

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

Т.В. Жаворонок

**Лабораторный практикум
по курсу
«Активные формы кислорода
в метаболизме тканей полости рта»**

**для студентов лечебного факультета
по специальности «Стоматология»**

ТОМСК
Издательство СибГМУ
2018

УДК 612.31:577.121](075.8)
ББК 28.707.3я73+28.072я73
Ж 135

Жаворонок, Т. В. Лабораторный практикум по курсу «Активные формы кислорода в метаболизме тканей полости рта» / Т. В. Жаворонок. – Томск : Изд-во СибГМУ, 2018. – 101 с.

Практикум предназначен для студентов медицинских вузов, обучающихся по специальности 31.05.03 – Стоматология, соответствует программе обучения в рамках дисциплины по выбору «Активные формы кислорода в метаболизме тканей полости рта». Материал согласован с тематикой лекционного курса и адаптирован для проведения практических занятий.

Практикум включает материал, необходимый студентам для получения базовых представлений о развитии патологических процессов в тканях полости рта, усвоения молекулярных механизмов формирования патологии при окислительном стрессе на уровне клетки и целого организма.

Учебное пособие содержит подробное изложение методов определения ключевых метаболитов окислительных процессов и активности антиоксидантных ферментов, вопросы и тесты по изучаемым темам, контрольные вопросы для проведения семинаров, итоговых занятий и годового зачета.

УДК 612.31:577.121](075.8)
ББК 28.707.3я73+28.072я73

Рецензент:

Д.И. Кузьменко – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Утверждено и рекомендовано к печати Центральным методическим советом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 83 от 22 марта 2018 г.).

© Издательство СибГМУ, 2018
© Жаворонок Т.В., 2018

ВВЕДЕНИЕ

Большая часть живых организмов на Земле не может обходиться без кислорода, который играет ключевую роль в их жизнедеятельности и биоэнергетике, являясь окислителем питательных веществ и метаболитов. Молекулярный кислород для клеток не токсичен, для них опасны продукты его неполного восстановления – активные формы кислорода (АФК). 95–98 % вдыхаемого O_2 расходуется на выработку энергии и окислительный метаболизм субстратов, остальные 2–5 % переходят в АФК. Появление АФК вызвано способностью молекулярного кислорода к перехвату электронов у переносчиков цепей электронного транспорта клетки. Синтез АФК в клетке происходит постоянно в ходе ряда процессов обмена веществ. АФК принимают участие в реакциях синтеза метаболически активных соединений, реакциях защиты при действии патогенов, служат вторичными посредниками в передаче сигналов. При нарушении гомеостаза АФК могут вызывать деэнергизацию клетки, инициировать превращение макромолекул в гидропероксиды с дальнейшим преобразованием их в токсичные окисленные соединения. АФК индуцируют повреждение нуклеиновых кислот, ингибирование клеточного деления, возникновение мутаций и опухолей. Для мембран клетки наиболее опасна способность АФК инициировать цепные процессы свободно-радикального перекисного окисления.

В практикуме рассматриваются методические подходы для изучения активности процессов перекисного окисления и окислительной модификации макромолекул. К промежуточным продуктам перекисного окисления липидов относят диеновые конъюгаты, одним из конечных продуктов является малоновый диальдегид, определение концентрации которого осуществляется по реакции с тиобарбитуровой кислотой. При оценке состояния процессов пероксидации большое значение имеет определение уровня окислительной модификации белков по содержанию карбонильных производных и накоплению продуктов окисления редокс-чувствительных аминокислот, а также исследование активности комплекса антиоксидантных ферментов.

От эффективности функционирования антиоксидантной системы (АОС), включающей ферментативные и неэнзиматические механизмы, зависит защита клетки от избыточного окисления и степень повреждений от АФК. Супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза защищают клетку от свободных радикалов и перекиси водорода. Методы оценки состояния процессов перекисного окисления и активности антиоксидантных ферментов широко используются для характеристики

особого состояния тканевого метаболизма, получившего название «окислительный стресс» (ОС).

К возникновению окислительного стресса приводит преобладание прооксидантных эффектов над антиоксидантными. Окислительный стресс является неизбежным следствием сдвигов гомеостаза, которые могут быть вызваны воздействием на организм широко круга физических, химических и биологических факторов. При этом нарушается баланс между темпами образования АФК, свободных радикалов и гидроперекисей, с одной стороны, и функциональными возможностями системы антиоксидантной защиты – с другой. В такой ситуации антиоксидантная система уже не способна адекватно противостоять усиленной продукции прооксидантов. Избыток свободных радикалов и перекисных соединений существенно увеличивает активность процессов перекисидации, что приводит к повреждению структуры и нарушению функций белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот. В результате нарушается редокс-состояние и структурно-функциональный статус клеток и тканей, что способствует возникновению так называемых «свободнорадикальных патологий». Окислительный стресс является ведущим патогенетическим звеном множества заболеваний (сахарный диабет, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, нефрит, болезнь Альцгеймера, ревматоидный артрит, фиброз легких и др.), во многом определяет темпы биологического старения.

Своеобразие органов и тканей полости рта, постоянное присутствие прооксидантных факторов и особенности организации и функционирования антиоксидантной системы способствуют формированию окислительного стресса и связанных с ним патологических процессов стоматологического профиля. Квалифицированному специалисту – стоматологу необходимы знания о методических подходах к оценке окислительных процессов и редокс-регуляции клеток организма и к выявлению патологий, связанных с окислительным дисбалансом в тканях и органах полости рта. Вместе с тем, изучение состояния процессов перекисидации и активности системы антиоксидантной защиты являются важным этапом при характеристике свойств новых лечебных препаратов, косметических средств, а также пищевых продуктов. Сведения в этой области могут быть полезными в профилактике и лечении заболеваний полости рта.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

4-ААП	– 4-аминоантипирин
АОС	– антиоксидантная система
АТФ	– аденозинтрифосфат
АФК	– активные формы кислорода
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТНБ	– дитионитробензойная кислота
ДФПГ	– 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (устойчивый свободный радикал)
ИФА	– иммуноферментный анализ
МДА	– малоновый диальдегид
МСО	– микросомальное окисление
НАД•Н	– никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СДГ	– сукцинатдегидрогеназа
СОД	– супероксиддисмутаза
СРП	– «свободно-радикальные» патологии
Cu-СОД	– медь-зависимая внеклеточная супероксиддисмутаза
Cu,Zn-СОД	– медь, цинк-зависимая цитозольная супероксиддисмутаза
Mn-СОД	– марганец-зависимая митохондриальная супероксиддисмутаза
СПИД	– синдром приобретённого иммунодефицита
СРО	– свободнорадикальное окисление
ТБК	– тиобарбитуровая кислота
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
ФАД•Н ₂	– флавинадениндинуклеотид восстановленный
ФМН•Н ₂	– флавинмононуклеотид восстановленный
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
ЭДТА	– этилендиаминтетраацетат (этилендиаминтетрауксусная кислота)
GSH	– глутатион восстановленный
GSSG	– глутатион окисленный (глутатиондиоксид)
O ₂ ^{•-}	– супероксид анион-радикал
ОН	– гидроксил-радикал
ОС	– окислительный стресс
¹ O ₂	– синглетный кислород
HO ₂ [•]	– гидродиоксил-радикал
NO [•]	– монооксид азота (свободный радикал)
RO [•]	– алкоксил-радикал
RO ₂ [•]	– алкилдиоксил-радикал
ROOH	– алкилгидропероксид

РАЗДЕЛ I

АФК И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ: ОРГАНИЗМ И КОМПАРТМЕНТЫ КЛЕТКИ

ТЕМА 1.1

КИСЛОРОД, АФК И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКЕ И ВНЕКЛЕТОЧНОМ МАТРИКСЕ

ЗАНЯТИЕ 1.1.1

Кислород и обмен веществ. Источники и пути генерации АФК

Вопросы к занятию

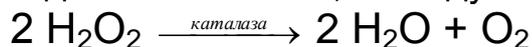
1. Строение и электронные уровни атома кислорода, свойства атома кислорода, молекулярный кислород. Кислород как макроэлемент организма.
2. Направления участия кислорода в метаболизме.
3. Понятие биологического окисления субстратов до углекислого газа и воды с целью образования энергии.
4. Понятие об окислительных процессах клетки, альтернативных процессу биологического окисления.
5. Четырехэлектронное восстановление молекулы кислорода до воды.
6. Источники и пути генерации активных форм кислорода.
7. Активные формы кислорода свободнорадикальной и нерадикальной природы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА КАТАЛАЗЫ НА СУБСТРАТ (ПЕРОКСИД ВОДОРОДА)

Каталаза является внутриклеточным ферментом геминовой природы. Много каталазы содержится в клетках крови. Особенно хорошо фермент представлен в эритроцитах, которые он призван защищать от окислительного повреждения активными формами кислорода (H_2O_2 и др.).

Принцип. Каталаза ускоряет реакцию разложения пероксида водорода, образующегося в ходе метаболизма, на воду и кислород:



Реактивы: 3 % раствор пероксида водорода.

Объект исследования. Цельная кровь.

Ход работы. В пробирку наливают 10 капель 3 % раствора H_2O_2 . Добавляют каплю свежей цельной крови. Результат оценивают по выде-

лению кислорода. Наблюдают за интенсивностью реакции в течение 20 мин, отмечая изменения через каждые 5 мин.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2
**УЧАСТИЕ H_2O_2 В ОТКРЫТИИ СЛЕДОВ КРОВИ
В РЕАКЦИИ С АЗОПИРАМОМ**

Принцип метода. При взаимодействии азопирама с гемоглобином в присутствии пероксида водорода как окислителя образуются цветные продукты с характерным фиолетовым окрашиванием.

Реактивы:

- 1) раствор азопирама (10 % раствор амидопирин и 0,10–0,15 % раствор хлорида фениламмония в 96 % этаноле);
- 2) 3 % раствор H_2O_2 ;
- 3) рабочий раствор (смешивают равные объемы растворов 1 и 2).

Объект исследования. Стоматологические инструменты со следами крови.

Ход работы. На исследуемые инструменты пипеткой наносят несколько капель рабочего раствора или протирают тампоном, смоченным в рабочем растворе, оставляют на 30–60 секунд. При наличии следов крови немедленно, или не позднее 1-ой минуты от начала контакта реактива с загрязненной кровью частью инструмента, появляется фиолетовое окрашивание, быстро переходящее в розово-сиреневое.

Норма. На стоматологическом инструментарии, подготовленном к стерилизации, следы биологического материала (крови) не обнаруживаются.

Клинико-диагностическое значение. Использование загрязненного кровью медицинского инструментария может привести к развитию таких заболеваний как вирусный гепатит, СПИД и иных патологий, возбудители которых находятся в крови.

Задание. Результаты азопирамового теста сравнить с итогами проведения представленной ниже бензидиновой пробы на кровь. Пояснить, почему в стоматологической практике методом выбора является реакция с азопирамом, а не бензидиновая проба.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3
**БЕНЗИДИНОВАЯ ПРОБА С H_2O_2 – СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ
НА ГЕМ ГЕМОГЛОБИНА**

Принцип. При добавлении к разбавленной крови растворов бензидина и H_2O_2 идет окисление бензидина с образованием окрашенных продуктов. Бензидин окисляется в дифенохинондимин синей окраски, переходящей в красную. Гемоглобин выступает катализатором реакции.

Реактивы:

- 1) 0,2 % спиртовой раствор бензидина;

2) 3 % раствор H_2O_2 .

Объект исследования. Разведенная кровь, стоматологические инструменты со следами крови.

Ход работы.

1) В пробирку помещают 5 капель разведенной крови, добавляют 2 капли 0,2 % спиртового раствора бензидина и 2 капли 3 % раствора H_2O_2 . Жидкость в пробирке приобретает синюю окраску, которая вскоре переходит в красную.

2) Смешивают 10 капель 0,2 % спиртового раствора бензидина и 10 капель 3 % H_2O_2 , полученным раствором обрабатывают исследуемые инструменты, нанося с помощью пипетки по несколько капель на исследуемый объект, оценивают результат и делают выводы.

Клинико-диагностическое значение. Пробу применяют в клинической практике для обнаружения малых количеств крови в биологических объектах (желудочном соке, кале и т. д.) и в судебно-медицинской практике для доказательства наличия кровяных пятен.

ЗАНЯТИЕ 1.1.2

Кислород и компартменты клетки.

Участие АФК в метаболизме клетки и организма

Вопросы к занятию

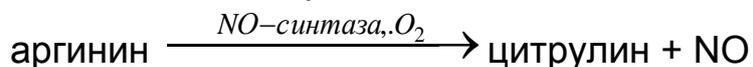
1. Разнообразие и назначение компартментов клетки. Использование молекул кислорода в компартментах клетки.
2. Особенности доставки и использования кислорода в клетке для генерации АФК.
3. Включение атомов азота и серы в состав активных форм кислорода, биологический смысл и дополнительные возможности таких АФК.
4. Функциональное значение и регуляторная роль АФК.
5. Понятие об участии АФК в метаболических процессах в различных типах клеток.
6. Понятие об участии АФК в метаболизме на уровне организма.
7. Монооксид азота – регуляторная молекула организма.

Тема доклада

Монооксид азота. Нобелевская премия 1998 года по медицине и физиологии «За открытие роли оксида азота как сигнальной молекулы в регуляции сердечно-сосудистой системы».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ
МОНООКСИДА АЗОТА (НИТРИТОВ) В СЛЮНЕ**

Монооксид азота (NO, азот(II)оксид) – это свободный радикал, который образуется в организме из аминокислоты аргинина при участии ферментов NO-синтаз согласно реакции:



NO играет роль посредника (мессенджера) в ряде важнейших биологических процессов. В высоких концентрациях NO токсичен и проявляет бактерицидные эффекты (при воспалении и других патологических состояниях), но одновременно способен повреждать окружающие ткани. При метаболизме 80 % имеющегося NO превращается в нитриты или нитраты. Используемый в работе метод основан на оценке содержания нитритов, поэтому сначала перед исследованием восстанавливают имеющиеся нитраты в нитриты, применяя омеднённый кадмиевый редутор.

Принцип метода. Нитриты реагируют с реактивом Грисса (α -нафтиламин и сульфаниловая кислота в соотношении 5 : 1) при 30 °С с образованием соединений розового цвета. Окраска, интенсивность которой определяют фотокolorиметрически, прямо пропорциональна концентрации нитритов в слюне.

Реактивы:

- 1) реактив Грисса (1 % раствор сульфаниламида и 0,1 % раствор нафтилендиамина в 12 % уксусной кислоте);
- 2) стандартный раствор NaNO_2 или KNO_2 .

Объект исследования. Ротовая жидкость, сыворотка или плазма крови.

Ход работы. Перед определением 10 мин восстанавливают в пробах слюны (плазмы крови) нитраты до нитритов с помощью омеднённого кадмиевого редутора. Отбирают 0,1 мл слюны (плазмы крови), прибавляют 0,9 мл дистиллированной H_2O и 1,0 мл реактива Грисса. Инкубируют в термостате при температуре 30 °С 20 мин. Контрольную пробу обрабатывают аналогично, но вместо слюны (плазмы крови) берут 0,1 мл дистиллированной H_2O . Колориметрируют опытные пробы против контрольной пробы при длине волны 540 нм в кювете с толщиной оптического слоя 0,5 см.

Расчёт производят, используя: 1) калибровочную пробу с известной концентрацией NaNO_2 (или KNO_2); или 2) калибровочную кривую, построенную по известным концентрациям NaNO_2 (диапазон 0–150 мкМ, результат выражают в мкМ). Если значения концентрации NaNO_2 для построения калибровочной кривой рассчитаны в мкг/мл, то результат выражают в мкг/мл.

$$C \text{ (мкг/мл или мкМ)} = 3,34 \cdot \Delta D, \quad \text{где}$$

C – концентрация метаболитов оксида азота (нитритов) в слюне;

3,34 – коэффициент пересчёта;

ΔD – масса нитритов в пробе (находят по калибровочному графику).

Нормы. Концентрация нитритов в слюне составляет 2–4 мкг/мл.

Клинико-диагностическое значение. Физиологическая роль NO – является фактором релаксации сосудов (эффекты виагры, нитроглицерина, нитропруссиды натрия связаны с синтезом NO, который через активацию гуанилатциклазы и образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) расслабляет гладкие мышцы сосудов) и, следовательно, снижает артериальное давление; регулирует перистальтику кишечника и эрекцию; выступает ингибитором агрегации тромбоцитов и фиксации лейкоцитов к эндотелию; медиатором в центральной нервной системе (с нарушением обмена NO связана болезнь Альцгеймера); медиатором воспаления (действие вирусов, микробов, провоспалительных цитокинов активирует синтез NO).

Глюкокортикоиды снижают уровень NO путём торможения активности ферментов NO-синтаз.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите один правильный ответ.

1. ПЕРВИЧНОЙ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЙ ФОРМОЙ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) $\cdot\text{OH}$
- 2) OH^-
- 3) $\text{HO}_2\cdot$
- 4) H_2O_2
- 5) $\text{O}_2^{\cdot-}$

2. ПРОДУКТОМ ТРЕХЭЛЕКТРОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ КИСЛОРОДА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) $\cdot\text{OH}$
- 2) OH^-
- 3) $\text{HO}_2\cdot$
- 4) H_2O_2
- 5) $\text{O}_2^{\cdot-}$

3. В РЕАКЦИИ ФЕНТОНА H_2O_2 РЕАГИРУЕТ С АКТИВНЫМ ЖЕЛЕЗОМ, НАХОДЯЩИМСЯ В ФОРМЕ

- 1) Fe^{2+}
- 2) Fe^{3+}
- 3) FeO

- 4) Fe_2O_3
- 5) FeS

4. В РЕАКЦИИ ГАБЕРА–ВЕЙСА ГЕНЕРИРУЕТСЯ ТОКСИЧНЫЙ ГИДРОКСИЛ-РАДИКАЛ ($\cdot\text{OH}$) ИЗ

- 1) синглетного кислорода и супероксида
- 2) пероксида водорода и синглетного кислорода
- 3) супероксида и ионов железа (III)
- 4) супероксида и ионов железа (II)
- 5) пероксида водорода и супероксида

5. К ОБРАЗУЕМЫМ В ОРГАНИЗМЕ АКТИВНЫМ ФОРМАМ КИСЛОРОДА НЕЛЬЗЯ ОТНЕСТИ

- 1) синглетный кислород
- 2) гидроксильный радикал
- 3) гидроксильный апатит
- 4) пероксид водорода
- 5) супероксидный радикал

6. ПРОДУКТОМ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНОЙ РЕАКЦИИ ЯВЛЯЕТСЯ АФК В ВИДЕ

- 1) H_2O_2
- 2) OH^-
- 3) $\text{O}_2^{\cdot-}$
- 4) $^1\text{O}_2$
- 5) NO_2^{\cdot}
- 6) $\cdot\text{OH}$

7. СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ ОТ СОЕДИНЕНИЙ НЕРАДИКАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ ОТЛИЧАЮТСЯ

- 1) неспаренным электроном на одной из внутренних орбиталей
- 2) анионным зарядом
- 3) катионным зарядом
- 4) неспаренным электроном на внешней электронной оболочке
- 5) неспаренным электроном на всех внутренних орбиталях

8. ИЗ 100 % ВДЫХАЕМОГО O_2 ПЕРЕХОДИТ В АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

- 1) 1–2 %
- 2) 2–5 %
- 3) 4–6 %
- 4) 0,5–3 %
- 5) до 8 %

9. СУБСТРАТОМ ДЛЯ ФЕРМЕНТОВ NO-СИНТАЗ ЯВЛЯЕТСЯ АМИНО-КИСЛОТА

- 1) аргинин
- 2) орнитин
- 3) цитруллин
- 4) лизин
- 5) гистидин

10. ИОН ГИПОТИОЦИАНАТА (OSCN^-) ОБРАЗУЕТСЯ ПРИ ОКИСЛЕНИИ ТИОЦИАНАТА (SCN^-) В ПРИСУТСТВИИ

- 1) $\cdot\text{OH}$
- 2) $\text{O}_2^{\cdot-}$
- 3) H_2O_2
- 4) $^1\text{O}_2$
- 5) HO_2^{\cdot}
- 6) O_3

ТЕМА 1.2 ДВОЙСТВЕННАЯ ПРИРОДА АФК. АНТИОКСИДАНТЫ И ПРООКСИДАНТЫ – ДВЕ СТОРОНЫ ОДНОГО ЦЕЛОГО

ЗАНЯТИЕ 1.2.1

Двойственная природа АФК.

Прооксиданты, антиоксиданты и окислительный стресс

Вопросы к занятию

1. Общий адаптационный синдром, зависимость реакций адаптации от силы раздражителя, срочная и долговременная адаптация.
2. Стадии стресс-реакции, понятие о стресс-реализующих и стресс-лимитирующих системах.
3. Двойственная природа активных форм кислорода, участие в созидании и разрушении, жизнедеятельности и смерти клетки.
4. Понятие о прооксидантах и антиоксидантах, основные примеры.
5. Прооксиданты и антиоксиданты – «две стороны одной медали».
6. Понятие о редокс-состоянии, редокс-регуляции и окислительном стрессе.
7. Методология изучения редокс-состояния и окислительного стресса.

Темы сообщений

1. Теория стресса Г. Селье.
2. Концепция адаптации организма Л. Гаркави, Е. Квакиной и М. Уколовой.
3. Радиоспектроскопические методы оценки окислительного стресса.
4. Хемилюминесцентные методы оценки окислительного стресса.
5. Иммуноферментный анализ в оценке окислительного стресса.

Высокая реакционноспособность АФК и дозозависимость их эффектов придаёт им, с одной стороны – токсические свойства, деструктивные в отношении макромолекул, с другой стороны – позволяет служить важными регуляторами внутриклеточных процессов и межклеточной кооперации за счёт способности к участию в обратимых окислительно-восстановительных реакциях, меняющих редокс-состояние и редокс-регуляцию клетки. Направление действия АФК во многом зависит от баланса процессов их синтеза и утилизации, результатом достигнутого равновесия становится их действующая концентрация.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА **МЕТОДОЛОГИЯ ОЦЕНКИ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА (ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА)**

Роль окислительного стресса в патогенезе многих заболеваний и при старении достаточно хорошо изучена, однако использование методов оценки свободнорадикального окисления (СРО) и антиоксидантной

системы (АОС) в клинике весьма ограничено. Это связано с объективными трудностями на всех этапах разработки стандартных подходов к исследованию окислительного стресса:

- 1) получение биопроб,
- 2) определение содержания свободных радикалов,
- 3) оценка продуктов окислительной дегградации белковых и липидных молекул,
- 4) установление концентрации антиоксидантов и активности ферментов АОС.

Основные препятствия – ультракороткое время жизни, неустойчивость и высокая метаболическая активность АФК и промежуточных продуктов окисления. Несмотря на выполнение всех требований, высокая реакционноспособность определяемых веществ способствует появлению и накоплению погрешностей.

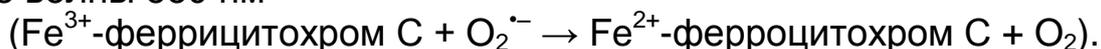
1. Сложности взятия, транспортировки и хранения биоматериала для анализа прооксидантной и антиоксидантной систем

Главные правила: взятие проб – в охлаждённые ёмкости, пробирки (лёд, термостаты, жидкий азот); транспортировка и центрифугирование – на холоде (0 – +4 °С). Все исследования проводят в день взятия материала. Нельзя откладывать выделение клеток (лейкоцитов, тромбоцитов, эритроцитов) из крови, экстракцию липидов, фракционирование гомогенатов биопсийного материала (приложение 1). Иногда хранят пробы при -70 °С (реже -20 °С). В исследуемых биопробах часто мало белка, поэтому для оценки его содержания используют специальные чувствительные методы (приложение 3).

2. Анализ АФК и продуцирующих их систем объективно затруднён. Основные трудности анализа АФК связаны с их низкой стационарной концентрацией *in vivo* вследствие высокой химической активности. При этом особенности биоматериала, существующего в мягких условиях, не позволяют использовать довольно жёсткие методы, повышающие стационарную концентрацию свободных радикалов. Доступной альтернативой являются «методы акцептора». Суть их заключается в том, что короткоживущий радикал, реагируя с веществом-акцептором, изменяет его с получением продуктов реакции, которые можно регистрировать путем измерения хемилюминесценции или оптических спектров (приложение 2, методические приёмы).

Спектральные методы отличаются разнообразием, применяют их часто. Например, содержание супероксидного анион-радикала можно оценить:

- 1) с помощью реакции восстановления цитохрома С. Реакция специфична и сопровождается повышением оптического поглощения при длине волны 550 нм



Однако, цитохром С можно восстановить аскорбатом или тиоловыми соединениями, поэтому для выяснения роли $O_2^{\cdot-}$ параллельно анализируют контрольную пробу с супероксиддисмутазой.

2) с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия в диформаза. Реакция специфична и сопровождается появлением полосы поглощения при длине волны 560 нм. Однако диформаза плохо растворим в водной среде, поэтому его применение для биологических проб ограничено.

Радиоспектроскопические методы в клинике обычно не используются, их выполняют только высококвалифицированные специалисты в специально оснащенных лабораториях. *Хемилюминесцентные методы* высокочувствительны, используются для определения интенсивности свободнорадикального окисления и антиоксидантной активности биожидкостей (сыворотки крови, плазмы крови и др.). В диагностике наиболее перспективно использовать переокисную хемилюминесценцию для оценки генерации АФК и свободных радикалов.

3. Анализ продуктов окислительной модификации макромолекул

Для исследования молекулярных продуктов свободнорадикального окисления липидов используют различные методы. Количество гидроперекисей липидов в сыворотке и клетках крови оценивают методом амперометрического титрования (восстановитель здесь чаще всего йодид-ион) или спектрофотометрическими методами. Поскольку первичные гидроперекиси липидов неустойчивы, то при оценке липидной перекисидации чаще всего анализируют вторичные или конечные продукты их превращений. Количественную оценку диеновых и триеновых конъюгатов проводят по специфическим спектрам поглощения в ультрафиолетовой области при 232 нм и 275 нм, соответственно. Накопление продуктов ПОЛ (малонового диальдегида и др.) в плазме и клетках крови часто определяют по тесту с тиобарбитуровой кислотой. Продукты ПОЛ могут образовывать сшивки с белками (основания Шиффа), которые выявляют по голубой флюоресценции при максимуме возбуждения – 370 нм, излучения – 450 нм. В анализе заболеваний, связанных с нарушениями липидного обмена, важна оценка окисления липопротеинов низкой плотности, которые активнее поглощаются макрофагами, ускоряя повреждение сосудов и появление бляшек.

Для анализа окислительной модификации белков разработаны колориметрические спектральные методы и ИФА-диагностика (определение карбонил-протеинов и др.). С помощью флюоресцентных методов оценивают накопление в белках нерепарируемых повреждений циклических радикалов аминокислот (окисленного триптофана, битиروزина).

4. Исследование антиоксидантной системы

Разнообразие неферментативных компонентов и ферментов АОС приводит к неизбежному распределению методов их исследования в отдельные группы:

1) определение содержания тиоловых соединений белковой и небелковой природы, восстановленного и окисленного глутатиона, активности глутатион-зависимых ферментов (пероксидаз, S-трансфераз, редуктазы);

2) оценка антирадикальной активности супероксиддисмутазы (используются системы: восстановления нитросинего тетразолия, «адреналин/адренохром», «ксантин/ксантиноксидаза – цитохром с», автоокисления кверцетина), в плазме крови определяют антирадикальную активность белка острой фазы воспаления – церулоплазмина;

3) оценка антиперекисной активности каталазы и разнообразных пероксидаз (лактопероксидаза, миелопероксидаза и др.);

4) определение содержания α -токоферола в липидной фазе (измерение флуоресценции альфа-токоферола, экстрагированного гексаном и этанолом из сыворотки крови, при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны испускания 323 нм) и аскорбата в водной фазе;

5) определение способности (общей, ферментативной и неферментативной) плазмы крови к расщеплению пероксида водорода;

6) оценка антирадикальной активности проб с использованием радикала ДФПГ.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите один правильный ответ.

1. ПРООКСИДАНТАМИ НАЗЫВАЮТ ВЕЩЕСТВА, СТИМУЛИРУЮЩИЕ

- 1) процесс перекисного окисления липидов
- 2) конъюгацию свободных радикалов
- 3) перенос ионов переменной валентности
- 4) аккумуляцию витамина Е в плазматической мембране
- 5) синтез витамина D в организме

2. К ПРООКСИДАНТАМ НЕЛЬЗЯ ОТНЕСТИ

- 1) АФК
- 2) свободные радикалы
- 3) ионы железа (II)
- 4) ионы кальция (II)
- 5) ионы меди (I)

3. КОНЦЕНТРАЦИИ АФК В ТКАНЯХ СОСТАВЛЯЮТ

- 1) 10^{-6} – 10^{-8} М

- 2) 10^{-8} – 10^{-11} М
- 3) 10^{-11} – 10^{-12} М
- 4) 10^{-12} – 10^{-15} М
- 5) 10^{-10} – 10^{-15} М

4. ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ НАЗЫВАЮТ

- 1) нарушение доставки кислорода в митохондрии
- 2) преобладание прооксидантов над антиоксидантами
- 3) преобладание антиоксидантов над эффектами АФК
- 4) увеличение внутриклеточного количества кислорода
- 5) увеличение сродства гемоглобина к кислороду

5. АНТИОКСИДАНТАМИ ЯВЛЯЮТСЯ ВЕЩЕСТВА, МАЛЫЕ ДОЗЫ КОТОРЫХ СПОСОБНЫ

- 1) увеличивать синтез фосфолипидов
- 2) стимулировать образование дисульфидных мостиков в белках
- 3) тормозить свободнорадикальное окисление
- 4) активировать накопление фосфатов в костях
- 5) снижать расход электронов в электрон-транспортных цепях

6. БИОЛОГИЧЕСКИМ АНТИОКСИДАНТОМ ЯВЛЯЕТСЯ ВИТАМИН

- 1) А
- 2) Е
- 3) F
- 4) К
- 5) Д

7. К АНТИОКСИДАНТАМ – ЛОВУШКАМ РАДИКАЛОВ ОТНОСЯТ

- 1) аскорбат
- 2) цистеин
- 3) глутатион
- 4) кальцитриол

8. ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ДИСБАЛАНСЕ СОДЕРЖАНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА ЗНАЧИТЕЛЬНО ВОЗРАСТЁТ ВСЛЕДСТВИЕ РАЗВИТИЯ

- 1) процесса репарации
- 2) реакции активации
- 3) эустресса
- 4) дистресса
- 5) резистентности

9. СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ ФОРМА ВИТАМИНА Е ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) малоактивным радикалом

- 2) радикалом средней силы
- 3) высокоактивным радикалом
- 4) несуществующим в природе артефактом

10. К ФУНКЦИЯМ АФК НЕЛЬЗЯ ОТНЕСТИ

- 1) участие в защитных реакциях при действии патогенов
- 2) эффект вторичных посредников в передаче сигналов
- 3) ингибирование деления клетки
- 4) окислительную модификацию макромолекул
- 5) активацию синтеза протеогликанов матрикса

ТЕМА 1.3 МЕХАНИЗМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ

ЗАНЯТИЕ 1.3.1

Окислительная модификация макромолекул и субстраты окисления – белки, липиды, нуклеиновые кислоты

Вопросы к занятию

1. Понятие об окислительной модификации макромолекул организма.
2. Белки, липиды и нуклеиновые кислоты как основные субстраты окисления. Мишени окисления в составе ДНК, белков, фосфолипидов.
3. Окислительная модификация макромолекул в нормальных процессах жизнедеятельности, роль для клетки и организма.
4. Окислительная модификация макромолекул при патологии, значение.
5. Последствия окислительной модификации макромолекул для клетки.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ХОЛИНОСОДЕРЖАЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ В СМЕСИ ЛИПИДОВ**

Принцип метода. Холиносодержащие фосфолипиды, имеющие четвертичный атом азота, являются сильными органическими основаниями, поэтому способны связывать красители (бромтимоловый синий, бромфеноловый синий), содержащие сульфогруппу с отрицательным зарядом. Образовавшийся гидрофобный комплекс экстрагируется органическими растворителями. Фосфолипиды без четвертичного атома азота (фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, кардиолипиды) с такими красителями не соединяются.

Реактивы:

- 1) хлороформ;
- 2) 0,1 % раствор бромтимолового синего (pH=8).

Объект исследования. 0,2 % раствор смеси липидов, плазма крови.

Ход работы. В 1-ую пробирку помещают 1 мл 0,2 % раствора смеси липидов, во 2-ую – 1 мл плазмы крови. В обе пробирки приливают по 1 мл 0,1 % раствора бромтимолового синего (pH=8) и 2 мл хлороформа. Обе пробирки перемешивают переворачиванием 30 секунд, не допуская образования пены, и оставляют на 5–7 мин для расслаивания фаз. В присутствии холиносодержащих фосфолипидов верхний хлороформный слой окрашивается в жёлтый цвет.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДНОГО ЧИСЛА НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

Принцип метода. Ненасыщенные жирные кислоты молекул липидов присоединяют йод по месту двойных связей. Йодное число – коли-

чество йода (г), присоединяемое к 100 г жира. По йодному числу можно определить вид жира.

Реактивы:

- 1) этанол;
- 2) спиртовой раствор йода (Сн = 0,1 моль);
- 3) раствор тиосульфата натрия (Сн = 0,1 моль);
- 4) 1 % раствор крахмала.

Объект исследования. Подсолнечное масло, сливочное масло.

Ход работы. Навеску жира (0,1 г) вносят в колбу на 500 мл, доливают 5 мл этанола для растворения жира. Добавляют 10 мл спиртового раствора йода, 200 мл воды, встряхивают и оставляют на 5 минут. Титруют избыток йода раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала. Параллельно во второй колбе ставят контроль, используя все компоненты без жира.

Расчет. Йодное число жира (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A - B) \cdot 12,692 \cdot 100}{0,1 \cdot 1000}, \quad \text{где}$$

A – объем тиосульфата (мл), израсходованного на титрование контроля.

B – объем тиосульфата (мл), израсходованного на титрование опыта.

12,692 – масса йода (мг), соответствующая 1 мл 0,1 N р-ра тиосульфата.

100 – перерасчет на 100 г жира; 0,1 – навеска жира в граммах.

1000 – коэффициент перевода содержания йода из мг в граммы.

Нормы.

Название жира	Показатель преломления	Йодное число
Жир человека	1,452–1,457	62,5–73,3
Сливочное масло	1,475–1,476	26–38
Подсолнечное масло	1,475–1,476	118–120
Рыбий жир	1,475–1,485	150–175
Касторовое масло	1,447–1,478	31–91

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3
ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ
И СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКАХ

Принцип метода. Ксантопротеиновая реакция обнаружения остатков ароматических аминокислот в белке обусловлена нитрованием бензольного кольца в боковом радикале данных аминокислот. Серосодержащие аминокислоты выявляются в реакции Фоля: при нагревании со щелочью они образуют сероводород, который реагирует со щелочью с получением сульфидов, имеющих характерное бурое окрашивание при добавлении ацетата свинца.

Реактивы:

- 1) конц. HNO₃;
- 2) 10 % раствор NaOH;
- 3) раствор ацетата свинца.

Объект исследования. Сыворотка крови, раствор яичного белка.

Ход работы. В две пробирки помещают по 5 капель сыворотки крови.

В 1-ю пробирку добавляют 4 капли конц. HNO_3 и нагревают на спиртовке до появления желтого окрашивания, охлаждают и добавляют 4 капли 10 % NaOH , в итоге жёлтая окраска переходит в оранжевую. Во 2-ю пробирку добавляют 3 капли 10 % NaOH , нагревают на спиртовке две минуты, охлаждают, добавляют 1 каплю ацетата свинца, в итоге развивается бурое окрашивание.

Аналогичные реакции проводят с раствором яичного белка и сравнивают полученные результаты с результатами исследования сыворотки крови.

ЗАНЯТИЕ 1.3.2

Механизмы перекисного окисления липидов

Вопросы к занятию

1. Разнообразие фосфолипидов. Глицеро- и сфинголипиды.
2. Жирнокислотный состав фосфолипидов. Разнообразие и роль полиненасыщенных жирных кислот.
3. Вклад фосфолипидов в структурно-функциональную организацию мембран.
4. Значение фосфолипидов в транспорте жиров в организме.
5. Механизмы перекисного окисления липидов: реакции зарождения, продолжения, разветвления и обрыва цепи, рекомбинация радикалов, взаимодействие с антиоксидантами.
6. Цепные реакции свободнорадикального окисления фосфолипидов клеточных мембран: причины инициации и последствия.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДИЕНОВЫХ КОНЪЮГАТОВ ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) сопровождается преобразованиями в области двойных связей полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов. Смещение таких связей в цепях полиеновых кислот приводит к появлению сопряженных диеновых и триеновых конъюгатов гидроперекисей липидов, имеющих максимумы поглощения в ультрафиолетовой области: диеновые – при 232 нм, триеновые – при 275 нм. Насыщенные жиры поглощают свет при длине волны 215 нм, по соотношению оптических плотностей при 232 и 215 нм можно судить о степени окисленности липидов.

Принцип метода. О содержании конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов судят по интенсивности поглощения липидным экстрактом при длине волны 232 нм.

Реактивы:

- 1) концентрированная HCl;
- 2) гептан;
- 3) изопропанол.

Объект исследования. Сыворотка крови.

Ход работы. В пробирке смешивают 4,5 мл гептана и 4,5 мл изопропанола. В две высокие пробирки отмеряют по 4 мл смеси (гептан : изопропанол = 1:1). В 1-ю пробирку вносят 0,2 мл сыворотки крови (опыт), во 2-ю – 0,2 мл H₂O (контроль), встряхивают обе пробы 10–15 мин на лабораторном встряхивателе. Экстракцию липидов проводят в высоких пробирках (18–20 см) во избежание потери гептановой фазы, что может привести к завышению результатов.

Для расслоения смеси в пробирки добавляют по 0,4 мл концентрированной HCl. Для устранения мутности, возникающей из-за преципитации белка, пробы центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования проб и расслоения фаз осторожно отбирают верхний гептановый слой в чистые пробирки. Измеряют оптическую плотность проб на спектрофотометре при длине волны 232 нм (ультрафиолетовый диапазон), интенсивность поглощения опытной пробы оценивают против соответствующей контрольной пробы.

Расчёт. Результат анализа представляют в относительных единицах оптической плотности с пересчётом на 1 мл сыворотки крови.

Расчёт концентрации (C) производят по формуле:

$$C = \frac{D_{232} \cdot V_{\text{Э}}}{V_{\text{С}}}, \quad \text{где}$$

$V_{\text{Э}}$ – конечный объём гептан-изопропанолового экстракта (4,0 мл);

$V_{\text{С}}$ – объём сыворотки крови (0,2 мл);

D_{233} – оптическая плотность гептан-изопропанолового экстракта, измеренная при длине волны 232 нм.

Расчёты можно провести с учётом коэффициента молярной экстинкции сопряжённых диенов при 232 нм ($2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и представить их концентрацию в микромолях.

ЗАНЯТИЕ 1.3.3

Механизмы окислительной модификации белка

Вопросы к занятию

1. Понятие о редокс-чувствительных аминокислотах. Роль различных АФК в окислительной модификации аминокислот.
2. Окисление редокс-чувствительных остатков аминокислот в составе белков, механизмы и продукты окисления.
3. Обратимые и необратимые модификации аминокислотных остатков в белках. Биологическое значение.

4. Использование обратимых реакций окисления SH-групп белков в редокс-регуляции и защите от повреждения.
5. Механизмы окислительной модификации полипептидной цепи белков. Альфа-амидный и диамидный пути окисления, продукты окисления.
6. Карбонилирование, образование сшивок, конъюгатов и другие процессы окисления белков.
7. Сходство и различия механизмов окислительной модификации белков и липидов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1
**ОБНАРУЖЕНИЕ МЕТАБОЛИТА ГИСТИДИНА
С ПОМОЩЬЮ СОЛЕЙ КОБАЛЬТА**

Принцип метода. Метаболит гистидина – гистамин, получаемый при декарбоксилировании аминокислоты, реагирует с солями кобальта с образованием окрашенных комплексных солей.

Реактивы:

- 1) раствор гистамина;
- 2) 1 % раствор кобальта нитрата или кобальта хлорида;
- 3) 5 % раствор NaOH.

Объект исследования. Раствор гистамина (10–20 мг в 1 мл воды).

Ход работы. К 1,0 мл раствора гистамина добавляют 2–3 капли раствора кобальта нитрата (или кобальта хлорида) и 1 каплю раствора NaOH.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2
ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ МЕТАБОЛИТА ТИРОЗИНА В МОЧЕ

Принцип метода. Одним из продуктов окислительного катаболизма аминокислоты тирозина является гомогентизиновая кислота, выделяемая с мочой. Оценка содержания гомогентизиновой кислоты основана на её восстановительных свойствах: по структуре эта кислота – дигидрохинон, образующий при окислении фосфорно-молибденовым реактивом продукт зелёного цвета.

Реактивы:

- 1) 0,5 М раствор KH_2PO_4 ;
- 2) 5,0 % раствор молибдата аммония на 5 N H_2SO_4 .

Объект исследования. Моча

Ход работы. Готовят 2 пробы. Опытная проба: к 1,0 мл мочи добавляют 1,0 мл раствора KH_2PO_4 , перемешивают, добавляют 1,0 мл раствора молибдата аммония, перемешивают и оставляют на 20 минут для развития окраски. Контрольная проба: вместо мочи берут 1,0 мл H_2O и обрабатывают аналогично опытной пробе. Измеряют оптическую плот-

ность опытной пробы против контроля при длине волны 670 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Расчёт. Содержание гомогентизиновой кислоты рассчитывают по формуле:

$$C \text{ (мкг/мл в пробе)} = 41,8 \cdot \Delta D, \quad \text{где}$$

ΔD – экстинкция пробы;

41,8 – коэффициент пересчёта.

Норма содержания гомогентизиновой кислоты в моче – до 28 мкг/мл.

Клинико-диагностическое значение. Повышение концентрации гомогентизиновой кислоты в моче наблюдается при наследственных нарушениях метаболизма тирозина (например, алкаптонурия при отсутствии оксидазы гомогентизиновой кислоты), а также при ряде патологических состояний (коллагенозы, ревматизм, тонзиллит и др.).

ЗАНЯТИЕ 1.3.4

Свойства и значение продуктов окислительной модификации макромолекул

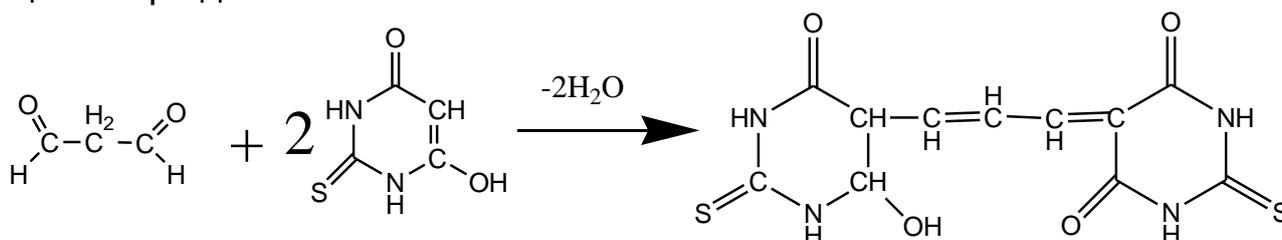
Вопросы к занятию

1. Продукты окислительной модификации макромолекул, разнообразие и реакционность.
2. Промежуточные свободно-радикальные продукты, первичные, вторичные и конечные метаболиты перекисного окисления липидов.
3. Гидроперекиси как первичные продукты перекисного окисления липидов, направления их метаболизма.
4. Конъюгированные диены и триеновые конъюгаты, получение и роль.
5. Малоновый диальдегид: источники (липиды, ДНК), образование, количественные взаимосвязи с липидной пероксидацией.
6. Конечные метаболиты пероксидации липидов. Шиффовы основания.
7. Продукты окислительного повреждения нуклеиновых кислот.
8. «Кластогенные факторы», свойства, роль $O_2^{\cdot-}$ в получении, выделение клетками. 4'-гидроксиноненаль как продукт окисления арахидоновой и линоленовой кислот.
9. Продукты окислительной модификации белков. Возможности их репарации и способы удаления нерепарируемых повреждений.
10. Стабильные метаболиты окислительной модификации белков.
11. Реакционность и токсичность продуктов окислительной модификации макромолекул, роль в индукции патологических процессов.
12. Пути нейтрализации и утилизации продуктов окислительной модификации макромолекул.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1
**ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ,
РЕАГИРУЮЩИХ С ТИОБАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТОЙ**

Индукция ПОЛ в клеточных мембранах и липопротеинах крови приводит к накоплению в организме различных дериватов полиненасыщенных жирных кислот. Активность ПОЛ оценивают по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), их основную массу составляет малоновый диальдегид (МДА). Однако возможна частичная реакция ТБК с другими альдегидами, аминокислотами и веществами, содержащими SH- и NH₂-группы, поэтому в итоге говорят об изменении концентрации не малонового диальдегида, а ТБК-реактивных продуктов или МДА-подобных соединений.

Принцип метода. В основе метода лежит реакция малонового диальдегида и МДА-подобных соединений с тиобарбитуровой кислотой, которая протекает при высокой температуре и кислом значении pH с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего 1 молекулу МДА и 2 молекулы ТБК. Комплекс имеет максимум светопоглощения при длине волны 532 нм.



Объект исследования. Сыворотка/плазма крови.

а) метод с использованием трис-буфера

Реактивы:

- 1) навеска для приготовления 0,75 % раствора ТБК (ex tempore! навеску растворяют в дистиллированной воде при нагревании на водяной бане);
- 2) трис-HCl буфер (pH 7,2);
- 3) 10 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Ход работы. Берут центрифужные пробирки. В опытную пробу вносят 0,5 мл сыворотки крови, в контрольную – 0,5 мл дистиллированной воды. В каждую пробу добавляют по 1,5 мл трис-HCl буфера, 1,0 мл 10 % раствора ТХУ и 1,0 мл 0,75 % свежеприготовленного раствора ТБК, кипятят 15 минут на водяной бане (пробы приобретают розоватую окраску), охлаждают и центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин для осаждения белка. Измеряют оптическую плотность опытной пробы против контроля в кювете 1,0 см при длине волны 532 нм.

Расчёт. Содержание ТБК-реагирующих продуктов ПОЛ рассчитывают по формуле, учитывающей коэффициент молярной экстинкции:

$$C = \frac{E}{1,56 \times 10^5 \times V}, \quad \text{где}$$

C – концентрация МДА (основной ТБК-реагирующий продукт ПОЛ), мкмоль/л,
 E – экстинкция опытной пробы,
 V – объем вносимой плазмы крови, в литрах,
 $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – молярный коэффициент экстинкции триметинового комплекса.

б) метод с использованием перманганата калия и бутанола

Реактивы:

- 1) навеска реактива для 0,7 % раствора ТБК (ex tempore: навеску растворяют в дистиллированной воде, нагревая на водяной бане);
- 2) фосфатный буфер (рН 7,4);
- 3) 20 % раствор ТХУ;
- 4) 1 ммоль/л раствор KMnO_4 ;
- 5) 1 моль/л раствор HCl ;
- 6) 1 ммоль/л раствор сульфата железа;
- 7) бутанол.

Ход работы. В центрифужную пробирку к 3 мл фосфатного буфера (рН 7,4) добавляют 0,2 мл сыворотки крови, 0,5 мл 1 ммоль/л раствора KMnO_4 , перемешивают и инкубируют 10 минут при комнатной температуре. Добавляют 0,5 мл 1 ммоль/л раствора FeSO_4 , 1 мл 20 % раствора трихлоруксусной кислоты и центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин. К 2 мл супернатанта добавляют 0,5 мл 1 моль/л раствора HCl и 1 мл 0,7 % раствора ТБК. Смесь выдерживают 20 минут на кипящей водяной бане, быстро охлаждают, добавляют 3 мл бутанола, перемешивают, центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин. Экстинкцию раствора оценивают фотометрически в кювете 1,0 см при длине волны 532 нм.

Расчёт проводят по формуле, учитывающей коэффициент молярной экстинкции, концентрацию (C) выражают в мкмоль/мл сыворотки:

$$C = \frac{\mathcal{E} \cdot 52,88}{0,2}, \quad \text{где}$$

\mathcal{E} – экстинкция раствора;
 52,88 – коэффициент пересчета;
 0,2 – объем сыворотки крови в пробе, мл.

Клинико-диагностическое значение. Увеличение концентрации малонового диальдегида свидетельствует об интенсификации процессов ПОЛ, что сопряжено с возникновением широкого ряда патологических состояний и заболеваний (лучевая, ожоговая и язвенная болезни, канцерогенез, катаракта, атеросклероз, ишемия/реперфузия, воспалительные, нейродегенеративные и др. процессы) и формирования возрастных старческих изменений в организме.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИТИРОЗИНА И ОКИСЛЕННОГО ТРИПТОФАНА
В ПЛАЗМЕ КРОВИ (ТЕОРЕТИЧЕСКИ)**

Принцип метода. При окислении фенилаланина в белке образуются орто-, мета-, пара-тирозины. Их 1-электронное окисление генерирует долгоживущий тирозин-радикал, который в реакции с таким же радикалом образует стабильный к влиянию протеаз битирозин, имеющий характерную голубую флюоресценцию. Окисление остатков триптофана сопровождается снижением присущей триптофану флюоресценции. Битирозин и окисленный триптофан – стабильные маркеры окислительной деградации белка, в нативных молекулах отсутствуют.

Реактивы:

- 1) 0,07 моль/л фосфатный буфер (pH=7,4);
- 2) раствор CuSO_4 (до конечной концентрации 1,0 ммоль/л).

Объект исследования. Плазма крови.

Ход работы. Работают в стерильных условиях. Опыт: к 0,1 мл плазмы крови добавляют 4,8 мл 0,07 моль/л фосфатного буфера, для индукции металл-катализируемой окислительной модификации белка добавляют 0,1 мл раствора CuSO_4 до конечной концентрации 1,0 ммоль/л. Контроль: к 0,1 мл плазмы крови добавляют 4,9 мл 0,07 моль/л фосфатного буфера. Обе пробы ставят в инкубатор на 20 часов при 37 °С. На спектрофлюориметре регистрируют: 1) флюоресценцию образованного битирозина при длине волны возбуждения 325 нм и длине волны испускания 415 нм, 2) флюоресценцию триптофана при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны испускания 325 нм.

Расчёт. В обоих случаях находят разницу показателей флюоресценции опыта и контроля. Результаты снижения флюоресценции триптофана и флюоресценцию битирозина приводят в условных единицах флюоресценции, стандартизуя их на 1 мг белка. Содержание белка в плазме крови определяют биуретовым методом.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите один правильный ответ.

1. К ОСНОВНЫМ СУБСТРАТАМ ПРОЦЕССА ПОЛ ОТНОСЯТ

- 1) полипептиды
- 2) полинуклеотиды
- 3) полиеновые жирные кислоты
- 4) полисахариды
- 5) насыщенные жирные кислоты

2. УЧАСТИЕ В ПРОЦЕССАХ ПОЛ НЕ ХАРАКТЕРНО ДЛЯ

- 1) клеточных мембран
- 2) свободных радикалов
- 3) глицерофосфолипидов
- 4) триацилглицеролов
- 5) сфингофосфолипидов

3. У ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ ЛИПИДОВ ОТСУТСТВУЕТ СПОСОБНОСТЬ

- 1) повышать текучесть мембраны
- 2) увеличивать выход растворенных в цитозоле веществ
- 3) нарушать функции мембранных белков
- 4) стабилизировать мембранные фосфолипиды
- 5) при разложении инициировать новые цепи перекисного окисления

4. К МЕМБРАННЫМ ЛИПИДАМ – СУБСТРАТАМ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ НЕЛЬЗЯ ОТНЕСТИ

- 1) глицерофосфолипиды
- 2) сфингофосфолипиды
- 3) ганглиозиды
- 4) гликолипиды
- 5) эфиры холестерина

5. ОСНОВНЫМ ПРОДУКТОМ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) ацетил-КоА
- 2) ацетальдегид
- 3) малоновый диальдегид
- 4) малонил-КоА
- 5) молочная кислота

6. К РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ АМИНОКИСЛОТАМ ОТНОСЯТ

- 1) аланин
- 2) лейцин
- 3) изолейцин
- 4) фенилаланин
- 5) глицин

7. СТАБИЛЬНЫМ МАРКЕРОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ БЕЛКОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) окисленный триптофан
- 2) цистин
- 3) 4'-гидроксиноненаль
- 4) малоновый диальдегид
- 5) альдегидный лизин

8. ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

- 1) бета-амидного механизма
- 2) диамидного пути
- 3) перекрёстной конъюгации
- 4) моноамидного механизма
- 5) альфа-диамидного пути

9. ГИДРОКСИЛ-РАДИКАЛ (HO^\bullet) МОДИФИЦИРУЕТ В МОЛЕКУЛЕ ДНК

- 1) только пуриновые основания
- 2) тимин и аденин
- 3) только тимин
- 4) только пиримидиновые основания
- 5) все четыре азотистые основания

10. АКТИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ЗАВИСИТ ОТ

- 1) степени ненасыщенности жирных кислот в фосфолипидах мембраны
- 2) толщины бислоя фосфолипидов мембраны
- 3) асимметрии фосфолипидов в слоях мембраны
- 4) транспорта фосфолипидов в мембрану клетки липопротеинами крови
- 5) соотношения глицеро- и сфингофосфолипидов в мембране

ТЕМА 1.4 СИСТЕМА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

ЗАНЯТИЕ 1.4.1

Система антиоксидантной защиты клетки и организма. Неферментативные компоненты

Вопросы к занятию

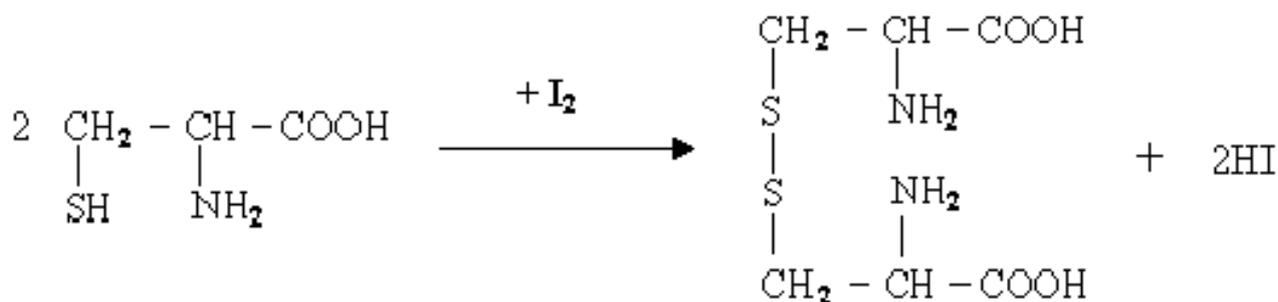
1. Система антиоксидантной защиты клетки и целого организма.
2. Антиоксиданты водной и липидной фазы.
3. Ферменты и неферментативные антиоксиданты.
4. Неферментативные антиоксиданты – первичная линия в защите от АФК. Классификации. Разнообразие компонентов. Роль цинка.
5. Витамины-антиоксиданты.
6. Восстановленный глутатион и цистеин. Тиолдисульфиды.
7. Поддержание редокс-состояния клетки.

Аэробный метаболизм клеток и тканей полноценно протекает лишь благодаря активному функционированию антиоксидантной системы. Это многоуровневая защита биомолекул от окислительного повреждения свободными радикалами и продуктами перекисидации липидов и белков. Она состоит из ферментов и неферментативных элементов. К ним относят неферментативные белки и комплекс низкомолекулярных соединений (глутатион и аскорбат, токоферол и бета-каротин, таурин и гипотаурин, полифенолы и мочевую кислоту и др.). Антиоксидантные свойства выявлены у эстрогенов и тиреоидных гормонов. Вышедшие из-под контроля антиоксидантной системы процессы свободнорадикального окисления (состояние окислительного стресса) могут стать причиной многих заболеваний и даже гибели организма.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ЦИСТЕИНА В КРОВИ**

В эритроцитах до 90 % небелковых тиоловых групп принадлежит глутатиону восстановленному. Соотношение GSH/GSSG определяет редокс-статус клетки.

Принцип метода. SH-группа в составе аминокислоты цистеина и трипептида глутатиона обладает восстановительными свойствами, под влиянием окислителей может превращаться в дисульфидную форму.



По количеству окислителя, затраченного в окислительно-восстановительной реакции, рассчитывают содержание тиоловых соединений в биологической жидкости.

Реактивы:

- 1) 10 % раствор трихлоруксусной кислоты;
- 2) 0,1 моль/л раствор HCl;
- 3) 1 % раствор крахмала;
- 4) 0,5 ммоль/л раствор I₂ для титрования.

Объект исследования. Цельная кровь, из которой лаборанты готовят ТХУ-фильтрат, осаждая белки 10 % трихлоруксусной кислотой.

Ход работы. В колбу для титрования вносят 0,5 мл ТХУ-фильтрата (соответствует 1 мл цельной крови), добавляют 2 мл 0,1 моль/л раствора HCl, 2 капли 1 % раствора крахмала, титруют 0,5 ммоль/л раствором йода до стойкого синего окрашивания, записывают пошедший на титрование объем раствора йода.

Расчёт производят по формуле, учитывая, что 1 моль йода окисляет 2 моля цистеина (1 мл 0,5 ммоль/л раствора I₂ используется на 0,001 ммоль цистеина):

$$X = \frac{A \cdot 0,001 \cdot 1000 \text{ мг}}{1 \text{ мл}}, \quad \text{где}$$

A – количество мл 0,5 ммоль/л раствора I₂, пошедшее на титрование;

0,001 и 1000 – коэффициенты пересчёта;

1 мл – количество взятой для исследования цельной крови.

Норма содержания тиоловых соединений (глутатиона и цистеина) в цельной крови составляет 0,9–1,5 ммоль/л.

Клинико-диагностическое значение. Определение проводят с целью оценки восстановительной емкости редокс-потенциала главных компонентов тиолдисульфидной системы (цистеина и глутатиона) в крови человека и выявления риска развития окислительного стресса при широком спектре заболеваний, объединяемых в «свободнорадикальные патологии».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2
**ОЦЕНКА УЧАСТИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ
В ВОССТАНОВЛЕНИИ МЕТИЛЕНОВОЙ СИНИ**

Принцип метода. Аскорбиновая кислота в присутствии метиленовой сини проявляет восстановительные свойства и окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты, а метиленовая синь восстанавливается в бесцветное соединение.

Реактивы:

- 1) раствор метиленовой сини;
- 2) раствор аскорбиновой кислоты.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 5 капель раствора метиленовой сини, в первую пробирку добавляют 5 капель раствора аскорбиновой кислоты, во вторую добавляют 5 капель дистиллированной H_2O . Нагревают обе пробирки на водяной бане, наблюдают в первой пробирке обесцвечивание раствора.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3
ОБНАРУЖЕНИЕ ТОКОФЕРОЛА В МАСЛЯНОМ РАСТВОРЕ

Принцип метода. Токоферол при действии концентрированной азотной кислоты теряет восстановительные свойства и окисляется в соединение хиноидной структуры красного цвета.

Реактивы:

- 1) масляный раствор витамина Е;
- 2) концентрированная HNO_3 .

Ход работы. В пробирку к 2 каплям масляного раствора витамина Е прибавляют 3 капли концентрированной азотной кислоты, пробирку помещают в кипящую водяную баню на 3 минуты. Отмечают появление красного кольца.

ЗАНЯТИЕ 1.4.2
Ферменты антиоксидантной защиты

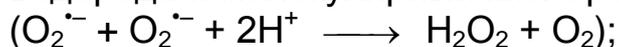
Вопросы к занятию

1. Ферменты-антиоксиданты, место в антиоксидантной системе клетки.
2. Ферментативные антиоксиданты в защите от прооксидантов и формирования окислительного стресса.
3. Система антирадикальной и антиперекисной ферментативной защиты.
4. Понятие о восстановительной метаболической энергии, способность клеток к синтезу НАДФ•Н, ферменты синтеза, назначение НАДФ•Н.
5. Редуктазы и трансферазы в антиоксидантной защите.
6. Ферменты тиолдисульфидной системы. Глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза и роль глутатиона.
7. Тиоредоксины, пероксиредоксины.

Ферменты – наиболее мощное звено антиоксидантной системы организма.

Супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1) – важный антирадикальный фермент:

1) на «первой линии защиты» катализирует превращение высоко реакционного супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) в относительно менее активную перекись водорода и молекулярный кислород

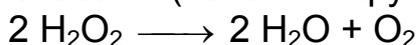


2) способствует снижению содержания высокотоксичного радикала $\cdot OH$. Семейство супероксиддисмутаз содержит ферменты, отличающиеся по металлу в активном центре, строению, локализации в клетках разных тканей. Эукариоты имеют цитозольную Cu,Zn-СОД и митохондриальную Mn-СОД, выявлена внеклеточная высокогликозилированная Cu-СОД.

Каталаза (1.11.1.6) – внутриклеточный гемопротейн всех тканей и жидкостей организма (особенно много в эритроцитах), один из наиболее филогенетически древних ферментов антиоксидантной системы. Обладает каталазной и пероксидазной активностью, относится к гидропероксидазам, использующим в качестве субстрата H_2O_2 и органические гидроперекиси ($ROOH$).

Функции каталазы:

1) Участвует в защите от эндогенного пероксида водорода, образуемого аэробными дегидрогеназами (основная функция):



2) Ограничивает синтез радикалов $\cdot OH$ за счет снижения уровня H_2O_2 .

3) Способствует переносу кислорода внутри клетки.

4) Участвует в окислительном метаболизме некоторых аминокислот.

5) Защищает от окисления гемоглобин, SH-группы в активных центрах ферментов и в функциональных белках и пептидах.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ**

Методы оценки активности каталазы основаны на способности фермента разлагать пероксид водорода на молекулярный кислород и воду, когда одна молекула H_2O_2 окисляется (служит донором электронов), а другая восстанавливается (является акцептором электронов). Образующийся O_2 выделяется в виде газа.

а) с использованием перманганата калия и вычислением каталазного числа

Принцип метода. Активность каталазы можно показать, используя каталазное число и показатель каталазы. Каталазное число – количество миллиграммов H_2O_2 , расщепляемое 1,0 микролитром крови за определенный промежуток времени. О количестве расщепленного пероксида водорода судят по разности количества перманганата калия,

пошедшего на титрование контрольной и опытной проб. Показатель каталазы – отношение каталазного числа к количеству миллионов эритроцитов в 1,0 мкл исследуемой крови.

Реактивы:

- 1) 1 % раствор H_2O_2 ;
- 2) 10 % раствор H_2SO_4 ;
- 3) 0,1 моль/л раствор $KMnO_4$.

Объект исследования. Гемолизат, получаемый разведением цельной крови дистиллированной водой в соотношении 1 : 1000. (Приготовление гемолизата: в мерную колбу на 100 мл наливают 10 мл воды и 0,1 мл крови микропипеткой, которую промывают несколько раз тем же раствором; наливают воду до метки и получают основной раствор крови (1 : 1000) для определения каталазного числа).

Ход работы. В две колбы для титрования (опыт и контроль) наливают по 7 мл воды, в каждую прибавляют по 1 мл основного раствора крови. В каждую колбу вносят точно по 2 мл 1 % раствора H_2O_2 . В контрольную колбу добавляют 3 мл 10 % раствора серной кислоты для расщепления каталазы. Обе колбы инкубируют при комнатной температуре 30 минут. Затем в опытную колбу наливают 3 мл 10 % раствора серной кислоты. Содержимое обеих колб титруют 0,1 моль/л раствором перманганата калия до появления розового окрашивания.

Расчёт. Вычисляют разницу между результатами опыта и контроля, умножают на 1,7 и получают каталазное число крови.

Пример расчёта: моль-эквивалент H_2O_2 равняется 17 г, значит, в 1 мл 0,1 ммоль/л раствора содержится 1,7 мг H_2O_2 . Умножив 1,7 на разницу между количеством миллилитров 0,1 моль/л раствора $KMnO_4$, пошедшего на титрование контрольной и опытной колб, получают количество миллиграммов H_2O_2 , расщеплённое 1,0 микролитром исследуемой крови (т. е. сразу получают каталазное число).

Нормы. Каталазное число составляет 10–15 единиц. В клинике чаще применяют показатель каталазы, который составляет $2-3 \cdot 10^{-6}$.

б) с использованием молибдата аммония

Принцип метода. Активность каталазы определяют по преобразованию субстрата (H_2O_2), образующего цветной комплекс с солями молибдата аммония.

Реактивы:

- 1) 0,03 % раствор H_2O_2 ;
- 2) 4 % раствор молибдата аммония.

Объект исследования. Сыворотка крови.

Ход работы. Обрабатывают три пробирки: с опытной, холостой и контрольной пробами. Опытная проба: к 2,0 мл 0,03 % раствора H_2O_2 добавляют 0,1 мл сыворотки. Холостая проба: вместо сыворотки берут 0,1 мл дистиллированной воды. Контрольная проба: вместо H_2O_2 берут

2,0 мл дистиллированной воды. Пробы инкубируют 10 минут при 37 °С, реакцию останавливают добавлением в каждую пробирку по 1,0 мл 4 % раствора молибдата аммония, центрифугируют в течение 10 мин при 4000 об/мин. Измеряют оптическую плотность надосадка, взятого из опытной и холостой проб, против контроля при длине волны 410 нм.

Расчёт активности каталазы в сыворотке крови производят по формуле:

$$A \text{ (мкат/л)} = \frac{E_{\text{ХОЛ}} - E_{\text{ОП}} \cdot 3,1}{T \cdot V \cdot 22,2 \cdot 10^3}, \quad \text{где}$$

$E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{хол}}$ – экстинкции опытной и холостой проб;

3,1 – общее разведение;

T – время инкубации (с);

V – объём вносимой пробы (л);

$22,2 \times 10^3$ – молярный коэффициент экстинкции, $\text{ммоль}^{-1} \text{см}^{-1}$.

Норма. Активность каталазы в сыворотке крови: $2,6 \pm 0,5$ мкат/л.

Клинико-диагностическое значение. Высокая активность каталазы наблюдается при пернициозной и макроцитарной анемии, наличии ацетоновых тел, а также поступлении в организм алкоголя, кофеина. Активность каталазы в крови снижается при раке, анемии, туберкулезе и других заболеваниях.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите один правильный ответ.

1. ГЛАВНЫМ НЕФЕРМЕНТАТИВНЫМ АНТИОКСИДАНТОМ КЛЕТКИ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) глутатион
 - 2) глутатиондисульфид
 - 3) тиоредоксин
 - 4) сульфоредаксин
 - 5) цистеин
2. ВИТАМИНОМ-АНТИОКСИДАНТОМ ЛИПИДНОЙ ФАЗЫ КЛЕТКИ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) токоферол
 - 2) тиамин
 - 3) тиоредоксин
 - 4) кальциферол
 - 5) пантотен
3. ДЛЯ ОПТИМАЛЬНОГО ПОДДЕРЖАНИЯ ФУНКЦИЙ ВИТАМИНА С НЕОБХОДИМА ЕГО СУТОЧНАЯ ДОЗА
 - 1) 1–3 мг

- 2) 10–20 мг
- 3) 2–3 мкг
- 4) 50–100 мг
- 5) 100–250 мкг

4. К ФЕНОЛЬНЫМ АНТИОКСИДАНТАМ ОТНОСИТСЯ СТЕРОИДНЫЙ ГОРМОН

- 1) кортизол
- 2) альдостерон
- 3) прогестерон
- 4) эстрадиол
- 5) тестостерон

5. УЧАСТИЕ ГЛУТАТИОНА В АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЕ ПРИВОДИТ К ОБРАЗОВАНИЮ

- 1) гипохлорита
- 2) глутатиондисульфида
- 3) цистина
- 4) пероксида водорода
- 5) монооксида азота

6. РЕАКЦИЮ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ КАТАЛИЗИРУЕТ ФЕРМЕНТ

- 1) моноаминоксидаза
- 2) лактопероксидаза
- 3) супероксиддисмутаза
- 4) каталаза
- 5) уратоксидаза

7. СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА ОТНОСИТСЯ К ФЕРМЕНТАМ

- 1) гидроксилазам
- 2) гидролазам
- 3) трансальдолазам
- 4) транскетолазам
- 5) оксидоредуктазам

8. КАТАЛАЗНЫМ ЧИСЛОМ КРОВИ НАЗЫВАЮТ

- 1) количество мг H_2O_2 , расщепляемое 1 мкл крови за определенный промежуток времени
- 2) соотношение количества мг H_2O_2 , расщепляемого 1 мкл плазмы крови, и количества эритроцитов в 1 мкл исследуемой крови
- 3) концентрация молекул каталазы (мг) в эритроцитах, содержащихся в 1 мкл исследуемой крови

9. В ОБРАЗОВАНИИ КоА-SH (АКТИВНОЙ ФОРМЫ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ) УЧАСТВУЕТ ТИОЛ

- 1) цистеин
- 2) метионин
- 3) тиоэтиламин
- 4) таурин
- 5) гомоцистеин

10. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ЭНЕРГИЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНУЮ СПОСОБНОСТЬ, ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ НАЛИЧИЕМ

- 1) НАД·Н
- 2) НАДФ·Н
- 3) ФАД·Н₂
- 4) ФМН·Н₂
- 5) дигидроаскорбата

ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ ПО РАЗДЕЛУ I

Вопросы к занятию

1. Кислород, основные направления участия кислорода в метаболизме.
2. Понятие «активные формы кислорода», причины появления и пути синтеза АФК.
3. Роль клеточных компартментов в образовании АФК.
4. Окислительные процессы в клетке и внеклеточном матриксе, роль антиоксидантов.
5. Пути и способы образования перекиси водорода в клетке.
6. Роль активных форм кислорода в метаболических процессах.
7. Образование АФК фагоцитами в реакциях респираторного взрыва.
8. Двойственная природа активных форм кислорода.
9. Ферменты оксидоредуктазы: характеристика класса и основных подклассов, коферменты.
10. Понятие «восстановительная способность». Реакции образования НАДФ·Н.
11. Направления использования НАДФ·Н в клетке.
12. Ксантиноксидоредуктаза: дегидрогеназная и оксидазная формы, катализируемые реакции. Роль мочевой кислоты. Подагра, значение аллопуринола.
13. Понятия «прооксидант» и «антиоксидант». Процессы, сопровождающиеся накоплением прооксидантов. Условия инверсии антиоксидантных свойств молекул в прооксидантные (на примере витамина С и аскорбат-зависимых процессов ПОЛ).
14. Редокс-состояние клетки и организма. Окислительный стресс и механизмы его формирования.
15. Основные мишени при окислительном повреждении нуклеиновых кислот, продукты окисления. Последствия окислительной модификации нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) для клетки.
16. Основные мишени и направления окислительной модификации белков. Роль в физиологии и патологии.
17. Понятие о редокс-чувствительных аминокислотах, основные механизмы окисления, разнообразие продуктов окисления. Битирозин и окисленный триптофан как маркеры окислительного повреждения белков.
18. Биологический смысл окисления гидрофобных участков аминокислот в процессе посттрансляционной модификации белков. Реакции синтеза и физиологическая роль гидроксипролина, гидроксизицина, аллизина.
19. Окисление цистеина в белках, обратимые и необратимые модификации, роль в редокс-регуляции. Дисульфиды, глутатионилирование белков.

20. Пути окисления полипептидной цепи белков. Расщепление окисленной полипептидной цепи по диамидному пути и α -амидному пути.
21. Образование карбонильных производных белков при гликозилировании, гликооксидации, в реакциях с продуктами ПОЛ.
22. Свободнорадикальный механизм, мишени перекисного окисления липидов.
23. Свободнорадикальные промежуточные продукты и первичные метаболиты ПОЛ. Получение гидроперекисей липидов и диеновых конъюгатов, направления их использования в организме.
24. Вторичные и конечные метаболиты ПОЛ. Синтез и назначение триеновых конъюгатов. Малоновый диальдегид, шиффовы основания.
25. Физиологическое значение индукции перекисного окисления липидов. Интенсивность и регуляция ПОЛ. Синтез биологически активных липидов из арахидоновой кислоты.
26. Утилизация O_2 в эндоплазматической сети, смысл гидроксилирования природных субстратов белковой и липидной природы. Окисление холестерина (желчные кислоты, стероидные гормоны, активные формы витамина D_3).
27. Характеристика и организация системы антиоксидантной защиты.
28. Ферменты и неферментативные антиоксиданты, их взаимосвязи.
29. Антиоксиданты водной и липидной фазы клетки и их взаимодействие.
30. Витамины-антиоксиданты, механизмы действия. Причины проявления прооксидантных эффектов.
31. Влияние витамина Е на биомембраны и жирорастворимые витамины.
32. Аскорбиновая кислота, влияние на синтез коллагена и гемопротейны.
33. Низкомолекулярные невитаминные компоненты и некаталитические белки антиоксидантной системы.
34. Ферменты антирадикальной и антиперекисной защиты клетки.
35. Глутатион, глутатион-зависимые ферменты (пероксидазы, редуктазы, трансферазы). Система оксиредукции глутатиона.
36. Тиолы и тиолдисульфидная система. Тиоредоксинасы и перокси-редоксинасы. Участие в антиоксидантной защите, поддержании редокс-состояния ядра и клетки в целом.

РАЗДЕЛ II

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ОРГАНИЗМЕ И ПОЛОСТИ РТА

ТЕМА 2.1

АФК И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ИНТЕРМЕДИАТЫ В ПАТОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ КЛЕТКИ

ЗАНЯТИЕ 2.1.1

АФК: патохимия, повреждение и гибель клетки

Вопросы к занятию

1. Роль АФК в химии патологических процессов клетки.
2. Свободнорадикальные интермедиаты в химии патологических процессов, направления участия.
3. Понятие об эустрессе и дистрессе при окислительном дисбалансе, степени воздействия окислительного стресса на клетку.
4. Общие представления об основных типах повреждения клетки: перекисном, токсическом, гипоксическом и апластическом.
5. Повреждения клетки, нейтрализация последствий и возможности репарации.
6. Разнообразие систем репарации, потенциал клетки для восстановления функциональных характеристик.
7. Механизмы гибели клетки: апоптоз, некроптоз, аутофагия. Общие представления об инициации процессов, основные причины активации, возможности предотвращения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

Супероксиддисмутаза проявляет антирадикальную активность, катализируя реакцию нейтрализации первичного супероксидного анионрадикала кислорода ($O_2^{\cdot-}$) с преобразованием его в пероксид водорода (H_2O_2), как более восстановленную форму АФК. Биохимические методы определения активности СОД основаны на способности фермента тормозить окисление субстратов.

а) метод с торможением автоокисления адреналина в адренохром

Принцип. Супероксиддисмутаза способна в щелочной среде тормозить реакцию автоокисления адреналина в адренохром с участием

O_2^- , сопровождающуюся увеличением оптической плотности при длине волны 480 нм.

Реактивы:

- 1) 0,05 моль/л Na-карбонатный буфер pH=10,2;
- 2) 0,05 моль/л раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) на 0,05 моль/л Na-карбонатном буфере с pH=10,2;
- 3) $1,8 \cdot 10^{-3}$ моль/л раствор адреналина с pH=2,5 (готовят ex tempore, подкисляя воду HCl).

Объект исследования. Сыворотка, плазма или гемолизат (разведение 1 : 100) крови, 10 % гомогенат печени в фосфатном буфере (pH=7,4).

Ход работы. Оценивают последовательно холостую и опытную пробы. Для измерения активности СОД в кювету спектрофотометра вносят компоненты реакционной смеси в следующем порядке. В опытную пробу: 3,0 мл 0,05 моль/л Na-карбонатного буфера, содержащего 0,05 моль/л раствор ЭДТА, и 0,1 мл плазмы крови, перемешивают, добавляют 0,5 мл $1,8 \cdot 10^{-3}$ моль/л водного раствора адреналина, одновременно быстро засекают время и производят первое измерение оптической плотности при длине волны 480 нм. Не вынимая кюветы из прибора, последующие измерения производят ровно через 1, 2 и 3 минуты. В холостую пробу вместо плазмы крови вносят 0,1 мл дистиллированной воды и обрабатывают аналогично опытной.

Расчёт. На основе зарегистрированных данных сначала рассчитывают скорость свободного неингибированного автоокисления адреналина в адренохром за 1 минуту (E_1 для холостой пробы). Затем – скорость автоокисления адреналина в присутствии СОД исследуемого материала за 1 минуту (E_2 для опытной пробы). Используя рассчитанные значения скоростей, определяют активность СОД в плазме крови по формуле:

$$A = \frac{E_2}{E_1}, \quad \text{где}$$

A – активность фермента в у.е./л (условные единицы активности),
 E_1 – скорость свободного неингибированного автоокисления адреналина в адренохром за 1 минуту,
 E_2 – скорость автоокисления адреналина за 1 минуту в присутствии СОД исследуемого материала.

**б) метод с ингибированием восстановления
нитротетразолия синего (ознакомительно)**

Принцип метода. Активность супероксиддисмутазы проявляется в виде способности к торможению восстановления нитротетразолия синего в присутствии кофермента НАДН.

Реактивы:

- 1) хлороформ-этанольная смесь (1 : 2);

- 2) порошок калия дигидрофосфата;
- 3) фосфатный буфер (pH=7,4);
- 4) 0,1 моль/л фосфатный буфер (pH=8,3);
- 5) раствор нитротетразолия синего (200 мкг/мл);
- 6) раствор феназинметасульфата (69 мкг/мл);
- 7) 0,2 моль/л раствор НАД·Н.

Объект исследования. Сыворотка или плазма крови, 10 % гомогенат печени в фосфатном буфере (pH=7,4).

Ход работы. В 2 центрифужные пробирки наливают 1 мл 10 % гомогената печени в фосфатном буфере (pH=7,4) или 1 мл плазмы крови. Добавляют по 0,5 мл смеси хлороформ-этанол и 300 мг порошка калия дигидрофосфата, перемешивают. Центрифугируют пробы в течение 15 минут при температуре 4 °С и 1200 об/мин для отделения осадка белка. Активность фермента определяют в супернатанте (надосадочной жидкости). Отбирают из каждой пробы по 0,2 мл супернатанта в чистые пробирки, дополнительно ставят контрольную пробу с 0,2 мл фосфатного буфера. Во все пробы добавляют по 1,3 мл 0,1 моль/л фосфатного буфера (pH=8,3), 1 мл раствора тетразолия синего, 0,3 мл раствора феназинметасульфата, 2 мл 0,2 моль/л раствора НАД·Н и инкубируют в темноте 10 минут. Фотометрируют опытные пробы против контрольной при длине волны 540 нм в кювете толщиной 10 мм.

Расчёт активности фермента (А) производят по формуле, учитывая процент ингибирования редукции нитротетразолия синего:

$$A = \frac{(E_k - E_o) \cdot 1/2}{E_k} \cdot 100\%, \quad \text{где}$$

E_k – экстинкция контрольной пробы;

E_o – экстинкция опытной пробы.

Активность СОД выражают в условных единицах активности. За одну условную единицу принимают количество СОД, способное ингибировать восстановление нитротетразолия синего на 50 %.

Клинико-диагностическое значение. Супероксиддисмутаза является антиоксидантом и уменьшает активность перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков. Антирадикальная активность и противовоспалительные свойства СОД рассматриваются как важный фактор неспецифической резистентности организма.

ЗАНЯТИЕ 2.1.2

Плазматическая мембрана, перекисное окисление липидов и перекисный тип повреждения клетки

Вопросы к занятию

1. Плазмолемма и пути индукции ПОЛ. Нарушение жирнокислотного состава, подвижности, асимметрии липидов при пероксидации мембран.

2. Плазматическая мембрана и перекисный тип повреждения клетки.
 3. Липид-белковые взаимодействия и аннулярные липиды плазматической мембраны. Формирование и свойства липидных «плотов».
 4. Разнообразие и структурно-функциональные особенности белков мембраны.
 5. Роль плазмолеммы в сигнальных процессах. Кальций-фосфолипидный механизм, аденилат- и гуанилат-циклазный механизмы передачи гормонального сигнала.
 6. Транспортные функции плазматической мембраны.
 7. Маркерные ферменты плазматической мембраны.
 8. Обновление плазмолеммы клетки и транспортные липопротеины.
 9. Активация фосфолипаз. Причины, значение в физиологии и патологии.
 10. Образование биологически активных липидов. Участие фосфолипаз и перекисного окисления липидов в механизмах синтеза эйкозаноидов.
 11. Продукция простагландинов, их разнообразие и роль в патологии.
- Мембраны – это высокоспециализированные надмолекулярные образования белково-липидной природы. Строгое согласование в пространстве и во времени огромного количества физико-химических, биохимических и физических процессов в ограниченном объёме клетки обеспечивается, в первую очередь, плазматической мембраной. Она объединяет клетку в единую систему, выступая барьером, отделяющим содержимое клетки от окружающей среды. Плазмолемма обеспечивает важнейшие процессы: транспорт веществ в клетку и из нее; осмотическое давление клетки; участие в рецепции; восприятие, классификацию различных веществ и определение скорости и направления их тока; генерацию и проведение потенциалов; восприятие энергии внешних воздействий и трансформацию в возбуждение; осуществление функциональных проявлений жизнедеятельности (секреция, реабсорбция и др.). Усиление процессов ПОЛ при окислительном стрессе нарушает структуру и функции плазматической мембраны клетки.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ГИДРОПЕРОКСИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
 В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ**

Принцип метода. Гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот в кислой среде окисляют ионы Fe^{+2} до Fe^{+3} , образующих с роданид-ионом комплекс красного цвета.

Реактивы:

- 1) 2 моль/л раствор HCl;
- 2) 0,5 % раствор соли Мора;
- 3) 0,1 моль/л раствор роданида аммония.

Объект исследования. Плазма/сыворотка крови, растительное масло, 0,2 % раствор смеси фосфолипидов.

Ход работы. В пробирки помещают по 0,5 мл биоматериала, добавляют в каждую по 0,5 мл 2 моль/л раствора HCl, 0,5 % раствора соли Мора и 0,1 моль/л раствора роданида аммония. В случае присутствия в пробе гидропероксидов полиеновых жирных кислот раствор окрашивается в красный цвет.

ЗАНЯТИЕ 2.1.3

Межклеточные контакты, гликокаликс и внеклеточный матрикс при окислительном стрессе

Вопросы к занятию

1. Взаимодействие клеток, разнообразие типов и форм взаимодействия.
2. Межклеточные контакты, виды и назначение.
3. Гликокаликс клетки: составные компоненты, функции, роль в рецепции и межклеточном сообщении.
4. Разнообразие молекул межклеточной сигнализации (цитокины и др.).
5. Нарушение адгезивности, рецепции и межклеточных взаимодействий при окислительном дисбалансе в мембранах клеток.
6. Действие АФК на внеклеточный матрикс.
7. Влияние продуктов окислительной модификации макромолекул на матрикс соединительной ткани.
8. Влияние дефицита витамина С и жирорастворимых витаминов на состояние внеклеточного матрикса.
9. Пути обновления компонентов межклеточного вещества.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1 **АНАЛИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ НА НАЛИЧИЕ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ А, Е, D**

Материал исследования. Рыбий жир, растительное масло, молоко, сухие плоды шиповника, сухие дрожжи.

Приготовление экстрактов из плодов шиповника и дрожжей. Плоды шиповника предварительно измельчают в ступке. Тщательно измельченный шиповник и сухие дрожжи помещают в 2 пробирки, добавляют в каждую по 1 мл бутанола и экстрагируют жирорастворимые витамины в течение 5 минут при встряхивании. В работе используют бутанольные экстракты.

а) наличие витамина А

Принцип метода. Концентрированная серная кислота способна отнимать воду от ретинола (витамина А) с последовательным образованием ряда окрашенных продуктов.

Реактивы:

- 1) концентрированная H_2SO_4 ;
- 2) бутанол.

Ход работы. В 4 пробирки вносят объекты исследования: 2 капли рыбьего жира, 2 капли растительного масла, 2 капли молока, 2 капли экстракта шиповника. В каждую пробу добавляют по 5 капель бутанола, оставляют на 1 минуту, периодически встряхивая. Добавляют 1–2 капли концентрированной серной кислоты. При наличии витамина А появляется синее окрашивание, переходящее сначала в фиолетовое, затем в красно-бурое.

Результаты.

Пищевые продукты	Наличие, интенсивность окрашивания	Вывод о наличии витамина в продукте
Рыбий жир		
Растительное масло		
Молоко		
Плоды шиповника		

б) наличие витамина Е

Принцип метода. При взаимодействии токоферола (витамина Е) с концентрированной азотной кислотой образуется соединение хиноидной структуры красного или желтовато-красного цвета.

Реактивы: концентрированная HNO_3 .

Ход работы. В 4 пробирки вносят по объекту исследования: 2 капли рыбьего жира, 2 капли растительного масла, 2 капли молока, 2 капли экстракта плодов шиповника. В каждую пробу добавляют 10 капель концентрированной HNO_3 , встряхивают и наблюдают появление красного окрашивания. Для ускорения реакции пробирки можно поместить в кипящую водяную баню на 3 минуты.

Результаты.

Пищевые продукты	Наличие, интенсивность окрашивания	Вывод о наличии витамина в продукте
Рыбий жир		
Растительное масло		
Молоко		
Плоды шиповника		

в) наличие витамина D

Принцип метода. При взаимодействии кальциферола с оксиметилфурфуролом, образующимся из сахарозы под действием концентрированной серной кислоты, появляется продукт красно-фиолетового цвета.

Реактивы:

- 1) концентрированная H_2SO_4 ;
- 2) бутанол;
- 3) 20 % раствор сахарозы.

Ход работы. В 4 пробирки вносят по одному из объектов исследования: 3 капли рыбьего жира, 3 капли растительного масла, 3 капли молока, 3 капли экстракта сухих дрожжей. В каждую добавляют по 5 капель бутанола и оставляют на 1 минуту, периодически встряхивая. Добавляют по 3 капли 20 % раствора сахарозы и 3 капли концентрированной H_2SO_4 . При наличии витамина D появляется красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в чёрно-бурое.

Результаты.

Пищевые продукты	Наличие и интенсивность окрашивания	Вывод о наличии витамина в продукте
Рыбий жир		
Растительное масло		
Молоко		
Дрожжи		

Задание. Сравнить полученные результаты с табличными данными, сделать вывод о лучших пищевых источниках для каждого из жирорастворимых витаминов: А, Е и D.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2**ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

Принцип метода. Аскорбиновая кислота, содержащаяся в биологическом материале, восстанавливает кетогруппу в составе 2,6-дихлорфенолиндофенола (краски Тильманса синего цвета) до спиртовой группы с образованием окрашенной лейкоформы. За счёт этого при полном окислении аскорбата титруемый раствор в кислой среде приобретает розовый цвет. По количеству красителя, затраченному на титрование, находят количество витамина.

Реактивы:

- 1) 2 % раствор HCl ;
- 2) 0,001 моль/л раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Материал исследования. Свежий картофель, красные или оранжевые сухие плоды шиповника.

Ход работы. Готовят экстракт витамина С, для чего исследуемую навеску материала (5 г картофеля или 1 г плодов шиповника) помещают в ступку, измельчают ножницами и скальпелем, добавляют 5 мл 2 % раствора HCl и тщательно растирают пестиком, постепенно вливая

20 мл дистиллированной воды. Оставляют на 5 минут для экстракции и измеряют объём каждого экстракта (V_1).

Для исследования переносят часть экстракта (V_2) в колбу для титрования. В случае экстракта картофеля $V_2 = 10$ мл. Для экстракта плодов шиповника $V_2 = 1$ мл, который разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 5. Содержимое обеих колб титруют краской Тильманса до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 секунд. Регистрируют объём краски, затраченной на титрование.

Расчёт содержания аскорбата (C) производят по формуле, выражая результат в мг на 100 г продукта:

$$C = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B} \times \frac{V_1}{V_2} \times 100, \quad \text{где}$$

0,088 – количество витамина С (мг), соответствующее 1 мл 0,001 моль/л раствора краски Тильманса;

A – количество краски Тильманса, затраченной на титрование (мл);

B – количество продукта, взятого для анализа (г);

B – разведение экстракта шиповника (в 5 раз);

V_1 – общее количество экстракта (мл);

V_2 – объём экстракта, взятый для титрования (мл);

100 – пересчёт на 100 г продукта.

Результаты.

Пищевые продукты	Количество продукта, содержащее суточную дозу витамина С		Вывод о витаминной ценности пищевого продукта
	С учётом нормального содержания	С учётом найденных величин	
Свежий картофель			
Плоды шиповника			

Нормы. Содержание витамина С в картофеле – 20 мг/100 г, в плодах шиповника – 1500 мг/100 г.

Задание. Для каждого продукта рассчитать количество, необходимое для удовлетворения суточной потребности в витамине С. Сравнить полученные значения, указать лучший пищевой источник аскорбата.

Клинико-диагностическое значение. Качественные реакции используют для обнаружения витаминов в пищевых продуктах и лекарственных растениях, для установления подлинности (достоверности) витаминных лекарственных препаратов. На основе реакций на витамины разработаны методы количественной оценки витаминов в различных препаратах и биологических объектах.

ЗАНЯТИЕ 2.1.4

Пероксисомы и перекисные системы, роль при перекисном повреждении клетки

Вопросы к занятию

1. Пероксисомы: строение и биологическое значение.
2. Система ферментов и метаболические функции пероксисом. Прооксидантные и антиоксидантные эффекты.
3. Участие пероксисом в обмене липидов.
4. Значение пероксисом в продукции и нейтрализации АФК, защите клетки от перекисления.
5. Характеристика перекисных систем клетки. H_2O_2 и взаимосвязи компартментов клетки.
6. Плазматическая мембрана и перекисный тип повреждения клетки, вклад пероксисом в защиту от повреждения.
7. Общая пероксидазная активность и пероксидазы в клетках и плазме крови.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ**

Принцип метода. Определение общей пероксидазной активности плазмы или сыворотки крови проводится по методу, основанному на окислении гваякола в присутствии пероксида водорода с образованием соединения хиноидной природы, имеющего характерную желто-коричневую окраску.

Реактивы:

- 1) 0,1 моль/л фосфатный буфер;
- 2) 0,1 моль/л раствор гваякола;
- 3) 1 ммоль/л раствор H_2O_2 .

Объект исследования. Плазма/сыворотка крови.

Ход работы. К 1,0 мл 0,1 моль/л фосфатного буфера добавляют 1,0 мл 0,1 ммоль/л раствора гваякола и 1,0 мл 1 ммоль/л раствора пероксида водорода. Доводят эту смесь до 30 °С, затем в опытную пробу добавляют 0,2 мл ферментного раствора (плазма/сыворотка крови), а в контроль – 0,2 мл дистиллированной воды. Оптическую плотность измеряют при 470 нм на 1-ой и 11-ой минутах исследования.

Расчёт. Общую пероксидазную активность плазмы/сыворотки крови рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(\Delta E_{on} - \Delta E_k) \times 3,2 \times n}{10 \times 0,2}, \quad \text{где}$$

A – общая пероксидазная активность, выражаемая в ед/мин•мл,
 ΔE_{on} – экстинкция опытной пробы,

ΔE_k – экстинкция контрольной пробы,
n – разведение плазмы/сыворотки крови,
10 – время инкубации в мин,
3,2 – общий объем инкубационной смеси в мл,
0,2 – объем ферментного раствора в мл.

ЗАНЯТИЕ 2.1.5

Эндоплазматическая сеть, микросомальное окисление и АФК. Токсический тип повреждения клетки

Вопросы к занятию

1. Гладкий эндоплазматический ретикулум: строение и функции, роль в метаболизме эндогенных веществ и ксенобиотиков.
2. НАДФН-зависимые и НАДН-зависимые системы цитохромов P-450 и b5, взаимосвязи электрон-транспортных цепей клетки.
3. Этапы гидроксирования субстратов, ферменты гидроксирования. Продукция АФК при микросомальном окислении.
4. АФК и микросомальные ферменты в модификации эндогенных субстратов (холестерола, белков).
5. АФК и ферменты в механизмах метаболизма ксенобиотиков. Детоксикация и токсификация субстратов.
6. Понятие об индукции микросомальных ферментов. Лекарственные тесты (амидопириновый и др.) в оценке индукции цитохрома P-450.
7. Токсины табака и микросомальное окисление.
8. Метаболизм этанола, механизмы токсичности, роль эндогенного этанола.
9. Токсический тип повреждения клетки.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

АМИДОПИРИНОВЫЙ ТЕСТ В ОЦЕНКЕ ИНДУКЦИИ ЦИТОХРОМА P-450

Способность организма к превращению ксенобиотиков можно изучать на примере метаболизма амидопирина. В этом случае оцениваются способности организма к окислительному деалкилированию ксенобиотиков.

Принцип метода. Амидопирин в организме человека подвергается окислительному деметилированию с образованием 4-аминоантипирина (4-ААП) при участии цитохрома P-450. Определив в моче количество 4-ААП, можно вычислить часть амидопирина, превращающегося в метаболит.

Реактивы:

- 1) 2,5 % раствор NH_4OH ;
- 2) 0,02 % раствор фенола;
- 3) 1 % раствор гексациано(III)феррата калия (красной кровяной соли).

Объект исследования. Моча.

Ход работы. Берут две пробирки. В опытную вносят 1 мл мочи, 0,5 мл 2,5 % раствора аммоний гидроксида, 2 мл 0,02 % раствора фенола и 0,5 мл 1 % раствора гексациано(III)феррата калия. Контрольную пробу готовят так же, как опытную, но вместо раствора фенола прибавляют 2 мл дистиллированной воды. Опытные пробы фотометрируют против контроля в кювете с оптическим путем 1 см при зелёном свето-фильтре.

Расчёт количества 4-аминоантипирина проводят, исходя из того, что 0,5 мкмоль 4-ААП соответствует 0,7 единицам оптической плотности.

Пример расчёта. Больной принял 250 мг (1000 мкмоль) амидопирин и собрал за сутки 1350 мл мочи. На фотоколориметре установлена экстинкция исследуемой пробы, составившая 0,5 единиц.

1. Рассчитаем содержание 4-ААП в 1 мл мочи:

0,5 мкмоль 4-ААП – 0,70 единиц экстинкции

X мкмоль – 0,50 единиц экстинкции в пробе отсюда вычисляем

$X = 0,357$ мкмоль 4-ААП в 1 мл мочи.

2. Рассчитаем содержание 4-ААП в суточном диурезе:

$0,357 \cdot 1350 = 482$ мкмоль 4-ААП за сутки.

3. Рассчитаем, сколько амидопирин превратилось в 4-ААП:

1000 мкмоль – 100 %

482 мкмоль – X

Отсюда вычисляем X и получаем, что 48,2% поступившего в организм амидопирин превратилось в 4-ААП.

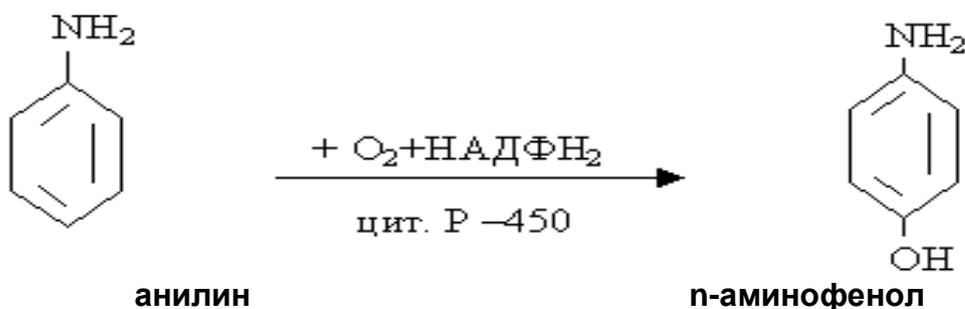
Нормы. Обычная тест-доза амидопирин составляет 250 мг (1000 мкмоль). У человека, принявшего такую дозу выделяется с мочой 15–30 % препарата в виде продукта метаболизма – 4-ААП.

Клинико-диагностическое значение. При нарушении функций печени количество амидопирин, превращающегося в 4-ААП, снижается, скорость этой реакции также замедляется. Если человек длительное время принимает лекарство или алкоголь, скорость деметилирования амидопирин может возрасть вследствие индукции ферментов.

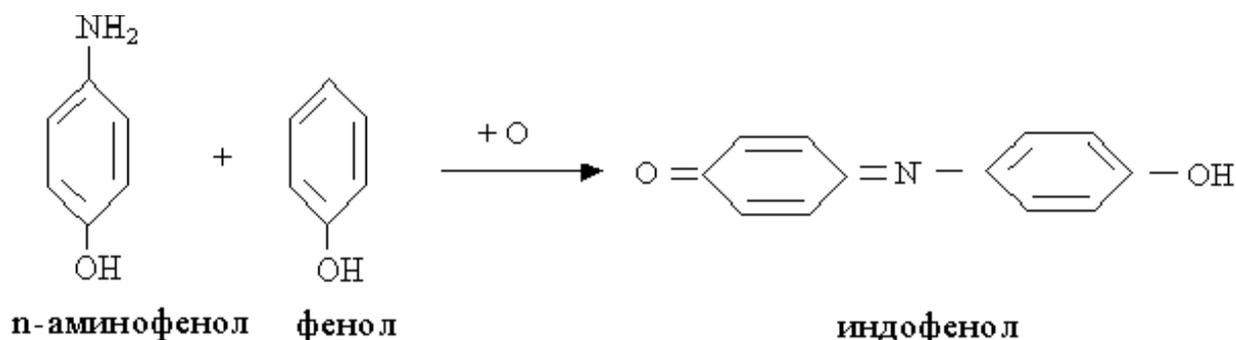
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ГИДРОКСИ-МЕТАБОЛИТОВ АНИЛИНА В МОЧЕ

Обнаружение чужеродных веществ (ксенобиотиков) и продуктов их обмена в крови, моче и других биологических жидкостях играет важную роль, так как свидетельствует не только о присутствии ксенобиотиков в организме, но и возможности их токсического действия. При попадании анилина в организм человека происходит его гидроксилирование в пара-аминофенол при участии цитохрома P-450.



Принцип метода. Работа основана на образовании окрашенного в синий цвет индофенола при взаимодействии пара-аминофенола с фенолом в присутствии окислителя.



Реактивы:

- 1) свежеприготовленный 2 % раствор фенола;
- 2) 10 % раствор карбоната натрия;
- 3) 1 % раствор гексациано (III)феррата калия (красной кровяной соли).

Объект исследования. Моча

Ход работы. Берут две пробирки, в опытную вносят 1 мл мочи, в контрольную – 1 мл дистиллированной воды. В обе пробирки последовательно добавляют: 0,5 мл 10 % раствора карбоната натрия, 1 мл свежего 2 % раствора фенола, 0,1 мл 1 % раствора калия гексациано(III)феррата. Обе пробы колориметрируют при длине волны 640 нм (красный светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 0,5 см.

Расчёт производят согласно пропорции:

0,1 мкмоль п-аминофенола – 0,29 единиц экстинкции,

X мкмоль п-аминофенола – величина экстинкции в опытной пробирке.

Рассчитав количество пара-аминофенола, выделяемое за сутки с мочой, можно определить, сколько анилина поступило в организм.

Клинико-диагностическое значение. Обнаружение пара-аминофенола в моче человека, работающего на химическом производстве, указывает на проникновение анилина в организм и недостаточность мер охраны труда на предприятии.

ЗАНЯТИЕ 2.1.6

Митохондрии, дыхательные ферменты и АФК. Гипоксический тип повреждения клетки

Вопросы к занятию

1. Митохондрии: строение и функции. Митохондриальный геном.
2. Особенности внутренней и наружной мембран митохондрии. Проницаемость. Транслоказы.
3. Дыхательные ферменты электрон-транспортной цепи митохондрий.
4. Редокс-потенциал и последовательность переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий.
5. Энергетические процессы биологического окисления, утилизация кислорода с образованием воды, синтез АТФ.
6. Неполное восстановление кислорода дыхательными ферментами, образование и роль активных форм кислорода, влияние на митохондриальный геном.
7. Моноаминоксидаза и цитохром с оксидаза мембран митохондрий.
8. Разобщение окисления и фосфорилирования. Разобщающие агенты.
9. Гипоксия и активация перекисного окисления. Общая и локальная гипоксия.
10. Митохондрии и гипоксический тип повреждения клетки.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

СРАВНЕНИЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА РИБОФЛАВИНА И МЕТИЛЕНОВОЙ СИНИ. ВЛИЯНИЕ H_2O_2 НА РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛ

Направление и последовательность переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий зависит от величины редокс-потенциала. Редокс-потенциал (РОП) – это электрический заряд, который возникает на платиновых электродах, опущенных в раствор окисленной и восстановленной формы одного и того же вещества. Вещества с бóльшим РОП окисляют вещества с меньшим РОП. Транспорт электронов и протонов происходит от веществ с более отрицательным потенциалом к веществам с более положительным потенциалом. Таким образом, порядок переноса электронов и протонов ферментными системами в дыхательной цепи не случайный. Он обусловлен величиной редокс-потенциала их коферментов.

Принцип метода. Восстановление метиленовой сини водородом, который получают при взаимодействии цинка с соляной кислотой, происходит раньше, чем восстановление рибофлавина. Это связано с тем, что редокс-потенциал у метиленовой сини ($E_0 = +0,11V$) больше, чем у рибофлавина ($E_0 = -0,02V$). При отсутствии водорода сначала окисляется восстановленный рибофлавин, затем – лейкоформа метиленовой сини. Наличие в системе H_2O_2 останавливает процесс.

Реактивы:

- 1) взвесь рибофлавина;
- 2) раствор метиленовой сини;
- 3) цинк металлический;
- 4) концентрированная HCl,
- 5) 3 % раствор H₂O₂.

Ход работы.

1 этап. Готовят 2 одинаковые пробирки. В каждую вносят по 4-6 капель дистиллированной воды, 2 капли взвеси рибофлавина и несколько капель раствора метиленовой сини до появления синего или сине-зелёного окрашивания. Затем вносят по кусочку цинка и капле концентрированной HCl, что приводит к выделению пузырьков водорода. По мере насыщения раствора водородом снижается РОП и последовательно восстанавливается сначала метиленовая синь, затем – рибофлавин. При этом цвет содержимого пробирок последовательно переходит из синего в зелёный, желто-зелёный, жёлтый и далее до полного обесцвечивания. Обычно при восстановлении рибофлавина жёлтый цвет меняется вначале на розовый за счёт образования промежуточного продукта восстановления – родофлавина, который при продолжении процесса обесцвечивается.

На последней стадии этапа в одну из исследуемых пробирок добавляют каплю 3 % раствора H₂O₂ и наблюдают резкую инверсию окраски.

2 этап работы иллюстрирует, что восстановление рибофлавина и метиленовой сини является обратимым процессом. Обесцвеченную жидкость из второй пробирки переливают в чистую пробирку и наблюдают постепенные переходы окраски в обратной последовательности – до возникновения сине-зелёной и синей. Это объясняется тем, что новые молекулы водорода в раствор больше не поступают, а имеющийся водород переносится последовательно через рибофлавин и метиленовую синь на кислород воздуха. В отсутствие притока водорода восстановленный рибофлавин окисляется, отдавая свой водород (H) через метиленовую синь на кислород (O), и окрашивается в жёлтый цвет (часть H₂ поступает на O₂, минуя индикатор). Следующей стадией является окисление лейкоформы красителя метиленовой сини, в ходе которого раствор в пробирке меняет окрашивание сначала на зелёное, затем на синее.

В отчёте фиксируют результаты каждой пробы, поясняя последовательные переходы окраски и смысловое значение воздействия H₂O₂ на редокс-потенциал исследуемой системы.

ЗАНЯТИЕ 2.1.7

Лизосомы и апластический тип повреждения клетки. Лизосомные болезни накопления

Вопросы к занятию

1. Лизосомы: структура, функции, гетерогенность органелл.
2. Разнообразие и специфичность лизосомных ферментов, причины активации. Маркерные ферменты лизосом.
3. Проницаемость мембраны лизосом и механизмы поддержания рН.
4. Роль лизосом в защите и адаптации, очищении клеток и обновлении организма.
5. Роль лизосом в развитии патологии (воспаление, гипоксия, некроз и др.). Вторичность участия лизосом в патологических процессах и деградации межклеточного матрикса.
6. Лизосомы и апластический тип повреждения клетки.
7. Генетические дефекты ферментов, представление о лизосомальных болезнях накопления. Первичная роль лизосом.
8. Основные типы болезней накопления, ассоциированных с лизосомами. Моноферментная и множественная ферментная недостаточность.

Темы сообщений

1. Ферменты лизосом.
2. Гликопротеинозы.
3. Гликолипидозы.
4. Гликозидозы.
5. Мукополисахаридозы.

ЗАНЯТИЕ 2.1.8

АФК, свободнорадикальные интермедиаты и гибель клетки

Вопросы к занятию

1. АФК и свободнорадикальные молекулы в механизмах гибели клетки.
2. Внутриклеточные и внеклеточные сигналы запуска апоптоза. Индукторы апоптоза. Окислительный стресс и апоптоз.
3. Характеристика апоптоза. Каспазы в механизмах апоптоза.
4. Ингибиторы апоптоза. Роль теломеразы при апоптозе.
5. Виды апоптоза при повреждении хромосом, митохондрий, клеточной мембраны. Общие черты и различия, митохондриальный и Fas-опосредуемый апоптоз.
6. Биологическое значение апоптоза. Роль в эмбриогенезе, регуляции клеточных популяций. Селекция тимоцитов, Т- и В-лимфоцитов, нейтрофилов, мегакариоцитов. Защита от вирусов.

7. Апоптоз в развитии заболеваний, ускользание от апоптоза при патологии. Заболевания, связанные с нарушением (активацией и угнетением) апоптотической программы клетки.
8. Гибель клетки по пути некроза, причины и этапы гибели, влияние на соседние клетки.
9. Аутофагия – путь самоликвидации клетки, причины и механизмы развития.
10. Особенности аутофагии при голодании.
11. Апоптоз, некроз, аутофагия – сравнительная характеристика.

Темы докладов

1. Апоптоз. Нобелевская премия 2002 года по медицине и физиологии «за открытия, посвящённые генетической регуляции развития органов и программированной клеточной смерти».
2. Аутофагия. Нобелевская премия 2016 года по медицине и физиологии «за открытие механизмов аутофагии».
3. Гибель клетки по пути некроза.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите один правильный ответ.

1. ПЕРЕКИСНЫЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ ОБУСЛОВЛЕН НАКОПЛЕНИЕМ
 - 1) продуктов β -окисления
 - 2) антиоксидантов
 - 3) жирных кислот
 - 4) продуктов протеолиза
 - 5) перекисей липидов
2. МАРКЕРНЫМ ФЕРМЕНТОМ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) аденилатциклаза
 - 2) цитохром-с-оксидаза
 - 3) сукцинатдегидрогеназа
 - 4) моноаминооксидаза
 - 5) малатдегидрогеназа
3. ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОМ ТИПЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ОТСУТСТВУЕТ
 - 1) активация процессов биосинтеза
 - 2) нарушение функций митохондрий
 - 3) угнетение транспорта электронов
 - 4) угнетение транспорта протонов
 - 5) снижение энергопродукции

4. К ФУНКЦИЯМ ПЕРОКСИСОМ НЕЛЬЗЯ ОТНЕСТИ

- 1) окисление этанола до ацетальдегида
- 2) образование и распад пероксида водорода
- 3) окисление ксенобиотиков
- 4) окисление уратов
- 5) окисление жирных кислот

5. ДОНОРОМ ЭЛЕКТРОНОВ В СИСТЕМЕ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) ФАД·Н₂
- 2) НАД·Н
- 3) НАДФ
- 4) цитохром *b*
- 5) цитохром *a*

6. ПРИ ГИДРОКСИЛИРОВАНИИ СУБСТРАТОВ АКЦЕПТОРОМ ЭЛЕКТРОНОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) цитохром *c*
- 2) цитохром Р-450
- 3) НАД·Н
- 4) НАДФ·Н
- 5) ФАД·Н₂

7. ТОКСИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ СОПРЯЖЕН С НАРУШЕНИЕМ

- 1) перекисного окисления липидов
- 2) аэробного гликолиза
- 3) окислительного фосфорилирования
- 4) митохондриального окисления
- 5) окислительной модификации белков

8. ПРИ НЕВОЗМОЖНОСТИ ИЗБАВИТЬСЯ ОТ НАКОПЛЕННОГО ИЗБИТКА АФК КЛЕТКИ УНИЧТОЖАЮТСЯ ПУТЁМ

- 1) апоптоза
- 2) цитолиза
- 3) аутофагии
- 4) некроптоза
- 5) фагоцитоза

9. В ПРОЦЕССЕ АПОПТОЗА КЛЕТКА ПРЕТЕРПЕВАЕТ

- 1) воспаление
- 2) окисление
- 3) сморщивание
- 4) набухание
- 5) цитолиз

10. ДЛЯ МЕХАНИЗМОВ НЕКРОЗА ХАРАКТЕРЕН ПРОЦЕСС

- 1) упорядоченной фрагментации ДНК
- 2) пикноза ядра
- 3) конденсации цитоплазмы
- 4) перекрёстного сшивания мембранных белков
- 5) повреждения и разрыва мембран клетки

ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ ПО ТЕМЕ 2.1

Вопросы к занятию

1. Окислительный стресс: определение, механизмы возникновения.
2. Направления участия АФК и свободнорадикальных интермедиатов в патохимии биологических процессов клетки.
3. Сравнительная характеристика типов повреждения клетки (перекисный, токсический, гипоксический, апластический).
4. Митохондрии: энергетические процессы, разобщение окисления и фосфорилирования, неполное восстановление O_2 дыхательными ферментами, образование и роль АФК. Моноаминоксидаза и оксидаза цитохрома с мембран митохондрий.
5. Гипоксия и активация перекисного окисления липидов. Гипоксический тип повреждения клетки.
6. Причины активации и значение перекисного окисления липидов в патологии. Активация ПОЛ при повреждении клеточных мембран.
7. Гликокаликс и внеклеточный матрикс, нарушение адгезии, рецепции, межклеточных контактов и взаимодействий при окислительном дисбалансе в плазмалемме.
8. Влияние дефицита витамина С и жирорастворимых витаминов на внеклеточный матрикс.
9. Влияние АФК и продуктов окислительной модификации макромолекул на матрикс соединительной ткани.
10. Пероксисомы и АФК. Строение, ферменты и функции пероксисом, участие в метаболизме липидов и защите клетки.
11. Пути образования перекиси водорода в клетке. Характеристика перекисных систем клетки. Перекисный тип повреждения клетки.
12. Гладкая эндоплазматическая сеть: организация системы детоксикации, ферменты и АФК. Токсический тип повреждения клетки.
13. НАДФ·Н- и НАД·Н-зависимые системы микросомального окисления, цитохромы P450 и b5. Этапы гидроксилирования и синтез АФК.
14. Микросомальное окисление и гидроксилирование эндогенных субстратов: синтез желчных кислот и гормонов из холестерина, активация витамина D₃, посттрансляционная модификация белков.
15. Моноксигеназная система в метаболизме ксенобиотиков. Детоксикация и токсификация.
16. Утилизация токсинов табака в системе микросомального окисления. Токсические эффекты этанола, алкоголь и микросомальное окисление.
17. Лизосомы: структура, типы, функции, разнообразие ферментов, проницаемость мембраны, механизмы поддержания pH.
18. Роль лизосом в адаптации и защите клетки, значение в возникновении патологий. Апластический тип повреждения клетки.
19. Лизосомные болезни накопления.

20. АФК и гибель клетки. Сравнительная характеристика механизмов гибели клетки (апоптоз, некроз, аутофагия).
21. Роль АФК и свободнорадикальных интермедиатов в патохимии процессов некроза.
22. Роль АФК во внутриклеточных и внеклеточных сигналах апоптоза.
23. Виды и значение апоптоза. Апоптоз и лимфоциты. Апоптоз и факторы роста.
24. Индукторы апоптоза, механизмы запуска при повреждении хромосом, митохондрий, мембран клеток.
25. Ингибиторы апоптоза, роль теломеразы. Нарушения программы апоптоза при заболеваниях.
26. Аутофагия – путь самоликвидации клетки, причины и механизмы развития. Аутофагия при голодании.

ТЕМА 2.2 ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ЗАНЯТИЕ 2.2.1

**Свободно-радикальные патологии.
Лучевая болезнь. Тепловой и солнечный ожог. Воспаление.
Пневмония, бронхиальная астма**

Вопросы к занятию

1. Понятие «свободнорадикальные патологии».
2. Окислительный стресс как типовое звено патогенеза широкого спектра заболеваний.
3. Радиация и лучевая болезнь, тепловой и солнечный ожог. Сравнительная характеристика формирования окислительного стресса и свободнорадикальных повреждений.
4. Радиационные повреждения, радиационная нагрузка при курении.
5. Роль фагоцитов в развитии воспаления. Зависимые и независимые от кислорода пути антимикробной защиты.
6. Респираторный взрыв, механизмы образования АФК фагоцитами.
7. Острое и хроническое воспаление – свободнорадикальные патологии.
8. Легкие и кислород. Альвеолярно-капиллярная мембрана, сурфактант.
9. Окислительный стресс при пневмонии, хроническом обструктивном бронхите и бронхиальной астме.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Церулоплазмин (КФ 1.16.3.1) относят к белкам острой фазы воспаления. Он обладает ферментативной антирадикальной активностью и рядом других антиоксидантных и защитных свойств.

Принцип метода. Определение содержания церулоплазмина в плазме или сыворотке крови проводят по методу, основанному на окислении церулоплазмином диаминов. Окисленный диамин, соединяясь с пара-фенилендиамином, дает розовое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна активности церулоплазмина.

Реактивы:

- 1) 0,5 % раствор п-фенилендиамина (готовят *ex tempore*);
- 2) 3 % раствор фторида натрия;
- 3) 0,1 моль/л ацетатный буфер (рН=5,2).

Объект исследования. Плазма или сыворотка крови.

Ход работы. Готовят две пробы. В опытную пробу добавляют 1,0 мл 0,5 % раствора п-фенилендиамина и 0,1 мл сыворотки крови. После 30 минут инкубации при 37°C останавливают реакцию добавлением 5,0 мл 3 % раствора фторида натрия. Контрольная проба состоит из 1,0 мл 0,1 моль/л ацетатного буфера с рН=5,2 и 0,1 мл сыворотки крови, к которым до инкубации добавляют 5,0 мл 3 % раствора натрия фторида. Оптическую плотность опытной пробы измеряют при длине волны 525 нм против контрольной пробы в кювете с длиной оптического пути 1 см. **Расчёт** концентрации церулоплазмينا проводят по формуле:

$$C = \frac{E_{on} - E_k}{875}, \quad \text{где}$$

C – концентрация церулоплазмينا, мг/л,

E_{on} – экстинкция опытной пробы,

E_k – экстинкция контрольной пробы,

875 – коэффициент, учитывающий особенности реакции.

ЗАНЯТИЕ 2.2.2

Окислительный стресс в механизмах старения, дисметаболического синдрома, диабета, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и опухолевых заболеваний

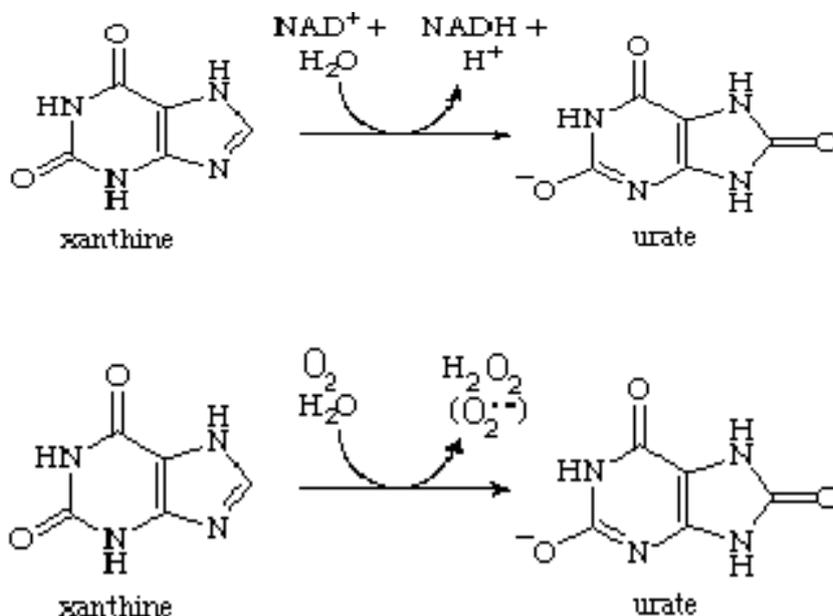
Вопросы к занятию

1. Свободные радикалы и старение.
2. Дисметаболический синдром. Ксантиноксидаза и мочевая кислота.
3. Сахарный диабет, роль окислительного стресса в формировании патологических изменений. Экспериментальная модель сахарного диабета (аллоксан и другие индукторы).
4. Сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз, ишемия и реперфузия, ишемия и инфаркт миокарда) – свободнорадикальные патологии.
5. Окислительный стресс при нейродегенеративных заболеваниях.
6. Окислительный стресс и опухолевый рост, мембранные онкобелки: α -фетопротеин, канцерозембриональный антиген и др.
7. Роль апоптоза в развитии заболеваний. Блокада апоптотической программы и значение ускользания клетки от апоптоза при опухолевых процессах, ген p53.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КСАНТИНОКСИДАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Ксантин : NAD⁺оксидоредуктаза. (КФ 1.17.1.4.) катализирует последовательное превращение ксантина в гипоксантин и мочевую кислоту. Фермент включается на конечном этапе пуринового обмена и входит в

систему детоксикации клетки. В проксидантных условиях происходит модификация фермента с переходом его в оксидазную форму (ксантин : кислород оксидоредуктаза, КФ 1.17.3.2.), когда он нарабатывает АФК наряду с мочевой кислотой.



Принцип метода. В основе определения активности ксантиноксидазы в сыворотке крови лежит реакция окисления ксантина до гипоксантина и далее до мочевой кислоты, протекающая с образованием оптически активного продукта, количество которого пропорционально активности фермента.

Реактивы:

- 1) 0,1 ммоль/л раствор ксантина;
- 2) 0,1 моль/л трис-буфер (pH=8,0),
- 3) 0,05 ммоль/л раствор аллопуринола на 0,1 М трис-буфере (pH=8,0).

Ход работы.

Приготовить пробы согласно таблице.

Реагенты, мл	Опытная проба	Проба сравнения
0,1 ммоль/л раствор ксантина (гипоксантина)	0,1	0,1
0,1 моль/л трис-буфер	1,9	1,8
Раствор аллопуринола на трис-буфере	—	0,1
Сыворотка крови	0,05	0,05

Сразу же измерить экстинкцию обеих проб в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 293 нм против трис-буфера. Обе пробы перелить обратно в те же пробирки и инкубировать в термостате или водяной бане при 37 °С ровно 30 минут, после чего немедленно повторить измерения.

Расчёт.

1) Активность фермента (А) в пересчёте на объём сыворотки крови:

$$A \text{ (нмоль/(мин·мл))} = (E_2 - E_1) \times 91, \quad \text{где}$$

E_2 – экстинкция пробы после термостатирования,

E_1 – первоначальная экстинкция пробы,

91 – расчётный коэффициент, учитывающий условия инкубации, объём пробы и молярный коэффициент экстинкции.

2) Активность ксантиноксидазы в пересчёте на белок:

$$A \text{ (нмоль/(мин·мг))} = (E_2 - E_1) \times 91 / n, \quad \text{где}$$

n – количество белка в пробе, мг/мл.

Значение. Особенность фермента ксантин-оксидоредуктазы заключается в том, что в качестве акцептора электронов его дегидрогеназная форма использует НАД^+ , а ксантин-оксидазная – молекулярный кислород, причём чем выше парциальное давление кислорода, тем больше образуется $\text{O}_2^{\cdot-}$. Продукт ксантин-оксидазной реакции реагирует с дисульфидными связями молекул ксантин-дегидрогеназы и превращает фермент в ксантин-оксидазу, приводя к образованию порочного круга окисления. Данное явление часто возникает при постишемическом поражении тканей. Генерация АФК ксантин-оксидазой необходима для метаболизма железа, регуляции тонуса сосудов. Гиперпродукция $\text{O}_2^{\cdot-}$ и ингибирование NO^{\cdot} (фактор релаксации сосудов) способствует гипертензии, агрегации тромбоцитов, адгезии лейкоцитов и миграции макрофагов в ткани при воспалении. Ксантин-оксидаза участвует в защите от вирусных инфекций (при гриппе её активность максимально усиливается в легких и может усугубить течение заболевания вплоть до развития пневмонии). При вирусных инфекциях α -интерферон индуцирует транскрипцию ксантин-дегидрогеназы с переходом её в оксидазную форму.

Задание. Сравните результаты, полученные при исследовании 2-х проб. Поясните механизм действия аллопуринола на молекулу фермента. Укажите, почему вместо ксантина в качестве субстрата реакции можно использовать гипоксантин, почему в качестве дополнительных продуктов реакции появляются активные формы кислорода, и как меняется энергетическая составляющая реакции. Покажите, за счёт каких особенностей структуры основной продукт реакции (мочевая кислота) может проявлять антиоксидантные свойства.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ**

а) ферментативный метод

Принцип метода. Фермент уриказы расщепляет молекулы мочевой кислоты до аллантаина с образованием пероксида водорода, который реагирует при участии пероксидазы с 4-аминоантипирином и дихлоргидроксибензолсульфонатом с образованием продуктов розово-малинового

цвета, имеющих максимум поглощения при длине волны 540 нм. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевого кислоты.

Реактивы:

1) рабочий реактив на калиево-фосфатном буфере, содержащий дихлоргидроксibenзолсульфонат, 4-аминоантипирин, фенол и ферменты – уриказу и пероксидазу;

2) 500 мкмоль/л стандартный раствор мочевого кислоты.

Объект исследования. Сыворотка крови, моча в разведении 1 : 5.

Ход работы. Готовят пробы согласно таблице

Реагенты, мл	Опыт 1	Опыт 2	Стандарт
Сыворотка крови	0,05	—	—
Моча (разведение 1:5)	—	0,05	—
Стандартный раствор мочевого кислоты	—	—	0,05
Рабочий реактив	2,0	2,0	2,0

Инкубируют 10 минут при 37 °С, измеряют оптическую плотность стандарта и опытных проб против дистиллированной воды при длине волны 540 нм

Расчёт. Содержание мочевого кислоты в сыворотке оценивают по формуле:

$$C \text{ (мкмоль/л)} = \frac{E_{on} \cdot C_{cm}}{E_{cm}},$$

содержание мочевого кислоты в моче оценивают по формуле:

$$C \text{ (ммоль/сут)} = \frac{E_{on} \cdot C_{cm} \cdot 5 \cdot D}{E_{cm} \cdot 1000}, \quad \text{где}$$

E_{on} – экстинкция опытной пробы,

E_{cm} – экстинкция стандартной пробы,

C_{cm} – концентрация мочевого кислоты в стандартной пробе, мкмоль/л,

5 – разведение мочи,

1000 – коэффициент пересчета мкмоль в ммоль,

D – суточный диурез (1300–1500 мл).

Нормальные величины содержания мочевого кислоты в сыворотке крови для женщин – 150–380 мкмоль/л, для мужчин – 210–460 мкмоль/л; в моче при обычной диете – 1,46–4,43 ммоль/сут.

б) титрометрический метод

Принцип метода. Мочевая кислота восстанавливает фосфорно-вольфрамовый реактив с получением фосфорно-вольфрамовой сини, интенсивность окраски которой пропорциональна содержанию мочевого кислоты. Концентрацию образовавшегося продукта определяют путём

титрования красной кровяной солью $K_3[Fe(CN)_6]$, окисляющей фосфорно-вольфрамовую синь в бесцветное соединение.

Реактивы:

- 1) 20 % раствор Na_2CO_3 ;
- 2) фосфорно-вольфрамовый реактив;
- 3) 3,992 моль/л раствор $K_3[Fe(CN)_6]$.

Объект исследования. 1) моча, 2) моча с добавлением мочевого кислоты.

Ход работы. В 1-ю колбу наливают 5 мл нормальной мочи, во 2-ю колбу – 5 мл мочи с добавлением мочевого кислоты. В обе колбы приливают по 2 мл фосфорно-вольфрамового реактива и 10 мл раствора Na_2CO_3 , перемешивают. Из бюретки медленно по каплям добавляют раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ до исчезновения синего оттенка и появления жёлтого окрашивания.

Расчёт. Содержание мочевого кислоты в моче рассчитывают по формуле:

$$C \text{ (ммоль/сут)} = \frac{C_{ст} \cdot A \cdot D}{B}, \quad \text{где}$$

$C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора мочевого кислоты, соответствует 1 мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, ($C_{ст} = 0,004$ ммоль/л),

A – количество раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, пошедшего на титрование (мл),

B – объём мочи, взятый для анализа (мл),

D – суточный диурез (1300–1500 мл).

Нормальные величины. Показатели содержания мочевого кислоты в моче зависят от особенностей питания: при обычной диете – 1,46–4,43 ммоль/сут, при мясной диете – 2,36–5,90 ммоль/сут.

Клинико-диагностическое значение

Сыворотка крови. Содержание уратов (комплексов моноватриевой соли мочевого кислоты и белка) в крови зависит от интенсивности синтеза и скорости выведения мочевого кислоты. Белки крови стабилизируют ураты, при снижении рН ураты кристаллизуются в тканях.

Гиперурикемия первичная (генетически обусловленная): метаболический тип – изменение активности ферментов обмена пуриновых нуклеотидов; почечный тип – снижение экскреции мочевого кислоты. **Вторичная** – усиление распада нуклеопротеинов (лейкозы, лечение цитостатиками, облучение, псориаз, пернициозная и гемолитическая анемия), но чаще – почечная недостаточность с нарушением фильтрации и канальцевой секреции мочевого кислоты, замедление выведения уратов (микседема, гестоз, гиперпаратиреоз, сахарный диабет). **Гипоурикемия** диагностически мало значит, иногда возникает при анемии, избытке кортикостероидов, приёме салицилатов.

Моча. Уровень мочевого кислоты в моче отражает распад пуриновых оснований, их поступление с пищей и выведение конечного продукта обмена. Выпадение солей в осадок зависит от кислотности мочи, а мо-

мочевая кислота придаёт кислую реакцию ($\text{pH} < 5$). *Повышение содержания* – непочечная гиперурикемия, обезвоживание, почечная недостаточность, приём салицилатов и солей лития. концентрацию мочевой кислоты в моче оценивают при подозрении на подагру, мочекаменную болезнь, опухоли, болезни крови, печени. *Снижение уровня* – алкоголизм, отравление солями тяжелых металлов, заболевания почек, иногда при подагре (в этом случае мочевая кислота откладывается в тканях, суставных сумках, хрящах, сухожилиях, и суточное количество в моче может снижаться).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите один правильный ответ.

1. В ЗДОРОВЫХ ИНТАКТНЫХ КЛЕТКАХ СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ

- 1) находятся постоянно
- 2) полностью отсутствуют
- 3) появляются при внутриклеточной стимуляции
- 4) появляются при внешних воздействиях
- 5) появляются при трансмембранном переносе от транспортных белков

2. СПОСОБНОСТЬ ЗАЩИЩАТЬ КЛЕТКИ ОТ СТАРЕНИЯ ОТСУТСТВУЕТ У

- 1) анзерина
- 2) карнозина
- 3) токоферола
- 4) аскорбата
- 5) гликокола

3. АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИГЛИКИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ПРОЯВЛЯЕТ

- 1) аскорбат
- 2) аскорутин
- 3) карнозин
- 4) токоферол
- 5) цистеин

4. БЫСТРОМУ РАЗВИТИЮ АТЕРОСКЛЕРОЗА СПОСОБСТВУЕТ АКТИВАЦИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПОПРОТЕИНОВ

- 1) высокой плотности
- 2) низкой плотности
- 3) очень низкой плотности
- 4) промежуточной плотности
- 5) хиломикронов

5. ОБНАРУЖЕНИЕ СВОБОДНОГО ГИДРОКСИПРОЛИНА В КРОВИ ЯВЛЯЕТСЯ СЛЕДСТВИЕМ

- 1) распада костной ткани
- 2) повреждения скелетной мускулатуры
- 3) снижения фильтрации аминокислот в почках
- 4) активации доставки аминокислот для синтезов
- 5) снижения поступления аминокислот в клетки

6. АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ ОБЛАДАЕТ МЕТАБОЛИТ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

- 1) мочевины
- 2) мочевая кислота
- 3) креатин
- 4) креатинин
- 5) нитрат аммония

7. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В МИОКАРДЕ ПОСЛЕ ТРОМБОЛИЗИСА И РЕОКСИГЕНАЦИИ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

- 1) усугубляется
- 2) не изменяется
- 3) снижается

8. ПРИ ВОСПАЛЕНИИ АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРОЯВЛЯЕТ ЗАЩИТНЫЙ БЕЛОК

- 1) гаптоглобин
- 2) гамма-глобулин
- 3) церулоплазмин
- 4) альбумин
- 5) фибриноген

9. ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ РЕАКТАНТОМ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) α_2 -макроглобулин
- 2) церулоплазмин
- 3) антитрипсин
- 4) α_1 -антихимотрипсин
- 5) альбумин

10. К ЗАБОЛЕВАНИЯМ, РАЗВИВАЮЩИМСЯ НА ФОНЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА, НЕЛЬЗЯ ОТНЕСТИ

- 1) атеросклероз
- 2) ИБС
- 3) пародонтит
- 4) болезнь Тея–Сакса
- 5) болезнь Паркинсона

ТЕМА 2.3 ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В МЕХАНИЗМАХ ФОРМИРОВАНИЯ ПАТОЛОГИИ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА

ЗАНЯТИЕ 2.3.1

Влияние прооксидантов и окислительного дисбаланса на ткани полости рта

Вопросы к занятию

1. Биохимические основы предрасположенности тканей полости рта к окислительному стрессу. Недостаточность защиты от нарушений редокс-баланса.
2. Основные причины формирования окислительного стресса в тканях полости рта.
3. Воздействие окислительного дисбаланса на зуб: состояние пульпы и твёрдых тканей.
4. Метаболиты кислорода и минеральная фаза твёрдых тканей полости рта, замещения и вакансии в кристаллах гидроксиапатита.
5. Препараты-прооксиданты, специфика метаболизма в организме, накопление и распад в тканях полости рта с образованием свободных радикалов.
6. Значение кислорода в жизнедеятельности кариесогенных и пародонтопатогенных микробных ассоциаций.
7. Особенности биохимии пародонтопатогенных бактерий: комплекс литических ферментов, разнообразие токсинов и антигенов, образование и роль летучих соединений.
8. Нацеленность метаболитов пародонтопатогенных бактерий на ткани десны, альвеолярного отростка челюстной кости и клетки защиты полости рта.
9. Восприимчивость тканей полости рта к пародонтопатогенным воздействиям, инволюции десны, костной альвеолы. Десневые и пародонтальные карманы.

Темы докладов

1. Препараты-прооксиданты: механизмы действия на ткани полости рта.
2. Биохимия пародонтопатогенной микрофлоры.

ЗАНЯТИЕ 2.3.2

Нейтрофилы и токсиканты в патохимии тканей полости рта

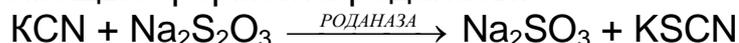
Вопросы к занятию

1. Функциональная активность и апоптоз нейтрофилов при воспалении тканей полости рта, влияние химических компонентов слюны.

2. Мутации гена катепсина С и воспаления пародонта.
3. Этанол и его метаболиты в инволюции и малигнизации тканей полости рта.
4. Модификации компонентов табака в организме (детоксикация, токсификация и др.), значение для тканей полости рта.
5. Компоненты табака в развитии хронического гингивита, пародонтита и пародонтоза.
6. Канцерогены и коканцерогены табака, значение в формировании лейкоплакии и злокачественного роста в тканях полости рта.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА **ОБНАРУЖЕНИЕ РОДАНИДОВ В СЛЮНЕ**

В слюне содержатся роданиды (тиоцианаты), которые являются продуктом сульфирования цианидов (солей синильной кислоты) тиосульфатом Na с помощью фермента роданазы:



Роданиды способны активировать пероксидазы слюны, участвующие в метаболизме различных пероксидов, и тем самым оказывать защитное действие. В гранулоцитах локализован фермент лактопероксидаза, который с помощью пероксида водорода окисляет имеющиеся в слюне роданид-ионы в ионы гипотиоционата:



Принцип метода. Роданиды в ротовой жидкости обнаруживают по появлению красного окрашивания при добавлении хлорного железа. Реакция обусловлена взаимодействием ионов Fe^{3+} и SCN^- , в результате которого образуются, наряду с роданистой солью трехвалентного железа, различные комплексы, имеющие состав от $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{NCS})^{2+}$ до $\text{Fe}(\text{NCS})_6^{3-}$. Некоторые органические соединения, например, соли лимонной и уксусной кислот, препятствуют образованию окраски.

Реактивы:

- 1) 0,01 % раствор хлорного железа (FeCl_3);
- 2) 2 % раствор HCl .

Материал исследования. Слюна некурящего человека и курильщика.

Проведение анализа. К 10 каплям слюны добавляют 2 капли 2 % раствора соляной кислоты и 2 капли 0,01 % раствора FeCl_3 . При наличии роданидов развивается красное окрашивание.

Практическое значение. В области десневой бороздки и в местах повреждения слизистой оболочки полости рта происходит эмиграция из крови нейтрофильных гранулоцитов, которые принимают участие в защитных реакциях. Один из механизмов защиты основан на способности гранулоцитов к окислению роданидов в чрезвычайно бактерицидный гипотиоцианат, который совместно с другими АФК ограничивает в полости рта влияние пародонтопатогенной и кариесогенной микрофлоры. Со-

держание роданидов в жидкостях полости рта связано с поступлением синильной кислоты и зависит от контакта с табачным дымом. Этот показатель в слюне у курящих людей в 2–10 раз выше, чем у некурящих. Высокие концентрации роданидов токсичны для окружающих тканей и способствуют развитию воспалительных процессов в пародонте.

Нормальные величины. Содержание роданидов (тиоцианатов) в ротовой жидкости составляет 0,5–1,2 ммоль/л.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите один правильный ответ.

1. ПРИ ЗАПОЛНЕНИИ ВАКАНСИЙ В КРИСТАЛЛАХ ГИДРОКСИАПАТИТА $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ЗУБНОЙ ЭМАЛИ КИСЛОРОД ЗАНИМАЕТ МЕСТО
 - 1) (Ca)
 - 2) (PO_4)
 - 3) (OH)
 - 4) (Ca) или (OH)
 - 5) (PO_4) или (OH)
 - 6) (Ca) или (PO_4)
2. ПРИЧИНОЙ СНИЖЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОЛИЛГИДРОКСИЛАЗЫ ПРИ СИНТЕЗЕ КОЛЛАГЕНА В ПЕРИОДОНТАЛЬНОЙ СВЯЗКЕ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) дефицит витамина С
 - 2) избыток ионов железа
 - 3) дефицит ионов цинка
 - 4) дефицит витамина D
 - 5) избыток ионов меди
3. К РАЗВИТИЮ ПОРОЗНОСТИ АЛЬВЕОЛ ЧЕЛЮСТНОЙ КОСТИ ПРИВОДИТ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ В ПОЧКАХ
 - 1) ретинола
 - 2) кальциферола
 - 3) токоферола
 - 4) пиридоксина
 - 5) рибофлавина
4. ВСАСЫВАНИЕ Ca^{2+} И ФОСФАТОВ МАКСИМАЛЬНО АКТИВИРУЕТСЯ ПРОДУКТОМ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ВИТАМИНА D
 - 1) 25(OH)D
 - 2) 1,25(OH)₂D
 - 3) 24,25(OH)₂D
 - 4) 1,24,25(OH)₃D
 - 5) 1,24(OH)₂D

5. ГИПОВИТАМИНОЗ С В ТКАНЯХ ДЕСНЫ И ПЕРИОДОНТА ПРИВЕДЁТ К

- 1) нарушению гидроксирования ЛИЗ в коллагене
- 2) увеличению скорости гликозилирования гидроксиПРО коллагена
- 3) нарушению гамма-карбоксилирования ГЛУ в белках
- 4) повышению активности пролингидроксилазы фибробластов
- 5) увеличению прочности зрелого коллагена

6. ПРИ С-АВИТАМИНОЗЕ ОТСУТСТВУЕТ

- 1) нарушение минерализации в опорных тканях
- 2) дегенерация одонтобластов с развитием кариеса и выпадением зубов
- 3) нарушение транспорта кислорода гемоглобином
- 4) снижение синтеза коллагена в костях и дентине зуба
- 5) нарушение синтеза протеогликанов соединительной ткани

7. ПРИ ГИНГИВИТЕ РЕСПИРАТОРНЫЙ ВЗРЫВ НЕЙТРОФИЛОВ МОЖЕТ ИНИЦИИРОВАТЬ В ПЛАЗМОЛЕММЕ КЛЕТОК ДЕСНЫ

- 1) окислительную модификацию холестерина в холевую кислоту
- 2) гидроксирование аннулярных липидов
- 3) открытие ионных каналов
- 4) перекисное окисление липидов
- 5) активацию работы Na^+/K^+ -АТФазы

8. ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В ТКАНЯХ ПОЛОСТИ РТА ПРОЯВЛЯЕТ МЕТАБОЛИТ ЭТАНОЛА

- 1) малоновый полуальдегид
- 2) малоновый диальдегид
- 3) янтарный полуальдегид
- 4) ацетальдегид
- 5) муравьиный альдегид

9. К КАНЦЕРОГЕНАМ ТАБАКА ОТНОСИТСЯ

- 1) бутадион
- 2) фенобарбитал
- 3) бензантрацен
- 4) бензоиларгинин
- 5) аргининосукцинат

10. ТОКСИФИКАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ ТАБАКА ПРИВОДИТ К

- 1) появлению гидрофобности
- 2) снижению токсичности
- 3) инверсии активности
- 4) снижению гидрофильности
- 5) повышению токсичности

ЗАНЯТИЕ-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ТЕМАМ 2.2–2.3

АФК И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ФОРМИРОВАНИИ ПАТОЛОГИИ В ОРГАНИЗМЕ И ПОЛОСТИ РТА

Темы докладов

1. Свободнорадикальные патологии.
2. АФК, радиация и лучевая болезнь. Радиационная нагрузка при курении.
3. Окислительный стресс при тепловом и солнечном ожоге.
4. АФК и острое воспаление.
5. Роль перекисного окисления липидов в синтезе медиаторов воспаления.
6. Окислительный стресс при лёгочных патологиях: пневмонии, хронической обструктивной болезни лёгких и бронхиальной астме.
7. Атеросклероз и окислительный стресс.
8. Окислительный стресс при ишемии, реперфузии и инфаркте миокарда.
9. Нейродегенеративные заболевания и окислительный дисбаланс.
10. Опухолевый рост и АФК. Канцерогены табака.
11. Окислительный стресс и старение.
12. Производственная и экологическая нагрузка в инициации окислительного стресса в организме и полости рта.
13. Синдром пероксидации и ткани пародонта.
14. Эйкозаноиды: происхождение, синтез, влияние на ткани пародонта.
15. Роль нейтрофилов жидкости десневой борозды.
16. Белки и ферменты слюны при окислительном стрессе.
17. Влияние прооксидантов и токсинов табачного дыма на ткани полости рта.
18. Влияние макро- и микроэлементов табачного дыма на зубы и пародонт.
19. Микросомальная система окисления и детоксикации при табачной нагрузке.
20. Влияние этанола на ткани полости рта.
21. Наркотическая составляющая в действии этанола и никотина.
22. Наркотики и кальций-фосфорный обмен.

ТЕМА 2.4

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И АНТИОКСИДАНТЫ В МЕХАНИЗМАХ ЗАЩИТЫ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА

ЗАНЯТИЕ 2.4.1

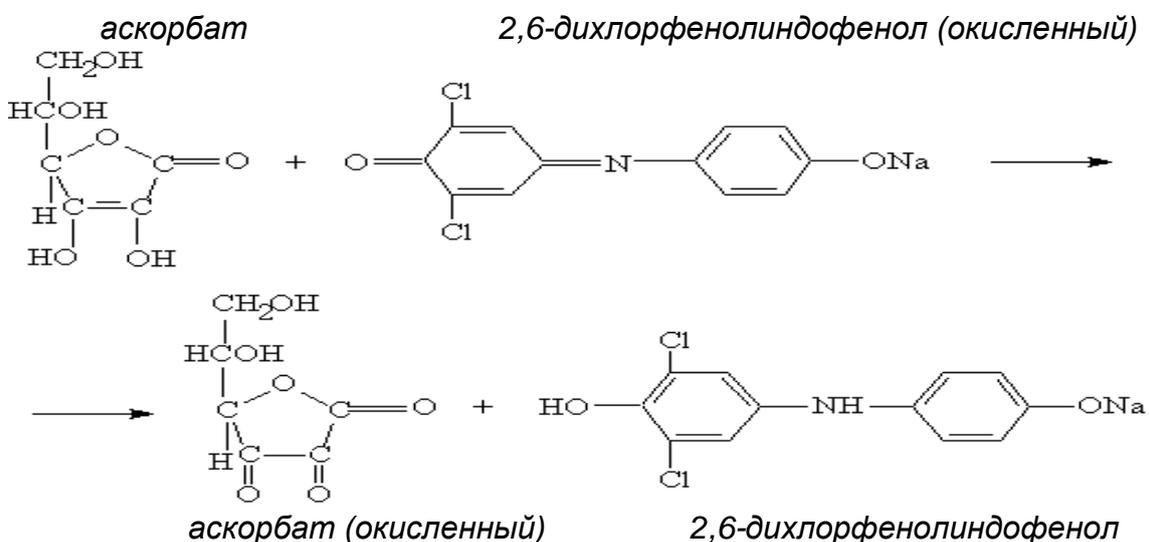
Витамины-антиоксиданты в профилактике и лечении заболеваний полости рта

Вопросы к занятию

1. Витамины-антиоксиданты, значение в поддержании здоровья и профилактике заболеваний тканей полости рта.
2. Витамины-антиоксиданты в лечении заболеваний тканей полости рта: польза и возможные риски.
3. Витаминоподобные факторы с антиоксидантным потенциалом: коэнзим Q₁₀, липоевая кислота, витамин F и др. Применение при патологии полости рта.
4. Комплекс витаминов E и A в защите и регенерации тканей пародонта.
5. Витамины D и K в механизмах защиты и регенерации тканей пародонта. Условия проявления прооксидантных эффектов.
6. Роль аскорбата в механизмах кровоточивости десен и деструкции периодонтальной связки при развитии цинги.
7. Факторы питания и обеспеченность организма жирорастворимыми витаминами и аскорбатом.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА ВИТАМИНОМ C ПО ЕГО СОДЕРЖАНИЮ В МОЧЕ**

Принцип метода. Аскорбиновая кислота, присутствующая в биологических пробах, восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол согласно реакции:



По количеству затраченного на титрование красителя определяют содержание витамина С в пробе. Как только весь витамин С окислится, титруемый раствор становится розовым за счёт образования в кислой среде недиссоциированных молекул 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Реактивы:

- 1) 2 % раствор HCl;
- 2) раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (краска Тильманса).

Объект исследования. Свежая моча.

Ход работы. В колбу для титрования отмеривают 5 мл мочи, 5 мл дистиллированной воды, перемешивают, добавляют 2,5 мл 2 % раствора HCl. Титруют краской Тильманса до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 секунд. Записывают объём краски, пошедший на титрование.

Расчёт содержания аскорбата (мг) в суточной моче производят по формуле:

$$\text{Содержание аскорбиновой кислоты, мг / сут} = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B}, \quad \text{где}$$

0,088 – количество витамина С (мг), эквивалентное 1 мл краски Тильманса;

A – количество краски Тильманса, затраченной на титрование (мл);

B – среднесуточный объём мочи (мужчины – около 1500 мл,
женщины – около 1200 мл);

B – объём мочи, взятый для титрования (мл).

Нормы. Витамин С выделяется с мочой здорового человека в количестве

20–30 мг/сут или 113,55–170,33 мкмоль/сут.

Практическое значение. Метод используют для диагностики недостаточности витамина С. Содержание витамина С в моче даёт представление о его запасах в организме, так как имеется соответствие между концентрацией витамина в крови и его выделением с мочой. У здоровых людей введение *per os* 100 мг витамина С сопровождается быстрым повышением его содержания в крови и моче. Концентрация витамина в моче может расти вследствие избыточного приёма аскорбата или поливитаминов. Содержание витамина С в моче снижается в 4–5 раз при гиповитаминозе, токсикозах, бронхопневмониях, острых и хронических инфекциях. Существенно снижен уровень аскорбата при цинге и сопровождается поражением периодонта. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, задерживают принятый *per os* аскорбат и его концентрация в моче не повышается. Однако не всегда на фоне гиповитаминоза уровень аскорбата в моче снижен. Он может быть в норме, несмотря на недостаток витамина в тканях, что усугубляет дефицит витамина С в организме.

ЗАНЯТИЕ 2.4.2

Белки и ферменты антиоксидантной защиты тканей и жидкостей полости рта при патологии

Вопросы к занятию

1. Системность антиоксидантной защиты в организме и её относительная недостаточность в тканях полости рта. Поддержание редокс-статуса клеток.
2. Происхождение, активность и взаимодействие антиоксидантных ферментов в тканях пародонта.
3. Белки и ферменты тиолдисульфидной системы в тканях полости рта.
4. Глутатион-зависимые реакции и относительная недостаточность ферментативных процессов антиоксидантной защиты тканей полости рта.
5. Супероксиддисмутаза и система антиперекисных ферментов в полости рта.
6. Антиоксидантные ферменты слюны.
7. Антиоксидантные ферменты слюны.
8. Антиоксидантные ферменты клеток защиты.
9. Спектр ферментов антиоксидантной защиты при воспалении в полости рта.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

Пероксидаза (1.11.1.7) содержится во всех растительных клетках. Гемоглобин, миоглобин и цитохромы также обладают слабой пероксидазной активностью.

Принцип метода. Пероксидазы восстанавливают гидропероксиды жирных кислот, превращают пероксид водорода в воду и кислород.

Реактивы:

- 1) ацетатный буфер;
- 2) 0,2 моль/л раствор пероксида водорода;
- 3) 0,001 моль/л раствор синего индигокармина.

Объект исследования. Гемолизат в разведении 1 : 1000.

Для приготовления гемолизата в мерную колбу на 50 мл наливают 5 мл дистиллированной воды, добавляют 0,05 мл свежей крови и несколько раз промывают пипетку полученным раствором. Добавляют дистиллированную воду до метки и получают основной раствор крови в разведении, необходимом для определения активности пероксидазы.

Ход работы. В пробирку вносят 2 мл ацетатного буфера, 3 мл разведённой крови (1 : 1000), 2 мл дист. воды и 8 капель 0,001 моль/л раствора индигокармина. Одновременно с включением секундомера добавляют 2 мл 0,2 моль/л раствора пероксида водорода и перемешивают

содержимое пробирки. Реакцию считают завершённой, как только синее окрашивание индигокармина перейдёт в жёлтое.

Норма. Пероксидазная активность гемолизата – от 30 до 50 секунд.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2
**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ
В ГЕМОЛИЗАТЕ ЭРИТРОЦИТОВ И ПЛАЗМЕ КРОВИ**

Принцип. Каталаза катализирует разложение синтезируемого в реакциях метаболизма пероксида водорода на воду и кислород.

Реактивы: 3 % раствор пероксида водорода.

Объект исследования. Плазма/сыворотка крови, цельная кровь.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 10 капель 3 % раствора H_2O_2 . Добавляют в 1-ю пробу каплю крови, во 2-ю – каплю сыворотки/плазмы и оценивают выделение O_2 . Сравнивают результаты в обеих пробирках, поясняют причины обнаружения каталазной активности в сыворотке/плазме крови.

ЗАНЯТИЕ 2.4.3

АФК, макрофаги, лейкоциты в защите тканей полости рта

Вопросы к занятию

1. Вклад АФК и кислород-зависимых механизмов лейкоцитов и макрофагов в защиту тканей полости рта.
2. Фагоцитарная активность и лизосомальный аппарат лейкоцитов и макрофагов в защите тканей полости рта.
3. Значение продукции АФК и фагоцитарной активности нейтрофилов в нейтрализации пародонтопатогенной микрофлоры.
4. Группы веществ, ингибирующих перекисное окисление липидов и продукцию медиаторов воспаления в тканях полости рта.
5. Возможности клеток защиты в удалении продуктов окислительной модификации белковых и липидных молекул при патологических процессах в тканях полости рта.
6. Роль трипептида глутатиона в поддержании защитной функции лейкоцитов и активности пероксидаз. Оксиредукция глутатиона и редокс-статус клетки.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА
В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ (ТЕОРЕТИЧЕСКИ)**

Принцип метода. Определение концентрации восстановленного глутатиона основано на способности кислоторастворимых тиоловых групп взаимодействовать с 5,5'-дитио-бис(2)-нитробензойной кислотой с

образованием окрашенного соединения – тио-2-нитробензойной кислоты, раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм.

Реактивы:

- 1) буферно-физиологический раствор (0,9 % раствор NaCl и 0,07 моль/л фосфатный буфер с pH=7,4 в соотношении 1 : 1);
- 2) 20 % раствор сульфосалициловой кислоты;
- 3) 0,01 % раствор этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) на 0,1 моль/л трис-HCl буфере (pH 8,5);
- 4) метанольный раствор 5,5'-дитио-бис(2)-нитробензойной кислоты (ДТНБ);
- 5) стандарт – 2,0 ммоль/л раствор восстановленного глутатиона (для калибровочного графика).

Материал исследования. Гемолизат эритроцитов, разведение 1 : 100. Приготовление взвеси эритроцитов. 5 мл венозной крови, взятой с добавлением 0,05 мл гепарина (5000 ЕД/мл), центрифугируют 5 минут при 3000 об/мин. Удаляют плазму и клетки белой крови с поверхности осадка эритроцитов. Осадок ресуспендируют с буферно-физиологическим раствором (1 : 1). Полученную эритроцитарную взвесь дважды отмывают буферно-физиологическим раствором, каждый раз центрифугируя 5 минут при 3000 об/мин и удаляя надосадочную жидкость. Из отмытой эритроцитарной взвеси готовят с помощью дистиллированной воды гемолизат эритроцитов с требуемым разведением.

Ход работы. В центрифужную пробирку помещают 0,6 мл гемолизата и 0,2 мл 20 % раствора сульфосалициловой кислоты, центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин и температуре 2–4 °С. Отбирают 0,2 мл надосадочной жидкости в пробирки, содержащие 2,55 мл 0,01 % ЭДТА (на 0,1 моль/л трис-HCl буфере с pH=8,5), добавляют 0,025 мл раствора ДТНБ, перемешивают, фотометрируют против дистиллированной воды при длине волны 412 нм.

Расчёт содержания восстановленного глутатиона производят с помощью калибровочного графика, который строят по разведениям стандартного раствора GSH (от 0,02 до 2,0 ммоль/л), каждое разведение обрабатывают аналогично опытным пробам. При необходимости пересчёта полученных данных на белок концентрацию белка оценивают биуретовым методом.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ
В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ (ТЕОРЕТИЧЕСКИ)**

Принцип метода. Определение активности глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) основано на способности данного фермента катализировать реакцию взаимодействия восстановленного глутатиона с гидроперекисью трет-бутила. Активность фермента оценивают по изменению

содержания восстановленного глутатиона в пробах до и после инкубации с модельным субстратом, используя цветную реакцию с 5,5'-дитио-бис(2)-нитробензойной кислотой.

Реактивы:

- 1) 0,01 % раствор этилендиаминтетрацетата (ЭДТА) на 0,1 моль/л трис-НСI буфере (рН=8,5);
- 2) сложный буфер (готовят в день исследования, растворяя 78 мг азиды натрия и 100 мг восстановленного глутатиона в 100 мл 0,1 моль/л трис-НСI буфера с 0,01% ЭДТА (рН=8,5));
- 3) 20 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);
- 4) 0,14 % раствор гидроперекиси трет-бутила;
- 5) метанольный раствор 5,5'-дитио-бис(2)-нитробензойной кислоты (ДТНБ).

Объект исследования. Гемолизат эритроцитов (разведение 1 : 200).

Ход работы. В опытные пробы вносят 0,2 мл гемолизата, добавляют 0,73 мл сложного буфера (готовят в день исследования, растворяя 78 мг азиды натрия и 100 мг восстановленного глутатиона в 100 мл 0,1 моль/л трис-НСI буфера (рН=8,5), содержащего 0,01% ЭДТА). Смесь выдерживают 10 минут при 37 °С. Реакцию инициируют внесением в смесь 70 мкл 0,14 % раствора гидроперекиси трет-бутила. Строго по секундомеру через 5 минут инкубации при 37 °С реакцию останавливают, добавляя 0,2 мл 20 % раствора ТХУ. После осаждения белка ТХУ вносят раствор гидроперекиси трет-бутила в контрольные пробы. Все пробы центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин.

В надосадке определяют содержание восстановленного глутатиона. Для этого к 0,1 мл надосадочной жидкости добавляют 2,65 мл трис-НСI буфера (рН=8,5), содержащего 0,01 % ЭДТА, и 25 мкл раствора ДТНБ, перемешивают и фотометрируют при длине волны 412 нм в кювете 10 мм против дистиллированной воды.

Расчёт активности фермента в эритроцитах производят по формуле

$$A = \frac{\Delta C \times V_1 \times 201}{V_2} \times t, \quad \text{где}$$

A – активность фермента, мкмоль/(мин•л),

ΔC – разность концентраций восстановленного глутатиона в опытных и контрольных пробах, мкмоль/л,

t – время инкубации (5 мин),

201 – степень разведения эритроцитарной взвеси в гемолизате,

V_1 – объём реакционной смеси (1,2 мл),

V_2 – объём пробы, использованной для определения концентрации восстановленного глутатиона (0,1 мл).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ
В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ (ТЕОРЕТИЧЕСКИ)**

Принцип метода. Определение активности глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) основано на оценке скорости катализируемой ферментом реакции восстановленного глутатиона (GSH) с 1-хлор-2,4-динитробензолом:



Активность фермента оценивают по скорости образования продукта реакции – глутатион-2,4-динитробензола, водный раствор которого имеет максимум поглощения при длине волны 340 нм.

Реактивы:

- 1) 2 ммоль/л раствор GSH;
- 2) 2 ммоль/л раствор 1-хлор-2,4-динитробензола.

Объект исследования. Гемолизат эритроцитов (1 : 10).

Ход работы. Реакцию проводят непосредственно в кювете спектрофотометра с длиной оптического пути 10 мм. Опытная проба: в кювету вносят 1,2 мл 2 ммоль/л раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл гемолизата эритроцитов (1 : 10), добавляют 1,2 мл 2 ммоль/л раствора 1-хлор-2,4-динитробензола для инициации реакции, перемешивают. Контроль обрабатывают аналогично опыту, внося вместо гемолизата 0,1 мл дист. воды. Оптическую плотность проб измеряют сразу же и ровно через 3 минуты против дист. воды при длине волны 340 нм.

Расчёт активности фермента в эритроцитах производят по формуле:

$$A = \frac{\Delta E \times V_1 \times 10^6 \times 11}{V_2 \times l \times \varepsilon \times t}, \quad \text{где}$$

A – активность фермента, мкмоль/(мин•л);

11 – разведение эритроцитарной взвеси;

ΔA – разность экстинкций проб до и после инкубации без величины разницы экстинкций в контроле $[(E_{\text{после}} - E_{\text{до}})_{\text{опыт}} - (E_{\text{после}} - E_{\text{до}})_{\text{контр}}]$;

V_1 – объём реакционной смеси (2,5 мл);

V_2 – объём гемолизата (0,1 мл);

l – длина оптического пути (1 см);

t – время инкубации (3 мин);

ε – молярный коэффициент поглощения для GS-2,4-динитробензола ($9600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);

10^6 – коэффициент пересчета моль в мкмоль,

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите один правильный ответ.

1. ДЛЯ ОГРАНИЧЕНИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ НЕЛЬЗЯ ИСПОЛЬЗОВАТЬ В КАЧЕСТВЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АНТИОКСИДАНТА
 - 1) витамин С
 - 2) глутатион
 - 3) карнитин
 - 4) билирубин
 - 5) карнозин

2. РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПАРОДОНТИТА ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЗА СЧЁТ
 - 1) снижения активности СОД и каталазы
 - 2) активации перекисного окисления липидов
 - 3) накопления карбонил-протеинов
 - 4) повышения соотношения АФК/антиоксиданты
 - 5) повышения содержания токоферола

3. ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ В ПОЛОСТИ РТА АНТИОКСИДАНТНЫЙ ЭФФЕКТ СЕЛЕНА ОПОСРЕДОВАН В ОСНОВНОМ
 - 1) глутатион-зависимыми ферментами
 - 2) цистеин-зависимыми процессами
 - 3) индукцией NO-синтаз
 - 4) вытеснением Fe^{2+} из активного центра ферментов
 - 5) регуляцией баланса СОД/каталаза

4. ПЕРОКСИДАЗЫ СЛЮНЫ, ЗАЩИЩАЯ ПОЛОСТЬ РТА, В РОЛИ СПЕЦИФИЧНОГО СУБСТРАТА ИСПОЛЬЗУЮТ ИОН
 - 1) роданида
 - 2) хлорида
 - 3) сульфида
 - 4) иодида
 - 5) бромида

5. НЕЙТРОФИЛЫ ЖИДКОСТИ ДЕСНЕВОЙ БОРОЗДЫ ОБРАЗУЮТ БАКТЕРИЦИДНЫЙ ИОН ГИПОХЛОРИТА (ОСГ) С ПОМОЩЬЮ
 - 1) каталазы
 - 2) пероксидредуктазы
 - 3) сульфоксидредуктазы
 - 4) миелопероксидазы
 - 5) лактопероксидазы

6. К ЦИТОПРОТЕКТОРНЫМ ФУНКЦИЯМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЛЬЗЯ ОТНЕСТИ
- 1) регуляцию клеточного сигналинга
 - 2) бактерицидное действие
 - 3) активацию иммунных реакций лейкоцитов
 - 4) запуск синтеза эйкозаноидов
 - 5) ингибирование деления клетки
7. В ТЕРАПИИ ПАРОДОНТИТА ПРИМЕНЯЮТ АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПРЕПАРАТ
- 1) аспирин
 - 2) мексидол
 - 3) ремантадин
 - 4) спазмалгон
 - 5) нистатин
8. МАКСИМАЛЬНЫЙ ВКЛАД В РАЗРУШЕНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ ВНОСИТ
- 1) супероксиддисмутаза
 - 2) НАДФ·Н-оксидаза
 - 3) миелопероксидаза
 - 4) диаминооксидаза
 - 5) моноаминооксидаза
9. ВЫРАЖЕННЫМИ АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ ОБЛАДАЕТ МОЛЕКУЛА
- 1) аллопуринола
 - 2) аспирина
 - 3) дибунола
 - 4) CCl_4
 - 5) аспаркама
10. АКТИВНОЙ ФОРМОЙ ЖЕЛЕЗА В СОСТАВЕ ГЕМА ПЕРОКСИДАЗ СЛЮНЫ ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) Fe^{2+}
 - 2) Fe^{3+}
 - 3) FeO
 - 4) Fe
 - 5) FeS

ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ ПО ТЕМАМ 2.2–2.4

ФОРМИРОВАНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЙ И МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА И ОРГАНИЗМА

Вопросы

1. Понятие «свободнорадикальные патологии» (СРП), окислительный стресс (ОС) в патогенезе заболеваний.
2. Радиация и лучевая болезнь. Тепловой и солнечный ожог как СРП.
3. Респираторный взрыв фагоцитов, острое и хроническое воспаление.
4. Окислительный стресс при легочных и сердечно-сосудистых заболеваниях.
5. Дисметаболический синдром и сахарный диабет как СРП.
6. ОС при нейродегенеративных патологиях, опухолевом росте. Роль апоптоза.
7. Свободные радикалы и гибель клетки, старение организма.
8. Причины формирования ОС в тканях полости рта. Биохимические основы предрасположенности тканей полости рта к нарушению редокс-баланса и недостаточность защиты от ОС.
9. Препараты-прооксиданты, метаболизм в организме, накопление и распад в тканях полости рта с образованием свободных радикалов.
10. Биохимия кариесогенных микробов, роль кислорода в жизнедеятельности.
11. Биохимия пародонтопатогенной микрофлоры, нацеленность метаболитов на ткани десны, альвеолярного отростка кости, клетки защиты полости рта.
12. Механизмы влияния АФК на ткани зуба и пародонта: вред и польза.
13. Функциональная активность и апоптоз нейтрофилов при воспалении тканей полости рта, влияние компонентов слюны, мутаций гена катепсина С.
14. Модификации компонентов табака (детоксикация, токсификация и др.), значение для тканей полости рта. Табак и формирование хронического гингивита, пародонтита и пародонтоза.
15. Канцерогены и коканцерогены табака, лейкоплакия и злокачественный рост в тканях полости рта. Этанол и его метаболиты в инволюции и малигнизации тканей полости рта.
16. Системность антиоксидантной защиты организма и её относительная недостаточность в тканях полости рта. Поддержание редокс-статуса клеток.
17. Антиоксидантные витамины и витаминоподобные факторы, роль в поддержании здоровья и лечении тканей полости рта.

18. Факторы питания и обеспеченность организма жирорастворимыми витаминами и аскорбатом. Условия проявления прооксидантных эффектов.
19. Ферменты и белки антиоксидантной защиты полости рта, антирадикальная и антиперекисная активность, роль глутатиона.
20. Защита белков и ферментов слюны от окисления и деградации.
21. Ротовая жидкость в O_2 -зависимых механизмах защиты тканей полости рта.
22. Вещества, ингибирующие перекисное окисление липидов и продукцию медиаторов воспаления в тканях полости рта. Оксиредукция глутатиона.
23. Участие клеток защиты в удалении продуктов окислительной модификации белков и липидов при патологических процессах в тканях полости рта.

ИТОГОВЫЙ ЗАЧЁТ

АФК В МЕТАБОЛИЗМЕ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА И ОРГАНИЗМА

Вопросы

1. Предмет, цели и задачи спецкурса «АФК в метаболизме тканей полости рта», значение в системе биомедицинских наук и клинической практике.
2. Путь 4-х электронного восстановления молекулы кислорода до воды в метаболических процессах организма.
3. Понятие «активные формы кислорода», разнообразие АФК, источники и пути образования АФК. Двойственная природа АФК.
4. Понятие о стрессе и адаптации. Реакции тренировки и активации, эу- и дистресс, срочная и долговременная адаптация. Кислород и стресс.
5. История изучения окислительного стресса.
6. Пути образования и утилизации перекиси водорода в клетке, реакции.
7. Реакции образования NO, роль в клетке. Нитрование и нитрозилирование субстратов, нитрозоамины.
8. Механизмы образования АФК фагоцитами в реакциях респираторного взрыва. Роль ферментов.
9. Понятие о про- и антиоксидантах. Примеры прооксидантов, процессы и заболевания, сопровождающиеся накоплением прооксидантов в организме.
10. Понятия «метаболическая энергия», «восстановительная способность». Пути и реакции образования и использования НАДФ·Н.
11. Организация системы антиоксидантной защиты клетки. Антиоксиданты водной и липидной фазы клетки.
12. Система неферментативных и ферментативных антиоксидантов клетки. Антирадикальная и антиперекисная защита клетки.
13. Глутатион и глутатион-зависимые ферменты. Система оксиредукции глутатиона. Окисление цистеина и глутатионилирование белков.
14. Витамины-антиоксиданты, механизмы действия. Участие в регуляции перекисного окисления в клетке.
15. Основные мишени при окислительном повреждении нуклеиновых кислот, продукты и последствия окислительной модификации нуклеиновых кислот.
16. Основные направления окислительной модификации белков. Обратимые и необратимые модификации.
17. Окислительная модификация редокс-чувствительных аминокислот, механизмы, продукты окисления – маркеры АФК-индуцированных повреждений.

18. Основные мишени при окислительной модификации белков. Расщепление окисленной полипептидной цепи по диаמידному пути и α -амидному пути.
19. Образование карбонильных производных белков в реакциях с продуктами перекисного окисления липидов, при гликозилировании и гликооксидации. Шиффовы основания. Значение в норме и патологии.
20. Субстраты и свободнорадикальный механизм ПОЛ.
21. Первичные и вторичные продукты ПОЛ: гидроперекиси, диеновые и триеновые конъюгаты, гидроксиноненали и малоновый диальдегид.
22. Пути и механизмы образования биологически активных липидов, влияние эйкозаноидов на клеточные мембраны и организм в целом.
23. Плазматическая мембрана клетки, гликокаликс и межклеточное вещество. Мишени окисления при ОС, перекисный тип повреждения клетки.
24. Строение и роль пероксисом в клетке. Пероксисомы и АФК. Значение перекисного окисления липидов в патологии.
25. Система микросомального окисления (МСО), роль флавопротеинов и цитохромов в цепи МСО, значение ионов Fe, рибофлавина.
26. Понятие о гидроксильном окислении субстратов в МСО, монооксигеназный механизм гидроксильного окисления и образование АФК.
27. Роль гидроксильного окисления в посттрансляционной модификации белков и метаболизме холестерина (гормоны, желчные кислоты, кальцитриолы).
28. Метаболизм ксенобиотиков и токсинов в системе МСО, токсический тип повреждения клетки.
29. Реакции синтеза H_2O_2 в микросомах и митохондриях. Альтернативность процесса образования перекисей процессу биологического окисления.
30. АФК и митохондрии. Гипоксия и активация перекисного окисления. Гипоксический тип повреждения клетки.
31. Лизосомы: структура, гетерогенность, функции, проницаемость мембраны и ферменты. Роль лизосом в адаптации и воспалении. Лизосомные болезни накопления. Апластический тип повреждения клетки.
32. Виды апоптоза, АФК в механизмах апоптоза. Внутри- и внеклеточные сигналы апоптоза, индукторы и ингибиторы. Механизмы запуска апоптоза при повреждении хромосом, митохондрий, мембран клеток.
33. Гибель клетки по пути некроза и аутофагии.
34. Окислительный стресс в механизмах развития заболеваний. Понятие «свободнорадикальные патологии», типичные примеры.
35. АФК и радиация. Лучевая болезнь. Радиационная нагрузка при курении.
36. Тепловой и солнечный ожог, оксидативный стресс и развитие повреждений.

37. Окислительный стресс и опухолевый рост, мембранные онкобелки (альфа-фетопротеин, канцерозембриональный антиген и др.). Апоптоз и опухоли.
38. Окислительный стресс: сахарный диабет и дисметаболический синдром.
39. Свободные радикалы и старение.
40. Окислительный стресс: механизмы возникновения в тканях пародонта, роль гипоксии и пародонтопатогенных бактерий.
41. Влияние окислительного дисбаланса на пародонт. Препараты-прооксиданты, накопление и обмен с образованием свободных радикалов в пародонте.
42. Влияние окислительного стресса на белки и ферменты ротовой жидкости.
43. АФК, кислород-зависимые и независимые от кислорода механизмы нейтрофилов в защите тканей полости рта.
44. Организация антиоксидантной защиты тканей полости рта.
45. Роль питания в профилактике и лечении «свободнорадикальных» заболеваний полости рта. Аскорбат и ткани пародонта.

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

РАЗДЕЛ I

ТЕМА 1.1

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	5	1	1	5	3	1	4	2	1	3

ТЕМА 1.2

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	1	4	2	2	3	2	3	4	1	5

ТЕМА 1.3

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	3	4	4	5	3	4	1	2	5	1

ТЕМА 1.4

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	1	1	4	4	2	3	5	1	3	2

РАЗДЕЛ II

ТЕМА 2.1

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	5	2	1	3	2	2	4	1	3	5

ТЕМА 2.2

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	1	5	3	2	1	2	1	3	5	4

ТЕМА 2.3

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	3	1	1	2	2	3	4	4	3	5

ТЕМА 2.4

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	4	5	1	1	4	5	2	3	3	1

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ (ДЛЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ГОМОГЕНАТОВ ТКАНЕЙ)

Метод дифференциального центрифугирования разработан Христианом Де Дювом (1955), основан на различиях в скорости седиментации (осаждения) частиц, отличающихся по размерам и плотности (удельному весу). Метод используют для фракционирования гомогенатов (печени, почек и других тканей) с целью получения отдельных субклеточных фракций – лизосомальной, митохондриальной, микросомальной и других.

Схема процесса представлена на рисунке 2. Гомогенат ткани центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения, которое подбирают таким образом, чтобы на каждом этапе осаждалась определенная субклеточная фракция. Осадок, получаемый на каждой стадии процесса, отделяют от надосадочной жидкости и несколько раз промывают для получения осадка относительно чистой фракции. Каждая фракция субклеточных частиц имеет размер и плотность в определенном диапазоне значений, поэтому практически невозможно получить абсолютно чистый и гомогенный осадок без примеси частиц, «примыкающих» по плотности и размеру из соседних фракций. Однако если предельно точно подобраны все скорости центрифугирования (максимально соответствуют требуемому значению центробежного ускорения) и соблюдены другие методические правила, то загрязнение каждой субклеточной фракции можно минимизировать до допустимого уровня.

Чистоту каждой субклеточной фракции, полученной в виде осадка, чаще всего оценивают по величине удельной активности маркёрного для данной фракции фермента. Её сравнивают с удельной активностью этого же фермента во всех других полученных фракциях.

Результат оформляют в виде гистограммы (рис. 1), где по оси абсцисс последовательно откладывают относительное количество белка в каждой из фракций в порядке их выделения; по оси ординат – удельную активность маркёрного для данной фракции фермента. По площади столбиков можно в каждой из полученных фракций определить активность фермента (в %) и оценить допустимость степени загрязнения ферментом соседних фракций.

Пример. Оценка чистоты фракции митохондрий, выделенных из гомогената печени крыс при дифференциальном центрифугировании. Сукцинатдегидрогеназа является одним из маркёрных ферментов митохондрий. При правильно подобранных режимах центрифугирования загрязнение сукцинатдегидрогеназой других субклеточных фракций, плот-

ность которых близка к таковой у митохондрий, будет минимальным. Гистограмма будет иметь вид, как на рисунке 1.

Выделение субклеточных фракций для оценки показателей, характеризующих окислительный стресс, производят при охлаждении до температуры 0–4 °С.

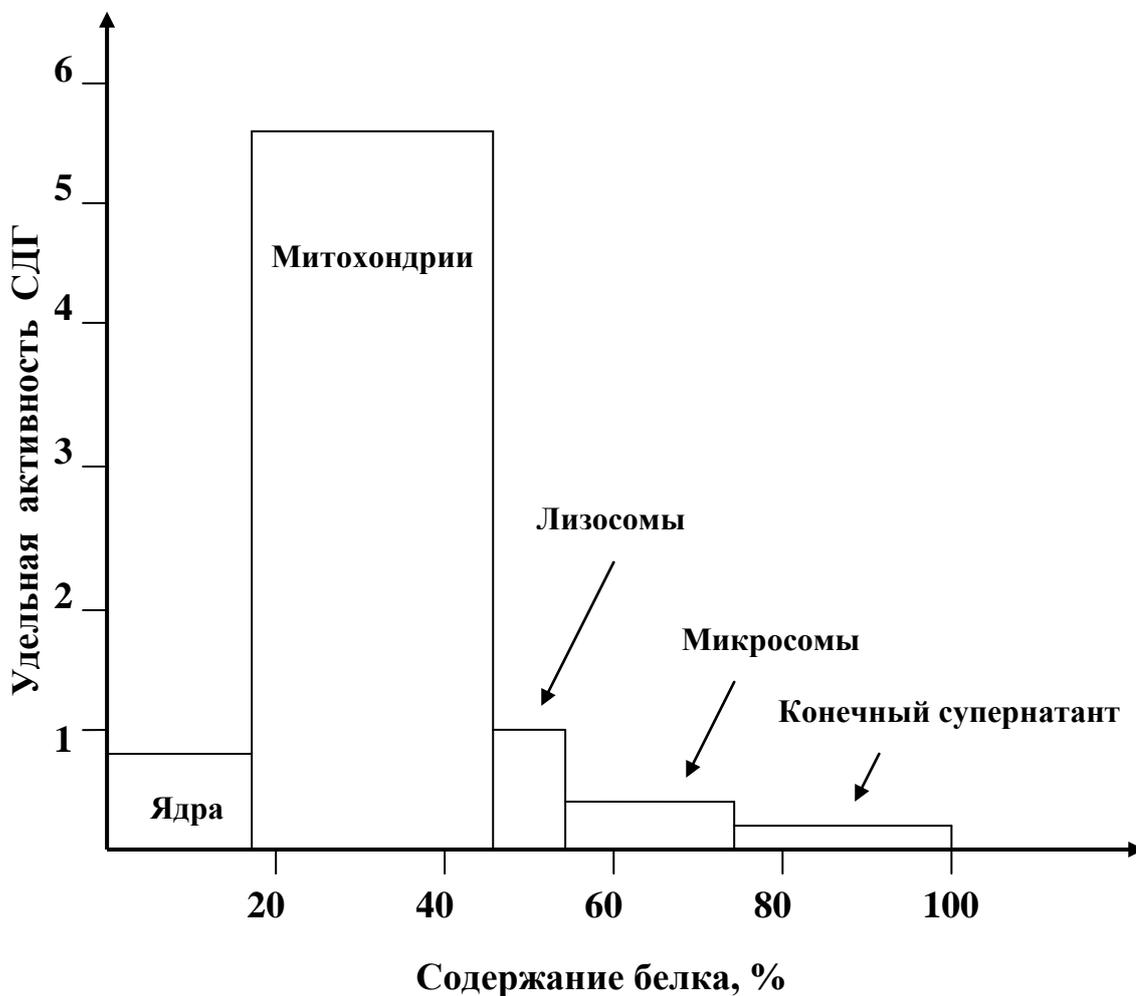


Рис. 1. Распределение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) между субклеточными фракциями из гомогената печени крыс

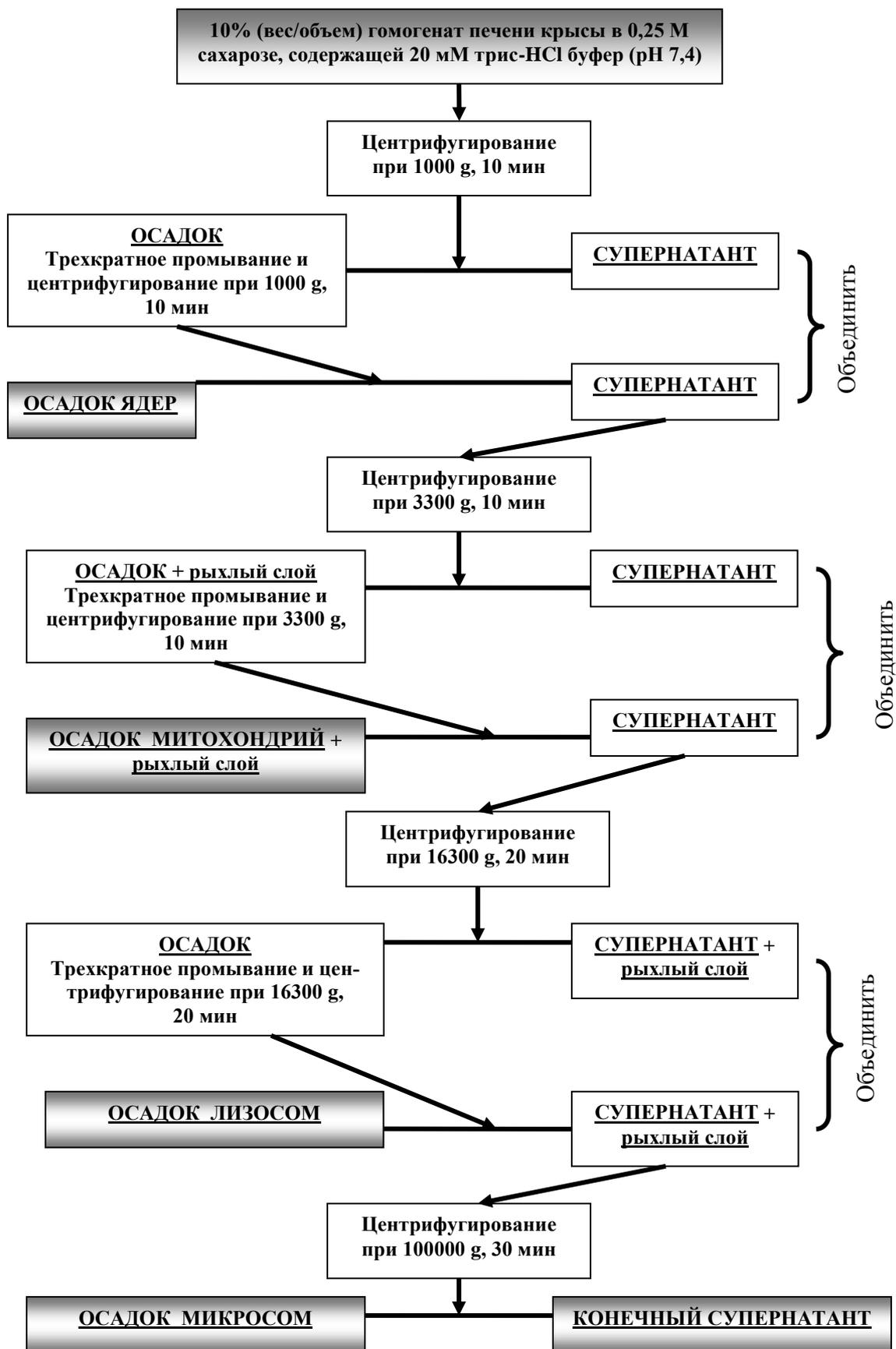


Рис. 2. Схема получения субклеточных фракций из гомогената печени крысы методом дифференциального центрифугирования по Х. Де Дюву и соавт. (Ch. De Duve et al., 1955)

СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВА В ИССЛЕДУЕМОМ РАСТВОРЕ

Концентрации веществ в биологических пробах в норме варьируют в строго определённом диапазоне. При патологии они изменяются в пределах, не превышающих критические для жизни значения. Более 80 % клинически важных метаболитов организма можно определить с помощью оптических методов количественного анализа. Оптический анализ количества вещества, основанный на регистрации интенсивности поглощения светового пучка с определённой длиной волны при прохождении через исследуемый раствор, называют *адсорбционной фотометрией*.

1) ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПО КАЛИБРОВОЧНОМУ ГРАФИКУ

В большинстве случаев для расчёта концентрации светопоглощающих растворов оптимален графический метод. Он состоит в построении калибровочной кривой, которая представляет собой график зависимости экстинкций (E) от известных концентраций (C) поглощающего вещества (хромофора). Концентрацию вещества откладывают на оси абсцисс (ось X), экстинкцию – на оси ординат (ось Y). Измерив экстинкцию раствора определяемого вещества, находят его содержание в пробе по графику.

Перед обработкой серии калибровочных проб необходимо хорошо отработать метод исследования, иначе точность расчетов по калибровочной кривой будет неудовлетворительной. При смене реактивов строят новый калибровочный график.

Требования к условиям построения калибровочных кривых

1. Калибровочный раствор помимо стандартного вещества должен содержать все основные компоненты биологической жидкости, влияющие на интенсивность окраски определяемого вещества.
2. Мерную посуду для приготовления раствора стандарта обезжиривают и моют хромовой смесью.
3. Навеска стандарта должна быть достаточно большой для уменьшения технической ошибки взвешивания. Сначала готовят основной раствор стандарта. Чем более он концентрирован, тем дольше сохраняется стандартное вещество. Разведения стандарта должны охватывать не только диапазон физиологических концентраций, но и выходить за пределы минимальных и максимальных величин (норма содержания общего белка в плазме крови 63–85 г/л, а растворы стандарта готовят в диапазоне от 40 до 120 г/л).
4. Измерение оптической плотности начинают со стандартного раствора меньшей концентрации. Каждое разведение измеряют 3–5 раз в 3-х сериях (одно разведение – 6–12 раз). Экстинкция должна быть в преде-

лах 0,1–0,3 единиц абсорбции (максимум – до 0,7). При построении калибровочного графика для каждого разведения учитывают средние значения.

5. Графики строят минимум по 5 точкам (обычно 5–8), различающимся по концентрации поглощающего вещества не более чем на 30 %. Кривую располагают так, чтобы 3 из 5 точек легли на линию, а остальные находились равномерно близ неё, отклоняясь в ту и другую сторону. Отдельные точки, значительно смещённые от линии графика, обычно являются результатом ошибки определения, поэтому их не учитывают.

6. Кривую проводят из точки начала координат под углом 45°, при необходимости применяют масштабирование. В правом верхнем углу указывают наименование кривой, метод, светофильтр (длину волны), длину оптического пути кюветы (мм), дату построения.

Пример построения калибровочной кривой

Нормальные значения определяемой величины составляют 60–80 г/л, калибровочные стандарты – 20, 40, 60, 80, 100, 120 г/л. Из каждого разведения стандарта выполняют исследование 3-х проб. При измерении экстинкции каждой из проб с одинаковым количеством стандарта, полученные значения усредняют (если одно из 3-х значительно отклоняется, его не учитывают).

Масштаб калибровочного графика должен быть достаточно крупным – 20 см и более на каждой оси. Для того чтобы кривая располагалась под углом около 45° к осям, берут максимальные значения концентрации и абсорбции, если между ними в пределах этих значений сохраняется прямо пропорциональная зависимость. В данном примере максимальная концентрация калибровочного стандарта – 120 г/л, максимальное значение экстинкции – 0,6 (рис. 3). На основании этих данных находят факторы калибровки по формулам:

$$C_{\max} / 20 = 120 / 20 = 6 \text{ г/л}$$

$$E_{\max} / 20 = 0,6 / 20 = 0,03$$

Полученные цифры – это «цена деления», соответствующая масштабу 1 см на осях концентрации (С) и экстинкции (Е). Для облегчения процедуры откладывания на оси ординат значений абсорбции стандартных и опытных проб рекомендуется разделить величину экстинкции на цену деления. Например: $0,2 / 0,03 = 6,67$. Полученное число показывает, на каком расстоянии в см от точки (0;0) следует сделать отметку для восстановления из неё перпендикуляра: отмеряют отрезок в 6 см и 7 мм. Аналогично обчисляют остальные значения, размещают их на вертикальной и горизонтальной осях.

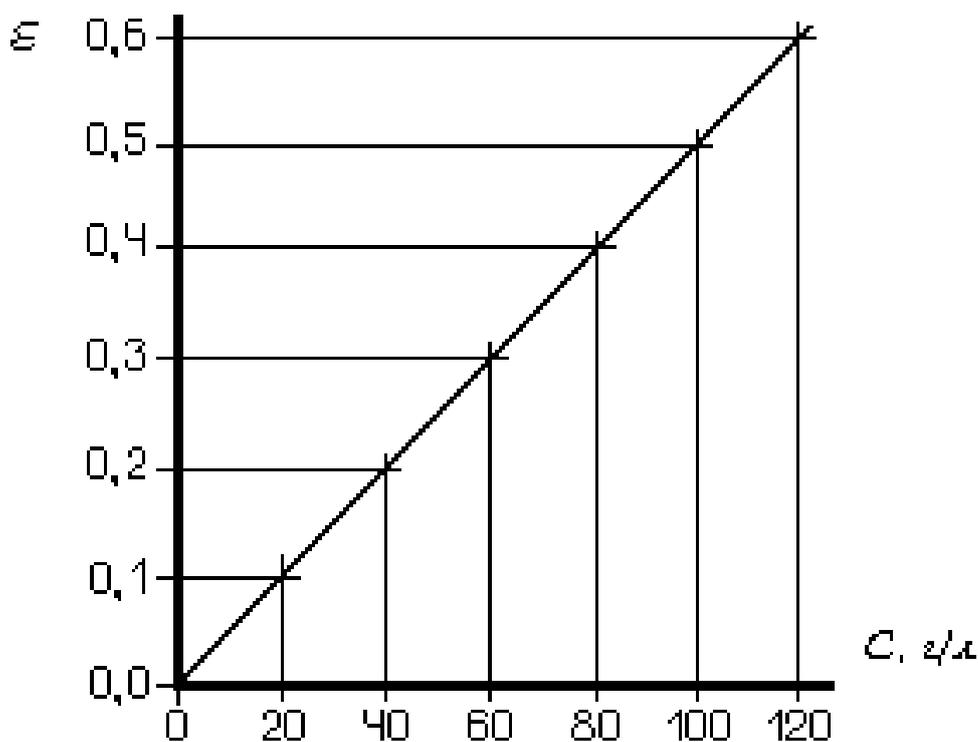


Рис. 3. Схематический вид калибровочной кривой

Все условия обработки опытных и калибровочных проб должны быть аналогичны (для построения графика используют ту же методику и те же самые реактивы, что и для обработки биопроб).

2) РАСЧЁТ ПО ОТНОШЕНИЮ К СТАНДАРТНОЙ ПРОБЕ

Расчёт концентрации вещества по отношению к стандартной пробе альтернативен методу вычисления содержания вещества в биологических пробах с использованием калибровочного графика. Данный способ расчёта менее точен, поскольку используется только одна калибровочная точка, что увеличивает возможность получения ошибочных результатов.

3) РАСЧЁТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЯРНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ЭКСТИНКЦИИ

Атомы, ионы, молекулы или функциональные группы в составе более сложной молекулы, поглощающие электромагнитное излучение оптического диапазона со строго определённой длиной волны, называют *хромофорами*. Они обладают разными свойствами. Пример хромофора одного вида – аминокислота триптофан, поглощающая излучение с длиной волны 280 нм (на этом основано спектрофотометрическое определение содержания белка в растворе). Пример хромофоров другого вида – окрашенные продукты взаимодействия определяемого соединения с некоторыми веществами. Их растворы прозрачны, не рассеивают проходящий световой поток. Для аналитических целей годны лишь те цветные реакции, в которых продукт–хромофор имеет интенсивность окраски прямо пропорциональную концентрации определяемого вещества.

Связь между оптической плотностью (экстинкцией) и концентрацией вещества–хромофора в растворе описывает закон Бугера–Ламберта–Бэра:

$$E = M \cdot C \cdot I, \quad \text{где}$$

M – молярный коэффициент экстинкции, $\text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л}$ (иначе $\frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}$);

E – экстинкция (оптическая плотность), величина безразмерная;

C – концентрация вещества в растворе, моль/л ;

I – толщина кюветы, см .

Молярный коэффициент экстинкции (**M**) означает экстинкцию хромофора в кювете толщиной 1 см при концентрации хромофора в растворе 1 моль/л. Зная величину **M** и определив **E** раствора хромофора в кювете 1 см, можно вычислить концентрацию хромофора (**C**) по формуле:

$$C \text{ (моль/л)} = \frac{E}{M \cdot I} = \frac{E \cdot \text{моль} \cdot \text{см}}{M \cdot \text{л} \cdot \text{см}}.$$

Для многих хромофоров молярные коэффициенты экстинкции известны, значения некоторых из них приведены в таблице:

Соединения-хромофоры	Длина волны максимума поглощения, нм	M , $\text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л}$
Триптофан	280	$5,6 \cdot 10^3$
ДНК	260	$6,6 \cdot 10^3$
НАД·Н, НАДФ·Н	340	$6,22 \cdot 10^3$
Аденин	260	$13,4 \cdot 10^3$
Гуанин	260	$7,2 \cdot 10^3$
Цитозин	260	$5,55 \cdot 10^3$
Тимин	260	$7,4 \cdot 10^3$
Триметиновый комплекс, образующийся в реакции МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой	532	$1,56 \cdot 10^5$

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБАХ

При расчётах часто необходимо знать содержание белка в исследуемой пробе. В биологических жидкостях бывает очень низкая концентрация белка, поэтому используют более чувствительные методы, чем обычно применяемый для оценки концентрации белка в плазме и сыворотке крови биуретовый метод.

а) биуретовый метод

Принцип метода основан на способности ионов меди в щелочной среде реагировать с пептидными связями с образованием комплексного хелатного соединения от сине- до красно-фиолетового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации белка.

Реактивы:

- 1) биуретовый реактив;
- 2) основной раствор альбумина (100 г/л).

Материал исследования. Сыворотка/плазма крови.

Ход работы. В пробирке смешивают 0,1 мл сыворотки/плазмы крови с 2 мл биуретового реактива, инкубируют 30 минут при комнатной температуре, измеряют экстинкцию при длине волны 540 нм против биуретового реактива.

Расчёт. Содержание белка в пробе выражают в г/л, определяя его по калибровочному графику, построенному по 5 разведениям основного раствора альбумина (100 г/л = 100 мг/мл), содержащим 20; 40; 60; 80; 100 мг белка в мл. Все разведения обрабатывают аналогично опытной пробе.

б) спектрофотометрический метод

Принцип метода основан на способности ароматических аминокислот в молекулах белков поглощать свет в ультрафиолетовом диапазоне.

Реактивы:

- 1) 0,9 % раствор NaCl (физиологический раствор);
- 2) стандартный раствор альбумина (5 мг/мл).

Материал исследования. Сыворотка/плазма крови

Ход работы. 0,1 мл сыворотки крови смешивают с 2,9 мл 0,9 % раствора NaCl и измеряют экстинкцию пробы на спектрофотометре при длине волны 280 нм против физиологического раствора.

Расчёт. Содержание белка в пробах определяют по калибровочной кривой. Для её построения используют 7 калибровочных разведений стандартного раствора альбумина (5 мг/мл), содержащих 0,1; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 и 5,0 мг белка в мл. Все их обрабатывают аналогично опыт-

ной пробе. Содержание белка в пробе выражают в мг/мл, соотносят с разведением сыворотки крови.

в) микробиуретовый метод

Принцип метода основан на способности ионов меди в щелочной среде реагировать с пептидными связями с образованием комплексного соединения сине- или красно-фиолетового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации белка.

Реактивы:

- 1) 3 % раствор NaOH;
- 2) реактив Бенедикта;
- 3) стандартный раствор альбумина (5 мг/мл).

Материал исследования. Сыворотка или плазма крови, фракции гомогената.

Ход работы. Опыт: в пробирке смешивают 0,1 мл сыворотки крови, 3,5 мл 3 % NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Контроль: вместо сыворотки крови берут 0,1 мл дистиллированной H₂O. Обе пробы инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Измеряют интенсивность окраски опытной пробы против контроля при длине волны 330 нм.

Расчёт. Содержание белка в пробах выражают в мг/мл, определяя его по калибровочному графику, построенному по 7 разведениям стандартного раствора альбумина (5 мг/мл) с содержанием белка 0,1; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 и 5,0 мг/мл. Разведения обрабатывают аналогично опытной пробе.

г) метод Лоури

Принцип метода основан на реакции пептидных связей со щелочным раствором сульфата меди, протекающей с получением хелатных соединений фиолетового цвета, интенсивность окраски пропорциональна уровню белка.

Реактивы:

- 1) 20 г Na₂CO₃ и 0,5 г K,Na-виннокислого в 1 л 0,1 моль/л раствора NaOH;
- 2) 0,1 % раствор CuSO₄·5H₂O;
- 3) щелочной медный реактив готовят непосредственно перед употреблением, сливая 45 мл реактива № 1 и 5 мл реактива № 2;
- 4) 1N раствор реактива Фолина.

Материал исследования. Разведения сыворотки крови.

Ход работы. К 0,2 мл пробы добавляют 5 мл щелочного медного реактива, инкубируют 15 минут, добавляют 0,25 мл реактива Фолина, инкубируют 30–40 минут и измеряют оптическую плотность растворов при длине волны 750 нм. В контроль вместо пробы добавляют 0,2 мл дистиллированной воды.

Расчёт производят по калибровочной кривой.

д) метод Бредфорд

Принцип метода основан на способности красителя Кумасси голубого G-250 взаимодействовать с остатками аргинина и лизина в белках. Свободный краситель красного цвета имеет максимум поглощения при 495 нм и при образовании комплекса с белком переходит в синюю форму, имеющую максимум поглощения при 595 нм.

Реактивы:

Раствор Кумасси голубого G-250 (100 мг красителя, 50 мл 96° этанола, 100 мл 85 % H_3PO_4 , H_2O до 1,0 л).

Материал исследования. Разведения сыворотки или лизат клеток крови.

Ход работы. К 0,1 мл лизата клеток или разведенной сыворотки крови добавляют 1,0 мл раствора Кумасси голубого, перемешивают, инкубируют 3 мин при комнатной температуре и измеряют оптическую плотность пробы при длине волны 595 нм против контроля, содержащего 0,1 мл воды и 1,0 мл раствора Кумасси голубого.

Расчёт. Содержание белка в пробах выражают в мг/мл, определяя его по калибровочному графику, построенному по разведениям стандартного раствора альбумина (1,0 мг/мл). Разведения обрабатывают аналогично опытной пробе.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Биохимия / под ред. проф. Е. С. Северина – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 768 с.
2. Клиническая лабораторная диагностика. Интерпретация результатов лабораторных исследований: учебное пособие / под ред. Н. В. Канской. – Томск : Изд-во СибГМУ, 2015. – 129 с.
3. Методы клинических лабораторных исследований / под ред. проф. В. С. Камышникова. – 6-е изд., перераб. – М. : МЕДпресс-информ, 2013. – 736 с.
4. Долгов, В. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство в 2-х томах / В. Долгов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 978 с.

Дополнительная

1. Кишкун, А. А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие / А. А. Кишкун. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 976 с.
2. Маколкин, В. И. Внутренние болезни: учебник / В. И. Маколкин, С. И. Овчаренко, В. А. Сулимов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 768 с.
3. Мухин, Н. А. Пропедевтика внутренних болезней: учебник. – 2-е изд., доп. и перераб. / Н. А. Мухин, В. С. Моисеев. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 848 с.
4. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов: учебное пособие / под ред. В. Ю. Сереброва, Г. А. Сухановой. – Томск, 2008. – 191 с.
5. Суханова, Г. А. Апоптоз : учебное пособие / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева. – Томск : Изд-во ТПУ – 2006. – 172 с.
6. Суханова Г. А. Биохимия клетки / Г. А. Суханова, В. Ю. Серебров. – Томск : Чародей. – 2000. – 184 с.
7. Маянская, Н. Н. Биохимические основы профилактики и лечения заболеваний полости рта: учебно-методическое пособие для студентов стоматологического факультета и врачей / Н. Н. Маянская. – Новосибирск, 2000. – 46 с.
8. Гринштейн, Б. Наглядная биохимия / Б. Гринштейн, А. Гринштейн. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2000. – 110 с.
9. Биохимия: краткий курс с упражнениями и задачами / ред. Е. С. Северин, А. Я. Николаев. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 448 с.
10. Жаворонок, Т. В. Практикум по биологической химии и биохимии полости рта / Т. В. Жаворонок, О. А. Тимин. – Томск : СибГМУ, 2016.– 232 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Список сокращений.....	5
РАЗДЕЛ I. АФК И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ: ОРГАНИЗМ И КОМПАРТМЕНТЫ КЛЕТКИ	6
ТЕМА 1.1. Кислород, АФК и окислительные процессы в клетке и внеклеточном матриксе	6
ЗАНЯТИЕ 1.1.1. Кислород и обмен веществ. Источники и пути генерации АФК.....	6
ЗАНЯТИЕ 1.1.2. Кислород и компартменты клетки. Участие АФК в метаболизме клетки и организма	8
ТЕМА 1.2. Двойственная природа АФК. Антиоксиданты и прооксиданты – две стороны одного целого	13
ЗАНЯТИЕ 1.2.1. Двойственная природа АФК. Прооксиданты, антиоксиданты и окислительный стресс	13
ТЕМА 1.3. Механизмы окислительной модификации Макромолекул	19
ЗАНЯТИЕ 1.3.1. Окислительная модификация макромолекул и субстраты окисления – белки, липиды, нуклеиновые кислоты	19
ЗАНЯТИЕ 1.3.2. Механизмы перекисного окисления липидов	21
ЗАНЯТИЕ 1.3.3. Механизмы окислительной модификации белка.....	22
ЗАНЯТИЕ 1.3.4. Свойства и значение продуктов окислительной модификации макромолекул	24
ТЕМА 1.4. Система антиоксидантной защиты	30
ЗАНЯТИЕ 1.4.1. Система антиоксидантной защиты клетки и организма. Неферментативные компоненты	30
ЗАНЯТИЕ 1.4.2. Ферменты антиоксидантной защиты.....	32
ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ по разделу I	38
РАЗДЕЛ II. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ОРГАНИЗМЕ И ПОЛОСТИ РТА	40
ТЕМА 2.1. АФК и свободнорадикальные интермедиаты в патохимии биологических процессов клетки.....	40
ЗАНЯТИЕ 2.1.1. АФК: патохимия, повреждение и гибель клетки	40
ЗАНЯТИЕ 2.1.2. Плазматическая мембрана, перекисное окисление липидов и перекисный тип повреждения клетки	42

ЗАНЯТИЕ 2.1.3. Межклеточные контакты, гликокаликс и внеклеточный матрикс при окислительном стрессе.....	44
ЗАНЯТИЕ 2.1.4. Пероксисомы и перекисные системы, роль при перекисном повреждении клетки	48
ЗАНЯТИЕ 2.1.5. Эндоплазматическая сеть, микросомальное окисление и АФК. Токсический тип повреждения клетки	49
ЗАНЯТИЕ 2.1.6. Митохондрии, дыхательные ферменты и АФК. Гипоксический тип повреждения клетки	52
ЗАНЯТИЕ 2.1.7. Лизосомы и апластический тип повреждения клетки. Лизосомные болезни накопления	54
ЗАНЯТИЕ 2.1.8. АФК, свободнорадикальные интермедиаты и гибель клетки	54
ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ по теме 2.1	58
ТЕМА 2.2. Окислительный стресс в механизмах развития заболеваний	60
ЗАНЯТИЕ 2.2.1. Свободно-радикальные патологии. Лучевая болезнь. Тепловой и солнечный ожог. Воспаление. Пневмония, бронхиальная астма.....	60
ЗАНЯТИЕ 2.2.2. Окислительный стресс в механизмах старения, дисметаболического синдрома, диабета, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и опухолевых заболеваний.....	61
ТЕМА 2.3. Окислительный стресс в механизмах формирования патологии тканей полости рта	68
ЗАНЯТИЕ 2.3.1. Влияние прооксидантов и окислительного дисбаланса на ткани полости рта.....	68
ЗАНЯТИЕ 2.3.2. Нейтрофилы и токсиканты в патохимии тканей полости рта	68
ЗАНЯТИЕ-КОНФЕРЕНЦИЯ по темам 2.2–2.3.....	72
ТЕМА 2.4. Активные формы кислорода и антиоксиданты в механизмах защиты тканей полости рта	73
Занятие 2.4.1. Витамины-антиоксиданты в профилактике и лечении заболеваний полости рта	73
Занятие 2.4.2. Белки и ферменты антиоксидантной защиты тканей и жидкостей полости рта при патологии.....	75
Занятие 2.4.3. АФК, макрофаги, лейкоциты в защите тканей полости рта	76
ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ по темам 2.2–2.4.....	82
Итоговый зачёт	84
Ответы на тестовые задания	87
Приложения.....	88
Рекомендуемая литература	98

Учебное издание

Татьяна Васильевна Жаворонок

**Лабораторный практикум
по курсу
«Активные формы кислорода
в метаболизме тканей полости рта»**

**для студентов лечебного факультета
(по специальности «Стоматология»)**

Учебное пособие

Редактор А.Ю. Коломийцев
Технический редактор О.В. Коломийцева
Обложка И.Г. Забоенкова

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
Тел.: 8(3822) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 20.06.18
Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ.л. 7,4. Авт.л. 5.
Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru