдаёт атом водорода свободному радикалу пероксида липида ( $\text{ROO}\cdot$ ), восстанавливая его до гидропероксида ( $\text{ROOH}$ ) и таким образом останавливает развитие ПО. Свободный радикал витамина Е, образовавшийся в результате реакции, стабилен и не способен участвовать в развитии цепи. Наоборот, радикал витамина Е непосредственно взаимодействует с радикалами липидных перекисей, восстанавливая их, а сам превращается в стабильную окисленную форму -- токоферолхинон.

В антирадикальной защите липопротеинов плазмы крови и клеточных мембран  $\alpha$ -токоферолу принадлежит ведущая роль – одна его молекула защищает  $\approx 10000$  молекул ненасыщенных жирных кислот, при этом считается, что  $\alpha$ -токоферол способен обезвредить не менее 60% образующихся пероксильных радикалов. Окисление  $\alpha$ -токоферола со свободными радикалами компенсируется биорегенерацией молекул этого антиоксиданта в реакциях восстановления коантиоксидантами (АН), редокс-потенциал которых ниже, чем у радикала  $\alpha$ -токоферола ( $\alpha\text{-Тф-О}\cdot$ ). В результате такой реакции не только происходит восстановление витамина Е, но и предотвращается возможность инициации  $\alpha$ -токофероксильным радикалом окисления липидов:





В физиологических условиях вторая реакция обычно превалирует над первой, так как константа скорости реакции  $\alpha\text{-Тф-О} \cdot$  с НЖК не превышает  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , в то время как для реакции (1) константа скорости может достигать значений  $10^4\text{-}10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . К наиболее изученным коантиоксидантам относятся убихинол, аскорбиновая кислота (АК), билирубин.

Витамин Е (а-токоферол) ингибирует свободнорадикальное окисление путём отдачи электрона, что приводит к инактивации радикала липида, а витамин Е превращается в стабильный, полностью окисленный токоферолхинон.

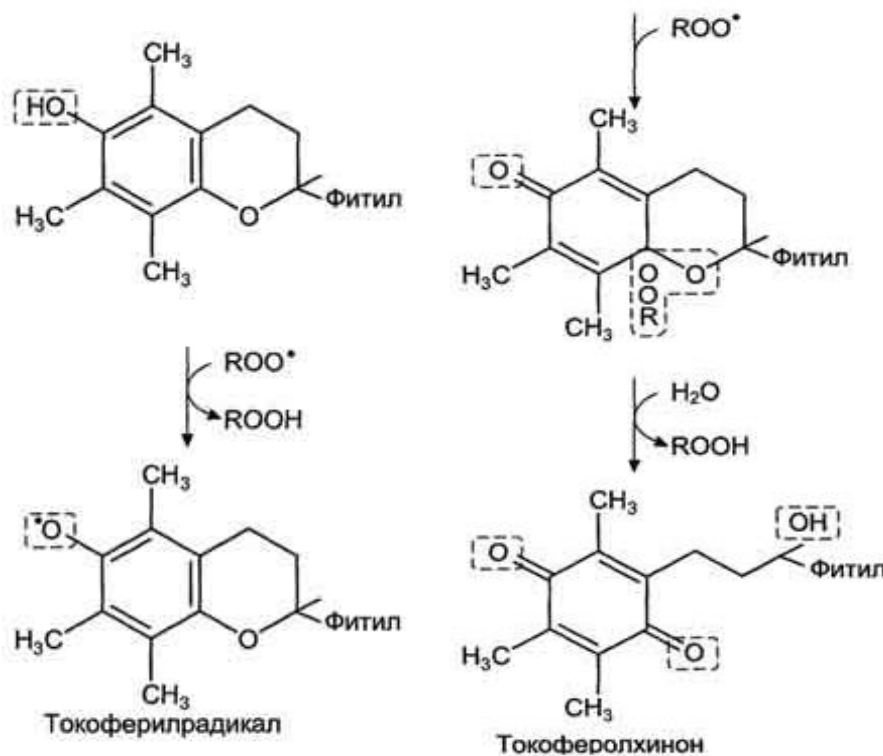


Рис. 3. Механизм антиоксидантного действия витамина Е.



Рис.4. Окислительно-восстановительные превращения  $\alpha$ -токоферола и сопряженных с ним коантиоксидантов.

**Витамин С (Рис.5.)** (аскорбиновая кислота) также является антиоксидантом и участвует с помощью двух различных механизмов в ингибировании ПОЛ. Во-первых, витамин С восстанавливает окисленную форму витамина Е и таким образом поддерживает необходимую концентрацию этого антиоксиданта непосредственно в мембранах клеток. Во-вторых, витамин С, будучи водорастворимым витамином и сильным восстановителем, взаимодействует с водорастворимыми активными формами кислорода -  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}\cdot$  и инактивирует их.



Наиважнейшим антиоксидантом внеклеточной жидкости является мочевая кислота (МК). Ввиду высокого ее содержания в плазме крови человека некоторые исследователи считают, что на нее приходится 35-65% защиты липопротеинов от окисления, 10-15% ингибирования НО. и 12% ингибирования синглетного кислорода. Кроме того МК может выступать синергистом с радикалами  $\alpha$ -токоферола и аскорбиновой кислотой, что усиливает их антиоксидантное действие.

В последние годы широко обсуждается роль активных форм кислорода (АФК) и инициируемых ими свободнорадикальных процессов при различных патологических процессах. В нормальных условиях активность этих процессов находится на невысоком уровне, но при стрессовых ситуациях происходит усиленное образование АФК, под действием которых происходит избыточная и неконтролируемая активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что в конечном итоге может привести к патологическому состоянию, которое сопровождается дисбалансом ферментативных и неферментативных компонентов системы антиоксидантной защиты. Характерным проявлением окислительного стресса является интенсификация процессов перекисного окисления липидов, индикатором которой служит увеличение содержания хотя бы одного из его продуктов. Данные о содержании продуктов ПОЛ в биологических объектах могут нести в себе информацию о глубине и степени патологического процесса. В качестве количественных маркеров наиболее часто используются такие интермедиаты ПОЛ, как диеновые конъюгаты (ДК), а также один из его конечных продуктов – малоновый диальдегид (МДА).

## **II Цель деятельности студентов на занятии**

### **Студент должен знать:**

1. АФК. Каким действием они обладают;
2. Источники образования АФК;
3. ПОЛ в норме;
4. ПОЛ при патологии;
5. Стадии ПОЛ;
6. АОС, классификация, функции;
7. Ферментативное звено АОС;
8. Описать действие СОД, характеристики;
9. КАТ. Механизм действия;
10. ГПО и ГП. Механизм действия;
11. Неферментативное звено АОС;

12. Роль ионов меди, цинка, железа и других металлов в АОС;

13. «Окислительный стресс»;

**Студент должен уметь:**

1. Уметь писать реакцию, катализируемую СОД;

2. Уметь писать реакцию, катализируемую КАТ;

3. Уметь писать реакцию, катализируемую ГПО;

4. Написать стадии ПОЛ;

5. Роль витамина Е в стрессовой ситуации.

**III Содержание обучения:**

**Основные вопросы:**

1. АФК. Механизм действия;

2. Источники АФК в организме;

3. ПОЛ в норме;

4. Особенности ПОЛ в условиях патологии;

5. Стадии ПОЛ;

6. АОС, классификация, функции;

7. Ферментативное звено АОС;

8. Характеристики СОД. Механизм действия;

9. КАТ. Механизм действия;

10. ГПО и ГП. Механизм действия;

11. Неферментативное звено АОС;

12. Роль витамина Е в стрессовой ситуации.

13. Роль витамина А, К в защите клеток от действия АФК;

14. Роль ионов меди, цинка, железа и других металлов в АОС;

15. «Окислительный стресс».

**IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.**

**Наглядные пособия:**

Рисунки: 1. Реакции последовательного восстановления убихинона дыхательной цепи; 2. Антиоксиданты водной фазы; 3. Механизм антиоксидантного действия витамина Е; 4. Окислительно-восстановительные превращения  $\alpha$ -токоферола и сопряженных с ним коантиоксидантов; 5. Витамин С, 6. Витамин А; 7. Повреждающее действие свободных радикалов на компоненты клетки; 8. Образование супероксида в ЦПЭ,

#### V Наименование лабораторной работы:

#### VI Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

#### ЛАБОРАТОНАЯ РАБОТА №1

Количественное определение малонового диальдегида в ткани печени.

ОБОРУДОВАНИЕ: баня, ФЭК.

#### ПРИНЦИП МЕТОДА.

Основан на определении малонового диальдегида (МДА) как показателя перекисного окисления липидов при инкубации гомогенатов тканей в присутствии кислорода. В присутствии прооксидантов МДА определяется по специфической цветной реакции в кислой среде с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

#### ХОД РАБОТЫ.

В трех центрифужных пробирках приготовить инкубационную смесь реактивов по следующей схеме:

Реактивы	1 пробирка “опытная”	2 пробирка “контроль”	3 пробирка “опытная” с добавлением про- оксидантов
Трис-буфер 0,15 М	3,4 мл	3,4 мл	1,4 мл
Сульфат железа FeSO <sub>4</sub>	-	-	1 мл
Аскорбиновая кислота	-	-	1 мл
ТХУ 10% раствор с ЭДТА	-	1 мл	-
Гомогенат печени	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл

Все пробирки поместить в термостат при 37°C на 15 минут. После инкубации остановить реакцию в 1 и 3 пробирках, добавляя в них по 1 мл ТХУ с ЭДТА, перемешать. Все пробирки центрифугировать в течение 20 минут при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно слить в чистые пробирки. Затем в другие чистые пробирки отобрать по 4 мл надосадочной жидкости, добавить по 2 мл свежеприготовленного раствора ТБК (тиобарбитуровая кислота) и поместить пробирки в кипящую баню на 15 минут. Пробирки охладить в холодной воде и определить оптическую плотность на ФЭКе с зеленым светофильтром (длина волны 540 нм) в кювете 10 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ:

Активность ПОЛ выражается количеством микромолей МДА, накопленного за период инкубации в 1 мл гомогената

$$X = \frac{D_{\text{опыт.}} - D_{\text{контр.}}}{\alpha}, \text{ где}$$

**X** - количество МДА, накопленного за период инкубации в 1 мл гомогената,  
**α**- молярный коэффициент экстинкции для малонового диальдегида при реакции с ТБК, численно равный 0.156.

**D<sub>оп</sub>** и **D<sub>конт</sub>** - оптические плотности "опытной" и "контрольной" пробирок соответственно.

Рассчитать активность ПОЛ в 1 и 3 пробирках и сделать вывод об активности ПОЛ и влиянии ионов Fe<sup>2+</sup> и аскорбата на перекисное окисление липидов.

**РАСЧЕТ И ВЫВОДЫ:**

## ЛАБОРАТОНАЯ РАБОТА №2

Количественное определение каталазы в крови.

### ПРИНЦИП МЕТОДА.

В основе количественного определения активности каталазы лежит определение количества перекиси водорода, разложенной ферментом за определенный промежуток времени. О количестве расщепленной перекиси водорода судят по разности количества перманганата калия, израсходованного на титрование перекиси водорода до и после действия каталазы.

Активность каталазы выражают с помощью каталазного числа. Каталазным числом называют количество мг перекиси водорода, которое разлагается под действием 1 мкл крови.

### ХОД РАБОТЫ.

Работу проводят по следующей схеме:

Р е а к т и в ы	Стаканчик № 1 (опыт)	Стаканчик № 2 (контроль)
Кровь	1 мл	1 мл
Вода дистиллированная	7 мл	7 мл
Перекись водорода 1%	2 мл	-

Серная кислота 10%	-	5 мл
<b>Стаканчики оставляют на 30 мин при комн. t°, изредка встряхивая</b> <b>Через 30 мин</b>		
Перекись водорода 1%	-	2 мл
Серная кислота 10 %	5 мл	-

Действие каталазы в кислой среде прекращается, т. к. этот фермент действует при рН=7,4. Поскольку в контрольную пробу серную кислоту приливали до добавления перекиси водорода, то в контроле все добавленное количество перекиси водорода остается нерасщепленным.

Содержимое каждого стаканчика необходимо титровать раствором перманганата калия до розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 сек.

Рассчитать каталазное число (КЧ) по формуле:

$$\text{КЧ} = (\text{А} - \text{В}) \times 1,7,$$

где:

А - кол-во 0,1 N раствора  $\text{KMnO}_4$ , пошедшее на титрование контрольной пробы в мл.

В - кол-во 0,1N раствора  $\text{KMnO}_4$ , пошедшее на титрование опытной пробы в мл.

1,7 - это коэффициент, показывающий, сколько мг  $\text{H}_2\text{O}_2$  содержится в 1мл 0,1н. раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

В **норме** каталазное число колеблется от 10 до 15 единиц у взрослых и 7,5 - 9,9 единиц у детей.

**РАСЧЕТ И ВЫВОДЫ:**

**Самостоятельная работа: составление тестов и кроссворда по теме ПОЛ.**

**Тестовый контроль:**

**Тема: ПОЛ.**

**1. К активным формам кислорода относят:**

1. ОН- - гидроксильный радикал;
2. супероксидный анион;
3.  $\text{H}_2\text{O}_2$  - пероксид водорода
4. все перечисленное

Отв.: 4



## **2. Образование активных форм кислорода происходит:**

1. в процессе переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи;
2. в реакциях, которые катализируются оксидазами (образуется перекись водорода), в том числе в свободнорадикальных процессах, совершающихся в фагоцитах;
3. в реакциях микросомального окисления при обезвреживании веществ с участием цитохрома P-450;
4. в реакциях самопроизвольного (неферментативного) окисления веществ (гемоглобина, ферредоксинов, адреналина и др.);
5. в биологических системах с наличием ионов металлов с переменной валентностью и, прежде всего, железа (свободных атомов, так называемых внегемовых);
6. верно все

Отв.: 6

## **3. Перечислите ряд причин вызывающих активацию ПОЛ в тканях:**

1. снижение поступления в организм алиментарных антиоксидантов (АО), таких как: токоферол, аскорбат, биофлавоноиды и др.;
2. стресс различного генеза, в частности эмоциональный (под влиянием катехоламинов и кортикостероидов в кровь поступает избыток жирных кислот и кислород);
3. внешние химические прооксиданты (пестициды, лекарственные окислители, алкоголь, продукты смога и т.д.);
4. физические факторы (повышенный радиоактивный фон, ультрафиолетовое облучение, электромагнитное поле, ультразвук с интенсивностью выше 2 Вт/см );
5. избыточное и несбалансированное потребление жиров и углеводов на фоне недостаточного их расходования;
6. гипокинезия с низким уровнем биологического окисления ферментов, т.е. сниженный уровень восстановления пиридиннуклеотидов;

7. врожденные энзимопатии антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы);
8. падение с возрастом активности антиоксидантных ферментов.
9. верного ответа нет
10. верно все перечисленное

Отв.: 10

**4. Антиоксиданты нужны для..., исключите неправильный ответ:**

1. обновления липидного состава мембран;
2. синтезаэйкозаноидов
3. обезвреживания ксенобиотиков и токсичных продуктов метаболизма;
4. функционирования иммунной системы.
5. синтеза глюкогона

Отв.: 1,2,4,5

**5. Оксидативный стресс приводит:**

1. Повреждение ДНК, белков, липидов мембран.
2. Канцерогенез, нейродегенеративные болезни, атеросклероз, сахарный диабет, сердечно сосудистые заболевания, старение.
3. 1,2

Отв.: 1,2

**6. Этот витамин ингибирует свободнорадикальное окисление путём отдачи электрона, что приводит к инактивации радикала липида и превращается в стабильный, полностью окисленный токоферолхинон:**

1. В1
2. РР
3. Е
4. С
5. Д

Отв.: 3

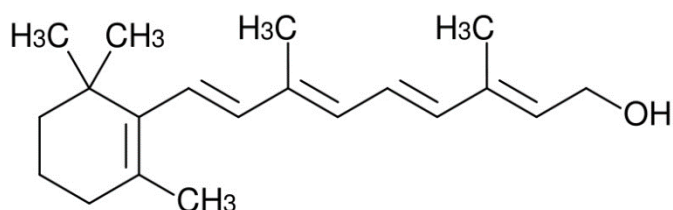
**7. Вит. А:**

1. увеличивает антиоксидантное действие Вит. Е; Вместе с Вит. Е и Вит. С;
2. активирует включение Se в состав *глутатионпероксидазы*;
3. препятствует окислению SH-групп белков и пептидов.
4. может быть прооксидантом
5. все верно

Отв. 5

**7. Структура, какого витамина представлена ниже:**

1. А;
2. Д;
3. Е;
4. РР;
5. К



Отв.: 1

**9. Этот витамин активирует ПОЛ так как является полиненасыщенным спиртом и легко окисляется кислородом может быть прооксидантом (в высоких дозах):**

1. К:
2. А;
3. Д;
4. Е;
5. РР

Отв.: 2

**10. Процесс свободнорадикального перекисного окисления липидов можно условно разделить на три этапа. Перечислите их в правильной последовательности.**

1. продукция перекисей липидов (перекисный этап);
2. образование свободных радикалов органических и неорганических веществ (свободнорадикальный этап);
3. кислородная инициация (кислородный этап)

Отв.: 3,2,1

**VIII Хронокарта учебного занятия:**

- 11.Общий бюджет времени: 3 (125);
- 12.Перекличка 5 минут;
- 13.Разбор основных вопросов темы 60 минут;
- 14.Тестовый опрос 20 минут;
- 15.Проведение лабораторной работы;
- 16.Оформление протоколов 10 минут

**IX Самостоятельная работа студентов:**

Составление тестов и кроссвордов по данной теме.

**X Список используемой литературы:**

**Обязательная:**

1. Биохимия. Учебник для вузов / Под ред. Е.С.Северина. М.:Гэотар-мед, 2003. 784 с.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия, Москва, 1998. 740 с.
3. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. Под ред. проф. Е.С.Северина и проф. А.Я.Николаева. М.: Гэотар-мед, 2001. 441 с.
4. Строев Е.А. Биологическая химия. Москва, 1986.
5. Дзугкоева Ф.С., Калоева Л.А., Каряева Э.А., Гурина А.Е., Баллаева С.А. «Обмен веществ (учебно-методическое пособие)» с грифом Учебно - методическое объединение МЗ РФ, Владикавказ, 2003. 170 с.

**Дополнительная:**

1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев с соавт. // Итоги науки и техники, 2000. – Т. 29. - С. 151-167.
2. Евстигнеева Р.П. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран / Р.П. Евстигнеева, И.М. Волков, В.В. Чудинова // Биол. Мембраны, 2003. - № 2. С. 119-137.

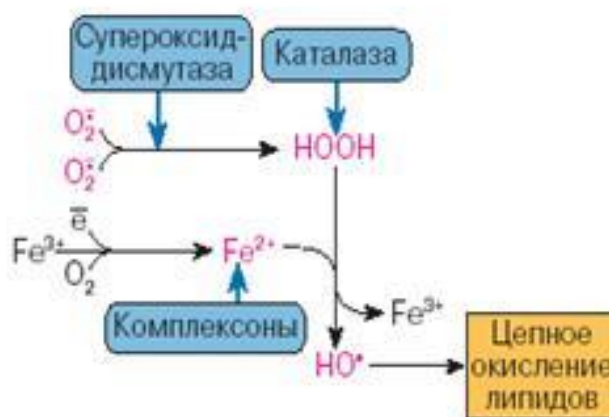
3. Зборовская В.А. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме / В.А. Зборовская, М.В. Банникова // Вестник РАМН, 2000. - № 6. - С. 53-63.
4. Зенков Н.К. Окислительный стресс / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. - М.: Наука, 2004. - 343с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высш. школа, 1998. - 293с.
6. Соловьева А.Г. Активность альдегиддегидрогеназы в эритроцитах, тромбоцитах и плазме крови крыс в норме и при ожоге / А.Г. Соловьева // Успехи соврем. Естествознания, 2007. - № 12. – С. 12-15.
7. Суханова Т.А Патохимия клетки / Т.А. Суханова // Успехи соврем. биологии, 2004. – Т. 40. – С. 82-104.
8. Шепелев А.П. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев, И.В. Корниенко, А.В. Шестопалов с соавт. // Вопр. мед. Химии, 2004. - № 2. - С. 15-17.

Наглядные пособия

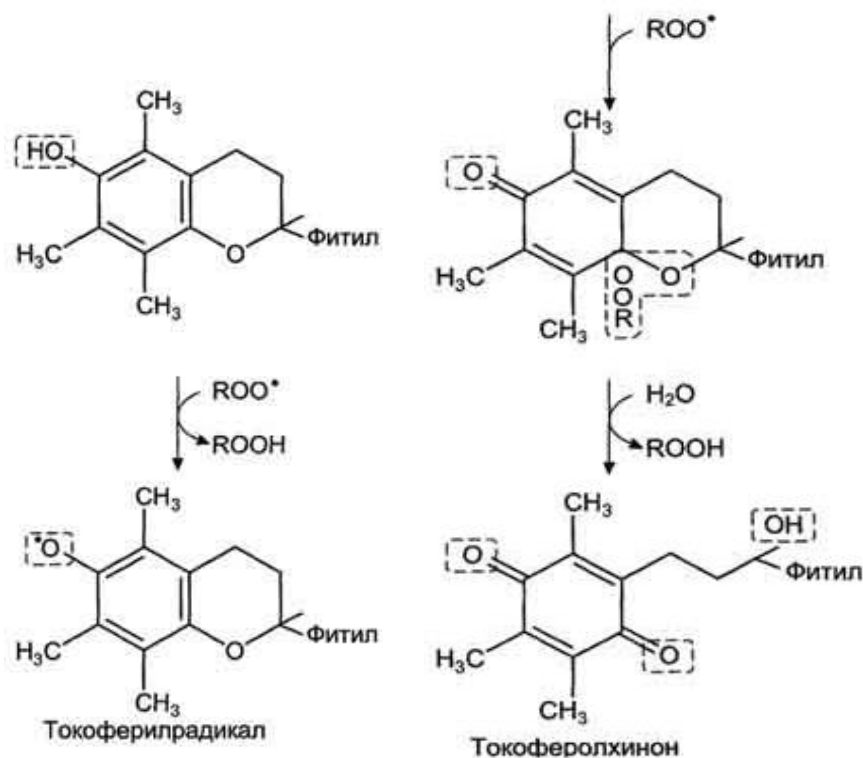
**по теме: Перекисное окисление липидов в норме и патологии.  
Ферментативное звено антиоксидантной системы защиты.**



**Рис. 1. Реакции последовательного восстановления убинона дыхательной цепи.**



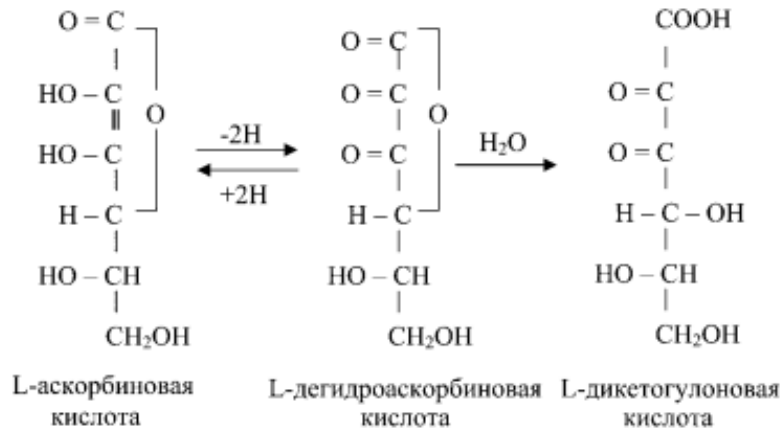
**Рис.2. Антиоксиданты водной фазы**



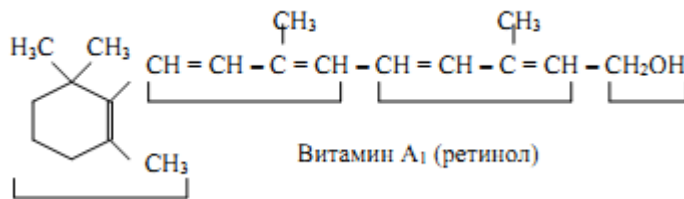
**Рис. 3. Механизм антиоксидантного действия витамина Е.**



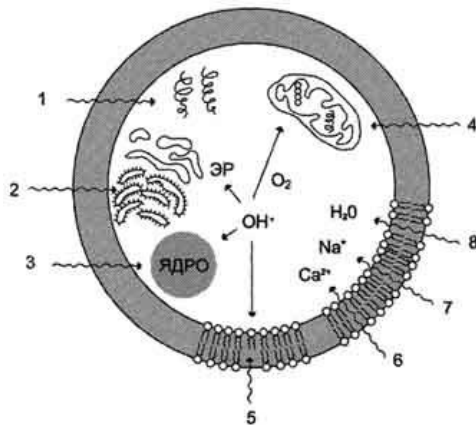
**Рис.4. Окислительно-восстановительные превращения  $\alpha$ -токоферола и сопряженных с ним коантиоксидантов.**



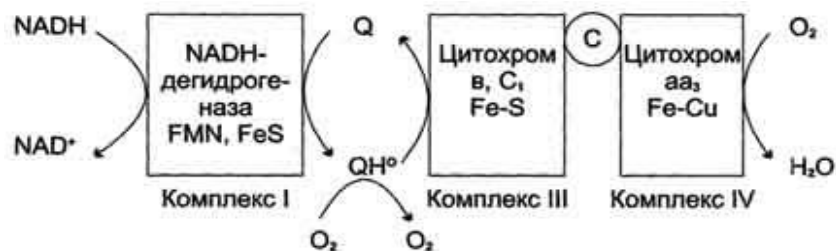
**Рис.5. Витамин С.**



**Рис. 6. Витамин А**



**Рис. 7. ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ НА КОМПОНЕНТЫ КЛЕТКИ. 1 - РАЗРУШЕНИЕ БЕЛКОВ; 2 - ПОВРЕЖДЕНИЕ ЭР; 3 - РАЗРУШЕНИЕ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ И ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК; 4 - РАЗРУШЕНИЕ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ; 5 - ПОЛ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ; 6, 7, 8 - ПРОНИКНОВЕНИЕ В КЛЕТКУ ВОДЫ И ИОНОВ.**



**Рис. 8. Образование супероксида в ЦПЭ.** "Утечка" электронов в ЦПЭ может происходить при переносе электронов с участием коэнзима Q. При восстановлении убихинон превращается в анион-радикал семихинона. Этот радикал неферментативно взаимодействует с O<sub>2</sub> с образованием супероксидного радикала. Комплекс II на рисунке не указан.

### Тема: Использование ДНК- технологий в медицине

#### I Научно-методическое обоснование темы:

##### Методы выделения ДНК

ДНК может быть выделена из любого типа тканей и клеток, содержащих ядро.

##### Этапы выделения ДНК:

1. быстрый лизис клеток;
2. удаление фрагментов клеточных органелл и мембран с помощью центрифугирования;
3. ферментативное разрушение белков протеиназами;
4. экстрагирование ДНК из раствора с помощью фенола и хлороформа;
5. осаждение ДНК этанолом.

##### Расщепление ДНК с помощью рестриктаз

Для фрагментирования используют рестриктазы (рестрикционные эндонуклеазы).

Рестриктазы узнают специфические фрагменты нуклеотидов в ДНК и «разрезают» ее в местах локализации этих последовательностей.

Образующиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК могут быть исследованы методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Выявление ДНК в геле производится при взаимодействии с бромидом эдития, при этом комплексное соединение окрашивается в розовый цвет.

##### Идентификация специфических последовательностей:

Идентификация в геле нужных фрагментов осуществляется путем гибридизации с мечеными ДНК-зондами (искусственно синтезированные фрагменты ДНК со строго определенной первичной структурой).

Классическим методом идентификации исследуемого участка ДНК стал *блот-гибридизация по Саусерну*. Суть метода: фрагменты ДНК полученные в результате деления по молекулярной массе в геле, подвергают денатурации и переносят с геля на твердый носитель. Перенос (блоттинг) осуществляется капиллярных сил, электрического поля. Фиксированную на фильтре ДНК гибридизируют с ДНК-зондом, содержащим метку. Методом радиоавтографии определяют положение искомого фрагмента геномной ДНК на электрофореграмме.

##### Установление первичной структуры ДНК-фрагмента (секвенирование ДНК)

Для установления первичной структуры ДНК-фрагмента используют дидезоксисеквенирование.

Денатурированную одонитевую ДНК помещают вместе с ДНК-полимеразой и дезоксинуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ - один из них радиоактивный).

##### Получение рекомбинантных ДНК и их амплификация

Получение рекомбинантных ДНК включает следующие этапы:

1. выделение ДНК из двух разных источников;
2. фрагментирование их разными рестриктазами;
3. нагревание и медленное охлаждение, образование фрагментов;
4. добавление 4 ддНТФ и синтез ДНК-копий.

Клонирование ДНК осуществляется за счет встраивания исследуемого фрагмента ДНК в векторную молекулу (плазмид, фаг, вирус), которая способствует проникновению этого фрагмента внутрь бактериальных клеток. В основном, для этой цели используют плазмиды – это небольшие кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, присутствующие в



бактериальных клетках, обладающие автономной системой контроля репликации. При этом трансформированные бактерии, т.е. введенные в них плазмиды, синтезируют копии введенного фрагмента ДНК.

### **Полимеразная цепная реакция (ПЦР, 1983 Карри Муллисон)**

Аmplification *in vitro*

При данном методе используют ДНК-матрицы (образцы). Участок исследуемой ДНК гибридизируют с двумя искусственно синтезированными олигонуклеотидными последовательностями – праймерами.

В реакционную смесь входят: термофильный фермент ДНК-полимераза бактерий (Taq-полимераза), исследуемая ДНК, субстраты реакций (4 дНТФ), два праймера, буфер с ионами магния.

**Один цикл полимеризации включает 3 этапа:**

1. плавление (нагревают смесь до  $t$  90-97°C при этом происходит денатурация ДНК);
2. гибридизация (отжиг ДНК с праймерами), при этом происходит снижение  $t$  до 50-60°C и происходит комплементарное связывание двухцепочечного участка на каждой из нитей ДНК;
3. Элонгация – удлинение нитей ДНК, катализируемое Taq-полимеразой в 5'-3' направлении.

Данный процесс осуществляется в специальных аппаратах – амплификаторах. С помощью ПЦР можно получить достаточное количество копий участков ДНК, которые предполагают присутствие мутаций, полиморфизм сайтов, поводить диагностику инфицированности различными реагентами.

### **ДНК-диагностика заболеваний**

С помощью рекомбинантных ДНК можно исследовать точечные мутации, вызванные заменой одного азотистого основания, делецией или вставкой, приводящими к появлению аллелей, кодирующих функционально неактивные белки. Разработанные технологии позволяют вести целенаправленное картирование генов человека в рамках международного проекта «Геном человека». Для идентификации моногенных болезней используют следующие методы:

1. Полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ);
2. Аллельспецифические пробы.

**ПДРФ – анализ** это метод, при котором определяется нечувствительность участков с мутацией к действию рестриктаз, с помощью измерения длины рестриционных фрагментов.

ПДРФ – анализ включает следующие этапы:

1. выделение геномной ДНК;
2. рестрикция специфической эндонуклеазой;
3. электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК;
4. Идентификация фрагментов по методу блот-гибридации по Саузерну.

При этом на электрофореze выявляется один крупный фрагмент или наоборот небольшой фрагмент.

Данный метод позволяет идентифицировать делецию в гене дистрофина (миодистрофия Дюшена), диагностировать гемофилию А, талассемии, гранулематоз, контролировать здоровье детей в семье и т.д.

### **Аллельспецифические пробы**

С помощью аллель - олигонуклеотидов определяют те участки, которые не узнают ферменты рестрикции. Для этого синтезируют короткие олигонуклеотидные зонды, комплементарные участку нормального и мутантного аллеля в ДНК. Область генома, содержащую исследуемый ген, амплифицируют с помощью ПЦР, и образцы полученной ДНК переносят на нитроцеллюлозные фильтры (дот- или слот-блоттинг). Пробы выдерживают с  $^{32}$ P-зондами для выявления нормальной или мутантной последовательности.

Олигонуклеотиды, аллель-специфические по определенным мутациям, можно использовать в качестве праймеров в ПЦР при клиническом тестировании населения на наличие патологического гена.

### **Использование ДНК-технологий для получения лекарственных препаратов и лечения различных болезней.**

Вакцины – очищенные белки, антигенные детерминанты ряда возбудителей ряда возбудителей вирусных и бактериальных инфекций. Для этого используют технику рекомбинантных ДНК.

Белки, имеющие терапевтическое значение, получают с использованием этой технологии во многих странах мира. Так получают инсулин, гормон роста, фактор VIII, тканевой активатор плазмينا (участвует в процессе фибринолиза и предотвращает образование тромба), интерлейкины, колоний стимулирующий фактор, эритропоэтин и др.

Генная терапия – лечение наследственных, многофакторных и инфекционных заболеваний путем введения в соматические клетки пациентов генов, которые обеспечивают исправление генных дефектов или придают клеткам новые функции.

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении в специализированные ткани больного клонированных и определенным образом упакованных последовательностей ДНК, поступающих в определенные клетки с помощью рецепторов.

**Интерферон** (Interferonum) является низкомолекулярным белком, обладающим противовирусными свойствами.

Его рассматривают как противовирусный антибиотик и как фактор неспецифической защиты организма от первичной вирусной инфекции.

В медицинской практике используют интерферон, образуемый лейкоцитами донорской крови человека в ответ на воздействие вируса интерферогена.

Применяют этот противовирусный препарат в ампулах по 2 мл (порошок), также есть гели и мази с интерфероном человеческого.

Раствор готовят на дистиллированной или кипяченой воде комнатной температуры и используют в виде аппликаций на слизистую оболочку рта или ингаляций в ротовую полость.

## **II Цель деятельности студентов на занятии**

### **Студент должен знать:**

1. Рестриктазы, механизм их действия;
2. Как происходит расщепление ДНК с помощью рестриктаз;
3. Основной смысл фрагментирования ДНК;
4. Как осуществляется идентификация специфических последовательностей в молекуле ДНК;
5. Методику секвенирования ДНК;
6. Получение рекомбинантных ДНК;
7. Как осуществляется амплификация фрагментов ДНК;
8. Основу метода клонирования ДНК и его значение;
9. Как используют знания последовательности нуклеотидов в ДНК для диагностики заболеваний, получения лекарственных препаратов и лечения различных болезней;
10. Какими свойствами обладает интерферон.

### **Студент должен уметь объяснить:**

1. Методы выделения ДНК;
2. Метод блот-гибридизации по Саузерну;
3. Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР);
4. Методы идентификации моногенных мутаций:
  - ❖ Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов;

❖ Аллельспецифические пробы.

### III Содержание обучения:

1. Методы выделения ДНК;
2. Рестриктазы, механизм их действия;
3. Расщепление ДНК с помощью рестриктаз;
4. Основной смысл фрагментирования ДНК;
5. Как осуществляется идентификация специфических последовательностей в молекуле ДНК;
6. Как осуществляется секвенирование ДНК;
7. Получение рекомбинантных ДНК;
8. Как осуществляется амплификация фрагментов ДНК;
9. Клонирование ДНК: основа метода, его значение;
10. Использование ДНК для диагностики заболеваний;
11. Использование ДНК-технологий для получения лекарственных препаратов и лечения различных болезней.
12. Метод блот-гибридизации по Саузерну;
13. Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР);
14. Методы идентификации моногенных мутаций;
15. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов;
16. Аллельспецифические пробы;
17. Какими свойствами обладает интерферон.

### Основные вопросы:

1. Методы выделения ДНК:
  - ❖ Метод блот-гибридизации по Саузерну;
  - ❖ Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР);
2. Методы идентификации моногенных мутаций:
  - Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов;
  - Аллельспецифические пробы.

### IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.

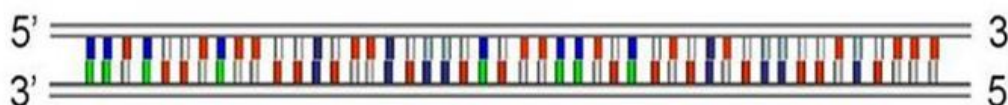
#### Наглядные пособия:

#### Таблицы названия

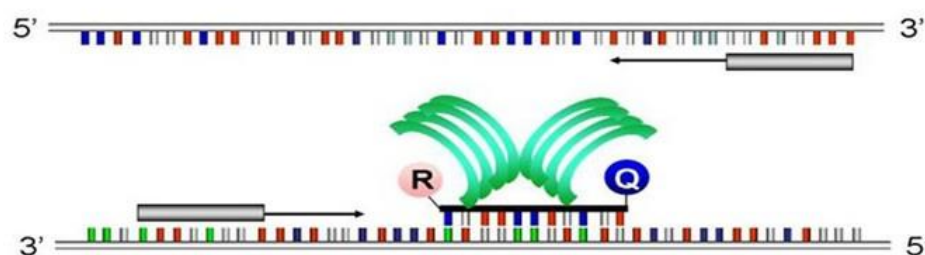
Таблица 1

#### Идентификация специфических последовательностей

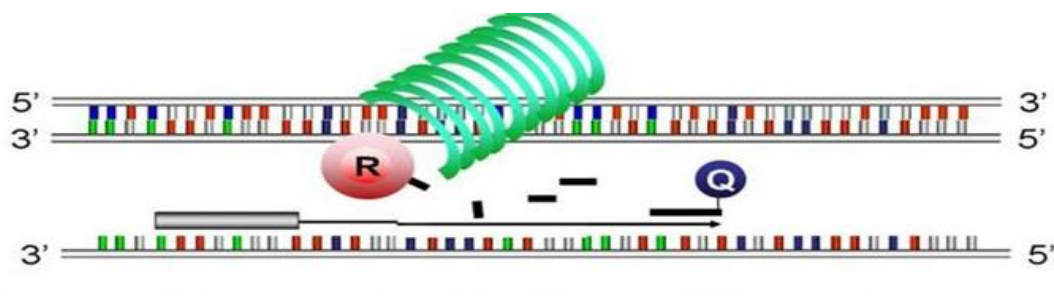
1. Молекула ДНК



2. ДНК-зонд гибридизуется с амплифицируемой последовательностью



3. ДНК-зонд в процессе амплификации разрушается ДНК-полимеразой и метка начинает флуоресцировать



#### VI Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Что такое белки?
2. Какие уровни организации белков существуют?
3. Свойства белков. Понятия «денатурация», «ренативация»?
4. Что такое ДНК и РНК? Функции.
5. Из каких мономеров они построены?
6. Напишите формулу АМФ, выделите в ней азотистое основание, углеводный компонент, остаток фосфорной кислоты.
7. Какие азотистые основания вы знаете?
8. По какому принципу происходит сборка нитей ДНК и РНК?
9. Чем ДНК отличается от РНК?

#### VIII Хронокарта учебного занятия:

17. Общий бюджет времени: 3 (125);
18. Переключка 5 минут;
19. Разбор основных вопросов темы 60 минут;
20. Тестовый опрос 20 минут;
21. Проведение лабораторной работы;
22. Оформление протоколов 10 минут

#### IX Самостоятельная работа студентов:

Подготовка тестов и кроссворда по данной теме.

#### X Список используемой литературы:

##### Обязательная:

1. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2003, С.212-226;
2. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008,

##### Дополнительная:

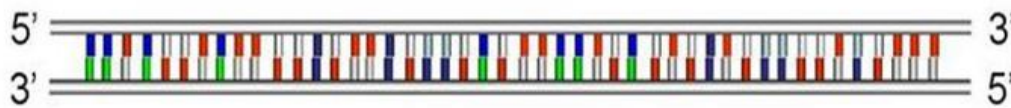
1. Лекция;
2. Интернет-источник

Тема: Использование ДНК- технологий в медицине

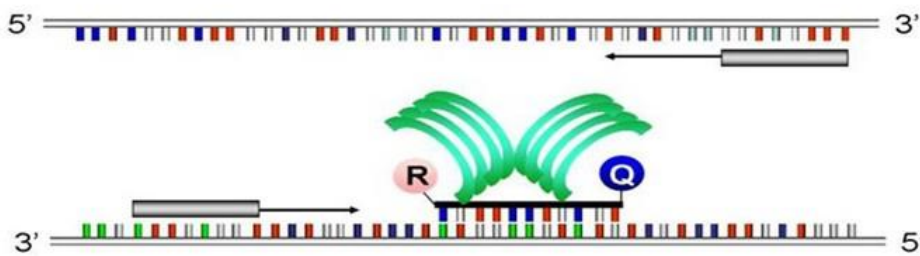
Таблица 1

Идентификация специфических последовательностей

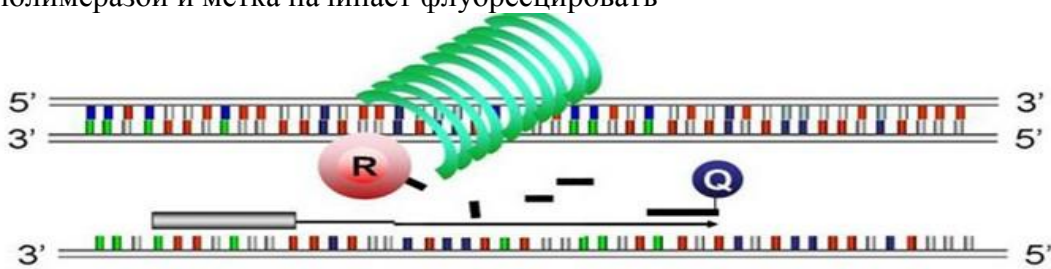
1. Молекула ДНК



2. ДНК-зонд гибридизуется с амплифицируемой последовательностью



3. ДНК-зонд в процессе амплификации разрушается ДНК-полимеразой и метка начинает флуоресцировать



## Биохимия обмена веществ

### Тема: Простагландины и лейкотриены, их структура, функции, и биологическая роль.

#### **I Научно-методическое обоснование темы:**

Эйкозаноиды – это группа сигнальных молекул местного действия, которые синтезируются практически во всех дифференцированных клетках из полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) с 20-ти углеродными атомами. Обладают коротким полупериодом жизни и действуют по аутокринному и паракринному механизму действия. ПНЖК включаются в состав фосфолипидов клеточных мембран, а далее под действием фосфолипазы А<sub>2</sub> и фосфолипазы С, которые активируются при поступлении сигнала на рецептор мембраны, высвобождается и идет на синтез эйкозаноидов.

В разных тканях арахидоновая и другие эйкозановые кислоты могут использоваться по трем основным направлениям:

1. Циклооксигеназный путь ведет к образованию тромбоксанов и простогландинов;
2. Липооксигеназа превращает арахидоновую кислоту в лейкотриены, липоксины и гидроксикоизотетраенолы (ГЭТЕ);
3. Система окисления с участием Р<sub>450</sub> ответственная за синтез эпоксинов;

#### **Классификация эйкозаноидов:**

1. простагландины;
2. тромбоксаны;
3. лейкотриены и ряд других веществ, - высокоактивные регуляторы клеточных функций.

#### **Функции эйкозаноидов:**

1. регулируют тонус ГМК (влияние на АД);
2. регулируют состояние бронхов, кишечника, матки;
3. регулируют секрецию воды и натрия почками;
4. оказывают влияние на образование тромбов;
5. участвуют в развитии воспалительного процесса, происходящего после повреждения тканей или инфекции;
6. обуславливают развитие таких признаков воспаления, как боль, отёк, лихорадка;

Избыточная секреция эйкозаноидов приводит к ряду заболеваний, например бронхиальной астме и аллергическим реакциям.

## А. Субстраты для синтеза эйкозаноидов

Главный субстрат для синтеза эйкозаноидов у человека - арахидоновая кислота (20:4,  $\omega$ -6), в меньшем количестве используются эйкозапентаеновая (20:5,  $\omega$ -3) и эйкозатриеновая (20:3,  $\omega$ -6) жирные кислоты. Полиеновые кислоты (ПНЖК) с 20 атомами углерода поступают в организм человека с пищей или образуются из незаменимых (эссенциальных) жирных кислот с 18 атомами углерода, также поступающими с пищей (рис. 1).

Эйкозаноиды действуют на клетки мишени через специфические мембранные рецепторы. Их присоединению к рецептору и включению аденилатциклазы или инозитолфосфатную систему, систему передачи сигнала, вызывают повышение внутриклеточной концентрации – цАМФ, цГМФ, ИФ<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>.

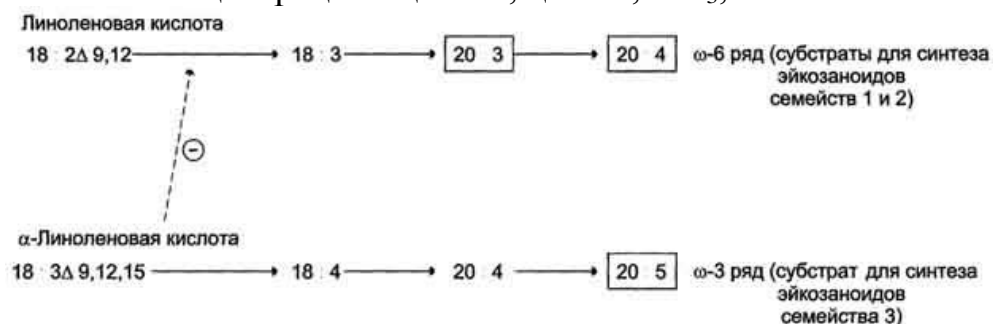


Рис.1. Синтез ПНЖК с 20 углеродными атомами в организме человека.

Простагландины впервые были выделены из предстательной железы, откуда и получили свое название. Позже было показано, что и другие ткани организма синтезируют простагландины и другие эйкозаноиды.

## Б. Структура, номенклатура и биосинтез простагландинов и тромбоксанов

Номенклатура простагландинов в (рис.2.) включает следующие обозначения: PG и заглавные буквы А, Е, Д и т.д. указывает на характер заместителей в 5-членном кольце, а нижний индекс – число двойных связей в боковых радикалах.

Эйкозатриеновая кислота образует семейство PG с одной двойной связью между C<sub>13</sub> – C<sub>14</sub> (PG E<sub>1</sub>).

Арахидоновая – семейство простагландинов с двумя двойными связями в положениях C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub> (PG E<sub>2</sub>), а эйкозапентаеновая – семейство с тремя двойными связями (C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>17</sub>-C<sub>18</sub>) боковой цепи (PG E<sub>3</sub>).

Основным общим представителем простагландинов и тромбоксанов из семейства арахидоновой кислоты является PG H<sub>2</sub>, который синтезируется во всех тканях.

**PG I - простациклины.** Имеют 2 кольца в своей структуре: одно пятичленное, как и другие простагландины, а другое - с участием атома кислорода. Их также подразделяют в зависимости от количества двойных связей в радикалах (PG I<sub>2</sub>, PG I<sub>3</sub>).

**Тромбоксаны.** В отличие от простагландинов, тромбоксаны синтезируются только в тромбоцитах, откуда и происходит их название, и стимулируют их агрегацию при образовании тромба. Тромбоксаны имеют шестичленное кольцо, включающее атом кислорода (рис.3.). Так же, как и другие эйкозаноиды, тромбоксаны могут содержать различное число двойных связей в боковых

цепях, образуя  $\text{TX A}_2$ , или  $\text{TX A}_3$ , отличающиеся по активности.  $\text{TX B}_2$  - продукт катаболизма  $\text{TX A}_2$  и активностью не обладает.

**Циклооксигеназный путь: синтез простагландинов и тромбоксанов**

**Активация фосфолипаз.** Синтез простагландинов начинается только после отделения полиеновых кислот от фосфолипида мембраны под действием ферментов (рис.4). Активация фосфолипаз, ассоциированных с мембранами, происходит под действием многих факторов: гормонов, гистамина, цитокинов, механического воздействия.

Связывание стимулирующего агента с рецептором может активировать или фосфолипазу  $A_2$  или фосфолипазу C. Это зависит от типа клетки и типа рецепторов.

После отделения арахидоновой кислоты от фосфолипида она выходит в цитозоль и в различных типах клеток превращается в разные эйкозаноиды. В клетках имеется 2 основных пути превращения арахидоновой кислоты (рис.5.).



Рис. 2. СЕМЕЙСТВА ПРОСТАГЛАНДИНОВ.

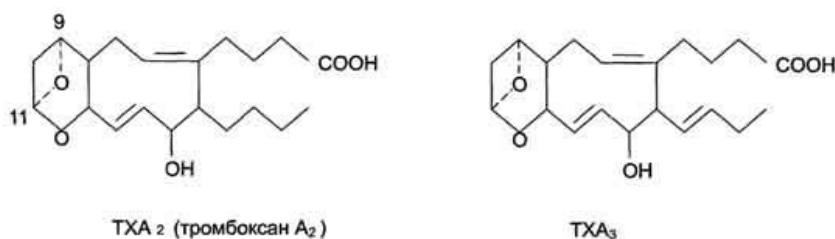


Рис.3. СТРУКТУРА ТРОМБОКСАНОВ.  $\text{TX A}_2$  СИНТЕЗИРУЕТСЯ ИЗ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ;  $\text{TX A}_3$  СИНТЕЗИРУЕТСЯ ИЗ ЭЙКОЗАПЕНТАЁНОВОЙ КИСЛОТЫ.

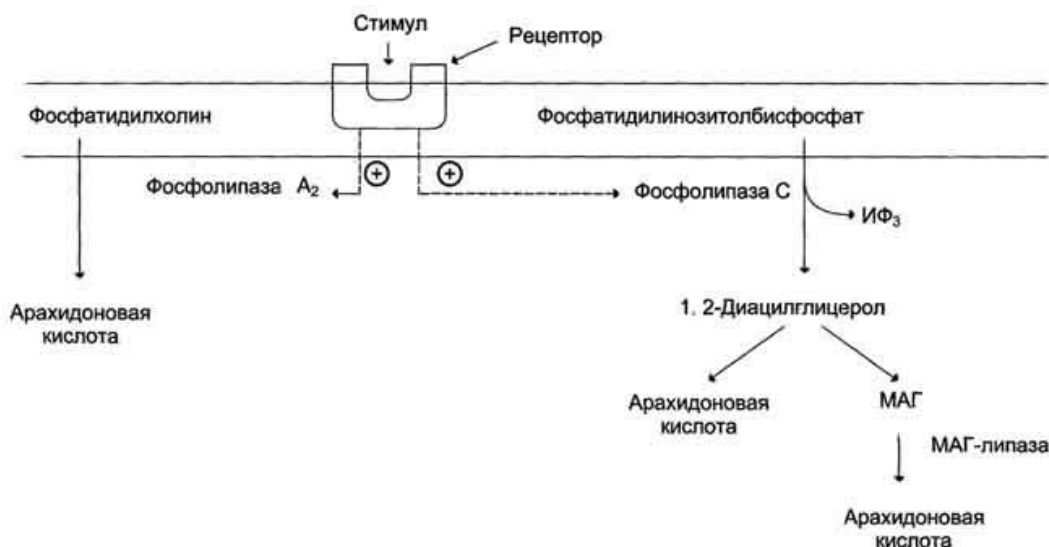


Рис.4. Отделение арахидоновой кислоты от глицерофосфолипидов. МАГ-моноацилглицерол; ИФ3-инозитолтри-фосфат.



**Синтез простагландинов.** Фермент, катализирующий первый этап синтеза простагландинов, называется PG H<sub>2</sub> синтазой и имеет 2 каталитических центра: циклооксигеназный, другой - пероксидазой; димер гликопротеинов, состоящий из идентичных полипептидных цепей; имеет гидрофобный домен, погружённый в липидный слой мембран ЭР, и каталитический домен, обращённый в полость ЭР. В а.ц. ЦОГ находится тирозин (385), в активном центре пероксидазы - простетическая группа - гем. В организме имеются 2 типа ЦОГ (PG H<sub>2</sub> синтаз). Циклооксигеназа 1 - конститутивный фермент, синтезирующийся с постоянной скоростью. Синтез циклооксигеназы 2 увеличивается при воспалении и индуцируется соответствующими медиаторами - цитокинами.

Оба типа циклооксигеназ катализируют включение 4 атомов кислорода в арахидоновую кислоту и формирование пятичленного кольца. В результате образуется нестабильное гидропероксидпроизводное, называемое PG G<sub>2</sub>. Гидропероксид у 15-го атома углерода быстро восстанавливается до гидроксильной группы пероксидазой с образованием PG H<sub>2</sub>. До образования PG H<sub>2</sub> путь синтеза разных типов простагландинов одинаков. Дальнейшие превращения PG H<sub>2</sub> специфичны для каждого типа клеток.

Например, PG H<sub>2</sub> в клетках ГМК может быть восстановлен под действием PG E синтазы с образованием PG E<sub>2</sub> или под действием PG D синтазы с образованием PG D<sub>2</sub>. В тромбоцитах содержится фермент тромбоксансинтаза, превращающий тот же исходный PG H<sub>2</sub> в TX A<sub>2</sub> обладающий сильным сосудосуживающим действием. В клетках эндотелия под действием фермента простаглицинсинтазы из PG H<sub>2</sub> синтезируется PG I<sub>2</sub> (простаглицин), имеющий сосудорасширяющее действие.

### **В. Структура и синтез лейкотриенов, ГЭТЕ, липоксинов**

Лейкотриены участвуют в аллергических реакциях, липоксины вызывают хемотаксис и стимулируют продукцию супероксидных ионов в лейкоцитах, которые необходимы для разрушения частиц, попадающих в клетки в результате фагоцитоза.

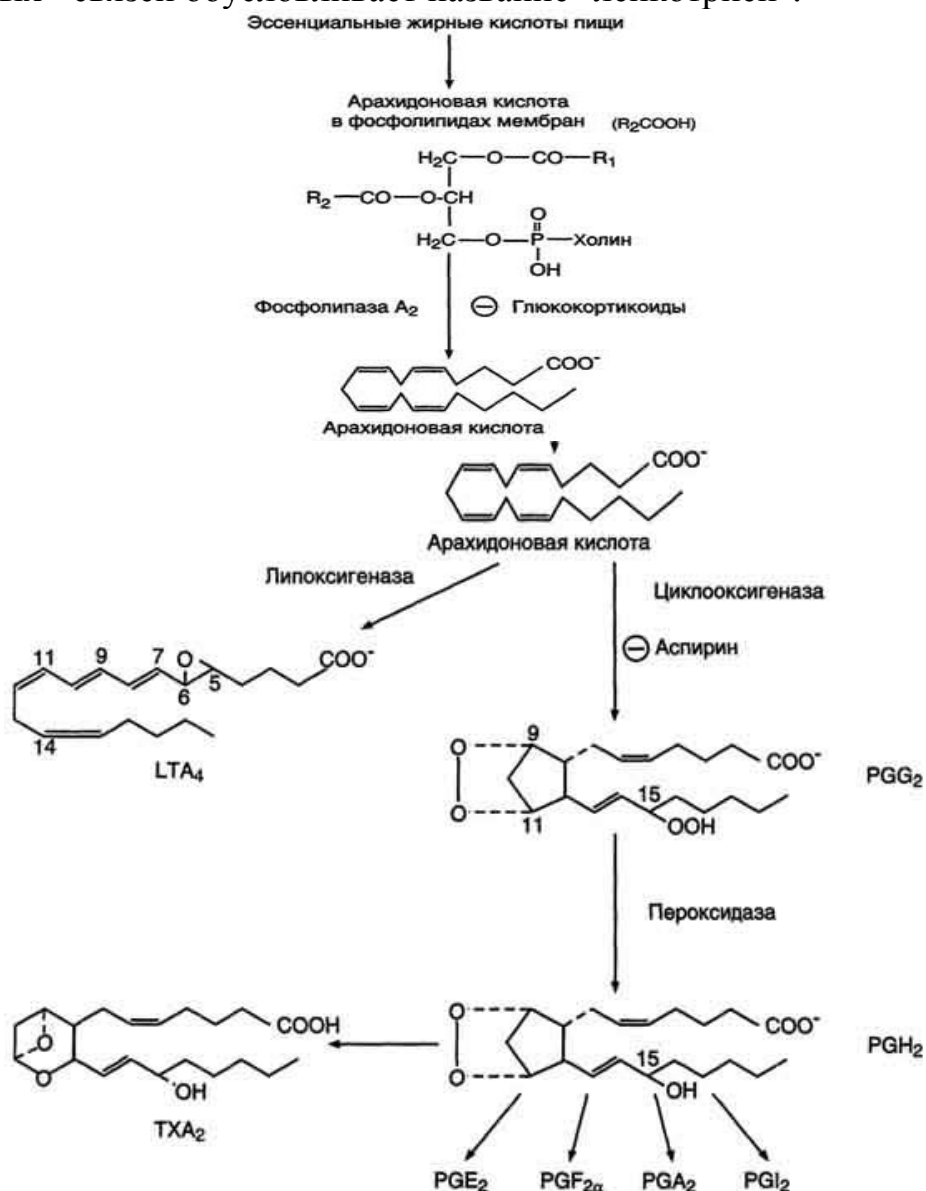
**Лейкотриены** также образуются из эйкозаноевых кислот, однако в их структуре отсутствуют циклы, как у простагландинов, и они имеют 3 сопряжённые двойные связи, хотя общее число двойных связей в молекуле больше (рис.5). Лейкотриены C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> и E<sub>4</sub> имеют заместители в виде трипептида глутатиона, дипептида глицилцистеина или цистеина, соответственно.

**Липоксигеназный путь синтеза**, приводящий к образованию большого количества разных эйкозаноидов, начинается с присоединения O<sub>2</sub> к одному из атомов углерода у двойной связи, с образованием гидропероксидов - гидропероксидэйкозатетраеноатов (ГПЭ-ТЕ). Далее гидропероксиды превращаются в соответствующие гидроксиэйкозатетраеноаты (ГЭТЕ).

**Синтез лейкотриенов** идёт по пути, отличному от пути синтеза простагландинов, и начинается с образования гидроксипероксидов - гидропероксидэйкозатетраеноатов (ГПЭТЕ). Эти вещества или восстанавливаются с образованием гидроксиэйкозатетраеноатов (ГЭТЕ) или превращаются в лейкотриены или липоксины. ГЭТЕ отличаются по положению

гидроксильной группы у 5-го, 12-го или 15-го атома углерода, например: 5-ГЭТЕ, 12-ГЭТЕ.

LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> – находятся в лейкоцитах, макрофагах, вызывают расширение сосудов увеличение их проницаемости являются компонентами «медленно реагирующей» субстанции анафилаксии. Липоксигеназы действуют в 5-й, 12-й или 15-й позиции арахидоновой кислоты в зависимости от типа ткани. Например, в ПЯЛ содержится в основном 5-липоксигеназа, в тромбоцитах - 12-липоксигеназа, в эозинофилах - 15-липоксигеназа. В лейкоцитах и тучных клетках 5-ГПЭТЕ превращается в эпоксидлейкотриен A4 (LT A<sub>4</sub>), где нижний индекс 4 обозначает общее количество связей. Наличие 3 сопряжённых связей обуславливает название "лейкотриен".



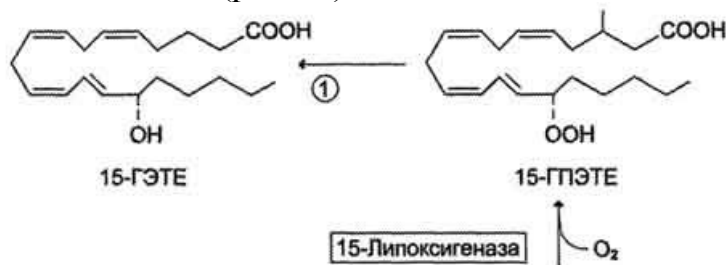
**Рис. 5. Синтез эйкозаноидов из арахидоновой кислоты.** Глюкокортикоиды ингибируют синтез всех типов эйкозаноидов, так как ингибируют фосфолипазу A<sub>2</sub>, и таким образом уменьшают количество субстрата для их синтеза. Аспирин и другие противовоспалительные препараты нестероидного действия ингибируют только циклооксигеназный путь.

Другие типы лейкотриенов образуются из LT A<sub>4</sub>. LT B<sub>4</sub> образуется под действием эпоксидгидролазы в лейкоцитах и клетках эпителия сосудов. Другой путь приводит к образованию группы лейкотриенов: LT C<sub>4</sub>, LT D<sub>4</sub>, LT E<sub>4</sub>. Их

синтез начинается с присоединения трипептида глутатиона к 6-му атому углерода с образованием LT C<sub>4</sub> в реакции, катализируемой глутатион-8-трансферазой. В следующей реакции удаляется глутамат, и LT D<sub>4</sub> содержит дипептид глицилцистеин. На последней стадии отщепляется глицин, и LT E<sub>4</sub> содержит только цистеин.

Липоксины (например, основной липоксин A<sub>4</sub>) включают 4 сопряжённых двойных связи и 3 гидроксильных группы.

Синтез липоксинов начинается с действия на арахидоновую кислоту 15-липоксигеназы, затем происходит ряд реакций, приводящих к образованию липоксина A<sub>4</sub> (рис. 6.).



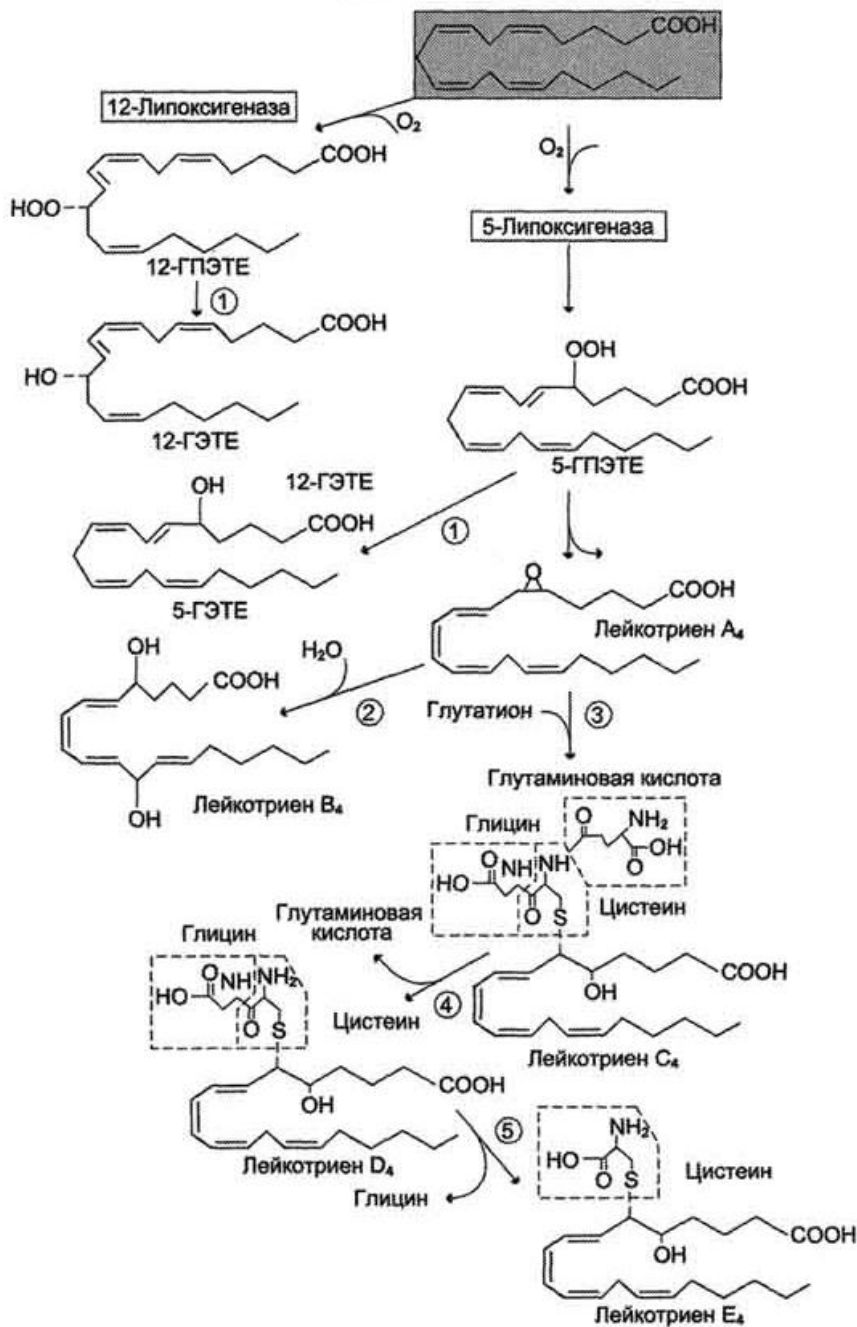


Рис. 8-49. Липоксигеназный путь синтеза эйкозаноидов.



Рис. 6. СТРОЕНИЕ И СИНТЕЗ ЛИПОКСИНА А<sub>4</sub>.

Эйкозаноиды - гормоны местного действия по ряду признаков:

- образуются в различных тканях и органах, а не только в эндокринных железах;
- действуют по аутокринному или паракринному механизмам;
- концентрация эйкозаноидов в крови меньше, чем необходимо, чтобы вызвать ответ в клетках-мишенях.

Только при некоторых патологических состояниях эйкозаноиды могут оказывать системное действие, если их концентрация в крови увеличивается до количеств, когда они могут оказать действие на ГМК всего органа, например кишечника, лёгких, кровеносных сосудов.

#### **Механизмы действия эйкозаноидов**

Один и тот же тип эйкозаноида может действовать по паракринному и по аутокринному механизму. Например, ТХ А<sub>2</sub>, продуцируемый тромбоцитами при их активации, действует на сами тромбоциты, увеличивая их способность к агрегации, и в то же время действует на окружающие ГМК кровеносных сосудов, способствуя их сокращению. Таким образом создаются условия для образования тромба и предотвращения кровотечения в области повреждения сосудов.

Эйкозаноиды действуют на клетки через специальные рецепторы. Некоторые рецепторы эйкозаноидов связаны с аденилатциклазной системой и протеинкиназой А - это рецепторы PGE, PG D, PC I. PG F<sub>2α</sub>, ТХ А<sub>2</sub> эндоперекиси (ГПЭТЕ) и лейкотриены действуют через механизмы, увеличивающие уровень кальция в цитозоле клеток-мишеней. Во многих клетках эйкозаноиды влияют на степень активации аденилатциклазной системы в ответ на действие других факторов, например гормонов. В этих случаях эйкозаноиды влияют на конформацию G-белков в плазматической мембране клеток. Если эйкозаноид связывается со стимулирующими G<sub>s</sub>-белками, то эффект основного стимулирующего агента увеличивается; если с G<sub>i</sub>-ингибирующими - эффект снижается. Эйкозаноиды действуют на клетки почти всех тканей организма. Избыточная продукция эйкозаноидов наблюдается при многих заболеваниях.

#### **Роль эйкозаноидов в развитии воспаления**

Воспаление - реакция организма на повреждение или инфекцию, направленная на уничтожение инфекционного агента и восстановление повреждённых тканей. Продукция медиаторов воспаления - эйкозаноидов, гистамина, кининов (пептидных гормонов местного действия) - активируется каскадами реакций, запускающимися при внедрении инфекционных агентов или повреждении тканей. Фактором, лимитирующим скорость синтеза эйкозаноидов, служит освобождение жирной кислоты под действием фосфо-липазы А<sub>2</sub>. Фосфолипаза А<sub>2</sub> связана с мембранами клеток и активируется многими факторами: гистамином, кининами, механическим воздействием на клетку, контактом

комплекса антиген-антитело с поверхностью клетки. Активация фосфолипазы  $A_2$  приводит к увеличению синтеза эйкозаноидов.

Многие эйкозаноиды выполняют функцию медиаторов воспаления и действуют на всех этапах воспаления. В результате увеличивается проницаемость капилляров, транссудат и лейкоциты проходят через сосудистую стенку. Лейкотриен  $B_4$  и липоксин  $A_4$  являются мощными факторами хемотаксиса; взаимодействуя с рецепторами, стимулируют движение лейкоцитов в область воспаления и секрецию ими лизосомальных ферментов и фагоцитоз чужеродных частиц.

Симптомы воспаления - покраснение, жар, отёк и боль. Покраснение и жар вызываются факторами, увеличивающими приток крови к месту повреждения. Отёк - результат увеличения притока жидкости из капилляров и движения клеток белой крови в область воспаления. Боль вызывается химическими компонентами (продуктами распада тканей, протонами) и сдавлением нервных окончаний. В развитии этих признаков воспаления участвуют разные типы эйкозаноидов (табл. 1).

### **Роль эйкозаноидов в тромбообразовании**

Свёртывание крови можно рассматривать как процесс, который поддерживается в состоянии равновесия противодействующими системами: свёртывания и противосвёртывания. В условиях патологии или при действии фармакологических средств это равновесие может смещаться в ту или другую сторону. В норме клетки эндотелия сосудов продуцируют простаглицлин  $I_2$ , который препятствует агрегации тромбоцитов и сужению сосудов (рис. 7.).

**Таблица 1. Характеристика биологического действия основных типов эйкозаноидов**

Эйкозаноид	Основное место синтеза	Основное биологическое действие
PG $E_2$	Большинство тканей, особенно почки	Расслабляет гладкую мускулатуру, расширяет сосуды, инициирует родовую активность, подавляет миграцию лимфоцитов, пролиферацию Т-клеток.
PG $F_{2\alpha}$	Большинство тканей	Сокращает гладкую мускулатуру, суживает сосуды, бронхи, стимулирует сокращения матки.
PG $D_3$	Клетки гладкой мускулатуры	Вызывает расширение сосудов, снижает агрегацию тромбоцитов и лейкоцитов.
PG $I_2$	Сердце, клетки эндотелия сосудов	Уменьшает агрегацию тромбоцитов, расширяет сосуды. В клетках-мишенях увеличивает образование цАМФ.
TX $A_2$	Тромбоциты	Стимулирует агрегацию тромбоцитов, суживает сосуды и бронхи, в клетках уменьшает образование цАМФ.
TX $A_3$	Тромбоциты	Обладает функциями, одинаковыми с TX $A_2$ , но значительно менее эффективен.

LT B <sub>4</sub>	Клетки белой крови, клетки эпителия	Стимулирует хемотаксис и агрегацию лейкоцитов, освобождение лизосомальных ферментов лейкоцитов. Увеличивает проницаемость сосудов.
<b>Группа лейкотриенов</b>	Клетки белой крови, альвеолярные	Стимулируют расширение сосудов, увеличивают их проницаемость. Вызывают сокращение бронхов.
LTC <sub>4</sub> →	макрофаги	Основные компоненты «медленно реагирующей субстанции» анафилаксии.
LT D <sub>4</sub> →		
LTE <sub>4</sub> →		
LXA <sub>4</sub>	Лейкоциты	Активирует хемотаксис и стимулирует образование супероксид аниона в лейкоцитах.

При разрушении клеток эндотелия (например, в результате образования атеросклеротической бляшки) синтез PGI<sub>2</sub> снижается. Тромбоциты контактируют с повреждённой стенкой сосуда, в результате чего активируется фосфолипаза A<sub>2</sub>. Это приводит к увеличению секреции TX A<sub>2</sub>, стимулирующего агрегацию тромбоцитов и образование тромба в области повреждения сосуда (рис. 8), что часто приводит к развитию инфаркта.

При изучении факторов риска инфаркта миокарда было показано, что люди, потребляющие большое количество рыбьего жира, значительно меньше подвержены этому заболеванию, так как у них реже образуются тромбы в сосудах сердца. Оказалось, что на семейства эйкозаноидов, синтезируемых в организме, влияет состав жирных кислот пищи (см. выше табл. 8-3). Если с пищей поступает больше эйкозапентаеновой кислоты (20:5, ω-3), в большом количестве содержащейся в рыбьем жире, то эта кислота включается преимущественно в фосфо-липиды мембран (вместо арахидоновой) и после действия фосфодипазы A<sub>2</sub> служит основным субстратом для синтеза эйкозаноидов. Это имеет существенное влияние на свёртывание крови. При обычной диете с преобладанием арахидоновой кислоты (20:4, ω-6) над эйкозапентаеновой действие TX A<sub>2</sub> уравновешено действием PG I<sub>2</sub> (рис. 9.) и другими простагландинами. В случае диеты с преобладанием ω-3 кислот в клетках эндотелия образуются более сильные ингибиторы тромбообразования (PG I<sub>3</sub>, PG E<sub>3</sub>, PG D<sub>3</sub>), что снижает риск образования тромба и развития инфаркта миокарда.

#### **Инактивация эйкозаноидов**

Все типы эйкозаноидов быстро инактивируются. T<sub>1/2</sub> эйкозаноидов составляет от нескольких секунд до нескольких минут. Простагландины инактивируются путём окисления гидроксильной группы в положении 15, важнейшей для их активности, до кетогруппы. Двойная связь в положении 13 восстанавливается. Затем происходит β-окисление боковой цепи, а после него - ω-окисление. Конечные продукты (дикарбоновые кислоты) выделяются с мочой. Активный TX A<sub>2</sub> быстро превращается в биологически неактивный IX B<sub>2</sub> путём разрыва кислородного мостика между 9-м и 11-м атомами углерода с образованием гидроксильных групп.

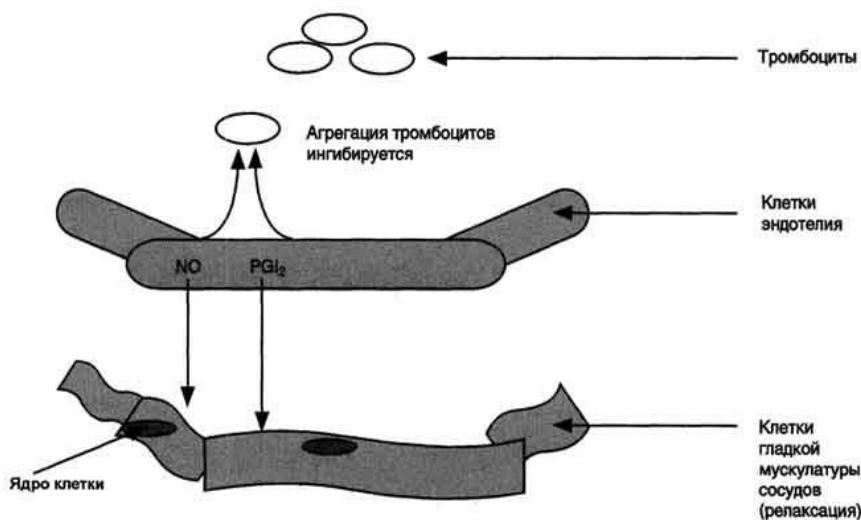


Рис. 7. РОЛЬ ПРОСТАЦИКЛИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА КЛЕТКИ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ СТенок СОСУДОВ И АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ. В НОРМЕ КЛЕТКИ ЭНДОТЕЛИЯ ПРОДУЦИРУЮТ  $PGI_2$ , КОТОРЫЙ ВЫЗЫВАЕТ РЕЛАКСАЦИЮ ГМК И ИНГИБИРУЕТ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ. ТРОМБОЦИТЫ В НЕАКТИВНОМ СОСТОЯНИИ НЕ ПРОДУЦИРУЮТ ТРОМБОКСАНЫ.  $NO$  (ОКСИД АЗОТА) - ВАЗОДИЛАТАТОР.

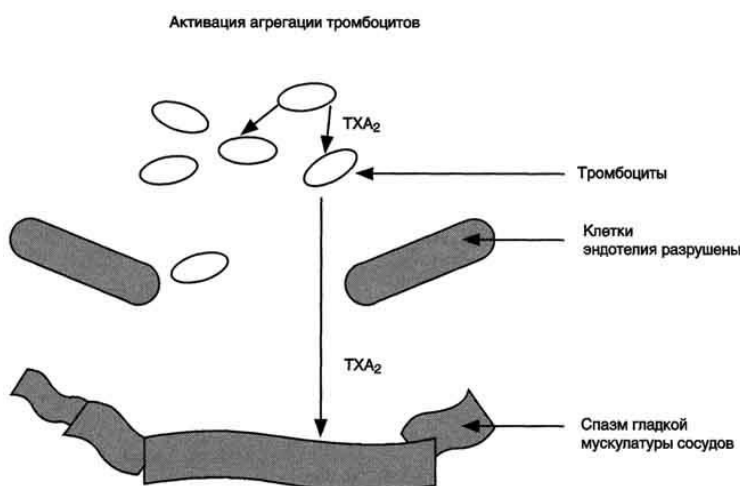


Рис. 8. НАРУШЕНИЕ СИНТЕЗА ЭЙКОЗАНОИДОВ В ОБЛАСТИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ. В ОБЛАСТИ ПОВРЕЖДЕНИЯ СТЕНКИ СОСУДА ПРЕОБЛАДАЕТ ДЕЙСТВИЕ  $TXA_2$ , СТИМУЛИРУЮЩЕГО АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ И СОКРАЩЕНИЕ СТенок СОСУДА. В РЕЗУЛЬТАТЕ НА ПОВРЕЖДЁННОМ УЧАСТКЕ ОБРАЗУЕТСЯ ТРОМБ, ПРОИСХОДИТ РЕЗКОЕ СУЖЕНИЕ ПРОСВЕТА СОСУДА. В МИОКАРДЕ ЭТО МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К РАЗВИТИЮ ИНФАРКТА МИОКАРДА.

## Лекарственные препараты -ингибиторы синтеза эйкозаноидов

### Механизм действия аспирина и других противовоспалительных препаратов нестероидного действия

Аспирин - препарат, подавляющий основные признаки воспаления. Механизм противовоспалительного действия аспирина стал понятен, когда обнаружили, что он ингибирует циклооксигеназу. Следовательно, он уменьшает синтез медиаторов воспаления и, таким образом, уменьшает воспалительную реакцию. Циклооксигеназа необратимо ингибируется путём ацетилирования серина в положении 530 в активном центре (рис. 10.). Однако эффект действия аспирина не очень продолжителен, так как экспрессия гена этого фермента не нарушается и продуцируются новые молекулы фермента. Другие нестероидные противовоспалительные препараты (например, ибупрофен и ацетаминофен)



действуют по конкурентному механизму, связываясь в активном центре фермента, и также снижают синтез простагландинов.

### Механизм действия стероидных противовоспалительных препаратов на синтез эйкозаноидов

Стероидные препараты обладают гораздо более сильным противовоспалительным действием, чем препараты нестероидного ряда. Механизм их действия заключается в индукции синтеза белков - липокортинов (или макрокортинов), которые ингибируют активность фосфолипазы A<sub>2</sub> и уменьшают синтез всех типов эйкозаноидов, так как препятствуют освобождению субстрата для синтеза эйкозаноидов - арахидоновой кислоты (или её аналога).

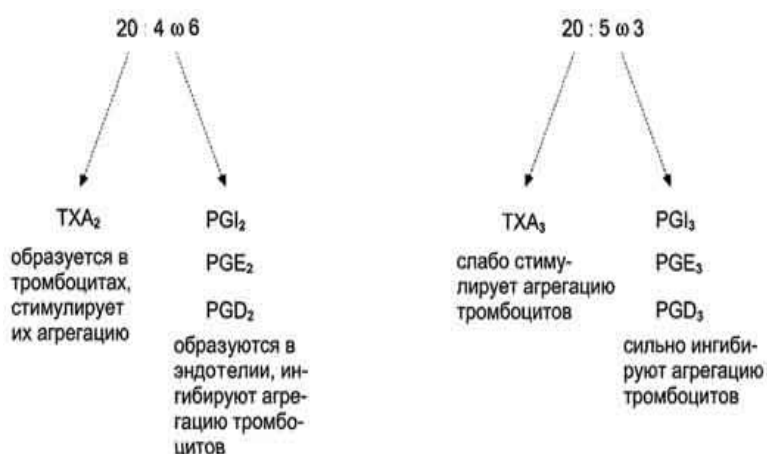


Рис. 9. Синтез тромбоксанов и простагландинов из арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот.

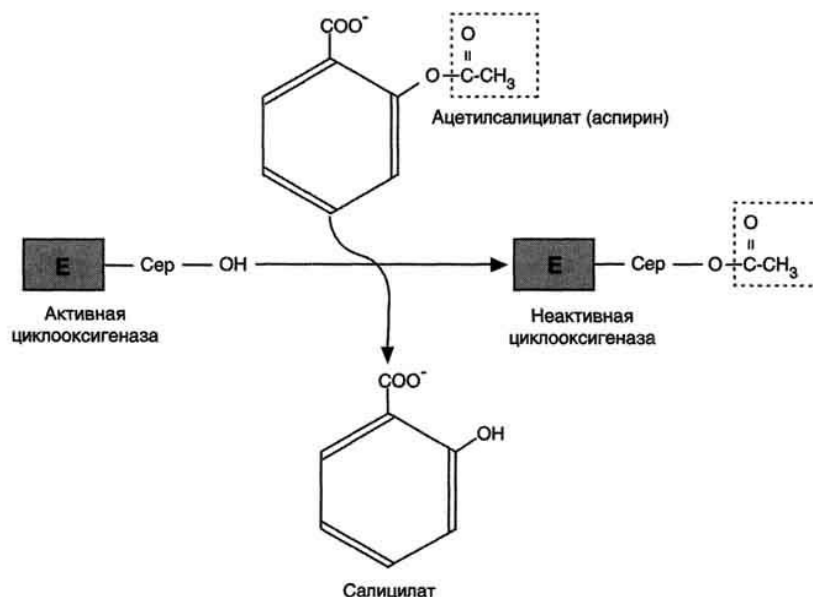


Рис. 10. Механизм инактивации циклооксигеназы аспирином. Ацетильный остаток переносится с молекулы аспирина на OH-группу фермента и необратимо ингибирует его.

Использование стероидных противовоспалительных препаратов особенно важно для больных, страдающих бронхиальной астмой. Развитие симптомов этого заболевания (бронхоспазм и экссудация слизи в просвет бронхов)

обусловлено, в частности, избыточной продукцией лейкотриенов тучными клетками, лейкоцитами и клетками эпителия бронхов. Прием аспирина у больных, имеющих изоформу липоксигеназы с высокой активностью, может вызвать приступ бронхиальной астмы. Причина "аспириновой" бронхиальной астмы заключается в том, что аспирин и другие нестероидные противовоспалительные препараты ингибируют только циклооксигеназный путь превращений арахидоновой кислоты и, таким образом, увеличивают доступность субстрата для действия липоксигеназы и, соответственно, синтеза лейкотриенов. Стероидные препараты ингибируют использование арахидоновой кислоты и по липоксигеназному и по циклооксигеназному пути, поэтому они не могут вызывать бронхоспазма.

### **Использование производных эйкозаноидов в качестве лекарств**

Хотя действие всех типов эйкозаноидов до конца не изучено, имеются примеры успешного использования лекарств - аналогов эйкозаноидов для лечения различных заболеваний. Например, аналоги PG E<sub>1</sub> и PG E<sub>2</sub> подавляют секрецию соляной кислоты в желудке, блокируя гистаминовые рецепторы II типа в клетках слизистой оболочки желудка. Эти лекарства, известные как H<sub>2</sub>-блокаторы, ускоряют заживление язв желудка и двенадцатиперстной кишки. Способность PG E<sub>2</sub> и PG F<sub>2α</sub> стимулировать сокращение мускулатуры матки используют для стимуляции родовой деятельности.

## **II Цель деятельности студентов на занятии**

### **Студент должен знать:**

1. Определение эйкозаноидов;
2. В каких процессах участвуют эйкозаноиды;
3. Субстраты для синтеза эйкозаноидов;
4. Классификация эйкозаноидов;
5. Простогландины – особенности;
6. Тромбоксаны. Характеристика;
7. Циклооксигеназный путь синтеза (ЦОГ) простогландинов;
8. Липоксигеназный путь синтеза;
9. Механизм действия эйкозаноидов, основные эффекты;
10. Роль эйкозаноидов в развитии воспаления;
11. Роль эйкозаноидов в процессе тромбообразования;
12. Инактивация эйкозаноидов;
13. ЛС- ингибиторы синтеза эйкозаноидов;

14.Механизм действия НПВС и СПВС;

15.Использование производных эйкозаноидов в качестве ЛС.

**Студент должен уметь:**

1. написать структуры арахидоновой кислоты;
2. Написать синтез эйкозаноидов из арахидоновой кислоты.

**III Содержание обучения:**

**Основные вопросы:**

1. Эйкозаноиды, их функции, классификация;
2. Субстраты для синтеза эйкозаноидов;
3. Простогландины – особенности. Тромбоксаны. Характеристика;
4. Циклооксигеназный путь синтеза (ЦОГ) простогландинов и липооксигеназный путь синтеза;
5. Механизм действия эйкозаноидов, основные эффекты;
6. Роль эйкозаноидов в развитии воспаления и ромбообразования;
7. Инактивация эйкозаноидов;
8. ЛС- ингибиторы синтеза эйкозаноидов. Механизм действия НПВС и СПВС;
9. Использование производных эйкозаноидов в качестве ЛС;
- 10.Структуру арахидоновой кислоты. Синтез эйкозаноидов.

**IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.**

**Наглядные пособия:**

**Таблицы названия**

**VI Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:**

1. Какие жирные кислоты бывают в природе;
2. Что мы называем ненасыщенными жирными кислотами, что насыщенными, а что полиненасыщенными (ПНЖК)?
3. Из каких жирных кислот осуществляется синтез эйкозаноидов: простогландинов, лейкотриенов и др.
4. Как выглядит структура жирных кислот;

5. В каких процессах участвуют жирные кислоты;
6. в состав, каких компонентов входят жирные кислоты в организме;
7. что значит эссенциальные жирные кислоты, что мы к ним относим?

#### **VII Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:**

1. Определение эйкозаноидов;
2. В каких процессах участвуют эйкозаноиды;
3. Субстраты для синтеза эйкозаноидов;
4. Классификация эйкозаноидов;
5. Простогландины – особенности;
6. Тромбоксаны. Характеристика;
7. Циклооксигеназный путь синтеза (ЦОГ) простогландинов;
8. Липооксигеназный путь синтеза;
9. Механизм действия эйкозаноидов, основные эффекты;
10. Роль эйкозаноидов в развитии воспаления;
11. Роль эйкозаноидов в процессе тромбообразования;
12. Инактивация эйкозаноидов;
13. ЛС- ингибиторы синтеза эйкозаноидов;
14. Механизм действия НПВС и СПВС;
15. Использование производных эйкозаноидов в качестве ЛС.

#### **VIII Хронокарта учебного занятия:**

23. Общий бюджет времени: 3 (125);
24. Перекличка 5 минут;
25. Разбор основных вопросов темы 60 минут;
26. Тестовый опрос 20 минут;
27. Проведение лабораторной работы;
28. Оформление протоколов 10 минут

## **IX Самостоятельная работа студентов:**

### **Вопросы для самостоятельного обучения:**

Составление тестов и кроссвордов по данной теме.

### **X Список используемой литературы:**

#### **Обязательная:**

1. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004,С.417-428;
2. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

#### **Дополнительная:**

1. Конспект лекций;
2. Интернет ресурсы.