

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«Северо-Кавказский федеральный университет»

Невинномысский технологический институт (филиал)

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ
ПО ДИСЦИПЛИНЕ БИОХИМИЯ
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ОФО НАПРАВЛЕНИЯ ПОДГОТОВКИ
18.03.01 ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ**

Невинномысск, 2020г.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ФГОС ВО и рабочей программы дисциплины «Биохимия». Указания предназначены для студентов очной/заочной формы обучения направления подготовки 18.03.01 Химическая технология.

Содержат основные разделы изучаемого теоретического материала, перечень вопросов необходимых для проработки, а также список рекомендуемой литературы.

Составители

Отв. редактор

Введение

Методические указания выполнены на современном научном уровне и рассчитано на студентов, обладающих достаточной подготовкой по разделам общей химии, физики и математики.

Методические указания составлены для проведения лабораторных занятий курса «Биохимия» с учетом требований стандарта ФГОС ВО для подготовки бакалавров направления 18.03.01 «Химическая технология».

В результате освоения материала всех разделов пособия по дисциплине «Биохимия» ООП студент приобретает следующие компетенции:

ОПК-1 способность и готовность использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности

Знать: основные законы естественнонаучных дисциплин

Уметь: использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности

Владеть: способностью и готовностью использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности

ОПК-3 готовность использовать знания о строении вещества, природе химической связи в различных классах химических соединений для понимания свойств материалов и механизма химических процессов, протекающих в окружающем мире

Знать: строение вещества, природу химической связи в различных классах химических соединений

Уметь: использовать знания о строении вещества, природе химической связи в различных классах химических соединений для понимания свойств материалов и механизма химических процессов, протекающих в окружающем мире

Владеть: готовностью использовать знания о строении вещества, природе химической связи в различных классах химических соединений для понимания свойств материалов и механизма химических процессов, протекающих в окружающем мире

Практическая работа №1 Аминокислоты

Цель работы: изучить некоторые физические и химические свойства аминокислот

Теоретическая часть:

Белки - важнейшая и необходимая составная часть всех живых организмов. Они составляют главную массу сухого вещества тканей человека и почти всех животных.

Это очень сложные, высокомолекулярные соединения, находящиеся в организме в коллоидном состоянии. Молекула белка состоит из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Под действием специфических: ферментов, а также при нагревании с кислотами или щелочами белки подвергаются гидролизу (распаду с присоединением элементов воды), давая ряд промежуточных продуктов (пептоны, пептиды), а при полном гидролизе - аминокислоты.

Обладая одновременно кислыми карбоксильными и основными аминными группами, белки являются амфотерными веществами и могут вести себя, и как кислоты, и как основания. При определённом рН, характерном для каждого белка, диссоциация кислых и щелочных групп белковой частицы уравнивается, и заряд амфотерного иона белка становится минимальным. Такое рН раствора носит название изоэлектрической точки белка. В изоэлектрической точке белок наименее устойчив в растворе.

Структура белковой молекулы очень лабильна и даже мягкая обработка может привести к денатурации белка, в результате которой изменяются его биологические и физико-химические свойства.

Реакции на присутствие белка основаны на открытии в нём тех или иных химических групп и на его физико-химических свойствах.

Некоторые реакция присущи не только белкам, но и другим веществам, содержащим те же группы. Так, ряд цветных реакций на белок является по существу реакциями на ту или иную аминокислоту, входящую в состав белка.

Поэтому, для установления наличия белка недостаточно какой-нибудь одной реакции.

Белки разделяют на две группы: протеины, или простые белки, не содержащие небелковых групп, и протеиды, или сложные белки, содержащие помимо собственно белка, ещё и небелковую (простетическую) группу.

Среди простых белков животного происхождения чаще всего приходится встречаться с альбуминами и глобулинами.

Альбумины растворимы в воде, осаждаются при насыщении раствора сернокислым аммонием, обычно не содержат аминокислоты – глицина. Примерами альбуминов являются альбумины кровяной сыворотки, молока, яичного белка, альбумины мышц (миогены).

Глобулины не растворимы в чистой воде, но растворимы в присутствии в ней нейтральных солей; осаждаются в полунасыщенном растворе сернокислого аммония, т. е. при добавлении к раствору белка равного объема насыщенного раствора этой соли. К глобулинам относят глобулины сыворотки крови и молока, куриного яйца, мышечные глобулины (миозин, глобулин X).

Среди сложных белков следует отметить: хромопротеиды - соединения белка с пигментом, например, гемоглобин; нуклеопротеиды - соединения белка с нуклеиновыми кислотами; фосфопротеиды — белки, содержащие фосфор, например казеин, мукопротеиды (глюкопротеиды) - соединение белка со сложными углеводами – мукополисахариды, например муцин слюны (простые углеводные группировки содержатся во многих белках)

Контрольные вопросы:

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Дайте определение и приведите классификацию аминокислот.
- 3 Перечислите протеиногенные аминокислоты.
- 4 Сформулируйте правила образования названия аминокислот.
- 5 Перечислите качественные реакции на аминокислоты (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).

6 Укажите реакции аминокислот по карбоксильной группе, напишите уравнения реакций.

7 Укажите реакции аминокислот по аминогруппе, напишите уравнения реакций.

8 Какие элементы можно обнаружить в составе аминокислот?

9 Предложите схему синтеза аланина из этилового спирта. Для аминокислоты напишите уравнения реакций взаимодействия с гидроксидом натрия и соляной кислотой.

10 Сколько мл раствора NaOH (10 %, $\rho = 1,1$ г/мл) потребуется для нейтрализации карбоксильной группы аминокислоты (глицина), полученной из 3,2 г карбида кальция?

Практическая работа №2 Реакции осаждения белков

Цель работы: ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций белки; закрепить представления о структурах белковых молекул

Теоретическая часть:

Устойчивость белков в биологических жидкостях организма человека обуславливают два фактора:

- заряд и водная оболочка – для гидрофильных белков
- только заряд – для гидрофобных белков.

Для каждого белка характерна по крайней мере одна трехмерная структура, в которой он стабилен и проявляет биологическую активность при физиологических условиях (рН, температура). Эта структура называется нативной конформацией белка.

При изменении внешних условий белки теряют нативную структуру.

Денатурация – изменение уникальной структуры белковой молекулы, приводящее к потере характерных свойств (растворимости, электрофоретической подвижности, биологической активности и т. д.)

Наиболее ярким признаком денатурации является резкое снижение биологической активности, при этом разрушаются в основном невалентные водородные и дисульфидные связи и не затрагиваются пептидные связи.

При непродолжительном действии возможен возврат биологической активности, т. е. ренатурация белка с полным восстановлением исходной структуры и нативных свойств.

Для белков характерны следующие основные физико-химические свойства: высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое давление и высокое онкотическое давление, способность к поглощению лучей при 280 нанометрах (10–9м).

Контрольные вопросы:

1. Общая характеристика, элементарный состав, история изучения белков. Формирование представления о белках как о классе соединений и важ-

нейшем компоненте живых организмов. Исследования Мульдера, Данилевского, Фишера и др.

2. Структура, свойства, классификация и общая характеристика протеиногенных аминокислот.

3. Первичная структура белков (умение писать структуры пептидов). Зависимость биологических, свойств белков от первичной структуры. Методы исследования первичной структуры.

4. Конформация пептидных цепей в белках (вторичная, надвторичная и третичная структуры). Слабые внутримолекулярные взаимодействия в пептидной цепи; дисульфидные связи.

5. Четвертичная структура белков. Кооперативные изменения конформации протомеров на примере гемоглобина, аллостерических ферментов.

6. Биологические функции белков. Способность к специфическим взаимодействиям. И специфическое узнавание как основа биологических функций всех белков. Комплементарность структуры центра связывания белка и лиганда; зависимость связывания от концентрации лиганда.

7. Глобулярные и фибриллярные белки. Пространственные конфигурации (α -кератиновая, β -кератиновая) фибриллярных белков, их свойства.

8. Общая характеристика физико-химических свойств белков. Растворимость и осаждаемость белков. Факторы стабилизации белковой молекулы в растворах.

9. Высаливание белков. Высаливающие агенты. Механизм высаливания. Практическое использование высаливания.

10. Денатурация белков. Факторы, механизм, практическое использование денатурации белков.

11. Электрические свойства белков. Механизм возникновения электрического заряда белков. Изоэлектрическая точка. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови на бумаге, протеинограмма здорового человека.

Практическая работа №3 Сложные белки

Цель работы: изучить состав сложных белков – хромопротеидов, фосфопротеидов, нуклеопротеидов

Теоретическая часть:

Сложные белки – комплексы, состоящие из белка и небелкового компонента, называемого простетической группой. К сложным белкам относятся: нуклеопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды, металлопротеиды и сложные белки-ферменты. Так, небелковой частью хромопротеидов являются окрашенные вещества, фосфопротеидов – фосфорная кислота, нуклеопротеидов – нуклеиновые кислоты и т. д. С помощью цветных реакций можно открыть составные компоненты сложных белков.

Реакции на нуклеопротеиды

Нуклеопротеиды состоят из белка и нуклеиновых кислот, которые построены из моноклеотидов.

Нуклеиновые кислоты – это биополимеры, мономерными звеньями которых являются нуклеотиды живых организмах нуклеиновые кислоты входят в состав нуклеопротеидов. Нуклеопротеиды – комплексы белка, являющиеся важнейшими составными элементами ядер живых клеток и вирусов. Связь белка, обладающего основными свойствами, с молекулами нуклеиновой кислоты (НК) в них осуществляется за счет солеобразных и водородных связей и легко разрушается путем солевой коагуляции белка. В результате этого процесса НК могут быть выделены в свободном виде. Нуклеотидами (в широком смысле) называют природные или синтетические соединения, в которых гидроксилы углеводного остатка нуклеозида этерифицированы одной или несколькими фосфатными группами, т. е. он является нуклеозидфосфатом.

Нуклеозиды – это природные или синтетические соединения, молекулы которых состоят из пуринового или пиримидинового основания, связанного N-гликозидной связью с остатком Д-рибозы или 2,-дезоксид-Д-рибозы.

Важнейшую роль в установлении строения НК сыграла реакция гидролиза, который можно осуществить ступенчато по приведенной схеме:

Нуклеопротеид → Нуклеиновая кислота (+ Белок) → Нуклеотид →
→ Нуклеозид (+H₃PO₄) → Пурины + Пиримидины + Пентозы

Молекулы нуклеиновых кислот всех типов живых организмов – это длинные неразветвленные полимеры полинуклеотидов. Роль мостика между нуклеотидами выполняет 3, 5-фосфорнодиэфирная связь, соединяющая 5-фосфат одного нуклеотида и 3-гидроксил остаток углеводной составляющей следующей. Поэтому такая цепь является полярной. На одном ее конце остается свободной 5-О-Фн-группа, а на другом – 3-ОН-группа остатка фосфорной кислоты у 5 атома углерода одного мононуклеотида с гидроксильной группой пентозы у 3 атома углерода другого. Данный тип связи осуществляет "первичную структуру" нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты классифицируют на 2 типа:

1 – дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), из которых при полном гидролизе можно выделить аденин, гуанин, цитозин, тимин, дезоксирибозу и фосфорную кислоту;

2 – рибонуклеиновые кислоты (РНК), гидролизующиеся до аденина, гуанина, цитозина, урацила, рибозы и фосфорной кислоты.

Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопротеиновых комплексов, которые рассматриваются как сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты.

Для качественного анализа химического состава нуклеопротеидов может быть использован гидролизат дрожжей как объект, богатый нуклеопротеидами. При частичном гидролизе нуклеопротеиды распадаются на белок (протамины или гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеопротеидов могут быть обнаружены: полипептиды (биуретовая реакция), пуриновые основания дают специфическую реакцию образования осадка солей серебра; фосфорную кислоту обнаруживают молибдатом аммония, рибозу или дезоксирибозу – по реакции "серебряного серебра", с реактивом Фелинга или пробой Троммера.

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

Контрольные вопросы:

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Укажите элементный состав белков и пептидов.
- 3 Охарактеризуйте свойства пептидов.
- 4 Белки как природные полипептиды.
- 5 Функции белков.
- 6 Классификация белков.
- 7 Структуры белка.
- 8 Понятие о коагуляции и денатурации. Причины данных явлений.
- 9 Растворимость белков.
- 10 Отношение белков к нагреванию в нейтральной, кислой и щелочных средах.
- 11 Качественные реакции на белки (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).
- 12 Укажите общие цветные реакции на белки и аминокислоты
- 13 Укажите условия выделения казеина из молока.
- 14 Какой состав имеют продукты гидролиза казеина?

Практическая работа №4 Ферменты

Цель работы: ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере сахарозы, амилазы, холинэстеразы

Теоретическая часть:

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы. Термин фермент (от лат. fermentum закваска) был предложен в начале XVII в. голландским ученым Ван-Гельмонтом для веществ, влияющих на спиртовое брожение. Ферменты и катализаторы неорганической природы, подчиняясь общим законам катализа, имеют сходные признаки:

- катализируют только энергетически возможные реакции;
- не изменяют направление реакции;
- не расходуются в процессе реакции;
- не участвуют в образовании продуктов реакции.

Почти все химические процессы в организмах и в различных производственных смесях протекают при участии ферментов.

Ферменты очень чувствительны к воздействию тепла, кислот, щелочей и солей металлов.

Большинство ферментов в водном растворе при комнатной температуре быстро теряет свою активность, поэтому растворы и препараты ферментов необходимо хранить при пониженных температурах. При длительной работе с растворами ферментов необходимо вносить антисептики (толуол или тимол) во избежание развития в растворах микроорганизмов.

Ферменты можно экстрагировать из растительного или животного материала водой, а затем водным экстрактом действовать на тот или иной субстрат (например, на крахмал или на белок). Учитывая количество образующихся продуктов реакции или изменения субстрата, определяют активность того или иного фермента. Так определяется активность ферментов, растворимых в воде. Однако ферменты не всегда растворяются в воде. Например, фермент липаза из семян клещевины не растворяется в воде. Поэтому в некоторых случаях применяются автолитические методы, основанные на том, что раз-

молотый и растертый испытуемый материал помещается в воду и оставляется на определенное время при температуре 40–45°C. Под действием как растворимых, так и нерастворимых ферментов, содержащихся в испытуемом материале, происходят соответствующие реакции. Таким образом, определяется суммарное действие ферментов, как растворимых в воде, так и нерастворимых.

Действие ферментов можно определить по вызываемому ферментами изменению окраски субстрата, по накоплению продуктов распада субстрата, по изменению вязкости, по изменению угла вращения плоскости поляризации и другими способами.

Белковую часть сложных белков ферментов называют апоферментом, а небелковую – кофактором. Кофактор условно делится на кофермент (коэнзим), легкодиссоциирующий и простетическую группу, труднодиссоциирующую. Кофермент легко присоединяется к различным апоферментам, а простетическая группа соединяется только с одним апоферментом.

Контрольные вопросы:

- 1 Правила техники безопасности при выполнении работы.
- 2 Понятие о ферментах.
- 3 Классификация ферментов.
- 4 Строение фермента.
- 5 Как можно обнаружить присутствие фермента в исследуемом материале?
- 6 Перечислите основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции.
- 7 Чем обусловлена специфичность ферментов?
- 8 Понятие об ингибиторах и активаторах.
- 9 Обратимое и необратимое ингибирование.
- 10 Методика исследования свойств сахаразы.
- 11 Методика исследования свойств амилазы.
- 12 Методика проведения биохимической реакции.

13 Особенность действия фосфорорганических соединений на фермент холинэстеразу.

14 Уравнение реакции гидролиза: сахарозы, крахмала, бутирилхолинйодида.

15 Определение ингибирующего действия хлорофоса.

Практическая работа №5 Нуклеиновые кислоты

Цель работы: провести кислотный гидролиз пекарских дрожжей, изучить некоторые продукты гидролиза дрожжей

Теоретическая часть:

Нуклеиновые кислоты, биополимеры, состоящие из остатков фосфорной кислоты, сахаров и азотистых оснований (пуринов и пиримидинов). Имеют фундаментальное биологическое значение, поскольку содержат в закодированном виде всю генетическую информацию любого живого организма, от человека до бактерий и вирусов, передаваемую от одного поколения другому.

Нуклеиновые кислоты были впервые выделены из клеток гноя человека и спермы лосося швейцарским врачом и биохимиком Ф.Мишером между 1869 и 1871. Впоследствии было установлено, что существует два типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновая (РНК) и дезоксирибонуклеиновая (ДНК), однако их функции долго оставались неизвестными.

В 1928 английский бактериолог Ф.Гриффит обнаружил, что убитые патогенные пневмококки могут изменять генетические свойства живых непатогенных пневмококков, превращая последние в патогенные. В 1945 микробиолог О.Эвери из Рокфеллеровского института в Нью-Йорке сделал важное открытие: он показал, что способность к генетической трансформации обусловлена переносом ДНК из одной клетки в другую, а следовательно, генетический материал представляет собой ДНК. В 1940–1950 Дж.Бидл и Э.Тейтум из Станфордского университета (шт. Калифорния) обнаружили, что синтез белков, в частности ферментов, контролируется специфическими генами. В 1942 Т.Касперсон в Швеции и Ж.Браше в Бельгии открыли, что нуклеиновых кислот особенно много в клетках, активно синтезирующих белки. Все эти данные наводили на мысль, что генетический материал – это нуклеиновая кислота и что она как-то участвует в синтезе белков. Однако в то время многие

полагали, что молекулы нуклеиновых кислот, несмотря на их большую длину, имеют слишком простую периодически повторяющуюся структуру, чтобы нести достаточно информации и служить генетическим материалом. Но в конце 1940-х годов Э.Чаргафф в США и Дж.Уайатт в Канаде, используя метод распределительной хроматографии на бумаге, показали, что структура ДНК не столь проста и эта молекула может служить носителем генетической информации.

Структура ДНК была установлена в 1953 М.Уилкинсом, Дж.Уотсоном и Ф.Криком в Англии. Это фундаментальное открытие позволило понять, как происходит удвоение (репликация) нуклеиновых кислот. Вскоре после этого американские исследователи А.Даунс и Дж.Гамов предположили, что структура белков каким-то образом закодирована в нуклеиновых кислотах, а к 1965 эта гипотеза была подтверждена многими исследователями: Ф.Криком в Англии, М.Ниренбергом и С.Очоа в США, Х.Кораной в Индии. Все эти открытия, результат столетнего изучения нуклеиновых кислот, произвели подлинную революцию в биологии. Они позволили объяснить феномен жизни в рамках взаимодействия между атомами и молекулами.

Типы и распространение. Как мы уже говорили, есть два типа нуклеиновых кислот: ДНК и РНК. ДНК присутствует в ядрах всех растительных и животных клеток, где она находится в комплексе с белками и является составной частью хромосом. У особей каждого конкретного вида содержание ядерной ДНК обычно одинаково во всех клетках, кроме гамет (яйцеклеток и сперматозоидов), где ДНК вдвое меньше. Таким образом, количество клеточной ДНК видоспецифично. ДНК найдена и вне ядра: в митохондриях («энергетических станциях» клеток) и в хлоропластах (частицах, где в растительных клетках идет фотосинтез). Эти субклеточные частицы обладают некоторой генетической автономией.

Бактерии и цианобактерии (сине-зеленые водоросли) содержат вместо хромосом одну или две крупные молекулы ДНК, связанные с небольшим количеством белка, и часто – молекулы ДНК меньшего размера, называемые

плазмидами. Плазмиды несут полезную генетическую информацию, например содержат гены устойчивости к антибиотикам, но для жизни самой клетки они несущественны.

Некоторое количество РНК присутствует в клеточном ядре, основная же ее масса находится в цитоплазме – жидком содержимом клетки. Большую ее часть составляет рибосомная РНК (рРНК). Рибосомы – это мельчайшие тельца, на которых идет синтез белка. Небольшое количество РНК представлено транспортной РНК (тРНК), которая также участвует в белковом синтезе. Однако оба этих класса РНК не несут информации о структуре белков – такая информация заключена в матричной, или информационной, РНК (мРНК), на долю которой приходится лишь небольшая часть суммарной клеточной РНК. Генетический материал вирусов представлен либо ДНК, либо РНК, но никогда обеими одновременно.

Контрольные вопросы:

1. Сложные белки, общая характеристика, классификация..
2. Нуклеопротеины – строение, классификация, биологическая роль. Уровни упаковки ДНК в составе хроматина. Строение простетической группы нуклеопротеинов – понятие о нуклеиновых кислотах, отличия ДНК от РНК.
3. Собственно гликопротеины. Классификация. Характеристика простетической группы гликопротеинов – классификация, структура, химические свойства углеводов. Гликопротеины слизи.
4. Гликопротеины плазмы крови. Методы их исследования. Биологическая роль отдельных представителей (трансферрин, гаптоглобин, церрулоплазмин, транскортин, урогликопротеиды и др.).
5. Протеогликаны. Строение простетической группы – гликозаминогликанов. Принцип построения протеогликановых комплексов, цементирующая роль гиалуроновой кислоты.
6. Понятие о мукополисахаридах или болезнях накопления гликозаминогликанов в тканях.

Практическая работа №6 Липиды

Цель работы: ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на липиды

Теоретическая часть: Липиды (от греч. липос – жир) – низкомолекулярные органические соединения, практически нерастворимые в воде, которые могут быть извлечены из клеток неполярными органическими растворителями (хлороформ, бензол, петролейный эфир). Отличительным свойством липидов является их гидрофобность (липофильность). Липиды представляют собой разнородные химические соединения

I Простые липиды:

1 ацилглицеролы (жиры, триглицериды и т. п.);

2 воска.

II Сложные липиды:

1 фосфолипиды

- глицерофосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, кардиолипин, плазмалоген);

- сфингофосфолипиды (сфингомиелин);

2 стероиды (холестерол, эргостерол, ланостерол, стигмастерол, экидистероиды);

3 гликолипиды (цереброзиды, ганглиозиды, сульфатиды).

Для характеристики жира используют константы или жировые числа:

Кислотное число – масса КОН (мг), необходимая для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира.

Число омыления – это масса КОН (мг), необходимая для гидролиза нейтральных липидов (омыления) и нейтрализации всех жирных кислот (в том числе и свободных), содержащихся в 1 г жира. Чем выше число омыления, тем больше низкомолекулярных кислот входит в состав жира.

Йодное число – это масса йода (г), связываемая 100 г жира. Йодное число характеризует степень ненасыщенности, так как присоединение йода происхо-

дит по месту разрыва кратных связей в остатке жирной кислоты. Чем больше йодное число, тем выше ненасыщенность жира.

Липиды широко применяют в медицине и технике. Из них получают основу для мазей, мыло (соли жирных кислот), масляные краски, олифу и т. п.

Контрольные вопросы:

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Дайте определение и проведите классификацию липидов.
- 3 Укажите функции липидов в организме.
- 4 Особенности высших жирных кислот, входящих в состав липидов человека.
- 5 Приведите примеры качественных реакций, доказывающих непредельный характер ВЖК.
- 6 Напишите структурные формулы представителей простых и сложных липидов: ТАГ, фосфолипидов, холестерина.
- 7 Какие реакции лежат в основе омыления жира?
- 8 Какие числа характеризуют состав и строение липидов?
- 9 Перечислите компоненты, участвующие в переваривании жиров.
- 10 Значение ВЖК, холестерина в метаболических процессах.

Практическая работа №7 методы исследования структуры белков и пептидов

Цель работы: ознакомиться с основными методами исследования структуры белка

Теоретическая часть:

Аминокислоты, соединяясь пептидной связью, образуют полипептидные цепи. Линейная последовательность аминокислотных остатков, соединенных между собой пептидными связями, определяет первичную структуру белковой молекулы.

ЭТАПЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

1. Выделение белка из смеси в чистом виде (по одному из признаков: размер молекулы, заряд, специфическое сродство связывания). Определение молекулярной массы белка.
2. Определение N-концевой АК.
3. Определение C-концевой АК.
4. Определение АК-последовательности белковой цепи.

Выделение белка из биологического материала основано на его физико-химических свойствах. Чаще всего для этих целей используют кислотно-основные свойства белков (ам-фотерность, заряд молекулы, изоэлектрическое состояние).

От заряда белковых молекул зависит их:

- растворимость (минимальна в ИЭТ);
- электрофоретическая подвижность;
- структура и биологическая активность.

При растворении в водной среде на поверхности белковой молекулы формируется гидратная оболочка.

Устойчивость белка в растворе зависит:

- 1) от заряда белковой молекулы;
- 2) наличия гидратной оболочки;

3) от молекулярной массы белка.

Для выделения нативных белков (без изменения пространственной структуры) используют метод высаливания:

- осаждение солями щелочноземельных металлов: хлорид натрия, сульфат аммония;
- осаждение другими водоотнимающими веществами: спиртом или ацетоном при низких температурах (около -20°C).

При использовании этих методов белки лишаются гидратной оболочки и выпадают в осадок.

Денатурация — нарушение пространственной структуры белков (первичная структура молекулы сохраняется). Может быть обратимая (структура белка восстанавливается после устранения денатурирующего агента) или необратимая (пространственная структура молекулы не восстанавливается, например, при осаждении белков минеральными концентрированными кислотами, солями тяжелых металлов).

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Отделение белков от низкомолекулярных примесей
Метод мембранных сит (диализ)

Используют диализную мембрану, которая является полимером и имеет поры определенной величины. Малые молекулы (низкомолекулярные примеси) проходят через поры в мембране, а крупные (белки) задерживаются. Таким образом, белки отмывают от примесей.

Разделение белков по молекулярной массе
Гельхроматография

Хроматографическую колонку заполняют гранулами геля (сефадекс), который имеет поры определенной величины. В колонку вносят смесь белков. Белки, размер которых меньше, чем размер пор сефадекса, задерживаются в колонке, так как «застревают» в порах, а остальные свободно выходят из колонки (рис. 2.1). Размер белка зависит от его молекулярной массы.

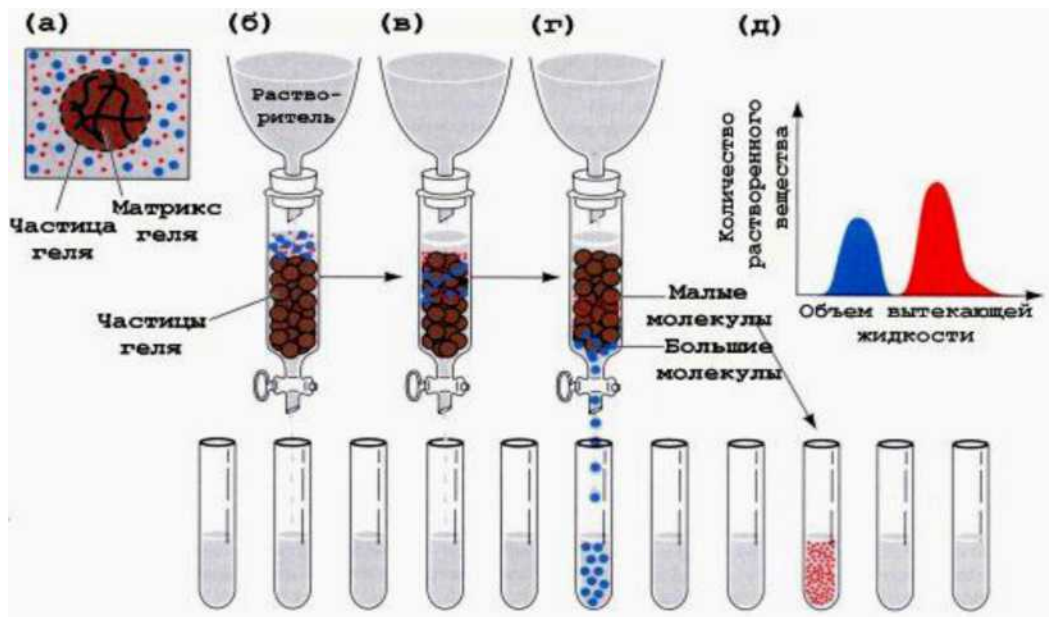


Рис1. Разделение белков методом гель-фильтрации

Ультрацентрифугирование

Этот метод основан на различной скорости седиментации (осаждения) белковых молекул в растворах с различным градиентом плотности (сахарозный буфер или хлорид цезия)

Электрофорез

Данный метод основан на различной скорости миграции белков и пептидов в электрическом поле в зависимости от заряда. Носителями для электрофореза могут служить бумага, крахмал, ацетатцеллюлоза, агар и другие гели.

Гель-электрофорез. Разделяемые молекулы движутся в геле в зависимости от их размера и формы: те из них, которые имеют большие размеры, будут задерживаться при прохождении через поры геля. Следовательно, после проведения электрофореза большие молекулы будут находиться ближе к старту, чем меньшие.

Выделение индивидуальных белков

Изоэлектрофокусирование

Метод основан на различной величине ИЭТ белков. Белки разделяют методом электрофореза на пластине с амфолином (это вещество, которое формирует градиент рН в диапазоне от 3 до 10). При электрофорезе белки разделяются в соответствии со значением их ИЭТ (в ИЭТ заряд белка будет равен

нулю, и он не будет передвигаться в электрическом поле).

Двухмерный электрофорез

Представляет собой сочетание изоэлектрофокусирования и электрофореза с ДДС-На. Проводят сначала электрофорез в горизонтальном направлении на пластине с амфолином. Белки разделяются в зависимости от заряда. Затем обрабатывают пластину раствором ДДС- Na и проводят электрофорез в вертикальном направлении. Белки разделяются в зависимости от молекулярной массы.

Аффинная хроматография

Метод основан на способности белков связываться со своими лигандами. Используется для выделения и очистки ферментов, иммуноглобулинов, рецепторных белков.

Колонку для аффинной хроматографии заполняют инертным веществом, к которому ковалентно присоединены лиганды (молекулы, с которыми специфически будут связываться определенные белки). При прохождении смеси белков через колонку искомым белком присоединяется к лиганду. Остальные белки свободно выходят из колонки. Белок, который остался в колонке, затем можно выделить с помощью буферного раствора, содержащего лиганд в свободном состоянии. Этот высокочувствительный метод позволяет выделить в чистом виде очень малые количества белка из клеточного экстракта, содержащего сотни других белков.

Анализ гомологичных белков

Гомологичные белки — белки, которые выполняют одну и ту же функцию, но различаются по первичной структуре (например, локализованы в различных органах или образуются при патологических состояниях). Например, НБА (содержит Glu) => HbS (содержит Val) при серповидноклеточной анемии.

Метод пептидных карт (отпечатков пальцев), предложенный Ингреном

Этапы:

- 1) оба анализируемых белка расщепляют на фрагменты (пептиды);

- 2) смесь пептидов каждого белка наносят в виде пятна на угол листа хроматографической бумаги;
- 3) проводят электрофорез в горизонтальном направлении;
- 4) проводят распределительную хроматографию в вертикальном направлении;
- 5) полученные карты окрашивают и сравнивают;
- 6) различающиеся пептидные пятна выделяют и анализируют.

Практическая работа №8 Белки соединительных тканей (молекулы внеклеточного матрикса)

Цель работы: изучить состав белков соединительной ткани живых организмов

Теоретическая часть:

Главный компонент внеклеточного матрикса — белки. Выделяют 3 группы белков:

- протеогликаны (ПГ);
- фибриллярные структурные белки (семейства коллагена и эластина);
- фибриллярные адгезивные белки (семейства фибронектина и ламинина).

Все эти белки содержат углеводы, поэтому относятся к сложным белкам и называются белково-углеводные комплексы (БУК).

БУК классифицируются по двум критериям: количеству углеводов в комплексе и качественному углеводному составу:

- протеогликаны (свыше 95 % углеводов);
- мукопротеины (10-50 % углеводов);
- гликопротеины (менее 10 % углеводов).

ПГ — это белковые комплексы, в которых с молекулами белка ковалентно связаны гликозаминогликаны (ГАГ). Белки ПГ называют коровыми белками (core — сердцевина, стержень).

ГАГ — гетерополисахариды, построенные по стандартному принципу: состоят из многократно повторяющихся дисахаридов, мономерами которых являются уроновые кислоты и гексозамины. Классифицируют ГАГ по строению остатков моносахаридов, типу связи между ними, числу и локализации сульфатных групп. Выделяют несколько семейств ГАГ (рис. 3):

- 1) гиалуронаты;
- 2) хондроитин- и дерматансульфаты;
- 3) кератансульфаты;

4) гепарин и гепарансульфаты.

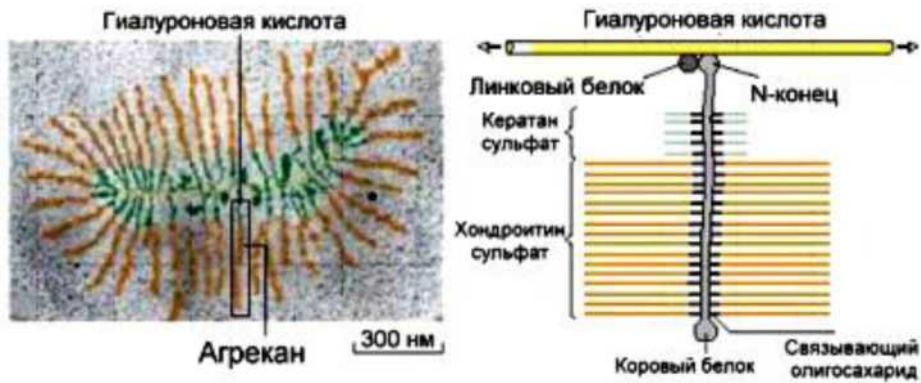


Рис. 3. Строение главного ПГ хрящевой ткани — агрекана

Функции ПГ: 1) являются структурными компонентами внеклеточного матрикса;

2) специфически взаимодействуют с коллагеном, эластином, фибронектином, ламинином и другими белками матрикса; 3) как полианионы, они связывают поликатионы и катионы;

4) обеспечивают тургор (упругость) различных тканей, связывая воду; 5) противостоят компрессионным силам; 6) влияют на клеточную миграцию; 7) действуют как антикоагулянты.

Гликопротеины и мукопротеины часто считают синонимами, так как различия между ними касаются лишь количества углеводов в комплексе, а моносахариды глико- и мукопротеинов одинаковы: галактоза, манноза, гексозамины, нейраминовая и сиаловая кислоты.

Функции мукопротеинов: 1) как компоненты секретов слизистых оболочек, они обладают защитными свойствами, уменьшая трение соприкасающихся поверхностей; 2) обеспечивают групповую, видовую и тканевую специфичность; 3) обладают ферментативной активностью.

Функции гликопротеинов: 1) являются структурными компонентами мембраны клетки, коллагеновых, эластиновых и фибриновых волокон, костного матрикса; 2) транспортные молекулы для витаминов, липидов, микроэлементов; 3) обеспечивают иммунную защиту; 4) обладают гормональной и ферментативной активностью (тиротропин, факторы свертывания крови).

В зависимости от типа связи между углеводной и белковой частями различают 2 типа

БУК:

- БУК с О-гликозидной связью между углеводом и СЕР, ТРЕ, гидроксигИЗ (ОН- ЛИЗ) белковой молекулы;
- БУК с N-гликозидной связью между углеводом и амидным азотом АСН белковой молекулы.

Белковые части обоих типов БУК синтезируются по законам матричного синтеза, а углеводные части — нематрично по двум механизмам:

- углеводная цепь для БУК с О-гликозидной связью образуется путем постепенного добавления моносахаридов к синтезированной белковой части с помощью ферментов гликозилтрансфераз, обладающих очень большой специфичностью;
- углеводная цепь для БУК с N-гликозидной связью синтезируется на специальной матрице — долихоле (полиизопреновое соединение) — и только затем присоединяется к синтезированной белковой части.

Распад БУК катализируется с помощью ферментов лизосом. Белковую часть расщепляют протеиназы, а углеводную цепь — гликозидазы. При врожденных дефектах гликозидаз возникают заболевания — мукополисахаридозы (болезни накопления БУК, лизосомные болезни).

Фибриллярные структурные белки

Коллагены — основные гликопротеины соединительных тканей. Они составляют 25 % всех белков организма человека и обеспечивают сопротивление растяжению в отличие от ПГ, которые противодействуют сжатию. В геноме человека 30 генов, кодирующих коллагеновые α-цепи. Выделено свыше 20 типов коллагеновых молекул (изоколлагены) (табл. 1).

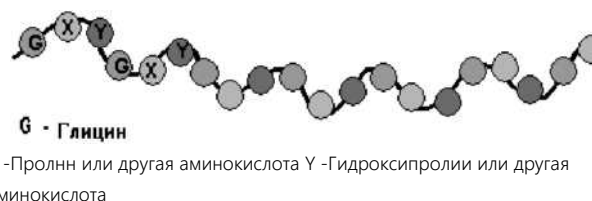
Таблица 1

Характеристика коллагенов

Тип коллагена	Длина волокна	Состав	Выделен
Тип I	300 нм	$[a_1(I)]_2a_2(I)$	Из кости, роговицы, дентина,
Тип II	300 нм	$[\alpha_2(\text{II})]_3$	Из гиалинового хряща
Тип III	300 нм	$[\alpha_1(\text{III})]_3$	Из дермы, клапанов сердца,
Тип IV	390 нм	$[\alpha_1(\text{IV})]_3$	Из базальных мембран
Тип V	300 нм	$[\alpha_1(\text{V})]_2a_2(\text{V})$	Из кости, роговицы, больших
Тип VI	105 нм	$\alpha_1(\text{VI}), \alpha_2(\text{VI})$	Из кровеносных сосудов
Тип VII	450 нм	$\alpha_1(\text{VII})$	Из эндотелия сосудов
Тип VIII	150 нм	$\alpha_1(\text{VIII})$	Из эндотелия сосудов
Тип IX	200 нм	$\alpha_1(\text{IX}), \alpha_2(\text{IX})$	Из хрящевой ткани
Тип X	150 нм	$\alpha_1(\text{X})$	Из хрящевой ткани

Изоколлагены типов I-III получили название фибрилформирующих коллагенов, а изоколлагены IX и XII — фибриллассоциируемых коллагенов, так как они обычно связаны с коллагеновыми волокнами, которые образовали фибрилформирующие коллагены. Фибриллассоциируемые коллагены обеспечивают соединение волокон с другими молекулами матрикса. Типы IV и VII называют сетьформирующими коллагенами. Они образуют сетевидные структуры и чаще всего находятся в базальных мембранах, обеспечивая связь клеточных слоев эпителия с подлежащей соединительной тканью. Это особенно важно для кожи.

Первичная структура коллагена — одиночная полипептидная цепь: 1/3 - ГЛИ, 1/5 - ПРО и гидроксипРО (ОН-ПРО), есть и ОН-ЛИЗ (рис. 3.2). К ней присоединен дисахарид (глюкоза + галактоза). Полипептидная цепь — левозакрученная спираль, но водородные связи отсутствуют, так как много иминокислот.



Вторичная структура — особый коллагеновый тип: 3 полипептидные цепи сворачиваются в тройную, линейную, правозакрученную спираль. Такая молекула называется тропоколлаген (рис.



Рис. 3.2. Первичная структура α -цепи коллагена

3.3).

Третичная структура — соединение в пространстве молекул тропоколлагена между собой по горизонтали: «голова» к «хвосту».

Четвертичная структура — ассоциация между собой молекул тропоколлагена,



имеющих третичную структуру, по вертикали: в виде «лестницы». Каждая «ступенька» такой лестницы смещена относи-

Рис. 3.3. Вторичная структура коллагена — тройная спираль из ос-цепей, каждая из которых состоит из 1000 аминокислот или 330 повторяющихся триплетов

тельно соседней на 1/4 своей длины. В образующиеся в ходе такого сдвига пустоты в костной ткани и в твердых тканях зуба откладываются кристаллы фосфата кальция, которые становятся центром нуклеации (ядром) для роста кристаллов гидроксиапатита.

Синтез коллагена. Полипептидные цепи синтезируются на полисомах в виде препро- коллагена («пре» указывает на наличие сигнального, лидирующего пептида; «про» — на наличие дополнительных пептидов на N- и C-концах). Затем начинается процессинг препро- коллагена (табл. 2).

Таблица.2

Порядок и локализация процессинга препроколлагена

Внутриклеточно	Внеклеточно
1. Удаление сигнального пептида	1. Удаление дополнительных пептидов
2. Гидроксилирование ПРО и ЛИЗ	2. Образование коллагеновых волокон с поперечной исчерченностью
3. Гликозилирование ОН-ЛИЗ	3. Окислительное дезаминирование
4. Образование внутри- и межцепо-	

Разрушается коллаген коллагеназами и лизосомными ферментами — протеиназами и гликозидазами. О «возрасте» коллагена можно судить по количеству поперечных ковалентных связей в коллагеновых волокнах: чем «моложе» коллаген, тем меньше поперечных связей, тем легче и быстрее он разрушается, и наоборот.

Эластин. Молекула эластина состоит из двух типов фрагментов, чередую-

щихся вдоль цепи: гидрофобные (фибрилярные) сегменты, которые ответственны за эластические свойства молекулы и глобулярные сегменты, богатые АЛА и ЛИЗ, имеющие форму α -спирали и участвующие в формировании поперечных связей между молекулами эластина. В отличие от

коллагена у эластина один генетический тип, мало ОН-ПРО, нет ОН-ЛИЗ, дополнительных пептидов, углеводов, не образуется тройная спираль. Синтезируется эластин в виде мономера, а внеклеточно происходит фибрилlogenез с образованием поперечных связей с помощью аминокислоты десмозина — продукта межмолекулярной конденсации 4-х остатков ЛИЗ. Эластин — самый прочный из белков, известных в организме человека. Разрушается под действием фермента эластазы.

Фибриллярные адгезивные белки

Внеклеточный матрикс содержит большое число адгезивных неколлагеновых белков, структурной особенностью которых является наличие доменов, способных специфически связываться с другими макромолекулами и рецепторами на поверхности клетки. Непременным компонентом доменов, обеспечивающих взаимодействие с клетками, является последовательность аминокислот АРГ-ГЛИ-АСП (R-G-D).

Фибронектин — высокомолекулярный гликопротеин. Существуют множественные формы фибронектина. Одна из них — фибронектин плазмы и других биологических жидкостей. Он принимает участие в механизмах свертывания крови и заживления ран. Фибронектины тканей располагаются на поверхности клеток, образуя фибронектиновые филаменты. Фибронектин ускоряет клеточную миграцию, обеспечивая взаимодействие клеток с матриксом.

Фибриллин — структурный компонент микрофибрилл, обеспечивающих образование эластиновых волокон. Он найден в хрусталике, периосте, аорте. При мутации гена, кодирующего синтез фибриллина, развивается синдром Марфана: эктопия хрусталика, арахно-дактилия («паучьи» пальцы), поражение суставов.

Ламинин и энтактин — гликопротеины базальной мембраны. Они связываются не только между собой, но и с изоколлагеном IV, гепарансульфатом, поверхностью эпителиальных клеток, причем для связывания с различными веществами имеются свои домены.

Каждый тип соединительной ткани имеет свои специфические наборы молекул: кроме соответствующих изоколлагенов, имеются и специфические неколлагеновые белки.

В хрящевой: главный ПГ (рис. 3.4) и минорные ПГ (фибромодулин — регулятор фибриллогенеза; бигликан — значение его пока неизвестно; декорин — способен связываться с изоколлагеном II и играет роль ингибитора фибринолиза; белки с разной молекулярной массой и не очень изученными функциями, из известных функций — связывание с хондроцитами, кристаллами гидроксиапатита, изоколлагеном II для его фиксации к хондроцитам).

Практическая работа №9 Введение в энзимологию. Свойства ферментов

Цель работы: изучить строение, свойства и механизм действия ферментов

Теоретическая часть:

Катализатор — это вещество, которое ускоряет химическую реакцию, но само в ходе этой реакции не расходуется.

Энзим (en zyme — в дрожжах), фермент (fermentum — закваска) — термины для обозначения биологических катализаторов белковой природы.

Рибозим — это биологический катализатор рибонуклеиновой природы.

Субстратом (S) называют вещество, химические превращения которого в продукт (P) катализирует фермент (E).

Чтобы произошла химическая реакция, необходимы следующие условия:

- 1) молекулы должны сблизиться (столкнуться);
- 2) запас энергии молекул в момент столкновения должен быть не ниже энергетического барьера реакции.

КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

В начале XX в. предложили называть ферменты по названию субстрата с добавлением суффикса -аза (amylum — амилаза, lipos — липаза, protein — протеиназа). В 1961 г. Международный Совет Биохимиков (IUB) предложил положить в основу названия и классификации ферментов тип химической реакции и ее механизм. Все ферменты разделили на 6 классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы). Каждый класс состоит из 4-13 подклассов, а те в свою очередь из подподклассов.

1. Оксидоредуктазы — это ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов А и В: $A_{red} + B^{\wedge} \rightarrow A_{ж} + B^{\wedge}$.

2. Трансферазы — это ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса группы X, кроме водорода и кислорода, с субстрата А на субстрат В: $A-X + B \leftrightarrow A + B-X$.

3. Гидролазы — это ферменты, которые катализируют расщепление внутримолекулярных связей с участием воды. Например: Ацетилхолин +

$\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Холин} + \text{Уксусная кислота}$.

4. Лиазы — это ферменты, отщепляющие группы от субстратов по негидролитическому механизму с образованием двойных связей и присоединением веществ по месту двойной связи.

5. Изомеразы катализируют превращения различных типов оптических, геометрических и позиционных изомеров.

6. Лигаза катализируют соединение двух молекул, сопряженное с разрывом пиро- фосфатной связи АТФ или другого макроэргического соединения.

Каждый фермент по классификации ферментов (КФ, ЕС) обозначается четырьмя цифрами (шифр фермента): 1 — класс, 2 — подкласс, 3 — подподкласс, 4 — номер фермента в списке подподкласса. Так, например, КФ 2.7.1.1 означает: класс 2 (трансферазы), подкласс 7 (перенос фосфата), подподкласс 1 (алкогольная группа — акцептор фосфата). Конечное название — гексокиназа, или АТФ^γ-гексоза-6-фосфотрансфераза, фермент, катализирующий перенос фосфата с АТФ на гидроксильную группу у шестого углеродного атома глюкозы.

СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТА

По сложности строения белковой молекулы выделяют простые (однокомпонентные) ферменты, состоящие только из белковой части, и сложные (двухкомпонентные) ферменты, имеющие кроме белковой части (апофермента) и небелковую часть (кофермент). В этом случае сложный фермент часто называют холофермент.

Кофермент часто называют кофактором или простетической группой. Отличие заключается в характере связывания с апоферментом. Кофермент связывается с ним нековалентными связями, а кофактор (простетическая группа) — ковалентными.

Коферменты выполняют следующие функции: а) являются посредниками между ферментом и субстратом; б) непосредственно участвуют в акте катализа; в) стабилизируют апо- фермент.

Роль коферментов могут выполнять как органические, так и неорганические соединения. Различают: а) коферменты алифатического ряда (липоевая кислота); б) коферменты ароматического ряда (убихинон); в) коферменты — производные водорастворимых витаминов (ТПФ, ПФ); г) коферменты-нуклеотиды (НАД⁺, ФАД); д) коферменты-металлы (Zn, Co, Mg).

В строении белковой части фермента можно выделить ряд функциональных доменов, обеспечивающих главные функции фермента: а) домен, обеспечивающий связь с коферментом (в двухкомпонентных ферментах); б) домен, обеспечивающий взаимодействие с регулятором (регулируемые ферменты) и др. Обязательным для всех ферментов является домен — активный центр фермента. Он образуется из остатков аминокислот, находящихся в составе различных участков полипептидной цепи или различных полипептидных цепей, но пространственно сближающихся при образовании пространственной структуры белка-фермента. В активном центре выделяют: а) способствующие группы; б) контактный (якорный) участок; в) каталитический участок; г) вспомогательные группы.

Белковая природа ферментов придает им ряд особенностей, отличающих их от обычных катализаторов. Эти особенности ферментов называют общими свойствами ферментов. К ним относятся:

8 12

- высокая молекулярная активность (ферменты могут ускорять реакцию в 10 -10 раз);
- высокая специфичность ферментов к субстратам (субстратная специфичность) и к типу катализируемой реакции (реакционная специфичность);
- высокая чувствительность ферментов к неспецифическим физико-химическим факторам среды — температуре, рН, ионной силе раствора и т. д.;
- высокая чувствительность к химическим реагентам;
- возможность регуляции активности.

Важное условие, характеризующее действие фермента, — специфичность взаимодействия. Различают несколько типов специфичности: а) абсолютная — фермент катализирует превращение строго определенного вещества (уреаза расщепляет только мочевину на CO_2 и NH_3); б) стереохимическая — фермент катализирует превращение только одного стереоизомера при наличии рацемата (L-оксидазы превращают L-аминокислоты, но не D-аминокислоты); в) групповая абсолютная специфичность — фермент катализирует превращения группы субстратов, имеющих одинаковую химическую группу, связанную одним типом химических связей (например, метилэстеразы действуют на субстраты, в которых метильная группа связана эфирной связью); г) групповой относительной специфичностью обладают ферменты, для которых важен только тип связи. Существуют две модели, объясняющие специфичность: модель Фишера — «ключ - замок» и модель Кошленда — индуцированного взаимодействия.

Единицы измерения активности

Катал — это количество фермента, которое обеспечивает превращение 1 моля субстрата за 1 секунду.

Стандартная единица (U) — это количество фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата за 1 минуту. $1 \text{ U} = 16,67 \text{ нкатал}$ (нанокатал).

В медицине активность ферментов выражают чаще всего в единицах активности на

1 л биологической жидкости.

Удельная активность — выражается в единицах активности, рассчитанной на 1 мг белка.

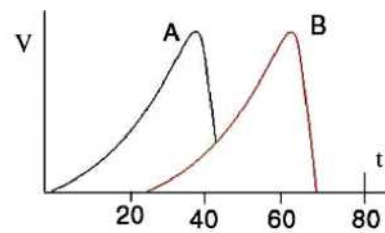
Влияние температуры

Наивысшую активность ферменты обычно проявляют в очень узком интервале

темпе

ратур (40-50 °С). До этого интервала с повышением температуры скорость катализируемой ферментами реакции повышается.

Выше оптимальной температуры активность ферментов снижается, а при температуре 50-60 °С совершенно прекращается — фермент инактивируется (существуют термоустойчивые ферменты).

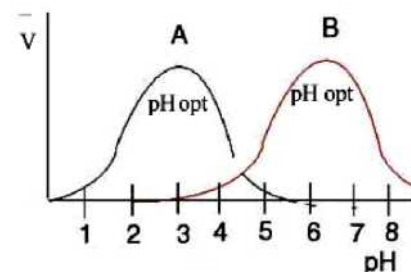


Влияние pH

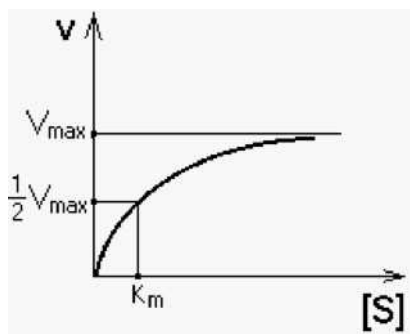
Для каждого фермента существует определенное значение pH, при котором его действие оптимально.

Объясняется это зависимостью диссоциации ионогенных групп фермента или субстрата от реакции среды.

Активность фермента зависит от определенного состояния (ионизированного или не-ионизированного) активного центра. На рисунке показаны два фермента с различными pH оптимумами.



Влияние концентрации субстрата



Исследование влияния концентрации субстрата на активность фермента позволило во многом объяснить механизм действия фермента. При постоянной концентрации фермента начальная скорость реакции растет пропорционально увеличению концентрации субстрата (реакция первого порядка для низких концентраций субстрата).

При высоких концентрациях скорость реакции достигает своего максимального значения (V_{max}) и не зависит от концентрации субстрата (реакция нулевого порядка). Эта кривая описывается уравне-

§

нием Михаэлиса-Ментен: $V = V_{max} \frac{[S]}{K_T + [S]}$

где K_T — константа Михаэлиса, численно равна той концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину от максимального значе-

ния.

ния.

С помощью K_T можно характеризовать сродство данного фермента к данному субстрату. Чем меньше K_T , тем больше сродство фермента к данному субстрату. Если K_T высока, то это означает, что сродство фермента к такому субстрату низкое и реакция при небольших концентрациях субстрата протекает неэффективно.

Практическая работа №10 Регуляция активности ферментов

Цель работы: изучить факторы влияющие на активность ферментов

Теоретическая часть:

Изменить скорость химического процесса в клетке можно путем: а) изменения количества субстрата или продукта реакции (регуляция проницаемости мембран); б) изменения количества фермента (регуляция синтеза белков); в) изменения активности фермента. Ниже будут приведены механизмы регуляции активности фермента. Можно выделить три основных принципа специфической регуляции активности ферментов: изостерическая регуляция, аллостерическая регуляция и ковалентная модификация структуры ферментов.

Влияние ингибиторов

Ингибиторы ферментов — это вещества, замедляющие ферментативные реакции (рис. 5.1).

Неспецифические

различ-
физико-

но вызы-

вают высокие температура или давление, некоторые виды облучения, действие сильных кислот или щелочей, солей тяжелых металлов и т.п.

Специфические
способны к специфическому
взаимодействию с функцио-
нальными центрами ферментов

Ингибиторы
ные не-специфические физические,
химические, химические воздействия, обыч-
но вызывают денатурацию белка-фермента (вы-

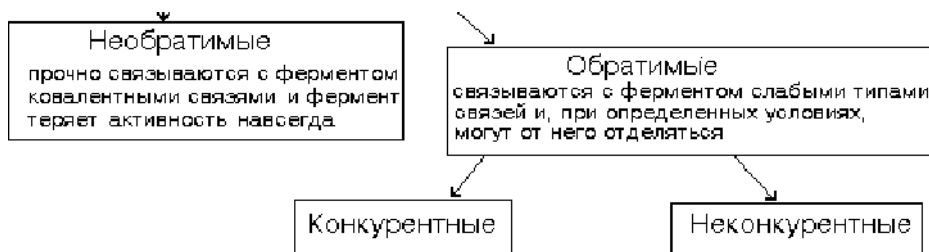


Рис. 5.1. Классификация ингибиторов ферментов

Конкурентные (изостерические) ингибиторы имеют следующие характеристики:

а) они похожи по структуре на субстрат (изо — подобный); б) эффект конкурентного ингибитора может быть устранен избытком субстрата (V_{max} не изменяется, а соответствующая K_m увеличивается). Как субстрат, так и ингибитор связываются с ферментом в активном центре, и связывание там одного из них исключает связывание второго.

Неконкурентные ингибиторы имеют следующие характеристики: а) ингибитор не похож по структуре на субстрат; б) эффект неконкурентного ингибитора не может быть устранен избытком субстрата (V_{max} уменьшается, а K_m остается неизменной). Связывание ингибитора с ферментом не влияет на связывание субстрата с ферментом.

Ингибитор (I) может связываться как с ферментом (E), так и с фермент-субстратным комплексом (ES), но только ES-комплекс (а не ESI-комплекс) ведет к образованию продукта.

По аналогии с изостерическими этот вид ингибиторов должен быть назван аллостерическим (аллос — иной, другой), однако термин «аллостериче-

ский» закрепился за регуляторами, действующими на мультимерные ферменты, субъединицы которых кооперативно реагируют на связывание регулятора с аллостерическим центром.

При связывании регулятора с аллостерическим центром происходит изменение конформации фермента, которое может оказать значительное влияние на связывание субстрата и скорость реакции.

Примеры использования ингибиторов в медицинской практике

При лечении заболеваний микробной этиологии — сульфаниламидные препараты структурно подобны парааминобензойной кислоте и тормозят образование фолиевой кислоты, необходимой для роста микроорганизмов. При отравлении антифризом (этиленгликолем) дают противоядие — этиловый спирт в больших дозах, играющий роль конкурирующего субстрата для алкогольдегидрогеназы. Для лечения подагры используют аллопуринол (необратимый ингибитор ксантиноксидазы). Для лечения алкоголизма используют эспераль — необратимый ингибитор оксидазы уксусного альдегида, что тормозит превращение альдеги

да в уксусную кислоту. Накапливающийся альдегид оказывает сильное токсическое действие. Для лечения панкреатита применяют контрикал — необратимый ингибитор протеолитических ферментов поджелудочной железы — для предотвращения «самопереваривания» железы.

Ковалентная модификация структуры фермента

1. Необратимое активирование путем гидролиза части полипептидной цепи фермента с формированием активного центра (ограниченный протеолиз).
2. Необратимое ингибирование ферментов путем присоединения определенного белка к активному ферменту.
3. Необратимое ингибирование путем ковалентного связывания аналогов субстратов с функциональными группами энзима в его активном центре.
4. Обратимая ковалентная модификация путем присоединения или отщепления от фермента небольшой химической группы, что изменяет его активность. Например, гликогенсинтаза переходит в неактивное состояние после ковалентного присоединения фосфатной группы к боковой цепи одного из сериновых остатков и снова активируется при отщеплении фосфата. Присоединение и отщепление Фн происходит разными способами и катализируется двумя разными ферментами.

Множественные формы ферментов

Это ферменты, которые катализируют одинаковые реакции, но отличаются по физико-химическим свойствам. По происхождению можно выделить две группы таких ферментов: а) изоферменты — это ферменты, в которых различия генетически детерминированы;

б) множественные формы, образующиеся в результате модификации молекул фермента после его синтеза.

Классификация изоферментов: а) по органной локализации — ферменты гликолиза в мышцах и печени; б) по внутриклеточной локализации — малатдегидрогеназа митохондриальная и цитоплазматическая; в) изоферменты,

образующиеся в результате мутаций структурных генов; г) гибридные формы, образующиеся путем нековалентного связывания нескольких разных по структуре полипептидных цепей. Так, ЛДГ состоит из 4-х цепей 2-х видов — Н и М. Из них возможно образование пяти изоферментов — Н4, Н3М, Н2М2, М3Н и М4. Н4 и Н3М преобладают в миокарде, а М4 — в печени.

Медицинские аспекты энзимологии

Ферменты плазмы крови

В крови могут присутствовать следующие ферменты:

- 1) Секреторные (плазмоспецифические) — синтезируются в печени и в норме выделяются в плазму крови, где выполняют свою функцию (например, ферменты свертывания крови).
- 2) Экскреторные — синтезируются в печени и в норме выделяются с желчью (например, щелочная фосфатаза). При патологических состояниях могут появляться в крови.
- 3) Индикаторные (клеточные) — попадают в кровь из клеток органов и тканей при их некрозе (гибели клеток), повышении проницаемости клеточных мембран или усилении пролиферации клеток, продуцирующих фермент. Таким образом, определение активности некоторых ферментов в крови имеет диагностическую ценность (см. ниже).

Выход ферментов из клеток в кровь зависит от размера молекул фермента: чем меньше размер, тем легче ферменты попадают в кровь. На уровень ферментов в крови влияет также продолжительность их жизни (скорость обновления). Дольше всех «живут» ферменты костной ткани, мышц, ЦНС, меньше — ферменты печени, жировой ткани, клеток крови.

Области применения ферментов в медицине

Для скрининг-диагностики — выборочные тесты.

Для диагностики заболеваний (аспарагиновая трансаминаза — для диагностики инфаркта миокарда; аланиновая трансаминаза — для диагностики заболеваний печени) и оцен

ки глубины повреждения ткани (ферменты цитоплазмы и митохондрий).

Для дифференциальной диагностики (кислая фосфатаза — рак предстательной железы, щелочные фосфатазы — поражения костной ткани, печени).

Для лечения заболеваний:

а) заместительная терапия (при заболеваниях ЖКТ используют пепсин, панкреатин, фестал, панзинорм, мезим-форте — это гидролитические ферменты; при панкреатите могут использоваться ингибиторы ферментов);

б) для лечения заболеваний и устранения патологических процессов используют ферменты с целью:

- разрушения омертвевшей ткани (при лечении ожогов, язв, абсцессов — трипсин, химотрипсин, нуклеаза);

- разжижения вязких секретов при лечении бронхитов (трипсин, химотрипсин, бронхолитин);

- для сглаживания послеоперационных рубцов (протеазы, лидаза, нуклеазы);

- для разрушения тромбов (стрептокиназа, фибринолизин).

Использование ферментов в стоматологии: для лечения кариеса, пульпита, периодонтита, гингивита, афтозного стоматита, язв полости рта.

Ферменты могут использоваться как самостоятельно (таблетки, порошки, аэрозоли, растворы), так и на носителе, т. е. в иммобилизованной форме (гели, мази, пасты). Иммобилизованные ферменты обладают пролонгированным эффектом.

Практическая работа №11^{м. адонат} Введение в метаболизм

Цель работы: изучить основы клеточного метаболизма в организме человека

Теоретическая часть:

Метаболизм — совокупность химических реакций, протекающих в клетках организма с момента поступления пищевых веществ в организм до образования конечных продуктов обмена.

Функции метаболизма:

- снабжение клеток химической энергией;
- превращение молекул пищи в строительные блоки;
- сборка из этих блоков компонентов клетки (белки, липиды, нуклеиновые кислоты);
- синтез и разрушение специфических биологических молекул.

Метаболический путь — последовательность химических превращений вещества. Метаболические пути многоэтапны, взаимосвязаны, регулируются, скоординированы в пространстве. Они бывают линейными (распад и синтез гликогена, гликолиз и др.) и циклическими (цикл трикарбоновых кислот, орнитинный цикл)

КРЕБСА, ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ (ЦТК)

Цикл лимонной кислоты локализован в матриксе митохондрий. Это циклический процесс из восьми последовательных реакций, в результате которых происходит декарбоксилирование и дегидрирование ацетил-КоА (универсального клеточного топлива) (рис. 6.6).

Цикл начинается с конденсации ацетил-КоА с 4-х углеродной кетокислотой — щавелевоуксусной (ЩУК). В результате образуется трикарбоновая кислота, цитрат. Изомеризация цитрата ведет к образованию изоцитрата. В ходе последовательных реакций изоцитрат декарбоксилируется и одновременно дегидрируется (фермент изоцитратДГ). Образовавшийся α -кетоглутарат также декарбоксилируется и дегидрируется. Образовавшийся макроэрг сукцинил-КоА служит источником энергии для синтеза АТФ (субстратное фосфорилирование в цикле Кребса). В результате еще двух дегидрирований (фер-

менты сукцинатДГ и ма-латДГ) ЩУК регенерирует и запускает новый оборот цикла Кребса.

Таким образом, наряду с конечным продуктом обмена — CO_2 в четырех дегидрогеназных реакциях трижды восстанавливается НАД⁺ (изоцитратДГ, а-кетоглутаратДГ, ма-латДГ) и один раз восстанавливается ФАД (сукцинатДГ). Чтобы цикл мог функционировать, необходимо окислить эти коферменты, т. е. передать атомы водорода в дыхательную цепь, где происходит их окисление кислородом до воды.

Функции цикла Кребса

1. Интегративная функция. Цикл Кребса является связующим звеном между реакциями катаболизма и анаболизма.
2. Катаболическая функция. В ходе ЦТК окисляются до конечных продуктов обмена ацетильные остатки, образовавшиеся из топливных молекул (глюкоза, жирные кислоты, глицерол, аминокислоты).
3. Анаболическая функция. Субстраты ЦТК являются основой для синтеза многих молекул (кетокислоты — а-кетоглутарат и ЩУК — могут превращаться в аминокислоты глу и асп; ЩУК может превращаться в глюкозу, сукцинил-КоА используется на синтез гема).

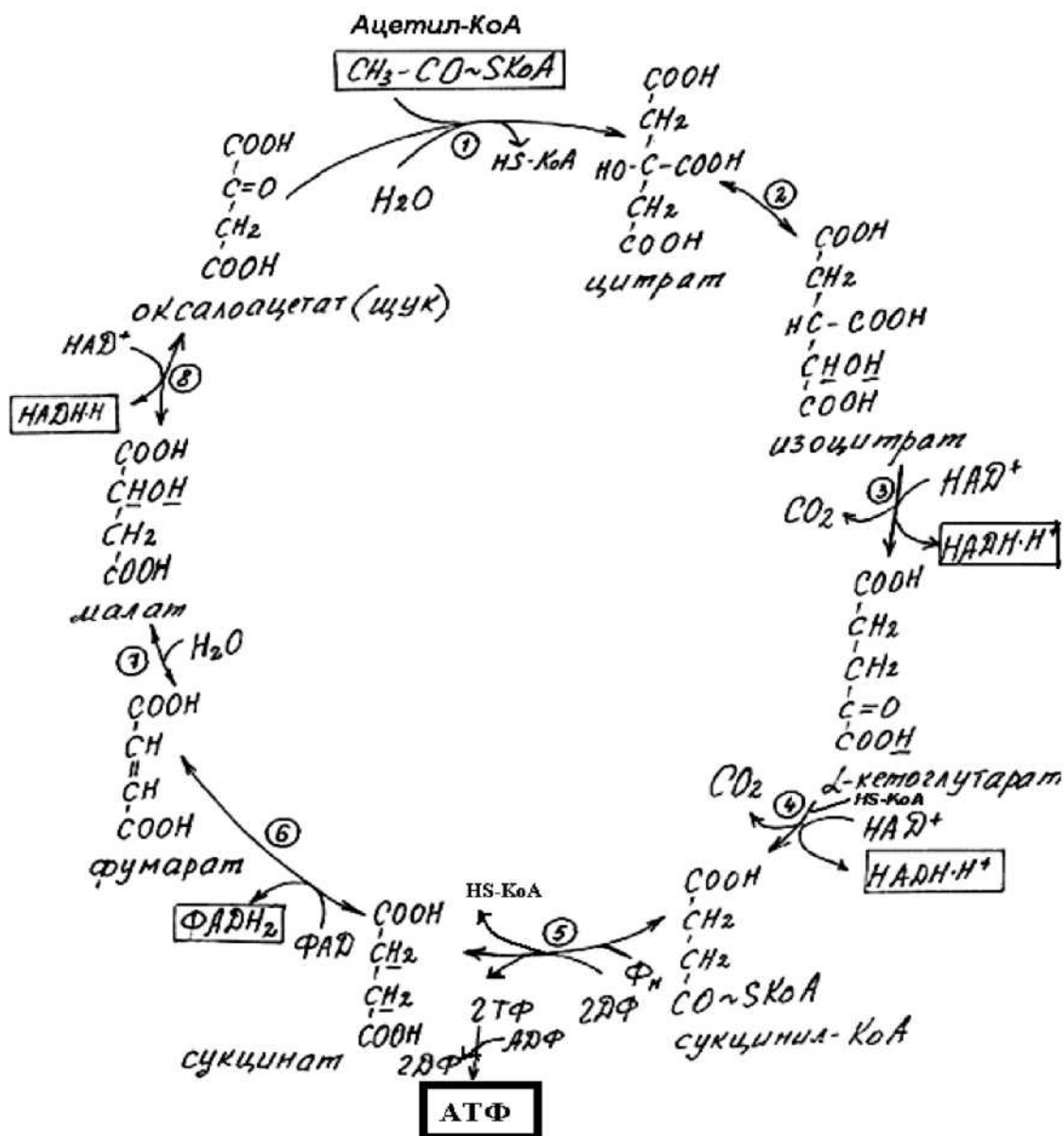


Рис. 4. Лимоннокислый цикл Кребса:

Ферменты: 1 — цитратсинтаза; 2 — аконитаза; 3 — изоцитратдегидрогеназа; 4 — а-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс; 5 — сукцинил-КоА синтетаза; 6 — сукцинатдегидрогеназа; 7 — фумаратгидратаза; 8 — малатдегидрогеназа

4. Водороднодонорная функция. Цикл Кребса поставляет субстраты для дыхательной цепи (НАД-зависимые субстраты: изоцитрат, а-кетоглутарат, малат; ФАД-зависимый субстрат - сукцинат).

5. Энергетическая функция. На уровне сукцинил-КоА происходит субстратное фосфорилирование с образованием одной молекулы макроэрга.

Помимо этого, 4 дегидрогеназ-^{м ало нат}ные реакции в цикле Кребса создают мощный поток электронов, богатых энергией. Эти электроны поступают в дыхательную цепь внутренней мембраны митохондрий. Конечным акцептором электронов является кислород. При последовательном переносе электронов на кислород выделяется энергия, достаточная для образования 9-ти молекул АТФ путем окислительного фосфорилирования. Более понятной эта цифра станет после того, как мы познакомимся с работой дыхательной цепи и с ферментом, синтезирующим АТФ.

Примечание: несмотря на постоянную ^{мало нат}убыль субстратов в результате анаболической функции, цикл Кребса не прерывается благодаря анаплеротическим реакциям, которые пополняют фонд его субстратов. Важнейшей анаплеротической реакцией является образование ЩУК (молекулы, запускающей цикл) путем карбоксилирования ПВК.

Регуляция ЦТК

Первый фермент цитратсинтаза ингибируется АТФ, жирными кислотами, а активируется субстратом (цитратом). Лимитирующим ферментом (катализирует самую медленную реакцию) является изоцитратДГ. Он активируется АДФ, НАД⁺, ингибируется АТФ, НАДН-Н⁺. Когда в клетке достаточно АТФ (покой), скорость цикла снижается, при распаде же АТФ образуется АДФ, который активирует самую медленную реакцию и, следовательно, скорость всего цикла в целом.

Познакомившись с центральными путями метаболизма, основное назначение которых

отделение от субстратов атомов водорода, проследим за судьбой этих атомов, за тем, как происходит их окисление кислородом до воды.

Практическая работа №12^{мадо.нат} Комплексы дыхательной цепи

Цель работы: Изучить механизм клеточного дыхания с биохимической точки зрения

Теоретическая часть:

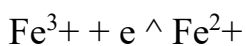
I. НАДН-убихинон-оксидоредуктаза. Принимает электроны и протоны от НАДН-Н⁺; протоны выбрасываются в межмембранное пространство, электроны передаются на ^Q.

II. Сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза. Принимает электроны и протоны от субстратов в матриксе и передает их на убихинон.

Убихинон — липофильная молекула, хинон, легко перемещается по мембране, принимает электроны и протоны от I и II комплексов дыхательной цепи и передает их на III комплекс.

Цитохромы, входящие в состав дыхательной цепи, представляют собой железосодержащие белки, простетическая группа которых представлена гемом.

Цитохромы могут переносить только электроны за счет атома железа с переменной валентностью, входящего в состав гема:



III. Убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза. Переносит электроны с убихинола на цитохром с. Одновременно за счет энергии, выделившейся при переносе, из матрикса переносятся протоны в межмембранное пространство.

IV. Цитохром с-оксидаза. Переносит электроны с цитохрома с непосредственно на кислород. Цитохромы а и а₃, помимо атомов железа, содержат атомы меди, поэтому этот комплекс одновременно осуществляет полное (4-электронное) восстановление молекулы кислорода. Энергия переноса электронов используется на перекачивание в межмембранное пространство протонов.

Как указывалось выше, для синтеза АТФ необходимо затратить около 32 кДж/моль энергии.

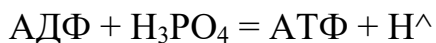
Для этого достаточной является разность потенциалов между окислителем и восстановителем не менее 0,20 вольта. Чанс, Скулачев установили, что таких

участков в дыхательной цепи три. Они соответствуют I, III и IV комплексам и названы пунктами сопряжения или фосфорилирования.

Чтобы понять связь между транспортом электронов по дыхательной цепи и синтезом АТФ, познакомимся с V комплексом внутренней мембраны митохондрий — ферментом, осуществляющим реакцию синтеза АТФ и называемым протонной АТФ-синтазой. Этот ферментативный комплекс состоит из двух частей: F_t,

(o — олигомицин), который встроен в мембрану, пронизывает ее насквозь и представляет собой протонный канал, и F₁. Последний по форме напоминает шляпку гриба или дверную ручку и обращен в матрикс митохондрии. В изолированном виде F₁ не может синтезировать АТФ, но может проводить ее гидролиз до АДФ и фосфата.

Реакция синтеза АТФ, которую проводит V комплекс, носит название окислительного фосфорилирования и описывается уравнением:



Биохимики долго искали связь — промежуточные макроэнергические соединения, которые могли бы служить посредником между процессом тканевого дыхания и окислительным фосфорилированием. Английский биохимик П. Митчелл предположил, что синтез АТФ V комплексом ВММ сопряжен с особым состоянием этой мембраны, и сформулировал хемиосмотическую теорию окислительного фосфорилирования (Нобелевская премия 1978 г.).

Основные постулаты этой теории:

- внутренняя митохондриальная мембрана (ВММ) непроницаема для ионов, в частности для H^+ и OH^- ;
- за счет энергии транспорта электронов через I, III и IV комплексы дыхательной цепи из матрикса выкачиваются протоны;
- возникающий на мембране электрохимический потенциал (ЭХП) и есть промежуточная форма запасания энергии;
- возвращение (транслокация) протонов в матрикс митохондрии через протонный канал V комплекса за счет ЭХП является движущей силой синтеза АТФ.

Дальнейшие исследования (Дж. Уокер, П. Бойер, Нобелевская премия 1997 г.) подтвердили предположения Митчелла. Ими показано, что энергия движения протонов используется на изменения конформации активного центра АТФ-синтазы, что сопровождается синтезом АТФ, а затем ее высвобождением. Образовавшаяся АТФ с помощью транслоказы перемещается в цитозоль; в ответ в матрикс митохондрии поступают АДФ и фосфат. Всего на процесс синтеза, высвобождения и выброса в цитозоль АТФ расходуется 4 протона.

При окислении НАД-зависимых субстратов в ММП выбрасывается 10 протонов (см. схему комплексов дыхательной цепи). Следовательно, в таком случае может быть синтезировано 2,5 моль АТФ (10:4), т. е. коэффициент фосфорилирования $P/O = 2,5$. При окислении ФАД-зависимых субстратов в ММП выбрасывается 6 протонов в III и IV пунктах сопряжения. В таком случае может быть синтезировано 1,5 моль АТФ (6:4), т. е. коэффициент фосфорилирования $P/O = 1,5$.

Теперь можно вернуться к пониманию энергетической функции цикла Кребса (см. предыдущую лекцию). В ЦТК происходят 4 реакции дегидрирования, причем три ДГ являются НАД⁺-зависимыми и одна — ФАД-зависимой. За счет окисления водорода 3-х молекул НАДН-Н⁺ в дыхательной цепи синтезируется 7,5 моль АТФ, окисление водорода 1 моль ФАДН₂ ведет к синтезу 1,5 моль АТФ. Помимо этого, в ЦТК имеет место одна реакция субстратного

фосфорилирования. Таким образом, энергетический выход окисления ацетил-КоА в цикле Кребса равен 10 моль АТФ (7,5 + 1,5 + 1). Этой цифрой мы будем пользоваться в дальнейших расчетах.

Регулируется скорость работы дыхательной цепи энергетическим зарядом клетки, т. е. соотношением АТФ/АДФ. АДФ является стимулятором дыхательной цепи, АТФ — аллостерическим ингибитором.

Гипоэнергетические состояния возникают в организме вследствие дефицита АТФ в клетках. Причины их следующие:

- алиментарные (голодание, гиповитаминозы РР, В₂);
- гипоксические (нарушения доставки O₂ в клетки);
- митохондриальные (действие ингибиторов и разобщителей).

Среди последних различают, во-первых, ингибиторы дыхательной цепи (рис. 7.3). Это яды, которые блокируют перенос электронов через I, II, III, IV комплексы. Ротенон и барбитураты блокируют I комплекс, малонат — II, антимицин А — III, цианиды, угарный газ блокируют перенос электронов на кислород, осуществляемый IV комплексом дыхательной цепи.

Во-вторых, ингибиторы окислительного фосфорилирования (олигомицин), закрывающие протонный канал V комплекса.

В-третьих, разобщители окислительного фосфорилирования. Это вещества, которые подавляют окислительное фосфорилирование, не влияя при этом на процесс переноса электронов дыхательной цепью. Механизм действия разобщителей сводится к тому, что, являясь липофильными веществами, они обладают способностью связывать протоны и переносить их в матрикс, минуя протонный канал H⁺ АТФ-синтазы. Выделяющаяся при переносе электронов энергия рассеивается в виде тепла. Различают разобщители:

- естественные (продукты перекисного окисления липидов, жирные кислоты с длинной цепью, белки термогенины бурой жировой ткани, большие дозы йодсодержащих гормонов щитовидной железы);
- искусственные (динитрофенол, производные витамина К, некоторые антибиотики).

ПУТИ УТИЛИЗАЦИИ КИСЛОРОДА КЛЕТКОЙ

Большая часть кислорода, потребляемого клеткой (около 80 %), используется, как указано, в митохондриях с участием цитохромоксидазы. Это так называемый оксидазный путь. При этом происходит полное восстановление кислорода, причем субстрат не реагирует с кислородом непосредственно. Данный путь дает клетке энергию в виде АТФ. Помимо цитохромоксидазы существуют другие оксидазы (ФМН и ФАД-зависимые), которые катализируют реакции окисления веществ с образованием перекиси водорода.

Наряду с этим существует другой путь окисления — оксигеназный. Он не дает клетке энергии, кислород включается в субстрат с образованием новой гидроксильной или карбоксильной группы. Этот путь происходит в основном в мембранах эндоплазматического ретикулума (микросомах). Путем микросомного окисления осуществляется α- и ω-окисление жирных кислот, синтез ненасыщенных жирных кислот, стероидов. Таким путем обезвреживаются ксенобиотики, т. е. чужеродные для организма вещества (лекарства, ядохимикаты, косметические препараты). Ферменты, осуществляющие такое окисление, называются оксигеназами. Различают диоксигеназы, которые включают в молекулу субстрата два атома молекулы кислорода. Более распространены в клетках монооксигеназы (гидроксилазы). Они катализируют реакции, при которых в молекулу субстрата включается один атом из молекулы кислорода, второй же атом кислорода восстанавливается при этом до воды. Монооксигеназные системы представляют собой короткие цепи переноса электронов и протонов, источником которых служит чаще всего восстановленный НАДФ⁺, реже НАД⁺ или аскорбиновая кислота. Активатором кислорода при этом является цитохром P₄₅₀ — одноцепочечный хро-

мопротеин с молекулярной массой 50 кДа.

Смысл такого процесса заключается в том, что ксенобиотики, которые обычно гидро- фобны, гидроксилируясь, становятся более гидрофильными, что способствует их обезвреживанию и выведению из организма с желчью или мочой. С участием микросомных систем осуществляется также биосинтез стероидов, желчных кислот, витамина ДЗ.

С появлением в атмосфере кислорода, а он появился тогда, когда возникли фотосинтезирующие организмы, стало возможным более эффективно использовать энергию, т. е. возник механизм окислительного фосфорилирования. Но, с другой стороны, вместе с этим кислород принес и новую опасность. При неполном восстановлении молекулы кислорода образуются высокоактивные формы (свободные радикалы), которые могут повреждать белки, нуклеиновые кислоты, липиды и способны даже убить живую клетку. Активные формы кислорода или свободные радикалы образуются в качестве промежуточных продуктов в ходе микросомного окисления, при работе дыхательной цепи, при воздействии ионизирующего излучения, при самопроизвольном окислении ряда веществ (гемоглобин). Свободные радикалы — молекулы, содержащие неспаренные электроны, агрессивные молекулы, которые атакуют другие молекулы с целью отнять у них электрон. К ним относятся: супероксидный анион-радикал (O_2^-), гидропероксидный радикал (HO_2), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксидный радикал (HO).

Свободные радикалы стимулируют разрывы в молекулах нуклеиновых кислот, нарушают функции белков, ведут к деполимеризации протеогликанов соединительной ткани, повреждают ненасыщенные жирные кислоты клеточных мембран, запуская, тем самым, механизм перекисного окисления липидов (ПОЛ). Вместе с тем свободные радикалы кислорода играют и положительную роль, так как участвуют в осуществлении фагоцитами и Т-лимфоцитами их защитной функции.

Повышенное образование в организме свободных радикалов кислорода ведет к «окислительному стрессу», который может привести к повреждению мем-

бран и гибели клетки. Поэтому в организме существует антиоксидантная защита от свободных радикалов.

Различают неферментативную и ферментативную защиту клеток. Важнейшим компонентом неферментативной защиты является витамин Е (токоферол), витамин размножения.

Являясь жирорастворимым витамином, он всасывается вместе с липидами, поступает в лимфатическую систему и кровяное русло, а оттуда — в ткани. Токоферол защищает ненасыщенные жирные кислоты клеточных мембран от перекисного окисления, предохраняет от окисления SH-группы мембранных белков, защищает от окисления двойные связи в молекулах каротинов и витамина А. Токоферол (совместно с витамином С) способствует включению селена в состав активного центра глутатионпероксидазы — важнейшего фермента анти- оксидантной защиты клеток. Он контролирует синтез гема, цитохромов, стабилизирует биологические мембраны.

Ферментативная защита клеток от свободных радикалов (антиоксидантная защита) осуществляется с помощью следующих ферментов:

- супероксиддисмутазы (превращает супероксидные радикалы в менее токсичную перекись водорода);

- каталазы (разлагает перекись водорода на воду и кислород);

глутатионпероксидазы — главная система защиты эритроцитов от разрушительного действия перекиси водорода. В качестве кофермента глутатионпероксидаза использует трипептид - глутатион. Для ее работы также необходим микроэлемент селен (Se).

Практическая работа №13 Переваривание

Цель работы: изучить биохимические основы переваривания питательных веществ в клетке

Теоретическая часть:

Углеводы — альдегиды и кетоны многоатомных спиртов, а также производные и полимеры этих соединений.

Углеводы пищи. Большая часть углеводов поступает в организм с пищей растительного происхождения. Обычный суточный рацион содержит 400-500 г углеводов, из которых 60-80 % составляют полисахариды (в основном крахмал, в меньшем количестве — гликоген и пищевые волокна), 20-30 % олигосахариды (сахароза, лактоза, мальтоза), остальное количество — моносахариды (в основном глюкоза, фруктоза и пентозы). Углеводы должны обеспечивать не менее 55 % суточного энергопотребления. В кишечнике всасываются моносахариды, поэтому в процессе переваривания углеводов пищи должно происходить их расщепление до моносахаридов.

ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

Ротовая полость. α -Амилаза слюны гидролизует внутренние α -1,4-гликозидные связи. Продуктами пищеварения являются олигосахаридные фрагменты (декстрины), в небольшом количестве — мальтоза и глюкоза.

Тонкий кишечник. Секретин стимулирует выделение панкреатического сока.

Холецистокинин (панкреозимин) стимулирует секрецию панкреатической α -амилазы и других панкреатических ферментов пищеварения.

Панкреатическая α -амилаза гидролизует внутренние α -1,4-гликозидные связи олигосахаридов и полисахаридов до мальтозы, изомальтозы и α -декстринов.

В ходе пристеночного пищеварения дисахаридазы гидролизуют дисахариды (мальтозу, изомальтозу, сахарозу, лактозу, трехалозу) до моносахаридов.

Мальтаза гидролизует мальтозу на две молекулы D-глюкозы.

Лактаза гидролизует лактозу на D-галактозу и D-глюкозу.

Изомальтаза/Сахараза — фермент двойного действия. Имеет два активных центра, расположенных в разных доменах. Фермент гидролизует сахарозу до D-фруктозы и D-глюкозы, с помощью другого активного центра фермент катализирует гидролиз изомальтозы до двух молекул D-глюкозы.

Трехалаза гидролизует трехалозу на две молекулы D-глюкозы.

α -Декстриназа (терминальная декстриназа) также образуется в клетках слизистой кишечника. Фермент гидролизует α -1,6-гликозидные связи в α -декстринах.

ВСАСЫВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

Всасывание глюкозы (галактозы) происходит в два этапа (рис. 8.2). I этап — транспорт глюкозы из полости тонкого кишечника в энтероциты. Осуществляется по двум механизмам:

- натрий-независимый транспорт с участием ГЛЮТ 5 (транспортёр глюкозы 5);

- натрий-зависимый транспорт с участием Na -глюкозного транспортёра.

II этап — транспорт глюкозы из энтероцитов в капилляры портальной венозной системы (натрий-независимый транспорт с участием ГЛЮТ 2).

Пищевые волокна. Некрахмальные полисахариды состоят из гетерогенной группы углеводных соединений (клетчатка, пектины, гемицеллюлоза, камеди). Основной полисахарид пищевых волокон — клетчатка (целлюлоза). Некрахмальные полисахариды не усваиваются организмом человека, так как в пищеварительном тракте отсутствуют ферменты их гидролиза.

Роль пищевых волокон в питании человека:

1. Поддерживают эубактериоз кишечника.
2. Стимулируют перистальтику кишечника.
3. Связывают воду и удерживают её в кишечнике.
4. Создают давление на стенки кишечника и желудка.
5. Являются энтеросорбентами.
6. Образуют гели, что оказывает защитное действие на слизистую кишечника.

7. Создают более длительное чувство насыщения.

ТРАНСПОРТ ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТКИ

Существует группа белков-переносчиков глюкозы (ГЛЮТ), сходных по структуре, но различающихся по участию в транспорте глюкозы (изоформы собственных транспортеров глюкозы). Они локализованы в плазматических мембранах всех клеток и участвуют в транспорте глюкозы (ускоряют транспорт) по градиенту её концентрации.

Инсулин стимулирует поступление глюкозы в адипоциты, миоциты и кардиомиоциты, увеличивая количество ГЛЮТ 4 в плазматических мембранах этих клеток.

ПРЕВРАЩЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТКАХ

При поступлении глюкозы в клетки осуществляется фосфорилирование глюкозы. Фосфорилированная глюкоза не может пройти через цитоплазматическую мембрану и остается в клетке. Реакция требует энергии АТФ и практически
необратима

МЕТАБОЛИЗМ ГЛИКОГЕНА

Пути синтеза и распада гликогена различаются, что позволяет этим метаболическим процессам протекать независимо друг от друга и исключает переключение промежуточных продуктов с одного процесса на другой.

Процессы синтеза и распада гликогена наиболее активно идут в клетках печени и скелетных мышц.

СИНТЕЗ ГЛИКОГЕНА (ГЛИКОГЕНЕЗ)

Общее содержание гликогена в организме взрослого человека около 450 г (в печени — до 150 г, в мышцах — около 300 г). Более интенсивно гликогенез осуществляется в печени.

Гликогенсинтаза — ключевой фермент процесса — катализирует присоединение глюкозы к молекуле гликогена с образованием α -1,4-гликозидных связей.

Включение одной молекулы глюкозы в синтезирующуюся молекулу гликогена требует затраты энергии двух молекул АТФ.

Регуляция синтеза гликогена осуществляется через регуляцию активности гликоген-синтазы. Гликогенсинтаза в клетках присутствует в двух формах: гликогенсинтаза в (D) — фосфорилированная неактивная форма, гликогенсинтаза а (I) — нефосфорилированная активная форма. Глюкагон в гепатоцитах и кардиомиоцитах по аденилатциклазному механизму инактивирует гликогенсинтазу. Аналогично действует адреналин в скелетных мышцах. Гликогенсинтаза D может аллостерически активироваться высокими концентрациями глюкозо-6-фосфата. Инсулин активирует гликогенсинтазу.

Итак, инсулин и глюкоза стимулируют гликогенез, адреналин и глюкагон — тормозят.

Синтез гликогена бактериями полости рта. Некоторые бактерии полости рта способны синтезировать гликоген при избытке углеводов. Механизм синтеза и распада гликогена бактериями подобен таковому у животных за исключением того, что для синтеза используются не УДФ-производные глюкозы, а АДФ-производные. Гликоген используется этими бактериями в отсутствие

углеводов в ротовой полости.

РАСПАД ГЛИКОГЕНА (ГЛИКОГЕНОЛИЗ)

Распад гликогена в мышцах происходит при мышечных сокращениях, а в печени — при голодании и в перерывах между приёмами пищи. Основным механизмом гликогенолиза — фосфоролиз (расщепление α -1,4-гликозидных связей с участием фосфорной кислоты и гликогенфосфорилазы).

Различия гликогенолиза в печени и мышцах. В гепатоцитах есть фермент глюкозо-

6-фосфатаза и образуется свободная глюкоза, которая поступает в кровь. В миоцитах нет глюкозо-6-фосфатазы. Образовавшийся глюкозо-6-фосфат не может выйти из клетки в кровь (фосфорилированная глюкоза не проходит цитоплазматическую мембрану) и используется на нужды миоцитов.

Регуляция гликогенолиза. Глюкагон и адреналин стимулируют гликогенолиз, инсулин — тормозит. Регуляция гликогенолиза осуществляется на уровне гликогенфосфорилазы. Глюкагон и адреналин активируют (переводят в фосфорилированную форму) гликогенфосфорилазу. Глюкагон (в гепатоцитах и кардиомиоцитах) и адреналин (в миоцитах) активируют гликогенфосфорилазу по каскадному механизму через посредника — цАМФ. Связываясь со своими рецепторами на цитоплазматической мембране клеток, гормоны активируют мембранный фермент аденилатциклазу. Аденилатциклаза наращивает цАМФ, который активирует протеинкиназу А, и запускается каскад превращений ферментов, заканчивающийся активацией гликогенфосфорилазы. Инсулин инактивирует, то есть переводит в нефосфорилированную форму, гликогенфосфорилазу. Мышечная гликогенфосфорилаза активируется АМФ по аллостерическому механизму.

Таким образом, гликогенез и гликогенолиз координированно регулируются глюкагоном, адреналином и инсулином.

Практическая работа №14 Аэробное окисление глюкозы

Цель работы: изучить механизм аэробного окисления глюкозы

Теоретическая часть:

Гликолиз — это сложный ферментативный процесс расщепления глюкозы до двух молекул пирувата (аэробный гликолиз) или двух молекул лактата (анаэробный гликолиз, протекающий без потребления кислорода).

Гликолиз функционирует во всех живых клетках. Все ферменты локализованы в цитозоле.

Гликолиз осуществляется в два этапа:

1. Подготовительный этап — дихотомический распад глюкозы на две молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Превращения сопровождаются затратой 2 АТФ
2. Этап гликолитической оксидоредукции — превращение глицеральдегид-3-фосфата в лактат. Включает окислительно-восстановительные реакции и реакции фосфорилирования, сопровождающиеся синтезом АТФ.

На втором этапе окисляются две молекулы глицеральдегид-3-фосфата, поэтому в реакциях впереди формулы субстрата следует ставить коэффициент 2.

В анаэробных условиях окисление НАДН⁺, восстановленного в глицеральдегидфосфатдегидрогеназной реакции, происходит в лактатдегидрогеназной реакции. В аэробных условиях НАДН⁺ окисляется кислородом с участием ферментов дыхательной цепи, а выделяющаяся при этом энергия используется на синтез 1,5 или 2,5 моль АТФ (в зависимости от челночного механизма транспорта гликолитического НАДН⁺ в митохондрию).

Энергетический баланс гликолиза — две молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы. На 1 этапе гликолиза расходуются две молекулы АТФ для активирования субстрата (в гексокиназной и фосфофруктокиназной реакциях). На 2 этапе образуются четыре молекулы АТФ (в фосфоглицераткиназной и пируваткиназной реакциях). Синтез АТФ осуществляется путем субстратного фосфорилирования.

Ключевые ферменты гликолиза:

1. Гексокиназа — это регуляторный фермент гликолиза во внепеченочных клетках. Гексокиназа аллостерически ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Глюкокиназа — регуляторный фермент гликолиза в гепатоцитах. Синтез глюкокиназы индуцируется инсулином.

2. Фосфофруктокиназа-1. Это главный ключевой фермент, катализирует реакцию, лимитирующую скорость всего процесса (наиболее медленная реакция). Синтез фермента индуцируется инсулином. Аллостерические активаторы — фруктозо-2,6-дифосфат, АМФ, АДФ. Уровень фруктозо-2,6-дифосфата увеличивается под действием инсулина и понижается под действием глюкагона. Аллостерические ингибиторы — АТФ, цитрат.

3. Пируваткиназа. Фермент активен в нефосфорилированной форме. Глюкагон (в гепатоцитах) и адреналин (в миоцитах) стимулируют фосфорилирование фермента, а значит инактивируют фермент. Инсулин, наоборот, стимулирует дефосфорилирование фермента, а значит активирует фермент. Аллостерический активатор — фруктозо-1,6-дифосфат. Аллостерический ингибитор — АТФ, ацетил-КоА. Синтез фермента индуцирует инсулин.

Биологическая роль гликолиза:

1. Генерирование АТФ. Гликолиз — единственный процесс в клетках, продуцирующий АТФ без потребления кислорода. Клетки, имеющие мало или не имеющие вообще митохондрий, получают АТФ только в ходе гликолиза.

Значение гликолиза для эритроцитов. Гликолиз — единственный процесс, продуцирующий АТФ в эритроцитах и поддерживающий их целостность и функции.

Наследственный дефект пируваткиназы сопровождается гемолитической анемией. При этой патологии эритроциты имеют от 5 до 25 % нормальной пируваткиназной активности и, следовательно, скорость гликолиза низкая.

Промежуточный продукт гликолиза в эритроцитах — 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ) — понижает сродство гемоглобина к кислороду, способствуя дис-

социации кислорода из окси- гемоглобина и переходу его в ткани. Нарушения гликолиза в эритроцитах могут оказывать влияние на транспорт кислорода. Так, при недостаточности гексокиназы наблюдается понижение уровня 2,3-ДФГ и ненормально высокое сродство гемоглобина к кислороду. И наоборот, при недостаточности пируваткиназы содержание 2,3-ДФГ вдвое превышает норму, что обуславливает низкое сродство гемоглобина к кислороду.

Является источником углеводородных радикалов для процессов биосинтеза в клетках

Практическая работа №15 Транспорт липидов в крови, депонирование и мобилизация липидов из жировых депо

Цель работы: изучить процесс метаболизма липидов в клетках

Теоретическая часть:

Состав липопротеинов. Липопротеины состоят из ядра, в котором находятся триа-цилглицеролы (ТАГ), эфиры холестерина (ЭХ), и поверхностного монослоя из фосфолипидов (ФЛ), свободного или неэстерифицированного холестерина (СХ) и апопротеинов. Функцией липопротеинов является транспорт липидов. Без этой транспортной формы липиды были бы нерастворимы в плазме крови.

Синтез хиломикрон (ХМ). В энтероцитах идет эстерификация 2-МАГ и ХС жирными кислотами (ЖК), образуются ТАГ и ЭХ, из которых затем формируются ХМ. Всосавшиеся ЖК активируются, преобразуясь в ацил-КоА. Это происходит в гладком эндоплазматическом ретикулуме. Важнейшим структурным компонентом ХМ является белок (апо В-48). В составе одной частицы ХМ находится одна молекула апо В-48.

ХМ секретируются с базолатеральной поверхности клеток кишечника в лимфу, а оттуда через грудной лимфатический проток попадают в систему кровообращения. После того как ХМ попадают в лимфу, они получают от ЛПВП апо С-II, С-III и апо Е.

Катаболизм ХМ. Попадая в систему кровообращения, ХМ быстро подвергаются катаболизму. Уровень ТАГ в плазме крови возрастает через 2 ч после приема пищи, а через 4 ч начинает постепенно снижаться. Время разрушения ХМ зависит от гидролиза ТАГ под действием липопротеинлипазы (ЛПЛ). Кофактором этого фермента является апо С-II. Гидролиз ТАГ приводит к уменьшению размеров ХМ, образуется избыточное количество поверхностных элементов по отношению к объему частиц.

Остатки ХМ разрушаются в печени. Таким образом, в процессе своего катаболизма в кровотоке ХМ поставляют ЖК клеткам периферических тканей (жировой и мышечной), в то время как ХС пищи попадает в печень.

Обмен липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеинов промежуточной плотности (ЛППП) и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Основной функцией этих липопротеинов является транспорт жирных кислот в составе ТАГ из печени к периферическим тканям, особенно в жировую и мышечную. Для синтеза ЛПОНП в гепатоцитах требуется белок апо В-100 и липиды ЭХ, ТАГ и ФЛ.

Триацилглицеролы для ЛПОНП синтезируются путем эстерификации глицерола жирными кислотами. Жирные кислоты поступают в гепатоциты из плазмы крови (источником их является, например, липолиз в жировой ткани) или синтезируются *de novo* в печени. Образование ЛПОНП регулируется за счет контроля синтеза апо В-100.

Новосинтезированная частица ЛПОНП содержит одну молекулу белка — апо В-100. Другие белковые компоненты (апо С-II, апо С-III и апо Е) поступают на неё от ЛПВП после того, как ЛПОНП попадают в плазму крови. Они требуются для ускорения метаболизма ЛПОНП.

Обмен ЛПОНП. На эндотелии сосудистой стенки ТАГ в составе ЛПОНП подвергаются действию фермента ЛПЛ. Необходимым кофактором для проявления активности ЛПЛ является апо С-II. ЛПЛ образуется в клетках многих тканей, среди которых наибольшее значение имеют жировая ткань, скелетная и сердечная мышцы, молочная железа во время лактации. ЛПЛ катализирует гидролиз ТАГ в составе ХМ и ЛПОНП до жирных кислот, моноацилглицеролов (МАГ), в результате ЛПОНП превращаются в кровотоке в ЛППП. Фермент проявляет слабую активность по отношению к МАГ и ФЛ.

В жировой ткани синтез ЛПЛ стимулирует инсулин. Тем самым обеспечивается поступление жирных кислот в адипоциты для синтеза и хранения в виде ТАГ. В мышцах ЛПЛ позволяет использовать жирные кислоты для окисления в периоды между приемами пищи, а инсулин подавляет образование этого фермента.

Липопротеины промежуточной плотности (ЛППП). Образование ЛППП происходит из ЛПОНП. Около 75 % ЛППП попадает в печень после связывания

апо Е с соответствующими рецепторами. В печени они полностью разрушаются. Около 25 % ЛППП в кровотоке подвергается действию другого липолитического фермента, печеночной липазы (ПЛ). Этот фермент катализирует дальнейшее расщепление ТАГ в составе ЛППП. В результате ЛППП превращаются в ЛПНП.

Синтез триацилглицеролов. Клетки большинства тканей, особенно печени и жировой ткани, обладают способностью накапливать ТАГ. Жировая ткань функционально специализируется на хранении (запасании) и мобилизации ТАГ (рис. 12.1).

Предшественниками для синтеза ТАГ являются глицерол-3-фосфат и активированные жирные кислоты. В печени глицерол-3-фосфат может образовываться или в результате фосфорилирования глицерола, или из глюкозы как промежуточный продукт гликолиза. В жировой ткани единственным источником образования глицерол-3-фосфата является гликолиз.

Вслед за перевариванием пищи в плазме крови увеличивается концентрация глюкозы, инсулина, липопротеинов, богатых ТАГ. Стимулируется активность ЛПЛ для гидролиза ТАГ в составе липопротеинов, и снижается активность жиромобилизующей липазы в жировой ткани. Наряду с этим стимулируется образование ТАГ в жировой ткани. Натощак или при повышенной потребности в энергии во время физической работы, повышении уровня катехоламинов, гормона роста, АКТГ и глюкагона в плазме крови, снижении секреции инсулина эти процессы меняются на противоположные — увеличивается липолиз в жировой ткани и высвобождаются жирные кислоты. Они используются в качестве источника энергии. Глицерол используется для глюконеогенеза. Доля этого процесса в удалении всех ЛПНП составляет 75 %. Остальная часть удаляется с помощью «мусорных» рецепторов макрофагов, имеющих низкую способность связывания. Этот путь получил образное название «мусорный путь».

После связывания ЛПНП комплекс рецептор — ЛПНП переносится в клетку посредством эндоцитоза; затем он сливается с лизосомами и разрушается.

Внутриклеточное высвобождение холестерина, происходящее таким путем, вызывает следующие эффекты: а) снижает синтез ключевого фермента образования собственного, клеточного, холестерина — гидроксиметилглутарил-КоА (ГМГ-КоА) редуктазы; б) снижает синтез рецепторов для ЛПНП; в) активирует фермент ацетил-КоА-холестерол ацилтрансферазу (АХАТ), который катализирует образование из метаболически активной формы — СХ — метаболически неактивной формы — ЭХ.

В отличие от регуляторного действия рецепторов к ЛПНП на обмен холестерина в клетках, мусорные рецепторы продолжают транспортировать ХС в клетку без торможения по принципу обратной связи. Тем самым макрофаги превращаются в пенистые клетки. Их образование рассматривается как начальный этап атеросклероза.

Метаболизм липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). ЛПВП синтезируются в клетках печени и кишечника. Сразу после секреции ЛПВП имеют вид плоских дисков, содержащих ФЛ. Белковым компонентом их является апо А. Из тканей и клеточных мембран на них поступает холестерол. Под действием фермента лецитин-холестерол ацилтрансферазы (ЛХАТ) из СХ и жирной кислоты фосфатидилхолина образуются ЭХ. В результате частицы ЛПВП созревают, принимая форму глобулы. Затем ЭХ транспортируются на ЛППП, ЛПНП, обломки ХМ с помощью липидпереносящего белка (ЛПБ) или апо D.

Практическая работа №16 Внутриклеточный метаболизм жирных кислот

Цель работы: изучить процесс переноса и метаболизма жирных кислот в клетках

Теоретическая часть: Жирные кислоты проходят через клеточную мембрану путем диффузии по концентрационному градиенту.

Активация жирных кислот. Первым этапом на пути метаболизма длинноцепочечных жирных кислот в клетке является их активация за счет образования ацил-КоА. Эту реакцию катализирует фермент ацил-КоА синтетаза, который локализован на наружной мембране митохондрий.

Перенос ацил-КоА в митохондрии. Ацил-КоА, имеющий средней длины или короткую углеводородную цепь (<10), может проходить через митохондриальную мембрану путем диффузии. Перенос длинноцепочечного ацил-КоА происходит с помощью карнитинацил-трансфераз (КАТ), локализованных соответственно на наружной и внутренней мембранах митохондрий, и транслоказы (Т). Предшественник для процесса синтеза жирных кислот, малонил-КоА, является аллостерическим ингибитором активности КАТ. Последовательность реакций (3-окисления катализируется 4 ферментами. С их помощью идет дегидрирование, гидратация, образование (3-кетокислоты и тиоли-тическое расщепление с высвобождением двухуглеродных фрагментов (ацетил-КоА).

Энергетический выход Р-окисления на примере пальмитиновой кислоты. Образование АТФ (1,5 АТФ/ФАДН₂; 2,5 АТФ/НАДН⁺; 10 АТФ/ацетил-КоА; таким образом, для пальмитоил-КоА (жирная кислота с 16 С): 7 ФАДН₂, 7 НАДН⁺ и 8 ацетил-КоА = 108 АТФ). Расход АТФ на активацию — 2 АТФ (используется энергия гидролиза двух макроэргических связей), в ходе которой пальмитат превращается в пальмитоил-КоА. Чистый энергетический выход для окисления пальмитата — 106 АТФ.

Окисление ненасыщенных жирных кислот. В ходе Р-окисления ненасыщенных жирных кислот отщепление двухуглеродных фрагментов ведет к образованию ацил-КоА с двойной связью в цис-положении между С₃ и С₄. Затем

с помощью фермента еноил-КоА изомеразы происходит её превращение в транс-двойную связь между С-2 и С-3. Другой фермент, 2,3-диеноил-КоА редуктаза, может катализировать насыщение двойной связи между С-1 и С-5 в составе ацил-КоА с использованием в качестве кофермента НАДНН+. Образовавшийся промежуточный продукт подвергается дальнейшему превращению под влиянием еноил-КоА изомеразы.

ОКИСЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ПЕРОКСИСОМАХ

Окисление жирных кислот в пероксисомах составляет около 30 % всего их окисления. В пероксисомах окисляются необычные жирные кислоты (с длинной углеводородной цепью, дикарбоновые, с разветвленным радикалом). Укорочение радикала в пероксисомах происходит до тех пор, пока не образуется ацил-КоА со средней длиной цепи. Образующийся ацил-КоА с С-8 впоследствии подвергается дальнейшему окислению в митохондриях.

Первоначальная стадия дегидрирования в ходе пероксисомного окисления жирных кислот протекает с образованием H_2O_2 , а не ФАДН₂. Перекись водорода удаляется с помощью каталазы. Все последующие реакции аналогичны происходящим в митохондриях, хотя катализируются они изоферментами пероксисом.

СИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Субстраты синтеза жирных кислот. Предшественником является ацетил-КоА, процесс протекает в цитозоле (рис. 13.3). Ацетил-КоА образуется из пирувата под действием митохондриального пируватдегидрогеназного комплекса. Внутренняя митохондриальная мембрана непроницаема для ацетил-КоА. В митохондриях фермент цитратсинтаза катализирует реакцию образования цитрата из ацетил-КоА и ЩУК. Цитрат выходит из митохондрий в цитоплазму. В цитозоле фермент АТФ-цитратлиаза расщепляет цитрат до ацетил-КоА и ЩУК.

Практическая работа №17 Синтез и обмен холестерина

Цель работы: изучить клеточный синтез соединений на основе циклопентанпергидрофенантрена

Теоретическая часть:

Значение холестерина для организма. Холестерол (ХС) является важным составным компонентом биомембран, он служит предшественником для синтеза стероидных гормонов, желчных кислот и витамина Д.

Распределение холестерина в тканях. Наиболее богаты холестерином мозг, печень, кожа и эндокринные железы.

Смесь свободного и эстерифицированного холестерина. И холестерол пищи, и холестерол в системе кровообращения являются смесью приблизительно 70 % эфиров холестерола (ЭХ) и 30 % свободного холестерола (СХ). Это соотношение остается постоянным в различных условиях (рис. 14.1).

Чаще других в эстерификации холестерола участвуют олеиновая (18:1, А 9) и линолевая (18:2, А 9, 12) кислоты.

СИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРОЛА de novo

1. Ацетил-КоА является источником всех углеродных атомов молекулы ХС.
2. ХС синтезируют все клетки, имеющие ядро.

Синтез ХС происходит в цитозоле и эндоплазматическом ретикулуме

ОБРАЗОВАНИЕ И УТИЛИЗАЦИЯ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ

Кетоновые тела являются водорастворимыми формами липидных энергетических источников. Двумя основными видами кетоновых тел являются ацетоацетат и (3-гидрокси-бутират. [3-гидроксибутират — это восстановленная форма ацетоацетата. Третьим видом является ацетон.

1. *Свойство кетоновых тел:* кетоновые тела растворимы в воде.
2. *Функция кетоновых тел:* источники энергии для мышц; при продолжительном голодании может использоваться центральной нервной системой.

Ацетоацетат образуется в клетках печени из ацетил-КоА (рис. 14.3). Обра-

зование происходит в митохондриальном матриксе. Печень служит главным местом образования кетоновых тел благодаря высокому содержанию ГМГ-КоА синтазы в митохондриях гепатоцитов.

При голодании усиливается липолиз, растет уровень глюкагона и концентрация цАМФ в печени. Происходит фосфорилирование и активация ГМГ-КоА синтазы. Аллостерическим ингибитором ГМГ-КоА синтазы выступает сукцинил-КоА.

Обратите внимание: эти реакции происходят в митохондриях. В цитозоле имеются изоферменты, которые также катализируют образование ГМГ-КоА, но в качестве промежуточного продукта в синтезе холестерина.

Практическая работа №18 Система свёртывания крови

Цель работы: изучить биохимический механизм свертывания крови

Теоретическая часть:

Система свёртывания крови по функциональному признаку делится на две системы: свёртывающую (гемокоагуляционную) и противосвёртывающую (антитромботическую). Противосвёртывающее действие обеспечивается антикоагулянтной и фибринолитической системами. Поддержание жидкого состояния циркулирующей крови обеспечивается взаимодействием свёртывающей и противосвёртывающей систем крови, которые в физиологических условиях находятся в динамическом равновесии.

СВЁРТЫВАЮЩАЯ (ГЕМОКОАГУЛЯЦИОННАЯ) СИСТЕМА КРОВИ

Назначение свёртывающей системы крови — образование нерастворимого фибрина. В свёртывающую систему крови входят ферментные и неферментные белки плазмы, тканей и форменных элементов крови (прежде всего тромбоцитов), надмолекулярные образования (фрагменты клеточных мембран) и ионизированный кальций. Международный комитет по выработке номенклатуры факторов свёртывания присвоил арабскую нумерацию тромбоцитарным (P_{1-11}) и римскую (ф.1—XIII) — плазменным и тканевым факторам.

Большинство плазменных факторов гемокоагуляции являются ферментами (сериновыми протеиназами), синтезируются в печени и секретируются в кровь в неактивном состоянии, то есть в виде прокоагулянтов. Активирование большинства прокоагулянтов осуществляется путём частичного протеолиза. На определённых этапах процесс свёртывания резко ускоряется неферментными белками, выполняющими роль коферментов.

Свёртывание крови (гемокоагуляция) — цепной каскадный ферментативный процесс, в ходе которого происходит взаимодействие и последовательная активация ряда сериновых протеиназ на фосфолипидных матрицах (тромбопластинах), заканчивающийся превращением растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин.

Время свёртывания крови составляет 5-7 мин.

Выделяют три фазы гемокоагуляции и посткоагуляционную фазу.

Первая фаза — образование протромбиназы или активного тромбoplastина крови (4 мин 50 с - 6 мин 50 с).

Вторая фаза — образование тромбина (2-5 с).

Третья фаза — образование фибрина (2-5 с).

Четвертая (посткоагуляционная) фаза — ретракция тромба, то есть образование гемостатически полноценного тромба (55-85 мин).

В зависимости от механизма первой фазы различают внешнюю и внутреннюю системы свёртывания крови (рис. 15.1).

Внутренний путь образования протромбиназы. Во внутреннем пути все необходимые факторы присутствуют в движущейся крови и реакции свёртывания начинаются при контакте крови с измененной или чужеродной поверхностью, по смачиваемости отличающейся от эндотелия (повреждённая сосудистая стенка или измененная вследствие васкулитов, атеросклероза, интоксикации; поврежденный эндокард). Кроме контакта с чужеродной поверхностью активирование фактора XII может осуществляться ферментом калликреином, а также иммунными комплексами, адреналином, жирными кислотами, холестерином, триацилглицеролами, эндотоксинами, бактериальными липопротеинами и другими веществами. Во внутренней активирующей системе источник тромбoplastинов — плазматические мембраны активированных тромбоцитов (P_3 — тромбоцитарный тромбoplastин).

Внешний путь образования протромбиназы. Появление в кровотоке обломков клеточных мембран (ф.Ша — активный тканевый тромбoplastин) при травме и других патологических состояниях или продукция тканевого тромбoplastина эндотелиоцитами (при стазекрови, гипоксии, ацидозе, действии протеиназ и токсинов на эндотелий) быстро запускает внешний механизм свертывания крови.

Роль витамина «К» в гемокоагуляции. Витамин К (K_1 , K_2 , K_3 , викасол и другие) является антигеморрагическим фактором. Он принимает участие в пост-

трансляционном созревании факторов II, VII, IX и X свёртывающей системы крови (а также в созревании витамин К-зависимых антикоагулянтов — протеинов С и S). Гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в молекуле этих белков протекает после трансляции, в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов с участием γ -глутамилкарбоксилазы. Роль кофактора в составе этого фермента выполняет восстановленная форма витамина К. Наличие дополнительной γ -карбоксильной группы в остатках глутаминовой кислоты придает этим белкам способность при посредстве ионов кальция связываться на фосфолипидной поверхности и участвовать в реакциях гемокоагуляции. При авитаминозе К содержание витамин К-зависимых факторов системы свёртывания в плазме крови не изменяется, но нарушается их способность связываться на поверхности тромбопластинов.

Длительная и выраженная гиперкоагуляция создает благоприятные условия для тромбообразования. Аномалии или дефицит факторов гемокоагуляции (коагулопатии) ведут к нарушению коагуляционного гемостаза, что сопровождается кровотечениями.

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ СИСТЕМА

Антикоагулянтная система — это ряд ингибиторов свёртывания (антикоагулянтов), осуществляющих контроль скорости активирования факторов свёртывания и реакций между ними.

Практически каждому из участников процесса фибринообразования противостоят специфические ингибиторы. Многие антикоагулянты обладают антитромбиновым действием.

По механизму образования в организме все естественные (физиологические) антикоагулянты разделяют на первичные и вторичные. Первичные антикоагулянты постоянно синтезируются и с постоянной скоростью выделяются в кровоток. Первичные антикоагулянты ингибируют активные факторы коагуляции и не действуют на неактивные формы этих факторов. Вторичные антикоагулянты образуются из факторов свёртывания и других белков в процессе свёртывания крови, фибринолиза или активации других протеолитиче-

ских систем.

Из физиологических антикоагулянтов функционально наиболее значимыми являются антитромбин III, гепарин, протеины C и S, «2-макроглобулин, антиконвертин.

Гликопротеин антитромбин III (АТ-III) синтезируется в печени и эндотелиальных клетках. АТ-III — главный ингибитор тромбина. Он также необратимо ингибирует большинство сериновых протеиназ свёртывающей системы (факторы Ха, ХПа, Х1а, 1Ха), слабый ингибитор калликрейна, а также плазмина. На долю АТ-III приходится почти 90 % всей антитромбиновой и более 75 % всей антикоагулянтной активности крови. АТ-III активируется гепарином в 1000 раз.

Протеины C и S — витамин К-зависимые гликопротеины, синтезируемые гепатоцитами. Протеин C синтезируется в неактивной форме и превращается в активную протеиназу тромбином. Протеин C расщепляет неферментные факторы УШа и Уа. Функция протеина C усиливается под влиянием протеина S, выполняющего роль кофактора.

а₂-Макроглобулин является конкурентным ингибитором взаимодействия тромбин-фибриноген. На его долю приходится 3,5 % всего антитромбинового потенциала крови.

Антиконвертин, в основном, синтезируется эндотелиальными клетками, и большее его количество находится на поверхности эндотелия. Антиконвертин ингибирует внешний механизм свёртывания крови: связывает в неактивный комплекс фактор Ха и комплекс ф.УПа/ Ca²⁺/ тканевый тромбопластин. В физиологических условиях содержание антикоагулянтов достаточно для сдерживания процессов гемокоагуляции. При усиленном тромбинообразовании компенсаторно растёт и уровень антикоагулянтов.

ФИБРИНОЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

Фибринолиз — это процесс расщепления фибрина (фибриногена) на растворимые фрагменты (пептиды).

Основным звеном фибринолиза является плазминовая система. В плазмино-

вую систему входят плазмин и его профермент — плазминоген, активаторы плазминогена, проактиваторы плазминогена, ингибиторы плазмина и ингибиторы активаторов плазминогена.

Плазмин обладает высокой специфичностью к фибрину и фибриногену. В результате действия плазмина фибрин (фибриноген) распадается на растворимые фрагменты (продукты деградации фибрина), которые затем удаляются из кровотока ретикулоэндотелиальной системой.

В плазме крови содержится плазминоген — неактивный предшественник плазмина.

Плазминоген — гликопротеин, синтезируемый в печени, костном мозге, почках. Превращение плазминогена в плазмин происходит в результате частичного протеолиза под действием активаторов плазминогена.

Литература:

Основная литература:

1. Барышева, Е. С.
Биохимия Электронный ресурс : Учебное пособие / Е. С. Барышева. - Оренбург : Оренбургский государственный университет, ЭБС АСВ, 2017. - 142 с. - Книга находится в премиум-версии ЭБС IPR BOOKS. - ISBN 978-5-7410-1888-0, экземпляров неограничено
2. Емельянов, В.В.; Биохимия Электронный ресурс : учебное пособие / Н.Н. Мочульская / Н.Е. Максимова / В.В. Емельянов. - Биохимия, 2022-08-31. - Екатеринбург : Уральский федеральный университет, ЭБС АСВ, 2016. - 132 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks. - ISBN 978-5-7996-1893-3, экземпляров неограничено

Дополнительная литература:

1. Глинка, Н. Л. Общая химия / Н. Г. Глинка ; Под ред. А. И. Ермакова. - Изд. 30-е, испр. - М. : Интеграл-Пресс, 2003. - 728с. - Библиогр.: с. 704. - Предм. указ.: с. 706. - ISBN 5-89602-017-1
2. Димитриев, А.Д.; Биохимия Электронный ресурс : учебное пособие / А.Д. Димитриев. - Саратов : Вузовское образование, 2018. - 111 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks. - ISBN 978-5-4487-0165-8, экземпляров неограничено