

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

**РУКОВОДСТВО К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ
по специальности: 33.05.01 Фармация**

Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии
разработано коллективом кафедры биохимии ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава РФ

Составители:

зав. кафедрой биохимии, к.м.н. – Гурина А.Е.,
доцент Лолаева А.Т.,
доцент Дзодзиева Л.Х.

Рецензенты:

Заведующий кафедрой фармации ФГБОУ ВО СОГУ им. К.Л.Хетагурова,
к.фарм.н., доцент Морозов В.А.

Зав. кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России,
д.м.н., Джиоев И.Г..

РАЗДЕЛ I. «КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ; СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ; ФЕРМЕНТЫ»

ЗАНЯТИЕ № 1

Тема: ПРЕДМЕТ, МЕТОДЫ И ЗАДАЧИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ. АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ, БЕЛКИ: КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРОЕНИЕ, ОБЩИЕ СВОЙСТВА

I. Научно-методическое обоснование темы:

Молекулярная архитектура живых клеток составляет ту основную черту, которая отличает их от неживой материи. Из всех макромолекул, участвующих в создании этой уникальной биологической суперструктуры, белки играют наиболее значимую роль. Разнообразие белковой структуры и их высокая упорядоченность, удивительная способность к самовоспроизведению, сократимость - неперенный атрибут живой системы. Они не только наиболее щедро представлены в организме человека (составляют более половины растворимого содержимого большей части клеток), но и характеризуются также наибольшим диапазоном вариаций размеров (величины молекулярного веса варьируют от нескольких тысяч до миллионов), формы и физических свойств (от водорастворимых или жирорастворимых до нерастворимых). В этом структурно-функциональном единстве организма, составляющем сущность жизни, белки играют важную роль, незаменимую другими веществами.

Белки - высокомолекулярные азотсодержащие вещества, молекулы которых построены из остатков аминокислот.

Жизнь немыслима без обмена веществ, без постоянного обновления составляющих компонентов живого организма, без *анаболизма* и *катаболизма*, в основе которой лежит деятельность катаболически активных белков - ферментов. Таким образом, белки являются основой структуры и функций живой системы. По образному выражению одного из основоположников молекулярной биологии Ф.Крика, белки важны потому, что они могут выполнять самые разнообразные функции:

1. Структурная (пластическая) - белки образуют основу протоплазмы живой клетки, в комплексе с липидами они являются основным структурным материалом всех цитоплазматических мембран и органелл.
2. Каталитическая - все биохимические реакции катализируются белками-ферментами.
3. Дыхательная - белок крови гемоглобин транспортирует кислород от легких и углекислый газ из клеток органов к легким, т.е. органам дыхания.
4. Транспортная - в транспорте липидов принимают участие альбумины сыворотки крови. Ряд других сывороточных белков образует комплексы с жирами, медью, железом, тироксином, витамином А и др. соединениями, обеспечивая их доставку в соответствующие органы-мишени.
5. Защитная - важнейшие факторы иммунитета - иммуноглобулины и система комплемента являются белками. Процесс свертывания крови, защищающий организм от чрезмерной кровопотери происходит с участием белков свертывающей системы.
6. Сократительная - в акте мышечного сокращения и расслабления участвуют специфические белки мышечной ткани - актин и миозин.
7. Рецепторная - функция восприятия различных воздействий из вне и из внутренней среды осуществляется гликопротеидами.
8. Гормональная - гуморальная регуляция осуществляется белковыми гормонами.

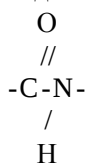
Подсчитано, что в природе существует от 10^{11} до 10^{12} различных белков, обеспечивающих существование $1,2 \times 10^8$ видов живых организмов. По мнению академика Ю.Овчинникова белки являются «законодателями моды» в организме человека.

Структурными единицами белков являются *аминокислоты*, определяющие индивидуальность белковых молекул и несущие информацию о построении пространственной структуры и функции данного белка. В составе белков в организме человека встречаются 20 аминокислот, 2 амида, т.е. 22 аминокислоты.

Согласно полипептидной теории Фишера карбоксильная группа одной аминокислоты взаимодействует с α-аминогруппой другой аминокислоты с выделением элементов молекулы воды и образуется амидная или пептидная связь.

Неподеленная пара электронов атома азота вступает в сопряжение с π-электронами карбонильной группы C=O, атомы N, C, O образуют жесткую сопряженную систему, находящуюся в одной плоскости.

В составе пептидной группы атом углерода находится в гибридизованном состоянии:



Электронное строение предопределяет плоскую, жесткую структуру пептидной связи. Поэтому биосинтез пептидной связи требует притока свободной энергии, тогда как гидролиз идет с высвобождением энергии.

Полипептидная цепь имеет остов или скелет, состоящий из повторяющихся функциональных групп -CH-

CO-NH-, а переменные части включают боковые радикалы, которые и определяют физико-химические свойства белковой молекулы. Помимо пептидной связи иногда встречаются *дисульфидные*.

19 из 20 аминокислот содержат в α -положении асимметричный атом углерода, с которым связаны 4 разные замещающие группы. В результате эти аминокислоты в природе могут находиться в двух разных изомерных формах L и D. Исключение - глицин, так как его радикал представлен только атомом водорода. В нашем организме присутствуют только L-изомеры аминокислот.

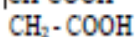
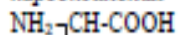
КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ:

по химическому строению радикала:

Аминокислоты с алифатическими радикалами (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин).

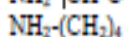
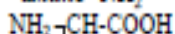
Аминокислоты, содержащие в алифатическом радикале замещенную группу:

карбоксильная - COOH



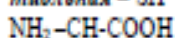
аспарагиновая кислота

амино- NH₂



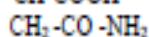
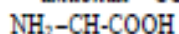
лизин

тиольная - SH



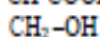
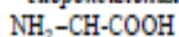
цистеин

амидная - CO-NH₂

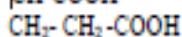
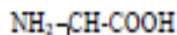


аспарагин

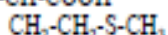
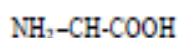
гидроксильная - OH



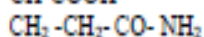
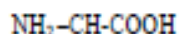
серин



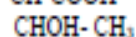
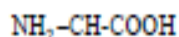
глутаминовая кислота



метионин

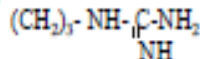
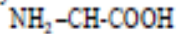


глутамин



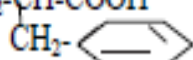
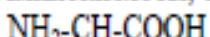
треонин

гуанидиновая - NH-C(=NH)-NH₂

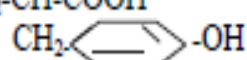
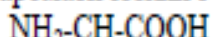


аргинин

3. Аминокислоты, содержащие ароматический гомоциклический радикал

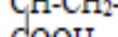
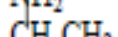


фенилаланин

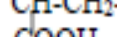
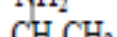


тирозин

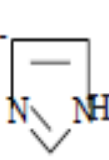
4. Аминокислоты, содержащие гетероциклический радикал



триптофан

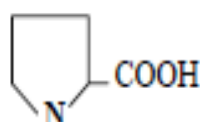


гистидин



5. Иминокислоты

пролин



По биологическому значению:

1. Незаменимые,
2. Заменяемые
3. Частично заменяемые.

По растворимости их радикалов в воде:

1. Аминокислоты с неполярными радикалами (гидрофобные)
– аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, метионин, фенилаланин, триптофан.
2. Аминокислоты с полярными незаряженными радикалами:
серин, треонин, тирозин, аспарагин, глутамин, цистеин
3. Аминокислоты с полярными отрицательно заряженными радикалами – аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота.
4. Аминокислоты с полярными положительно заряженными радикалами – лизин, аргинин, гистидин

II. Цель деятельности студентов на занятии

Студент должен знать:

1. Строение, свойства и функции белков.
2. Понятие заменимые и незаменимые аминокислоты.
3. Общие свойства аминокислот, обусловленные наличием amino- и карбоксильной групп.

Студент должен уметь:

1. Написать представителей отдельных аминокислот.
2. Определить свойства аминокислот, обусловленные наличием amino- и карбоксильной групп.
3. Определить pH водных растворов аминокислот.
4. Анализировать полученные результаты и делать соответствующие выводы.

III. Содержание обучения:

Основные вопросы

1. Основные функции белков:
 - а) структурная (пластическая)
 - б) каталитическая
 - в) транспортная
 - г) защитная
 - д) сократительная
 - е) рецепторная
 - ж) гормональная
2. Классификация аминокислот, входящих в состав белков.
3. Общие свойства аминокислот:
 - а) свойства аминокислот, обусловленные наличием аминогруппы.
 - б) свойства аминокислот, обусловленные карбоксильной группой.
 - в) кислотно-основные свойства.

IV. Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО

Лабораторные работы:

1. Свойства аминокислот, обусловленные наличием аминогрупп.
2. Определение p_n водных растворов аминокислот.
- 3.

Наглядные пособия:

Таблицы, слайды

1. Классификация аминокислот.
- 2.

V. Наименование лабораторной работы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.

Свойства аминокислот, обусловленные наличием аминогрупп.

а) реакция аминокислот с азотистой кислотой

43

Принцип метода: а – аминогруппы в аминокислотах могут реагировать с азотистой кислотой, при этом образуются следующие продукты реакции: оксипроизводные аминокислот, свободный азот и вода.

Методика выполнения. Берут две микрохимические пробирки. В первую из них вносят шесть капель 5% - ного раствора гликокола и каплю концентрированной азотной кислоты. Во вторую вносят шесть капель воды и одну каплю концентрированной азотной кислоты - контрольная пробирка. В каждую пробирку добавляют по три капли нитрита натрия. В первой пробирке, где имелаась аминокислота, отмечается интенсивное выделение пузырьков газообразного азота.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

б) реакция аминокислот с нингидрином

Принцип метода: α-аминокислоты, полипептиды и белки при кипячении с водным раствором нингидрина

дают синее и сине-фиолетовое окрашивание. В образовании цветного продукта принимает участие азот аммиака, образующегося из аминокрупп-

Методика выполнения. В две пробирки вносят по две капли нингидрина. В первую из них вносят гликокол, во вторую белок. Нагревают пробирки и отмечают появление синего окрашивания. Объяснить менее интенсивное и медленное появление синего окрашивания во второй пробирке. Делается вывод по работе.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

в) реакция аминокислот с формальдегидом

Принцип метода: Аминокислоты с формальдегидом дают метиленовые производные. Эта реакция лежит в основе метода формолтитрования Соренсена по определению количества аминокрупп.

Методика выполнения. В пробирке к пяти каплям раствора гликокола добавляют одну каплю раствора фенолфталеина и по каплям едкого натра до слабо-розовой окраски (обычно достаточно одной капли). Добавляют пять капель формоловой смеси и встряхивают. Раствор обесцвечивается за счет связывания аминокрупп формальдегидом и реакция сдвигается в кислую сторону. Добавляют до появления розовой окраски по каплям едкого натра. Количество едкого натра, израсходованного на титрование, эквивалентно количеству аминокрупп, связанных формальдегидом.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.

Определение p_n водных растворов аминокислот

Принцип метода: Водные растворы моноаминокарбоновых кислот дают реакцию, близкую к нейтральной, образуя внутреннюю соль.

Моноаминодикарбоновые аминокислоты дают кислые растворы, так как одна карбоксильная группа идет на образование внутренних солей, другая диссоциирует с образованием H^+ ионов.

Диаминомонокарбоновые аминокислоты в водных растворах дают щелочную реакцию, за счет одной аминокруппы свободной.

Методика выполнения. В три пробирки вносят по три капли растворов аминокислот: В первую гликокол, во вторую аспарагиновую кислоту, в третью лизин. Затем добавляют в каждую пробирку по пять капель универсального индикатора. Найденные по шкале значения p_n заносят в таблицу:

№	Аминокислота	p_n
1	Гликокол	
2	Аспарагиновая кислота	
3	Лизин	

Предполагаемые результаты:

Выполняется обсуждение результатов, и делаются выводы.

VI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний

1. Подберите правильные характеристики

- | | |
|-------------------|---------------------------|
| 5. Сер | А. Полярная с катионной |
| 6. Про | Б. Полярная с анионной |
| 7. Мет | В. Полярная незаряженная. |
| 8. Гис | Г. Неполярная. |
| 1-Г; 2-В; 3-Б; 4- | 6-Г, 7-Г; 8-А. |

3. Подберите правильные характеристики АМК:

- | | |
|--------|---|
| 1. Мет | А. Циклическая аминокислота. |
| 2. Арг | Б. Гидрокси АК. |
| 3. Тре | В. Серосодержащая АК. |
| 4. Тир | Г. Диаминомонокарбоновая АМК с (+) зарядом. |
| 5. Вал | Д. Входит в состав фибриллярных белков. |

Ответ: 1-В; 2-Г; 3-Б; 4- А; 4-Б; 5-Д.

4. Подберите правильные характеристики АМК:

- | | |
|--------|--|
| 1. Лиз | А. Содержит индольное кольцо |
| 2. Сер | Б. Иминокислота |
| 3. Гис | В. АМК с (+) зарядом |
| 4. Три | Г. Входит в состав коллагеновых белков |
| 5. Про | Д. Входит в состав фосфо- и гликопротеидов |

Ответ: 1-В; 2-Д; 3-В, 4-А; 5-Б, Г

4. Подберите правильные характеристики

АМК

1. Гис А. Гидрофильная с анионной группой
2. Лей Б. Гидрофильная с катионной группой
3. Сер В. Гидрофильная незаряженная
4. Лиз Г. Гидрофобная
5. Глу Д. Входит в состав альбуминов
6. Тир
7. Три

Ответ: 1-Б; 2-Г; 3-В; 4-Б; 5-А, Д; 6-В; 7-Г.

5. Напишите и назовите формулы дипептидов, которые могут быть получены из аминокислот:

- а) треонина и цистеина
- б) фенилаланина и аспарагина.
- в) аргинина и лейцина.

6. Напишите формулы протеиногенных аминокислот, содержащих серу.

7. Напишите формулы протеиногенных аминокислот, имеющих в своем составе гетероциклическое кольцо.

8. Напишите проекционные формулы D и L-фенилаланина.

9. Классифицируйте аминокислоты по полярности радикалов:

- | | | |
|----|------|----------------------------------|
| 1. | Иле. | А. Полярная с катионной группой. |
| 2. | Асн. | Б. Полярная с анионной группой. |
| 3. | Глу. | В. Полярная незаряженная. |
| 4. | Гис. | Г. Неполярная. |
| 5. | Сер. | |

Ответ: 1-Г; 2-В; 3-Б; 4-А; 5-В.

10. Напишите формулу пентапептида:

Асп-Вал-Глу-Фен-Лиз.

Обозначьте в пептиде N- и C-концы. Подчеркните пептидные связи.

VII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний

1. Что такое белки и какие основные функции они выполняют в животных организмах?
2. Аминокислоты, как структурная единица белка.
3. Классификация аминокислот.
4. Представители алифатических аминокислот и их характеристика. Напишите формулы ациклических аминокислот.
5. Гомоциклические аминокислоты.
6. Гетероциклические аминокислоты.
7. Рациональная классификация аминокислот, основанная на полярности радикалов.
8. Общие свойства аминокислот.
9. Напишите формулы дикарбоновых аминокислот. Дайте им рациональные и тривиальные названия. Обозначьте углеродные атомы греческими буквами.

VIII. Хронокарта учебного занятия

- 1) Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
- 2) Переключки – 2 мин.
- 3) Вступительная беседа – 6 мин.
- 4) Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
- 5) Опрос – 10 минут.
- 6) Проведение лабораторной работы – 30 мин.
- 7) Оформление протоколов – 10 мин.

IX. Самостоятельная работа студентов

Определение аминокислотного состава белков и хроматографический анализ УИРС:

1. Методы фракционирования и очистки белков:
 - а) электрофорез;
 - б) ультрацентрифугирование;
 - в) гель-фильтрация.
2. Хроматография аминокислот и значение в клинической биохимии.
3. Изменение белкового состава плазмы крови в онтогенезе.

X. Список используемой литературы

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012

2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000, стр. 23-36
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Музил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 2

Тема:СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ, СВЯЗИ, СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ СТРУКТУРУ БЕЛКОВ

I. Научно-методическое обоснование темы:

Прежде чем рассматривать механизм и значение функций белка, следует ознакомиться с основами его «анатомии». Существует четыре важнейших уровня организации белковых молекул:

Первичная структура - это уникальная аминокислотная последовательность, детерминированная генетически и образованная пептидными или амидными связями. В первичной структуре заложен весь план дальнейшей пространственной укладки белковой молекулы.

Правильность полипептидной теории Фишера строения белковой молекулы доказана следующими факторами:

- В природных белках мало титруемых карбоксильных и аминогрупп, поскольку они участвуют в образовании пептидных связей.

- В процессе кислотного или щелочного гидролиза образуются свободные амино - или карбоксильные группы, то же самое происходит под влиянием ферментативного гидролиза, реакция биурета положительная на пептидные связи.

- Рентгеноструктурный анализ подтверждает полипептидную структуру белка, то же самое доказывается возможностью лабораторного синтеза белка. Последовательность аминокислот в первичной структуре определяется методами Сенгера и Эдмана.

В 1953 г. Сенгер в Кембридже впервые открыл последовательность аминокислотных остатков в инсулине (молекулярная масса 5700), спустя несколько лет Мур и Стейн (Нью-Йорк) - других белков в частности, рибонуклеазы с молекулярной массой 13700. Исследование аминокислотной последовательности важно, так как она определяет видовую специфичность белка, то есть одни и те же белки разных видов животных имеют разную аминокислотную последовательность.

Например: инсулин человека в А цепях в положениях

	-8	9	10
человека	тре	сер	лей
свиньи	тре	сер	лей
лошади	тре	гln	лей
крупного рогатого скота	ctJlct	сер	вал
барана	ctJlct	gln	вал

Вторичная структура - это пространственная конфигурация полипептидных цепей, которые стремятся

уменьшить свободную энергию, то есть способ скручивания полипептидных цепей в пространстве. Различаема спирализацию и β -структуру, беспорядочный клубок.

а спирализация - это закручивание полипептидной цепи вокруг мнимого цилиндра по ходу часовой стрелки, поскольку аминокислоты являются L изомерами. Шаг спирали - 5,3 А на каждом витке располагается 3,6 аминокислотных остатка, то есть происходит взаимодействие между 1 и 4 аминокислотным остатком и образование большого числа водородных связей: $-C=O \dots H-N-$

Некоторые фибриллярные белки образуют конформацию **Р-структуры** - структуры складчатого листа, то есть, последовательный ряд листков, расположенных под углом друг к другу. Она может сформироваться между отдельными полипептидными цепями и может быть параллельной и антипараллельной. Вторичная структура поддерживается большим числом слабых связей, энергия которых мала - от 1 до 7 кал. Слабые связи: водородные, электростатические, гидрофобные, Ван-дер-ваальсовы:

Слабые связи:

- а) электростатическое взаимодействие;
- б) гидрофобные взаимодействия неполярных групп;
- в) водородные связи;

Третичная структура - это способ укладки полипептидной цепи в определенном объеме пространства. Она, прежде всего, зависит от характера боковых групп аминокислотных остатков - радикалов. Каждая из этих групп стремится к наиболее выгодным энергетическим взаимодействиям с другими группами и атомами. Каждая специфическая последовательность аминокислот в полипептидной цепи всегда занимает определенное нативное положение в пространстве, обеспечивающее максимально выгодное число связей между атомами полимера и его окружением. Силы, которые способствуют формированию - это разновидности слабых связей, но поддерживается третичная структура ковалентными дисульфидными связями. Дисульфидные связи не определяют характер свертывания полипептидной цепи, но несомненно стабилизируют конформацию молекулы после завершения процесса свертывания.

Например: фермент рибонуклеаза состоит из одной полипептидной цепи (124 аминокислотных остатка) содержит 4 дисульфидных мостика. В положениях 26-84, 72-65, 40-95, 58-110.

При формировании третичной структуры гидрофобные группировки располагаются во внутренней области молекулы.

Некоторые белки имеют четвертичную структуру. Белковая молекула состоит из отдельных протомеров или субъединиц, каждая из которых имеет свои первичную, вторичную и третичную структуры.

Четвертичная структура - это способ укладки в пространстве отдельных полипептидных цепей, обладающих одинаковой или разной первичной, вторичной, третичной структурой и формирующих единое макромолекулярное образование в структурном и функциональном отношениях.

Эту способность белок приобретает при определенном способе пространственного объединения входящих в его состав протомеров образовавших молекулу называемую мультимером, (построены из четного числа протомеров от 2 до 4, реже от 6 до 10, 12...).

Субъединица - функционально активная часть молекулы мультимерного белка. Молекула гемоглобина состоит из α - и β -субчастиц, каждая из которых состоит из 2-х одинаковых α - и β -полипептидных цепей т.е. молекула гемоглобина состоит из 4-х полипептидных цепей, каждая из которых окружает группу гем.

Классическим примером олигомерной молекулы является вирус табачной мозаики (гигантская молекула с молекулярной массой $\sim 40.000.000$, состоящая из 1 молекулы рибонуклеиновой кислоты и 2130 белковых субъединиц, m каждой ~ 17.500 длина вируса 300 нм., ширина - 17 нм.).

Многие ферменты обладают четвертичной структурой (фосфоорилаза а).

Мультимерным ферментом является лактатдегидрогеназа (катализирует обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную. Этот фермент, благодаря различным сочетаниям субъединиц, может существовать в 5-и формах, такие формы получили название **изоферментов или множественных форм ферментов**.

I. Цель деятельности студентов на занятии

Студент должен знать:

1. Структурную организацию белковой молекулы.
2. Связи, стабилизирующие структуры белка.
3. Специфические свойства аминокислот.
4. Качественные и количественные реакции. Реакции на отдельные аминокислоты. Количественные методы определения белков в исследуемых растворах.

Студент должен уметь:

1. Анализировать качественные реакции на определение аминокислот.
2. Определить количественное содержание белка в плазме крови.

II. Содержание обучения:

Основные вопросы

1. Структурная организация белков

- первичная
 - вторичная
 - третичная
 - четвертичная
2. Специфические свойства аминокислот
 3. Методы химического определения белка
 4. Определение N-концевых и C-концевых аминокислот

III. Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО

Лабораторные работы:

1. Качественные реакции на определение отдельных аминокислот в белках:
 - а) биуретовая реакция;
 - б) ксантопротеиновая реакция (Мульдера);
 - в) реакция Сакагучи;
 - г) реакция Миллона;
 - д) реакция Адамкевича;
 - е) реакция Фоля.
2. Качественное определение белка по методу Биурета.

IV. Наименование лабораторной работы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.

Качественные реакции на определение отдельных аминокислот в белках.

а) Биуретовая реакция (обнаружение пептидных связей). *Принцип метода:* Появление цветного окрашивания при би-уретовой реакции вызвано образованием комплексного соединения меди с белком или пептидом.

Методика выполнения, к трем каплям раствора белка добавляют одну каплю раствора сульфата меди и три капли едкого натра. Делают выводы по работе.

Предполагаемые результаты:

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

б) Ксантопротеиновая реакция (Мульдера).

Принцип метода: Белки, содержащие тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие в своей молекуле ароматическое кольцо), могут легко нитроваться с образованием окрашенных нитропроизводных.

Методика выполнения. Берут три микрохимические пробирки. В первую вносят две капли фенола (раствора), во вторую - две капли раствора тирозина или триптофана, в третью столько же капель раствора белка. В каждую пробирку добавляют по капле азотной кислоты (концентрированной). После нагревания отмечают появление желтого окрашивания.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

в) Реакция Сакагучи

Принцип метода: Белки в присутствии щелочи дают красное окрашивание с гипобромидом α-нафтолом. Реакция обусловлена наличием в белке аминокислоты аргинина, имеющей в своем составе гуанидиновую группировку, которая окисляется гипобромидом, соединяясь с нафтолом, образует продукт конденсации красного цвета.

Методика выполнения. В одну пробирку наливают пять капель 1% яичного белка, в другую - пять капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по пять капель 10%-ного едкого натра, три капли 0, 1%-ного спиртового раствора-α-нафтола и по каплям (1-5 капель) 2%-ного раствора гипобромита натрия. Жидкость окрашивается в красный цвет.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

г) Реакция Миллона

Принцип метода: Тирозин, содержащий фенольный гидроксил с реактивом Миллона (смесь азотнокислых солей окиси и закиси ртути) дает красное окрашивание раствора. Эта реакция является специфичной для тирозина при изучении аминокислотного состава гидролизатов белков.

Методика выполнения. Берут три микрохимические пробирки. В первую вносят по три капли раствора тирозина, во вторую

- столько же белка, в третью - фенола. Добавляют в каждую пробирку по одной капле реактива Миллона и нагревают. В пробирках с тирозином и фенолом возникает кирпично-красное окрашивание, в пробирке с белком - белый осадок, затем краснеет при нагревании.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

д) Реакция Адамкевича

Принцип метода: При взаимодействии триптофана с глиоксильной кислотой (ледяная уксусная кислота содержит примесь глиоксиловой) образуется соединение фиолетового цвета.

Методика выполнения. В одну пробирку вводят три капли раствора триптофана, в другую - три капли раствора белка. В каждую пробирку добавляют по три капли уксусной кислоты и нагревают, не доводя до кипения. После охлаждения добавляют по стенке десять капель концентрированной серной кислоты. При стоянии на границе между кислотой и исследуемой жидкостью появляется фиолетовое окрашивание.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

е) Реакция Фоля

Принцип метода: Серосодержащие аминокислоты при кипячении со щелочью теряют серу, которая отщепляется в виде сероводорода. Сероводород взаимодействует со щелочью, образует сульфиды, которые можно обнаружить с помощью ацетата свинца. При добавлении ацетата свинца сульфиды образуют коричневый или черный осадок сульфида свинца.

Методика выполнения. В микрохимическую пробирку вносят три капли 0,4%-ного раствора цистеина, в другую - три капли белка. В каждую пробирку добавляют по три капли 30%-ного едкого натра и осторожно нагревают в течении двух минут. После охлаждения добавляют каплю ацетата свинца.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. Количественное определение белка по методу Биурета.

Количественные методы определения белка имеют большое значение для диагностики ряда патологических состояний. Знание величины содержания общего белка в плазме крови позволяет не только выявить синдромы гипер- и гипопроteinемии, но и произвести расчет концентрации различных фракций.

Принцип метода: Белки сыворотки (плазмы) крови, реагируя в щелочной среде с сернокислой медью, образуют соединения, окрашенные в фиолетовый цвет.

Методика выполнения. К 5 мл раствора биуретового реактива добавляют, избегая образования пены, 0, 1 мл сыворотки крови. Через 30 минут пробу колориметрируют на ФЭКе в кювете с шириной слоя 10мм при зеленом светофильтре (с пропусканием 546 нм). Показатель экстинкции учитывают в сравнении с контрольной пробиркой. Расчет ведут по калибровочной кривой.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

V. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний

1. Уровни организации белковой молекулы.
2. Первичная структура белка. Теория Фишера.
3. Связи, стабилизирующие первичную структуру.
4. Пространственная конфигурация полипептидной цепи. Вторичная структура и связи ее стабилизирующие.
5. Надвторичная структура. Понятие «домен».
6. Третичная структура белка, связи, стабилизирующие ее, их характеристики.
7. Четвертичная структура белка, понятие об олигомерных белках.
8. Понятие об «изоферментах».

VI. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний

1. Каково строение белковой молекулы? Что такое α -спираль и β -структура полипептидной цепи?
2. Дайте определение первичной структуры белка. Какая связь её формирует, как она возникает?
3. Что такое вторичная структура, какие связи ее стабилизируют, изобразите.
4. Дайте определение третичной структуре, какие связи участвуют в ее формировании, как они возникают?
5. Дайте определение четвертичной структуре. Какие связи участвуют в ее формировании.
6. Охарактеризуйте принцип комплементарности при формировании четвертичной структуры.
7. Охарактеризуйте эффект Бора.
8. Какие вещества называют пептидами, как обозначаются концы полипептидной цепи.
9. Опишите ксантопротеиновую реакцию.
10. Опишите реакцию Миллона.

11. Перечислите химические связи, которые могут возникать между функциональными группами радикалов аминокислот внутри одной полипептидной цепи, а также между отдельными полипептидными цепями в белках.

12. Какие белки называют глобулярными, а какие фибриллярными?

VII. Хронокарта учебного занятия

- 1) Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
- 2) Переключки – 2 мин.
- 3) Вступительная беседа – 6 мин.
- 4) Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
- 5) Опрос – 10 минут.
- 6) Проведение лабораторной работы – 30 мин.
- 7) Оформление протоколов – 10 мин.

VIII. Самостоятельная работа студентов

1. Химический состав и химические свойства протаминов и гистонов.
2. Альбумины и глобулины.
3. Самосборка клеточных органелл и вирусных частиц.

IX. Список используемой литературы

Основная:

6. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
7. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
8. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
9. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
10. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А. Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

14. Е.А. Строев. Биологическая химия, Москва 1986
15. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
16. Ленинджер Л. «Биохимия». 1986
17. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
18. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
19. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000, стр. 23-36
20. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
21. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980
22. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
23. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
24. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
25. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
26. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 3

Тема: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ.

I. Научно-методическое обоснование темы:

Для белков наиболее характерны следующие основные физико-химические свойства: высокая вязкость, диффузия, диализ, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, осмотическое давление, денатурация белков, молекулярная масса белков.

Белки амфотерны, благодаря наличию свободных NH_2 - и COOH - групп. Для них характерны все свойства кислот и оснований. Белки обладают явно выраженными гидрофильными свойствами. Растворы белков имеют очень низкое осмотическое давление, высокую вязкость и незначительную способность к диффузии. Белки способны к набуханию в очень больших пределах.

Молекулярная масса белков.

Белки - высокомолекулярные соединения, в состав которых входят сотни и даже тысячи аминокислотных

остатков, объединенных в макромолекулярную структуру. Молекулярная масса колеблется от 6000 до 1000000Д и выше, и зависит от количества полипептидных цепей в составе единой молекулярной структуры белка. Такие полипептидные цепи называют субъединицами. Их молекулярная масса варьирует от 6000 до 100000 и более.

Для огромного количества встречающихся в природе белков химическое строение не выявлено, поэтому основными методами определения молекулярной массы все еще остаются физико-химические методы (гравиметрические, осмометрические, вискозиметрические, электрофоретические, оптические и др.).

Определение молекулярной массы белков методами седиментационного анализа проводят в ультрацентрифугах, в которых удастся создать центробежные ускорения (g), превышающие в 200000 и более раз ускорение земного притяжения. Вычисляют по скорости седиментации молекул белка или седиментационно-муравновесию. По мере перемещения молекул от центра к периферии образуется резкая граница растворитель-белок (регистрируется автоматически). Оптические свойства растворителя и белка используются при определении скорости седиментации; последнюю выражают через константу седиментации S, которая зависит как от массы, так и от формы белковой частицы:

$$W^2 - r$$

где V - скорость перемещения границы растворитель-белок, см/с; W - угловая скорость ротора, рад/с, r - расстояние от центра ротора до середины ячейки с раствором белка, см.

Константа седиментации имеет размерность времени (в сек.). Величина константы седиментации равна $1 \cdot 10^{13}$ с, условно принята за единицу и названа сведбергом (S).

Значения констант седиментации большинства белков лежат в пределах 1-50 S, хотя в ряде случаев эти значения превышают 100 S. Для вычисления M необходимы сведения о плотности растворителя и белка и другие согласно уравнению Сведберга:

$$M = \frac{R T S}{D(1 - \nu \rho)}$$

$$D(1 - \nu \rho)$$

где R-газовая постоянная орг/(моль град), T - абсолютная t (по шкале Кельвина), S - константа седиментации, ρ - плотность растворителя, ν -парциальный удельный объем молекулы белка, D-коэффициент диффузии.

Определение M белков методом ультрацентрифугирования требует много времени и сложной, дорогостоящей аппаратуры. Разработаны 2 более простых метода (гель-хроматография и электрофорез). При использовании диск-электрофореза в полиакриламидном геле для определения M белков строят график зависимости между логарифмом молекулярной массы калибровочных белков и подвижностью белковых частиц в полиакриламидном геле, а затем, определив подвижность исследуемого белка, по графику находят его массу.

Электрофорез проводят в присутствии детергента додецил-сульфата натрия, т.к. только в этом случае наблюдается прямая пропорциональная зависимость между молекулярной массой и подвижностью белков.

Масс-спектрометрический метод (лазерный десорбционноионизационный метод)позволяет определить M небольших пептидов (инсулин, вазопрессин) и крупных биополимерных молекул и, кроме того, структуру биомолекул.

Форма белковых молекул

По форме молекул белки делятся на глобулярные и фибриллярные.

Глобулярные белки имеют более компактную структуру, их гидрофобные радикалы в большинстве своем спрятаны в гидрофобное ядро, и они значительно лучше растворимы в жидкостях организма, чем фибриллярные белки (исключение составляют мембранные белки).

Благодаря применению сканирующей микроскопии и рентгеноструктурного анализа удалось в деталях расшифровать не только полную пространственную структуру, форму, но и степень ассиметрии белковых молекул во всех трех измерениях.

Изоэлектрическая и изоионная точки белков

В изоэлектрической точке суммарный заряд белков, обладающих амфотерными свойствами, равен 0 и белки не перемещаются в изоэлектрическом поле. Зная аминокислотный состав белка, можно приближенно определить изоэлектрическую точку (pI); pI является характерной константой белков.

Изоэлектрическая точка лежит в пределах от 5,5 до 7,0, что свидетельствует о частичном преобладании кислых аминокислот. Однако в природе имеются белки, у которых значения изоэлектрических точек лежат в крайних значениях pH среды, pI пепсина равна 1, а сальмина - почти 12.

В изоэлектрической точке белки наименее устойчивы в растворе и легко выпадают в осадок.

Раствор белка называется изоионным, если он не содержит никаких других ионов, кроме ионизированных остатков аминокислот белковой молекулы и ионов, образующихся при диссоциации воды. Для освобождения белка от посторонних ионов, раствор пропускают через колонку, наполненную смесью анионо- и катионообменников. Изоионной точкой данного белка принято называть значение pH изоионного раствора этого белка:

$$[H]^+ + [P]z = [OH]^-$$

где P - молярная концентрация белка, Z - средний заряд молекулы.

Изоионная точка белка зависит от его концентрации.

Денатурация белков.

Под влиянием различных физических и химических факторов белки подвергаются свертыванию и выпадают в осадок, теряя нативные свойства. Под денатурацией следует понимать нарушение общего плана уникальной структуры нативной молекулы белка, преимущественно ее третичной структуры, приводящее к потере характерных для нее свойств (растворимость, электрофоретическая подвижность, биологическая активность). Большинство белков денатурирует при нагревании их растворов до 50-60 С.

Наиболее характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря белком его биологической активности (каталитической, антигенной или гормональной).

При денатурации белка, вызванной 8М мочевиной или другим агентом, разрушаются в основном нековалентные связи (в частности, гидрофобные взаимодействия и водородные связи).

Дисульфидные связи в присутствии восстанавливающего агента меркаптоэтанола разрываются, в то время как пептидные связи самого остова полипептидной цепи не затрагиваются. В этих условиях разворачиваются глобулы нативных белковых молекул и образуются случайные и беспорядочные структуры.

При непродолжительном воздействии и быстром удалении денатурирующих агентов возможна ренатурация белка с полным восстановлением исходной трехмерной структуры и нативных свойств его молекулы, включая биологическую активность.

При денатурации белковая молекула полностью теряет биологические свойства, демонстрируя тем самым тесную связь между структурой и функцией.

Для практических целей иногда используют процесс денатурации в «мягких» условиях (в условиях низкой t , в присутствии солей, и соответствующем значении pH) например, при получении ферментов или других биологически активных белковых препаратов.

II. Цель деятельности студентов на занятии

Студент должен знать:

1. Основные физико-химические свойства белков.
2. Методы осаждения белка.

Студент должен уметь:

1. Произвести высаливание белков.
 2. Анализировать результаты практических работ.
- Осадить белки различными веществами.
3. Обнаружить в гидролизате дрожжей:
 - а) полипептиды Биуретовым методом;
 - б) пуриновые и пиримидиновые основания серебряной пробой;
 - в) пентозу качественной реакцией;
 - г) фосфорную кислоту молибденовой пробой.
 4. Обнаружить геминую группировку гемоглобина бензидиновым методом.

III. Содержание обучения:

Основные вопросы

1. Основные физико-химические свойства:
 - а) высокая вязкость
 - б) диффузия, диализ.
 - в) оптическая активность
 - г) подвижность в электрическом поле
 - д) осмотическое давление
 - е) денатурация белков (факторы денатурации)
 - ж) молекулярная масса белков
 - з) необратимое осаждение.
2. Методы осаждения:
 - а) необратимое
 - солями тяжелых металлов
 - алкалоидными реактивами
 - минеральными кислотами
 - органическими кислотами
 - при нагревании
 - б) обратимые реакции осаждения
 - органическими растворителями
 - концентрированными растворами нейтральных солей.

IV. Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО

Лабораторные работы:

1. Осаждение белка солями тяжелых металлов.
2. Осаждение белка алкалоидными реактивами.
3. Осаждение белка конц. минеральными кислотами.

4. Осаждение белка органическими растворителями.
5. Высаливание белков.
6. Гидролиз нуклеопротеидов дрожжей.
- а) Биуретовая реакция на полипептиды;
- б) Серебряная проба на пуриновые и пиримидиновые основания;
- в) Качественная реакция на пентозу;
- г) Молибденовая проба на фосфорную кислоту.

Наглядные пособия:

Таблицы, слайды

V. Наименование лабораторной работы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.

Разделение белковых фракций методом высаливания

а). Осаждение белка солями тяжелых металлов

Принцип метода: Соли тяжелых металлов образуют с белками малорастворимые соединения, а в избытке солей наблюдается растворение первоначально выпавшего осадка. Это свойство белков - связывание тяжелых металлов используется в медицинской практике как противоядие при отравлении.

Методика выполнения. По две капли раствора белка вносят в три микрохимические пробирки. В первую пробирку добавляют 1 каплю раствора сернокислой меди, во вторую сернокислый цинк, в третью - уксусно-кислый свинец. В выпавшие осадки добавляют остатки данных солей.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

б) Осаждение белка алкалоидными реактивами.

Принцип метода: Алкалоиды нашли применение при лечении ожогов. Обработка алкалоидами поражённой области приводит к денатурации белка и образованию защитного слоя, предшествующего обезвоживанию тканей и проникновению инфекции. Осаждение белка алкалоидными реактивами обусловлено наличием в белке азотистых гетероциклических группировок, аналогичных, тем, которые находятся в молекуле алкалоидов (пиррольных, индольных). Более полное осаждение белка наблюдается при перезарядке белковой молекулы на положительный заряд.

Методика выполнения. В три пробирки наливают по 5 капель 1 % яичного белка, по 1 капле 1% уксусной кислоты и по 2-3 капли в первую пробирку 10% раствора пикриновой кислоты, во вторую - насыщенного раствора таннина, в третью - 5% раствора железистосинеродистого калия.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов, и делаются выводы.

Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами.

Принцип метода: Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами объясняется как явлением дегидратации белковых частиц, так и нейтрализации их зарядов. В избытке серной и соляной кислот выпавший осадок денатурированного белка растворяется. В избытке азотной кислоты этого растворения не происходит. Возможно, что ион NO мешает перезарядке белковой молекулы. Реакция осаждения белка азотной кислотой используется при клинических исследованиях мочи на присутствие и количественное содержание в ней белка.

Методика выполнения. В три пробирки наливают по 15-20 капель концентрированной соляной, серной, азотной кислот. Наклонив пробирки под углом 45° , осторожно по стенке пробирки наливают равный объём белка.

Появившийся осадок встряхнуть

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов, и делаются выводы.

г) Осаждение белка органическими кислотами

Принцип метода: Трихлоруксусная и сульфасалициловая

кислоты являются очень чувствительными специфическими реактивами на белок и поэтому широко используются в клинической практике для доказательства наличия белка в биологических жидкостях, т. е. применяются в диагностических и прогностических целях.

Методика выполнения. В две пробирки наливают по 5 капель 1% белка, в одну пробирку добавляют 1-2 капли 10% раствора сульфасалициловой, в другую - 1-2 капли 10% раствора трихлоруксусной кислоты.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов, и делаются выводы.

д) Осаждение белка органическими растворителями.

Принцип метода: Белки не растворимы во многих органических растворителях (спирт, ацетон, эфир и др.). Однако их осаждение происходит только из нейтральных и слабокислых растворов и особенно полно в присутствии электролитов. Органические растворители регидратируют частицы белка, разрушают водную оболочку и, тем самым, понижают их устойчивость в растворе.

Методика выполнения. В пробирку наливают 5 капель 1% раствора яичного белка и 20 капель спирта или ацетона, раствор мутнеет. При добавлении нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия выпадает осадок белка.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

е) Высаливание белков

Принцип метода: Если прибавлять к растворам белка соли щелочных и щелочноземельных металлов (сульфат аммония, сульфат натрия, хлористый натрий, сернокислый магний), то их ионы, несущие заряд противоположный заряду белковых частиц, адсорбируются на последних и, делая их электронеutralными, понижают их устойчивость в растворе. Данный процесс носит название высаливания, и является обратимым процессом.

Осадки белков могут быть вновь растворены после уменьшения концентрации солей диализом или разделением водой.

Методика выполнения. В пробирку наливают 20 капель не-разведенного яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, содержимое перемешивают, выпадает осадок яичного глобулина.

Осадок отфильтровывают и в фильтрате остается яичный альбумин. Для высаливания альбумина к фильтрату добавляют измельченный порошок сульфата аммония. Выпавший осадок отфильтровывают, с фильтратом проводят биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белка.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

VI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Какие физико-химические свойства вы знаете?
2. От чего зависит степень ионизации функциональных групп?
3. 3. Что такое изоэлектрическая точка? Какова биологическая активность и устойчивость в растворе белков, находящихся в изо-электрическом состоянии?
4. От каких свойств зависит растворимость белков в воде?
5. При какой t и pH среды можно использовать метод избирательной денатурации?
6. От чего зависит концентрация соли при высаливании белков?
7. Какие принципы положены в основу хроматографических методов?
8. При какой t производят выделение и очистку белков? С чем это связано?
9. В чем выражается амфотерность белков?
10. От чего зависит заряд частиц белков в растворе?

VII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Физико-химические свойства белка.
2. Сущность процесса денатурации и факторы ее вызывающие.
3. Методы выделения, очистки и фракционирования белков.
4. Что такое денатурация?
5. Что такое диализ? Для чего служит диализ?
6. Чем обусловлены реакции осаждения белков? Что такое обратимое и необратимое осаждение.
7. Перечислите способы осаждения белков.

VIII. Хронокарта учебного занятия

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключка – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
5. Опрос – 10 минут.
6. Проведение лабораторной работы – 30 мин.
7. Оформление протоколов – 10 мин.

IX. Самостоятельная работа студентов

1. Определение молекулярной массы белков методами седиментационного анализа.

Х. Список используемой литературы

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000, стр. 23-36
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 4

Тема: СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ: ХРОМО-, НУКЛЕО-, ЛИПО- И ГЛИКОПРОТЕИДЫ.

Сложные белки - протеиды, состоят из белковой части и небелковой - простетической группы, кофермент, кофактор. В зависимости от характера простетических групп сложные белки классифицируются на:

1. Хромопротеиды:
 - а) гемопропротеиды (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, пероксидазы, каталазы).
 - б) флавопротеиды: ФАД, ФМН (производные витамина В₂).
 - в) металлопротеиды: трансферрин, церулоплазмин и др.
2. Нуклеопротеиды:
 - а) дезоксирибонуклеопротеиды (простетическая группа в виде ДНК);
 - б) рибонуклеопротеиды (простетическая группа в виде РНК).
3. Фосфопротеиды, то есть содержащие остатки фосфорной кислоты - казеиноген, фосвитин, ихтулин и др.
4. Липопротеиды (хиломикроны, ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП, ЛПОВП).
5. Гликопротеиды - цереброзиды, цереброзидсульфаты, ганглиозиды.

Характеристика простетических групп.

Гемопропротеиды - простетической группой гемопропротеидов является гем, производное протопорфирина - форма IX, который состоит из 4 пиррольных колец, соединенных метановыми (СН) связями. На вершине каждого пиррольного кольца имеется атом азота, который двумя координационными и двумя ковалентными связями присоединяется к двухвалентному железу. В составе гема имеются замещенные радикалы: 4 метальных, 2 винильных и 2 остатка пропионовой кислоты. Следовательно, по химической структуре гем представляет собой 1, 3, 5, 8 тетраметил, 2, 4 дивинил, 6, 7 дипропионовокислый порфирин. Такая структура гема характерна для гемоглобина, миоглобина, цитохрома с и с₁. Гем цитохрома аа₃ или цитохромоксидазы имеет следующие отличия: во втором положении вместо винильного радикала имеет место изопреноидная цепь и в 8 положении метальный радикал замещается на формильную группу С - ОН. Гем гемоглобина и миоглобина обладает свойствами взаимодействия с газами в частности с кислородом, который присоединяется через координационную связь, при этом валентность железа не изменяется, то есть гем этих соединений имеет свободную координационную связь. Гемоглобин превращается в оксигемоглобин образуется НвО₂. На уровне органов и тканей он диссоциирует на кислород и восстановленный гемоглобин, последний присоединяет углекислый газ и превращается в

карбогемоглобин. Следовательно, в нормальном здоровом организме существуют следующие формы гемоглобина HbO_2 , HbH , $HbCO_2$

Кроме этого, гем Hb обладает способностью реагировать с угарным газом, причем сродство Hb к угарному газу в 300 раз больше, чем к кислороду. Небольшая примесь угарного газа в закрытом помещении активно связывает железо гема гемоглобина, при этом валентность железа не изменяется, но образуется прочное соединение карбоксигемоглобин, что сопровождается нарушением процесса дыхания. Под влиянием сильных окислителей (анилиновые краски, бертолетова соль, красная кровяная соль, железо) Hb окисляется и превращается в метгемоглобин (Мет (ОН)). При этом останавливается тканевое дыхание и наступает удушье - смерть. Гемоглобин был первым белком, полученным в кристаллическом виде, он способен кристаллизоваться, в присутствии соляной кислоты и хлористого натрия образуются кристаллы гемоглобина, которые получены впервые Тейхманом, они имеют видоспецифичность, то есть кристаллы человека имеют ромбическую форму. Hb животных приобретают другие формы, поэтому данное свойство Hb используется в судебной практике для идентификации пятен крови человека и животных.

Гем цитохромов в отличие от гема гемоглобина и миоглобина не имеет свободной координационной связи, так как двумя координационными связями присоединяется к белковой молекуле, поэтому железо гема цитохромов может окисляться и восстанавливаться, принимая и отдавая электроны. На этом свойстве основано участие цитохромов в ЦПЭ.

Флавопротеиды - производные рибофлавина - витамина В, в основе структуры простетической группы лежит изоаллоксазиновое кольцо, к которому присоединяется пятиатомный спирт рибитол и активная форма называется ФМН, если через остаток фосфорной кислоты к ФМН присоединяется адениловая кислота, то образуется другой кофермент - ФАД. Оба кофермента участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. ФМН - с ферментами - оксидазами, а ФАД с дегидрогеназами.

Металлопротеиды.

Трансферрин в своем составе имеет атом железа, является транспортной формой железа.

Ферритин - это депонированная форма железа, которая откладывается в энтероците и гепатоците.

Церулоплазмин - медь содержащий белок, который принимает участие в метаболизме ионов меди, доставляет их в гепатоцит, подвергается там метаболизму и экскретируется с желчью, поэтому при недостаточности развивается болезнь Вильсона-Конона - гепатолентикулярная недостаточность.

Нуклеопротеины состоят из белков и нуклеиновых кислот. В природе обнаружено 2 типа нуклеопротеинов, отличающихся друг от друга по составу, размерам и физико-химическим свойствам: дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) и рибонуклеопротеины (РНП). У РНП углевод представлен рибозой, у ДНП - дезоксирибозой. Термин «нуклеопротеины» связан с названием ядра клетки, однако ДНП и РНП содержатся и в других субклеточных структурах. ДНП преимущественно локализованы в ядре, а РНП

- в цитоплазме. В то же время ДНП открыты в митохондриях, а в ядрах и ядрышках обнаружены также высокомолекулярные РНП.

Биохимики имеют достаточно оснований для утверждения, что природа синтезированных в клетках белков зависит в первую очередь от природы ДНП, точнее ДНК, а свойства живых организмов, как и структурная организация субклеточных органелл, клеток и целостного организма, определяются свойствами синтезированных белков.

ДНК хранит наследственную информацию. Подтверждением этого служит явление трансформации, наблюдаемое у бактерий и открытое также в культуре клеток человека. Сущность заключается в превращении одного генетического типа клеток в другой путем изменения природы ДНК. С нуклеопротеинами и соответственно нуклеиновыми кислотами непосредственно связаны такие биологические процессы, как митоз, мейоз, эмбриональный и злокачественный рост.

У большинства клеток эукариот, когда ядро находится в интерфазе, из ДНК и белковых молекул образуются филаменты - нити, имеющие меняющуюся толщину (в среднем около 10 нм, реже 2 нм). Толщина филаментов определяется наличием или отсутствием белков, окружающих двухспиральную структуру ДНК, а длина их - молекулярной массой ДНК. Известно, что одна хромосома содержит одну молекулу ДНК, имеющую длину несколько сантиметров. ДНП входит в состав мононуклеосом, являющихся составной частью хромосомы. В состав хроматина входят молекула ДНК, пять различных классов белков-гистонов и так называемые негистоновые белки. Количество ДНК в ядре составляет до 6 пг на одну клетку у животных. У *E.coli* содержание ДНК равно 0,01 пг.

Относительно белкового состава ДНП известно, что все 5 классов гистонов различаются по размерам, аминокислотному составу и величине заряда (всегда положительный). Выделяют гистоны, богатые лизином (H1), молекулярная масса которых составляет в среднем 20000, и богатые аргинином с мол.массой до 15000.

Фосфопротеиды.

К белкам этого класса относятся казеиноген молока, вителин, вителлинин и фосвитин, выделенные из желтка куриного яйца; ихтулин, содержащийся в икре рыб. Большое количество фосфопротеинов содержится в клетках ЦНС. Характерной особенностью структуры фосфопротеинов является то, что фосфорная кислота оказывается связанной сложноэфирной связью с белковой молекулой через гидроксильные группы В-оксиаминокислот, главным образом серина и в меньшей степени треонина. На 1 молекулу белка приходится 2-4 остатка фосфата. В клетках фосфопротеины синтезируются в результате пространственной модификации, подвергаясь фосфорилированию при участии протеинки-наз. Фосфопротеины содержат органически связанный, лабильный фосфат абсолютно необходимый для выполнения клеткой ряда биологических функций. Они являются ценным источником энергетического и пластического материала в процессе эмбриогенеза и дальнейшего

постнатального роста и развития организма.

Липопротеины - состоят из белка и простетической группы, представленной каким-либо липидом. В составе ЛП открыты нейтральные жиры, свободные жирные кислоты, фосфолипиды, холестериды. ЛП входят в состав клеточной мембраны и внутриклеточных биомембран ядра, митохондрий, микросом (структурированные ЛП), а также присутствуют в свободном состоянии (в плазме крови). Различают ЛП сыворотки крови низкой плотности, очень низкой плотности, высокой плотности, очень высокой плотности и промежуточной плотности.

К ЛП относятся тромбопластический белок ткани легких, липовителлин желтка куриного яйца, некоторые фосфолипиды молока и т.д. ЛП участвуют в структурной, комплексной организации миелиновых оболочек, нервной ткани, хлоропластов, фоторецепторной и электронно-транспортной систем, палочек и колбочек сетчатки.

Большинство ЛП синтезируются в печени или слизистой оболочке кишечника. Они содержат гидрофобное липидное ядро, окруженное полярными липидами и оболочкой из белков, получивших название апобелки. Различают восемь типов апобелков (апо- A_I, A_{II}, B, C_I, C_{II}, C_{III}, D, E). Обычно ЛП содержат до 5% углеводов (глюкоза, галактоза, гексозамины, фукоза, сиаловая кислота), поэтому некоторые из них являются и гликопротеинами.

Гликопротеины - сложные белки, содержащие, помимо простого белка или пептида, группу гетероолигосахаридов(или гликоконъюгатов). В их состав входит углеводный компонент (гли- кановая фракция), ковалентно связанный с неуглеводной частью (агликановая фракция), представленной белком, пептидом, аминокислотой или липидом. Нарушение реакции гликозилирования двух главных классов гликоконъюгатов (гликопротеинов и ганг- лиозидов) приводит или к накоплению предшественников этих веществ, или к синтезу «укороченных» сахарных цепей гликоконъюгатов. При взаимодействии между некоторыми вирусами и клетками-мишенями главную роль играют углеводные компоненты. Помимо гликопротеинов различают также протеогликаны, состоящие из белка и гликозаминогликанов (или мукополисахаридов). Они состоят из цепей сложных углеводов: аминсахаров, уроновых кислот, серной кислоты и отдельных моносахаридов. Типичными гликозаминогликанами являются гиалуроновая кислота, хондроитинсерная кислота и гепарин.

К гликопротеинам относят большинство белковых гормонов, секретируемых в жидкие среды организма вещества, мембранные сложные белки, все антитела (иммуноглобулины), белки плазмы крови, молока, овальбумин, интерфероны, факторы комплемента, группы крови, рецепторные белки и др.

Они выполняют специфические функции: обеспечивают клеточную адгезию, молекулярное и клеточное узнавание, антигенную активность опухолевых клеток, оказывают защитное и гормональное, а также антивирусное действие.

Синтез гликопротеинов осуществляется в рибосомах эндоплазматического ретикулума (в цитронах), затем присоединяются сахарные цепи (постсинтетическое гликозилирование), и далее белок транспортируется до биомембран клетки и включается в состав мембранных белков или секретируется. Синтезированные гликопротеины далее переносятся в аппарат Гольджи, где осуществляются окончательное гликозилирование и сортировка по назначению.

VII. Цель деятельности студентов на занятии

Студент должен знать:

1. Основные физико-химические свойства белков.
2. Методы осаждения белка.

Студент должен уметь:

1. Произвести высаливание белков.
 2. Анализировать результаты практических работ.
- Осаждать белки различными веществами.
3. Обнаружить в гидролизате дрожжей:
 - а) полипептиды Биуретовым методом;
 - б) пуриновые и пиримидиновые основания серебряной пробой;
 - в) пентозу качественной реакцией;
 - г) фосфорную кислоту молибденовой пробой.

VIII. Содержание обучения:

Основные вопросы

1. Основные физико-химические свойства:
 - а) высокая вязкость
 - б) диффузия, диализ.
 - в) оптическая активность
 - г) подвижность в электрическом поле
 - д) осмотическое давление
 - е) денатурация белков (факторы денатурации)
 - ж) молекулярная масса белков
 - з) необратимое осаждение.

2. Методы осаждения:
 - а) необратимое
 - солями тяжелых металлов
 - алкалоидными реактивами
 - минеральными кислотами
 - органическими кислотами
 - при нагревании
 - б) обратимые реакции осаждения
 - органическими растворителями
 - концентрированными растворами нейтральных солей.

IX. Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО

Лабораторные работы:

1. Гидролиз нуклеопротеидов дрожжей.
 - а) Биуретовая реакция на полипептиды;
 - б) Серебряная проба на пуриновые и пиримидиновые основания;
 - в) Качественная реакция на пентозу;
 - г) Молибденовая проба на фосфорную кислоту.
2. Качественное определение геминовой группировки гемоглобина.
3. Открытие углеводного компонента в белке (реакция Молиша).
4. Обнаружение фосфата в казеине.

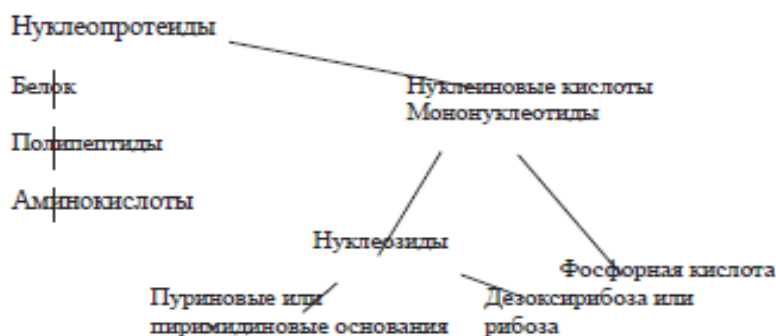
Наглядные пособия:

Таблицы, слайды

X. Наименование лабораторной работы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. Гидролиз нуклеопротеидов дрожжей.

При непродолжительном гидролизе нуклеопротеиды распадаются на белок и нуклеиновые кислоты, а при продолжительном гидролизе белка нуклеиновые кислоты распадаются на основные компоненты, что можно представить в виде следующей схемы.



Для изучения химического состава нуклеопротеидов проводят кислотный гидролиз дрожжей, поскольку они очень богаты нуклеопротеидами. Эта часть работы подготавливается заранее лаборантом, так как на гидролиз тратится много времени (1 час). Студент же проделявает качественные реакции на составные части нуклеопротеидов в готовом гидролизате.

а) Биуретовая реакция на полипептиды.

Методика выполнения. К 5 каплям гидролизата приливают по каплям 10%-го раствора едкого натра, до щелочной реакции (по лакмусу), затем по 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди.

Предполагаемые результаты:

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

б) Серебряная проба на пуриновые и пиримидиновые основания.

Принцип метода: при взаимодействии пуриновых и пиримидиновых оснований с азотнокислым серебром, образуется аморфный осадок серебряных солей пуриновых и пиримидиновых оснований.

Методика выполнения. Для открытия пуриновых и пиримидиновых оснований отфильтровывают в пробирку 3 капли гидролизата, добавляют к ним 2 капли раствора серебряных солей пуриновых и пиримидиновых оснований.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

в) Качественная реакция на пентозу.

Принцип метода: Моносахариды обладают способностью восстанавливать в щелочной среде ионы меди, серебра и др. Реакция эта обусловлена наличием в молекуле моносахаридов альдегидной группы, которая легко окисляется, вызывая тем самым, восстановление металлов.

Методика выполнения. К 3 каплям гидролизата добавляют 3 капли 10%-ного едкого натра, 4 капли реактива Фелинга и нагревают до кипения. Появление желтого осадка указывает на наличие в гидролизате углевода.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

г) Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Принцип метода: Молибденовый реактив с фосфорной кислотой дает продукт реакции - фосфорномолибденовокислый аммоний (желтый кристаллический осадок).

Методика выполнения. К 10 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят. После охлаждения в пробирке появляется желтый кристаллический осадок.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.

Качественное определение геминной группировки гемоглобина

Принцип метода: Реакция обусловлена способностью гемоглобина катализировать окисление бензидина перекисью водорода. Бензидин при этом окисляется в парахинодиимин и жидкость приобретает синюю окраску, при стоянии - красную. Очень чувствительная реакция для обнаружения минимальных количеств крови и имеет широкое применение в судебной медицине (аналогично протекает реакция с Гваяковой кислотой).

Методика выполнения. К 2 каплям разведенной крови добавляют 4 капли бензидина, встряхивают содержимое пробирки и добавляют 4 капли перекиси водорода.

Предполагаемые результаты.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3.

Открытие углеводного компонента в белке (Реакция Молиша)

Принцип метода: Гликопротеиды помимо кислот имеют углеводный компонент, который можно обнаружить с помощью нафтола. Образующийся при этом комплекс дает розово-фиолетовое окрашивание.

Методика выполнения: К 5 каплям 10% яичного белка добавляют 3 капли 0,2% раствора а-нафтола и 20 капель концентрированной серной кислоты.

Предполагаемые результаты:

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4.

Обнаружение фосфата в казеине

Принцип метода: Фосфопротеиды при щелочном гидролизе распадаются на фосфат и белок.

Методика выполнения: К нескольким зернышкам казеина в пробирке добавляют 8 капель раствора едкого натрия и кипятить 30 секунд. После охлаждения проводят реакции на продукты гидролиза.

1. Обнаруживают белок биуретовой реакцией.

2. Определяют фосфат с помощью молибденового реактива.

Предполагаемые результаты:

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

XI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Дайте определение сложным белкам.
2. Классификация сложных белков.
3. Назовите представителей гемопротеидов.
4. Напишите структуру гема гемоглобина и охарактеризуйте его связи.
5. Охарактеризовать структурную организацию гемоглобина.
6. Что такое эффект Бора.
7. Гемоглобинозы и их характеристика.
8. Флавопротеиды, их представители и характеристика.
9. Нуклеопротеиды, строение, свойства, представители.
10. Липопротеиды, классификация и их биологическая функция.
11. Фосфопротеиды структура и биологические функции.
12. Гликопротеиды, строение, представители и биологические функции

XII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Как классифицируются сложные белки? Что такое простетическая группа? Перечислить простетические группы всех классов сложных белков.
2. Охарактеризуйте хромопротеиды. Каково строение и биологическая роль гемоглобина? Назовите соединения гемоглобина с O_2 , CO , что такое метгемоглобин?
3. Назовите ферменты, относящиеся к хромопротеидам.
4. Каково строение и биологическое значение фосфопротеидов? Назовите представителей фосфопротеидов.
5. Каково строение и биологическое значение металлопротеидов? Назовите представителей металлопротеидов.
6. Каково строение и биологическое значение гликопротеидов? Назовите представителей гликопротеидов.
7. Каково строение и биологическая роль липопротеидов
8. Что такое нуклеопротеиды? Каково их строение?
9. Какова биологическая роль нуклеопротеидов? Какие протеины входят в состав нуклеопротеидов и какова особенность их аминокислотного состава?
10. Какие нуклеиновые кислоты входят в состав нуклеопротеидов? Чем отличаются по своему строению ДНК и РНК?

XIII. Хронокарта учебного занятия

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключки – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
5. Опрос – 10 минут.
6. Проведение лабораторной работы – 30 мин.
7. Оформление протоколов – 10 мин.

XIV. Самостоятельная работа студентов

1. Гидролиз сложных белков.
2. Нуклеопротеиды и их химическое строение.
3. Строение и свойства ДНК.
4. Строение и свойства РНК,
5. Химическое строение гемоглобина
6. Свойства гемоглобина и его производных.
7. Строение и свойства липопротеидов, глико протеидов, фосфопротеидов, металлопротеидов.

XV. Список используемой литературы

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г.Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000, стр. 23-36
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Музил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

Тема: ФЕРМЕНТЫ КАК БИОЛОГИЧЕСКИЕ КАТАЛИЗАТОРЫ. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ФЕРМЕНТОВ.

I. Научно-методическое обоснование темы:

Основу жизнедеятельности любого организма составляют биохимические процессы.

Практически все реакции в живом организме протекают с участием природных биокатализаторов, называемых ферментами или энзимами. Они представляют собой высокоспециализированный класс веществ белковой природы, используемых живыми организмами для осуществления многих тысяч взаимосвязанных химических реакций, включая синтез, распад и взаимопревращение разнообразия и огромного множества химических соединений.

Жизнь и многообразие ее проявлений - сложная совокупность химических реакций, катализируемых специфическими ферментами. Важнейшим свойством живого организма является обмен веществ, ускоряющим и направляющим аппаратом, основой молекулярных механизмов которого являются ферменты.

Учение о ферментах выделено в самостоятельную науку - энзимологию или ферментологию. Теоретические и практические достижения энзимологии занимают ведущее место в решении многих проблем биохимии и молекулярной биологии, включая их сравнительное и эволюционное рассмотрение.

Энзимология в своем современном физико-химическом и молекулярном понимании решает две главные, неразрывно связанные между собой проблемы, касающиеся, с одной стороны структурной макромолекулярной организации ферментов, с другой - природы химических взаимодействий, лежащих в основе ферментативного катализа.

Изучение ферментов имеет огромное значение для любой области биологии: химической, пищевой и фармацевтической индустрии, занятых приготовлением катализаторов, антибиотиков, витаминов, лекарственных препаратов и других биологически-активных веществ.

Успехи общей и молекулярной энзимологии способствуют развитию медицинской энзимологии, цели и задачи которой связывают с решением проблем энзимопатологии, энзимодиагностики и энзимотерапии

1. Определения основных понятий.

Как и другие функциональные белки, ферменты делятся на простые и сложные. *Простые ферменты* — это простые белки, они построены из аминокислот и при гидролизе распадаются только на аминокислоты. *Сложные ферменты* — это сложные белки, они состоят из простого белка и небелкового компонента. При их гидролизе, помимо свободных аминокислот, освобождается небелковая часть или продукты её распада.

Белковая часть сложного фермента получила название *апофермент*, небелковая часть — *кофактор*. Кофакторы могут иметь разную химическую природу и отличаться по прочности связи с апоферментом. В роли кофактора могут выступать ионы различных металлов, а также другие неорганические ионы.

Органические вещества неаминокислотной природы, используемые в роли кофакторов, называются *коферментами*. Кофермент вместе с апоферментом образуют *холофермент*.

Кофермент + Апофермент ↔ Холофермент

В некоторых случаях в условиях живой клетки равновесие в этой реакции сильно сдвинуто вправо и кофермент прочно связан со своей белковой частью, они не разделяются при выделении и очистке. Такой кофермент называется *протетической группой*.

Следует отметить одну отличительную особенность сложных ферментов, заключающуюся в том, что ни кофактор (в том числе кофермент), ни сам по себе апофермент каталитической активностью не обладают и только их объединение в единое целое обеспечивает быстрое протекание химической реакции.

Коферменты относятся к сложным органическим веществам, их молекулы значительно меньше по размеру, чем молекулы ферментов. Коферменты могут проникать через биологические мембраны, нагревание обычно не вызывает изменения их структуры.

Функцией кофермента является участие в катализируемой реакции, причём количество кофермента и его химическое строение внешне остаются неизменными. В действительности кофермент является одним из субстратов ферментативной реакции, т.е. выступает как **косубстрат**. В ходе реакции кофермент претерпевает химические превращения, в точности противоположные тем, которые происходят в субстрате. Например, в окислительно-восстановительных реакциях молекула субстрата окисляется, а молекула кофермента восстанавливается. При последующих сопряжённых реакциях изменения в коферменте протекают в обратном направлении и он воспроизводится в первоначальной форме.

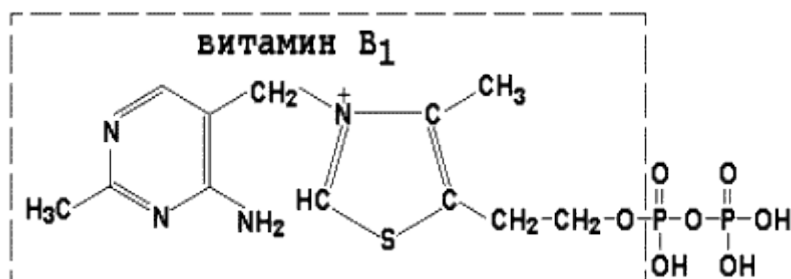
Таким образом, коферменты могут быть охарактеризованы как переносчики определённых атомов, электронов или химических групп на соответствующий акцептор. Строение апофермента определяет специфичность этой реакции, а строение кофермента — её тип.

Витаминные коферменты. Многие коферменты и протетические группы ферментов являются производными витаминов — органических веществ, которые не синтезируются в организме человека и должны поступать в составе пищевых продуктов. Они называются **витаминными коферментами**. В молекуле такого кофермента активным компонентом, соединяющимся с переносимой группой, служит именно витамин. Остальная часть молекулы кофермента обеспечивает специфическое связывание с апоферментом в строго определённой ориентации. Заболевания, возникающие у людей при недостатке витаминов в пище, являются следствием

нарушений обмена веществ, в результате снижения концентрации коферментов специфических ферментативных реакций.

Важнейшими из витаминных коферментов являются:

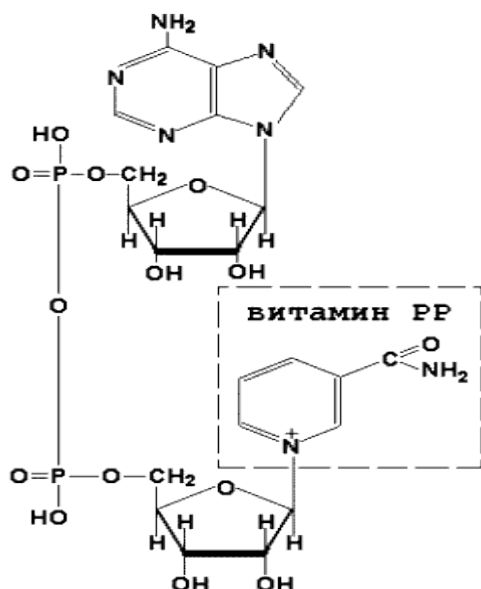
Тиаминдифосфат (ТДФ) является производным витамина В1; участвует в реакциях окислительного декарбоксилирования пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот. Его формула приведена на рисунке.



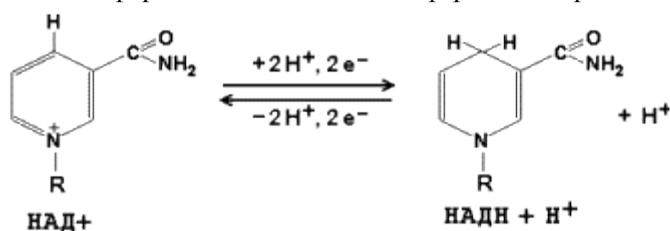
Пиридоксальфосфат является производным витамина В6; он принимает участие в реакциях трансаминирования аминокислот. Его формула приведена на рисунке.



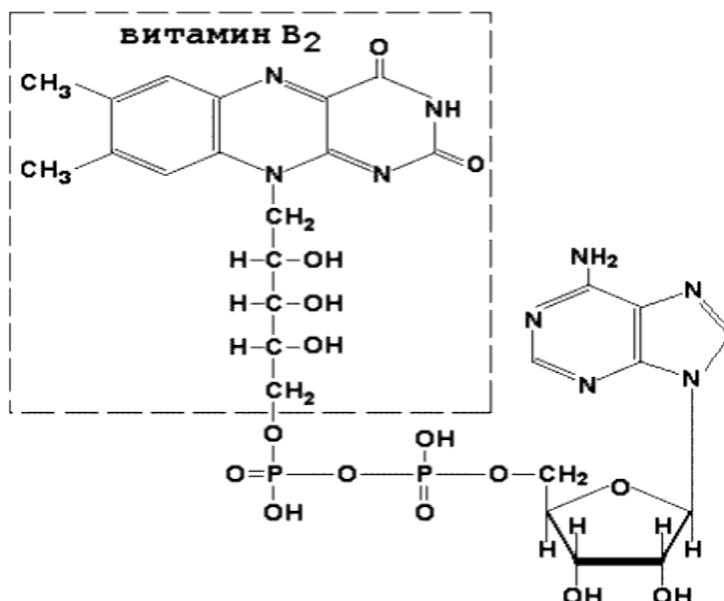
Коферменты **НАД⁺** (никотинамидадениндинуклеотид) и **НАДФ⁺** (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) содержат в своём составе витамин РР и принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях. Восстановленные формы этого кофермента обозначаются НАДН и НАДФН соответственно. Формула кофермента НАД⁺ представлена на рисунке; структура НАДФ⁺ отличается наличием дополнительной фосфатной группы во втором положении рибозы аденилового нуклеотида.



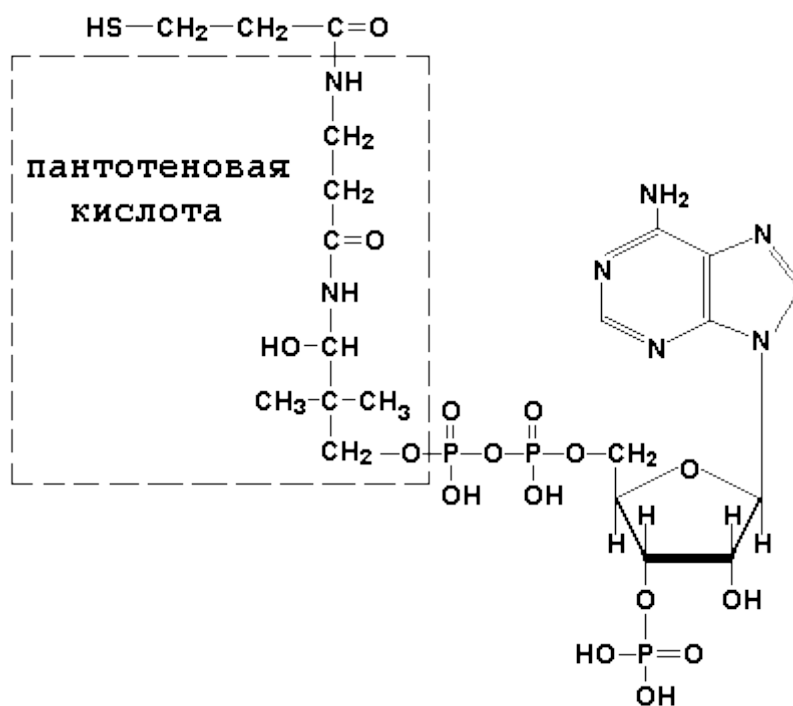
Образование восстановленных форм никотинамидных коферментов представлено на схеме:



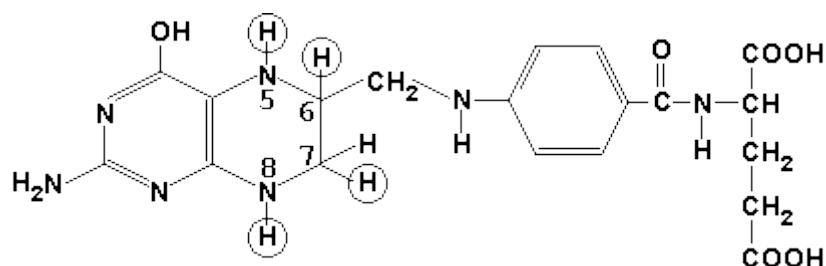
Коферменты **ФАД (флавинадениндинуклеотид)** и **ФМН (флаavinмононуклеотид)** содержат в своём составе витамин В2 и принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях. Восстановленные формы этого кофермента обозначаются ФАДН2 и ФМНН2 соответственно.



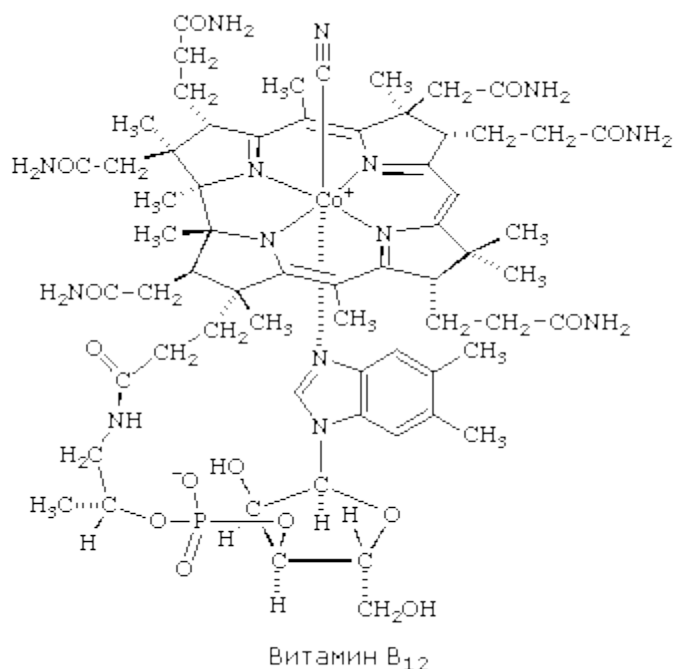
Коэнзим А (CoA-SH) является производным витамина В3 (пантотеновой кислоты) и участвует в реакциях переноса остатков жирных кислот (реакциях ацилирования).



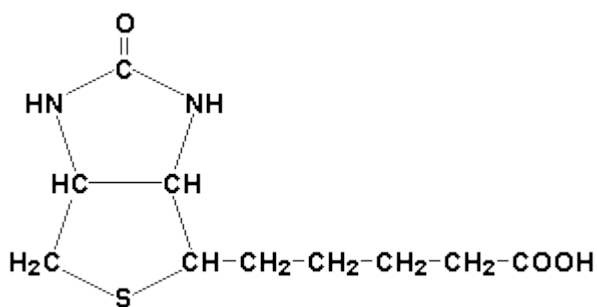
5,6,7,8-Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК) является производным витамина Вс (фолиевой кислоты) и участвует в реакциях переноса одноуглеродных групп: метильной (CH₃-), метиленовой (-CH₂-), метенильной (-CH=), формильной (-COH) и некоторых других.



Метилкобаламин (содержит витамин B12) и также принимает участие в переносе метильной группы.



Биотин (витамин Н) участвует в активации CO₂ и переносе карбоксильных групп (реакциях карбоксилирования).

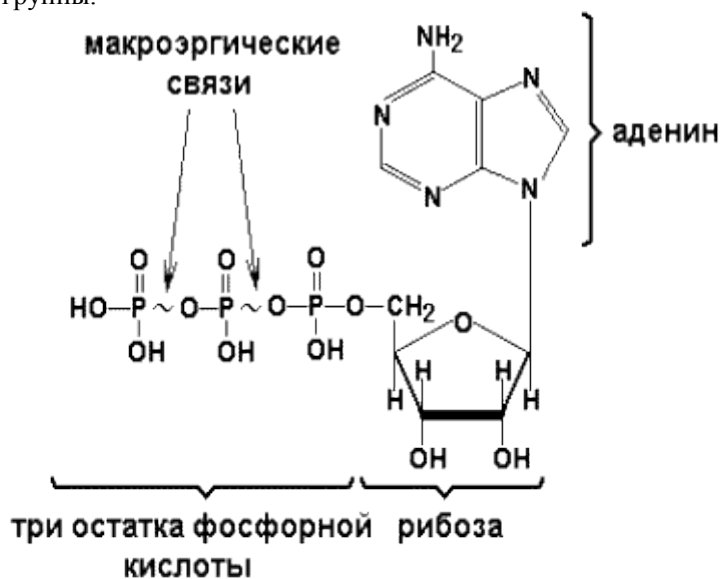


Невитаминные коферменты. К невитаминным коферментам относятся в первую очередь пептидные и нуклеотидные коферменты.

Глутатион – кофермент пептидной природы. По химическому строению это трипептид γ -глутамил-цистеинил-глицин. Его реакционная способность определяется SH-группой цистеина, которая легко вступает в окислительно-восстановительные реакции. Поэтому глутатион может находиться в восстановленной (Г-SH) и окисленной (Г-S-S-Г) форме. В клетке глутатион присутствует преимущественно в восстановленной форме. Его основная функция состоит в том, что глутатион защищает SH-группы ферментов от окисления и образует тиолы из дисульфидов.



Аденозинтрифосфат (АТФ) - кофермент нуклеотидной природы. В его состав входит пуриновое основание аденин, углевод рибоза и три остатка фосфорной кислоты. Это соединение содержит богатые энергией (макроэргические) фосфатные связи и может принимать участие в реакциях синтеза сложных веществ, а также служить донором фосфатной группы.



Типы реакций с участием АТФ:

1. АТФ как источник энергии в реакциях биосинтеза:
 $\text{Глутамат} + \text{NH}_3 + \text{АТФ} \longrightarrow \text{Глутамин} + \text{АДФ} + \text{H}_3\text{PO}_4$
2. АТФ как донор фосфатных групп:
 $\text{Глицерол} + \text{АТФ} \longrightarrow \text{Глицерол-3-фосфат} + \text{АДФ}$

Активный центр фермента. Контактный и каталитический участки активного центра, их функции. Образование фермент-субстратного комплекса.

В процессе формирования фермент-субстратного комплекса субстрат присоединяется к специфическому участку на молекуле фермента, который называется активным центром.

Активный центр – участок молекулы фермента, который связывает субстраты и от которого зависит специфичность каталитического действия ферментов; активный центр содержит функциональные группы остатков аминокислот и коферментов, пространственно сближенных и определённым образом ориентированных.

Несмотря на огромное разнообразие структуры ферментов, их специфичности и механизма действия,

существует ряд общих закономерностей формирования активных центров.

Во-первых, на активный центр приходится относительно малая часть объёма фермента. Роль остальных аминокислотных остатков, составляющих основную массу фермента, состоит в том, чтобы обеспечить молекуле фермента правильную глобулярную форму.

Во-вторых, активный центр – это сложная трёхмерная структура, и в её образовании принимают участие группы, принадлежащие разным частям линейной последовательности аминокислот. Радикалы аминокислот, образующих активный центр, оказываются вблизи друг от друга в результате формирования третичной структуры белка (рисунок 1). Поэтому при воздействии факторов, вызывающих денатурацию (нагревание, концентрированные кислоты и щёлочи) утрачивается конформация активного центра и фермент теряет свою активность.

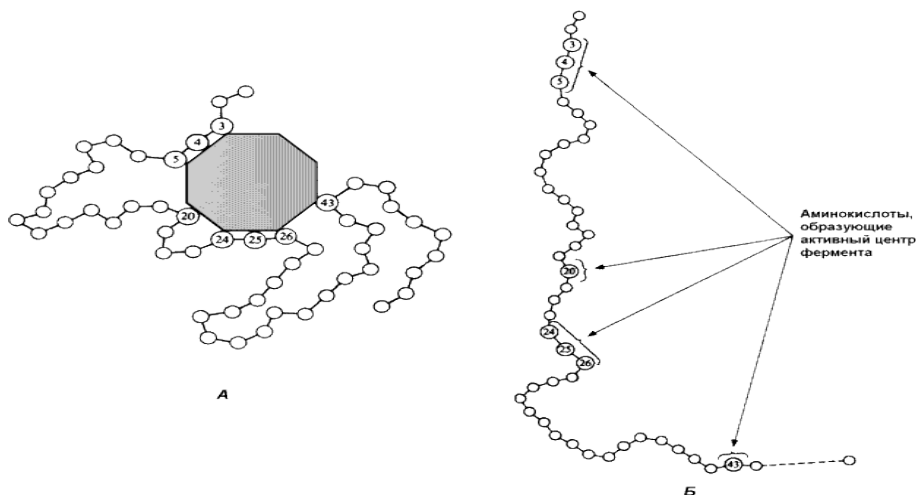


Рисунок 1. А. Участие аминокислотных остатков, образующих активный центр фермента, во взаимодействии с субстратом. Б. Положение этих аминокислотных остатков в первичной структуре фермента.

В-третьих, активный центр имеет форму узкого углубления или щели, в которую ограничен доступ воде, за исключением тех случаев, когда вода является одним из реагирующих веществ. В этом углублении присутствует несколько полярных аминокислотных остатков, необходимых для связывания субстрата и катализа.

В-четвёртых, в составе активного центра можно условно выделить две части: а) контактный или якорный участок, где происходит связывание субстрата в нужной ориентации; б) каталитический участок, обеспечивающий протекание реакции (рисунок 2).



Рисунок 2. Состав активного центра фермента (на примере химотрипсина).

В-пятых, субстраты относительно слабо связываются с ферментами. В связывании и превращении субстрата принимают участие следующие группировки аминокислотных радикалов:

- **полярные заряженные:** карбоксильные группы глутамата и аспартата, аминогруппы лизина; гуанидиновые группы аргинина; имидазольные группы гистидина;
- **полярные незаряженные:** гидроксильные группы серина и треонина; сульфгидрильные группы цистеина; фенольные группы тирозина;
- **неполярные группы:** углеводородные цепи алифатических аминокислот; ароматические кольца фенилаланина и триптофана.

У сложных ферментов в формировании активных центров принимают участие также функциональные группы коферментов.

В образовании фермент-субстратных комплексов принимают участие те же молекулярные взаимодействия, что и обеспечивают формирование пространственной структуры макромолекул, межклеточные контакты и другие

процессы в биологических системах:

- **водородные связи** между полярными незаряженными группировками субстрата и фермента;
- **ионные связи** между противоположно заряженными группировками субстрата и фермента;
- **гидрофобные взаимодействия** между неполярными группировками субстрата и фермента.

Эти три основных типа нековалентных связей различаются по своей геометрии, энергии, специфичности.

Специфичность связывания субстрата с ферментом зависит от строго определённого расположения атомов в активном центре. Субстрат входит в активный центр, если он соответствует ему по форме. Существует две модели, описывающие взаимодействие субстрата с активным центром:

а) Модель жёсткого соответствия («ключ – замок»), предложена Э. Фишером в 1890 году. Активный центр считается заранее подогнанным под форму молекулы субстрата (рисунок 3). Эта модель не утратила своего значения для понимания некоторых свойств ферментов, например, их способности к строго определённому связыванию двух или большего числа субстратов или для объяснения кинетики насыщения субстратом.

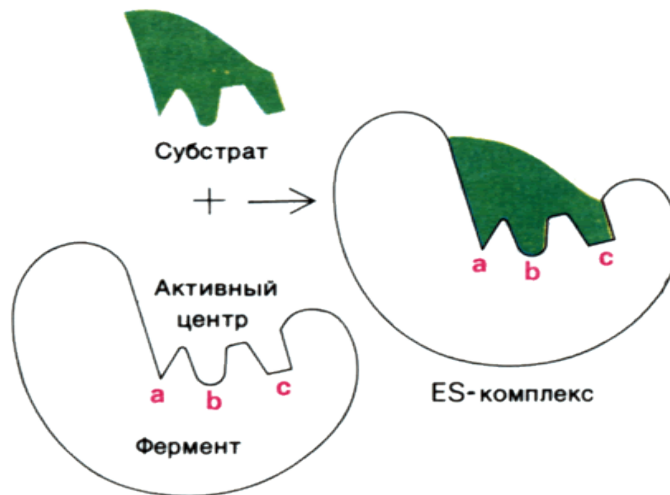


Рисунок 3. Взаимодействие субстрата с ферментом согласно модели жёсткого соответствия (Л.Страйер, 1984).

б) Модель индуцированного соответствия («рука – перчатка»), предложена Кошлендом в 1950-е годы. Согласно этой модели, субстрат вызывает (индуцирует) конформационные изменения фермента, и лишь в результате этих изменений аминокислотные остатки фермента принимают пространственную ориентацию, необходимую для связывания субстрата и катализа (рисунок 4). При этом другие аминокислотные остатки могут погрузиться вглубь молекулы фермента.

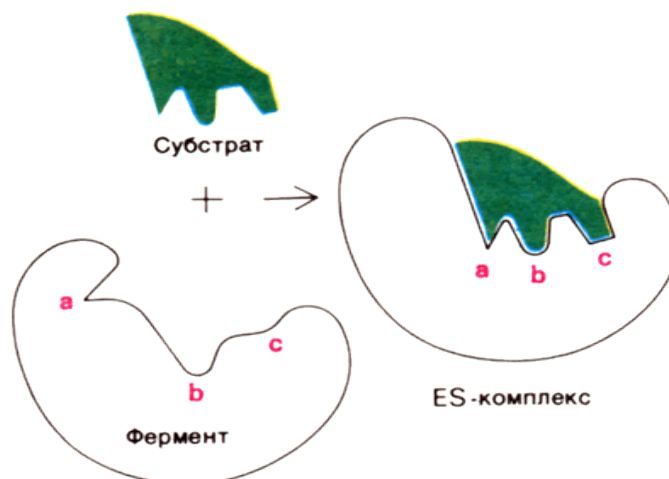


Рисунок 4. Взаимодействие субстрата с ферментом согласно модели индуцированного соответствия (Л.Страйер, 1984).

Значение конформационных изменений, возникающих в молекуле фермента в процессе присоединения к ней субстрата можно рассмотреть на примере гексокиназы. Этот фермент катализирует фосфорилирование глюкозы в реакции с АТФ. Присоединение относительно небольшой молекулы глюкозы к активному центру гексокиназы приводит к сближению полипептидных цепей двух субъединиц, которые, как клещи, захватывают

молекулу глюкозы (рисунок 5). По-видимому, при такой индуцированной подгонке конформации фермента к структуре субстрата молекула глюкозы также деформируется и облегчается её взаимодействие с молекулой АТФ.

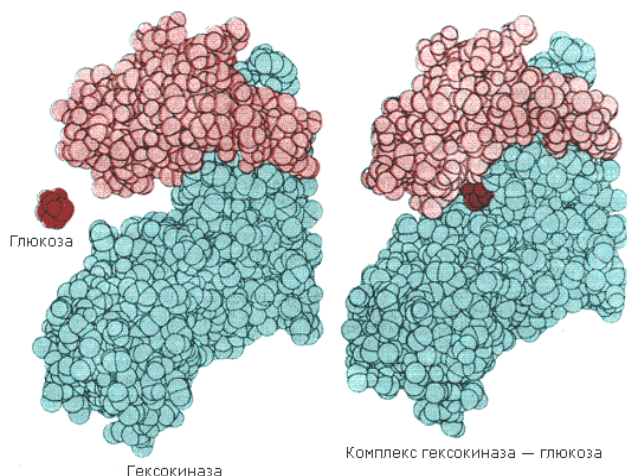


Рисунок 5. Индуцированное соответствие при взаимодействии гексокиназы с глюкозой по данным рентгеноструктурного исследования (А.Ленинджер, 1985).

Аллостерический (регуляторный) центр фермента, его функция. Роль четвертичной структуры молекулы белка в его формировании.

Многие ферменты, обладающие олигомерной структурой (хотя и не все), являются аллостерическими белками, способными изменять своё сродство к субстрату. Аллостерические ферменты, как правило, катализируют начальные реакции в многостадийных путях химических превращений в клетке. Аллостерические ферменты отличаются от остальных ферментов тем, что не подчиняются классической кинетике Михаэлиса – Ментен. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата у таких ферментов имеет вид S-образной кривой. Наряду с активным центром такие ферменты содержат по меньшей мере один аллостерический центр (регуляторный центр).

Аллостерический центр - участок молекулы фермента, способный присоединять определённые молекулы (**эффекторы или модуляторы**). Аллостерический центр специфичен по отношению к своему эффектору подобно тому, как активный центр специфичен по отношению к своему субстрату. Между аллостерическим центром одной из субъединиц фермента и аллостерическим эффектором могут возникать нековалентные взаимодействия (водородные, ионные и гидрофобные). Это приводит к обратимому изменению конформации остальных субъединиц молекулы фермента, в том числе изменению конформации активного центра. В результате активность фермента снижается или повышается (рисунок 6).

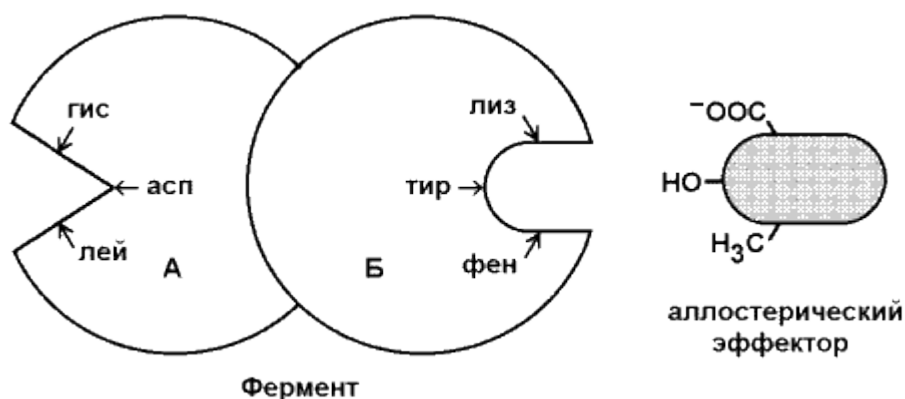


Рисунок 6. Схема взаимодействия аллостерического фермента и его эффектора. Аллостерический фермент состоит из двух субъединиц: А - каталитической, включающей активный центр, и Б - регуляторной, в состав которой входит аллостерический центр. Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению конформации активного центра.

Аллостерические эффекторы бывают двух типов – активаторы и ингибиторы. Аллостерические активаторы способствуют переходу фермента из Т-конформации с низким сродством к субстрату в R-конформацию с высоким сродством к субстрату, аллостерические ингибиторы – наоборот. Если после присоединения эффектора сродство активного центра фермента к субстрату повышается, то эффектор называется аллостерическим активатором, если сродство понижается, то эффектор называется аллостерическим ингибитором.

Различают гомотропную и гетеротропную аллостерическую регуляцию. В случае **гомотропной** регуляции эффектором является субстрат. У таких ферментов аллостерический центр по своей конформации совпадает с активным, а роль аллостерического эффектора фермента выполняет молекула субстрата. Взаимодействие субстрата с активным центром одной из субъединиц аллостерического фермента повышает сродство остальных субъединиц к субстрату. Это напоминает связывание молекулы гемоглобина с кислородом.

В случае **гетеротропной** регуляции эффектор отличается от субстрата и аллостерический центр не совпадает с активным центром. Примером может служить регуляция биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов (рисунок 7).



Рисунок 7. Схема биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов.

Начальную реакцию этого метаболического пути катализирует фермент аспартат-карбамоилтрансфераза (АКТ-аза). Конечный продукт цепи реакций – цитидинтрифосфат (ЦТФ) является аллостерическим ингибитором АКТ-азы. При увеличении концентрации ЦТФ сродство фермента к субстратам снижается, хотя максимальная скорость реакции (V_{max}) остаётся неизменной (рисунок 8). График зависимости активности от концентрации при этом смещается вправо. В этом случае V_{max} может быть достигнута при более высокой концентрации субстрата (аспартата). Ингибирующее действие ЦТФ может быть снято добавлением АТФ (субстратом промежуточных реакций биосинтеза).

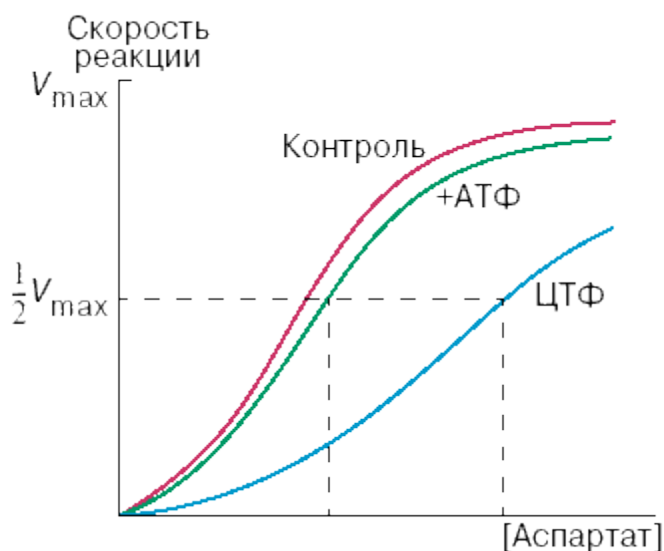


Рисунок 8. Регуляция аспартат-карбамоилтрансферазы ЦТФ и АТФ.

Т.о., ферменты (энзимы) - это высокоспецифичные белки, выполняющие функции биологических катализаторов. Катализатор - это вещество, которое ускоряет химическую реакцию, но само в ходе этой реакции не расходуется.

Условия необходимые для химического взаимодействия молекул, чтобы произошла химическая реакция:

1) молекулы должны сблизиться (столкнуться). Но не всякое столкновение приводит к взаимодействию;

2) необходимо, чтобы это столкновение стало эффективным - завершилось бы химическим превращением. Обязательное условие для эффективности столкновения - чтобы запас энергии молекул в момент столкновения был не ниже энергетического уровня реакции.

Энергетический уровень реакции - это запас энергии, которым должны обладать молекулы, чтобы их столкновение стало эффективным (чтобы произошла химическая реакция). Этот запас энергии является постоянной характеристикой (константой) для каждой данной реакции.

Средний энергетический уровень молекул - это энергия, которой обладает большинство молекул системы в данный момент времени. Эта средняя величина энергетического запаса, которая характеризует совокупность данных молекул в данных конкретных условиях (температура, давление и другие). Энергетический запас молекул - это понятие статистическое (вероятностное). Молекулы постоянно находятся в тепловом движении. Поэтому энергетический запас каждой из них все время изменяется, колеблется около величины, которая и представляет собой средний энергетический уровень молекул. В каждый момент времени наибольшая доля молекул данной совокупности обладает именно таким средним запасом энергии. И чем больше отличается энергия определенной группы молекул от среднего энергетического уровня (в любую сторону), тем малочисленнее эта группа. В любой совокупности молекул ее определенная доля обладает такой энергией, которая выше среднего энергетического уровня и достаточна для протекания химической реакции.

Разность между средним энергетическим уровнем молекул и энергетическим уровнем реакции называется энергетическим барьером или энергией активации. Чем больше эта энергия активации, тем медленнее идет химическая реакция.

Как ускорить химическую реакцию? Повышение среднего энергетического уровня молекул (повышение температуры, давления и других параметров среды, которое используют на химических заводах и фабриках) невозможно для живых организмов, которые нормально функционируют только при постоянных значениях температуры, давления и других параметров. Невозможен и другой путь - уменьшение энергии активации путем снижения энергетического уровня реакции, поскольку эта величина является постоянной характеристикой данной реакции.

Поэтому, только явление катализа (применение катализаторов) может обеспечить ускорение химических реакций в живых организмах. Рассмотрим две реакции.

В общем случае энергии активации реакций 1, 2а и 2б не совпадают между собой, и все разнообразие возможных вариантов можно разделить на две группы:

1) $E_{акт2а}$ и/или $E_{акт2б}$ больше, чем $E_{акт1}$.

Во всех таких случаях реакция образования вещества "АВ" с участием вещества "К" пойдет медленнее. Значит, вещество "К" является ингибитором (замедлителем) этой реакции;

2) $E_{акт2а}$ и/или $E_{акт2б}$ меньше, чем $E_{акт1}$.

В этих случаях реакция с участием вещества "К" пойдет быстрее, чем без него. Значит, вещество "К" является катализатором (ускорителем) данной химической реакции.

Катализатор - это вещество, которое направляет реакцию по такому обходному пути, на котором энергетические барьеры ниже.

Энергия, которую надо затратить для "подъема" молекулы от среднего энергетического уровня реакции, полностью компенсируется при самостоятельном "скатывании" молекулы по склону "вулкана". При дальнейшем самопроизвольном "скатывании" до подошвы "вулкана" (т. е., до среднего энергетического уровня молекул, которые являются продуктами данной реакции). Энергия, которая при этом выделяется, называется "энергетический итог реакции".

Энергетический итог реакции - это разность между энергетическим уровнем исходных веществ (субстратов) и энергетическим уровнем продуктов реакции.

Энергетический итог реакции не зависит от пути, по которому идет реакция (он одинаков и для реакции с участием катализатора, и для реакции без его участия). Он не зависит и от величины энергии активации - от нее зависит только скорость протекания каждого из путей этой реакции.

Вывод из уравнения Аррениуса: так как энергия активации в этом уравнении входит в показатель степени, то даже маленькое изменение энергии активации приводит к большим изменениям скорости реакции.

2) **Общие свойства катализаторов** 1. Катализаторы сами не вызывают химическую реакцию, а только ускоряют реакцию, которая протекает и без них.

2. Не влияют на энергетический итог реакции.

3. В обратимых реакциях катализаторы ускоряют как прямую, так и обратную реакцию, причем в одинаковой степени, из чего следует, что катализаторы:

а) не влияют на направленность обратимой реакции, которая определяется только соотношением концентраций исходных веществ (субстратов) и конечных продуктов;

б) не влияют на положение равновесия обратимой реакции, а только ускоряют его достижение.

3. **Особенности ферментов как биологических катализаторов.** Ферменты обладают всеми общими свойствами обычных катализаторов. Но, по сравнению с обычными катализаторами, все ферменты являются белками. Поэтому они обладают особенностями, отличающими их от обычных катализаторов. Эти особенности ферментов, как биологических катализаторов, иногда называют общими свойствами ферментов. К ним относится следующее.

1. Высокая эффективность действия. Ферменты могут ускорять реакцию в 10^8 - 10^{12} раз.

Высокая избирательность ферментов к субстратам (субстратная специфичность) и к типу катализируемой

реакции (специфичность действия).

2. Высокая чувствительность ферментов к неспецифическим физико-химическим факторам среды - температуре, pH, ионной силе раствора и т.д.

3. Высокая чувствительность к химическим реагентам.

4. Высокая и избирательная чувствительность к физико-химическим воздействиям тех или иных химических веществ, которые благодаря этому могут взаимодействовать с ферментом, улучшая или затрудняя его работу.

4. Строение ферментов. Субстратом (S) называют вещество, химические превращения которого в продукт (P) катализирует фермент (E). Тот участок поверхности молекулы фермента, который непосредственно взаимодействует с молекулой субстрата, называется **активным центром фермента**.

Активный центр фермента образован из остатков аминокислот, находящихся в составе различных участков полипептидной цепи или различных полипептидных цепей, пространственно сближенных. Образуется на уровне третичной структуры белка-фермента.

В его пределах различают:

1) Адсорбционный участок (центр) и каталитический участок (центр). Кроме того, вне активного центра фермента встречаются особые функциональные участки; каждый из них обозначают термином аллостерический центр.

Каталитический центр - это та область (зона) активного центра фермента, которая непосредственно участвует в химических преобразованиях субстрата. Формируется он за счет радикалов двух, иногда трех аминокислот, расположенных в разных местах полипептидной цепи фермента, но пространственно сближенных между собой за счет изгибов этой цепи. Например, каталитический центр "серин-гистидиновых" ферментов формируется за счет радикалов аминокислот серина и гистидина. Если фермент является сложным белком, то в формировании каталитического центра нередко участвует простетическая группа молекулы фермента (кофермент). Коферментную функцию выполняют все водорастворимые витамины и жирорастворимый витамин К. Адсорбционный центр - это участок активного центра молекулы фермента, на котором происходит сорбция (связывание) молекулы субстрата. Он формируется одним, двумя, чаще тремя радикалами аминокислот, которые обычно расположены рядом с каталитическим центром. Главная его функция - связывание молекулы субстрата и передача этой молекулы каталитическому центру в наиболее удобном положении (для каталитического центра). Эта сорбция происходит только за счет слабых типов связей и потому является обратимой. По мере формирования этих связей происходит конформационная перестройка адсорбционного центра, которая приводит к более тесному сближению субстрата и активного центра фермента, более точному соответствию между их пространственными конфигурациями. Такое соответствие - не заранее "готовое", а формирующееся в ходе взаимодействия - американский ученый Кошленд положил в основу теории индуцированного соответствия (или наведенного соответствия), которая преодолела ограниченность существовавшей ранее теории ключа и замка (жесткого соответствия структуры субстрата структуре адсорбционного центра).

Очевидно, что именно структура адсорбционного центра определяет субстратную специфичность фермента, т. е. требования фермента к молекуле химического вещества, чтобы она могла стать для него подходящим субстратом.

Некоторые вещества, обладающие подходящими характеристиками (т. е. похожие на субстрат), могут тоже связываться с адсорбционным центром фермента. Но если в их молекуле нет такой химической связи, на которую может воздействовать каталитический центр данного фермента, то химических превращений этого вещества не произойдет. Занимая активный центр фермента, такие молекулы блокируют его работу, т. е. являются обратимыми ингибиторами данного фермента (обратимыми, потому что связаны с ферментом слабыми типами связей). Повышая концентрацию субстрата, их можно вытеснить из адсорбционного центра. Поэтому такие ингибиторы называют конкурентными. Они конкурируют с истинным субстратом данного фермента за обладание его адсорбционным центром.

2) Аллостерическими центрами называют такие участки молекулы фермента вне его активного центра, которые способны связываться слабыми типами связей (значит - обратимо) с тем или иным веществом (лигандом). Причем такое связывание приводит к такой конформационной перестройке молекулы фермента, которая распространяется и на активный центр, облегчая, либо затрудняя (замедляя) его работу. Соответственно такие вещества называются аллостерическими активаторами или аллостерическими ингибиторами данного фермента.

Термин "**аллостерический**" (т. е. "имеющий иную пространственную структуру") появился в связи с тем, что эти эффекторы по своей пространственной конфигурации совсем не похожи на молекулу субстрата данного фермента (и потому не могут связываться с активным центром фермента). Было сделано заключение, что и аллостерический центр не похож по своей структуре на активный центр фермента. Аллостерические центры найдены не у всех ферментов. Они есть у тех ферментов, работа которых может изменяться под действием гормонов, медиаторов и других биологически активных веществ. Некоторые искусственно синтезированные лекарства обладают биологической активностью потому, что их молекулы комплементарны аллостерическому центру некоторых ферментов организма.

2. **Специфичность ферментов** Различают два главных вида специфичности ферментов: субстратную специфичность и специфичность действия. *Субстратная специфичность*, это способность фермента катализировать превращения только одного определенного субстрата или же группы сходных по строению субстратов. Определяется структурой адсорбционного участка активного центра фермента.

Различают 3 типа субстратной специфичности:

- 1) абсолютная субстратная специфичность - это способность фермента катализировать превращение только одного, строго определенного субстрата;
- 2) относительная субстратная специфичность - способность фермента катализировать превращения нескольких, сходных по строению, субстратов;
- 3) стереоспецифичность - способность фермента катализировать превращения определенных стереоизомеров.

Например, фермент оксидаза L-аминокислот способен окислять все аминокислоты, но относящиеся только к L-ряду. Таким образом, этот фермент обладает относительной субстратной специфичностью и стереоспецифичностью одновременно.

Специфичность действия - это способность фермента катализировать только определенный тип химической реакции.

В соответствии со специфичностью действия все ферменты делятся на 6 классов. Классы ферментов обозначаются латинскими цифрами. Название каждого класса ферментов соответствует этой цифре.

3. Классификация ферментов.

I класс – оксидоредуктазы

К данному классу относятся ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. При окислении может происходить либо отнятие водорода от окисляемого вещества, либо присоединение кислорода к окисляемому веществу. В зависимости от способа окисления различают следующие подклассы оксидоредуктаз:

- 1) дегидрогеназы. Катализируют реакции, при которых происходит отнятие водорода от окисляемого вещества;
- 2) оксигеназы. Ферменты этого подкласса катализируют включение кислорода в окисляемое вещество:
 - а) монооксигеназы - включают один атом кислорода в окисляемое вещество;
 - б) диоксигеназы - включают 2 атома кислорода в окисляемое вещество. Часто это сопровождается разрывом циклической структуры. По месту разрыва связи присоединяются атомы кислорода.

класс – трансферазы

Катализируют реакции переноса химических групп с молекулы одного вещества на молекулу другого вещества.

III класс – гидролазы

Катализируют реакции разрушения химических связей с участием воды.

IV класс – лиазы

Катализируют реакции разрушения химических связей без участия воды.

V класс – изомеразы

Катализируют реакции изомерных превращений.

VI класс – лигазы (сингазы, синтетазы).

Катализируют реакции синтеза.

4. **Основные этапы ферментативного катализа** Любая ферментативная реакция протекает через ряд промежуточных стадий. Различают три основных этапа ферментативного катализа.

1 этап. Ориентировочная сорбция субстрата на активном центре фермента с образованием обратимого E-S комплекса (фермент-субстратного). На этом этапе происходит взаимодействие адсорбционного центра фермента с молекулой субстрата. При этом и субстрат подвергается конформационной перестройке. Все это происходит за счет возникновения слабых типов связей между субстратом и адсорбционным центром фермента. В результате этого молекула субстрата подается на каталитический центр в наиболее удобном для него положении. Этот этап является легко обратимым, потому что здесь участвуют только слабые типы связей. Кинетическая характеристика 1-го этапа ферментативного катализа - константа Михаэлиса (K_m).

2 этап. Химические превращения молекулы субстрата в составе фермент-субстратного комплекса с образованием комплекса фермента с химически преобразованным субстратом. На этом этапе разрываются одни ковалентные связи и возникают новые. Поэтому этот этап протекает значительно медленнее, чем 1-й и 3-й этапы. Именно скорость второго этапа определяет скорость всей ферментативной реакции в целом. Значит, скорость ферментативного процесса в целом характеризуется величиной k_{+2} , которая является почти всегда самой маленькой из всех частных констант скоростей. Кинетическая характеристика 2-го этапа - максимальная скорость (V_{max}).

3 этап. Десорбция готового продукта из его комплекса с ферментом. Этот этап протекает легче, чем 2-й. Он, как и 2-й этап, тоже необратим. Исключение - обратимые ферментативные реакции.

5. **Специфика ферментативного катализа.** Любая химическая реакция характеризуется, кроме принципиальной возможности ее протекания (обусловленной законами термодинамики), скоростью процесса. Скорость ферментативной реакции - изменение $[S]$ или $[P]$ в единицу времени. Измерив ее скорость, т. е. скорость в присутствии фермента, мы должны измерить скорость реакции и в отсутствие фермента (спонтанно протекающая реакция). Именно эта разность и характеризует работу фермента.

Измеряя скорость реакции всегда надо измерять начальную скорость процесса, т. е. скорость ферментативной реакции, в достаточно короткий промежуток времени, когда концентрация субстрата меняется, не настолько значительно, чтобы это отразилось на скорости процесса. Единицы измерения скорости реакции могут быть разными. Лучше пользоваться молярными единицами, а время - это минуты или секунды, реже часы. Поэтому скорость реакции может выражаться, например, в мкмоль/мин или ммоль/час. Величина скорости определяется законом действующих масс. В общем случае скорость химической реакции пропорциональна произведению концентрации реагирующих веществ. В случае ферментативной кинетики - одно из реагирующих веществ -

фермент, концентрация которого на много порядков меньше, чем концентрация субстрата. Это определяет некоторые особенности кинетики ферментативного катализа.

$$V = k_{+2} [E][S].$$

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации ($[E]$) при постоянной и довольно большой концентрации субстрата ($[S] \gg [E]$, $[S] = \text{const}$).

Отклонение от линейности графика при очень высокой концентрации фермента возникает из-за нехватки субстрата, поэтому снижается скорость поступления субстрата на активный центр фермента. Определять скорость ферментативной реакции надо только в том диапазоне концентраций фермента, в котором график линеен. Линейность этого графика позволяет выразить его одной цифрой - тангенс угла наклона к оси абсцисс. Этот тангенс представляет собой величину активности фермента. Именно работа (эффективность) каждого фермента количественно характеризуется величиной его активности, т. е. величиной скорости ферментативной реакции в расчете на единицу количества фермента. Единицы активности могут быть различными: мкмоль S/мин·мг или мкмоль S/мин·мл сыворотки крови.

Молекулярная активность - это количество молекул субстрата, которые превращаются одной молекулой фермента за одну минуту при 30°C и прочих оптимальных условиях. Преимущество этой единицы - в том, что можно сравнивать не только активность ферментов из разных источников, но и эффективность разных ферментов. Например, молекулярная активность фермента каталазы составляет 5×10^6 , а карбоангидразы - 36×10^6 .

Из линейности графика следует, что по скорости реакции можно судить о количестве фермента:

- катал - это количество фермента, которое обеспечивает превращение 1 моля субстрата за 1 с;

- юнит - это количество фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата за 1 мин. 1 юнит = 16,67 нкатал.

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при $[E] = \text{const}$ и $[S] \gg [E]$: чем выше концентрация субстрата, тем выше скорость реакции.

Эта зависимость гиперболическая.

Предельное значение, к которому стремится гипербола - $V_{\max}$ данной реакции - характеризует максимальную работоспособность фермента: $V_{\max} = k_{+2} [E]$.

Таким образом, $V_{\max}$ - это предел, к которому стремится скорость реакции при бесконечном повышении концентрации субстрата.

k_m - это константа Михаэлиса. Она численно равна той концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину от максимального значения.

Эта кривая описывается уравнением Михаэлиса-Ментен.

Физический смысл K_m заключается в том, что она представляет собой константу равновесия между двумя реакциями, приводящими к распаду фермент-субстратного комплекса и той реакцией, которая ведет к образованию этого комплекса.

K_s - субстратная константа. Характеризует константу равновесия 1-го этапа ферментативной реакции. Следовательно, K_m обычно тоже довольно близка к K_s . Следовательно, K_m , как и K_s , характеризует сродство субстрата к данному ферменту. Но экспериментально определить k_{-1} и k_{+2} очень трудно, поэтому трудно определить и K_s . А вот K_m можно просто определить, используя координаты Лайнуивера-Бэрка. С помощью K_m можно характеризовать сродство данного фермента к данному субстрату. Чем меньше K_m , тем больше сродство фермента к данному субстрату, а значит тем больше равновесие первого этапа ферментативной реакции сдвинуто вправо - в сторону образования фермент-субстратного комплекса. Значит, будут созданы наилучшие условия для протекания и второго этапа ферментативного процесса. При таких условиях для достижения эффективного превращения субстрата требуется малая концентрация субстрата. Значит, и $V_{\max}$ теоретически может быть достигнута при малых количествах субстрата.

Если K_m высока, то это означает, что сродство фермента к такому субстрату низкое и реакция при небольших концентрациях субстрата протекает неэффективно.

K_m и $V_{\max}$ - это две кинетические константы, с помощью которых можно характеризовать эффективность работы фермента, в том числе и *in vivo*.

Таким образом, субстрат (S) — вещество, химические превращения которого в продукт (P) катализирует фермент (E).

$S + E \longrightarrow P$, фермент снижает энергию активации; за счет этого реакция ускоряется.

Активный центр фермента — участок поверхности молекулы фермента, непосредственно взаимодействующий с молекулой субстрата. Образован из остатков аминокислот, находящихся в составе различных участков полипептидной цепи или различных полипептидных цепей, пространственно сближенных. Возникает на уровне третичной структуры белка-фермента.

В его пределах различают три области:

- 1) каталитический центр — область (зона) активного центра фермента, непосредственно участвующая в химических преобразованиях субстрата. Формируется за счет радикалов 2–3 аминокислот, расположенных в разных местах полипептидной цепи фермента, но пространственно сближенных между собой за счет изгибов этой цепи. Если фермент — сложный белок, то в формировании каталитического центра нередко участвует простетическая группа молекулы фермента — кофермент (например, все водорастворимые витамины и жирорастворимый витамин K);

- 2) адсорбционный центр — участок активного центра молекулы фермента, на котором происходит сорбция (связывание) молекулы субстрата. Формируется 1, 2, чаще 3 радикалами аминокислот, расположенными рядом с каталитическим центром. Главная функция — связывание молекулы субстрата и передача этой молекулы

каталитическому центру в наиболее удобном положении (для каталитического центра). Сорбция происходит только за счет слабых типов связей и потому обратима. По мере формирования этих связей происходит конформационная перестройка адсорбционного центра, которая приводит к более тесному сближению субстрата и активного центра фермента, более точному соответствию между их пространственными конфигурациями. Именно структура адсорбционного центра определяет субстратную специфичность фермента;

3) аллостерические центры — такие участки молекулы фермента вне его активного центра, которые способны связываться слабыми типами связей (значит — обратимо) с тем или иным веществом (лигандом). Это связывание приводит к такой конформационной перестройке молекулы фермента, которая распространяется и на активный центр, облегчая либо затрудняя (замедляя) его работу. Соответственно такие вещества называются аллостерическими активаторами, или аллостерическими ингибиторами данного фермента. Аллостерические центры найдены не у всех ферментов.

II. Цель деятельности студентов на занятии.

Студент должен знать:

1. Роль ферментов, значение ферментов в химических реакциях как биокатализаторов;
2. Структурную организацию ферментов;
3. Понятие о коферментах, кофакторах и простетических группах;
4. Значение активного центра в ферментативном катализе, специфичность действия ферментов;
5. Отличие ферментативного катализа от действия неорганических катализаторов;
6. Механизм и кинетику ферментативного катализа.

Студент должен уметь:

1. Определять активность амилазы слюны;
2. Определять влияние различных температурных режимов на активность амилазы слюны;
3. Определять специфичность действия амилазы слюны и сахара дрожжей;
4. Исследовать влияние реакции среды на активность пепсина желудочного сока;
5. Интерпретировать полученные данные и делать соответствующие выводы.

III. Содержание обучения.

1. Структурная организация ферментов. Понятие «апофермент» и «холофермент». Кофермент, кофактор и простетическая группа. Их роль в ферментативном катализе.

3. Реагирующая часть фермента «апофермент». Свойства активного центра, специфичность действия ферментов.
4. Особенности ферментативного катализа.
5. Механизм ферментативного катализа. Теории Фишера и Кошленда.
6. Кинетика ферментативных реакций. Закон Михаэлиса-Ментен.
7. Зависимость скорости ферментативных реакций от t и pH .

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

Лабораторные работы:

1. Определение активности амилазы слюны.
2. Определение влияния различных температурных режимов на активность амилазы слюны.
3. Определение специфичности действия амилазы слюны и сахаразы дрожжей.
4. Исследование влияния реакции среды на активность пепсина желудочного сока.

V. Наименование лабораторной работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.

Определение активности амилазы слюны

Принцип работы: Амилаза слюны относится к классу гидролаз и ускоряет гидролиз полисахаридов (например, крахмала). Действие амилазы слюны на гидролитическое расщепление крахмала можно обнаружить по определению конечных продуктов этой ферментативной реакции.

Порядок проведения работы. В две пробирки вносят: в первую - 10 капель слюны, во вторую - 10 капель желудочного сока. Затем в обе пробирки приливают по 10 капель 0,5% раствора крахмала и помещают на 10 минут в водяную баню при 37° . Далее пробирки извлекают, помещают в штатив и добавляют по 3 капли раствора Люголя. При надобности проверить конец гидролиза крахмала реакцией Феллинга.

Исследуемый фермент	Объект исследования	Субстрат	Условия реакции	Результаты реакции с йодом	Результаты реакции Феллинга
амилаза	слюна	крахмал	$37^{\circ}-10'$		

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2.

Определение влияния различных температурных режимов на активность амилазы слюны

Принцип работы: В работе выявляется чувствительность фермента к температуре, при которой протекает ферментативная реакция. Для многих ферментов максимальная ферментативная скорость наблюдается при $38-40^{\circ}C$. При нагревании выше $70^{\circ}C$ ферменты-белки, подвергаясь денатурации, теряют свойства биологических катализаторов. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются, но скорость ферментативного катализа резко падает.

Порядок проведения работы. В 3 пробирки вносят по 10 капель слюны и 10 капель 0,5% раствора крахмала и помещают в водяную баню при 37° на 10 минут первую пробирку, вторую - на

10 минут в кипящую водяную баню, третью ставят на 10 минут на лед. Затем пробирки помещают в штатив и добавляют по 5 капель раствора Люголя. Результаты вносят в таблицу.

Фермент	Субстрат	Условия реакции		Результаты реакции с йодом
		Температура	Время	
1. Амилаза	Крахмал	37°	10'	
2. Амилаза	//	100°	10'	
3. Амилаза	//	0°	10'	

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3.

Определение специфичности амилазы слюны и сахаразы дрожжей

Принцип работы: Способность катализировать только определенные химические реакции есть важное свойство ферментов. Эта высокая специфичность объясняется участием в образовании фермент-субстратного комплекса лишь определенных функциональных групп, входящих в состав ферментов. Амилаза ускоряет гидролиз лишь полисахаридов, а сахараза расщепляет только дисахарид сахарозу. Гидролиз соответствующих субстратов специфичными ферментами определяем по обнаружению конечных продуктов гидролиза реакцией Феллинга.

Порядок выполнения работы. В 2 пробирки вносят: в первую - 10 капель раствора крахмала, во вторую - 10 капель сахарозы. В обе пробирки добавляют по 5 капель амилазы слюны и помещают смеси в водяную баню при 37° С. Через 10 минут пробирки вынимают, охлаждают водой и в каждую пробирку добавляют по 5-6 капель раствора Феллинга. Пробирки нагревают и отмечают результаты. Параллельно аналогичную работу проделывают с другим ферментом - сахарозой дрожжей.

Схема протокола

Фермент	Субстрат	Условия реакции		Результаты реакции Феллинга
Амилаза	крахмал	37°	10'	
Амилаза	сахароза	//	10'	
Сахараза	крахмал	37°	10'	
Сахараза	сахароза	//	10'	

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4.

Исследование влияния реакции среды на активность пепсина желудочного сока

Принцип работы: Оптимум pH для пепсина желудочного сока определяют при взаимодействии последнего с фибрином при различных значениях pH среды.

Порядок выполнения работы. В три пробирки наливают по 5мл буферного раствора с различными значениями pH. В каждую пробирку вносят по кусочку (20-30 мг) окрашенного фибрина или яичного белка. Тщательно размешать и внести по 30мг пепсина. Инкубировать в течение 15-20 минут при 37° С, периодически помешивая смесь. Полученные результаты внести в протокол.

Фермент	Схема буф. рН'	Субстрат	Условия реакции	Раствор фибрина
Пепсин	2	Фибрин	37° 45-25'	
//	7	//	//	
//	9	//	//	

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

VI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний.

1. Ферменты как биокатализаторы. Охарактеризовать биологическую роль ферментов.
2. Ферменты простые и сложные. Дайте определение понятия «апофермент», «холофермент», «кофермент», «кофактор» и «простетическая группа».
3. Перечислите и охарактеризуйте коферменты - производные витаминов.
4. Назовите металлы, которые выполняют роль кофактора.
5. Назовите функции белковой части молекулы фермента.
6. Понятие об активном центре, свойства активного центра; охарактеризуйте участие активного центра в ферментативном катализе.
7. Особенности ферментативного катализа; отличие ферментов от неорганических катализаторов.
8. Что называют энергетическим барьером реакции? Что такое «энергия активации», понятие «переходное состояние».
9. Назовите и охарактеризуйте две теории действия ферментов.
10. Изобразите схематически протекание реакции превращения субстрата в продукт реакции по теории

промежуточных соединений.

11. Объясните в общем виде механизм действия ферментов, исходя из теории фермент-субстратной комплементарности.

12. В чем заключается биологическая роль ступенчатости биохимических процессов в живых организмах?

13. С помощью каких связей происходит присоединение субстрата к активному центру фермента, какого значения «многоточечного» контакта фермента с субстратом?

14. В чем сущности кислотно-основного, а также нуклеофильного и электрофильного катализа ферментативных реакций?

15. Назовите нуклеофильные группы. Радикалы каких аминокислот встречаются в активном центре?

16. Что представляют собой электрофильные группы, встречающиеся в активном центре ферментов, как они действуют в акте катализа?

17. Перечислите факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций.

18. Как изменяется скорость ферментативной реакции при изменении концентрации фермента.

19. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Закон Михаэлиса-Ментен.

20. Что такое константа Михаэлиса и ее биологическая роль.

21. Как изменяется скорость ферментативной реакции при изменении температуры, что такое термолабильность?

22. Зависимость ферментативной активности от pH. Чем обусловлено влияние pH среды на скорость ферментативной реакции. Укажите оптимум pH для следующих ферментов: пепсин, трипсин, амилаза.

VII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний.

1. Охарактеризуйте ферменты как биокатализаторы. Опишите строение ферментов. Дайте определение простым и сложным ферментам.

2. Классификация ферментов по химической структуре и биологической роли.

3. Написать несколько коферментов, производных витаминов

НАД, ФАД, ФМН; охарактеризовать их реагирующую часть молекулы.

4. Охарактеризовать коферменты, производные витаминов В В₆, фолиевой кислоты; написать структуры и объяснить, в каких процессах метаболизма они участвуют.

5. Охарактеризовать и написать формулы биотина, липоевой кислоты и в каких процессах метаболизма они участвуют.

6. Охарактеризовать роль аскорбиновой кислоты. Коферментом каких ферментов она является.

7. Назовите кобамидные коферменты. Производным какого витамина являются. Какова функция ферментов, содержащих кобамидные коферменты.

8. Чем отличается ферментативный катализ от неферментного

9. Охарактеризуйте реагирующую часть апофермента. Опишите, как формируется активный центр, из каких групп состоит, какими свойствами обладает.

10. Охарактеризуйте влияние температурного режима и pH на активность ферментов.

VIII. Хронокарта учебного занятия.

1) Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).

2) Переключки – 2 мин.

3) Вступительная беседа – 6 мин.

4) Разбор основных вопросов темы – 30 минут.

5) Опрос – 10 минут.

6) Проведение лабораторной работы – 30 мин.

7) Оформление протоколов – 10 мин.

IX. Самостоятельная работа студентов.

1. Современные представления о механизмах каталитической деятельности ферментов.

2. Структурная организация рибонуклеазы.

X. Список используемой литературы

Основная:

11. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012

12. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016

13. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013

14. Ф.С. Дзугоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007.

15. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 6.

Тема: РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ. ИНГИБИТОРЫ И АКТИВАТОРЫ. МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ ЭНЗИМОЛОГИИ.

I. Научно-методическое обоснование темы:

Активность ферментов в организме человека и высших животных регулируется, что обеспечивает приспособление интенсивности обмена веществ к скорости протекания жизненных процессов. Регуляция скорости ферментативных реакций в клетке - основной механизм не только контроля и координации метаболических путей, но и особенностей течения метаболизма в клетках различных органов и их адаптация к изменениям окружающей среды.

Живая клетка - открытая система, постоянно обменивающаяся с внешней средой веществами и энергией: в нее поступают питательные вещества, которые подвергаются превращению и используются в качестве строительного и энергетического материала, из клеток выводятся конечные продукты метаболизма. В многоклеточном организме клетка реагирует не только на изменение окружающей среды, но и на функциональную активность соседних клеток, она стремится сохранить неизменным свой внутренний состав - клеточный гомеостаз.

Среди всех метаболических путей, протекающих в организме, выделяют катаболизм и анаболизм (обмен веществ).

Катаболизм - распад сложных веществ до простых с высвобождением энергии.

Анаболизм - синтез из простых более сложных органических веществ.

Метаболические пути согласованы между собой по месту, времени и интенсивности протекания. Эта согласованность протекания обеспечивается сложными и многообразными механизмами регуляции.

Скорость ферментативной регуляции, как и активность фермента, в значительной степени определяется так же присутствием в среде активаторов и ингибиторов: первые повышают скорость реакции, а вторые -тормозят. Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы.

Основными способами регуляции активности ферментов являются: активирование и ингибирование.

Активирование протекает по типу срочной регуляции и хронической адаптации.

К срочной (быстрой) регуляции относятся:

1. ковалентная модификация
2. частичный протеолиз
3. ассоциация-диссоциация
4. белок-белковые взаимодействия
5. аллостерическая регуляция.

Хроническая адаптация - дорепрессорное действие на синтез белка-фермента.

Ингибирование бывает обратимое и необратимое. Обратимое ингибирование в свою очередь разделяют на конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное. Ферменты применяют в медицине:

1.Ферменты и наследственная патология - энзимопатология, т.е. дефицит отдельных ферментов является причиной наследственных заболеваний.

2. Ферменты применяются с целью диагностики заболеваний (энзимодиагностика) - трансферазы АсАТ, АлАТ. Определение их активности используется для диагностики патологии сердца и печени.

3. При их отсутствии или недостатке (наследственном или приобретенном) например, ферменты пищеварительного тракта (пепсин, трипсин, липаза) входят в состав лекарств, улучшающих пищеварение.

4. Для специфического разрушения некоторых продуктов обмена, тромбов, участков омертвевшей ткани на ранах.

5. Многие лекарственные ферментные препараты при онкопатологии оказывают свое терапевтическое действие по механизму конкурентного ингибирования, т.е. являются антиметаболитами.

Понятие об активаторах и ингибиторах ферментов. Роль ионов металлов в регуляции активности ферментов.

Как уже отмечалось, ферменты, относятся к катализаторам, активность которых может регулироваться. Поэтому через ферменты можно контролировать скорость протекающих химических реакций в организме. Регуляция активности ферментов может осуществляться путем взаимодействия с ними различных биологических компонентов или чужеродных соединений (например, лекарств и ядов), которые принято называть **модификаторами** или **регуляторами ферментов**. Под действием модификаторов на фермент реакция может ускоряться (в этом случае их называют **активаторами**) или замедляться (в этом случае их называют **ингибиторами**).

Активация ферментов определяется по ускорению биохимических реакций, наступающему после действия модификатора. Одну группу активаторов составляют вещества, влияющие на область активного центра фермента. К ним относятся кофакторы ферментов и субстраты. Кофакторы (ионы металлов и коферменты) являются не только обязательными структурными элементами сложных ферментов, но и по существу их активаторами.

Из ионов металлов на активность многих ферментов влияют: NH_4^+ , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} . Ионы тяжелых металлов, как правило, оказывают ингибирующее влияние. Действие катионов в основном довольно специфично, но в большинстве случаев фермент активируется более, чем одним катионом. Наблюдается также явление антагонизма между ионами. Наиболее известен антагонизм между Na^+ и K^+ и между Mg^{2+} и Ca^{2+} .

Магний является природным активатором ферментов, действующих на фосфорилированные субстраты (фосфатазы, киназы, синтетазы), но в условиях *in vitro* может быть заменён марганцем.

Анионы в общем мало влияют на активность ферментов, и их воздействие лишено специфичности. Исключением является амилаза, активируемая хлоридами, а также, в меньшей степени, другими галогенами. Влияние активирующего иона изменяется также в зависимости от pH. Степень очистки фермента также влияет на активирующую концентрацию иона и на специфичность активации. Высокоочищенные ферменты характеризуются большей избирательностью по отношению к активирующим ионам.

Активирующее действие ионов металлов реализуется различными путями. Наиболее типичным механизмом является включение иона в структуру каталитического центра фермента, который без него не проявляет активности. Это типичная функция металла в роли кофермента. Другой, довольно частой функцией активирующего металла является образование связи между ферментом и субстратом, или между ферментом, коферментом и субстратом. Например, ионы Zn^{2+} в составе фермента алкогольдегидрогеназы образуют 2 координационные связи с молекулой кофермента НАД⁺, 3 координационные связи с молекулой апофермента, а шестая координационная связь присоединяет субстрат (рисунок 9).

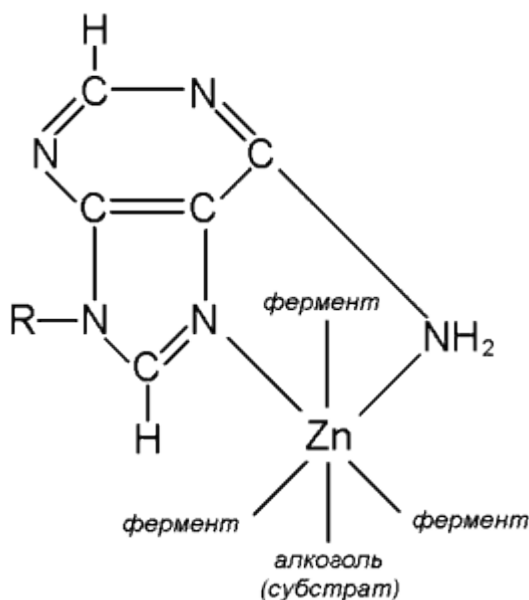


Рисунок 9. Участие иона цинка в связывании алкогольдегидрогеназой печени кофермента и субстрата.

Ионы металлов, так же как и субстраты, коферменты, их предшественники и структурные аналоги, можно использовать на практике в качестве препаратов, регулирующих активность ферментов.

Виды ингибирования ферментов (обратимое и необратимое, конкурентное и неконкурентное).

Ингибирование - частичное или полное торможение ферментативной реакции под действием веществ различной химической природы. Вещества, вызывающие ингибирование ферментов, называют **ингибиторами**.

Различают обратимое и необратимое ингибирование. Если ингибитор вызывает стойкое снижение скорости реакции, то это **необратимое ингибирование**. При этом образуются ковалентные связи между молекулами фермента и ингибитора. Некоторые ферменты полностью ингибируются очень малыми концентрациями ионов

тяжёлых металлов, например, ионов ртути (Hg^{2+}), серебра (Ag^+) и мышьяка (As^+), или иодуксусной кислотой. Эти ингибиторы необратимо соединяются с SH-группами ферментов и вызывают денатурацию ферментного белка.

Диизопропилфторфосфат (ДФФ) – соединение из группы нервнопаралитических отравляющих веществ. Он является ингибитором ацетилхолинэстеразы, которая инактивирует нейромедиатор ацетилхолин. ДФФ связывается с остатком аминокислоты серина в активном центре и блокирует действие фермента (рисунок 10). В результате ацетилхолин накапливается в синаптической щели, нервные импульсы следуют один за другим, мышца не расслабляется, и наступает паралич или смерть.

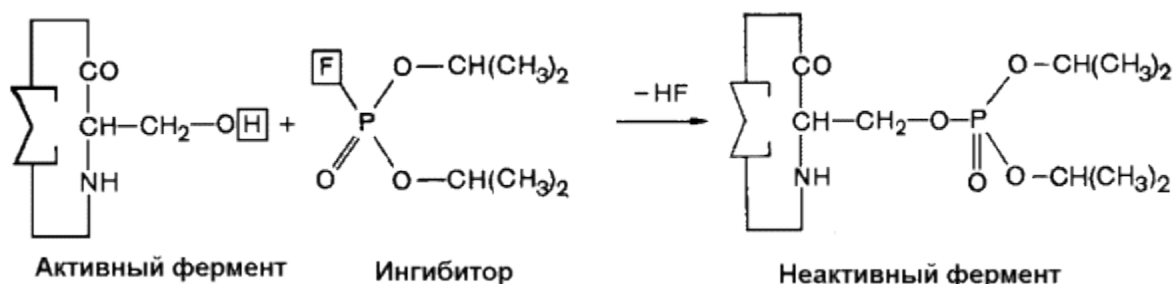


Рисунок 10. Необратимое ингибирование фермента ацетилхолинэстеразы диизопропилфторфосфатом.

Другим примером **необратимого ингибирования** может служить действие цианидов на фермент цитохромоксидазу, участвующую в окислительно-восстановительных процессах в митохондриях клеток. Отравление цианидами может привести к смерти.

Если ингибитор соединяется с ферментом при помощи нековалентных связей, то возможно восстановление исходной активности фермента после удаления ингибитора, например, путём диализа. Такое ингибирование называется **обратимым**.

Обратимое ингибирование можно разделить на **конкурентное и неконкурентное**.

Запомните **особенности, характерные для конкурентного ингибирования**:

- конкурентный ингибитор сходен по строению с субстратом.
- конкурентный ингибитор взаимодействует с активным центром фермента, образуя фермент-ингибиторный комплекс, и препятствует взаимодействию активного центра с субстратом.
- действие конкурентного ингибитора зависит от его концентрации: чем выше концентрация ингибитора, тем ниже скорость ферментативной реакции.
- действие конкурентного ингибитора можно снять, увеличив концентрацию субстрата.

График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии конкурентного ингибитора даёт такую же величину V_{max} , как и в отсутствии ингибитора. Величина КМ в данном случае будет увеличена, поскольку для обеспечения скорости, равной половине максимальной, в присутствии ингибитора потребуется больше субстрата. Отсюда следует, что конкурентный ингибитор препятствует образованию фермент-субстратного комплекса, но не влияет на процесс распада фермент-субстратного комплекса с образованием продуктов реакции (рисунок 11).

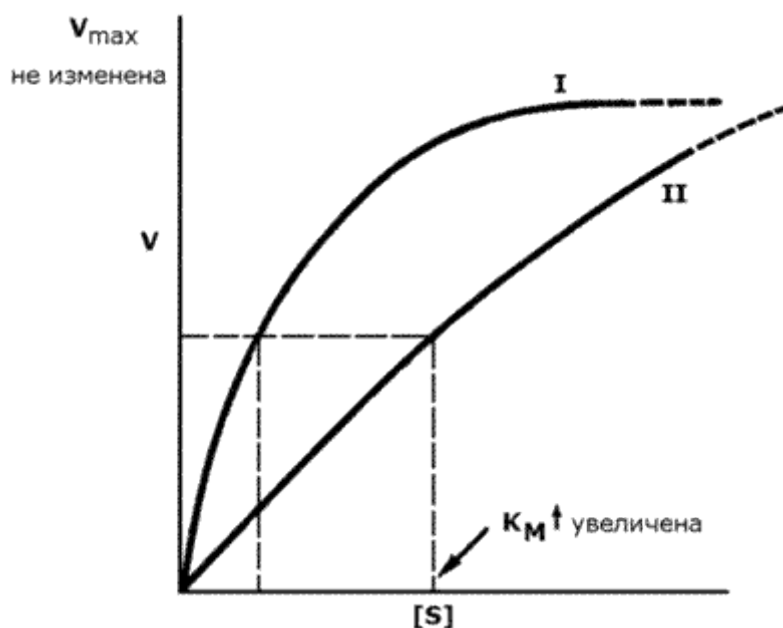


Рисунок 11. Влияние конкурентного ингибитора на кинетические свойства фермента.

Примером конкурентного ингибирования является ингибирование фермента сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой (рисунок 12). Сукцинатдегидрогеназа катализирует реакцию дегидрирования янтарной кислоты с образованием фумаровой кислоты. Малоновая кислота, как и янтарная кислота, содержит две карбоксильные группы, но обладает более короткой углеродной цепью. Поэтому дегидрирование малоновой кислоты невозможно. Если концентрация малоновой кислоты в среде будет превышать концентрацию янтарной, то активность сукцинатдегидрогеназы снижается. Ингибирующее действие малоновой кислоты исчезает при увеличении концентрации янтарной кислоты.

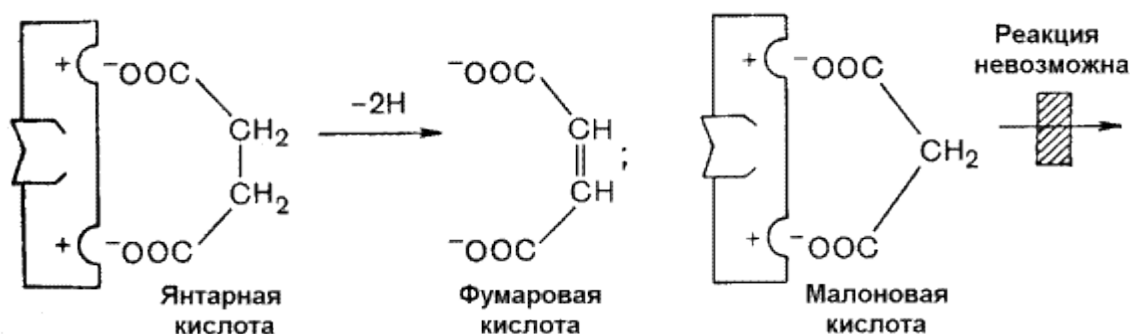


Рисунок 12. Конкурентное ингибирование сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой.

Запомните особенности, характерные для неконкурентного ингибирования:

- неконкурентный ингибитор не сходен по строению с субстратом.
- неконкурентный ингибитор может взаимодействовать, как правило, не с активным центром фермента, а с другими участками в молекуле фермента. Поэтому фермент-ингибиторный комплекс может присоединять субстрат. Наввиду изменения конформации активного центра сродство к субстрату будет понижено.
- действие неконкурентного ингибитора не зависит от его концентрации.
- действие неконкурентного ингибитора нельзя снять, увеличив концентрацию субстрата.

График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в присутствии неконкурентного ингибитора показывает сниженную величину V_{max} . Субстрат не может вытеснить ингибитор из его соединения с ферментом. Величина K_M в присутствии неконкурентного ингибитора не меняется. Это значит, что неконкурентный ингибитор воздействует на фермент на стадии распада фермент-субстратного комплекса, но не влияет на связывание субстрата (рисунок 13).

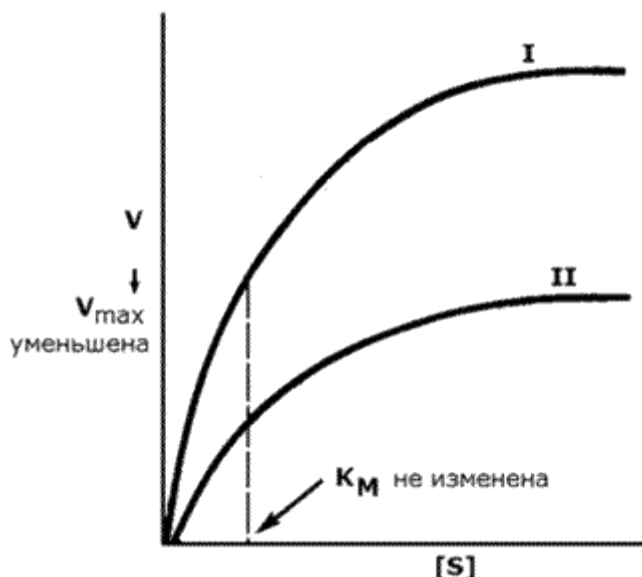


Рисунок 13. Влияние неконкурентного ингибитора на кинетические свойства фермента.

Неконкурентные ингибиторы снижают количество молекул субстрата, которые взаимодействуют с одной молекулой фермента в единицу времени (число оборотов фермента).

Ингибиторы ряда ферментов используются в медицине как химиотерапевтические препараты. Целью химиотерапии является уничтожение возбудителя болезни при помощи химических веществ, не повреждая при этом организма-хозяина.

Регуляция активности ферментов путём ковалентной модификации и по принципу отрицательной обратной связи.

В ряде случаев каталитическая активность ферментов может изменяться путём ковалентной

модификации - в результате разрыва или образования ковалентных связей в молекуле. Существует несколько вариантов ковалентной модификации, из которых наибольший интерес представляют частичный протеолиз и регуляция путём фосфорилирования — дефосфорилирования.

Частичный протеолиз. Многие белки синтезируются в форме неактивных предшественников, которые затем активируются в результате специфического расщепления одной или нескольких пептидных связей. Если каталитически активный белок называется ферментом (или энзимом), то неактивный предшественник фермента называется проферментом (или зимогеном).

Активация белков путем частичного протеолиза - процесс, широко распространенный в биологических системах. Вот несколько примеров.

- пищеварительные ферменты, гидролизующие белки, синтезируются в желудке и поджелудочной железе в виде проферментов: пепсин – в виде пепсиногена, трипсин – в виде трипсиногена и т.д.
- свертывание крови представляет собой каскад реакций протеолитической активации проферментов. Это обеспечивает быструю ответную реакцию на повреждение кровеносного сосуда.
- некоторые белковые гормоны синтезируются в виде неактивных предшественников. Например, инсулин образуется из проинсулина.
- фибриллярный белок соединительной ткани коллаген также образуется из предшественника — проколлагена.

Активацию неактивных предшественников ферментов путем частичного протеолиза можно рассмотреть на примере превращения трипсиногена в трипсин. Этот процесс происходит под действием фермента энтеропептидазы в просвете двенадцатиперстной кишки и сводится к отщеплению с N-конца полипептидной цепи 6 аминокислотных остатков и соответственно укорочению полипептидной цепи (рисунок 14). Такое же действие на трипсиноген оказывает и активный трипсин.

В результате изменения первичной структуры в молекуле профермента возникают новые нековалентные связи, изменяется конформация полипептидной цепи и формируется активный центр. В молекуле профермента активный центр отсутствует.

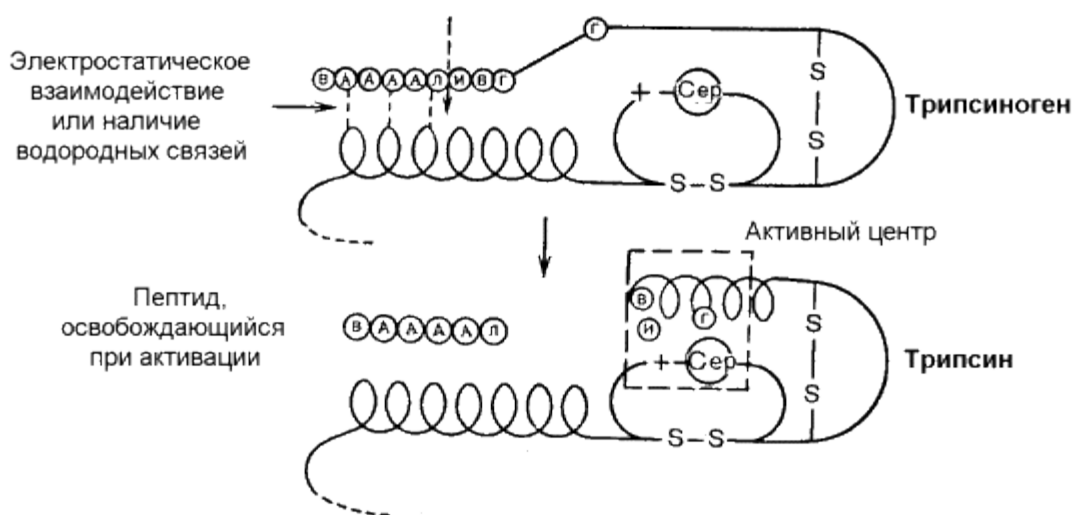


Рисунок 14. Схема механизма активации трипсиногена быка.

Физиологический смысл выработки пищеварительных ферментов в форме проферментов заключается в том, что в противном случае ферменты могли бы оказывать свой эффект на клеточные белки слизистой желудка и поджелудочной железы, вызывая разрушение этих клеток. Такое разрушение клеток может наблюдаться, например, при панкреатите, когда активация трипсина происходит непосредственно в поджелудочной железе.

Фосфорилирование – дефосфорилирование ферментов – присоединение или отщепление фосфатной группы. В отличие от частичного протеолиза, это обратимое изменение каталитической активности ферментов.

Такие ферменты могут существовать в двух формах – фосфорилированной и дефосфорилированной. В зависимости от конкретного случая, одна из этих форм будет обладать более высокой, а другая – более низкой каталитической активностью.

Фосфорилированию обычно подвергаются остатки серина, реже тирозина или треонина. Донором фосфатной группы является молекула АТФ. Фосфорилирование происходит избирательно и затрагивает лишь небольшое число аминокислотных остатков, не обязательно в активном центре фермента. Присоединение фосфата приводит к изменению конформации фермента и его активности. Фосфатные группы, связанные с остатками аминокислот, удаляются путём гидролиза с образованием неорганической фосфорной кислоты.

Фосфорилирование и дефосфорилирование катализируется протеинкиназами и протеинфосфатазами соответственно (рисунок 15). Активность протеинкиназ и протеинфосфатаз находится под гормональным контролем и регулируется также нервной системой.

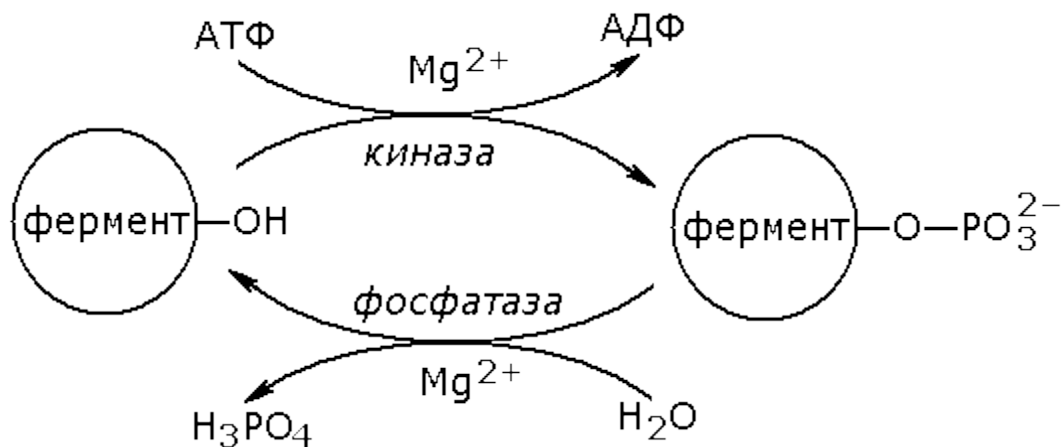


Рисунок 15. Ковалентная модификация, осуществляемая путем фосфорилирования — дефосфорилирования.

Примером фермента, активность которого регулируется путём обратимого фосфорилирования, является **гликогенфосфорилаза**, участвующая в распаде гликогена в клетках печени и мышц. Неактивная форма фермента (дефосфорилированная) превращается в активную форму (фосфорилированную) при помощи другого фермента – **киназы фосфорилазы**. Реакцию дефосфорилирования катализирует **фосфатаза фосфорилазы** которая инактивирует фосфорилазу.

Регуляция по принципу отрицательной обратной связи. В результате аллостерических механизмов и ковалентной модификации происходит изменение активности уже имеющихся в клетке молекул фермента. Существуют также механизмы, влияющие на скорость реакций обмена веществ путём изменения количества молекул ферментативного белка в клетке.

В настоящее время установлено, что синтез и распад ферментов, как и других белков, происходит в организме непрерывно. У взрослого здорового человека в условиях динамического равновесия процессы синтеза и распада имеют одинаковую скорость, благодаря чему общее содержание фермента не изменяется во времени. Для каждого фермента характерна своя скорость распада. В большинстве случаев полное прекращение синтеза фермента привело бы к исчезновению 50% молекул фермента за несколько дней, но некоторые ферменты обновляются значительно быстрее. Скорость синтеза фермента может варьировать от нуля до максимума, тогда как скорость распада представляется постоянной. Таким образом, любое вещество, влияющее на скорость синтеза фермента, способно оказать существенное воздействие на регуляцию обмена веществ путем изменения соотношения ферментов в организме. В основе многих гормональных воздействий на обмен веществ у человека лежат, как было установлено, именно такие контролирующие влияния на выработку каталитически активных белков.

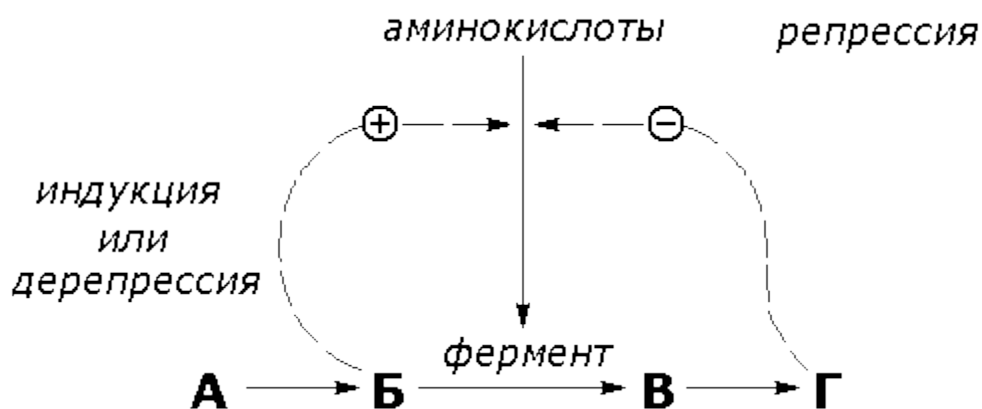


Рисунок 16. Регуляция синтеза фермента.

Конечный продукт (Г) цепи метаболических реакций снижает концентрацию фермента, катализирующего этап Б @ В путем репрессии его синтеза. Субстрат (Б) индуцирует синтез того фермента, который превращает его в В, препятствуя действию репрессора.

Вещество, которое избирательно препятствует синтезу определенного фермента, называется **репрессором**. При помощи механизма **репрессии** конечные продукты реакций обмена веществ могут регулировать процесс их собственного образования по принципу обратной связи. Было доказано, что в некоторых системах накопление метаболитов, образующихся в итоге цепи последовательных реакций, предотвращает синтез одного из ферментов, функционирующего в начале этой цепи (рисунок 16). Продукт реакции в таком случае действует как специфический репрессор синтеза этого фермента предотвращая как ненужное потребление субстратов, вовлекаемых в реакции данной метаболической цепи, так и бесполезный расход энергии и аминокислот,

необходимых для образования каталитически активного белка.

Примером того, как конечные продукты цепи химических реакций способны замедлять синтез ферментных белков, катализирующих начальные стадии процесса (то есть снижать количество молекул этих ферментов), может служить регуляция синтеза гемоглобина в клетках кроветворных органов. По мере накопления гема в этих клетках подавляется синтез фермента, катализирующего первую реакцию синтеза гема (рисунок 17). Тем самым предупреждается избыточное накопление гемоглобина в клетке.



Рисунок 17. Регуляция синтеза гема по механизму репрессии на уровне фермента, катализирующего начальную реакцию этого метаболического пути.

Явление, противоположное репрессии, известно под названиями **индукция** фермента или **дерепрессия**. В типичном случае субстрат определенного фермента способен индуцировать синтез этого фермента, что в свою очередь стимулирует потребление данного субстрата. Воздействуя на механизм синтеза фермента, индуктор, вероятно, прямо или косвенно противодействует репрессору. Соотношение между репрессором (конечным продуктом) и индуктором (субстратом) определяет, таким образом, количество ключевых ферментов и обеспечивает приспособление последовательности метаболических реакций к количеству метаболитов, поступающих в клетки организма с пищей.

Как и в случае регуляторных ферментов, лишь немногие ключевые ферменты способны реагировать подобным образом на изменение физиологических потребностей. Такие ферменты называют **индуцибельными** (или адаптивными); ферменты, содержание которых в таких условиях не изменяется, называют **конститутивными**; они составляют постоянное содержимое клетки.

У человека на адаптивные ферменты, вероятно, в большей мере влияют эндокринные факторы, нежели промежуточные продукты реакций обмена веществ. Так, гормоны коры надпочечников – **глюкокортикоиды** стимулируют синтез ферментов, участвующих в образовании сахара крови (глюкозы), тогда как гормон поджелудочной железы **инсулин** противодействует этому. Глюкокортикоиды прямо или косвенно играют роль индукторов ферментов, когда как инсулин усиливает процесс репрессии. От определяемой противоположными воздействиями индукции и репрессии уровня синтеза ферментов зависит физиологическая регуляция содержания глюкозы в крови этими противоборствующими эндокринными системами.

II. Цель деятельности студентов на занятии.

Студент должен знать:

1. Как регулируется интенсивность протекания химической реакции;
2. Виды регуляции (ингибирование и активирование);
 - а). Виды ингибирования: понятие об антиметаболитах;
 - б). Виды срочного (быстрого) активирования и хронической адаптации;
 - в). Аллостерическая регуляция - основной вид регуляции метаболических процессов и уровни регуляторной активности ферментов;
3. Использование ферментов в медицине.

Студент должен уметь:

1. Определять влияние активатора и не специфического ингибитора на активность амилазы слюны;
2. Интерпретировать полученные данные и делать соответствующие выводы.

III. Содержание обучения

Основные вопросы:

1. Регуляция активности ферментов: ингибирование и активирование.
2. Виды активирования по типу срочной и быстрой регуляции и хронической адаптации.

3. Виды ингибирования: необратимое и обратимое, конкурентное и неконкурентное. Понятие об антиметаболитах.
4. Регуляторные ферменты и их роль в биологических процессах.
5. Аллостерическая регуляция олигомерных ферментов. Аллостерические «эффекторы» или «модуляторы».
6. Влияние положительных и отрицательных эффекторов.
7. Регуляция в клетке концентрации ферментных молекул.
8. Уровни регуляции активности ферментов.
9. Ферменты и медицина - энзимопатология, энзимодиагностика, энзимотерапия и др.

10. Единицы измерения активности ферментов - удельная активность ферментов.

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

Лабораторные работы:

1. Влияние активатора и не специфического ингибитора на активность амилазы слюны.

V. Наименование лабораторной работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.

Влияние активатора и неспецифического ингибитора на активность амилазы

Принцип работы: Определяется активность амилазы слюны по Вольгельмуту при добавлении к реагирующей смеси определенных компонентов (хлористый натрий, сернокислая медь).

Порядок выполнения работы: В 10 пробирок наливают по 1мл воды, затем в 1 пробирку вносят 1мл разведенной в 10 раз слюны. Тщательно перемешивают и 1мл смеси вносят во 2 пробирку, раствор перемешивают и 1мл смеси вносят в 3 пробирку и т.д. Из 10 пробирки 1мл смеси вылить.

Таким образом, разведения будут:

Пробир.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Развед.	1/ 20	1/ 40	1/ 80	1/ 160	1/ 320	1/ 640	1/ 1280	1/ 2560	1/ 5120	1/ 10240

Во все пробирки добавить по 2мл крахмала. В пробирки первого ряда добавить по 1мл H_2O . В пробирки второго ряда - по 1мл NaCl. В пробирки третьего ряда - по 1мл $CuSO_4$.

Все пробирки помещают на 30 минут в водяную баню при 38° . Затем пробирки охлаждают и прибавляют по капле р-ра Люголя. Результаты оформить в виде схемы-рисунков.

VI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний.

1. Как регулируется скорость протекания биохимических процессов в клетке? Начальные уровни регуляции биохимических процессов.
2. Ингибирование активности ферментов. Понятие об ингибиторах. Ингибирование обратимое и необратимое.
3. Назовите виды обратимого ингибирования; охарактеризуйте каждый вид обратимого ингибирования.
4. Чем характеризуется необратимое ингибирование ферментов?
5. Конкурентное ингибирование. Антиметаболиты.
6. Что такое активаторы ферментов? Каков механизм их действия?
7. Какие вещества называются проферментами? Биологический смысл образования некоторых ферментов в неактивной форме.
8. Охарактеризуйте виды активирования: диссоциация и ассоциация ферментных молекул.
9. Какие ферменты называются регуляторными? Какую роль они играют в биохимических процессах?
10. Аллостерическая регуляция. Аллостерические эффекторы или модуляторы. Их характеристика.
11. Регуляция концентрации ферментативной молекулы (III уровень регуляции ферментативной активности).
12. Охарактеризуйте ферменты конститутивные, индуцибельные и репрессуемые.
13. Высший уровень регуляции ферментативной активности в организме.
14. Какими путями гормоны могут влиять на активность ферментов?
15. Что понимают под энзимопатологией? Типы энзимопатологий.
16. На чем основана энзимодиагностика? Характеристика индикаторных или органоспецифических ферментов.
17. Охарактеризуйте изменения ферментативной активности в сыворотке крови при патологических состояниях: рахит, поражение поджелудочной железы, некроз миокарда и др.
18. Энзимотерапия. Назовите типы препаратов, используемых для энзимотерапии.
19. В чем заключается сущность действия лекарственных веществ?

20. Ферменты как мишени действия лекарственных веществ.
21. Ферменты как химические реагенты.
22. Методы обнаружения ферментов в биологических средах.
23. В каких единицах выражается активность ферментов?

VII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний.

1. Регуляция активности биохимических процессов в клетке.
2. Как ингибируется активность ферментов? Обратимое и необратимое ингибирование.
3. Виды обратимого ингибирования. Охарактеризовать каждый из них.
4. Охарактеризуйте необратимое ингибирование ферментов.
5. Антиметаболиты и конкурентное ингибирование.
6. Механизм действия активаторов ферментов.
7. Что такое проферменты и биологический смысл их образования.
8. Охарактеризовать процесс диссоциации и ассоциации ферментативных молекул.
9. Характеристика аллостерической регуляции, аллостерических эффекторов или модуляторов.
10. Что такое индуцибельные, конститутивные и репрессируемые ферменты?
11. Пути влияния гормонов на активность ферментов.
12. Типы энзимопатологий.
13. Энзимодиагностика, органоспецифические или индикаторные ферменты, их характеристика.
14. Энзимотерапия, ферменты-мишени действия лекарственных веществ.
15. Единицы выражения активности ферментов, удельная активность ферментов.

VIII. Хронокарта учебного занятия.

- 1) Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
- 2) Перекличка – 2 мин.
- 3) Вступительная беседа – 6 мин.
- 4) Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
- 5) Опрос – 10 минут.
- 6) Проведение лабораторной работы – 30 мин.
- 7) Оформление протоколов – 10 мин.

IX. Самостоятельная работа студентов.

1. Классификация ферментов по биологическому значению. Значение органоспецифических ферментов в диагностике различных патологий (энзимодиагностика).
2. Энзимодиагностика патологии рака предстательной железы и первичного рака печени.
3. Энзимодиагностика патологии почек.
4. Врожденные и приобретенные энзимопатии.

X. Список используемой литературы

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г.Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год

10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 7.

Вопросы для подготовки к модулю №1 по разделу:

«КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ; СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ; ФЕРМЕНТЫ»

1. Что такое белки, какие основные функции они выполняют в животных организмах;
2. Аминокислоты, как структурная единица белка;
3. Классификация аминокислот и их характеристика;
4. Представители алифатических аминокислот и их характеристика;
5. Участие оксиаминокислот в образовании фосфопротеидов;
6. Гомоциклические аминокислоты
7. Гетероциклические аминокислоты;
8. Значение серосодержащих аминокислот в стабилизации третичной структуры белка
9. Моноаминодикарбоновые аминокислоты в образовании амидов (глутамина и аспарагина);
10. Рациональная классификация аминокислот, основанная на полярности радикалов;
11. Общие свойства аминокислот.
12. Первичная структура белка и связи ее фиксирующие;
13. Вторичная, третичная, четвертичная структура белка и связи ее фиксирующие;
14. Свободные пептиды в организме, представители, номенклатура;
15. Физико-химические свойства белка;
16. Сущность процесса денатурации и факторы ее вызывающие;
17. Методы выделения очистки и фракционирования белков;
18. Классификация простых белков;
19. Структура и функции альбуминов и глобулинов;
20. Структура и функции гистонов;
21. Краткая характеристика склеропротеинов;
22. Классификация сложных белков;
23. Нуклеопротеиды, характер простетических групп;
24. Первичный, вторичный, третичный уровень структуры нуклеиновых кислот;
25. Хромопротеиды, характер простетической группы, представители;
26. Фосфопротеиды, структура и роль в процессе формирования детского организма, представители
27. Гликопротеиды и липопротеиды
28. Качественные реакции на аминокислоты;
29. Качественные реакции на белки
30. Качественные реакции на компоненты простетических групп сложных белков
31. Количественное определение белка в сыворотке крови.
32. Ферменты – биологические катализаторы. Строение, свойства ферментов.
33. Специфичность ферментов. Виды специфичности.
34. Ферментативный катализ, основные его положения. Кинетика ферментативных реакций.
35. Структура ферментов: коферменты, кофакторы, их роль в ферментативных реакциях. Структура НАД, ФАД.
36. Основные принципы классификации и номенклатуры ферментов:
 - a. оксидоредуктазы, подклассы, представители;
 - b. трансферазы, подклассы, представители;
 - c. гидролазы, подклассы, представители;
 - d. лиазы, подклассы;
 - e. изомеразы подклассы;
 - f. лигазы подклассы.
37. Основные принципы количественного определения активности ферментов.
38. Единицы измерения ферментативной активности. Удельная активность ферментов.
39. Возможности и перспективы применения ферментов при лабораторной диагностике заболеваний (энзимодиагностика).
40. Возможные механизмы ферментативного катализа (на примере химотрипсина).
41. Понятие об активном и аллостерическом центрах.
42. Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций. Характер их влияния.
43. Связь между конформацией ферментов и их каталитической активностью.
44. Активаторы. Основные виды регуляции активности ферментов.

45. Ингибиторы. Основные виды ингибирования ферментов (специфическая и неспецифическая, конкурентное и неконкурентное).
46. Аллостерические ферменты, особенности их строения, роль в регуляции их каталитической реакции.
47. Изоферменты, их роль в ферментативной активности. Изоферментные спектры в различных тканях. Их роль в диагностике заболеваний.
48. Основные направления использования ферментов в медицине.
49. Энзимотерапия, ее возможности и перспективы.

РАЗДЕЛ II: «БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ. ВИТАМИНЫ. ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ. БИОЭНЕРГЕТИКА. МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ»

ЗАНЯТИЕ № 8

Тема: БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ: СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ. ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС ВЕЩЕСТВ. МЕХАНИЗМ ПОСТУПЛЕНИЯ СИГНАЛА В КЛЕТКУ

I. Научно-методическое обоснование темы:

Все живые клетки отделены от окружающей среды поверхностью, называемой клеточной мембраной. Кроме того, для эукариотов характерно образование внутри клеток компартментов. Они представлены рядом субклеточных органелл, ограниченных мембранами, например ядро и митохондрии. Мембраны представляют собой не только статически организованные поверхности раздела, но и включают активные биохимические системы, отвечающие за такие процессы, как избирательный транспорт веществ внутрь и наружу клетки, связывание гормонов и других регуляторных молекул, протекание ферментативных реакций, передача импульсов нервной системы и т.д. Существуют различные типы мембран, отличающиеся по выполняемым функциям. Функции мембран обусловлены их строением.

Биологические мембраны (БМ) (от лат. *Membrana* – перепонка) – это высокоорганизованные структуры, толщиной в несколько молекулярных слоев, редко превышающую 10 нм.

Мембраны милазывают внутреннее пространство клетки или ее отсеков от внешней среды.

Мембраны обладают избирательной проницаемостью, содержат специфические транспортные системы. Мембраны состоят из 2-х слоев: внутреннего и наружного. Каждый слой имеет наружную сторону (обращена к поверхности) и внутреннюю сторону (обращена в цитозоль или внутрь клеточной органеллы). Внутренний слой ограничивает органеллы и формирует обособленные клеточные отсеки – компартменты клеток, что обеспечивает функциональную специализацию клеток (в одно и то же время, в клетке могут протекать взаимоисключающие биохимические реакции). Мембраны играют центральную роль в системе межклеточных взаимодействий. В них располагаются рецепторы, воспринимающие химические, физические и др. внешние сигналы. Некоторые мембраны сами способны генерировать сигнал (химический или электрический). Мембраны участвуют в процессах превращения энергии (фотосинтез, окислительное фосфорилирование).

Общие свойства БМ.

1. Мембраны – нековалентные надмолекулярные структуры; нековалентные взаимодействия носят кооперативный характер.
2. Белки и липиды удерживаются в толще БМ вместе множеством нековалентных взаимодействий.
3. Плоские структуры, толщиной в 2-3 молекулы, образующие сплошную перегородку, состоящую из липидов и белков, в соотношении от 1:4 до 4:1, а также углеводов, связанных с липидами и белками.
4. Компоненты мембран (белки, липиды, углеводы) плотно упакованы в них, за счёт чего обеспечивается большая общая плотность.
5. Белки мембран выполняют роль насосов, клапанов, рецепторов, ферментов и преобразователей милазы. Они встроены в липидный бислой.
6. БМ – ассиметричны в структурном и функциональном плане; углеводы всегда локализуются на поверхности и их нет на внутренней стороне мембран.
7. БМ – динамичные структуры, т.к. входящие в их состав белки и липиды могут двигаться в плоскости мембраны (латеральная диффузия), или переходить с одной стороны мембраны на другую (поперечная диффузия). Переход белков и липидов с одной стороны мембраны на другую происходит крайне медленно.

Функции клеточных мембран.

1. **Ограничение и обособление** клетки и органелл. Обособление клеток от межклеточной среды обеспечивается плазматической мембраной, защищающей клетку от механического и химического воздействий. Плазматическая мембрана обеспечивает также сохранение разности концентраций метаболитов и неорганических ионов между внешней и внутренней средой.
2. **Контролируемый транспорт** метаболитов и ионов определяет внутреннюю среду, что существенно для гомеостаза, т.е. поддержания постоянной концентрации метаболитов и неорганических ионов, и других физиологических параметров. Регулируемый

и избирательный транспорт метаболитов и неорганических ионов через поры и посредством переносчиков становится возможным благодаря обособлению клеток и органелл с помощью мембранных систем.

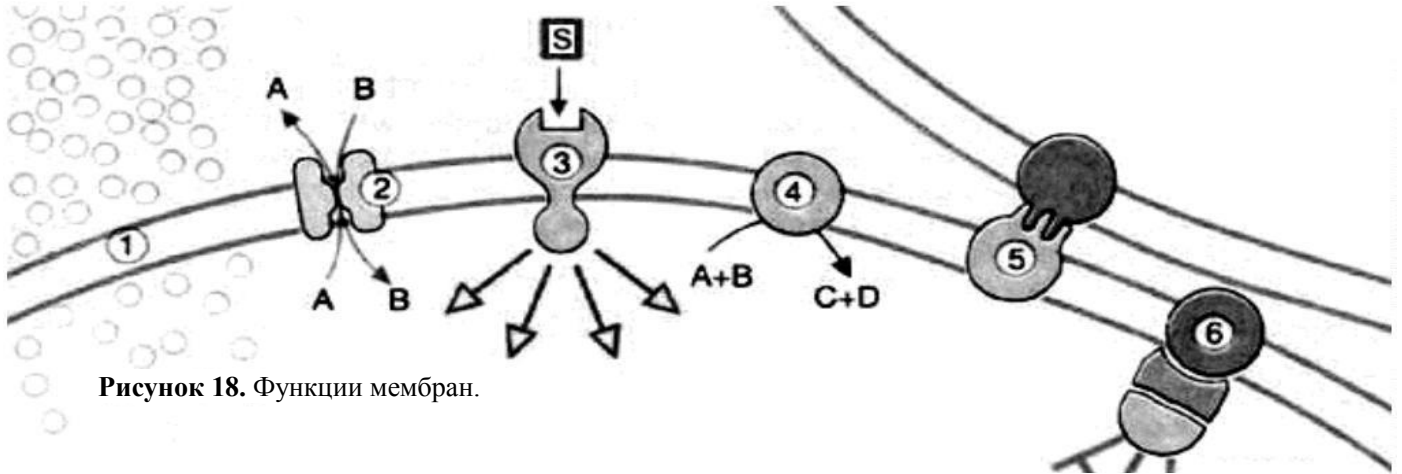


Рисунок 18. Функции мембран.

3. **Восприятие внеклеточных сигналов** и их передача внутрь клетки, а также инициация сигналов.

4. **Ферментативный катализ.** В мембранах на границе между липидной и водной фазами локализованы ферменты. Именно здесь происходят реакции с неполярными субстратами.

Примерами служит биосинтез липидов и метаболизм неполярных ксенобиотиков. В мембранах локализованы наиболее важные реакции энергетического обмена, такие, как окислительное фосфорилирование (дыхательная цепь) и фотосинтез.

5. Контактное взаимодействие с межклеточным матриксом и **взаимодействие с другими клетками** при слиянии клеток и образовании тканей.

6. **Заякоривание цитоскелета**, обеспечивающее поддержание формы клеток органелл и клеточной подвижности.

Структура биологических мембран.

В 1925 г. Гorter и Грендел предположили, что липиды в мембране эритроцитов образуют **бимолекулярный слой (липидный бислой)**.

а)

б)

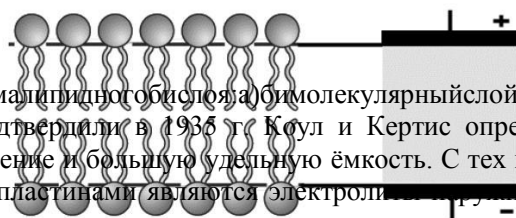


Рисунок 19. а) Схематическое изображение бимолекулярного слоя липидов; б) мембрана как конденсатор

Эту гипотезу подтвердили в 1935 г. Коул и Кертис, определив электрические параметры БМ: высокое электрическое сопротивление и большую удельную ёмкость. С тех пор БМ стали рассматривать как электрический конденсатор, в котором пластинами являются электролиты внешнего и внутреннего растворов (внеклеточного и цитоплазмы) с погруженными в них головками липидных молекул. Проводники разделены диэлектрическим слоем, образованным неполярной частью липидных молекул – двойным слоем их хвостов.

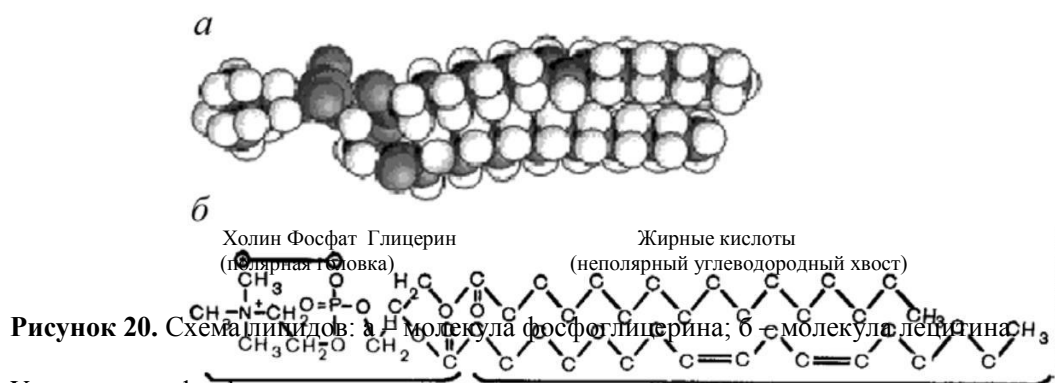
Липиды представлены фосфолипидами и холестерином, имеющими гидрофобные и гидрофильные группы. В мембранах находят гликолипиды. В водных растворителях фосфолипиды самоорганизуются в мицеллы, затем в плоский бислой и везикулы, которые называются **липосомами** (состоят из фосфолипидного бислоя). Везикулы с включением белков называются **протеолипосомами**.

Функции липидной части мембраны. Липиды, входящие в состав мембран, служат растворителем для интегральных белков и барьером проницаемости для полярных молекул. Гидрофобные жирорастворимые вещества легко проникают через липидный бислой. Малые молекулы газов (кислород, двуокись углерода, азот) легко диффундируют через гидрофобную область мембраны. Липиды мембраны обеспечивают ее жидкость, текучесть. Жёсткость определяется степенью насыщенности жирных кислот в фосфолипидах и наличием холестерина. Текучесть мембраны тем ниже, чем выше насыщенность жирных кислот и чем больше содержание

холестерина. От нее зависят такие функции мембраны, как транспорт веществ через мембрану, взаимодействие рецепторов с лигандами. Основой старения и атеросклероза является понижение жидкости мембраны.

В мембранах содержатся разные фосфолипиды, например, в мембранах эритроцитов их около 20 видов. Варьирует, также, химическая формула полярной головки молекулы.

Молекулы фосфолипидов, входящие в состав биологических мембран, обладают свойствами амфифильности, которое заключается в том, что часть молекулы полярна (гидрофильна), а другая – неполярна (гидрофобна). Это обусловлено химической формулой фосфолипидов, молекулы которых состоят из глицерина, жирных кислот, фосфорной кислоты и полярного соединения, характерного для каждого класса фосфолипидов (холин, этаноламин, серин и др.). По своей форме молекулы фосфолипидов напоминают сплюснутый цилиндр, у которого около $\frac{1}{4}$ части (по длине) гидрофильна, а $\frac{3}{4}$ – гидрофобна.



У некоторых фосфолипидов головки кроме двух зарядов противоположного знака, создающих дипольный момент, но оставляющих молекулу в целом нейтральной, несут один некомпенсированный отрицательный заряд, вследствие чего молекула оказывается заряженной отрицательно. Углеводородные хвосты фосфолипидов содержат приблизительно 20 атомов углерода, в хвосте может быть 1-4 двойных ненасыщенных связей.

Полярные головки фосфолипидов – гидрофильны и обращены к водной фазе, а их неполярные хвосты – гидрофобны и расположены подальше от воды.

Существенным является тот факт, что молекулы фосфолипидов имеют **два хвоста**. Такая молекула в пространстве имеет форму цилиндра. Из молекул фосфолипидов в водной среде происходит **самосборка** бислойной мембраны.

Липидные бислои, если они имеют достаточно большую протяженность, стремятся замкнуться сами на себя, чтобы спрятать гидрофобные участки фосфолипидных молекул от воды. В результате образуются фосфолипидные везикулы – липосомы.

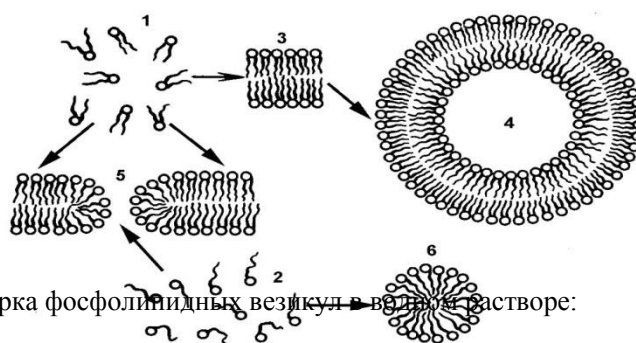


Рисунок 21. Самосборка фосфолипидных везикул в водном растворе:

1 – молекулы фосфолипидов; 2 – их лизоформы; 3 – бислойная мембрана; 4 – липосома; 5 – пора в бислойной мембране; 6 – мицелла.

Окисление одной из жирнокислотных цепей фосфолипидов при свободнорадикальном процессе

перекисного окисления или отщепление её под действием фермента **фосфолипазы** приводит к образованию молекулы, у которой размер головки в плоскости мембраны превышает размеры гидрофобной части: молекула по форме ближе не к цилиндру, а к конусу. Присутствие таких дефектных молекул – с одним хвостом, по форме напоминающих конус, разрушает клеточные мембраны.

Фосфолипидные молекулы, лишённые одного из хвостов, образуют **порыв бислоевой мембраны**, следовательно, нарушается барьерная функция мембран (рис.21 – 5), и такие молекулы, собираясь вместе, образуют не бислой, а сферические мицеллы (рис.21 – 6).

Функции белковой части мембраны. Белки мембран встроены в липидный бислой. Различают:

1. внешние (периферические) белки – непрочные связанные с поверхностью мембраны;
2. внутренние (интегральные) белки – погруженные внутрь мембраны гидрофобными радикалами аминокислот;
3. прошивающие белки – пронизывают мембрану насквозь.

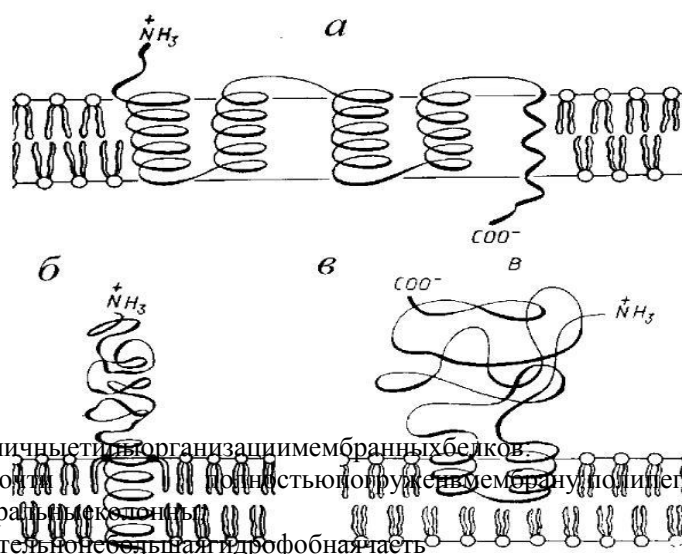


Рисунок 22. Различия в организации мембранных белков.

а – белок погружен в мембрану, спиралью пересекая её несколько раз, образуя α -спираль; *б* – сравнительно небольшая гидрофобная часть белка погружена в мембрану, пересекая всю её толщину; для стабилизации связи с мембраной иногда наблюдается ковалентное присоединение жирных кислот к белку (показаны черными точками); *в* – гидрофобный "якорь" белка проникает только на расстояние фосфолипидного монослоя

Периферические и частично интегральные белки связаны с углеводами и являются рецепторами. Число белков варьирует от 6-8 – в мембранах СПР (саркоплазматического ретикула) до 100 – в плазматической мембране.

Молекулярная организация мембран. 1. Сингер и Никольсон (1972) предложили *жидкостно-мозаичную модель* строения мембраны: мембрана представляет собой липидный бислой, в котором расположены глобулярные белки. Каждая молекула липидов расположена так, что ее неполярная углеводородная часть направлена внутрь бислоя, а полярные головки находятся на поверхности, контактируя с водой. По этой модели мембрана представляет собой динамическую систему, в которой молекулы белка относительно свободно «плавают» в липидном море в виде айсбергов». Прямые измерения показали, что белки движутся в сотни раз медленнее из-за переплетения углеводных цепей на поверхности мембраны (гликокаликс). Кроме того, компоненты мембраны с внутренней стороны связаны с системой белков цитоскелета.

2. Согласно решетчато-мозаичной модели мембрана представляет собой липидный бислой, включающий молекулы белков, заключенные в ажурный каркас. Молекулы белков, которые связаны с цитоскелетом, малоподвижны. Остальные могут относительно свободно перемещаться в плоскости мембраны. Например, в мембране эритроцитов присутствует интегральный анионпереносящий белок, который связан с белками цитоскелета – спектрином и анкирином. При гемолизе эти связи нарушаются.

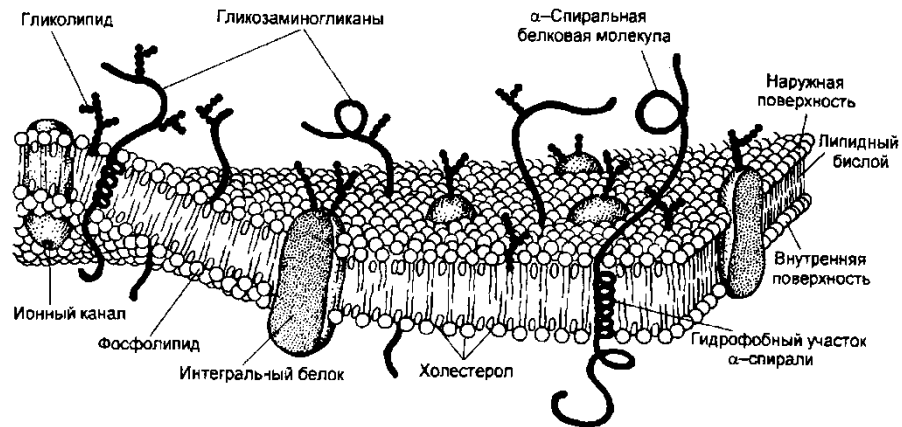


Рисунок 23. Схема строения клеточной мембраны.

ансmemбранный перенос.

В живой клетке через цитоплазматическую мембрану постоянно осуществляется транспорт веществ, потребляемых в процессе синтеза основных компонентов клетки, что создает градиент концентрации этих веществ между внешней и внутренней средой.

Особые белки-переносчики, встроенные в плазматическую мембрану, которые ещё называют **каналоформерами**, способны избирательно увеличивать проницаемость мембраны и переносить вещества, необходимые организму.

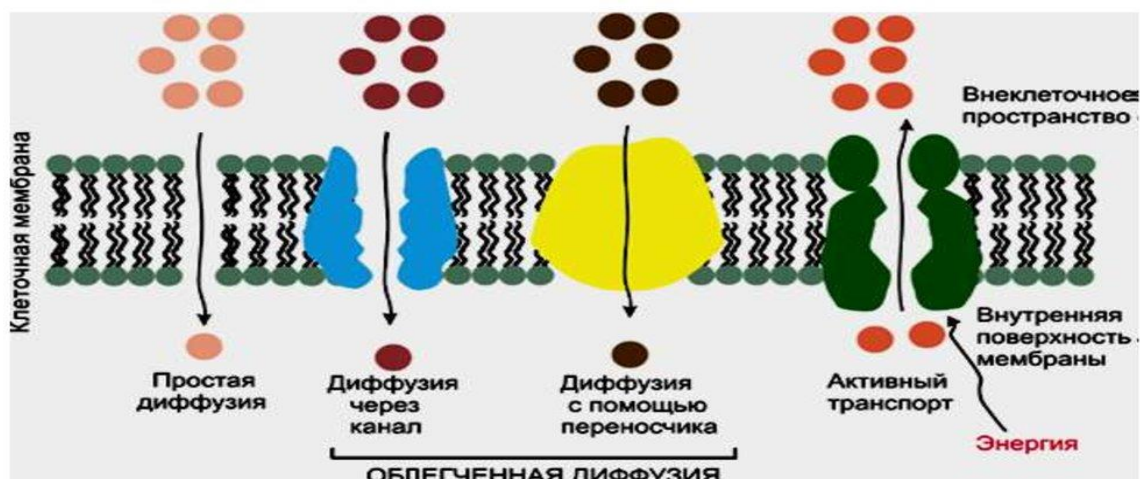
Различают 4 способа переноса веществ через мембрану.

Простая диффузия – это перенос небольших нейтральных молекул по градиенту концентрации без затрат энергии и переносчиков (легко переходят через мембрану вещества, хорошо растворимые в липидах).

Облегченная диффузия - перенос веществ по градиенту концентрации без затрат энергии, но с переносчиком. Характерна для водорастворимых соединений. По принципу действия мембранные переносчики делятся на два типа:

- переносчики I типа – это, молекулы которые переносят вещества с одной стороны мембраны на другую, а затем возвращаются назад;
- переносчики II типа – это белки, встроенные в мембрану и изменяющие свою конфигурацию по принципу «пинг-понг»: в состоянии «понг» белок открыт на стороне высокой концентрации переносимого вещества и связывает это вещество. Затем происходит изменение конформации белка-переносчика («пинг») и белок, со связанным веществом, проникает внутрь, т.е. канал открывается на стороне низкой концентрации данного вещества. Процесс обратим. Суммарный поток определяется концентрационным градиентом. Этот тип переносчиков преобладает. Облегченная диффузия отличается от простой большей скоростью переноса и способностью к насыщению. Некоторые вещества способны создавать искусственные каналы в мембранах, через которые могут проходить макромолекулы (антибиотик грамицидин, дифтерийный токсин и т.д.).

Виды переноса веществ через мембрану



3. *Активный транспорт* – транспорт веществ против градиента концентрации (незаряженные

частицы) или электрохимического градиента (для заряженных частиц), требующий затрат энергии. Обязательно присутствие молекул АТФ. При нарушении снабжения АТФ активный транспорт останавливается. Выделяют два вида активного транспорта:

- Первичный активный транспорт – использует энергию АТФ или энергию окислительно-восстановительного потенциала (например, Na^+/K^+ -АТФ-аза)
- Вторичный активный транспорт – когда используется градиент ионов (H^+ , Na^+ , K^+ и т.д.), созданный на мембране, за счёт работы системы первичного активного транспорта.

Строение Na^+/K^+ -АТФ-аза.

Натрий - калиевый насос - это особый белок, пронизывающий всю толщу мембраны, который постоянно накачивает ионы калия внутрь клетки, одновременно выкачивая из нее ионы натрия; при этом перемещение обоих ионов происходит против градиентов их концентраций. Выполнение этих функций возможно благодаря двум важнейшим свойствам этого белка. Во-первых, форма молекулы переносчика может меняться. Эти изменения происходят в результате присоединения к молекуле переносчика фосфатной группы за счет энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ (т. е. разложения АТФ до АДФ и остатка фосфорной кислоты). Во-вторых, сам этот белок действует как АТФ-аза (т. е. фермент, гидролизующий АТФ). Поскольку этот белок осуществляет транспорт натрия и калия и, кроме того, обладает АТФ-азной активностью, он так и называется - «натрий-калиевая АТФ-аза».

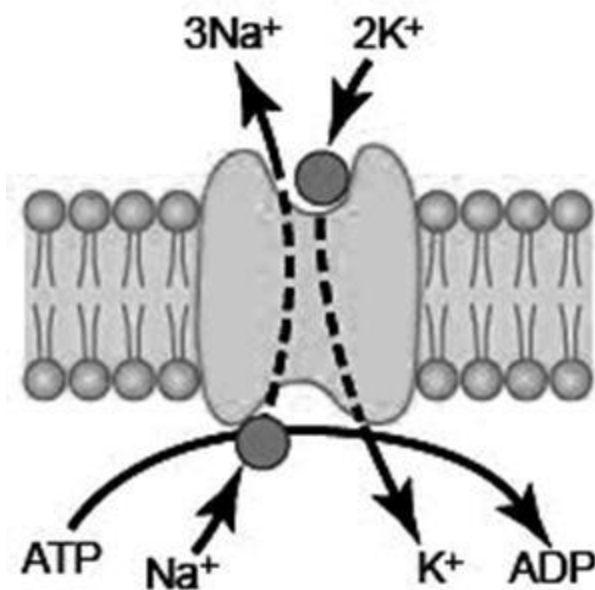


Рисунок 24. Схема строения натрий-калиевой АТФ-азы

Упрощенно действие натрий-калиевого насоса можно представить следующим образом.

1. С внутренней стороны мембраны к молекуле белка-переносчика поступают АТФ и ионы натрия, а с наружной — ионы калия.
 2. Молекула переносчика осуществляет гидролиз одной молекулы АТФ.
 3. При участии трех ионов натрия за счет энергии АТФ к переносчику присоединяется остаток фосфорной кислоты (фосфорилирование переносчика); сами эти три иона натрия также присоединяются к переносчику.
 4. В результате присоединения остатка фосфорной кислоты происходит такое изменение формы молекулы переносчика (конформация), что ионы натрия оказываются по другую сторону мембраны, уже вне клетки.
 5. Три иона натрия выделяются во внешнюю среду, а вместо них с фосфорилированным переносчиком соединяются два иона калия.
 6. Присоединение двух ионов калия вызывает дефосфорилирование переносчика — отдачу им остатка фосфорной кислоты.
 7. Дефосфорилирование, в свою очередь, вызывает такую конформацию переносчика, что ионы калия оказываются по другую сторону мембраны, внутри клетки.
 8. Ионы калия высвобождаются внутри клетки, и весь процесс повторяется.
- Значение натрий-калиевого насоса для жизни каждой клетки и организма в целом определяется

мембраны других веществ (сахаров, аминокислот). Большие количества калия требуются также для белкового синтеза, гликолиза, фотосинтеза и других процессов. Примерно треть всей АТФ, расходуемой животной клеткой в состоянии покоя, затрачивается именно на поддержание работы натрий-калиевого насоса. Если каким-либо внешним воздействием подавить дыхание клетки, т. е. прекратить поступление кислорода и выработку АТФ, то ионный состав

внутреннего содержимого клетки начнет постепенно меняться. В конце концов, он придет в равновесие с ионным составом среды, окружающей клетку; в этом случае наступает смерть.

Биологическая роль

Натрий - основной ион внеклеточной жидкости, в ней содержится 96 % от общего количества натрия в организме (90-100 г). Нормальная концентрация Na^+ в плазме крови - 135-145 ммоль/л; она поддерживается с высокой точностью, поскольку определяет осмолярность плазмы и водный обмен. Уровень Na^+ в крови регулируется гормонами: АДГ и НУФ способствуют его снижению, альдостерон - увеличению. Обычное потребление человеком NaCl составляет 8-15 г/сут, хотя реальная потребность организма в натрии несколько меньше. Избыток Na^+ выводится через почки и потовые железы; потеря натрия через кишечник может наблюдаться при диареях.

Важнейшие биологические функции натрия:

1. Главная роль в поддержании осмолярности плазмы крови и внеклеточной жидкости в целом.
2. Участие (совместно с калием) в возникновении электрохимического потенциала на плазматических мембранах клеток, обеспечение их возбудимости и мембранного транспорта.
3. Стабилизация молекул белков и ферментов, обеспечение протекания ряда ферментативных реакций.

Калий - основной внутриклеточный катион; во внеклеточном пространстве его в 20-40 раз меньше. Значительное количество калия находится в мышечной ткани; содержание K^+ в плазме крови - 3,5-5,0 ммоль/л.

Калием богаты мясо, фрукты и овощи; суточная потребность в нем - 2-4 г.

Снижению уровня K^+ в плазме способствуют гормоны: инсулин вызывает его переход в клетки вместе с глюкозой, альдостерон усиливает выведение калия через почки. Концентрация K^+ в крови может повыситься при гибели клеток, "утечке" иона через поврежденные биомембраны или вследствие нарушения работы натрий-калиевого насоса (клеточный энергодефицит).

Основные биологические функции калия:

1. Обеспечение биоэлектрической активности клеток (формирование потенциала покоя, обеспечение нервно-мышечной возбудимости и проводимости).
2. Поддержание осмолярности внутриклеточного содержимого.
3. Участие в ряде ферментативных реакций, в том числе в синтезе белка.

II. Цель деятельности студентов на занятии.

Студент должен знать:

1. Строение и свойства клеточных мембран
2. Трансмембранный перенос веществ
3. Механизм поступления сигнала в клетку

Студент должен уметь:

1. Интерпретировать роль мембран в регуляции метаболизма, транспорте веществ в клетку и удалении метаболитов.
2. Объяснять молекулярные механизмы действия гормонов и других сигнальных молекул на органы-мишени.

III. Содержание обучения

Основные вопросы:

1. Функции клеточных мембран
2. Общие свойства мембран
3. Функции липидной части мембран
4. Функции белковой части мембран
5. Молекулярную организацию мембран
6. Трансмембранная передача сигнала

Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.

ные работы:

V. Наименование лабораторной работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.

VI.Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний.

1. Строение биологических мембран и их роль в обмене веществ и энергии.
2. Основные способы переноса веществ через мембраны.
3. Что такое эндоцитоз и экзоцитоз?

VII.Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний.

1. Характеристика сигнальных молекул как первичных мессенджеров
2. Виды мембранных рецепторов
3. Роль вторичных мессенджеров
4. Механизм действия аденилатциклазной системы.
5. Участие аденилатциклазной системы в регуляции экспрессии генов.
6. Механизм действия гуанилатциклазной системы.
7. Механизм действия инозитолфосфатной системы.
8. Понятие о каталитических рецепторах.
9. Передача сигнала при помощи ростковых факторов.
10. Передача сигнала с помощью внутриклеточных рецепторов.

VIII.Хронокарта учебного занятия.

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключка – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы –30 минут.
5. Опрос –10 минут.
6. Проведение лабораторной работы –30 мин.
7. Оформление протоколов –10 мин.

IX.Самостоятельная работа студентов.

1. Строение и этапы функционирования аденилатциклазной и гуанилатциклазной системы.

X.Список используемой литературы

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г.Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР – медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А.Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 9.

Тема: ВИТАМИНЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ. МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ ВИТАМИНОВ. ВИТАМИНЫ КАК КОФЕРМЕНТЫ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА.

I. Научно-методическое обоснование темы:

Витамины - это органические низкомолекулярные биологически активные вещества, не синтезирующиеся в клетках организма человека (за исключением нескольких), поступающие из внешней среды и принимающие участие в биологическом катализе, процессах роста и воспроизведения.

Источниками витаминов являются пищевые продукты, а также синтез их микрофлорой кишечника.

В организме человека могут синтезироваться: витамин РР в печени из триптофана и витамин Д₃ (в печени и коже) из холестерина, в печени из каротиноидов возникает ретинол, а также в небольшом количестве (приблизительно 20%) образуется холин (в составе лецитинов), микрофлорой кишечника - В_р, В₂, В₆, В₁₂, РР, фолиевая кислота, пантотеновая кислота, К, биотин. В организм человека витамины могут поступать в виде предшественников - провитаминов, примерами служат для ретинола - каротиноиды, для витамина Д₃ - 7-дегидрохолестерин, для витамина Д₂ - эргостерин.

Суточная потребность витаминов ничтожно мала, измеряется миллиграммами и даже микрограммами. Так, взрослым в сутки необходимо 50-100 мг витамина С, 1- 2,5 мг фолиевой кислоты, 150-250 мкг биотина, 2-5 мкг кобаламина. Потребность человека в витаминах зависит от возраста, качества питания, состояния организма, условий жизни и деятельности.

В номенклатуре витаминов используется обозначение их буквами латинского алфавита, применяются также наименования, отражающие их клиническое действие, иногда в названии отражают химическое строение и распространенность витамина. Например, В_р- кобаламин - антианемический витамин, В₁- тиамин антиневритный, РР (В₅) - никотиновая кислота (ниацин) - антипеллагрический витамин.

Витамины делятся на водорастворимые и жирорастворимые. К *водорастворимым* относятся В_р, В₂, В₆, В_р, В₁₅, РР, С, биотин, пантотеновая кислота, фолиевая кислота, липоевая кислота. К витаминоподобным веществам относят холин, инозит, липоевую кислоту и др., к *жирорастворимым* - А, Д, Е, К, F. В организме человека имеются витаминоподобные вещества: холин, инозит, липоевая кислота, витамин В₁₅, витамин U, карнитин, убихинон, оротовая кислота.

Витамины выполняют важные функции в организме человека. Так, роль водорастворимых витаминов заключается в том, что они принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях, выполняют роль коферментов, соединяющихся со специальными белками с образованием биологических катализаторов - ферментов, в трансферазных реакциях, входят в состав мультиферментных комплексов, являются переносчиками цепи транспорта электронов.

Так, витамин В₁ (тиамин, антиневритный, аневрин, анейрин) в составе тиаминдифосфата (ТДФ, ТПФ) участвует в окислительном декарбоксилировании α-кетокислот (пировиноградной кислоты (ПВК), α-кетоглутаровой кислоты), а так же в транскетотазной реакции, в неокислительном декарбоксилировании пирувата.

Витамин В₂ (рибофлавин) является предшественником коферментов ФМН (флавиномононуклеотид), ФАД (флавинаденин-динуклеотид). В составе коферментов ФМН и ФАД участвует в окислительно-восстановительных реакциях (перенос Н⁺). Соответствующие ферменты - дегидрогеназы, оксидазы имеют общее название флавиновые ферменты.

Разновидностями витамина В₆ являются пиридоксин (пиридоксол), пиридоксаль, пиридоксамин. Витамин В₆ (пиридоксин, антидерматитный) предшественник кофермента пиридоксаль-фосфат (ПФ). Принимает участие в реакциях трансаминирования аминокислот, декарбоксилирования аминокислот, взаимопревращении D и L-форм аминокислот.

Разновидностями витамина РР являются никотиновая кислота и никотинамид (антипеллагрический витамин). Из витамина РР возникают никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). В составе НАД и НАДФ витамин РР участвует в окислительно-восстановительных реакциях. Соответствующие ферменты - дегидрогеназы, редуктазы. Ниацин переносит водород с субстрата на акцептор при участии НАД и НАДФ.

Витамин С (аскорбиновая кислота, антискорбутный витамин) может находиться в организме человека в восстановленной и окисленной (дегидроаскорбиновая кислота) формах. Принимает активное участие в окислительно-восстановительных реакциях. Как кофактор, совместно с железом, участвует в гидроксильровании лизина и пролина, необходимых для созревания коллагена.

Недостаточность или избыток витаминов приводит к тяжелым нарушениям обмена веществ. Существует понятие: *типовитаминозы* - недостаточная обеспеченность организма витаминами, *авитаминоз* - состояние, возникающее при полном прекращении поступления витаминов в организм, *гипервитаминоз* - состояние, возникающее при чрезмерно большом поступлении витаминов, *полиавитаминозом* называется состояние, развивающееся вследствие прекращения поступления в организм нескольких витаминов одновременно. Недостаточность витаминной функции в организме может возникать вследствие недостаточности поступления витамина с пищевыми продуктами, изменения нормальной микрофлоры кишечника (заболевания желудочно-кишечного тракта, подавление нормальной микрофлоры лекарственными препаратами, нарушения всасывания, например, жирорастворимые витамины при патологии печени, нарушение транспортировки витаминов кровью, нарушение превращения витаминов в активную форму (коферменты), нарушение взаимодействия кофермента с белком, нарушение синтеза белковой части фермента, а также вследствие воздействия авитаминов.

Из организма с мочой постоянно выделяются продукты метаболизма (деградации) ферментов и витаминов, в некотором количестве и свободном состоянии.

Гипо-, гипер-, авитаминозы могут привести к необратимым последствиям обмена веществ, поэтому знание биологической роли витаминов необходимо для врачей всех специальностей.

Жирорастворимые витамины - это витамины, растворимые в жирах или органических растворителях. Они

играют важную роль в организме человека. Поступают извне с пищей, но могут и синтезироваться в организме из предшественников. Основными представителями являются : витамин А (ретинол), витамин Д (холекальциферол), витамин Е (токоферол), витамин К (нафтахинон), витамин F.

Витамин А (ретинол, ретиналь, ретиноевая кислота, анти- ксерофтальмический). Большое количество витамина А содержат сливочное масло, молоко, яичный желток, печень трески. Поступает он в организм в виде провитаминов а, р, у - каротинов. Витамин А участвует в темновом зрении, регулирует дифференцировку эпителия, выполняет коферментную функцию, необходим для стабилизации клеточных мембран; является антиоксидантом, регулируя синтез хондроитинсульфата, влияет на рост костей, зубов, сперматогенез, влияет на образование Т- и В-лимфоцитов.

Представителями витаминов *группы D* являются Витамин

-эрго кальциферол: витамин **D**, - холекальциферол, которые синтезируются из провитаминов: эргостерол - провитамин D₂, содержится в грибах, растениях и 7-дегидрохолестерол - провитамин D₃, содержится в животных продуктах. Активные формы витамина D - это кальцитриолы: 1,25 (ОН), D₃- 1,25 дигидрокси-холекальциферол, 24,25 (ОН), D₃- 24,25 дигидрокси-холекальциферол.

(ОН) D₃ образуется в печени, 1,25 (ОН), D₃ и 24,25 (ОН), D₃ - вначале в печени, затем в почках. В почках участвует в образовании 1,25 (ОН), D₃ 1-α-гидроксилаза. Кальцитриолы поддерживают постоянство концентрации кальция и фосфата в крови несколькими путями: в стенке тонкого кишечника 1,25 (ОН), D₃ индуцирует синтез кальцийсвязывающих белков, необходимых для всасывания кальция в кишечнике; усиливает действие паратгирона на реабсорбцию кальция в почках; влияет на образование гидроксиапатитов на коллагеновых волокнах минерализованных тканей.

К витаминам *группы K* относят витамин K₁ - филлохинон, содержится в растениях; витамин K₂ - метакхинон, содержится в тканях животных. Витамин K является кофактором γ-глутамат карбоксилазы, катализирует реакцию карбоксилирования глутаминовой кислоты в процессе синтеза факторов свертывающей системы крови Ф-П, Ф-УП, Ф-IX, Ф-X; и процессах минерализации костей и дентина зубов - синтез остеокальцина и матриксного γ-карбоксилглутаматсодержащего белка, участвующих в процессах минерализации этих тканей. Водорастворимым аналогом витамина K является фармакологический препарат викасол.

Основными представителями *витамина E* являются а, р, у-токоферолы. Наиболее распространен и активен α-токоферол, α-токоферол является антиоксидантом, то есть прерывает перекисное окисление липидов. Антиоксидантную функцию витамин E выполняет совместно с селеном и цистеином. При гиповитаминозе E наблюдается стерильность у взрослых, анемия у недоношенных младенцев.

К *витаминам F* относят полиненасыщенные эссенциальные жирные кислоты: линолевая, линоленовая, арахидоновая, которые содержатся в растительных маслах. Для физиологических процессов необходимы полиненасыщенные эссенциальные жирные кислоты, которые являются компонентами глицерофосфолипидов мембран; участвуют в образовании этерифицированного холестерина в ЛПВП (антиатерогенное действие); из полиеновых жирных кислот (в основном арахидоновой и пентаеновой кислот) образуются: простагландины - простагландины, простациклины и тромбоксаны и лейкотриены.

II. Цель деятельности студентов на занятии

студент должен знать:

1. Классификацию витаминов;
2. Структуру водорастворимых витаминов, их природные источники, суточную потребность, коферментную функцию и участие в метаболических процессах.
3. Нарушения обмена веществ и патологические состояния, возникающие при недостаточности данных витаминов.
4. Структуру витаминов А, Д, Е, К, F, природные источники, суточную потребность, их биологическую роль в организме человека и участие в метаболических процессах.
5. Пути активации витамина Д, его регуляторные механизмы.
6. Нарушения обмена веществ и патологические состояния, возникающие при недостаточности данных витаминов.

студент должен уметь:

1. Провести качественные реакции на витамины В В,
2. Обнаружить альдегидоксидазу в молоке.
3. Определить количество витамина С в капусте и картофеле.
4. Обнаружить в биологической среде витамины А, Д, Е (качественные реакции), искусственно синтезированный водорастворимый аналог витамина К (викасол).
5. Показать, что он дает такие же качественные реакции.

III. Содержание обучения:

вопросы:

1. Классификация витаминов.
2. Химическая структура, природные источники, суточная потребность и биологическая роль витаминов:

3. В₁ (тиамин),
4. В₂ (рибофлавин),
5. В₆ (пиридоксин),
6. РР (амид никотиновой кислоты),
7. С (аскорбиновая кислота).
8. Патологические состояния, возникающие при недостаточности или избытке витаминов в организме человека (гипо-, ги- пер- и авитаминозы)
9. Методы определения витаминов.
10. Структура витамина А и его провитаминов, природные источники, суточная потребность, биологическая роль, участие в метаболических процессах.
11. Структура витамина Д и его провитаминов, природные источники, суточная потребность, биологическая роль, участие в метаболических процессах, роль в обмене фосфора и кальция.
12. Нарушение обмена веществ при рахите.

IV. Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО

Лабораторные работы:

1. Реакция окисления тиамин В₁.
2. Качественная реакция на витамин В₂ (рибофлавин).
3. Обнаружение альдегидоксидазы в молоке.
4. Количественное определение витамина С.
5. Качественная реакция на витамин А (ретинол).
6. Качественная реакция на витамин Д (кальциферол).
7. Качественная реакция на витамин Е (токоферол).
8. Качественная реакция на искусственно синтезированный водорастворимый аналог витамина К (викасол).

Наглядные пособия:

Таблицы

1. Витамины В_г.
2. Авитаминоз РР.
 3. Химический состав и калорийность молока.
 4. Авитаминоз D.
 5. Цикл родопсина в сетчатке глаза.

V. Наименование лабораторной работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.

Реакция окисления тиамин В₁

Принцип метода: В щелочной среде тиамин окисляется в тioxром феррицианидом калия, тioxром обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучении.

Методика выполнения: К 1 капле 5%раствора тиамин прибавляют 5-10 капель 10% раствора едкого натра, 1-2 капли 5% раствора феррицианида калия, взбалтывают и слегка нагревают

Предполагаемые результаты: Происходит окрашивание смеси в желтый цвет в результате окисления тиамин в тioxром, который в щелочном растворе при облучении ультрафиолетом обладает интенсивной синей флюоресценцией.

Выполняется обсуждение результатов и делается выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.

Качественная реакция на витамин В₂ (рибофлавин)

Принцип метода: Окисленная форма витамина В₂ - желтое флюоресцирующее в ультрафиолетовых лучах вещество. Реакция на витамин В₂ основана на способности его легко восстанавливаться; при этом раствор витамина В₂, обладающий желтой окраской, приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, т. к. восстановленная форма витамина В₂ бесцветна

Методика выполнения: В пробирку наливают 10 капель раствора В₂, добавляют 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и опускают зёрнышко металлического цинка.

Предполагаемые результаты: Происходит выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается.

Выполняется обсуждение результатов и делается выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3.

Обнаружение альдегидоксидазы в молоке

Принцип метода: По химической природе альдегидоксидазы являются флавопротеидами, способными окислять альдегиды (например, формальдегид). При добавлении к некипяченому молоку формальдегида и метиленового синего, названный фермент окисляет формальдегид в муравьиную кислоту, а освободившийся при этом водород передается на метиленовый синий, восстанавливая его в бесцветное соединение.

Методика выполнения: В 2 пронумерованные пробирки наливают по 15 капель молока. Молоко в пробирке 1 кипятят, после чего охлаждают. В каждую пробирку вносят по капле раствора формальдегида и по капле раствора метиленового синего. Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием и добавляют в каждую пробирку по 5 капель вазелинового масла, чтобы создать анаэробные условия. Пробирки помещают в водяную баню при 37°C.

Предполагаемые результаты: Отмечают постепенное обесцвечивание метиленовой сини в пробирке 2. Пробирка 1, содержащая кипяченое молоко, является контрольной, в ней обесцвечивание метиленового синего не произошло, т. к. фермент разрушен нагреванием.

Выполняется обсуждение результатов и делается выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. Количественное определение витамина С

Принцип метода: Метод основан на способности витамина С восстанавливать 2,6 - дихлорфенолиндифенол, который в кислой среде имеет красную окраску, а при восстановлении обесцвечивается; в щелочной среде окраска синяя. Для предохранения витамина С от разрушения исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6 дихлорфенолиндифенолом до появления розового окрашивания.

Для расчета содержания аскорбиновой кислоты в капусте, картофеле, хвое и др. используют формулу:

$$X = \frac{0,088 \times A \times G \times 100}{B \times V}$$

где

X - содержание аскорбиновой кислоты в мг на 100 г продук-

0, 088 - содержание аскорбиновой кислоты; мг,

A - результат титрования 0,001 г раствором 2,6 - дихлорфено- линдифенола (мл)

B - объём экстракта, взятый для титрования (мл),

V - количество продукта, взятое для анализа (г),

G - общее количество экстракта (мл),

100 - пересчет на 100 г продукта.

Методика выполнения.

а) Определение содержания витамина С в капусте.

Отвешивают 1 г капусты на весах, растирают в ступке с 2 мл

10% раствора хлористоводородной кислоты + 8 мл воды, фильтруют, берут 2 мл вытяжки, титруют 2,6 - дихлорфенолиндифенолом до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 сек. Вычисляют содержание аскорбиновой кислоты в 100 г капусты по формуле, указанной выше;

б) определение содержания витамина С в картофеле.

Отвешивают 5 г картофеля, растирают в ступке с 20 каплями 10% раствора хлористоводородной кислоты. Постепенно приливают дистиллированную воду - 15 мл. Полученную массу сливают в стаканчик, ополаскивают ступку водой, сливают её по стеклянной палочке в стаканчик и титруют 0,001 н раствором 2,6 - дихлорфенолиндифенола до розовой окраски. Вычисляют по формуле.

Предполагаемые результаты: В норме в капусте содержание витамина С = мг/100 мл, в картофеле - мг/100 мл

Выполняется обсуждение результатов и делается выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Качественная реакция на витамин А (ретинол)

Принцип метода: Раствор витамина А образует с серной кислотой эфирное соединение красно-бурого цвета.

Методика выполнения. В сухую пробирку отмеривают 3 капли рыбьего жира в хлороформе и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты.

Предполагаемые результаты. Появляется красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в красно-бурое.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

Качественная реакция на витамин Д (холекальциферол)

Бромхлороформная проба

Принцип метода: Витамин Д, содержащийся в рыбьем жире, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе приобретает зеленовато-голубую окраску.

Методика выполнения. В сухую пробирку вносят 2-3 капли рыбьего жира или 1 каплю концентрата витамина Д и 2-4 капли раствора брома в хлороформе (1:60).

Предполагаемые результаты. В присутствии витамина Д постепенно появляется зеленовато-голубое окрашивание.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7.

Качественная реакция на витамин Е (α-токоферол)

Реакция с хлоридом железа

Принцип метода: Раствор α-токоферола окисляется хлоридом железа в токоферилхинон и раствор окрашивается в красный цвет.

Методика выполнения. В сухую пробирку берут 5 капель 0, 1% раствора спиртового витамина Е (α-токоферол), прибавляют 0, 5 мл 1% раствора хлорида железа, перемешивают.

Предполагаемые результаты: Содержимое пробирки приобретает красное окрашивание. Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8.

Качественная реакция на искусственно синтезированный водорастворимый аналог витамина К (викасол)

Принцип метода: Раствор викасола в щелочной среде при добавлении цистеина окрашивается в желто-оранжевый цвет.

Методика выполнения. В сухую пробирку берут 5 капель раствора викасола, добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю 10% раствора едкого натрия

Предполагаемые результаты, появляется желтое окрашивание.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

VI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний.

1. Что такое витамины?
2. Назовите источники витаминов для человека.
3. Какие витамины могут синтезироваться в организме человека?
4. Какие витамины синтезируются микрофлорой кишечника?
5. Что такое провитамины? Назовите их.
6. Какие вещества являются незаменимыми факторами питания?
7. Какими единицами измеряется суточная потребность человека в витаминах и от каких факторов зависит потребность человека в различных витаминах?
8. Какие принципы используются для номенклатуры витаминов?
9. Как классифицируются витамины?
10. Назовите витаминоподобные вещества.
11. Назовите и охарактеризуйте типы нарушений (заболеваний), связанных с количественным нарушением обеспечения организма витаминами.
12. Что такое гипо-, гипер-, авитаминозы?
13. Назовите и кратко охарактеризуйте причины недостаточности витаминной функции в организме.
14. В каких единицах выражается содержание витамина в пищевых продуктах?
15. Какую функцию выполняют витамины в организме? Опишите кратко их взаимосвязь с ферментом (коферментом).
16. Судьба витаминов в организме.
17. Что такое антивитамины?
18. Что такое жирорастворимые витамины?
19. Какие жирорастворимые витамины Вы знаете?
20. Назовите источники жирорастворимых витаминов.
21. Какие жирорастворимые витамины могут синтезироваться в организме человека?
22. Какие провитамины этой группы Вы знаете? Из чего могут синтезироваться жирорастворимые витамины?
23. Судьба жирорастворимых витаминов в организме.

VII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Напишите формулу витамина В₁ и дайте еще 3 названия данного витамина.
2. Назовите природные источники тиамин, укажите его суточную потребность.
3. Какова роль тиамин в обмене веществ? Назовите коферменты, которые из него возникают и напишите их.

4. Напишите декарбоксилирование и окисление α -кетокислоты (пировиноградной кислоты) при участии ТПФ. Какие ферменты содержат в качестве кофермента ТПФ?
5. Каковы проявления авитаминоза В₁?
6. Напишите формулу витамина В₂, дайте ему другое название.
7. Какие продукты богаты витамином В₀? Назовите его суточную потребность.
8. Какова роль витамина В, в обмене веществ?
9. Назовите коферменты, которые из него возникают. Напишите формулы коферментов ФМН и ФАД.
10. Напишите реакцию переноса водорода с субстрата на акцептор при участии ФАД (ФМН).
11. Назовите важнейшие симптомы В, авитаминоза.
12. Витамин В₆, назовите его разновидности, напишите структуру.
13. В каких пищевых продуктах содержится много витамина В₆? Его суточная потребность.
14. Какова биологическая роль витамина В₆?
15. Назовите коферменты, которые возникают из витамина В₆, в каких реакциях принимают участие эти коферменты?
16. Назовите важнейшие симптомы В авитаминоза.
17. Как иначе называется витамин В₉? Дайте еще два наименования. Опишите основные структурные компоненты его молекулы.
18. Назовите коферменты, возникающие из витамина В₉.
19. В каких пищевых продуктах много витамина В₉ (кобаламина)? Его суточная потребность?
20. Что такое внешний и внутренний факторы Касла? Каковы химическая природа, место образования и роль внутреннего фактора?
21. Назовите важнейшие симптомы недостаточности витамина В₁₂.
22. Какие существуют разновидности РР? Напишите структурную формулу назовите его.
23. В каких пищевых продуктах особенно много никотиновой кислоты? Суточная потребность данного витамина.
24. Назовите коферменты, которые возникают из витамина РР.
25. Какова роль ниацина в обмене веществ?
26. Назовите важнейшие симптомы пеллагры.
27. Какими формами представлен витамин С? Напишите структурную формулу.
28. Назовите основные пищевые источники витамина С, его суточную потребность.
29. В каких реакциях участвует витамин С?
30. Как называется авитаминоз С? Основные признаки цинги, опишите нарушение обмена веществ.
31. Поясните смысл названия витамина - фолиевой кислоты и назовите структурные компоненты молекулы этого витамина.
32. Назовите основные источники фолиевой кислоты, ее суточную потребность.
33. Опишите, как данный витамин превращается в кофермент.
34. Какова роль фолатина в обмене веществ?
35. Каковы симптомы недостаточности фолиевой кислоты?
1. Какие формы витамина А существуют в организме человека?
2. Назовите пищевые источники витамина А, его провитамины и их суточную потребность.
3. Опишите процесс превращения провитамина - Р-каротина в витамин А, сколько молекул образуется?
6. Охарактеризуйте биологическую роль витамина А.
7. Назовите симптомы гиповитаминоза А.
8. Каких представителей витаминов группы D Вы знаете? Назовите провитамины.
9. Каковы основные источники витамина D в организме человека? Его суточная потребность.
10. Назовите активные формы витамина D
11. Какие соединения относятся к кальцитриолам? Где и как происходит их синтез?
12. Какова биологическая роль витамина D₃?
13. Охарактеризуйте основные проявления гиповитаминоза D₃ и механизм их появления.
14. Какие появляются изменения при гипервитаминозе D?
15. Какие витамины относятся к витаминам группы К? Назовите его водорастворимый аналог.
16. Назовите пищевые источники витамина К и их суточную потребность.
17. Какова биологическая роль витамина К?
18. Какие симптомы характерны для гиповитаминоза К?
19. Какие симптомы характерны для гипервитаминоза К?
20. Назовите авитамины К.
21. Какие соединения относятся к витаминам Е?
22. Назовите пищевые источники витамина Е и их суточную потребность.
23. Какова биологическая роль витамина Е?
24. Какие симптомы характерны для гиповитаминоза Е?
25. Какие соединения относят к витаминам F?
26. Какова суточная потребность витамина F?
27. Для каких физиологических процессов необходимы поли- ненасыщенные эссенциальные жирные кислоты?

Задача № 1.

К врачу обратился больной 28 лет с жалобами на частые расстройства функции кишечника, ослабление памяти, появление темной пигментации на тыльной стороне кистей. Недостаточность какого витамина можно предположить у больного? Обоснуйте ответ.

Задача № 2.

В клетках печени идет интенсивный синтез белка, для которого необходимы аминокислоты, образующиеся в результате тран-саминирования. Назовите какой витамин в виде какого кофермента участвует в этой реакции.

Задача № 3.

В процессах работы живой клетки потребовалось усиление окислительно-восстановительных реакций. Необходимость в каких витаминах при этом возникает?

Задача № 4.

Человек, находящийся преимущественно на углеводной диете бедной белками, стал замечать у себя усиленное сердцебиение, слабость, утомляемость, чувство страха, снижение чувствительности конечностей, боли по ходу нервов. В чем причина этих проявлений? Обоснуйте ответ.

Задача № 5

Почему недостаток фолиевой кислоты и витамина В₁₂ приводит к развитию анемии?

Задача № 6.

Почему при гиповитаминозе С наблюдается кровоточивость мелких сосудов?

VIII. Хронокарта учебного занятия

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Перекличка – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
5. Опрос – 10 минут.
6. Проведение лабораторной работы – 30 мин.
7. Оформление протоколов – 10 мин.

IX. Самостоятельная работа студентов

Суточная потребность, распространение в природе, биологическая роль витаминов:

В₁₂(кобаламин),

В₃ (пантотеновая кислота),

В₁₅ (пангамовая кислота),

Н (биотин),

В₉ (фолиевая кислота),

U (противоязвенный).

Зарисовать и заполнить таблицу по водорастворимым витаминам:

Наименование витамина	Химическая природа	Структура-ра витамина	Суточная потребность	Распространение в природе	Название и структура кофермента	Биологическая роль

Структура и биологическая роль витамина Е (токоферола) Структура и биологическая роль витамина К (филлохинона). Зарисовать и заполнить таблицу по жирорастворимым витаминам:

Наименование витамина	Химическая природа	Структура витамина	Суточная потребность	Распространение в природе	Биологическая роль

Х. Список используемой литературы

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А. Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А. Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия». 1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980.
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 10

Тема: ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ. ПОНЯТИЕ О БИОЭНЕРГЕТИКЕ. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ. МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ЦЕПЬ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ.

1. Научно-методическое обоснование темы:

В зависимости от вида использования энергии все организмы делятся на *фототрофные* (использование энергии солнечного излучения) и *хемотрофные* (использование энергии химических веществ). К фототрофным относят все растения, к хемотрофам - животных и человека.

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

Поступление веществ происходит в результате дыхания и питания. В желудочно-кишечном тракте происходит переваривание (гидролиз полимеров - белков, полисахаридов, липидов и других сложных органических веществ) до мономеров.

Мономеры всасываются и включаются в промежуточный обмен, который состоит из 2 типов реакций: катаболизма и анаболизма.

Катаболизм - процесс расщепления органических молекул до конечных продуктов (CO_2 , H_2O и мочевины). Реакции сопровождаются выделением энергии.

Анаболизм объединяет биосинтетические процессы, в которых простые строительные блоки соединяются в сложные макромолекулы, необходимые для организма. В этих реакциях используется энергия, освобождающаяся при катаболизме.

Процессы катаболизма в клетках животных и человека сопровождаются потреблением кислорода, который необходим для реакций окисления. В результате этих реакций происходит освобождение энергии, которая необходима организмам в процессе жизнедеятельности для осуществления различных видов работы. Энергия необходима для поддержания температуры тела, выполнения химической работы (синтез органических соединений, усложнения химической структуры), активного транспорта веществ через мембраны, механической работы (мышечное сокращение), а так же для генерирования электрического тока и иногда света (биолуминесценция)

Носителями энергии являются электроны, формирующие связи между атомами в органических субстратах. Для использования этой энергии необходимо расщепление молекул субстрата и освобождение энергии электронов. Источником этой энергии являются процессы биологического окисления, сопряженного с окислительным фосфорилированием, происходящим в организме человека и животных.

Биологическое окисление - это окисление ионов водорода молекулярным кислородом с образованием эндогенной воды. Основным источником энергии являются соединения ионов водорода, отщепляемого от распадающегося субстрата с O_2 в дыхательной цепи.

Дыхательная цепь (цепь переноса электронов) представляет собой биохимическую систему во внутренней мембране митохондрий, состоящую из ряда переносчиков электронов и протонов, транспортирующих электроны от окисляющегося субстрата к вдыхаемому кислороду. Дыхательная цепь в процессе миграции по ней электронов обеспечивает постепенную (ступенчато) отдачу им своей избыточной энергии, которая частично (40-50%) переходит в энергию трансмембранного электрохимического потенциала, а затем аккумулирует в синтезирующиеся молекулы АТФ. Часть энергии электронов (50-60%) расходуется в виде тепла, что необходимо для поддержания температуры тела. Происходит сопряжение процессов биологического окисления и окислительного фосфорилирования.

Основной путь переноса электронов и протонов (полная дыхательная цепь) включает в себя 4 ферментных комплекса:

Комплекс 1 - называется НАДН - КоQ (убихинон)- оксидоре- дуктаза и обеспечивает передачу электронов от НАДН H^+ к КоQ.

Комплекс 2 - сукцинат - КоQ -оксидоредуктаза - катализирует перенос электронов от сукцината (ацилов жирных кислот) на КоQ.

Ферментный комплекс 3 называется КоQ Н - цитохром с - оксидоредуктаза (комплекс bc) и передает электроны от КоQ на цитохром с.

4. Ферментный комплекс 4 - цитохромоксидаза, катализирует перенос электронов от цитохрома с на кислород. В этот комплекс входят цитохром а и аз, содержащие два гема и два иона Cu^{2+} , которые меняя валентность с Cu^{2+} на Cu^{2+} и обратно, принимают и отдают электроны на цитохром аз, электроны присоединяются к ионам Cu^{2+} , а от них на O_2

Дыхательная цепь локализуется во внутренней мембране митохондрий и располагается ассиметрично.

Последовательность расположения компонентов дыхательной цепи определяется большей или меньшей выраженностью у них окислительной и восстановительной способности, которая характеризуется *окислительно-восстановительным потенциалом* (редокс потенциал). Чем отрицательнее редокс - потенциал, тем сильнее восстанавливающая способность, то есть способность отдавать электроны, тем большей энергией эти электроны обладают. Наибольшей окислительной способностью (принимать электроны) обладает O_2 , и его редокс-потенциал имеет наибольшую величину.

Она достигает в ЦПЭ - 1,2 в, что соответствует освобождению 220 кДж энергии в расчете на 1 моль H^+ (52,7 ккал/моль) в стандартных условиях измерения. В физиологических же условиях в клетке эти величины составляют 380 кДж или 90 ккал/моль).

Митохондриальная дыхательная цепь *укорачивается* в том случае, если субстрат дегидрируется сразу флавиновым ферментом (с коферментом ФАД). При этом электроны и протоны с такого субстрата сразу передаются через ФАД убихинону.

Редокс-потенциал у подобных субстратов выше, чем у тех, которые окисляются НАД⁺- зависимой дегидрогеназой, запас энергии у электронов меньше, поэтому трансмембранный потенциал возникает меньшей величины и вследствие этого синтезируется меньшее количество АТФ (2 молекулы).

II. Цель деятельности студентов на занятии

Студент должен знать:

1. Общие представления об обмене энергии: катаболические и анаболические процессы.
2. Процесс биологического окисления и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования.
3. Цепь транспорта электронов: основные переносчики. Ферментные комплексы дыхательной цепи.
4. Токсическое действие кислорода: перекисное окисление липидов. Обезвреживание токсических форм кислорода.

Студент должен уметь:

1. Оценивать значение основных этапов обмена веществ в получении энергии, необходимой для процессов жизнедеятельности.
2. Анализировать этапы трансформации энергии пищевых веществ в энергию химических связей АТФ как основного аккумулятора энергии в организме.
3. Определять энергетический эффект окисления различных субстратов (в молях АТФ).

III. Содержание обучения

Основные вопросы:

1. Понятие о биологическом окислении
2. Набор переносчиков электронов в дыхательной цепи. Проблема донора и акцептора электронов.
3. Понятие об электрохимическом потенциале.
4. Строение ферментов и коферментов ЦПЭ.
5. Строение и роль витаминов, участвующих в тканевом дыхании

IV. Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО

Лабораторные работы:

Качественная реакция на цитохромоксидазу.

V. Наглядные пособия:

Таблицы

1. Пути образования ацетил-КоА.
2. Взаимосвязь липидов, углеводов и белков в процессах обмена веществ.
3. Схема дыхательной цепи.
4. Окислительное фосфорилирование.
5. Превращение НАД в НАДН⁺(Н⁺).
6. Превращение ФАД в ФАДН⁺(Н⁺).

Средства ТСО:

Кодоскоп, Доска

Водяная баня

Пробирки химические

Пипетки

Лабораторная посуда

Реактивы

Слайды

Энергетический обмен. Цепь транспорта электронов

- схема унификации энергетических субстратов
- переносчики дыхательной цепи
- ферментные комплексы дыхательной цепи
- реакции окисления в дыхательной цепи
- схема полной дыхательной цепи
 - возможные варианты восстановления O₂

VI. Наименование лабораторной работы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.

Качественная реакция на цитохромоксидазу

Принцип метода: Цитохромоксидаза -оксидоредуктаза, катализирующая перенос электронов непосредственно на кислород, содержит железопорфириновый комплекс (гем) и ионы меди. Цитохромоксидаза (дыхательный фермент Варбурга) прочно связана с клеточной структурой. При извлечении белков из тканей фермент остается в нерастворившемся осадке. Цитохромоксидаза способна окислять при участии кислорода воздуха некоторые соединения, в частности диметилпарафенилендиамин и а-нафтол (реактив НАДИ). При окислении двух последних соединений образуется цветной продукт - индофеноловый голубой. Мышца, где цитохромоксидаза инактивирована тепловой денатурацией окрашивания не дает.

Методика выполнения. Берут 5 г свежих скелетных мышц, освобождают от жировой ткани, измельчают ножницами и тщательно растирают в ступке в течение 10 минут с четырехкратным объемом дистиллированной воды. Мышечную кашицу фильтруют через двойной слой марли и многократно промывают твердый остаток дистиллированной водой до тех пор, пока промывные воды перестанут быть окрашенными. Почти бесцветную мышечную кашицу отжимают между листами фильтровальной бумаги. Полученная кашица содержит цитохромоксидазу, комплекс ци- тохромов и некоторые дегидрогеназы. Отмытую мышечную кашицу делят на 2 части. Одну часть оставляют на фильтровальной бумаге, а другую часть (контрольная проба) помещают в пробирку, заливают 1 мл дистиллированной водой, кипятят 1 минуту, затем охлаждают пробирку и осторожно сливают жидкость, а мышечную кашицу стеклянной палочкой переносят на фильтровальную бумагу. Затем на обе порции мышечной кашицы наносят по 2-3 капли реактива НАДИ, представляющего собой смесь диметилпарафенилендиамин и анафтол в щелочной среде.

Предполагаемые результаты: Спустя несколько минут после добавления реактива НАДИ, непрокипяченная мышца постепенно окрашивается в синий цвет в результате образования индофенолового голубого продукта окисления и конденсации а-нафтола и NN - диметилпарафенилендиамин

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

VI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний

1. Назовите виды энергообеспечения процессов жизнедеятельности?
2. В каких процессах в организме человека затрачивается энергия?
3. Этапы расщепления органических веществ, которые приводят к освобождению энергии.
3. Схема унификации энергетических субстратов.
4. Что такое биологическое окисление?
5. Что такое цепь транспорта электронов, ее биологическая роль и локализация в клетке?
6. Назовите основные компоненты дыхательной цепи.
7. От чего зависит последовательность расположения комплексов в дыхательной цепи? Что такое редокс-потенциал?
8. Напишите схему полной дыхательной цепи. Обозначьте места выбрасывания протонов на наружную поверхность мембраны.
8. Напишите реакцию окисления субстрата НАД⁺-зависимой дегидрогеназой.
9. Напишите реакцию окисления НАДН флавиновым ферментом.
10. Напишите реакцию окисления ФМН Н, с помощью уби- хинона.
11. Напишите окисление восстановленного убихинона.
12. Что такое цитохромы? Какие разновидности участвуют в цепи транспорта электронов? Чем цитохромоксидаза отличается от цитохромов?
13. Что такое эндогенная вода? Сколько ее образуется за сутки в организме человека? Какова роль каталазы и глутатионперокси- дазы?

VII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний.

1. **Взаимосвязь обмена веществ и энергии.**
2. **Этапы переноса электронов и протонов от дегидрируемых субстратов к кислороду.**
3. **Основные положения, объясняющие механизм сопряжения дыхания и синтеза АТФ.**
4. **Роль тканевого дыхания в регуляции и теплопродукции организма.**
5. **Дыхательный контроль.**
6. **Ингибиторы дыхания.**

ЗАНЯТИЕ № 11

Тема: ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ.

I. Научно-методическое обоснование темы:

Окислительным фосфорилированием называется синтез АТФ путем фосфорилирования АДФ, используя энергию трансмембранного электрохимического потенциала, возникающего при освобождении энергии электронов в процессе миграции их по дыхательной цепи к вдыхаемому О₂.

Коэффициент фосфорилирования (Р/О) это соотношение количества израсходованного на синтез АТФ фосфора Н₃Р₀₄ и поглощенного О₂. Он выражает эффективность функционирования цепи транспорта электронов: чем выше коэффициент, тем больше синтезируется АТФ в расчете на пару переносимых электронов. В полной дыхательной цепи коэффициент равен 3, в случае же укороченной равен 2.

Согласно *хемотронической гипотезе Митчела-Скулачева* основным фактором сопряжения окисления и фосфорилирования является *протонный градиент*. Часть энергии электронов окисленного субстрата в процессе их миграции по дыхательной цепи трансформируется в энергию трансмембранного электрохимического потенциала, создаваемого путем перекачки протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство. В дальнейшем протоны через канал сопрягающего устройства возвращаются в матрикс (закрывается протонный цикл), концентрация протонов выравнивается, мембрана разряжается, а энергия трансмембранного электрохимического градиента используется для синтеза АТФ.

Трансмембранный электрохимический потенциал протонный потенциал, протон - движущая сила (ΔpH) - это градиент концентрации ионов водорода и электрических зарядов по обе стороны внутренней мембраны митохондрий. Этот потенциал складывается из разности электрических зарядов ($\Delta \psi$) равной около

0,206 и градиента ионов водорода (ΔpH) - около 0,056. Общая величина $\Delta \mu \text{H}^+ = 0,25$ в. Протонный потенциал возникает путем перекачки H^+ из матрикса в межмембранное пространство за счет энергии транспорта электронов. В каждой точке сопряжения и фосфорилирования в межмембранное пространство поступает не менее 2 H^+ .

Под сопряжением понимают превращение энергии транспорта электронов в промежуточную форму - в энергию трансмембранного потенциала с последующим использованием ее для фосфорилирования АДФ, то есть синтеза АТФ. Протонный градиент создается путем выталкивания ионов водорода в трех участках дыхательной цепи: при переходе электронов с ФМН H , через FeS-белок на КоQ, при переходе электронов с КоQH₂ через FeS-белок на цитохром c; и при транспорте электронов от цитохрома a₃ к O₂. Эти участки обозначены как пункты сопряжения.

Сопрягающее устройство является биохимической системой, осуществляющей фосфорилирование АДФ (синтез АТФ) за счет энергии протонного потенциала. Локализовано оно в грибовидных выступах внутренней мембраны митохондрий. Одна часть - это белковый канал (F_0), другая - (F_1) - это фермент H^+ -АТФ-синтетаза. Поток протонов через сопрягающее устройство сопровождает разряд мембраны и выделение свободной энергии, обуславливает синтез АТФ из АДФ и H_3P_0_4 . При этом происходит либо активирование фосфата, либо конформационные изменения белка.

Эти процессы являются общими для всех органических субстратов, именно они нарабатывают энергию для процессов жизнедеятельности, нарушение которых приводит к развитию патологических процессов. Поэтому очень важно для студентов знать основы биоэнергетики, процесс биологического окисления и окислительного фосфорилирования.

III. Цель деятельности студентов на занятии

Студент должен знать:

1. Общие представления об обмене энергии: катаболические и анаболические процессы.
2. Процесс биологического окисления и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования.
3. Цепь транспорта электронов: основные переносчики. Ферментные комплексы дыхательной цепи.
4. Токсическое действие кислорода: перекисное окисление липидов. Обезвреживание токсических форм кислорода.

Студент должен уметь:

1. Провести качественную реакцию на цитохромоксидазу
2. Интерпретировать результаты эксперимента.

VII. Содержание обучения Основные вопросы:

1. Понятие о биологическом окислении
2. Набор переносчиков электронов в дыхательной цепи. Проблема донора и акцептора электронов.
3. Понятие об электрохимическом потенциале.
4. Окислительное фосфорилирование, факторы, необходимые для данного процесса.
5. Теория сопряжения биологического окисления и окислительного фосфорилирования. Локализация пунктов сопряжения в дыхательной цепи.
6. Коэффициент P/O и возможные его значения.
7. Альтернативные пути переноса электронов.

VIII. Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО

Лабораторные работы:

Качественная реакция на цитохромоксидазу.

Наглядные пособия:

Таблицы

7. Пути образования ацетил-КоА.
8. Взаимосвязь липидов, углеводов и белков в процессах обмена веществ.
9. Схема дыхательной цепи.
10. Окислительное фосфорилирование.
11. Превращение НАД в $\text{НАДН}^+(\text{H}^+)$.
12. Превращение ФАД в $\text{ФАДН}^+(\text{H}^+)$.

Средства ТСО

Кодоскоп

Доска

Водяная баня

Пробирки химические

Пипетки

Лабораторная посуда

Реактивы

Слайды

Энергетический обмен. Цепь транспорта электронов

- схема унификации энергетических субстратов
- переносчики дыхательной цепи
- ферментные комплексы дыхательной цепи
- реакции окисления в дыхательной цепи
- схема полной дыхательной цепи
- возможные варианты восстановления O_2 ,

V. Наименование лабораторной работы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. Качественная реакция на цитохромоксидазу

Принцип метода: Цитохромоксидаза -оксидоредуктаза, катализирующая перенос электронов непосредственно на кислород, содержит железопорфириновый комплекс (гем) и ионы меди. Цитохромоксидаза (дыхательный фермент Варбурга) прочно связана с клеточной структурой. При извлечении белков из тканей фермент остается в нерастворившемся осадке. Цитохромоксидаза способна окислять при участии кислорода воздуха некоторые соединения, в частности диметилпарафенилендиамин и а-нафтол (реактив НАДИ). При окислении двух последних соединений образуется цветной продукт - индофеноловый голубой. Мышца, где цитохромоксидаза инактивирована тепловой денатурацией окрашивания не дает.

Методика выполнения. Берут 5 г свежих скелетных мышц, освобождают от жировой ткани, измельчают ножницами и тщательно растирают в ступке в течение 10 минут с четырехкратным объемом дистиллированной воды. Мышечную кашицу фильтруют через двойной слой марли и многократно промывают твердый остаток дистиллированной водой до тех пор, пока промывные воды перестанут быть окрашенными. Почти бесцветную мышечную кашицу отжимают между листами фильтровальной бумаги. Полученная кашица содержит цитохромоксидазу, комплекс цитохромов и некоторые дегидрогеназы. Отмытую мышечную кашицу делят на 2 части. Одну часть оставляют на фильтровальной бумаге, а другую часть (контрольная проба) помещают в пробирку, заливают 1 мл дистиллированной водой, кипятят 1 минуту, затем охлаждают пробирку и осторожно сливают жидкость, а мышечную кашицу стеклянной палочкой переносят на фильтровальную бумагу. Затем на обе порции мышечной кашицы наносят по 2-3 капли реактива НАДИ, представляющего собой смесь диметилпарафенилендиамин и анафтол в щелочной среде.

Предполагаемые результаты: Спустя несколько минут после добавления реактива НАДИ, непрокипяченная мышца постепенно окрашивается в синий цвет в результате образования индофенолового голубого продукта окисления и конденсации а-нафтола и NN - диметилпарафенилендиамин

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

VII. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний

1. Этапы расщепления органических веществ, которые приводят к освобождению энергии.
2. Схема унификации энергетических субстратов.
3. Что такое биологическое окисление?
4. Что такое цепь транспорта электронов, ее биологическая роль и локализация в клетке?
5. Назовите основные компоненты дыхательной цепи.
6. От чего зависит последовательность расположения комплексов в дыхательной цепи? Что такое редокс-потенциал?
7. Напишите схему полной дыхательной цепи. Обозначьте места выбрасывания протонов на наружную поверхность мембраны.
8. Напишите реакцию окисления субстрата $НАД^+$ -зависимой дегидрогеназой.
9. Напишите реакцию окисления НАДН флавиновым ферментом.
10. Напишите реакцию окисления ФМН Н, с помощью уби- хинона.
11. Напишите окисление восстановленного убихинона.
12. Что такое цитохромы? Какие разновидности участвуют в цепи транспорта электронов? Чем цитохромоксидаза отличается от цитохромов?
13. Что такое эндогенная вода? Сколько ее образуется за сутки в организме человека? Какова роль каталазы и глутатионпероксидазы?
14. Что мы понимаем под окислительным фосфорилированием? Что такое коэффициент фосфорилирования P/O?
15. В чем суть хемиосмотической теории сопряжения окисления с фосфорилированием.
16. Что такое трансмембранный электрохимический градиент? Из каких компонентов он складывается?
17. Какие участки дыхательной цепи обеспечивают сопряжение окисления и фосфорилирования?
18. Что представляет собой сопрягающее устройство?
19. Какие вещества являются разобщающими агентами?
20. Что представляет собой укороченная Ц.Т.Э.?
21. Сколько молекул АТФ возникает при прохождении по ней электронов?

22. Что такое короткие нефосфорилированные цепи и где они функционируют?

VIII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний.

1. Аккумуляторы энергии в организме, макроэргические соединения
2. Фазы освобождения энергии
3. Строение митохондрий
4. Типы окисляемых субстратов
5. Полная и укороченная ЦПЭ
6. Виды окисления субстратов
7. Окислительное фосфорилирование
8. Гипотезы окислительного фосфорилирования
9. Строение АТФ-синтазы
10. Дыхательный контроль
11. Разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования
12. Окислительные системы, не связанные с запасанием энергии.

Тестовый контроль

1 вопрос: Указать неверное положение в определении метаболизма.

1. Распад пищевых веществ до мономеров под действием пищеварительных компонентов.
2. Распад всосавшихся пищевых веществ и структурно-функциональных компонентов клетки до CO_2 и H_2O катаболизм.
3. Использование энергии пищевых веществ.
4. Использование энергии структурно-функциональных компонентов клетки.
5. Синтез структурно-функциональных компонентов клетки - анаболизм.

2 вопрос: В результате пищеварения происходит:

1. Гидролиз пищевых биополимеров до мономеров.
2. Образование продуктов, лишенных видовой специфичности.
3. Всасывание продуктов, лишенных видовой специфичности.
4. Все верно.
5. Все неверно.

3 вопрос: Катаболизм и анаболизм связаны между собой:

1. Общими промежуточными метаболитами.
2. Образующейся при катаболизме энергией.
3. Образующимися при катаболизме восстановительными эквивалентами.
4. Все верно.
5. Все неверно.

4 вопрос: Основное значение амфиболических реакций:

1. Гидролиз пищевых биополимеров.
2. Гидролиз внутриклеточных биополимеров до мономеров.
3. Образование энергии в ходе катаболических реакций.
4. Связывание катаболических и анаболических процессов. Синтез специфических биополимеров.

5 вопрос: Составить пары: название биохимических процессов, их тип.

- | | |
|---|---|
| 1. Гидролиз пищевых веществ в пищеварительном тракте. | 8. Образование фосфолипидов. |
| 2. Гликолиз. | 8. Выделение CO_2 и H_2O из организма. |
| 3. Окислительное декарбоксилирование пирувата. | 14. Связывание O_2 в легких. |
| 4. Образование кетонных тел. | А. Катаболизм. |
| 5. Реакции ЦТК. | Б. Анаболизм. |
| 6. Образование мочевой кислоты. | В. Амфиболический. |
| 7. Образование холестерина. | Г. Не относится ни к какому типу. |

6 вопрос: Цепь тканевого дыхания (ЦТД) или цепь транспорта электронов (ЦТЭ) это:

1. НАД⁺ - зависимые дегидрогеназы.
2. НАДН - дегидрогеназы.
3. ФАД - зависимые дегидрогеназы.
4. ФАД - зависимые оксидазы.
5. Совокупность комплекса ферментов, транспортирующих электроны (e) от НАДН⁺Н⁺, ФАДН, и некоторых субстратов на О₂, и одновременно перекачивающих Н⁺ из матрикса митохондрий в межмембранное пространство.

7 вопрос: ЦТЭ локализована:

1. В матриксе митохондрий.
2. Во внешней мембране митохондрий.
3. Во внутренней мембране митохондрий.
4. В мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР).
5. В цитозоле.

8 вопрос: Подберите пары между комплексами ферментов ЦТЭ и соответствующими названиями:

I-комплекс	А. Ко Q Н ₂ /цитохром С-оксидоредуктаза.
II-комплекс	Б. Цитохромоксидаза (цитохром С/О ₂ - оксидоредуктаза).
III-комплекс	В. НАДН/КоО-оксидоредуктаза.
IV -комплекс	Г. Сукцинат/ Ко Q-оксидоредуктаза.

9 Последовательность расположения комплексов ферментов в ЦТК обусловлена:

1. Строением комплексов ферментов.
2. Сродством комплексов ферментов к липидам мембраны.
3. Величиной их окислительно-восстановительных потенциалов.
4. Все верно.
5. Все неверно.

10 вопрос: Роль ЦТЭ заключается:

1. Восстановление О₂.
2. Образование эндогенной Н₂О.
3. Перекачивание Н⁺ в межмембранное пространство.
4. Образование электрохимического трансмембранного потенциала.
5. Все верно.

11 вопрос: Что такое окислительное фосфорилирование?

1. Окисление НАДН⁺Н⁺, ФАДН, некоторых субстратов и транспорт их на О₂.
2. Перекачивание Н⁺ от НАДН⁺Н⁺, КоQH, из матрикса митохондрий в межмембранное пространство.
3. Образование энергии мембраны в виде Ац Н⁺.
4. Аэробный митохондриальный процесс трансформации энергии в виде Ац Н⁺ в энергию АТФ.
5. Все верно.

12 вопрос: Укажите неверное положение в функции Н⁺- АТФ-азы:

1. Дозированный транспорт Н⁺ из межмембранного пространства через F₀ в F₁.
2. Образование на F₁P : за счет связывания 2Н⁺ с НРO₄²⁻ и отнятия Н₂О.
3. Фосфорилирование АДФ с помощью P_i в АТФ на F
4. Транспорт АТФ из матрикса в межмембранное пространство.
5. Гидролиз АТФ в матриксе митохондрий, ведущий к повышению энергозаряженности (А ц Н⁺) мембраны.

13 вопрос: Коэффициент фосфорилирования отражает:

1. Количество перекаченных H^+ .
2. Количество поглощенного O_2 .
3. Количество синтезированного АТФ.
4. Отношение количества использованного H_3PO_4 (на фосфорилирование АДФ в АТФ) к количеству поглощенного кислорода (O_2).
5. Все верно.

14 вопрос: Выработка АТФ окислительным фосфорилированием снижается:

1. При ингибировании ферментов цпэ.
2. При ингибировании окислительного фосфорилирования.
3. При разобщении окислительного фосфорилирования.
4. Все верно.
5. Верно 1 и 2.

15 вопрос: Разобщение окислительного фосфорилирования - это:

1. Торможение транспорта e^- в ЦТЭ.
2. Торможение синтеза АТФ.
3. Нарушение образования AcH^+ , приводящее к усилению транспорта e^- и снижению синтеза АТФ.
4. Все верно.
5. Верно 1 и 2.

16 вопрос: Указать причину пирогенного эффекта при действии разобщителей.

1. Ускорение транспорта e^- .
2. Торможение синтеза АТФ.
3. Рассеивание энергии усиленного окисления в виде тепла.
4. Все верно.
5. Верно 1, 2.

17 вопрос: Процессы разобщения наиболее активно протекают:

1. В адипоцитах.
2. В бурой жировой ткани.
3. В скелетных мышцах.
4. В печени.
5. Верно 2,3,4.

ОТВЕТЫ:

1	1
2	4
3	4
4	4
5	1-Г; 2-А; 3-А; 4-А; 5-В; 6-А; 7-Б; 8-Б; 9-Г; 10-Г.
6	5
7	3
8	1-В, 2-Г, 3-А, 4-Б.
9	3
10	3
11	5
12	4
13	4
14	1-Б; 2-В; 3-А.
15	1 1-Г, 2-В, 3-Б, 4-А, 5-Д.
16	4
17	3

IX. Хронокарта учебного занятия

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключка – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
5. Опрос – 10 минут.
6. Проведение лабораторной работы – 30 мин.
7. Оформление протоколов – 10 мин.

Х. Вопросы для самостоятельного изучения

1. Токсическое действие кислорода: перекисное окисление липидов.
2. Обезвреживание токсических форм кислорода.

XI. Список используемой литературы:

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980.
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А.Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 12

Тема: ОБЩИЙ ПУТЬ КАТАБОЛИЗМА - ЦИКЛ КРЕБСА. ВЫЯВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ.

I. Научно-методическое обоснование темы:

Общим метаболитом, который образуется из аминокислот, глюкозы и жирных кислот является ацетилКоА.

Освобождение энергии в организме человека это многоступенчатый процесс, включает три основных этапа:

Расщепление полимеров (углеводов, белков, липидов) в желу- дочно-кишечном тракте до мономеров: моносахаридов, жирных кислот и глицерина, аминокислот и других веществ.

Превращение мономеров в промежуточные соединения, которое происходит в клетках тканей, то есть специфические пути катаболизма: глюкоза, глицерин, аминокислоты превращаются в пируват, а пируват окисляется до ацетил Ко А. Жирные кислоты в процессе р-окисления продуцируют ацетил КоА, аминокислоты распадаются до следующих метаболитов: а-кетоглутарата, окса- лоацетата, фумарата, сукцинила КоА.

Общие пути катаболизма: биологическое окисление, сопряженное с окислительным фосфорилированием и ЦТК, в которых полностью окисляется ацетил КоА до 2 СО₂ и Н₂О. При этом в реакции окисления отщепляются протоны и электроны, переносимые в дыхательной цепи и генерирующие энергию АТФ.

Таким образом, в результате путей унификации энергетических субстратов образуется один общий метаболит, основной субстрат цикла Кребса - ацетил КоА. Он может поступить в ЦТК (цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса, лимоннокислый цикл), использоваться в синтезе холестерина, жирных кислот и кетонных тел.

Цикл Кребса - это центральный метаболический путь углерода, входящего в состав всех основных классов биомолекул и основной источник метаболической энергии в форме АТФ. Это «котел», в котором сгорают белки, липиды, углеводы. Это основной процесс, который поставляет ионы водорода для цепи транспорта электронов для продукции энергии в виде АТФ. Ни один энергодающий процесс в организме человека, не происходит без участия ЦТК.

ЦТК - это циклический процесс, так как он начинается с конденсации оксалоацетата и ацетил КоА и заканчивается образованием оксалоацетата. Протекает в матриксе митохондрий и состоит из 8 стадий.

Катаболическая роль ЦТК заключается в том, что в результате взаимодействия ацетил КоА с

оксалоацетатом в серии реакций освобождается 2 молекулы CO_2 и генерируется оксалоацетат, а так же образуются восстановленные эквиваленты в виде 3 молекул НАДН⁺ и 1 молекулы ФАДН₂.

НАД⁺ и ФАД регенерируются путем транспорта электронов в цепи реакций, в которой терминальным акцептором электронов служит кислород. Именно поэтому цикл лимонной кислоты представляет собой аэробный (кислородзависимый) путь. Энергоценность ЦТК-12 молекул АТФ, из них 11 молекул образуется в результате окислительного фосфорилирования и 1 молекула АТФ путем субстратного фосфорилирования.

ЦТК выполняет также амфиболическую роль, которая заключается в следующем: цитрат, α-оксоглутарат, сукцинил-КоА, фумарат в ЦТК превращаются в оксалоацетат, а из оксалоацетата может образоваться глюкоза; цитрат участвует в процессах синтеза жирных кислот; цитрат способен связывать ионы кальция и участвовать в процессах его переноса и отложения, (минерализации); путем трансаминирования из оксалоацетата образуется аспарагиновая кислота, которая используется в биосинтезе пири- мидинов, а из α-оксоглутарата - глутаминовая кислота; сукцинил КоА участвует в синтезе порфиринов (гема); сукцинил КоА является донором HS КоА в реакции образования активной формы ацетоацетата (кетонное тело); ацетилКоА представляет собой метаболический источник всех атомов углерода, используемых в синтезе жирных кислот, каротиноидов и стероидов; энергия АТФ используется в реакциях анаболизма.

ЦТК - это регулируемый процесс. К регуляторным ферментам относятся: цитратсинтаза, изоцитратдегидрогеназа,

α-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс. Положительными аллостерическими эффекторами (активаторами этих ферментов) являются - НАД⁺, АДФ и АМФ; ингибиторами этих ферментов являются НАДН⁺, АТФ, сукцинил Ко А.

Нарушение функционирования данного процесса, изменение концентрации субстратов приводит к различным патологическим процессам, нарушению образования АТФ. Поэтому студенту необходимо знать и понимать всю важность данного процесса, его химизм и регуляцию.

II. Цель деятельности студентов на занятии.

Студент должен знать:

1. Схему катаболизма основных пищевых веществ.
2. Цикл Кребса: последовательность реакций, характеристику ферментов.
3. Связь ЦТК и ЦТЭ. Регуляцию.
4. Анаболическую роль ЦТК.

Студент должен уметь:

1. Определить активность сукцинатдегидрогеназы и изучить конкурентное ее ингибирование.

III. Содержание обучения.

Основные вопросы:

1. Пути унификации энергетических субстратов.
2. Цикл Кребса - общий путь катаболизма белков, жиров, углеводов.
3. Химические реакции цикла трикарбоновых кислот, краткая их характеристика.
4. Ферменты, катализирующие реакции цикла Кребса и краткая их характеристика.
5. Связь реакций цикла Кребса с дыхательной цепью.
6. Постадийный и общий энергетический эффект цикла Креб-

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

Лабораторные работы:

Определение активности сукцинатдегидрогеназы и изучение конкурентного ингибирования.

Наглядные пособия:

Таблицы

Цикл трикарбоновых кислот.

V. Наименование лабораторной работы.

36

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.

Определение активности сукцинатдегидрогеназы и изучение конкурентного ингибирования

Принцип метода: Сукцинатдегидрогеназа в качестве кофер- мента содержит ФАД - флавинадениндинуклеотид. Активность фермента зависит от наличия в нем сульфгидрильных групп (SH) и атомов железа. Действие фермента может происходить и в анаэробных условиях, если к янтарной кислоте добавить 2,6 - дихлор- фенолиндифенол или метиленовый синий, являющийся акцептором водорода и превращающийся в восстановленную бесцветную форму, что и является показателем активности фермента. Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности вызывает малоновая кислота, являющаяся структурным аналогом янтарной кислоты.

Методика выполнения. Мышечную ткань (свежую) около 1 г измельчают ножницами и растирают в ступке

с небольшим количеством воды (2-3 мл) в течение 1 минуты. Затем мышечную кашицу переносят на двойной слой марли, помещенной на воронку, промывают водой, помещают на фильтровальную бумагу и высушивают. В 3 пробирки наливают по 3 мл фосфатного буфера (рН 7,4) и помещают в них по 0,1 г мышечной кашицы. Затем в опытную пробирку добавляют 5 капель 3% раствора янтарной кислоты (для нейтрализации) и 5 капель 0,1 н раствора NaOH, а в контрольную пробирку приливают 10 капель дистиллированной воды, в третью пробирку добавляют 5 капель 3% раствора малоновой кислоты, 5 капель 3% раствора янтарной кислоты и 4 капли 0,1 н раствора NaOH. Во все пробирки добавляют по 1 мл 0,001 н раствора 2,6 - дихлорфенолиндифенола и содержимое пробирок перемешивают, пробы помещают в термостат при 37 °С на 40 минут.

Предполагаемые результаты: В опытной пробирке, жидкость почти бесцветная, сравнивают ее с контролем и с пробиркой, где находится конкурентный ингибитор сукцинатдегидрогеназы - малоновая кислота. Время обесцвечивания 2,6 - дихлор- фенолиндифенола в присутствии янтарной кислоты характеризует активность сукцинатдегидрогеназы.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

VI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Какой общий метаболит образуется из аминокислот, глюкозы и жирных кислот?
2. Какова дальнейшая судьба ацетил КоА?
3. Что такое ЦТК?
4. Почему процесс называется циклическим (циклом)?
5. Где протекает ЦТК?
6. Из скольких стадий состоит ЦТК?
7. Какова катаболическая роль ЦТК?
8. Как происходит регенерация окисленных форм коферментов НАД⁺ и ФАД?
9. Какой фермент среди ферментов ЦТК локализован на внутренней митохондриальной мембране.
10. Напишите стадию ЦТК в ходе которой прямо выделяется энергия метаболизма (субстратное фосфорилирование)
11. Назовите второй путь регенерации ГДФ.
12. Какие ферменты и коферменты участвуют в реакции окислительного декарбоксилирования α-оксоглутаровой кислоты?
13. Какие витамины участвуют в реакциях ЦТК?
14. Назовите регуляторные ферменты ЦТК.
15. Назовите положительные аллостерические эффекторы (активаторы этих ферментов).
16. Назовите ингибиторы этих ферментов.
17. Какова энергоценность ЦТК ?
18. Назовите субстраты, которые являются донорами атомов водорода для функционирования дыхательной цепи.
19. В чем заключается амфиболическая роль ЦТК?
20. Какие последствия может иметь удаление интермедиатов из цикла ЦТК для использования в реакциях синтеза?
21. Как предотвращается такая возможность?
22. Назовите одну из наиболее важных реакций такого типа.

VII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний

вопрос: При катаболизме АМК, глюкозы глицерола и свободных жирных кислот (СЖК) образуется общий метаболит:

1. Пируват.
2. Лактат.
3. Ацетил-Ко-А.
4. Ацетоацетил-КоА.
5. Оксалоацетат.

37

вопрос: В цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) полностью расщепляется:

- Пируват.
- Лактат.
- Ацетил-Ко-А.
- Ацетоацетил-Ко-А.
- 2-оксоглутарат.

вопрос: Метаболическим процессам подобрать соответствующее определение:

- | | |
|--|-----------------------|
| Распад АМК до пирувата. | А. Специфический путь |
| Распад глюкозы до пирувата. | катаболизма. |
| Распад глицерола до пирувата. | Б. Общий путь катабо- |
| Распад СЖК до ацетил-КоА. | лизма. |
| Распад АМК до ацетил-КоА. | В. Ни то, ни друго |
| 6. Превращение пиру вата в ацетил-КоА. | |
| 7. Распад ацетил-КоА до CO_2 и H_2O . | |
| 8. Превращение ацетил-КоА в холестерол | |

4 вопрос: Укажите последовательность (1-8) метаболитов ЦТК.

- | | |
|-------------------|---|
| А. Цитрат | 1 |
| Б. Изо цитрат | 2 |
| В. Сукцинат | 3 |
| Г. Малат | 4 |
| Д. Оксалоацетат. | 5 |
| Е. Фумарат | 6 |
| Ж. Сукцинил-КоА | 7 |
| З. 2-оксoglутарат | 8 |

5 вопрос: Указать локализацию ЦТК в клетке:

1. Плазматическая мембрана.
2. Цитозоль.
3. Митохондриальные мембраны.
4. Митохондриальный матрикс.
5. Эндоплазматический ретикулум (ЭР).

6 вопрос: Составьте пары между субстратами ЦТК и генерируемыми НАДН⁺(Н⁺) И ФАДН₂.

- | | |
|--------------------|------------------------|
| 1. Оксалоацетат | А. ФАДН ₂ . |
| 2. Цитрат | Б. |
| 3. Изоцитрат | В. Ни тот, |
| 4. 2-оксoglутарат. | другой |
| 5. Сукцинил-КоА | Г. Оба. |
| 6. Сукцинат. | |
| 7. Фумарат. | |
| 8. Малат | |

7 вопрос: Какой метаболит ЦТК образует макроэргический фосфат субстратным фосфорилированием:

1. Оксалоацетат.
2. Цитрат. Изоцитрат.
3. 2-оксoglутарат.
4. Сукцинил-КоА.
5. Сукцинат.
6. Фумарат.
7. Малат.

38

8 вопрос. Указать 2 метаболита ЦТК, при декарбоксилировании которых освобождается CO_2 :

1. Оксалоацетат.
2. Цитрат.
3. Изоцитрат.
4. 2-оксoglутарат.
5. Сукцинил Ко А.
6. Сукцинат.
7. Фумарат.

8. Малат.

9 вопрос: Указать неверное положение в катаболической роли ЦТК:

1. Интеграция катаболизма АМК, глюкозы, глицерола, СЖК.
2. Генерация восстановленных коферментов: $\text{НАДН}^+\text{Н}^+$ и ФАДН_2 .
3. Образование 2CO_2 .
4. Образование кетонных тел.
5. Образование I макроэргического фосфата субстратным фосфорилированием.

10 вопрос: Амфиболическая роль ЦТК. Составьте пары между метаболитами ЦТК и синтезируемыми из них веществами.

- | | |
|-------------------|---------------------------|
| 1. Оксалоацетат | А. Гем |
| 2. Цитрат | Б. Минерализованные ткани |
| 3. 2-оксоглутарат | В. Глюкоза |
| 4. Сукцинил-КоА | Г. Аси |
| | Д. Глу Е. СЖК |

11 вопрос: Сколько АТФ может синтезироваться в реакциях ЦТК?

- | | | |
|--------------------------|-----------|--------------|
| 1. Оксалоацетат - цитрат | А - 3 АТФ | |
| 2. Цитрат - изо цитрат | Б - 2 АТФ | |
| 3. Изоцитрат - 2- | В - 1 АТФ | оксоглутарат |
| 4. 2-оксоглутарат - | Г - Ни | сукцинил-КоА |
| 5. Сукцинил-КоА - | одной | сукцинат |
| 6. Сукцинат - фумарат | | |
| 7. Фу марат - малат | | |
| 8. Малат - оксалоацетат | | |

Ответы на тестовые задания

- 1 вопрос: 3.
- 2 вопрос: 3.
- 3 вопрос: 1-А, 2-А, 3-А, 4-А, 5-А, 6-Б, 7-Б, 8-В.
- 4 вопрос: 1-Д, 2-А, 3-Б, 4-З, 5-Ж, 6-В, 7-Е, 8-Г.
- 5 вопрос: 4.
- 6 вопрос: 1-В, 2-В, 3-Б. 4-Б, 5-В, 6-А, 7-В, 8-Б.
- 7 вопрос: 5.
- 8 вопрос: 3 и 4.
- 9 вопрос: 4.
- 10 вопрос: 1-В, 1-Г, 2-Б, 2-Е. 3-Д, 4-А.
- 11 вопрос: 1-Г, 2-Г, 3-А, 4-А. 5-В, 6-Б, 7-Г, 8-А.

VIII. Хронокарта учебного занятия

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключка – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
5. Опрос – 10 минут.
6. Проведение лабораторной работы – 30 мин.
7. Оформление протоколов – 10 мин

39

IX. Самостоятельная работа студентов

1. Анаболическая функция ЦТК
2. Изменение ЦТК в условиях гипоксии

Х. Список используемой литературы:

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980.
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 13

Тема: ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ. ЕГО РОЛЬ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ.
МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ КИСЛОРОДА В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ.
АНТИОКСИДАНТЫ КАК ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ. НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ТЕМЫ:

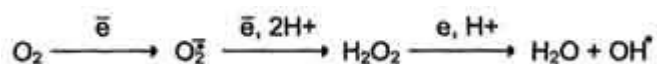
I. Научно-методическое обоснование темы:

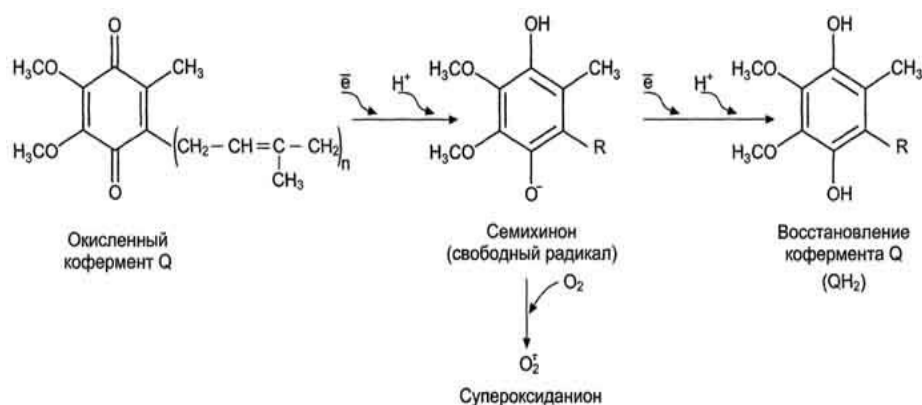
Кислород, необходимый аэробным организмам для функционирования ЦПЭ и различных других реакций, может проявлять разную степень окисления, приобретая высокую реакционную активность. Это токсические формы кислорода, и в организме они представлены:

- $\text{OH}^\bullet$ - гидроксильный радикал;
- $\text{O}_2^\bullet$ - супероксидный анион;
- H_2O_2 - пероксид водорода.

В стабильном состоянии в организме кислород находится в виде молекулярного кислорода и кислорода воды (O_2 и H_2O). Эндогенная вода образуется в ЦПЭ при восстановлении молекулы кислорода 4-мя электронами. Однако транспорт электронов осуществляется последовательно, по 1 электрону, что способствует образованию промежуточных активных радикалов, способных взаимодействовать с O_2 , образуя токсические его формы. Например, семихинон. Кофермент Q в ЦПЭ принимает от доноров последовательно по одному электрону, превращаясь в форму семихинона.

Этот радикал может непосредственно взаимодействовать с кислородом, образуя супероксидный анион, который, в свою очередь, может превращаться в другие активные формы кислорода:





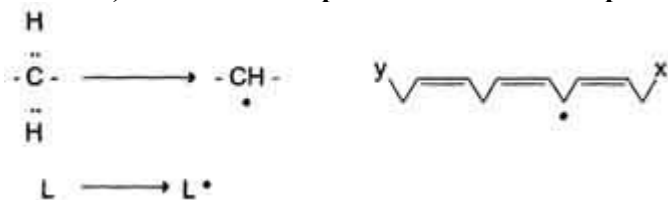
Активные формы кислорода образуются также при микросомальном окислении, фагоцитозе, катаболизме некоторых метаболитов. Активные формы кислорода при взаимодействии с большинством органических молекул отнимают от них электрон, инициируют таким образом цепные реакции окисления.

Перекисное окисление липидов

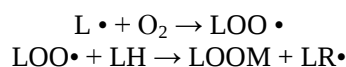
ПОЛ - цепные реакции, обеспечивающие расширенное воспроизводство свободных радикалов, частиц, имеющих неспаренный электрон, которые инициируют дальнейшее распространение перекисного окисления.

Стадии перекисного окисления липидов

1) Инициация: образование свободного радикала (L•)



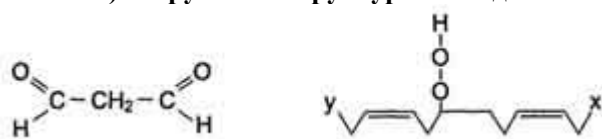
2) Развитие цепи:



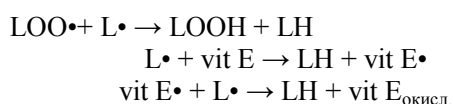
Развитие цепи происходит при присоединении O₂, в результате чего образуется липопероксид L• или пероксид липида LOOH.

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

3) Разрушение структуры липидов



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.

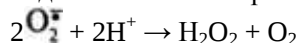
Повреждение клеток в результате перекрестного окисления липидов

Активные формы кислорода повреждают структуру ДНК, белков и различные мембранные структуры клеток. В результате появления в гидрофобном слое мембран гидрофильных зон за счёт образования гидропероксидов жирных кислот в клетки могут проникать вода, ионы натрия, кальция, что приводит к набуханию клеток, органелл и их разрушению.

Ферменты антиоксидантного действия

К ферментам, защищающим клетки от действия активных форм кислорода, относят супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу; Наиболее активны эти ферменты в печени, надпочечниках и почках, где

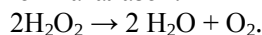
содержание митохондрий, цитохрома P₄₅₀ и пероксисом особенно велико. Супероксиддисмутаза (СОД) превращает супероксидные анионы в пероксид водорода:



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.

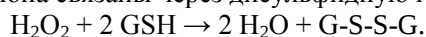
СОД - индуцируемый фермент, т.е. синтез его увеличивается, если в клетках активируется перекисное окисление.

Пероксид водорода, который может инициировать образование самой активной формы $\text{OH}^{\cdot}$, разрушается ферментом каталазой:



Каталаза находится в основном в пероксисомах, где образуется наибольшее количество пероксида водорода, а также в лейкоцитах, где она защищает клетки от последствий "респираторного взрыва" (см. раздел 6).

Глутатионпероксидаза - важнейший фермент, обеспечивающий инактивацию активных форм кислорода, так как он разрушает и пероксид водорода и гидропероксиды липидов. Он катализирует восстановление пероксидов с помощью трипептида глутатиона (γ -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. Источником восстановительных эквивалентов для этого фермента является пентозофосфатный цикл.

Витамины, обладающие антиоксидантным действием

Витамин Е (α -токоферол) - наиболее распространенный антиоксидант в природе.

Витамин С (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 - $\text{O}_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $\text{OH}^{\cdot}$ и инактивирует их.

β -Каротин, предшественник витамина А, также обладает антиоксидантным действием и ингибирует ПОЛ.

II. Цель деятельности студентов на занятии

Студент должен знать

1. Токсические формы кислорода.
2. Перекисное окисление липидов. Стадии.
3. Обезвреживание токсических форм кислорода.

III. Студент должен уметь:

1. Написать стадии перекисного окисления липидов
2. Определить активность каталазы в сыворотке крови
3. Написать и объяснить механизм антиоксидантной защиты витаминов Е и С.

IV. Содержание обучения.

Основные вопросы:

1. Активные формы кислорода
2. Источники активных форм кислорода
3. Перекисное окисление липидов
4. Стадии перекисного окисления липидов (инициация, образование свободного радикала ($\text{L}^{\cdot}$), развитие цепи, разрушение структуры липидов)
5. Повреждение клеток в результате перекрестного окисления липидов
6. Системы защиты клеток от активных форм кислорода (ферментативные и неферментативные звенья антиоксидантной защиты).

Лабораторная работа №1

Количественное определение каталазы методом Баха и Зубковой

Принцип метода: в основе количественного определения каталазы лежит определение количества перекиси водорода, разложенной ферментом за определенный промежуток времени.

Активность каталазы выражают с помощью каталазного числа, которым называют количество миллиграммов H_2O_2 , которое образуется из 1 мкл крови.

А – количество 0,1 н раствора KMnO_4 , израсходованное на титрование контрольной пробы в мл;

В – количество 0,1 н раствора KMnO_4 , израсходованное на титрование опытной пробы в мл;

1,7 – это количество в мг H_2O_2 , содержащееся в одном мл 0,1 н раствора

Ход работы: разведенную кровь (1: 1000) взбалтывают, наливают по 1 мл в две колбы, приливают по 7 мл дистиллированной воды; в опытную пробу добавляют 2 мл 1% H_2O_2 , а в контрольную – 5 мл 10% раствора H_2SO_4 . Действие каталазы в кислой среде (контрольная проба) прекращается, так как она действует при pH 7,4. Колбы оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем приливают в опытную колбу 5 мл 10% раствора H_2SO_4 , а в контрольную – 2 мл 1% раствора H_2O_2 . Содержимое каждой колбы титруют 0,1 н раствором KMnO_4 до розовой окраски. Рассчитывают каталазное число (КЧ) по формуле :

$\text{КЧ} = (\text{А} - \text{В}) \times 1,7$. Умножая 1,7 на разность (А-В), получают количество мг H_2O_2 , которое разлагается 1 мкл исследуемой крови – каталазное число колеблется от 10 до 15 единиц.

V. Хронокарта учебного занятия

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключки – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
5. Опрос – 10 минут.
6. Проведение лабораторной работы – 30 мин.
7. Оформление протоколов – 10 мин.

VI. Вопросы для самостоятельного изучения

VII. Список используемой литературы:

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А. Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А. Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия». 1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980.
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 14.

Вопросы для подготовки к модулю №2 по разделу:

«БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ. ВИТАМИНЫ. ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ. БИОЭНЕРГЕТИКА. МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ»

1. Классификация витаминов.
2. Методы определения витаминов.
3. Структура и биологическая роль витамина В₁ (тиамина), В₆.
4. Химическая природа, биологическая роль витамина В₂ (рибофлавин).
5. Витамин РР (амид никотиновой кислоты), биологическая роль, структура.
6. Жирорастворимые витамины (А, Д, Е, К).
7. Что такое биологическое окисление?
8. Дыхательная цепь.
9. Ферменты и коферменты дыхательной цепи. Водород переносящие и электронпереносящие участки дыхательной цепи.
10. Окислительное фосфорилирование.
11. Макроэргические соединения.
12. Сопряжение процесса дыхания и окислительного фосфорилирования.
13. Сущность хемоосмотической теории сопряжения переноса электронов с синтезом АТФ.
14. Роль витаминов в процессе биологического окисления.
15. Витамины В₂ и В₅, их структура и биологическая роль.
16. Убихинон или коэнзимQ, его структура и роль его в биологическом окислении.
17. Структура и функции цитохромов.
18. Внутриклеточная локализация ферментов дыхательной цепи.
19. Общие пути катаболизма углеводов, жиров, белков.
20. Цикл трикарбоновых кислот. Реакции цикла.
21. Характеристика ферментов ЦТК.
22. Пути образования оксалоацетата.
23. Субстратное фосфорилирование в ЦТК.
24. Регуляция ЦТК.
25. Энергетический баланс ЦТК.
26. Анаболическая функция ЦТК.
27. Разобщители биологического окисления окислительного фосфорилирования.
28. Роль мембран в метаболизме и их разнообразие
29. Строение и состав мембраны эукариотических клеток;
30. Функции клеточных мембран;
31. Основные принципы организации мембранных липидов и белков, липопротеиновый комплекс клеточных мембран;
32. Молекулярная организация биологических мембран;
33. Биосинтез биологических мембран.
34. Методы выделения мембран: разрушение клеток, разделение мембран; разделение и анализ липидных компонентов мембран; выделение и модификацию мембраносвязанных компонентов.

РАЗДЕЛ III. «СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ В ОРГАНИЗМЕ»

ЗАНЯТИЕ № 15

Тема: СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ. ОСНОВНЫЕ ПУТИ КАТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ. ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ.

I. Научно-методическое обоснование темы:

Углеводы являются полиоксиальдегидами (альдозы) или полиоксикетонами (кетозы) и их производными. Большинство углеводов имеют эмпирическую формулу (СН₂O)_n, но не все они удовлетворяют этому соотношению. В организме человека и высших животных углеводы выполняют прежде всего энергетическую и пластическую функции, они также необходимы для функционирования генетического аппарата (пентозы в нуклеиновых кислотах) для биологического катализа (пентозы в коферментах), для детоксикационных процессов (парные синтезы с участием глюкуроновой кислоты), для иммунологических регуляторных процессов (углеводы в составе иммуноглобулинов, рецепторов и ряда гормонов), для смазки трущихся поверхностей. По химической структуре углеводы делят на три основных класса: моносахариды, олигосахариды и полисахариды.



триозы (C₃)
 тетрозы (C₄)
 пентозы (C₅)
 гексозы (C₆)
 гептозы (C₇)

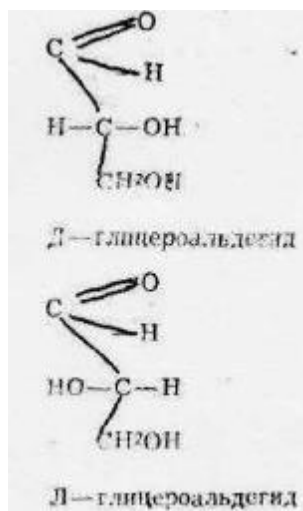
Моносахариды - это простейшие углеводы, в названии которых имеется окончание «-оза».

Наиболее распространены альдозы: D-глицериновый альдегид, D-эритроза, D-рибоза, D-глюкоза, D-манноза, D-галактоза.

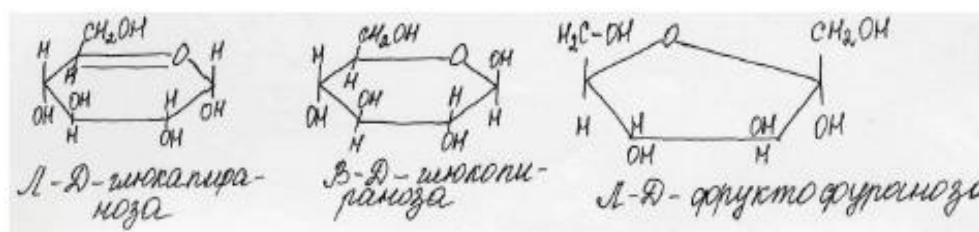


Изомерия моносахаридов обусловлена: наличием альдегидной и кетонной группы (альдозы и кетозы), присутствием центра (возникновением оптически активных стереоизомеров (D и L формы), образованием циклических структур, появлением аномерного хирального атома углевода в процессе циклизации (α и β -аномеры), возможностью вращения атомных групп вокруг оди-нарных связей (конформационная изомерия).

D и L-конфигурации (зеркальные изомеры) отличаются расположением гидроксильной группы у последнего хирального атома углерода. Обе конфигурации могут быть в виде левовращающего (-) и правовращающего (+) изомера.



Все природные углеводы, в основном D-ряда. Моносахариды (C_6 и выше) как гетерофункциональные соединения способны на внутримолекулярное взаимодействие между карбонильной и спиртовой группой с образованием циклических полуацеталей шестичленных и пятичленных фураноз. Каждый твердый препарат углеводов представляет собой какую-либо циклическую форму, но при растворении эта форма может превращаться в другие циклические структуры до достижения определенного их соотношения, при этом меняется величина удельного вращения раствора этот процесс называется муларотацией. Например, глюкоза находится в растворе преимущественно в виде L- и β -глюкопираноз, а фруктоза больше в виде фуранозного цикла.



Полуацетатный гидроксил альдоз отличается реакционной способностью и может замещаться с образованием гликозидов.

Наиболее распространенные олигосахара - дисахариды, состоящие из двух моносахаридов, соединенных гликозидной связью. Мальтоза (солодовый сахар) - состоит из двух остатков α -D-глюкопираноз, соединенных α -1-4-гликозидной связью, лактоза (молочный сахар) состоит из остатка α -D-глюкозы и β -D- галактозы, соединенных 1,4-гликозидной связью. И мальтоза, и лактоза имеют свободный полуацетальный гидроксил и обладают редуцирующими свойствами. В отличие от них сахароза (тростниковый или свекольный сахар) не имеет свободной полуацетальной группы, состоит из остатков α -D-глюкопиранозы β -D- фруктофуранозы, не обладает редуцирующими свойствами.

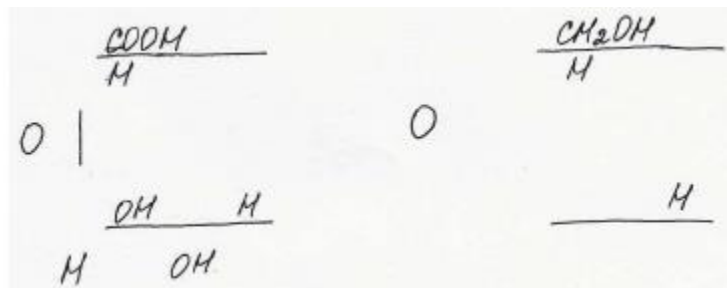
К сложным углеводам относятся полисахариды, которые делятся на гомополисахариды (состоят из одинаковых остатков моносахаридов); кислые и нейтральные гетерополисахариды (состоящие из мономерных единиц разного типа). Наиболее распространенные гомополисахариды - это резервный полисахарид растений - крахмал, состоит смеси двух полимеров α -D-глюкозы, неразветвленной амилозы (с α -1-4 гликозидной связью), и разветвленного амилопектина (где остатки глюкозы соединены α -1,4 гликозидной связью, а в местах ветвления α -1,6 гликозидной связью).

Гликоген (резервный полисахарид человека и высших животных) подобен по своей структуре амилопектину, но более разветвлен и компактен (содержится в печени и мышцах).

Клетчатка (целлюлоза) - самый распространенный на земле углевод растений - полисахарид, образованный β -D-глюкозой, соединенных β -1,4 гликозидной связью, в виде неразветвленной цепи.

Полисахаридбелковые комплексы - делятся на протеоглики (до 95% их массы приходится на долю углеводного компонента) и гликопротеины, в которых доля углеводной массы составляет несколько %. В протеогликах углеводный компонент является полисахаридом (кислые гликозамингликаны) содержащие

уроновые кислоты, часто и серную кислоту, представляют собой длинные линейные цепи с повторяющимися дисахаридными фрагментами. Связь с белковой молекулой как ковалентная, так и нековалентная. В состав кислых гликозаминогликанов могут входить гексозамины, уроновые кислоты, уксусная кислота, серная кислота, небольшое количество гексоз (галактоза и иногда сиаловые кислоты). *Гиалуроновая кислота* состоит из чередующихся (ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, связанных β -1-4 и β -1-3 гликозидными связями. Общее число мономерных единиц (в молекуле гиалуроновой кислоты) достигает нескольких тысяч, участвует в образовании протеогликановых агрегатов, находящихся в межклеточном веществе соединительной ткани кожи, хряща и др. тканей. Фрагмент гиалуроновой кислоты:



Протеогликановые агрегаты включают в себя полипептидные цепи, хондроитинсульфат, кератансульфат, гепарин и т. д.

Кератансульфат включает в свою структуру ацетилглюкозамин, серную кислоту, галактозамин, сиаловые кислоты (связь β (1-4) и (3 (1-3)). *Гепарин* состоит из глюкуронат-сульфата, ацетилглюкозаминсульфата, уроновой и идуруновой кислоты. Обнаруживается гепарин во многих тканях.

Протеогликановые агрегаты включают в себя полипептидные цепи, хондроитинсульфат, кератансульфат, гепарин и т. д.

Кератансульфат включает в свою структуру ацетилглюкозамин, серную кислоту, галактозамин, сиаловые кислоты (связь β (1-4) и (3 (1-3)). *Гепарин* состоит из глюкуронат-сульфата, ацетилглюкозаминсульфата, уроновой и идуруновой кислоты. Обнаруживается гепарин во многих тканях.

ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ВСАСЫВАНИЕ УГЛЕВОДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ.

Многие ткани обладают специфической потребностью в глюкозе, которая не обязательно должна поступать с пищей, поскольку в нее легко превращаются другие пищевые углеводы в процессе переваривания. Суточная потребность организма в углеводах составляет 6-7 г. на кг массы тела, а минимальное дневное потребление, предотвращающее кетоз и потерю мышечного белка у человека - 50-100 г. Грудной ребенок должен получать 10-15 г. углеводов на 1 кг/массы тела. Дети старшего школьного возраста - 15 г на кг тела при усиленной мышечной работе. Основным источником углеводов является пища растительного и животного происхождения. Мучные изделия, крупы и картофель поставляют крахмал, пищевой сахар и свекла - сахарозу, злаки - мальтозу, фрукты и мед - фруктозу и глюкозу. Продукты животного происхождения являются источниками лактозы и гликогена.

Пищевые дисахариды (мальтоза, лактоза, сахароза) и полисахариды (крахмал и гликоген) гидролизуются гликозидазами пищеварительного тракта до мономеров. Полисахариды подвергаются этому процессу ступенчато и поэтому освобождение глюкозы происходит постепенно. Крахмал начинает гидролизываться в ротовой полости амилазой слюны, которая секретируется слюнными железами, до крупномолекулярных декстринов, т. к. фермент атакует внутренние гликозидные связи. После попадания пищи в желудок действие слюнной амилазы прекращается, т.к. пищевой комок пропитывается кислотой, инактивирующей фермент (рН - оптимум амилазы - 6,9-7,0). Крахмал, декстрины, гликоген перевариваются до мономеров в тонком кишечнике панкреатической амилазой до олигосахаридов (разрушаются 1,4 гликозидные связи). Сохранившиеся в точках ветвления 1,6 гликозидные связи гидролизуются панкреатическими амило-1,6- или олиго-1,6- гликозидазами. Мальтоза, лактоза и сахароза гидролизуются соответственно мальтазой, лактазой, сахаразой, синтезированными клетками кишечника на поверхности клеточных мембран (пристеночное пищеварение) или внутриклеточно.

Продуктами полного переваривания углеводов пищи являются: глюкоза, фруктоза, галактоза.

Трансцеллюлярный транспорт моносахаридов включает в себя пассивную диффузию и вторично активный транспорт. Пассивно диффундируют молекулы пентоз (кроме ксилоры), а также спирты. Вторично-активный транспорт характерен для галактозы, глюкозы, фруктозы, маннозы и ксилоры. Через мукозную поверхность моносахариды абсорбируются по градиенту концентрации из полости тонкого кишечника в энтероцит. Для ускорения этого переноса функционируют специализированные мембранные белковые переносчики. Этот процесс является облегченной диффузией. Сульфгидрильная группа переносчика гликозилируется на наружной поверхности апикальной мембраны энтероцита, а к другому участку переносчика присоединяется ион Na^+ . В результате меняется конформация переносчика и глюкоза транспортируется в энтероцит. Эффективность всасывания происходит с различными скоростями. По уменьшению скорости всасывания моносахариды распределяются следующим образом: галактоза - глюкоза - фруктоза - манноза - ксилоры - арабиноза. Глюкоза, галактоза и ксилоры переносятся одной и той же транспортной системой, что объясняет существование конкурентного торможения всасывания (например, галактоза подавляет транспорт глюкозы).

Через базолатеральную мембрану энтероцита Na^+ активно выталкивается АТФазой за счет энергии гидролиза АТФ, создается градиент, обратный направлению транспорта глюкозы в клетку. Эта энергия гидролиза

АТФ используется и для транспорта глюкозы

Таким образом, активный перенос глюкозы через базолатеральную мембрану энтероцита обеспечивается энергосистемами натриевого насоса против градиента концентрации. Этот механизм активного транспорта сходен с ферментативными процессами связывания субстрата с активным центром специализированного белка, скорость соответствующих реакций зависит от концентрации белка-фермента или белка-носителя, то есть для них

характерен феномен «насыщения». Различие заключается в том, что при активном транспорте субстрат не изменяется, тогда как при ферментативной реакции субстрат превращается в продукт реакции.

В процессе всасывания моносахариды попадают из энтероцита в портальную систему и печень. Важнейшие пищевые гексозы

- глюкоза, галактоза, фруктоза, манноза могут взаимопревращаться друг в друга в энтероците и особенно интенсивно в печени.

Галактоземия - это врожденное наследственное заболевание, связанное, с недостаточной активностью в печени фермента гексоза-1-фосфатуридилтрансферазы. Вследствие дефицита этого фермента галактоза, поступающая в организм новорожденного в составе лактозы материнского молока не превращается в глюкозу, концентрация ее в крови повышается и она в тканях восстанавливается альдозоредуктазой в токсический спирт - галактит (дульцит). В результате развивается задержка роста, катаракта (помутнение хрусталика глаза), умственная отсталость. Ребенок специально переводится на безгалактозную диету. При этом необходимая для синтеза гетерополисахаридов и гликопротеидов активная УДФ-галактоза образуется в нужных количествах из УДФ-глюкозы с помощью фермента - эпимеразы.

II. Цель деятельности студентов на занятии.

Студент должен знать:

1. Классификацию углеводов.
2. Строение моносахаридов, их свойства.
3. Производные моносахаридов - аминсахара.
4. Строение и свойства олигосахаридов (ди-, три- и т.д.).
5. Структурную организацию, свойства и биологическую роль представителей гомо- и гетерополисахаридов.
6. Значение углеводов для организма, включая энергетическое значение.
7. Ферменты, необходимые для гидролитического расщепления углеводов в желудочно-кишечном тракте.
8. Значение полостного и пристеночного пищеварения.
9. Особенности пристеночного пищеварения.
10. Продукты всасывания и взаимопревращения гексоз в гепатоците.

Студент должен уметь:

1. Определять активность амилазы.
2. Интерпретировать полученные результаты.
3. Сделать соответствующие выводы.

III. Содержание обучения:

Основные вопросы:

1. Классификация углеводов.
2. Строение моносахаридов.
3. Производные моносахаридов - аминсахара.
4. Олигосахариды, их структура и свойства.
5. Классификация полисахаридов. Структурная организация, свойства и биологическое значение представителей гомо- и гетерополисахаридов.
6. Основные углеводы пищи, суточная потребность.
7. Переваривание углеводов, ферменты, участвующие в этом процессе.
8. Понятие о полостном и пристеночном пищеварении.
9. Всасывание продуктов расщепления углеводов.
10. Реакции изомерных превращений гексоз.

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

Лабораторные работы.

Восстанавливающие свойства дисахаридов.

Гидролиз сахарозы.

Цветные реакции на крахмал и гликоген.

Действие амилазы поджелудочной железы на крахмал

Наглядные пособия:

Таблицы

V. Наименование лабораторной работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.

Реакция Троммера

Принцип метода: Восстанавливающие свойства моносахаридов. Все моносахариды обладают способностью восстанавливать в щелочной среде ионы меди, висмута, серебра и др. Реакция эта обусловлена наличием в молекуле моносахаридов альдегидной группы, которая чрезвычайно легко окисляется, превращаясь в карбоксильную группу, вызывая, тем самым, восстановление металлов.

Порядок выполнения работы: В микрохимической пробирке смешивают по 2 капли исследуемой жидкости и раствора едкого натра. Прибавляют возможно малую каплю раствора сульфата меди и нагревают пробирку.

Предполагаемые результаты: Появляется желтое окрашивание. При дальнейшем нагревании возникает оранжевое, а затем красное окрашивание жидкости (образование закиси меди).

Выполняется обсуждение результатов и делается вывод.

Реакция Фелинга.

Порядок выполнения работы. Жидкость Фелинга содержит сульфат меди, едкий натр и сегнетову соль. В микрохимическую пробирку вводят 3 капли исследуемой жидкости. Добавляют каплю реактива Фелинга и нагревают.

Предполагаемые результаты: Появится желтое или оранжевое окрашивание.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3.

Восстанавливающие свойства дисахаридов

Принцип работы: Дисахариды, имеющие свободный гликозидный гидроксил (мальтоза, лактоза), дают реакции восстановления металлов. Дисахарид сахароза, не имеющий свободного гликозидного гидроксила, не дает этих реакций.

Порядок выполнения работы. Берут 3 микрохимические пробирки, в первую из них наливают 3 капли раствора мальтозы, во вторую - столько же раствора лактозы, а в третью - сахарозы. С содержимым каждой пробирки проводят реакцию Троммера. Для этого добавляют в каждую пробирку по 1 капле раствора сульфата меди и по 2 капли раствора едкого натра.

Предполагаемые результаты: В первой и второй пробирках, где находились дисахариды мальтоза и лактоза, произойдет восстановление меди (появится желтое или красное окрашивание). В третьей пробирке, где налит раствор сахарозы, восстановления нет.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

Гидролиз сахарозы.

В микрохимическую пробирку вносят 3-4 капли раствора сахарозы и 2 капли серной кислоты, нагревают пробирку до кипения. После 1-2 минут нагревания пробирку охлаждают, добавляют

6 капли раствора едкого натра и 1 каплю раствора сульфата меди. Нагревают жидкость до кипения. Освободившиеся при гидролизе моносахариды восстанавливают медь, давая желтое или красное окрашивание.

Предполагаемые результаты: Отмечается желтое или красное окрашивание.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3.

Цветные реакции на крахмал и гликоген

Принцип работы: В качестве реактива на крахмал и гликоген используется раствор Люголя. Он представляет собой раствор йода и йодистого калия в воде (напомним, что йод образует с йодистым калием легко растворимый в воде комплекс). Крахмал окрашивается раствором Люголя в синий цвет, а гликоген в красно-бурый.

Порядок выполнения работы. Вводят в микрохимическую пробирку 3 капли раствора крахмала, прибавляют каплю раствора Люголя, отмечают красно-бурое окрашивание. Сопоставляют это окрашивание с окраской, возникающей при смешивании в пробирке трех капель воды с каплей раствора Люголя.

Предполагаемые результаты: Появится красно-бурое окрашивание.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Действие амилазы поджелудочной железы на крахмал

Принцип метода: метод основан на определении промежуточных продуктов расщепления крахмала - декстринов, которые по разному окрашиваются реактивом Люголя и конечного продукта - глюкозы по ее способности восстанавливать реактив Фелинга.

Порядок выполнения работы: В две микрохимические пробирки вносят по 10 капель вытяжки из поджелудочной железы. Содержимое одной пробирки кипятят над спиртовкой, охлаждают. Затем в обе пробирки вносят по 5 капель раствора крахмала и по капле раствора хлористого натрия (активатор амилазы). Пробирки помещают в водяную баню при 37°C. Через каждые 5 минут гидролизат отбирают в отдельные пробирки и реактивом Люголя проверяют появление декстринов по характерному окрашиванию. С остатком гидролизата ставят реакцию Фелинга.

Продукты расщепления крахмала	Результат	
	Окрашивание реактивом Люголя	Реакция Фелинга
Амилодекстрины	Синее	Осадок + CH_2O красного цвета
Эритродекстрины	Красное	
Ахродекстрины	Не окрашиваются	
Мальтодекстрины	Не окрашиваются	
Глюкоза		

VI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний.

1. Классификация углеводов.
2. Моносахариды (альдозы и кетозы). Структура, представители, свойства.
3. Дисахариды. Их представители, структура и свойства.
4. Классификация полисахаридов.
5. Гомополисахариды (крахмал, гликоген, клетчатка). Их структура, свойства, биологическая роль.
6. Энергетическая ценность углеводов.
7. Характеристика амилазных ферментов и их специфичность.
8. Механизм транспорта органических веществ через полу-проницаемые мембраны (пассивная диффузия и активный транспорт).

VII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний.

1. Классификация углеводов.
2. Назовите основные представители моносахаридов.
3. Структура и свойства моносахаридов.
4. Назовите основные представители дисахаридов.
5. Структура и свойства дисахаридов.
6. Структура и свойства крахмала и гликогена.
7. Гетерополисахариды. Основные представители, их биологическая роль.
8. Энергетическая ценность углеводов пищи.
9. Характеристика ферментов, расщепляющих пищевые углеводы в желудочно-кишечном тракте.
10. Понятие о полостном и пристеночном пищеварении и его роль в процессах всасывания.
11. Механизм транспорта моносахаридов из полости кишечника в энтероцит.
12. Вторично активный транспорт моносахаридов в кровь.
13. Реакции взаимопревращения галактозы и фруктозы в глюкозу.
14. Глюкоза - конечный продукт расщепления пищевых углеводов.

VIII. Хронокарта учебного занятия

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключки – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
5. Опрос – 10 минут.
6. Проведение лабораторной работы – 30 мин.
7. Оформление протоколов – 10 мин.

Х. Самостоятельная работа.

1. Свойства и распространение гликогена как резервного поли-сахарида.
2. Участие гиалуроновой и хондроитинсерной кислот в органи-зации и функции межклеточного вещества.
3. Пристеночное переваривание углеводов

ХІ. Список используемой литературы:

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г.Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

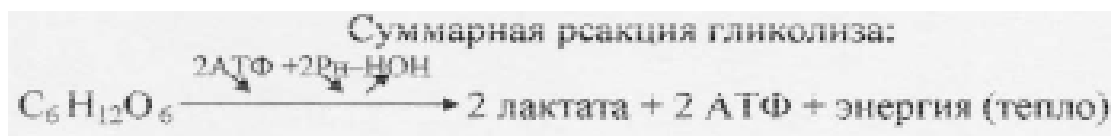
1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980.
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А.Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ №16

Тема: АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ.

І. Научно-методическое обоснование темы:

Распад углеводов в клетке является основным (до 56 %) источником энергии для процесса жизнедеятельности. В зависимости от доступности и участия или неучастия кислорода распад углеводов может быть аэробным и анаэробным. В организме человека протекают следующие виды анаэробного окисления глюкозы: гликолиз, гликогенолиз и брожение. Анаэробный гликолиз является основным путем образования энергии в работающей скелетной мышце в условиях дефицита кислорода в эмбриональной ткани, в первые дни постнатального периода, в эритроцитах и клетках злокачественного роста. Ферменты, катализирующие реакции гликолиза, локализованы в гиалоплазме.

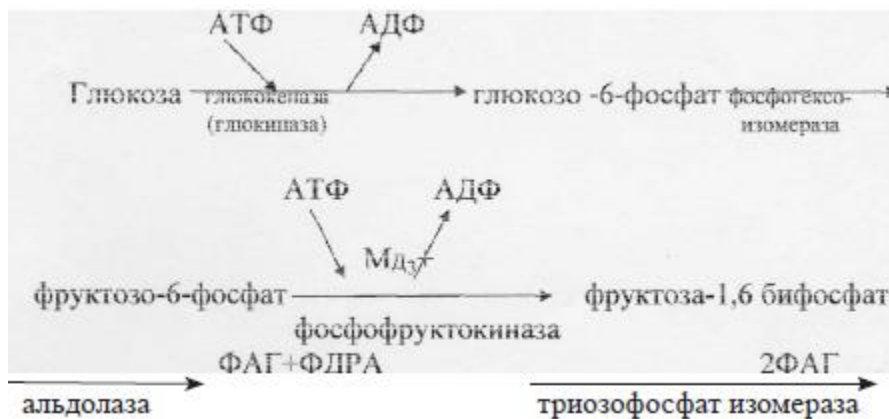


Реакции гликолиза протекают в две стадии:

1. Подготовительная.
2. Окислительная.

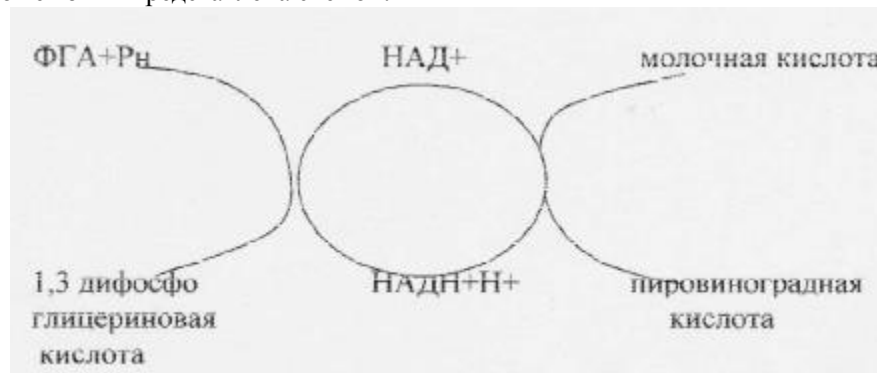
Подготовительная стадия включает в себя:

1. Активацию гексозы с образованием фруктозо-1,6 - дифосфата;
2. Дихотомический распад активированной гексозы пополам с возникновением двух фосфотриоз: фосфоглицеринового альдегида (ФГА) и фосфодиоксиацетона (ФДОА);
3. Реакции изомеризации указанных фосфотриоз, завершающие первую стадию гликолиза:



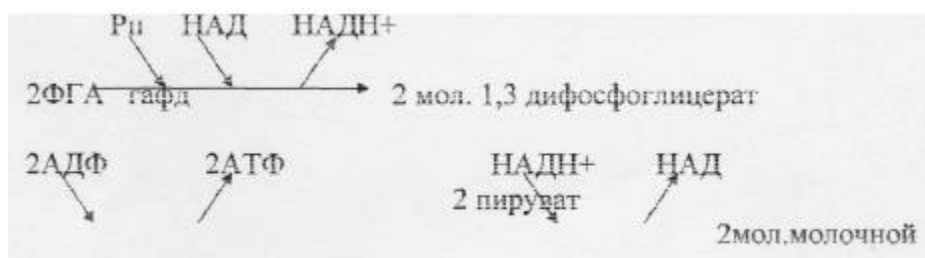
Окислительная стадия гликолиза начинается с НАД-зависимой глицеральдегидфосфат-дегидрогеназной реакции, в которой ФГА окисляется до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты с одно-временным образованием НАДН+(Н+), восстанавливающим в лактатдегидрогеназной реакции пируват в лактат.

Сопряженное взаимодействие между указанными реакциями гликолиза - «гликолитическая оксидоредукция» - может быть представлена схемой:



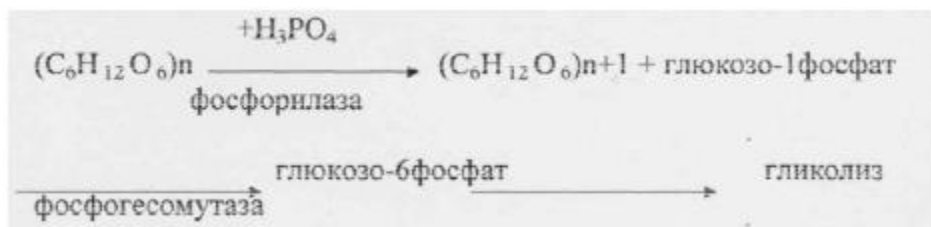
Окисление ФГА сопровождается фосфорилированием, пере-распределением энергии и образованием макроэргической связи с последующим синтезом 2 АТФ путем первого субстратного фосфорилирования. Внутримолекулярное окисление фосфоглицерата (енолазная реакция), ведет к возникновению макроэргической связи и второму субстратному фосфорилированию с синтезом 1 молекулы АТФ.

Восстановление пирувата в лактат - конечный продукт гликолиза.



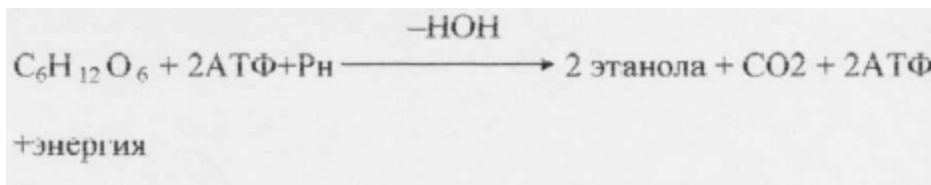
Лактат из мышечной клетки диффундирует в кровь, из которой его поглощают сердечная мышца и печень. Сердечная мышца окисляет лактат в пируват и расщепляет дальше через ЦТК, извлекая энергию для сократительной функции. Печень может не только подвергать молочную кислоту окислительному распаду, но и превращать ее в глюкозу.

Гликогенолизом обозначается процесс распада гликогена, который начинается с отщепления в фосфорилазной реакции глюкозо-1-фосфата, в которой фосфоглюкомутазой глюкоза-1-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат, включающийся в гликолиз.



Следовательно, в подготовительной стадии гликогенолиза, в фосфофруктокиназной реакции, расходуется только 1 мол АТФ.

Под брожением понимаем распад глюкозы микроорганизма-ми в анаэробных условиях. Анаэробное окисление в этом процес-се завершается образованием этанола:



Биологическая роль процессов брожения состоит в том, что микроорганизмы, расщепляя своими ферментами углеводы, получают аккумулированную в АТФ энергию, которую они исполь-зуют для своей жизнедеятельности. В организме человека процес-с брожения происходит в толстом кишечнике.

Биологическая роль гликолиза заключается в том, что ин-тенсивно работающие мышцы в условиях недостаточно обеспе-чивающих их кислородом, получают значительное количество энергии: в процессе гликолиза путем субстратного фосфорили- рования синтезируется 4 АТФ. Так как в начале процесса 2 АТФ расходуется на активирование гексозы, то накопление составляет 2 АТФ на каждую молекулу расщепившейся глюкозы. В процессе гликогенолиза путем субстратного фосфорилирования синтези-руется 4 АТФ, расходуется 1 АТФ, чистый прирост - 3 АТФ на 1 мол распада гликогена.

II. Цель деятельности студентов на занятии.

Студент должен знать:

1. Пути расходования глюкозы в организме.
2. Характеристику анаэробного распада глюкозы (характерис-тику подготовительного этапа).
1. Ферменты гликолиза.
2. Гликолитическую оксидоредукцию.
3. Субстратное фосфорилирование, как источник образования энергии при гликолизе.
4. Энергетический выход гликолиза.

Студент должен уметь:

1. Открывать конечные продукты гликолиза.
2. Интерпретировать соответствующие результаты и выводы.

III. Содержание обучения.

Основные вопросы:

1. Общая схема источников и путей расходования глюкозы в организме.
2. Анаэробный распад глюкозы, гликогенолиз. Ферменты гликолиза, их локализация. Гликолитическая оксидоредукция; пируват, как акцептор водорода.
3. Субстратное фосфорилирование при гликолизе.
4. Распределение и физиологическое значение анаэробного распада глюкозы. Энергетический выход гликолиза.

IV. Перечень лабораторных работ, наглядных пособий исредств ТСО

Лабораторные работы:

1. Качественная реакция на молочную кислоту (реакция Уф- фельмана).

V. Наименование лабораторной работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.

Качественная реакция на молочную кислоту (реакция Уффельмана)

Принцип метода: Молочная кислота в присутствии фенол-лята железа (реактив Уффельмана), окрашенного в фиолетовый цвет, образует лактат желто-зеленого цвета.

Порядок выполнения работы: Мышцы измельчают ножницами и растирают их в ступке с небольшим количеством кварцевого песка в течение 3 минут, прибавив 5 капель воды до получения однородной массы. Затем приливают 3 мл воды, перемешивают и фильтруют через смоченную водой вату. 15 капель фильтрата добавляют по каплям к реактиву Уффельмана.

Предполагаемые результаты: В присутствии молочной кислоты фиолетовая окраска жидкости переходит в желто-зеленую, т.к. образуется лактат.

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы

VI. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Экзэргонические и эндэргонические реакции.
2. Источник энергии для синтеза АТФ.
3. Глюкоза, как конечный продукт превращения пищевых углеводов.
4. Пути использования глюкозы в клетке.
5. Фосфорилирование глюкозы, как необходимый этап окисления глюкозы.

VII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Виды анаэробного распада углеводов в организме.
2. Понятие гликолиз, гликогенолиз, их биологическая роль.
3. Пусковая реакция гликогенолиза.
4. Основные этапы гликолиза и ферменты, осуществляющие реакции процесса.
5. Локализация в клетке.
6. Гликолитическая оксидоредукция.
7. Необратимые реакции гликолиза и ферменты, их катализирующие.
8. Лактат - дегидрогеназная реакция, источник «Н» для нее и конечный продукт гликолиза.
9. Реакции накопления энергии в гликолизе.
10. Роль гликолиза и гликогенолиза в энергообразовании.

VIII. Хронокарта учебного занятия

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключка – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
5. Опрос – 10 минут.
6. Проведение лабораторной работы – 30 мин.
7. Оформление протоколов – 10 мин.

IX. Самостоятельная работа студента:

Энергообеспечение работающей мышцы в ходе реакций гликолиза.

X. Список используемой литературы

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А. Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А. Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976

3. Ленинджер Л. «Биохимия». 1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980.
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А. Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ №3

Тема: АЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

I. Научно-методическое обоснование темы:

Окисление глюкозы в аэробных условиях является основным для энергообразования в организме и протекает прямым дихо-томическим (дихотомия - расщепление глюкозы на 2 триозы) путем, который начинает функционировать с 3-4 месяца постна- тального периода.

Дихотомический путь представлен тремя блоками реакций:

1. Окисление глюкозы или гликогена до ПВК;
2. Окисление ПВК до ацетил-Ко А;
3. Окисление ацетил Ко А в цтк и цпэ до CO_2 и H_2O

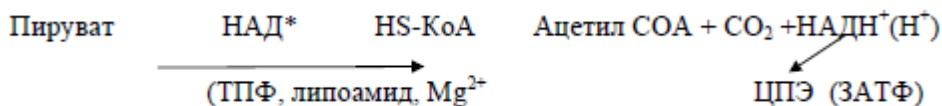
Реакции 1 этапа аналогичны гликолизу, однако заканчиваются на образовании пирувата, а освободившийся в ходе оксидоредукции водород НАДН⁺ (Н⁺) поступает в митохондрию (а не вос-станавливает в цитоплазме ПВК) с помощью глицерофосфатного или малатаспартатного челночного механизма. В первом случае образуется 2 молекулы, а во втором - 3 молекулы АТФ.



2 – этап. Сопряжение гликолиза и цикла лимонной кислоты происходит на уровне превращения пирувата в ацетил СоА, катализируемого в митохондриях мультиферментным пируватдегидрогеназным комплексом, аналогичным - α-кетоглутаратдегидрогеназному комплексу в ЦЛК.

Внутри митохондрий, куда пируват транспортируется из ци-топлазмы специальным переносчиком по механизму симпорта с протоном, происходит его окислительное декарбоксилирование, катализируемое тремя ферментами:

- Пируватдекарбоксилирующей дегидрогеназой
- Дигидролипоилтрансацетилазой
- Дигидролипоилдегидрогеназой
- и пятью коферментами: ТПФ, ЛК, HS-CoA, ФАД, НАД.



3 – этап. Цитратный цикл, в котором молекула ацетил CoA окисляется до двух молекул CO_2 , а освободившийся водород, источниками которого являются субстраты ЦЛК (изоцитрат, α -кетоглутарат, сукцинат и малат) поступают в ЦПЭ, где освобождают энергию, достаточную для синтеза 11 молекул АТФ и образования воды.

В итоге, энергетический выход окисления глюкозы до CO_2 и H_2O вычисляется следующим образом:

1 этап - гликолиз:

Превращение глюкозы во фруктозо-1,6-дифосфат требует 2 молекулы АТФ. Окисление двух молекул глицероальдегид-3-фосфата в ПВК продуцирует 4 молекулы АТФ субстратным фосфорилированием и 2 $\text{НАДН}^+(\text{H}^+)$, отдающий H^+ в митохондриях, либо через малатаспартатный челночный механизм, что генерирует 6 АТФ, либо глицерофосфатный и тогда образуется только 4 АТФ.

Итого: $6+4-2=8\text{АТФ}$

$4+4-2=6\text{АТФ}$.

2 этап - Окислительное декарбоксилирование двух молекул ПВК в митохондриях приводит к образованию 2 $\text{НАДН}^+(\text{H}^+)$, окисление которых в ЦПЭ служит источником энергии для 6 АТФ.

3 этап - Окисление ацетил CoA в ЦЛК образует 2 АТФ субстратным фосфорилированием и восстановленные коферменты (6 $\text{НАДН}^+(\text{H}^+)$, и 2 ФАДН_2) для синтеза еще 22 АТФ в ЦПЭ. Следовательно, при полном аэробном окислении глюкозы до CO_2 и H_2O образуется

$8+6+24=38\text{АТФ}$

$6+6+24=36\text{АТФ}$

в зависимости от характера челночного механизма.

Альтернативным путем аэробного окисления глюкозы является апотомический, пентозофосфатный или гексозомонофосфатный шунт, который начинает функционировать у плода в раннем постнатальном периоде. Сущность этого процесса заключается в отщеплении от глюкозо-6-фосфата первого углеродного атома с образованием CO_2 и пентозо-фосфатов. Особенностью пентозо-фосфатного пути является то, что в разных тканях он имеет свою специфику, и особенно интенсивно протекает в жировой ткани, печени, лактирующей молочной железе, коре надпочечников, эритроцитах и семенниках.

Ферменты этого пути локализованы в цитоплазме клетки. Окисление осуществляется путем дегидрирования, акцептором водорода является НАДФ:



Последовательность реакций пентозофосфатного пути можно разделить на две фазы: окислительную и неокислительную.

Окислительная фаза:

Глюкозо-6-фосфат окисляется НАДФ-зависимой дегидрогеназой до 6-фосфоглюконолактона.

6-фосфоглюконолактон гидролизуется до 6-фосфоглюконо-вой кислоты.

6-фосфоглюконовая кислота окисляется, декарбоксилируется НАДФ-зависимой дегидрогеназой с образованием рибулозо-5-фосфата.

Возможные пути использования продуктов окислительной части:

$\text{НАДН}^+(\text{H}^+)$ используется:

Как источник электронов для цепи митохондриального окисления.

Как источник H^+ для синтеза холестерина и жирных кислот.

Как источник H^+ для обезвреживания аммиака путем восстановительного аминирования 2-оксoglутарата.

Как источник H^+ для образования восстановленного глутатиона, стабилизирующего мембраны эритроцитов.

Как источник H^+ для стероидогенеза.

Рибозо-5-фосфат используется для синтеза гистидина, нуклеозидов и нуклеотидов, и получаемых из них коферментов (НАД, ФАД, HSCoA) и нуклеиновых кислот. Если в клетке одновременно используется и $\text{НАДН}^+(\text{H}^+)$ и рибозо-5-фосфат, то весь процесс заканчивается окислительной фазой. Когда используется $\text{НАДН}^+(\text{H}^+)$, а рибозо-5-фосфат нет, включается неокислительная фаза, в которой важнейшую роль играют ферменты - ТПФ-зависимые транскетолаза и трансальдолаза и суть которой заключается в обратном превращении пентоз в гептозы.

Из двух пентоз (рибулозо-5-фосфата и ксилулозо-5-фосфата) образуется гептоза - седогептулоза-7-фосфат и 3-фосфоглицериновый альдегид.

Реагируя между собой, они образуют тетрозу - эритрозо-4-фосфат и гексозу - фруктозо-6-фосфат.

Тетроза реагирует с еще одной молекулой - ксилулозо-5-фосфата, образуя гексозу - фруктозо-6-фосфат и триозу - 3-фосфоглицериновый альдегид.

Таким образом, из 3 молекул пентоз получаем 2,5 молекулы гексоз, а следовательно, из 6 молекул пентоз получаем 5 гексоз. В раннем постнатальном периоде пентозофосфатный путь используется как энергетический.

Образующийся в неокислительной части ФГА не превращается в глюкозо-6-фосфат, а окисляется до CO_2 и H_2O с одновременным генерированием энергии. НАДФН $^{+}$ используется для синтеза холестерина и жирных кислот.

II. Цель деятельности студентов на занятии:

Студент должен знать:

Этапы гексозоди- и гексозомонофосфатного пути окисления глюкозы, их распространение и биологическую роль.

Студент должен уметь:

Определять продукт аэробного дихотомического пути окисления глюкозы - пируват в моче, интерпретировать полученные результаты.

III. Содержание обучения.

Основные вопросы темы:

1. Важнейшие пути аэробного распада глюкозы.
2. Гексозодифосфатный путь: последовательность реакций до образования пирувата.
3. Окислительное декорбоксилирование пировиноградной кислоты.
4. Судьба ацетил CoA и энергетика аэробного окисления глюкозы.
5. Локализация и последовательность реакций пентозофосфатного пути окисления глюкозы.

IV. Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО

Лабораторные работы:

1. Количественное определение пировиноградной кислоты в моче.

V. Наименование лабораторной работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.

Количественное определение пировиноградной кислоты в моче

Принцип метода: Пировиноградная кислота (ПВК) взаимодействует с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде, образует 2,4-динитрофенилгидразоны ПВК желто-оранжевого цвета, интенсивность окрашивания которых пропорциональна концентрации ПВК.

Порядок выполнения работы: Контрольная и опытные пробы ставятся одновременно. Берут 2 пробирки, в две контрольные наливают по 1 мл воды, в опытную - 1 мл мочи. Затем во все пробирки приливают по 1 мл 2,5% спиртового раствора КОН, перемешивают все пробирки одновременно 1 минуту, приливают по 0,5 мл 0,1% раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и оставляют стоять на 15 минут при комнатной температуре. Фотометрируют на ФЭК против контроля в кюветах на 5 мм с синим светофильтром. Расчет проводят по готовому калибровочному графику, найденную величину умножают на суточный диурез и получают ПВК в суточной моче.

Предполагаемые результаты:

Выполняется обсуждение результатов и делаются выводы.

VII. Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Метаболически активная форма витамина B $_6$ и ее участие в аэробном окислении глюкозы.
2. Роль дегидрогеназ в окислении субстратов.
3. Реакция взаимопревращения пентоз.
4. Механизмы окисления цитоплазматического кофермента НАДН $^{+}$ (Н $^{+}$)

VIII. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Виды аэробного окисления глюкозы.
2. Основные этапы аэробного дихотомического распада углеводов.
3. Челночные механизмы и их биологическая роль.
4. Окислительное декорбоксилирование ПВК, характеристика ферментов и коферментов мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса.
5. Энергетический выход аэробного дихотомического пути окисления глюкозы.
6. Аэробный распад глюкозы, его локализация, тканевая специфичность, последовательность реакций окислительной и неокислительной фаз.
7. Значение аэробного распада, как источника восстановительных эквивалентов и пентоз в биосинтетических реакциях.

IX. Хронокарта учебного занятия

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключка – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы –30 минут.
5. Опрос –10 минут.
6. Проведение лабораторной работы –30 мин.
7. Оформление протоколов –10 мин.

X. Самостоятельная работа студента:

1. Регуляция содержания сахара крови.

XI. Перечень учебной литературы к занятию

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г.Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980.
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А.Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ №18.

Тема: ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ. ОБМЕН ГЛИКОГЕНА. ГЛИКОГЕНОЗЫ

I. Научно-методическое обоснование темы:

Глюконеогенез – процесс биосинтеза глюкозы. Синтез глюкозы происходит главным образом в печени и корковом слое почек. В широком смысле под глюконеогенезом понимают синтез глюкозы из всех метаболитов – источников глюкозы (лактата и пирувата, субстратов цикла Кребса и глицерола, аминокислот); в более узком смысле – только из аминокислот (все аминокислоты, кроме кетогенных лейцина и лизина, способны участвовать в синтезе глюкозы). Жирные кислоты не могут служить источником глюкозы. В печени он происходит после истощения запасов печеночного гликогена для поддержания в крови уровня глюкозы в условиях длительной физической нагрузки или при голодании. Кроме получения глюкозы, глюконеогенез обеспечивает и уборку **лактата**, постоянно образуемого в эритроцитах или при мышечной работе, и **глицерола**, являющегося продуктом липолиза в жировой ткани. Реакции **глюконеогенеза** способны идти во всех тканях, кроме последней глюкозо-6-фосфатазной реакции, которая идет только в **печени и почках**. Поэтому, строго говоря, глюконеогенез идет только в этих двух органах.

Источниками синтеза глюкозы являются:

1. **лактат (молочная кислота)** – в мышцах (при длительной физической нагрузке) и **глицерин** (поступающий из жировой ткани);

2. *аминокислоты* – в мышцах (при длительном голодании, из-за разрушения белков) и *глицерин* (поступающий из жировой ткани).

Основные стадии глюконеогенеза совпадают с реакциями гликолиза, только протекают они в обратном направлении. Имеется очень важная особенность, обусловленная тем, что 3 реакции в гликолизе, катализируемые киназами необратимы:

- гексокиназой (1-ая реакция),
- фосфофруктокиназой (3-ья реакция)
- пируваткиназой (10-я реакция).

В этих реакциях происходит высвобождение энергии для синтеза АТФ. Поэтому в обратном процессе возникают **энергетические барьеры**, которые клетка обходит с помощью специальных реакций.

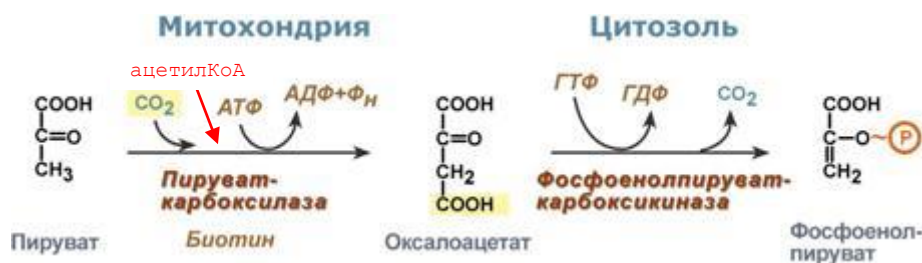
Глюконеогенез включает все **обратимые реакции** гликолиза, и **особые обходные пути**, т.е. он не полностью повторяет реакции окисления глюкозы.

Рассмотрим образование глюкозы в первую очередь из **пирувата**, т.к. в него легко превращается основная гликогенная аминокислота **аланин**, а также **лактат**, который поступает в значительных количествах в кровь из мышц после нагрузки и окисляется в печени, под действием ЛДГ. В процессе катаболизма субстратов цикла Кребса образуется **ЩУК**, который включается в реакции глюконеогенеза.

1. **Обход пируваткиназной реакции** катализируется двумя ферментами: **пируваткарбоксилазой** и **фосфоенолпируваткарбоксикиназой** (ФЕПКС).

Пируваткарбоксилаза локализуется в митохондриях. Он является биотинзависимым (реакции карбоксилирования в клетках протекают с участием витамина Н); в реакциях тратятся два макроэрга - АТФ и ГТФ.

В химическом плане обходной путь десятой реакции выглядит достаточно просто:



Упрощенный вариант написания обхода десятой реакции гликолиза

Однако дело в том, что **пируваткарбоксилаза** находится в митохондрии, а **фосфоенолпируваткарбоксикиназа** – в цитозоле. Пируваткарбоксилаза активируется ацетил-КоА по аллостерическому механизму.

Дополняет проблему **непроницаемость** митохондриальной мембраны для **оксалоацетата**. Зато через мембрану может пройти **малат**, предшественник оксалоацетата по ЦТК.

Поэтому в реальности все выглядит более сложно:

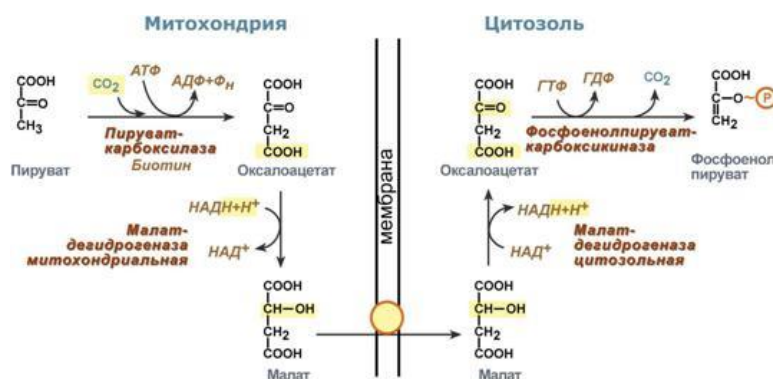
1. В цитозоле пировиноградная кислота может появиться при окислении **молочной кислоты** и в реакции трансаминирования **аланина**. После этого пируват симпортом с ионами H^+ , движущимися по протонному градиенту, проникает в митохондрии. В митохондриях **пируваткарбоксилаза** превращает пировиноградную кислоту в **оксалоацетат**.

Пируваткарбоксилазная реакция идет в клетке постоянно, так как оксалоацетат является главным регулятором скорости ЦТК. Реакция называется **анаплеротической** (пополняющей) реакцией ЦТК.

2. Далее оксалоацетат мог бы превратиться в фосфоенолпируват, но для этого сначала он должен попасть в цитозоль. Поэтому происходит реакция восстановления оксалоацетата в малат при участии **малатдегидрогеназы**. В результате **малат** накапливается, выходит в цитозоль и здесь превращается обратно в **оксалоацетат**.

Повернуть малатдегидрогеназную реакцию ЦТК вспять позволяет избыток $НАДН^+$ в митохондриях. $НАДН^+$ поступает из **β-окисления жирных кислот**, активируемого в гепатоците при голодании.

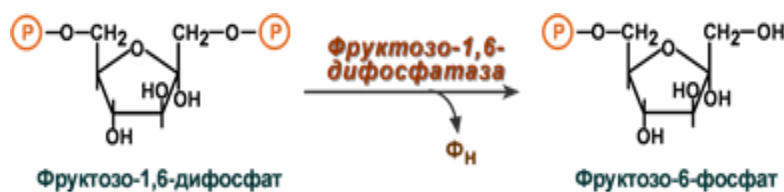
3. В цитоплазме **фосфоенолпируваткарбоксикиназа** осуществляет превращение **оксалоацетата** в **фосфоенолпируват**, для реакции требуется энергия ГТФ. От молекулы отщепляется тот же углерод, что и присоединяется.



Обход десятой реакции гликолиза

2. Обход третьей реакции гликолиза

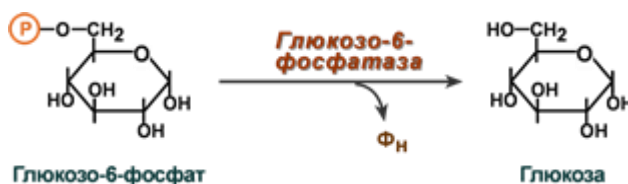
Второе препятствие на пути синтеза глюкозы – фосфофруктокиназная реакция – преодолевается с помощью фермента **фруктозо-1,6-дифосфатазы**. Этот фермент есть в почках, печени, поперечно-полосатых мышцах. Таким образом, эти ткани способны синтезировать фруктозо-6-фосфат и глюкозо-6-фосфат.



Обход третьей реакции гликолиза

3. Обход первой реакции гликолиза

Последняя реакция катализируется **глюкозо-6-фосфатазой**. Она имеется только в **печени** и **почках**, следовательно, только эти ткани могут продуцировать свободную глюкозу.



Обход первой реакции гликолиза

Свободная глюкоза, образующаяся в ходе этой реакции, поступает из печени в кровь и утилизируется тканями.

При голодании, когда усиленно потребляются в качестве источников энергии жирные кислоты, в большом количестве образуется глицерол, который активируясь помощью АТФ, под действием глицеролкиназы превращается в α -глицеролфосфат, который затем окисляется α -глицеролфосфатдегидрогеназой в фосфодиацетон – субстрат гликолиза.

Взаимосвязь гликолиза и глюконеогенеза (цикл Кори).

Для координирования деятельности органов в интересах целостного организма важна координация процессов распада (гликолиз) и синтеза (глюконеогенез) углеводов. В работающих мышцах идет гликолиз – анаэробный распад глюкозы до молочной кислоты. Мышцы получают глюкозу из крови, ткань мышцы не отдает глюкозу в кровь, поскольку нет фермента гл-6-фосфатазы. Лактат из мышц выходит в кровь и поступает в печень. В гепатоцитах идет глюконеогенез из лактата. Образовавшаяся глюкоза поставляется в кровь, т.к. в печени есть фермент гл-6-фосфатаза. Этот кругооборот и является циклом Кори. Для многих других органов (мозг, почки, селезенка) потребность в энергии сравнительно постоянна, и скорость распада глюкозы меняется незначительно.

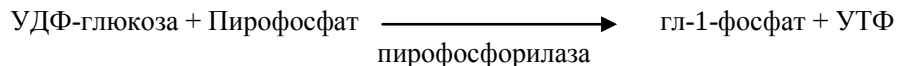
Регуляция глюконеогенеза. Важнейшими регуляторами глюконеогенеза являются глюкокортикоиды. Они, с одной стороны, оказывают каталитическое действие на мышечную ткань, что приводит к увеличению поступления аминокислот в кровоток; с другой стороны – индуцируют биосинтез ферментов глюконеогенеза в печени (анаболический эффект гормонов), благодаря чему поступившие в печень аминокислоты могут использоваться для синтеза глюкозы.

Непосредственное, но взаимно исключаящее влияние на регуляцию глюконеогенеза оказывают гормоны поджелудочной железы **глюкагон** и **инсулин**. Глюкагон ингибирует гликолиз и активирует процесс глюконеогенеза в печени путем увеличения концентрации цАМФ. Активируя протеинкиназу, цАМФ вызывает фосфорилирование пируваткиназы, т.е. переводит ее в неактивное состояние, поэтому гликолиз прекращается. Соответственно активируются ферменты глюконеогенеза.

Все ключевые ферменты гликолиза и глюконеогенеза *регулируются координировано*: инсулин является **индуктором синтеза** глюкокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы (ключевых ферментов гликолиза) и одновременно **репрессором** пируваткарбоксилазы, фосфоеноилпируваткарбоксилазы, фр-1,6,-дифосфатазы и гл-6-фосфатазы (ключевых ферментов глюконеогенеза). Напротив, глюкагон является индуктором синтеза ферментов глюконеогенеза и одновременно ингибитором ключевых ферментов гликолиза.

Ферменты, катализирующие главные реакции гликолиза и глюконеогенеза, – это аллостерические белки, их регуляция происходит по принципу «обратной связи» под влиянием аллостерических эффекторов. В отличие от гормонов, под действием которых активность ферментов изменяется относительно медленно (регуляция синтеза), аллостерические регуляторы изменяют скорость протекания реакции быстро. Например, аллостерическим активатором пируваткиназы (фермента глюконеогенеза) является ацетил-КоА. Одновременно он ингибирует пируватдегидрогеназу. Следовательно, накопление ацетил-КоА в клетке замедляет окисление глюкозы и стимулирует ее синтез, т.е. глюконеогенез.

Самым главным аллостерическим регулятором гликолиза и глюконеогенеза является фр-2,6-дифосфат, который синтезируется из фр-6-фосфата с затратой энергии, а распадается он на фр-6-фосфат и фосфорную кислоту:



синтез фр-2,6-бисфосфата (киназная реакция) и его распад катализируются одним и тем же ферментом, называемым **бифункциональным**, который регулируется путем фосфорилирования. Фосфорилирование приводит к увеличению фосфатазной активности и снижению киназной, т.е. фосфорилирование вызывает снижение содержания фр-2,6-дифосфата. Этот фермент является аллостерическим активатором ключевого фермента гликолиза ФФК, поэтому снижение его содержания замедляет реакции гликолиза. Увеличение киназной активности способствует образованию фр-2,6-дифосфата, следовательно, гликолиз будет усиливаться.

Фосфорилирование бифункционального фермента является цАМФ-зависимой реакцией. Следовательно, гормоны, увеличивающие образование цАМФ (в первую очередь глюкагон), будут стимулировать фосфорилирование бифункционального фермента, т.е. способствовать снижению содержания фруктозо-2,6-дифосфата в печени и тем самым ускорять глюконеогенез. Инсулин будет оказывать противоположное действие.

Аллостерические механизмы регуляции аэробного и анаэробного путей распада глюкозы и глюконеогенеза.

Примером взаимного контроля аэробного и анаэробного путей распада глюкозы является эффект Пастера – торможение гликолиза (накопление лактата) дыханием. Механизм эффекта Пастера:

1. При аэробном распаде углеводов не функционирует окислительно-восстановительная реакция гликолиза, т.к. восстановительные эквиваленты из цитоплазмы переносятся в митохондрии. Поэтому $\text{НАДН} + \text{H}^+$ не может служить для восстановления пирувата в лактат.

2. В аэробных условиях образуются цитрат и АТФ, которые аллостерически тормозят активность ФФК (реакция лимитирует скорость всего процесса).

3. Дыхание подавляет гликолиз из-за конкуренции за АДФ между митохондриальной цепью переноса электронов и реакциями гликолиза в цитоплазме (фосфолицераткиназной и пируваткиназой), т.к. АДФ преимущественно используется в реакции окислительного фосфорилирования в митохондриях, а не субстратного фосфорилирования в гликолизе.

АМФ и АДФ аллостерически регулируют гликолиз и глюконеогенез на уровне фосфатазы фруктозо-1,6-дифосфата: АМФ – подавляет активность фермента, а АТФ – активирует. Малое количество энергии в клетке способствует подавлению глюконеогенеза (АМФ), а весь фруктозо-1,6-дифосфат превращается по пути распада углеводов с целью продукции энергии. Напротив, по мере накопления АТФ происходит стимуляция глюконеогенеза.

Важным моментом в регуляции глюконеогенеза является реакция, катализируемая пируваткарбоксилазой. Роль положительного аллостерического модулятора этого фермента выполняет ацетил-КоА. В отсутствие ацетил-КоА фермент почти полностью лишен активности. Когда в клетке накапливается митохондриальный ацетил-КоА, биосинтез глюкозы из пирувата усиливается. Известно, что ацетил-КоА одновременно является отрицательным модулятором пируватдегидрогеназного комплекса (см. далее). Следовательно, накопление ацетил-КоА замедляет окислительное декарбоксилирование пирувата, что также способствует превращению последнего в глюкозу.

Другой важный момент в регуляции глюконеогенеза – реакция, катализируемая фруктозо-1,6-бисфосфатазой – ферментом, который ингибируется АМФ. Противоположное действие АМФ оказывает на фосфофруктокиназу, т.е. для этого фермента он является аллостерическим активатором. При низкой концентрации АМФ и высоком уровне АТФ происходит стимуляция глюконеогенеза. Напротив, когда величина отношения АТФ/АМФ мала, в клетке наблюдается расщепление глюкозы.

В 1980 г. группой бельгийских исследователей (Г. Херс и др.) в ткани печени был открыт фруктозо-2,6-бисфосфат, который является мощным регулятором активности двух перечисленных ферментов:

Фруктозо-2,6-бисфосфат активирует фосфофруктокиназу и ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу. Повышение в клетке уровня фруктозо-2,6-бисфосфата способствует усилению гликолиза и уменьшению скорости глюконеогенеза. При снижении концентрации фруктозо-2,6-бисфосфата отмечается обратная картина.

Установлено, что биосинтез фруктозо-2,6-бисфосфата происходит из фруктозо-6-фосфата при участии АТФ, а распадается он на фруктозо-6-фосфат и неорганический фосфат. Биосинтез и распад фруктозо-2,6-бисфосфата катализируются одним и тем же ферментом, т.е. данный фермент бифункционален, он обладает и фосфокиназной, и фосфатазной активностью:

Показано также, что бифункциональный фермент в свою очередь регулируется путем цАМФ-зависимого фосфорилирования. Фосфорилирование приводит к увеличению фосфатазной активности и снижению фосфокиназной активности бифункционального фермента. Этот механизм объясняет быстрое воздействие гормонов, в частности глюкагона, на уровень фруктозо-2,6-бисфосфата в клетке (см. главу 16).

Активность бифункционального фермента регулируется также некоторыми метаболитами, среди которых наибольшее значение имеет глицерол-3-фосфат. Действие глицерол-3-фосфата на фермент по своей направленности аналогично эффекту, который наблюдается при его фосфорилировании с помощью цАМФ-зависимых протеинкиназ.

В настоящее время фруктозо-2,6-бисфосфат, помимо печени, обнаружен и в других органах и тканях животных, а также у растений и микроорганизмов.

Показано, что глюконеогенез может регулироваться и непрямым путем, т.е. через изменение активности фермента, непосредственно не участвующего в синтезе глюкозы. Так, установлено, что фермент гликолиза пируваткиназа существует в 2 формах – L и M. Форма L (от англ. liver – печень) преобладает в тканях, способных к глюконеогенезу. Эта форма ингибируется избытком АТФ и некоторыми аминокислотами, в частности аланином. M-форма (от англ. muscle – мышцы) такой регуляции не подвержена. В условиях достаточного обеспече-

ния клетки энергией происходит ингибирование L-формы пируваткиназы. Как следствие ингибирования замедляется гликолиз и создаются условия, благоприятствующие глюконеогенезу.

Наконец, интересно отметить, что между гликолизом, интенсивно протекающим в мышечной ткани при ее активной деятельности, и глюконеогенезом, особенно характерным для печеночной ткани, существует тесная взаимосвязь. При максимальной активности мышц в результате усиления гликолиза образуется избыток молочной кислоты, диффундирующей в кровь, в печени значительная ее часть превращается в глюкозу (глюконеогенез). Такая глюкоза затем может быть использована как энергетический субстрат, необходимый для деятельности мышечной ткани.

Регуляция при физической нагрузке.

- АДФ и сами гексозы, накапливающиеся в мышцах в начале работы, аллостерически активируют ферменты распада глюкозы;
- Глюкокортикоиды и глюкагон, выделяющиеся при длительной работе и голодании, стимулируют в печени синтез ферментов глюконеогенеза;
- Жирные кислоты, мобилизуемые из жировой ткани при длительной работе и голодании, а также продукты их обмена (АТФ, ацетил-КоА, цитрат) аллостерически ингибируют в мышцах и печени ферменты синтеза глюкозы.

Регуляция после еды:

- Инсулин, выделяемый после еды, повышает проницаемость клеток для глюкозы и активирует гексокиназу. Этим стимулируются все превращения глюкозы, в том числе и синтез из нее жирных кислот в печени и жировой ткани.

Гликоген - это легкоиспользуемый резерв энергии

Мобилизация гликогена (гликогенолиз)

Резервы гликогена используются по-разному в зависимости от функциональных особенностей клетки.

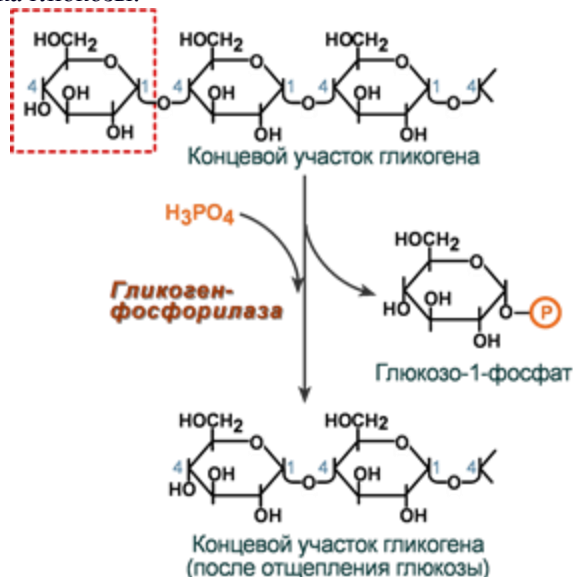
Гликоген **печени** расщепляется при снижении концентрации глюкозы в крови, прежде всего между приемами пищи. Через 12-18 часов голодания запасы гликогена в печени полностью истощаются.

В **мышцах** количество гликогена снижается обычно только во время физической нагрузки – длительной и/или напряженной. Гликоген здесь используется для обеспечения глюкозой работы самих миоцитов. Таким образом, мышцы, как впрочем и остальные органы, используют гликоген только для собственных нужд.

Мобилизация (распад) гликогена или **гликогенолиз** активируется при недостатке свободной глюкозы в клетке, а значит и в крови (голодание, мышечная работа). При этом **уровень глюкозы крови** "целенаправленно" поддерживает только **печень**, в которой имеется глюкозо-6-фосфатаза, гидролизующая фосфатный эфир глюкозы. Образованная в гепатоците свободная глюкоза выходит через плазматическую мембрану в кровь.

В гликогенолизе непосредственно участвуют три фермента:

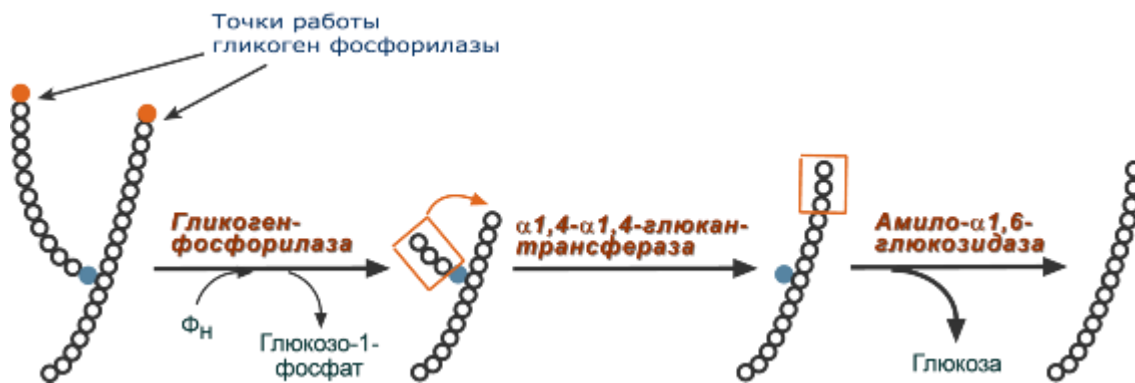
1. **Фосфоорилаза гликогена** (кофермент пиридоксальфосфат) – расщепляет α -1,4-гликозидные связи с образованием глюкозо-1-фосфата. Фермент работает до тех пор, пока до точки ветвления (α 1,6-связи) не останется 4 остатка глюкозы.



Роль фосфоорилазы при мобилизации гликогена

2. **α (1,4)- α (1,4)-Глюкантрансфераза** – фермент, переносящий фрагмент из трех остатков глюкозы на другую цепь с образованием новой α 1,4-гликозидной связи. При этом на прежнем месте остается один остаток глюкозы и "открытая" доступная α 1,6-гликозидная связь.

3. **Амил- α 1,6-глюкозидаза**, ("деветвящий" фермент) – гидролизует α 1,6-гликозидную связь с высвобождением **свободной** (нефосфорилированной) глюкозы. В результате образуется цепь без ветвлений, вновь служащая субстратом для фосфоорилазы.



Роль ферментов в расщеплении гликогена

Таким образом, при мобилизации гликогена образуется свободная глюкоза и глюкозо-1-фосфат (изомеризующийся в глюкозо-6-фосфат), и их судьба различна в зависимости от органа.

Синтез гликогена

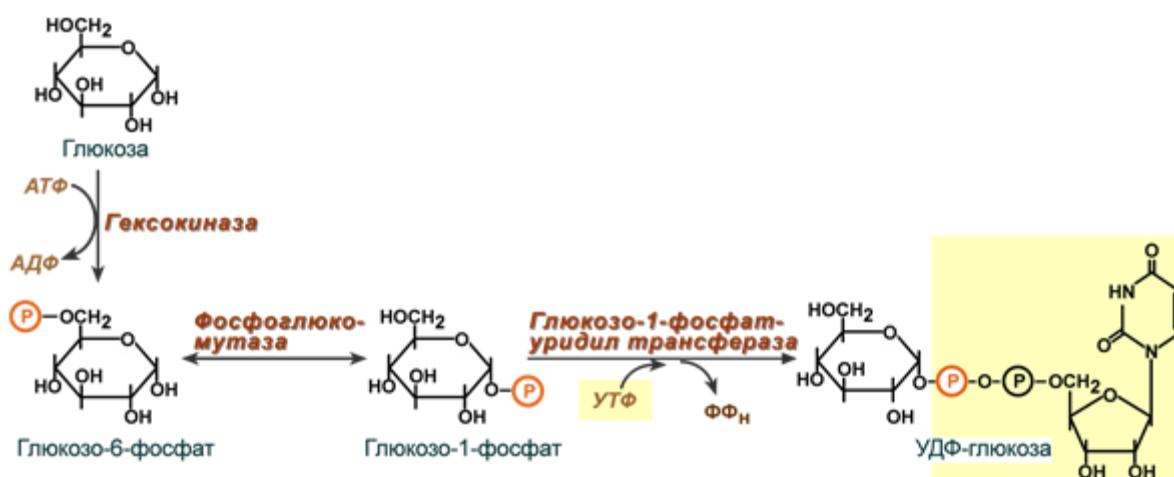
Гликоген способен синтезироваться почти во всех тканях, но наибольшие запасы гликогена находятся в печени и скелетных мышцах. **Накопление** гликогена в мышцах отмечается в период восстановления после нагрузки, особенно при приеме богатой углеводами пищи. В печени синтез гликогена **происходит** только после еды, при гипергликемии. Это объясняется особенностями печеночной гексокиназы (**глюкокиназы**), которая имеет низкое сродство к глюкозе и может работать только при ее высоких концентрациях, при нормальных концентрациях глюкозы в крови ее захват печенью не производится.

Непосредственно синтез гликогена осуществляют следующие ферменты:

1. **Фосфоглюкомутаза** – превращает глюкозо-6-фосфат в глюкозо-1-фосфат;

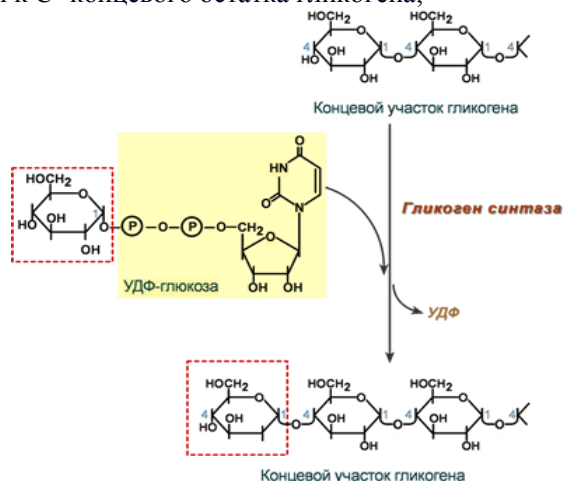
2. **Глюкозо-1-фосфат-уридилтрансфераза** – фермент, осуществляющий ключевую реакцию синтеза.

Необратимость этой реакции обеспечивается гидролизом образующегося дифосфата;



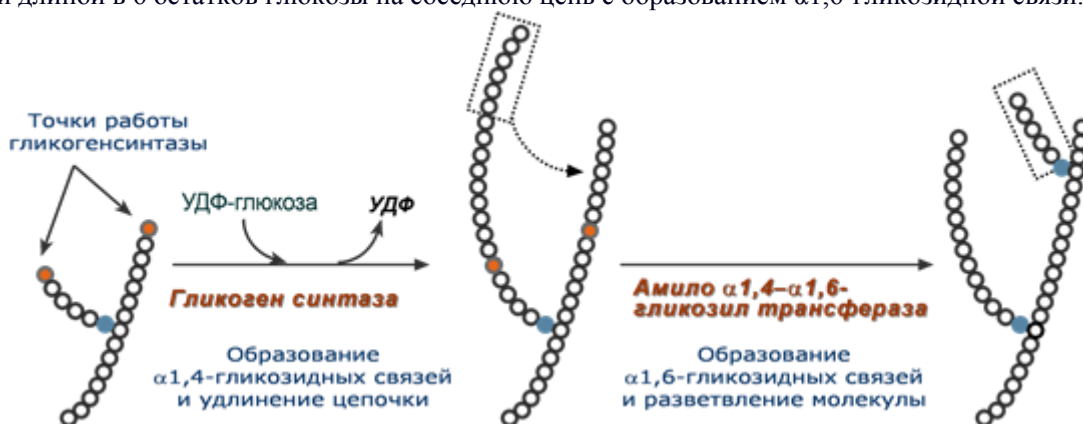
Реакции синтеза УДФ-глюкозы

3. **Гликогенсинтаза** – образует α1,4-гликозидные связи и удлиняет гликогеновую цепочку, присоединяя активированный C¹ УДФ-глюкозы к C⁴ концевому остатка гликогена;



Химизм реакции гликогенсинтазы

4. **Амилло- α 1,4- α 1,6-гликозилтрансфераза**, "гликоген-ветвящий" фермент – переносит фрагмент с минимальной длиной в 6 остатков глюкозы на соседнюю цепь с образованием α 1,6-гликозидной связи.



Роль гликогенсинтазы и гликозилтрансферазы в синтезе гликогена

II. Цель деятельности студентов на занятии:

Студент должен знать:

1. химизм реакций гликолиза
2. понятие о глюконеогенезе, его биологическая роль
3. функции гликогена в организме, синтез и распад
4. общие принципы регуляции углеводного обмена
5. болезни накопления

Студент должен уметь:

1. объяснить взаимосвязь гликолиза и глюконеогенеза (цикл Кори)

III. Содержание обучения.

Основные вопросы:

1. что такое гликолиз? Реакции гликолиза
2. реакции биосинтеза глюкозы
3. обходные пути пируваткиназной реакции
4. обходные пути фосфофруктокиназной реакции
5. обходные пути гексокиназной реакции
6. аллостерические механизмы регуляции гликолиза и глюконеогенеза
7. регуляция глюконеогенеза при физической нагрузке
8. регуляция глюконеогенеза после еды
9. биосинтез углеводов из двухуглеродных соединений (ацетил-КоА)
10. биосинтез гликогена; регуляция процесса
11. нарушения углеводного обмена (наследственные и приобретенные)

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

Лабораторные работы:

V. Хронокарта учебного занятия.

1. Общий бюджет времени: 2 часа (90 мин).
2. Переключки – 2 мин.
3. Вступительная беседа – 6 мин.
4. Разбор основных вопросов темы – 30 минут.
5. Опрос – 10 минут.
6. Проведение лабораторной работы – 30 мин.
7. Оформление протоколов – 10 мин.

VI. Самостоятельная работа студента:

1. Энергообеспечение работающей мышцы в ходе реакций гликолиза.

VII. Список используемой литературы

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2012
2. Е.С. Северин «Биохимия», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
4. Ф.С. Дзугоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г. Дзугоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаяева, С.Г. Дзугоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринштейн Б., Гринштейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000.
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медиа», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980.
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Гринштейн Б, Гринштейн А.Наглядная биохимия, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000

ЗАНЯТИЕ № 19.

Вопросы для подготовки к модулю №3 по разделу:

«СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ В ОРГАНИЗМЕ»

1. Классификация углеводов.
2. Моносахариды (альдозы и кетозы). Структура, представители, свойства.
3. Фосфопроизводные моносахаридов. Их биологическое значение.
4. Аминопроизводные моносахаридов. Их биологическое значение.
5. Дисахариды, их структура, свойства и представители.
6. Классификация полисахаридов.
7. Гомополисахариды, их структура, свойства, представители.
8. Кислые и нейтральные мукополисахариды.
9. Углеводы пищи. Суточная потребность. Переваривание и всасывание углеводов.
10. Судьба всосавшихся моносахаридов; изомеризация фруктозы и галактозы в глюкозу.
11. Биосинтез и распад гликогена, ферменты участвующие в этих процессах, и их сбалансированная регуляция, роль гормонов.
12. Катаболизм глюкозы. Анаэробный распад глюкозы (гликолиз).
13. Гликолитическая оксидоредукция. Пируват как акцептор водорода.
14. Субстратное фосфорилирование при гликолизе.
15. Распространение и физиологическое значение анаэробного распада глюкозы.
16. Аэробный распад – основной путь катаболизма глюкозы у человека.
17. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты. Энергетический эффект.
18. Взаимосвязь гликолиза и аэробного распада углеводов. Эффект Пастера.
19. Пентозный цикл, его локализация и биологическое значение.
20. Роль печени в регуляции уровня сахара в крови.
21. Глюконеогенез. Цикл Кори.
22. Нейрогуморальные механизмы регуляции углеводного обмена.
23. Биосинтез нарушений углеводного обмена (сахарный диабет).

24. Энзимопатии, галактоземия, непереносимость лактозы, фруктозы.