

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
**«Томский национальный исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук»**

**Г.А. Суханова, Д.И. Кузьменко,  
В.Ю. Серебров, Л.В. Спирина**

**Медицинская биохимия:  
патохимия, диагностика. Интегративная  
биохимия. Регуляция метаболизма**

практикум

Томск  
Издательство СибГМУ  
2018

УДК 577.1:616-098](075.8)

ББК 52.57я73+52.526я73

М422

**М422 Медицинская биохимия: патохимия, диагностика. Интегративная биохимия. Регуляция метаболизма: практикум / Г.А. Суханова, Д.И. Кузьменко, В.Ю. Серебров, Л.В. Спирина. – Томск: Издательство СибГМУ, 2018. – 112 с.**

Практикум подготовлен в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по специальности 30.05.01 – Медицинская биохимия. В нем представлены механизмы повреждения и гибели клеток, а также методы, необходимые для работы с биологическим материалом в экспериментальных условиях.

Каждая тема в пособии разделена на информационный и экспериментальный блок. В информационном блоке представлено обоснование, практическое применение биохимических методов в медицине. Экспериментальный блок состоит из лабораторных работ и семинаров, выполнение которых позволит сформировать необходимые компетенции для работы в биохимической лаборатории.

Полученные знания помогут найти правильные решения в условиях работы научной и клинико-диагностической лаборатории, интерпретировать результаты исследований биохимических процессов в норме и патологии, планировать проведение экспериментального исследования, совершенствовать существующие и разрабатывать новые методы диагностики и лечения.

УДК 577.1:616-098](075.8)

ББК 52.57я73+52.526я73

**Рецензент:**

**Медведев М.А.** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой нормальной физиологии СибГМУ.

*Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати: Методической комиссией МБФ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 2 от 27.12.2016 г.).*

© Г.А. Суханова, Д.И. Кузьменко,  
В.Ю. Серебров, Л.В. Спирина, 2018.  
© Издательство СибГМУ, 2018.

# СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	5
<b>РАЗДЕЛ I. ПАТОХИМИЯ. ДИАГНОСТИКА.....</b>	<b>7</b>
<b>ТЕМА 1. ЛИПИДЫ И БЕЛКИ МЕМБРАН.....</b>	<b>7</b>
<b>Лабораторная работа № 1. Выделение мембран эритроцитов из крови доноров.....</b>	<b>10</b>
<b>Лабораторная работа № 2. Выделение митохондрий из печени крыс.....</b>	<b>14</b>
<b>ТЕМА 2. ТИПЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ГИБЕЛИ КЛЕТОК.....</b>	<b>20</b>
<b>Лабораторная работа. Определение активности каспаз с использованием синтетических субстратов.....</b>	<b>21</b>
<b>Семинар. Апоптоз и некроз.....</b>	<b>27</b>
<b>ТЕМА 3. МАРКЕРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ... ..</b>	<b>29</b>
<b>Лабораторная работа № 1. Определение активности 5'-нуклеотидазы.....</b>	<b>29</b>
<b>Лабораторная работа № 2. Определение активности кислой фосфатазы в гомогенате печени.....</b>	<b>32</b>
<b>Лабораторная работа № 3. Определение активности глюкозо-6-фосфатазы.....</b>	<b>35</b>
<b>Семинар. Локализация ферментов в клетке.....</b>	<b>38</b>
<b>ТЕМА 4. ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ.....</b>	<b>39</b>
<b>Лабораторная работа № 1. Определение <math>H^+</math> АТФ-азной активности.....</b>	<b>39</b>
<b>Лабораторная работа № 2. Определение поглощения кислорода полярографическим методом.....</b>	<b>41</b>
<b>Семинар. Энергетическая функция митохондрий и митохондриальные болезни человека.....</b>	<b>48</b>
<b>ТЕМА 5. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ.....</b>	<b>50</b>
<b>Лабораторная работа № 1. Определение содержания малонового диальдегида.....</b>	<b>50</b>
<b>Лабораторная работа № 2. Определение содержания карбонильных производных окисленных белков.....</b>	<b>53</b>
<b>Лабораторная работа № 3. Определение активности каталазы.....</b>	<b>56</b>

<b>Лабораторная работа № 4.</b> Определение содержания нитрит-ионов в конденсате выдыхаемого воздуха и сыворотке крови.....	58
<b>Семинар.</b> Окислительный стресс: роль в патологии.....	62
<b>Семинар.</b> Микросомальное окисление: значение для диагностики.....	63
<b>Задание для самостоятельной работы</b> .....	65
<b>РАЗДЕЛ II. ИНТЕГРАТИВНАЯ БИОХИМИЯ. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА</b> .....	67
<b>Лабораторная работа № 1.</b> Кинетика ферментативного катализа и применение ингибиторного анализа. Кинетические свойства аспартаткарбамоилтрансферазы.....	67
<b>Лабораторная работа № 2.</b> Определение активности катепсина D...	72
<b>Лабораторная работа № 3.</b> Выделение препарата G-актина из скелетных мышц крыс.....	76
<b>Семинар.</b> Законы классической ферментативной кинетики. Ингибиторы и ингибиторный анализ неаллостерических ферментов.....	78
<b>Семинар.</b> Особенности кинетики ферментативного катализа с участием аллостерических (регуляторных) ферментов.....	80
<b>Семинар.</b> Интеграция и регуляция метаболизма углеводов, липидов и белков.....	81
<b>Семинар.</b> Система циклических нуклеотидов – вторичных мессенджеров.....	82
<b>Семинар.</b> Фосфоинозитидная система вторичных мессенджеров. МАПК-сигнальный путь.....	84
Ситуационные задачи.....	86
Тестовые задания.....	88
Вопросы для подготовки к зачету.....	103
Ответы на тестовые задания.....	105
Ответы к ситуационным задачам.....	107
Рекомендуемая литература.....	110

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДНФГ	– альдегидные динитрофенилгидразоны
ГЛЮТ4	– глюкозный транспортёр 4
ДАГ	– диацилглицерол
ИФ3 (IP3)	– инозитол-1'4'5'-трифосфат
КДНФГ	– кетоновые динитрофенилгидразоны
МДА	– малоновый диальдегид
ОМБ	– окислительная модификация белков
ПКА	– протеинкиназа А (цАМФ-активируемая протеинкиназа)
ПКС	– протеинкиназа С
ПКС-ξ	– протеинкиназа С-дзета – атипичная форма протеинкиназы С
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ПР	– прогестероновые рецепторы
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ТБК	– тиобаритуровая кислота
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
ФИТЦ	– флуоресцеинизотиоцианат
ФИФ2	– фосфатидилинозитол-4, 5-бисфосфат
ФЛ С	– фосфолипаза С
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
АКАР	– белок, заякоряющий протеинкиназу А
ALK	– анапластическая лимфомная киназа;
CREB	– cAMP responsive elements binding protein или белок, связывающийся с цАМФ-респонсивным элементом ДНК
ERK	– extracellular signal regulated kinase или киназа, регулируемая

	внеклеточными сигналами; систематическое название –
	МАП-киназа (МАПК), серин-треониновая протеинкиназа
Gbr2	– Growth factor receptor-bound protein 2 или белок-2, связывающийся с рецептором фактора роста
GPCR	– G-protein coupled receptor или рецептор, сопряжённый с G-белком
Gas, Gai,	– $\alpha$ -субъединицы G-белка: s – стимулятор аденилатциклазы
Gaq	– i-ингибитор аденилатциклазы; q-активатор ФЛ С
HEPES	– 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
CHAPS	– 3-[(3-холамидопропил) диметиламмоний]-1-пропансульфонат
IRS-1	– субстрат рецептора инсулина-1
JAK	– Janus kinase или Янус киназа
MAPK	– митоген активируемая протеинкиназа
MEK	– mitogen extracellular signal regulated kinase или киназа, регулируемая внеклеточным митогенным сигналом
NFkB	– ядерный транскрипционный фактор kB (каппа B)
NOS	– NO-синтаза
iNOS	– индуцибельная NO-синтаза
PDK-1	– протеинкиназа-1, зависящая от 3-фосфоинозита
PKB (ПКВ)	– протеинкиназа B
Raf	– Rapidly accelerated fibrosarcoma, серин-треониновая протеинкиназа
Ras	– rat sarcoma или мембранный белок (малый G-белок) – активатор серин-треониновой протеинкиназы Raf
SH2	– Src homology 2 domain или домен Src гомологии 2
SH3	– Src homology 3 domain или домен Src гомологии 3
SOS/GEF	– son of sevenless/guanine nucleotide exchange factor
STAT	– signal transducers and activation transcription

# РАЗДЕЛ I

## ПАТОХИМИЯ, ДИАГНОСТИКА

### ТЕМА 1. ЛИПИДЫ И БЕЛКИ МЕМБРАН

#### *Информационный блок*

#### **Состав клеточных мембран**

**Плазматическая мембрана** образует границу, на которой осуществляется контакт клетки с ее окружением. Она содержит специализированные компоненты, участвующие в межклеточных контактах, в системах гормонального ответа и транспорта малых и больших молекул через мембрану клетки.

**Эндоплазматический ретикулум** – сложная сеть структур, которая занимает значительную часть внутреннего объема клетки. Основная роль ЭР состоит в том, что он служит местом биосинтеза белков, которые затем секретируются и включаются в другие структуры. Здесь осуществляется биосинтез стеролов, протекают реакции детоксикации и происходит десатурация жирных кислот с участием цитохромов P450 и b<sub>5</sub>.

**Лизосомы** – органеллы, участвующие в деградации биополимеров, содержат гидролитические ферменты. В лизосомах происходит расщепление внеклеточных биополимеров, поступающих в клетку путем эндоцитоза, а также при аутофагоцитозе внутриклеточных компонентов.

**Пероксисомы** содержат ферменты оксидазы, участвующие в деградации малых молекул, таких, как аминокислоты, ксантин, жирные кислоты. Их название связано с метаболизмом перекиси водорода.

**Митохондрии.** В этих органеллах осуществляется окислительное фосфорилирование, в результате которого образуется АТФ. Митохондрии имеют двуслойную мембрану. Внутренняя мембрана образует кристы и содержит ферменты, участвующие в транспорте электронов и синтезе АТФ.

#### **Функции мембран:**

- 1) представляют собой полупроницаемые барьеры – защитная функция для клеток и внутриклеточных органелл;
- 2) осуществляют избирательный транспорт различных веществ внутрь клетки;
- 3) передача информации посредством гормонов, медиаторов, нервного импульса;
- 4) преобразование энергии (синтез АТФ осуществляется на внутренних мембранах митохондрий за счет энергии трансмембранного градиента концентраций протонов);
- 5) процессы молекулярного узнавания происходят на мембранах клеток, где располагаются рецепторы гормонов, молекулы иммунной системы;

- б) ферментативная деятельность мембран связана с координацией всех биохимических реакций, протекающих в клетке.

### Выделение мембранных структур

**Процесс выделения клеток** начинается с разрушения тканей и клеток, обычно путём гомогенизации. При работе с животными клетками этот процесс проводят в гомогенизаторах со стеклянными стенками и тефлоновым пестиком. При такой обработке разрушается плазматическая мембрана, а также связи между клеточными органеллами при сохранении их целостности. Большое значение при разрушении клеток имеет правильный выбор среды. Для того чтобы сохранить целостность мембранных органелл, следует использовать среду, изотоничную их внутреннему содержимому. Чаще всего для этого используют раствор 0,25 М сахарозы.

Кроме чисто механического воздействия на обрабатываемую ткань процедуры включают комбинацию щадящих механических воздействий с обработкой ткани ферментами (обычно коллагеназой и гиалуронидазой) или хелатообразующими агентами, например, ЭДТА, который препятствует ассоциации клеток. Для разделения клеточных органелл и фрагментов мембран, содержащихся в гомогенате, пользуются методами центрифугирования, позволяющими фракционировать частицы по размеру и плотности.

При **дифференциальном центрифугировании** частицы оседают с различной скоростью, которая зависит от их размеров. В обычных условиях центрифугирования в первую очередь оседают наиболее крупные частицы (ядра) и в последнюю очередь – наиболее мелкие (микросомы и рибосомы). При **изоплотностном центрифугировании** частицы оседают в среде с градиентом плотности до тех пор, пока не попадут в зону, где плотность среды такая же, как и у них самих. Частицы, имеющие низкую плотность, характеризуются, как правило, высоким содержанием липидов, а частицы с высокой плотностью – высоким содержанием белка и (или) нуклеиновых кислот.

Для разделения фракций используют **непрерывный градиент**, когда плотность постепенно увеличивается от вершины пробирки к ее дну, либо **ступенчатый градиент**, когда в пробирку наслаиваются один за другим несколько слоев с различной плотностью. Альтернативный вариант предусматривает поддержание постоянной тоничности всего раствора с помощью низкомолекулярных веществ и создание градиента плотности высокомолекулярных веществ, таких, как полисахароза (фиколл).

Существуют два способа фракционирования субклеточных частиц: во-первых, **аналитическое центрифугирование**, с помощью которого решаются вопросы внутриклеточной локализации отдельных компонентов; во-вторых, **препаративное центрифугирование**, которое применяют в том случае, когда в задачу исследования входит подробное изучение свойств отдельных внутриклеточных компонентов. Для характеристики выделенных фракций применяются методы световой и электронной микроскопии, а также различные марке-



ры, посредством которых измеряют относительное содержание меченного маркером компонента в исходном гомогенате и в выделенной фракции.

Для выделения мембран из клеточных гомогенатов используют также другие методы:

- *Фазовое распределение*. Разделение мембранных частиц происходит в соответствии с их поверхностными свойствами – с этой целью формируют два или три несмешивающихся слоя водных растворов различных полимеров (полиэтиленгликоля, декстрана, фикоλλα), и мембранные частицы разделяются в соответствии с их сродством к этим фазам.

- *Непрерывный электрофорез в свободном потоке*. В этом случае разделение мембранных частиц происходит в соответствии с их электрическим зарядом.

- *Аффинная адсорбция*. Разделение основано на биоспецифическом взаимодействии между мембранными компонентами и твердой фазой, к которой ковалентно присоединены антитела. Чаще всего метод используют для выделения мембранных белков.

### **Определение чистоты выделения мембранных фракций**

Объективным критерием чистоты выделенной мембранной фракции является присутствие компонента, который содержится только в этой мембране или является в ней преобладающим. Обычно такими компонентами служат ферменты, называемые в этом случае **маркерами**. При определении активности фермента следует принимать во внимание, что он может находиться в латентной форме, например, благодаря тому, что локализуется на внутренней поверхности выделяемых мембранных везикул. По распределению маркеров в выделенных фракциях можно судить о содержании в них искомым компонентов (табл. 1).

Количественные измерения, проводимые с помощью маркеров в препаративных экспериментах, могут служить критерием того, насколько материал загрязнен посторонними примесями. Для детального химического или физического анализа органелл очень важно, чтобы степень чистоты исследуемого материала была достаточно высокой.

В аналитических экспериментах данные по распределению маркеров дают возможность судить о наличии в препарате тех компонентов, которые локализованы в тех же областях клетки, что и маркеры. Подобные подходы оказываются особенно важными при идентификации ферментов, входящих в состав органелл, таких как плазматическая мембрана или лизосомы, составляющих по массе лишь небольшую часть клетки и поэтому труднодоступных в чистом виде.

Следует подчеркнуть, что при изучении каждой мембранной фракции, а также специализированных мембран возникает целый комплекс вопросов, требующих конкретного решения, и открываются широкие возможности для биохимических исследований.

Основным интегральным белком является белок полосы 3, осуществляющий транспорт анионов через мембрану. Его N-конец находится с цитоплазматической стороны, а С-конец расположен с наружной стороны мембраны. Периферические белки взаимодействуют друг с другом, образуя двумерный кар-

кас, выстилающий внутреннюю поверхность эритроцитарной мембраны, который называют мембранным скелетом. Он содержит около 50 % общего количества белков эритроцитарной мембраны. Его основными компонентами являются спектрин (полосы 1 и 2), актин (полоса 5), а также белки полосы 4.1. и 4.9. Считают, что актин-спектриновая сеть с помощью якорного белка анкирина связана с фосфолипидным матриксом через цитоплазматический участок белка полосы 3.

Таблица 1

Маркерные ферменты мембранных фракций

Мембранная фракция	Маркерный фермент
Плазматические мембраны	5'-Нуклеотидаза
	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -АТРаза
	Аденилатциклаза
Митохондрии (внутренняя мембрана)	Цитохром с-оксидаза
	Сукцинатдегидрогеназа
Митохондрии (наружная мембрана)	Моноаминоксидаза
Лизосомы	Кислая фосфатаза
	Катепсин D
Пероксисомы	Каталаза
	Уратоксидаза
Эндоплазматический ретикулум	Глюкозо-6-фосфатаза
	NADPH-цитохром с-оксидоредуктаза
Цитозоль	Лактатдегидрогеназа

Липиды в мембранах эритроцитов находятся почти исключительно в форме бислоя. По данным ЯМР, в эритроцитах человека таких липидов не менее 9 %. Вязкость липидного бислоя мембран эритроцитов выше, чем для других мембран. Это обусловлено высоким содержанием в них холестерина.

### Экспериментальный блок

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

### ВЫДЕЛЕНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ИЗ КРОВИ ДОНОРОВ

#### Введение

Удобной моделью для изучения структурно-функциональных модификаций биомембран, индуцированных воздействием целого ряда физико-химических агентов, являются мембраны эритроцитов или так называемые «тени эритроцитов».

Определение концентрации белка – одна из необходимых процедур в биохимической практике. Концентрацию белка определяют при выделении, разделении и очистке белковых фракций, исследовании активности ферментов. При выделении препарата мембран оценивают количественный выход белка. Метод Лоури (1951) – наиболее распространенный и высокочувствительный метод определения концентрации белка, основанный на измерении интенсивности окраски раствора, зависящей от концентрации белка.

*Цель работы:*

Выделить мембраны эритроцитов из крови и определить в них содержание белка.

*Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой выделения мембран и определения содержания белка в мембране эритроцитов.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Выполнить лабораторную работу с использованием донорской крови.
5. Оценить полученные результаты.
6. Сравнить с данными литературы.
7. Сделать выводы по работе.

*Принцип метода:*

1. Метод получения мембран эритроцитов, свободных от гемоглобина, включает выделение эритроцитов из крови и их гемолиз в буферной системе с низкой ионной силой, с последующим центрифугированием. После центрифугирования супернатант удаляется. В результате получают чистые мембраны, свободные от гемоглобина. Для выделения эритроцитарных мембран используют метод осмотического гемолиза и отмывки мембран в гипотоническом буфере (метод Доджа). Выделенные мембраны (тени эритроцитов), полученные путем гипоосмотического гемолиза и отмывые от гемоглобина в гипотоническом буфере, содержат около 50 % белков, 43 % липидов и 7 % углеводов. Основная часть углеводов (93 %) связана с белками, остальная – с липидами. Отношение белков к липидам составляет величину 1:1.

2. При взаимодействии белка с реактивами, происходят две цветные реакции на белок. Одна из них – биуретовая реакция между пептидными группами и ионами меди. Возникающая сине-фиолетовая окраска обусловлена образованием комплексного соединения – биуретового медного комплекса.

Вторая реакция – это реакция реактива Фолина с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами молекулы белка. Это реакция восстановления смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот (реактив Фолина) с образованием комплексного соединения синего цвета. Эта реакция не очень специфична, но высокочувствительна. Преимущество метода Лоури состоит в возможности определения белка в сильно разбавленных растворах (десятки мкг).

*Материал исследования:* кровь доноров с антикоагулянтом.

*Реактивы:*

- хлорид натрия;
- трисгидроксиметиламинометан (трис);
- соляная кислота;
- этилендиаминтетраацетат (ЭДТА);
- вольфрамат натрия  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;
- молибдат натрия  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;
- 80 % раствор фосфорной кислоты;
- концентрированная соляная кислота;
- сульфат лития, бром, гидроксид натрия, карбонат натрия, тартрат натрия, сульфат меди, альбумин.

*Оборудование:*

- центрифужные пробирки;
- центрифужные весы;
- центрифуга MPW-360, центрифуга ЦЛР-1;
- рН-метр;
- пастеровские пипетки;
- фотоэлектроколориметр или спектрофотометр;
- стеклянные пробирки;
- автоматические пипетки;
- фильтровальная бумага.

*Проведение анализа:*

*Выделение мембран эритроцитов*

1. Кровь (20 мл) с антикоагулянтом (3,8 % раствор цитрата натрия в соотношении кровь: цитрат 9:1) центрифугировать при 3000 об/мин на центрифуге MPW-360 в течение 10 мин.
2. Плазму и верхний слой лейкоцитов аккуратно отобрать пастеровской пипеткой и удалить.
3. Эритроциты три раза промыть охлажденным раствором, содержащим 0,145 моль/л NaCl в 0,02 моль/л трис-HCl буфере (pH 7,6 при 20 °C), каждый раз осаждая клетки в том же режиме (3000 об/мин в течение 10 мин).
4. Мембраны эритроцитов получают с помощью гипоосмотического гемолиза их раствором, содержащим 10 ммоль/л ЭДТА в 10 ммоль/л трис-HCl буфере (pH 7,6 при 20 °C).
5. Для этого один объем отмытых эритроцитов быстро и энергично перемешать с 20 объемами охлажденной до +4 °C гемолизирующей среды и выдержать при этой температуре в течение 15 мин.
6. Гемолизат центрифугировать на центрифуге ЦЛР-1 при 18000 об/мин в течение 15 мин.
7. Надосадочную жидкость удалить, а осадок мембран промыть три раза 20 объемами 10 ммоль/л трис-HCl буфера (pH 7,6 при 20 °C), каждый раз осаждая мембраны в том же режиме. В экспериментах использовать свежеприготовленную суспензию мембран.

*Определение концентрации белка мембран  
по методу Лоури*

*Приготовление реактива Фолина*

1. Сто грамм вольфрамата натрия и 25 г молибдата натрия растворить в 700 мл воды в круглодонной колбе на 1 л, снабженной пришлифованным холодильником Либиха.
2. Добавить 50 мл 80 % фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной соляной кислоты.
3. Поместить в колбу несколько капилляров. Смесь кипятить в колбе с обратным холодильником в течение 10 ч.
4. Далее прибавить 150 г сульфата лития, 50 мл воды и несколько капель брома. Для удаления избытка брома кипятить содержимое колбы в течение 15 мин без обратного холодильника под тягой.
5. Раствор охладить, довести водой до 1 л и пропустить через стеклянный фильтр. Реактив Фолина хранить в химической посуде из темного стекла.
6. На всех этапах приготовления реактива цвет реакционной смеси должен быть желтым. Реактив Фолина титровать 1 н раствором щелочи, и на основании полученных данных рассчитывают его кислотность.
7. Перед использованием реактив Фолина разбавить водой до кислотности, соответствующей 1 н раствору соляной кислоты.
8. Далее готовить рабочий раствор: в цилиндр на 100 мл наливать 50 мл 2 % раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , в отдельную пробирку – 0,5 мл 2 % тартрата натрия и 0,5 мл 1 % сульфата меди. Содержимое пробирки выливать в цилиндр и образовавшейся смесью ополаскивать пробирку и опять выливать в цилиндр. Смесь перемешать и оставить на 10 мин.

*Определение концентрации белка*

1. В пробирки разлить по 0,1 мл суспензии мембран, затем – по 0,1 мл 0,4 н раствора  $\text{NaOH}$  (пробирки можно нагреть для лучшего растворения белка).
2. Добавить бидистиллированную воду до 0,4 мл. Смешать с 2 мл рабочего раствора, перемешать содержимое пробирок и оставить при комнатной температуре на 10 мин.
3. Затем добавить 0,2 мл реактива Фолина, перемешать и оставить на 30–40 мин для развития окраски. Измерить оптическую плотность растворов при длине волны 750 нм на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре.
4. Содержание белка в пробах определить по калибровочному графику, построенному с использованием сывороточного альбумина. Для этого приготовить серию растворов белка с содержанием от 20 до 400 мкг в 1 мл. Определение ведут также, как и для опытных растворов, количество повторностей для каждой концентрации белка – не менее 5. Построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс содержание белка в пробе, а по оси ординат - оптическую плотность при 750 нм.

*Ответить на вопросы:*

1. Назвать виды гемолиза эритроцитов.
2. Что такое осмотический гемолиз, стадии осмотического гемолиза?
3. Охарактеризовать основные этапы получения «теней» эритроцитов.
4. Как оценить качество выделения мембран?
5. Какой метод применяется для определения количества белка выделенных мембран?
6. Что означает «количественный выход белка»?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

### ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС

#### *Введение*

Тканевые гомогенаты широко используются в экспериментальных исследованиях при изучении метаболизма органов, тканей, субклеточных фракций. Целью гомогенизации является разрушение структуры клеточных стенок и/или мембран. Гомогенат ткани может быть использован как материал для исследования активности ферментов, содержания различных метаболитов, а также для дальнейшего фракционирования клеточных компонентов.

Выбор метода разрушения клеточной структуры и среды выделения зависит от ткани и от целей исследования.

Все этапы и процедуры приготовления гомогената проводят на холоде. Оптимальная температура составляет +2 °С. Посуда, инструменты и растворы, используемые для получения гомогената, должны быть предварительно охлаждены до этой температуры.

Навеску ткани, отмытую от крови, быстро измельчают ножницами или пропускают через металлический пресс. Все процедуры проводятся максимально быстро и на холоде. Для приготовления гомогената тканей из таких органов, как печень, селезенка, тимус, с целью максимального сохранения клеточных структур чаще всего используют стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком типа Поттера и Даунса – соответственно с ручным или механическим приводом.

Эффективность гомогенизации зависит от скорости вращения пестика (800, 1000 или 2000 об/мин), зазора между пестиком и стаканом (обычно 0,14–0,16 мм), количества движений пестика вверх-вниз (8–10 движений) и времени гомогенизации (0,5–1,5 мин). Стакан гомогенизатора помещают в ледяную баню, полученный гомогенат фильтруют через один слой капрона или 3–4 слоя марли. Полученный гомогенат хранят в пробирках с крышками, помещенных в ледяную баню.

Результат гомогенизации можно контролировать морфологически с использованием так называемых «витальных» красителей: акридинового оранжевого, трипанового синего, определяя процент неразрушенных клеток, или биохимически, оценивая активность ферментов цитозоля и субклеточных частиц.

Среда выделения для гомогенизации тканей обычно имеет нейтральное значение рН и необходимое осмотическое давление, предохраняющее частицы от набухания и разрыва. Готовится она чаще всего на основе буферного раствора (обычно 50мМ трис-НСl, рН 7,4) с добавлением 0,25 М сахарозы или 0,2 М КСl. Иногда добавляют вещества, препятствующие инактивации ферментов (например, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), связывающий двухвалентные ионы металлов или глутатион, препятствующий окислению липидных компонентов).

Соотношение ткань: среда (вес/объём) может быть различным. Обычно готовят исходный 10 % гомогенат (1 г ткани на 9,0 мл среды).

**Дифференциальное центрифугирование.** Метод дифференциального центрифугирования разработан Кристианом Де Дювом (1955). Он основан на различиях в скорости седиментации (осаждения) частиц, отличающихся по размерам и плотности (удельному весу). Гомогенат ткани центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения, которое подбирают так, чтобы на каждом этапе осаждалась определенная субклеточная фракция. Осадок, получаемый на каждой из стадий процесса, отделяют от надосадочной жидкости и несколько раз промывают для получения относительно чистой осадочной фракции. Получить абсолютно чистый и гомогенный осадок практически невозможно. Вместе с тем, при условии максимального точного подбора скоростей центрифугирования, а также соблюдении ряда других методических правил, загрязнение каждой из субклеточных фракций можно минимизировать до допустимого уровня.

**Определение концентрации белка и неорганического фосфора.** Для работы с препаратами тканей, клеточной культурой, суспензией клеток необходимо пересчитывать концентрацию метаболитов и активность ферментов на содержание белка в образце с предварительным расчетом по калибровочному графику. Определение содержания неорганического фосфата необходимо для оценки активности маркерных ферментов, одним из продуктов реакций которых он является.

#### *Цель работы:*

Получить гомогенат печени, выделить митохондриальную фракцию из гомогената печени методом дифференциального центрифугирования по Weinbach и определить содержание белка и неорганического фосфата в образце.

#### *Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой получения гомогената, выделения митохондрий и определения содержания белка и фосфора в гомогенате и митохондриях печени крыс.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Подготовить калибровочные графики на фосфор и белок.
5. Выполнить лабораторную работу с использованием печени крысы.
6. Рассчитать содержание фосфора на г ткани и мг белка.

7. Оценить полученные результаты.
8. Сравнить с данными литературы.
9. Сделать выводы по работе.

*Принцип метода:*

В основе биуретового метода лежит способность ионов  $\text{Cu}^{2+}$  к образованию с пептидными связями молекул белка хелатных соединений фиолетового цвета в щелочной среде. Биуретовая реакция развивается в присутствии белков и пептидов, содержащих не менее 2-х пептидных связей. В щелочной среде происходит таутомерная перегруппировка по месту пептидных связей, в результате которой образуется стабильный комплекс, имеющий фиолетовую окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации белка в растворе. Биуретовый метод применяют при концентрации белка в исследуемом растворе от 1 до 10 мг/мл. Чувствительность биуретового метода составляет 1/16 от чувствительности метода Лоури.

Определение содержания неорганического фосфора методом В.Е. Боданского основано на образовании фосфомолибдата аммония с последующим восстановлением его аскорбиновой кислотой в молибденовую синь, количество которой пропорционально исходному содержанию фосфора.

*Материал исследования:* печень крысы.

*Реактивы:*

- среда для приготовления гомогената печени и выделения митохондриальной фракции: 0,25 М раствор сахарозы, содержащий 0,001 М динатриевой соли ЭДТА и 0,02 М трис-НСl буфер (рН 7,4);
- биуретовый реактив;
- стандартный раствор белка (альбумин) – 10 мг/мл;
- NaOH, 3 % раствор;
- основной стандартный раствор фосфора;
- 10 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);
- молибденовый реактив. 0,1 М раствор HCl;
- 1 % раствор аскорбиновой кислоты.

*Оборудование:*

- гомогенизатор;
- автоматические пипетки;
- колориметр или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

*Выделение митохондрий из печени крысы*

1. Приготовить среду для выделения митохондриальной фракции. Взвесить 85,58 г сахарозы, 2,42 г трис-основания и 0,292 г динатриевой соли ЭДТА и растворить в 1,0 л дистиллированной воды. Перед использованием среду следует охладить до +2 °С. До этой же температуры должны быть охлаждены все инструменты и посуда.



2. Печень быстро извлечь из брюшной полости крысы и дважды промыть охлаждённой средой для выделения и поместить в чашку Петри, стоящую на льду. Печень измельчить ножницами, снова промыть охлаждённой средой выделения. Кусочки печени в соотношении к среде выделения 1:9 (вес/объём) гомогенизировать в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (600–800 об/мин) в течение 40 с.
3. Полученный гомогенат разлить в пластмассовые центрифужные пробирки и центрифугировать 10 мин при 600 g в рефрижераторной центрифуге. Температура ротора центрифуги во время процедуры выделения митохондрий не должна превышать +2 °С.
4. Полученный супернатант слить в центрифужные пробирки и центрифугировать 10 мин при 8500 g. Осадок митохондрий ресуспендировать в среде для выделения, дважды отмыть и затем центрифугировать по 10 мин при 8500 g.
5. Рабочую суспензию митохондрий приготовить путём ресуспендирования осадка отмытых органелл в 0,2–0,25 мл среды выделения. Концентрация белка в полученной суспензии митохондрий должна составлять 25–35 мг/мл. Суспензию митохондрий хранить в пробирке с крышкой на ледяной бане. Рекомендуется все исследования с препаратом проводить в течение 1 часа после получения митохондриальной фракции.
6. Расчет относительного центробежного ускорения (g) в частоту вращения ротора центрифуги (об/мин) осуществляют по номограмме или с помощью формулы:

$$\text{Об/мин} = \sqrt{\frac{g}{1.11 \cdot 10^{-5} \cdot R}},$$

где g – требуемое относительное центробежное ускорение (600 g и 8500 g);  
R – радиус ротора центрифуги в см.

#### *Определение концентрации белка*

1. Приготовить биуретовый реактив. Для этого 0,75 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и 3 г реактива  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (натрий-калий виннокислый) последовательно растворить в 250 мл дистиллированной воды. К раствору при энергичном помешивании добавить 150 мл 10 % NaOH и 1 г KI. Общий объём раствора довести до 1,0 л.
2. Приготовить калибровочные пробы, используя представленную ниже таблицу. Для каждой точки на калибровочном графике определение выполнить трижды. В контрольной пробе вместо стандартного раствора белка использовать дистиллированную воду.
3. После доведения калибровочных проб дистиллированной водой до 1,0 мл во все пробирки добавить по 4,0 мл биуретового реактива и перемешать (таблица 2).
4. Инкубировать 30 мин при комнатной температуре. Затем измерить оптическую плотность при длине волны 540 нм в кюветах из оптического

стекла толщиной 5 мм против контроля (слепой пробы). Измерение оптической плотности начинать с раствора меньшей концентрации.

- По полученным данным построить калибровочную кривую в координатах зависимость оптической плотности (экстинкции) от концентрации белка в калибровочных пробах (мг в пробе, то есть в 1,0 мл).

Таблица 2

*Подготовка калибровочных проб для определения содержания белка биуретовым методом*

Проба	Стандартный раствор белка (мл)	Количество белка в пробе (мг)	H <sub>2</sub> O (мл)	Биуретовый реактив (мл)
Контроль	–	–	1,0	4,0
1	0,1	1	0,9	4,0
2	0,2	2	0,8	4,0
3	0,4	4	0,6	4,0
4	0,6	6	0,4	4,0
5	0,8	8	0,2	4,0
6	1,0	10	–	4,0

- Для количественного определения белка в биоматериале, его развести с помощью 3 % раствора NaOH. Щелочный раствор исследуемого материала взять в пробирку в объеме 1,0 мл и добавить к нему 4,0 мл биуретового реактива. Все дальнейшие процедуры провести, как описано выше. При расчете необходимо учесть степень разведения исходного материала 3 % раствором NaOH.

*Определение содержания неорганического фосфата*

- Приготовить реактивы. Для приготовления основного стандартного раствора фосфора 0,44 г KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> растворить в мерной колбе на 100 мл. Для приготовления рабочего стандартного раствора фосфата: 1,0 мл основного стандартного раствора перенести в мерную колбу на 100 мл и довести дистиллированной водой до метки. В 1,0 мл рабочего стандартного раствора будет содержаться 0,01 мг фосфора. Для приготовления молибденового реактива 2,5 г молибденово-кислого аммония растворить в 60,0 мл дистиллированной воды, фильтровать в мерную колбу на 100 мл. В другой колбе к 25,0 мл воды добавить 7,5 мл концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Работать с соблюдением правил техники безопасности! Второй раствор приливают к первому и доводят объём дистиллированной водой до метки. 1 % раствор аскорбиновой кислоты приготовить ex tempore на 0,1 М HCl.
- Для проведения анализа использовать лабораторную посуду, которая была вымыта с применением хромовой смеси. (Метод отличается чрезвычайно высокой чувствительностью, даже остаточные количества неорганического фосфата на стенках некачественно обработанной лабораторной посуды приводят к существенным искажениям результатов количественного анализа).

3. Построить калибровочный график, используя рабочий стандартный раствор фосфора согласно таблице 3. В 6 пробирок налить рабочий стандартный раствор, 10 % ТХУ и довести суммарный объем смеси в каждой пробирке дистиллированной водой до 9,0 мл.

Таблица 3

Построение калибровочного графика

Стандартный рабочий раствор $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (мл)	Количество фосфора (мкг) в пробе объемом 9,0 мл	10 % ТХУ (мл)	$\text{H}_2\text{O}$ (мл)	Количество фосфора (мкг) в пробе объемом 1,5 мл
0,6	6	2,5	5,9	1,0
1,2	12	2,5	5,3	2,0
2,4	24	2,5	4,1	4,0
3,6	36	2,5	2,9	6,0
4,8	48	2,5	1,7	8,0
6,0	60	2,5	0,5	10,0

4. При подготовке проб для калибровочного графика в состав смеси вводят ТХУ в связи с тем, что определение неорганического фосфата в биоматериале ведут в надосадочной жидкости после осаждения белка с помощью ТХУ. Для каждой точки на калибровочной кривой определение выполнить трижды.
5. Для этого из каждой пробы объемом 9,0 мл, в три чистые пробирки перенести по 1,5 мл смеси, затем во все пробирки добавить по 1,0 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты и по 1,0 мл молибденового реактива.
6. Параллельно поставить контрольную (слепую) пробу, содержащую 1,5 мл 10 % раствора ТХУ, 1,0 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты и 1,0 мл молибденового реактива.
7. Все пробы инкубировать 10 мин при комнатной температуре, затем измерить их оптическую плотность при длине волны 640 нм против контроля (слепой пробы).
8. По полученным данным построить калибровочный график в координатах: зависимость оптической плотности (экстинкции) от содержания неорганического фосфата в калибровочных пробах (мкг в пробе, то есть в 1,5 мл – указано в таблице).

*Ответить на вопросы:*

1. В чем заключается основной принцип получения гомогената ткани?
2. Какой метод используется для выделения митохондриальной фракции?
3. Как можно проверить чистоту выделения митохондрий?
4. С какой целью определяют содержание белка в субклеточных фракциях?
5. В чем заключается принцип метода определения содержания фосфата?
6. Для чего рассчитывают содержание фосфора (или другого метаболита) на 1 г ткани и 1 мг белка?

## ТЕМА 2. ТИПЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ГИБЕЛИ КЛЕТОК

### *Информационный блок*

Одна из важных задач биохимии заключается в изучении внутриклеточных процессов, однако живые клетки чрезвычайно разнообразны, что намного осложняет эту задачу. Поэтому в биохимии пользуются моделью клетки. Понятие «минимальная клетка» включает набор структур, обязательных для обмена веществ, энергии и самовоспроизведения. К таким структурам относятся:

- мембрана (плазматическая),
- митохондрии – источник энергии,
- ядро – носитель генетической информации,
- лизосомы – катаболические станции,
- эндоплазматический ретикулум – процессы детоксикации.

Одним из процессов, активно развивающихся при патологии мембранных структур, является перекисное окисление липидов. Активация гидролитических ферментов характерна для повреждения лизосом. Воздействие химических соединений, вызывает индукцию микросомальных оксигеназ, способствует удалению ксенобиотиков из организма или приводит к токсическому повреждению печени. **Типы повреждения**, связанные с характерными нарушениями биохимических процессов в клетке, составляют основу клинических проявлений заболеваний человека. Выделяют следующие типы повреждений: перекисный, гипоксический, токсический, апластический.

Существует **2 типа гибели** клеток: некроз и апоптоз.

*Некроз* обычно ассоциируется с действием экстремальных факторов, нарушением целостности мембраны, увеличением размеров клеток, набуханием органелл. Появление очагов некроза сопровождается воспалением. При некрозе происходит лизис внутриклеточных структур, разрыв их мембран. Ультраструктурные проявления некроза значительно отличаются от апоптотических. Ранние изменения при некрозе являются результатом повреждения клеточных мембран и снижения синтеза АТФ. Некроз обычно сопровождается воспалением, рассматривается как метаболическая катастрофа, вызванная тяжелыми структурными повреждениями.

*Апоптоз* гораздо более распространенное явление, чем некроз. При апоптозе происходит сморщивание клеток, уменьшение их объема, уплотнение гранул. Апоптоз является иммунологически инертным событием, гибнущие клетки подвергаются фагоцитозу макрофагами, но это не вызывает развития воспалительной реакции. Пути передачи апоптотического сигнала и других программ жизнедеятельности клеток часто переплетаются между собой, создавая сложную картину внутри- и межклеточных взаимодействий, составляющих основу регуляции клеточного роста, дифференцировки и гибели клеток.

## **Методы изучения апоптоза**

Существуют морфологические и биохимические методы изучения апоптотической гибели клетки. Самыми ранними проявлениями апоптоза, выявляемыми с помощью *морфологических методов* являются резко очерченные уплотнения ядерного хроматина. Результаты микроскопических исследований свидетельствуют о конденсации цитоплазмы и ядерного материала. Позже ядро распадается с образованием компактных апоптотических телец, которые ограничены плазматической мембраной. Трудности выявления апоптотических телец обусловлены быстрым разрушением и фагоцитозом их макрофагами или клетками окружения. Для количественной оценки используют апоптотический индекс, который характеризует количество клеток с морфологическими признаками апоптоза по отношению к общему количеству клеток.

Апоптоз сопровождается изменением размера и плотности клеток. Апоптотические клетки не окрашиваются такими красителями как трипановый синий или пропидий бромид, которые используют для выявления живых интактных клеток. Следует отметить отсутствие воспалительных явлений в тканях. С помощью *проточной цитофлуориметрии* можно обнаружить изменения размеров и плотности клеток, вызванных потерями молекул воды. Уменьшение размеров и увеличение плотности клеток при апоптозе наблюдается только на ранних стадиях апоптоза, когда еще не произошло образование апоптотических телец, что необходимо учитывать при использовании этого метода.

Перспективным является флуориметрический метод для определения активности каспаз. Активация каспаз происходит на ранних этапах апоптоза и определение их активности служит показателем инициации процесса. Метод основан на гидролизе каспазами флуоресцентного субстрата – амино4-флуорометилкумарина (AFC). В норме конъюгат AFC дает голубое свечение при 400 нм, но после протеолитического расщепления каспазами свободный аминофлуорометилкумарин дает желто-зеленое свечение при 505 нм. Типичная флуоресценция апоптотических клеток должна быть в 4–7 раз выше, чем в неиндуцированном контроле.

## ***Экспериментальный блок***

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА**

#### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАСПАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ**

##### ***Введение***

Каспазы играют центральную роль в запуске апоптоза. Последовательная активация каспаз начинается с активации инициаторной каспазы, которая в свою очередь активирует эффекторные каспазы. К инициаторным относится

каспаза 8, к эффекторным – каспаза 3. Механизмы запуска каспазного каскада могут осуществляться через рецепторный (внешний) и митохондриальный (внутренний) пути. Определение активности каспазы 3 позволяет выявить наличие апоптоза, а каспазы 8 – определить путь запуска программированной клеточной гибели.

*Цель работы:*

Определить активность каспазы-3 и каспазы-8 в лизате миокарда.

*Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с инструкциями определения активности каспаз спектрофотометрическим методом.
2. Подготовить реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Выполнить лабораторную работу с использованием лизата миокарда крыс.
5. Сделать необходимые расчеты.
6. Оценить полученные результаты. Сравнить с данными литературы.
7. Сделать выводы по работе.

*Принцип метода:*

Протеиназная активность каспаз определяется по образованию продукта реакции р-нитроанилина при 405 нм в лизате апоптотических клеток в пробах без ингибитора и в присутствии ингибитора.

*Материал исследования:* миокард крысы.

*Реактивы:*

- HEPES – буфер, 20 мМ;
- KCl, 10 мМ;
- магний хлористый, 1,5 мМ;
- дитиотреитол, 1 мМ;
- ингибиторы: AEBSF, апротинин, пепстатин А, лейпептин, бестатин, E-64;
- 5-кратный буфер для лизиса;
- 10-кратный реакционный буфер;
- каспаза 3 (лиофилизированный порошок);
- субстрат Ac-DEVD-pNA;
- ингибитор Ac-DEVD-CHO (альдегид ацетилтетрапептида);
- р-нитроанилин (стандарт) p-NA;
- каспаза 8 (лиофилизированный порошок);
- субстрат 20 мМ Ac-IETD-pNA в DMSO (хромогенное производное п-нитроанилида);
- ингибитор 1 мМ Ac-IETD-CHO в DMSO (альдегид ацетилтетрапептида);
- р-нитроанилин 10 мМ pNA в DMSO;
- вода «17 Мом».

#### *Оборудование:*

- аналитические весы;
- гомогенизатор;
- планшетный иммуноферментный анализатор SUNRISE (Tecan, Швейцария);
- бокс абактериальной воздушной среды БАВ-ПЦР «Ламинар-С» (Ламинарные системы, Россия);
- термостат электрический суховоздушный ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия).

#### *Проведение анализа:*

##### *Получение лизата клеток миокарда*

1. Приготовить среду для выделения, состоящую из 20 mM HEPES, pH 7,5; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ДТТ. К ней добавить коктейль ингибиторов протеаз (104 mM AEBSF, 0,08 mM аprotинин; 1,5 mM пепстатин А; 2 mM лейпептин; 4 mM бестатин; 1,4 mM E-64) в соотношении 100:1 (все реактивы фирмы «Sigma», США). Необходимость добавления ингибиторов протеаз обусловлена возможностью расщепления каспаз высвобождающимися из клеток протеолитическими ферментами или их дополнительной активации путем частичного протеолиза.
2. Ткань желудочков сердца крыс взвесить (навеска 300 мг), добавить среду для выделения в соотношении 1:3 (на 1 мг миокарда – 3 мкл среды) и измельчить в гомогенизаторе WiseTis с ротором 8 мм при скорости 4500 об/мин.
3. Гомогенаты центрифугировать при 15000 g в течение 30 мин при 4°C. Полученные супернатанты (лизаты) используют для оценки активности каспазы 3 и каспазы 8. Важным условием при гомогенизации тканей является проведение всех манипуляций при низкой температуре во избежание преждевременной активации ферментов. Осадок удаляют, прозрачный супернатант можно хранить при -70 °C.

#### **Определение активности каспазы 3**

1. Активность каспазы 3 определить с использованием набора «Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric» фирмы «Sigma», адаптированного к исследованию лизата клеток миокарда.
2. Приготовить раствор каспазы. Для этого добавить 50 мкл прилагаемой воды «17 МОм». Полученный раствор 100 мкг/мл каспазы 3 будет содержать 50 mM HEPES, 0,1 % CHAPS, 10 mM DTT, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % сахарозы. Активность полученного раствора >1 Ед/мг белка. При этом 1 Ед соответствует активности фермента, расщепляющего 1 мкМ субстрата в минуту при pH 7,4 и температуре 25 °C.
3. Приготовить 1-кратный реакционный буфер, содержащий 20 mM HEPES, pH 7,4; 0,1 % CHAPS, 5 mM DTT, 2 mM EDTA; 5 % сахароза. Для этого развести 10-кратный реакционный буфер в 10 раз прилагаемой водой «17 МОм».

4. Приготовить субстрат (20 мМ в DMSO). Развести содержимое флакона (15 мг) в 1,2 мл DMSO для получения основного раствора или 1 мг в 78,5 мкл DMSO. Полученный раствор хранить при -20 °С. Для планшетного исследования необходимо развести 20 мМ – основной раствор до 2 мМ 1-кратным реакционным буфером.
5. Приготовить ингибитор, 2 мМ в DMSO. Развести содержимое флакона (0,5 мг) в 500 мкл DMSO для приготовления основного раствора. Полученный раствор хранить при -20 °С. Для планшетного исследования необходимо развести 2 мМ – основной раствор до 200 мкМ 1-кратным реакционным буфером.
6. Приготовить положительный контроль каспазы 3. Развести содержимое флакона (5 мкг) 50 мкл прилагаемой воды «17 Мом» (100 мкг/мл). Хранить аликвоты при -70 °С. Непосредственно перед использованием разводят в 20 раз до 5 мкг/мл 1-кратным реакционным буфером, содержащим 1 мг/мл BSA или буфером для лизиса.
7. Приготовить раствор стандарта рNA для построения калибровочной кривой. Разводят содержимое флакона в 0,72 мл DMSO. Хранить основной раствор при -20 °С. Концентрацию основного раствора можно рассчитать, исходя из того, что оптическая плотность 1 моля при 405 нм составляет 10,5.
8. Приготовить 1-кратный буфер для лизиса (50 мМ HEPES, рН 7,4; 5 мМ CHAPS; 5 мМ DTT). Развести 5-кратный буфер для лизиса в 5 раз прилагаемой водой «17 Мом».
9. Поместить в лунку 10 мкл положительного контроля или 40 мкл клеточного лизата опытного образца и добавить 1-кратный реакционный буфер (таблица 4).

Таблица 4

Схема реакции для определения активности каспазы 3  
в 96-луночных планшетах

	Опытный образец	Каспаза 3 (5 мкг/мл)	1-кратный реакционный буфер	Ингибитор 200 мкМ	Субстрат 2 мМ
Бланк (отрицательный контроль)			90 мкл		10 мкл
Опытный образец	40 мкл		50 мкл		10 мкл
Опытный образец + ингибитор	40 мкл		40 мкл	10 мкл	10 мкл
Положительный контроль		10 мкл	80 мкл		10 мкл
Положительный контроль+ингибитор		10 мкл	70 мкл	10 мкл	11 мкл



10. Добавить ингибитор в соответствующую лунку и запустить реакцию с добавлением 10 мкл приготовленного субстрата и осторожного перемешивания встряхиванием. Необходимо избегать образования пузырьков.
11. Закрывать планшеты и инкубировать в течение 95 минут при 37 °С. Измерить в ИФА-ридере («Sunrise», Tecan) оптическую плотность каждые 10 минут при 405 нм.
12. Рассчитать результат с помощью калибровочного графика.
13. Построение калибровочного графика. Приготовить серию растворов п-нитроанилина с диапазоном концентраций от 10 до 200 мкМ путем разведения основного раствора 1-кратным реакционным буфером. Поместить в лунки по 100 мкл каждого раствора, включая 100 мкл реакционного буфера. Определить оптическую плотность при 405 нм и построить график зависимости оптической плотности от содержания нитроанилина в лунке.

### *Расчет активности каспазы 3*

$$\text{Скорость расщепления субстрата (нмоль/мин·мл)} = \frac{(A_{t_1} - A_t) \times d}{(A_{1\text{nmole}}) \times t \times v},$$

где  $v$  – объем образца (мл);

$d$  – разведение;

$t$  – время реакции в минутах;

$A_{1\text{nmole}}$  – оптическая плотность 1 нмоль рНА в лунке;

$A_t$  – оптическая плотность в  $t$  минут;

$A_{t_1}$  – оптическая плотность в  $t_1$  минут;

$t_1-t$  – период времени, в котором идет линейный рост активности каспазы.

Активность каспазы 3 рассчитывается по разнице скоростей расщепления субстрата в пробах без ингибитора и в присутствии ингибитора.

### **Определение активности каспазы 8**

1. Активность каспазы 8 определяют с использованием набора «Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric» фирмы «Sigma», адаптированного к исследованию лизата клеток миокарда.
2. Приготовить 1-кратный реакционный буфер (20 мМ HEPES, pH 7,4; 0,1 % CHAPS; 5 мМ DTT, 2 мМ EDTA, 5 % сахароза). Развести 10-кратный реакционный буфер в 10 раз прилагаемой водой «17 МОм».
3. Приготовить субстрат. Развести раствор субстрата в 10 раз 1-кратным реакционным буфером для получения 2мМ раствора. Добавление 50 мкл воды «17 МОм» приводит к получению раствора 100 мкг/мл каспазы 8 в 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 % CHAPS, 20 мМ 2-mercaptoethanol; 500 мМ NaCl; 2,5 мМ EDTA; 150 мМ имидазола; 10 % сахарозы. Активность полученного раствора >500 Ед/мг белка. 1 Ед соответствует количеству фермента, расщепляющему 1 нМ субстрата в минуту при pH 7,4 и температуре 25 °С.

4. Приготовить раствор ингибитора. Развести аликвоту раствора ингибитора в 40 раз 1-кратным реакционным буфером для получения 25 мкМ раствора.
5. Приготовить положительный контроль каспазы 8. Развести содержимое флакона (5мкг) с 50 мкл прилагаемой воды «17 МОм» (100 мкг/мл). Хранить аликвоты при -70 °С. Непосредственно перед использованием развести в 10 раз 1-кратным реакционным буфером до 10 мкг/мл в полипропиленовой пробирке и использовать в исследовании образец объемом 10 мкл. Все растворы необходимо готовить в полипропиленовых пробирках, так как каспаза 8 абсорбируется стеклянной поверхностью.
6. Приготовить раствор стандарта рНА. Развести раствор рНА в 50 раз 1-кратным реакционным буфером и построить калибровочную кривую.
7. Приготовить 1-кратный реакционный буфер для лизиса. Развести 5-кратный реакционный буфер для лизиса в 5 раз прилагаемой водой «17 МОм».
8. Поместить в лунку 10 мкл разведенного положительного контроля или 40 мкл опытного образца, добавить соответствующее количество 1-кратного реакционного буфера (таблица 5).

Таблица 5

Схема реакции для определения активности каспазы 3 в 96-луночных планшетах

	<b>1-кратный реакционный буфер</b>	<b>Каспаза 8 (10 мкг/мл)</b>	<b>Опытный образец</b>	<b>Ингибитор 25 мкМ</b>	<b>Субстрат 2 мМ</b>
Бланк (отрицательный контроль)	90 мкл				10 мкл
	1-кратный реакционный буфер	Каспаза 8 (10 мкг/мл)	Опытный образец	Ингибитор 25 мкМ	Субстрат 2 мМ
	1-кратный реакционный буфер	Каспаза 8 (10 мкг/мл)	Опытный образец	Ингибитор 25 мкМ	Субстрат 2 мМ
Положительный контроль	80 мкл	10 мкл			10 мкл
Положительный контроль + ингибитор	78 мкл	10 мкл		2 мкл	10 мкл
Опытный образец	50 мкл		40 мкл		10 мкл
Опытный образец + ингибитор	48 мкл		40 мкл	2 мкл	10 кл

9. Добавить ингибитор в соответствующую лунку. Осторожно перемешать содержимое лунок, избегая образования пузырьков, и оставить на 5 минут при комнатной температуре.
10. Запустить реакцию добавлением 10 мкл приготовленного субстрата. Поместить планшет в ИФА-ридер («Sunrise», Tecan) и измерить начальную оптическую плотность при 405 нм (t=0).

11. Закрывать планшеты и инкубировать в течение 60 минут при 37 °С, определяя оптическую плотность каждые 10 минут. Рассчитать результат с помощью калибровочного графика.
12. Построение калибровочного графика. Приготовить серию растворов нитроанилина с диапазоном содержания от 1 до 20 нМ в лунке путем разведения основного раствора 1-кратным реакционным буфером. Поместить в лунки по 100 мкл каждого раствора, включая 100 мкл реакционного буфера. Определить оптическую плотность при 405 нм. Построить график зависимости оптической плотности от содержания нитроанилина в лунке.

*Расчет активности каспазы 8*

$$\text{Скорость расщепления субстрата (нмоль/мин·мл)} = \frac{(A_t - A_0) \times d}{(A_{1\text{nmole}}) \times t \times v},$$

где  $v$  – объем образца (мл);

$d$  – разведение;

$t$  – время реакции в минутах;

$A_{1\text{nmole}}$  – оптическая плотность 1 нмоль рНА в лунке;

$A_t$  – оптическая плотность в  $t$  минут;

$A_0$  – оптическая плотность в 0 минут.

Активность каспазы 8 рассчитывается по разнице скоростей расщепления субстрата в пробах без ингибитора и в присутствии ингибитора.

*Ответить на вопросы:*

1. Какие физико-химические методы используются для определения активности каспаз?
2. С какой целью определяют активность каспазы 3 и каспазы 8?
3. В чем заключается принцип колориметрического метода?
4. Почему для определения активности каспаз используют *лизат* миокарда?
5. Что является субстратом, продуктом и ингибитором реакции?
6. Для чего необходимо добавлять ингибитор?
7. Какое оборудование необходимо при использовании этого метода?

## СЕМИНАР

### АПОПТОЗ И НЕКРОЗ

*Вопросы для самоподготовки:*

1. Типы повреждения клетки.
2. Характеристика некроза и апоптоза.
3. Ингибиторы и индукторы апоптоза.
4. Механизмы гибели клеток при апоптозе.
5. Рецептор-опосредованный апоптоз.
6. Каспазы и их ингибиторы.
7. Биологическое значение апоптоза.
8. Иммунологические маркеры апоптоза.

9. Биохимические основы старения клеток.
10. Значение апоптоза в развитии заболеваний.
11. Методы изучения апоптоза.

*Темы докладов и рефератов:*

1. Общая характеристика апоптоза. Биохимические изменения клеток при апоптозе.
2. Внутриклеточные и внеклеточные индукторы апоптоза.
3. Ингибиторы апоптоза. Роль теломеразы при апоптозе.
4. Митохондриальный путь активации апоптоза. Трансмембранный потенциал митохондрий.
5. Каспазы. Характеристика, основные функции. Семейства каспаз.
6. Fas-опосредуемый апоптоз. Рецепторы, адаптеры, каспазы.
7. Заболевания, связанные с усилением и угнетением апоптоза. СПИД, нейродегенеративные, онкологические заболевания, вирусные инфекции.

## ТЕМА. 3. МАРКЕРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ

### *Информационный блок*

Маркерные ферменты локализованы в определенном типе мембранных структур и катализируют реакции, соответствующие специфическим функциям этих мембран. Фермент можно использовать как маркер, если он прочно связан с мембраной и не подвергается активации или ингибированию при разделении мембранных фракций. Оценка чистоты выделения мембран осуществляется посредством определения удельной активности маркерных ферментов.

К маркерам плазматических мембран относят 5'-нуклеотидазу. Кислая фосфатаза является маркером митохондриальной фракции, содержащей лизосомы. Чистоту фракции мембран эндоплазматического ретикулума, выделенных с помощью дифференциального центрифугирования тканевого гомогената, можно оценить по активности фермента глюкозо-6-фосфатазы, который связан с микросомальной фракцией.

### *Экспериментальный блок*

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ

##### *Актуальность*

Активность 5'-нуклеотидазы используют для идентификации фракций плазматических мембран, выделенных различными методами. 5'-нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5), номенклатурное название фермента: 5'-рибонуклеотид фосфогидролаза, липидзависимый фермент плазматической мембраны катализирует гидролиз внеклеточного АМФ с образованием внутриклеточного аденозина:



Каталитическая активность 5'-нуклеотидазы проявляется по отношению к 5'-АМФ, 5'-ЦМФ, 5'-ГМФ, 5'-ИМФ, но преимущественным субстратом для фермента служит 5'-АМФ. Ингибируют активность фермента ионы  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ , активируют - ионы  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . 5'-нуклеотидаза существует в клетке в двух формах: мембранно-связанной и растворимой. Высокая активность 5'-нуклеотидазы характерна для иммунокомпетентных клеток лимфоидных органов, а также печени.

Определение активности фермента в сыворотке крови имеет диагностическое значение. При гепатитах различной этиологии активность 5'-нуклеотидазы в сыворотке крови повышается на ранних стадиях заболевания ещё до развития желтухи и увеличения активности аминотрансфераз в сыворотке крови больного.

### *Цель работы:*

Определить активность 5'-нуклеотидазы в гомогенате и митохондриальной фракции печени.

### *Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой определения активности 5'-нуклеотидазы.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Подготовить калибровочные графики на фосфор и белок.
5. Выполнить лабораторную работу с использованием печени лабораторной крысы.
6. Сделать необходимые расчеты.
7. Оценить полученные результаты.

### *Принцип*

Активность 5'-нуклеотидазы определяют по образованию неорганического фосфора, освободившегося при гидролизе субстрата (5'-АМФ). Определение неорганического фосфора проводят по методу В.Е. Боданского.

*Материал исследования:* гомогенат печени, митохондриальная фракция.

### *Реактивы:*

- КСl, 0,125 М;
- 5'-АМФ, 5 мМ раствор (ex tempore!) на 50 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,4);
- аскорбиновая кислота, 1 % водный раствор (ex tempore);
- молибденовый реактив, 2,5 % раствор на серной кислоте;
- MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ раствор;
- трис-НСl буфер, 50 мМ рН 7,4;
- ТХУ, 10 % раствор.

### *Оборудование:*

- гомогенизатор;
- автоматические пипетки;
- колориметр или спектрофотометр.

### *Проведение анализа:*

1. Приготовление гомогената печени. Навеску печени 500 мг измельчить, приготовить гомогенат в 5 мл среды для выделения 0,125 М раствор КСl. 1 мл оставить для определения содержания белка. 4 мл центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин. Для определения активности 5'-нуклеотидазы использовать центрифугат. Приготовить инкубационную смесь по схеме, как указано в таблице 6.
2. Смесь инкубировать в течение 1 ч при 37 °С при медленном перемешивании. После инкубации в опытных пробах остановить реакцию добавлением 2,5 мл охлаждённого 10 % раствора ТХУ. Белок осадить центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин. Затем в полученной прозрачной

надосадочной жидкости провести количественное определение неорганического фосфора методом В.Е. Боданского по схеме (таблица 7).

Таблица 6

Определение активности 5'-нуклеотидазы

Реагенты	Холостая проба	Опытная проба
Центрифугат	0,2	0,2
Трис-НСI буфер (рН 7,4)	0,5	0,5
MgCl <sub>2</sub>	0,2	0,2
5'-АМФ	0,2	0,2
ТХУ 10 %	2,5	–

Таблица 7

Ход реакции

Реагенты	Контроль	Опыт
Надосадочная жидкость	1,5	1,5
Молибденовый реактив	1,0	1,0
Аскорбиновая кислота	1,0	1,0

- Через 10 мин колориметрировать при длине волны 640 нм в кювете из оптического стекла толщиной 0,5 см, против контроля (слепой пробы): ТХУ – 1,5 мл, молибденовый реактив – 1,0 мл, аскорбиновая кислота – 1,0 мл.
- Концентрацию неорганического фосфата, образующегося при гидролизе 5'-АМФ, определить по разнице его содержания в контроле (слепой пробе) и опытной пробе с помощью калибровочного графика.

Расчет:

Активность 5'-нуклеотидазы рассчитать на 1,0 мг белка в пробе или на 1,0 г печени.

В пересчете на мг белка:

активность 5'-нуклеотидазы = мкмоль/мин·мг белка =  $\Phi_n$  (мкг) / 31·t ·мг белка,

где  $\Phi_n$  – количество неорганического фосфата, определенное по калибровке в 1,5 мл пробы;

31 – молекулярный вес неорганического фосфата;

t – время инкубации, мин.

В пересчете на г печени активность фермента рассчитывают по формуле:  
 активность 5'-нуклеотидазы =  $\Phi_n$  (мкг)·5 / 31·t · 0,2 (мкмоль/мин·г печени),  
 где 5 и 0,2 – коэффициенты пересчёта разведения на г печени.

*Ответить на вопросы:*

1. Какие ферменты являются маркерными для плазматической мембраны клетки?
2. С какой целью определяют активность маркерных ферментов в гомогенате и субклеточных фракциях?
3. На каком принципе основан метод определения активности 5'-нуклеотидазы?
4. Охарактеризуйте чистоту выделения митохондриальной фракции.
5. Оцените полученные результаты.

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2**

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В ГОМОГЕНАТЕ ПЕЧЕНИ**

#### *Актуальность*

Активность кислой фосфатазы определяют в гомогенате, митохондриальной фракции, содержащей лизосомы, и надмитохондриальной фракции, характеризующей проницаемость лизосом для фермента. Для оценки состояния лизосом определяют общую и свободную активность кислой фосфатазы (КФ). Свободная активность КФ является показателем целостности лизосомальной мембраны, общая активность принимается за 100 %, определяется в присутствии детергента тритона X-100. Стабильность лизосомальных мембран определяется по соотношению св/общ активности КФ 100 %.

#### *Цель работы:*

Определить активность кислой фосфатазы в гомогенате и митохондриальной фракции печени.

#### *Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой определения активности кислой фосфатазы.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Подготовить калибровочные графики на фосфор и белок.
5. Выполнить лабораторную работу с использованием печени лабораторной крысы.
6. Сделать необходимые расчеты.
7. Оценить полученные результаты.

#### *Принцип метода:*

Активность кислой фосфатазы определяют по количеству *p*-нитрофенола, образовавшегося при расщеплении *p*-нитрофенилфосфата. Количество образовавшегося *p*-нитрофенола пропорционально активности кислой фосфатазы (КФ) и определяется спектрофотометрически.



$p$ -нитрофенилфосфат + вода  $\rightarrow$  кислая фосфатаза  $\rightarrow$   $p$ -нитрофенол + фосфат.

Определение активности фермента проводится с помощью реактивов из набора для определения активности фермента в сыворотке крови (Ольвекс диагностика, С-Пб. Россия).

*Материал исследования:* гомогенат печени, митохондриальная фракция.

*Реактивы:*

- сахароза, 0,25 М, рН 7,4;
- тритон X-100, 0,2 % раствор;
- реагент № 1. 0,09 М цитратный буфер рН 4,8 (100 мл);
- реагент № 2. 0,02 М раствор тартрата натрия (100 мл);
- реагент № 3.  $p$ -нитрофенилфосфат 32,7 мМ (50 мл);
- реагент № 4. 1 М раствор едкого натра (100 мл);
- калибровочный раствор  $p$ -нитрофенола 168,8 мг/л (10 мл).

*Оборудование:*

- аналитические весы;
- мерные цилиндры и колбы на 100 мл;
- пипетки на 2,0 мл. Пипетки с переменным объемом на 0,2 и 1,0 мл, сменные наконечники;
- химические и центрифужные пробирки, воронки;
- центрифуга;
- рН-метр;
- суховоздушный термостат на 37 °С;
- ФЭК или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. Подготовка реагентов. Рабочий реагент № 1: смешать содержимое флакона № 3 и содержимое флакона № 1 в соотношении 1:4. Рабочий реагент № 2: смешать содержимое флакона № 3 и содержимое флакона № 2 в соотношении 1:4. Реагент № 4: содержимое флакона № 4 развести дистиллированной водой в 10 раз. 0,25 М сахароза (85,58 г/л) приготовить на 0,001 М растворе ЭДТА (м.м. 372,3), рН 7,4.
2. Приготовить гомогенат печени. Навеску печени 500 мг измельчить ножницами и гомогенизировать в соотношении 1:10 (5 мл 0,25 М сахарозы + 0,001 М ЭДТА (рН 7,4)). Осадить при 1000 об/мин в течение 10 мин, использовать её как гомогенат (проба 1). Из надосадочной жидкости получить фракцию митохондрий при 6000 об/мин в течение 10 мин. Осадок развести в 1 мл среды для выделения (проба 2). Надосадочная жидкость после осаждения митохондрий (проба 3).
3. Свободную активность КФ, характеризующую проницаемость мембраны лизосом для субстрата, определить в пробе 1. Взять 2 пробирки: опыт и контроль. В опытной пробирке к 0,2 мл пробы 1 добавить 0,5 мл рабочего реагента № 1 из набора, содержащего субстрат, перемешать и инкубиро-

вать при 37 °С ровно 30 мин. После окончания инкубации внести 2 мл реагента № 4. В контрольной пробирке 0,5 мл рабочего реагента № 1 оставить на 30 мин при комнатной температуре, после чего добавить 0,2 мл пробы 1 плюс 2 мл реагента № 4 и затем фотометрировать при 405 нм против контроля на реактивы (0,2 мл среды выделения, 0,5 мл рабочего реагента № 1, 2 мл реагента № 4).

4. Общую активность КФ определить в пробах 1, 2 и 3. Для этого к 0,2 мл каждой опытной пробы добавить 0,2 мл 0,2 % раствора тритона X-100 и преинкубировать смесь при 37 °С в течение 10 мин. Затем в каждую пробирку добавить по 0,5 мл рабочего реагента № 1 из набора, перемешать и инкубировать при 37 °С ровно 30 мин. После окончания инкубации внести по 2 мл реагента № 4. Для каждой опытной пробы ставить контроль (0,5 мл рабочего реагента № 1, оставить при комнатной температуре на 30 мин, после чего добавить 0,2 мл пробы 1, 2, 3 и 0,5 мл тритона X-100). Фотометрировать при 405 нм против контроля на реактивы (0,4 мл среды для выделения, 0,5 мл рабочего реагента № 1, 2 мл реагента № 4).
5. В аликвотах проб 1, 2, 3 определить содержание белка, расчет активности фермента произвести в нмоль/с.мг белка по калибровочному графику. Из основного калибровочного раствора приготовить следующие растворы (таблица 8).

Таблица 8

Построение калибровочной кривой

№ пробы	Калибровочный раствор (мл)	Вода (мл)	Активность фермента нмоль/с
1	0,1	1,9	41,7
2	0,2	1,8	83,3
3	0,5	2,0	166,7
4	1,0	1,0	416,7
5	1,0	-	833,5

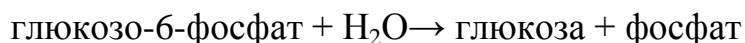
6. В каждую из пяти пробирок внести по 0,1 мл соответствующего рабочего калибровочного раствора, добавить по 2,5 мл реагента № 4, перемешать и измерить оптическую плотность против воды. Построить график зависимости оптической плотности от активности фермента.
7. Определить свободную и общую активность кислой фосфатазы в гомогенате, митохондриальной и надмитохондриальной фракциях. Сделать заключение о локализации фермента. Оценить стабильность лизосомальных мембран, проницаемость мембраны лизосом для субстрата и фермента.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТАЗЫ

#### *Актуальность*

Глюкозо-6-фосфатаза (КФ 3.1.3.9) представляет собой фосфогидролазу, высокоспецифичную по отношению к D-глюкозо-6-фосфату. Глюкозо-6-фосфатаза содержится в основном в микросомах печени, почек и слизистой оболочке тонкого кишечника. Фермент имеет оптимум pH между 6,0–7,0. Обычно его активность измеряют при pH 6,5. Глюкозо-6-фосфатаза катализирует реакцию:



#### *Цель работы:*

Определить активность глюкозо-6-фосфатазы в гомогенате печени.

#### *Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой определения активности глюкозо-6-фосфатазы
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Подготовить калибровочные графики на фосфор и белок.
5. Выполнить лабораторную работу с использованием печени лабораторной крысы.
6. Сделать необходимые расчеты.
7. Оценить полученные результаты.

#### *Принцип метода:*

Об активности реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфатазой, можно судить по скорости увеличения концентрации в среде инкубации неорганического фосфата, освобождаемого в результате гидролиза субстрата – D-глюкозо-6-фосфата.

#### *Материал исследования:* гомогенат печени

#### *Реактивы:*

- сахараза, 0,25 М, pH 7,4.
- 0,1 М цитратный буфер, pH 6,5;
- 0,08 М раствор глюкозо-6-фосфата ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_9\text{PNa}_2$ );
- 10 % раствор ТХУ;
- 2,5 % раствор молибдата аммония;
- 1 % раствор аскорбиновой кислоты (свежеприготовленный).

*Оборудование:*

- гомогенизатор;
- автоматические пипетки;
- колориметр или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. Приготовить реактивы. 0,25 М сахараза (85,58 г/л) приготовить на 0,001 М растворе ЭДТА (м.м. 372,3), рН 7,4. 0,1 М цитратный буфер, рН 6,5 получить при растворении 2,101 г лимонной кислоты ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) в 50–75 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 100 мл, значение рН довести до 6,5 при помощи 30 % раствора NaOH или KOH, долить до метки водой.
2. Приготовить 0,08 М раствор глюкозо-6-фосфата ( $C_6H_{11}O_9PNa_2$ , м.м. 304,10), значение рН довести до 6,5 при помощи 30 % раствора NaOH или KOH, долить дистиллированной водой до 10 мл.
3. 2,5 г молибденово-кислого аммония растворить в 60,0 мл дистиллированной воды, фильтровать. Раствор внести в мерную колбу на 100 мл. В другой колбе к 25,0 мл дистиллированной воды прилить 7,7 мл концентрированной  $H_2SO_4$ . Второй раствор прилить к первому и после охлаждения доводят водой до метки.
4. Приготовить гомогенат печени. Навеску печени 500 мг измельчить ножницами и гомогенизировать в соотношении 1:10 (4,5 мл 0,25 М сахаразы + 0,001 М ЭДТА (рН 7,4)). На каждую опытную пробу, содержащую гомогенат, ставить контрольную пробу № 1 (исходное содержание Фн в гомогенате) и № 2 (количество Фн, вносимого с глюкозо-6-Ф). В центрифужные пробирки внести следующие компоненты (таблица 9).

*Таблица 9*

*Проведение анализа*

<b>Состав пробы</b>	<b>Опыт</b>	<b>Контроль 1</b>	<b>Контроль 2</b>
Гомогенат, мл	0,1	0,1	-
Прогреть в термостате при + 37 °С в течение 5 мин			
Глюкозо-6-Ф, мл	0,1	-	0,1
Цитратный буфер, мл	-	0,1	0,1
Пробы инкубировать в термостате при + 37 °С в течение 15 мин			
10 % ТХУ, мл	2,0	2,0	2,0
Конечный объём, мл	2,2	2,2	2,2

5. После остановки реакции добавить 2,0 мл раствора 10 % ТХУ, все пробы центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин.
6. В надосадочной жидкости определить содержание неорганического фосфата по методу В.Е. Боданского. Для этого, к 1,5 мл надосадочной жидкости добавить 1,0 мл молибденового реактива, затем 1,0 мл 1 % раствора

аскорбиновой кислоты и через 10 мин колориметрировать при длине волны 640 нм в кювете с толщиной 0,5 см против слепой пробы, в которой надо-сачочную жидкость заменить 1,5 мл раствора ТХУ. Количество неорганического фосфата (Фн) определить с помощью калибровочного графика.

*Расчет:*

Активность фермента (мкг Фн/мл гомогената за 15 мин инкубации) =  $\Delta E \times 1,47 \times 10$ ,

где:  $\Delta E = (E_{\text{опыт}} - E_{\text{контр.1}}) - E_{\text{контр.2}}$ ;

$E_{\text{опыт}}$  – экстинкция раствора пробы опыт;

$E_{\text{контр. 1}}$  – экстинкция раствора контрольной пробы 1;

$E_{\text{контр. 2}}$  – экстинкция раствора контрольной пробы 2;

1,47 – коэффициент пересчета объема пробы, взятой в цветную реакцию, на 2,2 мл объема смеси после добавления раствора ТХУ;

10 – пересчет на 1 мл гомогената.

Если в гомогенате определить содержание белка биуретовым методом, то активность глюкозо-6-фосфатазы можно выразить в ед. удельной активности, путем пересчета на 1 мг белка в пробе.

*Ответить на вопросы:*

1. Какие выводы о локализации фермента в клетке можно сделать на основании полученных результатов?
2. Как можно оценить степень чистоты выделения фракций?

*Решить задачу.*

Из 50 г печени крысы был получен гомогенат, а затем субклеточные фракции, в которых определили содержание белка и активность глюкозо-6-фосфатазы по накоплению фосфата неорганического. Полученные данные приведены в таблице 10.

*Таблица 10*

Фракционирование гомогената печени крыс

Параметры	Фракции				
	гомогенат	ядра	митохондрии	микросомы	цитозоль
Общий объем, мл	50	10	10	5	75
Содержание белка, мг/мл	24	35	49	31	2,2
Объем, взятый для определения активности фосфатазы, мл	0,5	0,5	0,5	0,05	1,0
Изменение содержания неорганического фосфата за 5 мин, мкг	23	7,5	19	18	2

Определить: количество белка: общее и в каждой фракции; активность глюкозо-6-фосфатазы: в мкг фосфата неорганического за 1 мин на 1 мг белка; в мкмоль фосфата неорганического за 1 мин на 1 мг белка в гомогенате и субклеточных фракциях.

## СЕМИНАР

### ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКЕ

*Вопросы для самоподготовки:*

1. Ферменты плазматической мембраны клетки. Маркерные ферменты. Взаимодействие с рецепторами, образование эффекторов.
2. Ферменты митохондриальных мембран и митохондриального матрикса.
3. Цитозольные ферменты: гликолиза, пентозофосфатного пути, цикла трикарбоновых кислот.
4. Ферменты микросомальной фракции. Участие в метаболизме ксенобиотиков.
5. Пероксисомы. Ферменты, метаболизм  $H_2O_2$ .
6. Ферменты лизосом, пути активации.

*Темы докладов и рефератов:*

1. Локализация ферментов в клетке.
2. Ферменты плазматической мембраны клетки.
3. Ферменты митохондриальных мембран и митохондриального матрикса.
4. Цитозольные ферменты: гликолиза, пентозофосфатного пути, цикла трикарбоновых кислот.
5. Ферменты микросомальной фракции. Участие в метаболизме ксенобиотиков.
6. Пероксисомы. Ферменты, метаболизм  $H_2O_2$ .
7. Ферменты лизосом, пути активации.

## ТЕМА 4. ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ

### *Информационный блок*

Митохондрии – это «энергетические станции» клеток. В их кристы встроены ферменты, участвующие в преобразовании энергии питательных веществ, поступающих в клетку извне, в энергию молекул АТФ. Транспорт электронов, создание протонного градиента способствуют активации механизма окислительного фосфорилирования за счет работы АТФ-синтазы.

Кроме того, в состав митохондрий входит более 1300 белков, функции которых до сих пор неизвестны, что обеспечивается существованием митохондриальной ДНК. В настоящее время существует ряд заболеваний, связанных с дефектами в функционировании митохондрий, приводящими к нарушениям энергетических функций в клетках, которые получили название митохондриальные.

Особенность данных заболеваний связана с тем, что митохондрии наследуются по другим механизмам, в частности в результате случайного перераспределения между клетками, и все они наследуются от матери. Также известно, что мутации в митохондриальной ДНК происходят, по разным причинам, намного чаще, чем в ядерной.

### *Экспериментальный блок*

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ $H^+$ АТФ-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ

##### *Актуальность*

Протонная  $H^+$  АТФ-аза митохондрий занимает ключевую позицию в синтезе АТФ, встроена во внутреннюю мембрану митохондрий, имеет сложную субъединичную структуру и обозначается как V комплекс дыхательной цепи. В состав фермента входит канал для переноса протонов ( $F_o$ ), и комплекс субъединиц, образующих сопрягающий фактор 1 ( $F_1$ ), который обращен во внутреннее пространство органелл. Роль  $F_1$  состоит в синтезе АТФ и АДФ из неорганического фосфата за счет энергии протонного градиента, создаваемого в процессе транспорта ионов  $H^+$  и электронов вдоль дыхательной цепи внутренней мембраны митохондрий. Электроны движутся вдоль по дыхательной цепи к цитохромоксидазе, а протоны выталкиваются в межмембранное пространство, где формируется их избыток. Ток протонов через канал  $F_o$  от цитоплазматической стороны мембраны митохондрий в матрикс приводит к синтезу АТФ с участием  $F_1$ . Реакция, катализируемая сопрягающим фактором  $F_1$ , обратима, что дает возможность судить об активности процесса по скорости гидролиз экзогенного АТФ.

*Цель работы:*

Определить активность  $H^+$ -АТФ-азы в гомогенате печени.

*Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой определения  $H^+$ -АТФазной активности в гомогенате печени крыс.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Подготовить калибровочный график.
5. Рассчитать активность фермента на 1 г печени и 1 мг белка.
6. Сравнить полученные результаты с данными литературы.
7. Сделать выводы.

*Принцип метода:*

Под действием фермента молекула АТФ в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  расщепляется до АДФ и неорганического фосфата. Об активности  $H^+$ -АТФ-азы судят по скорости накопления неорганического фосфата в среде инкубации.

*Материал исследования:* гомогенат печени.

*Реактивы:*

- трис-НСl буфер, 0,05 М (рН 7,4), содержащий 125 мМ КСl;
- $MgCl_2 \times 6H_2O$ , 0,18 М раствор (М.м.=203);
- АТФ динатриевая соль, 0,01 М (М.м.=551,15). Раствор готовят ex tempore на трис-НСl-буфере;
- молибденовый реактив;
- аскорбиновая кислота, 1 % раствор;
- ТХУ, 10 % раствор.

*Оборудование:*

- гомогенизатор;
- автоматические пипетки;
- колориметр или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. Приготовить 10 % (масса/объем) гомогената печени. Для этого 500 мг печени быстро измельчить ножницами и гомогенизировать в 4,5 мл трис-НСl буфера, 0,05 М (рН 7,4), содержащего 125 мМ КСl. Процедуру провести в специальном пластмассовом стакане, помещённом в ледяную баню, с помощью вращающегося тefлонового пестика в течение 10–15 с. Полученный гомогенат центрифугировать при 3000 об/мин в течение 10 мин с охлаждением (0 – -2 °С) для отделения неизмельчённых частиц печени и неразрушенных клеток, а также фрагментов цитоплазматической мембра-



ны. Последующие этапы работы вести с надосадочной жидкостью, которая содержит митохондрии и другие внутриклеточные органеллы.

2. Провести определение  $H^+$ -АТФ-азной активности в 10 % (масса/объем) гомогенате печени в двух параллельных пробах: № 1 и № 2. В обе пробирки последовательно внести по 2,1 мл трис-НСl буфера, содержащий 125 мМ КСl, по 0,1 мл раствора  $MgCl_2$  и по 0,4 мл раствора АТФ.
3. Обе пробирки поместить на 10–15 мин в термостат с температурой  $+37\text{ }^\circ\text{C}$  для прогрева реакционной смеси. Затем, в пробу 1 внести 0,5 мл гомогената печени; в пробу 2 сначала внести 0,9 мл раствора ТХУ, затем сразу же добавить 0,5 мл гомогената печени и тщательно перемешать. Обе пробы помещают в термостат с температурой  $+37\text{ }^\circ\text{C}$  на 15 мин. После завершения времени инкубации в пробу 1 внести 0,9 мл раствора ТХУ.
4. Обе пробы центрифугировать в течение 10 мин при 2000 об/мин. В супернатанте определить содержание неорганического фосфата по методу Боданского.
5. Об активности  $H^+$ АТФ-азы можно судить по разнице между накопившимся неорганическим фосфатом за период инкубации (проба 1) и его исходным содержанием в гомогенате печени (проба 2). Активность  $H^+$ АТФ-азы выразить в мкмоль неорганического фосфата/мин на 1 мг белка.

*Ответить на вопросы:*

1. Какую функцию выполняет  $H^+$ АТФаза в митохондриях?
2. Что является активатором  $H^+$ АТФазной реакции?
3. Какое значение имеет определение активности  $H^+$ АТФаз для оценки энергетической функции митохондрий?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

*Актуальность*

Метод полярографии изобретен чешским электрохимиком Ярославом Гейровским в 1931 году. Метод основан на использовании явления концентрационной поляризации поверхности индикаторного электрода (катода). В полярографической ячейке соотношение площадей катода и анода составляет 1:100. На катоде с малой площадью поверхности плотность тока чрезвычайно высока, что обеспечивает явление поляризации. На аноде, имеющем большую площадь, то же значение разности потенциалов между электродами создаёт существенно меньшую плотность тока и его поляризации не происходит. Полярографический метод анализа обладает высокой чувствительностью и избирательностью. Возможно, определение чрезвычайно низких концентраций (до  $10^{-6}$  моль/л) широкого круга электрохимически активных соединений без предварительного разделения компонентов изучаемых растворов. Метод позволяет исследовать

малые объемы – до 0,01 мл и легко подвергается автоматизации. С помощью полярографического метода определяют микроэлементы, анализируют белки, нуклеиновые кислоты, витамины, пигменты и т. д. Полярографический метод, в частности, стал незаменимым для количественного определения содержания кислорода в водных растворах, в том числе и в различных биологических жидкостях.

Для изучения функционального состояния изолированных митохондрий (дыхания митохондрий) полярографический метод является самым оптимальным, поскольку позволяет судить о процессе напрямую – по изменению скорости поглощения кислорода органеллами в различных метаболических состояниях, которые легко воспроизвести *in vitro*.

*Цель работы:*

Оценить биоэнергетическую функцию митохондрий в различных метаболических состояниях с использованием полярографического метода.

*Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с устройством электрода Кларка
2. Собрать и подготовить к работе полярографическую установку, изучить порядок работы и правила её подключения к полярографу.
3. Записать полярографическую кривую при последовательном внесении добавок субстрата окисления, растворов АДФ и разобщителя.
4. Рассчитать скорость потребления кислорода и параметры, характеризующие энергетическую функцию митохондрий.

*Принцип метода:*

Для регистрации поглощения кислорода митохондриями используют кислород-чувствительный электрод Кларка (электрод закрытого типа) с платиновым катодом на котором восстановление кислорода происходит при разности потенциалов между электродами, равном 0,65 В (рис. 1).

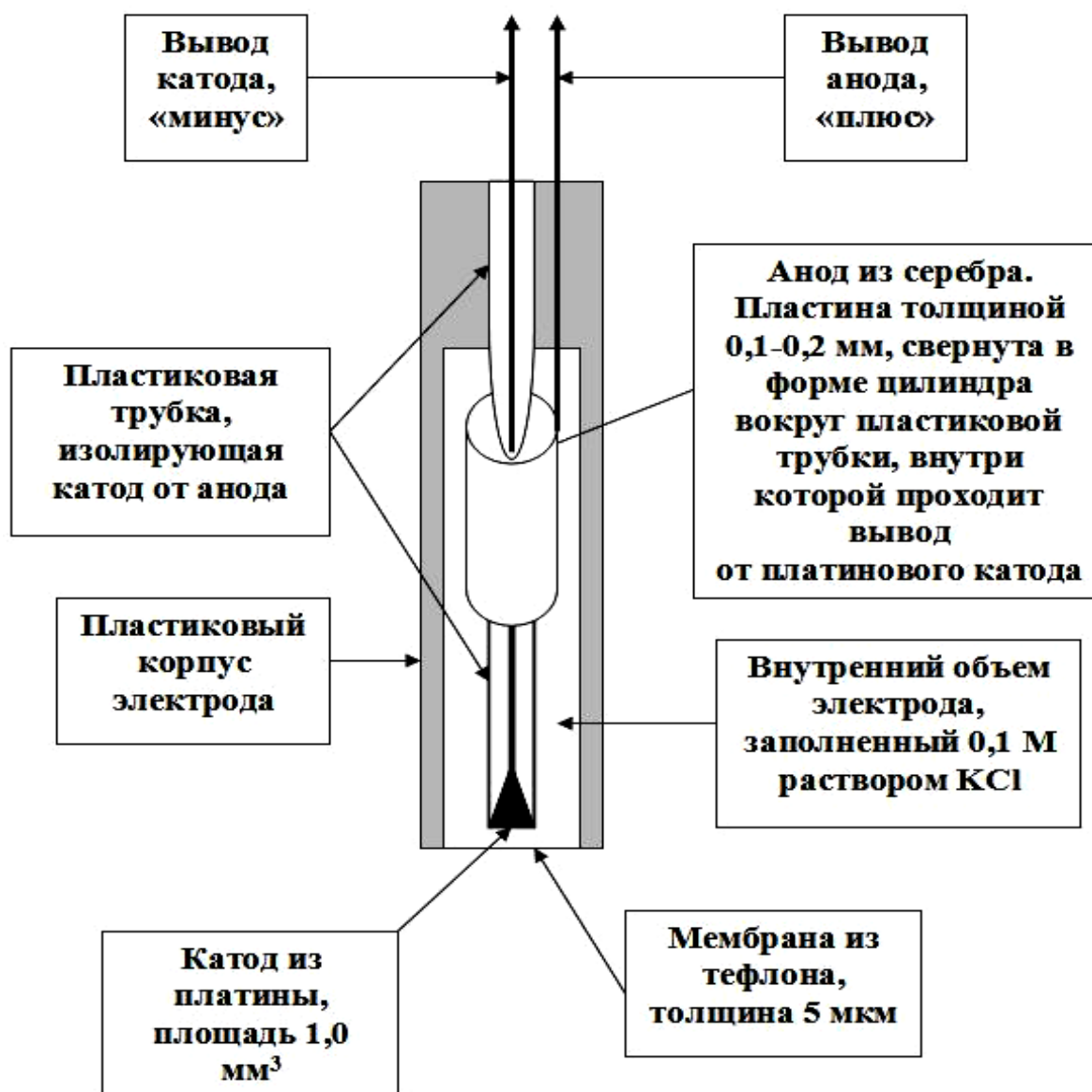
Полярограф, к которому подключен электрод Кларка, обеспечивает разность потенциалов между катодом и анодом и измеряет ток в цепи электродов, величина которого пропорциональна концентрации кислорода в растворе. Динамику поглощения кислорода гомогенатом или изолированными митохондриями записывают с помощью регистрирующего потенциометра, подключаемого к полярографу (рис. 2).

*Материал исследования:* гомогенат печени, изолированные митохондрии печени.

*Реактивы:*

- среда для приготовления гомогената печени крысы выделения фракции митохондрий: 125 мМ КСl (М.м.=74,5), 50 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4) (М.м. трис=121,14) и 1 мМ динатриевой соли ЭДТА;

- среда инкубации для изучения дыхания безъядерного гомогената печени крысы или изолированных митохондрий:  
125 мМ КСl,  
50 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4),  
5 мМ MgCl<sub>2</sub> x 6 Н<sub>2</sub>О (М.м.=203,3),  
20 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (М.м.=136,0),  
10 мМ сукцината натрия (М.м.=270,16);
- 20 мМ раствор динатриевой соли АДФ (М.м.=471,2). При введении 0,01 мл этого раствора в кювету объёмом 1,0 мл достигается конечная концентрация 200 мкМ АДФ;
- 5 мМ спиртовой раствор 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ), (М.м.=184,12). При введении 0,01 мл этого раствора в кювету объёмом 1,0 мл достигается конечная концентрация разобщителя 50 мкМ;
- реактивы для определения концентрации белка биуретовым методом.



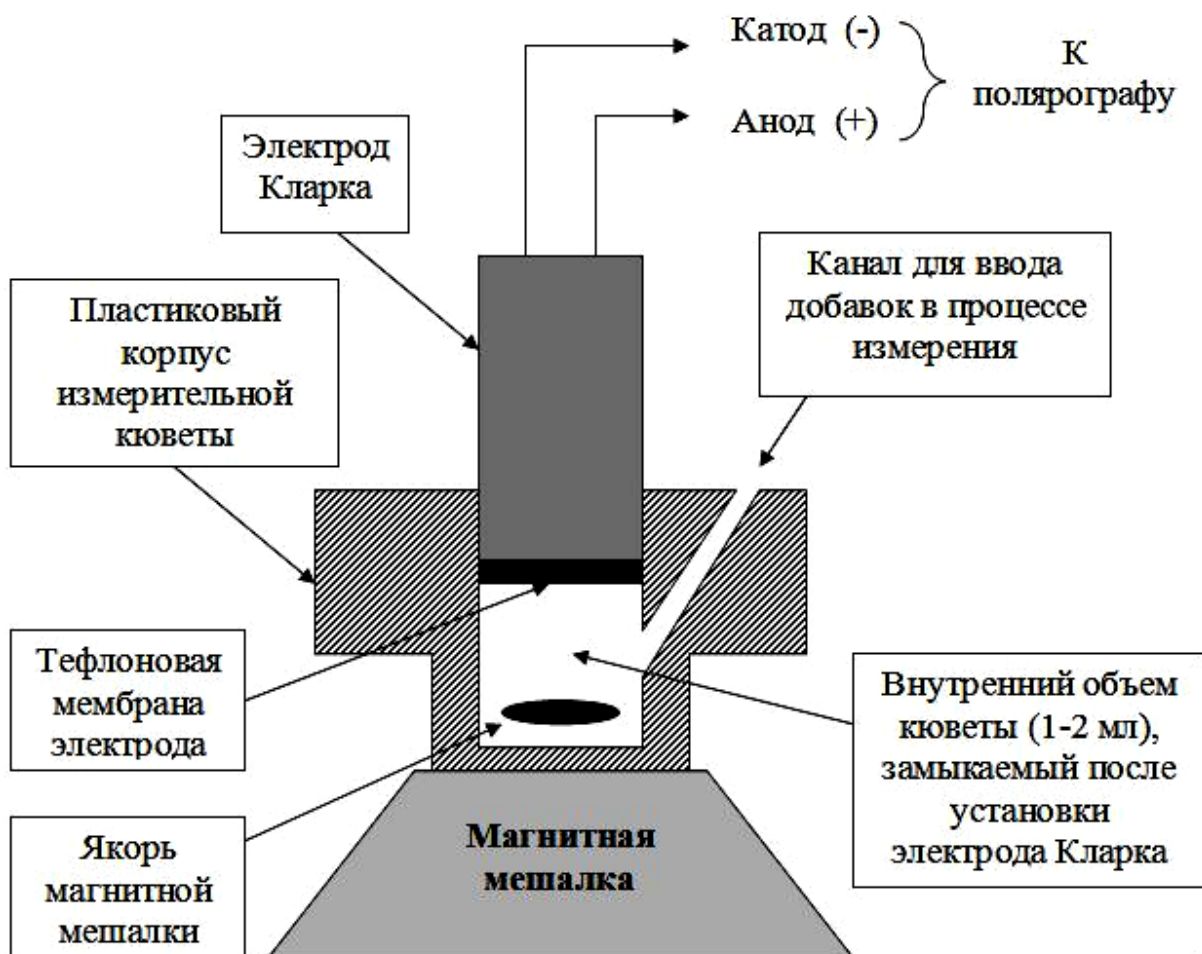
*Рис. 1. Конструкция электрода Кларка*

*Оборудование:*

- гомогенизатор;
- автоматические пипетки;
- колориметр или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. *Приготовить гомогенат печени.* Печень извлечь после декапитации животного. Навеску печени (1 г) измельчить ножницами и перенести в стакан гомогенизатора. Ткань гомогенизировать в охлажденной среде, соотношение масса ткани: объем среды 1:7, в течение 15–20 сек.
2. *Выделить фракции митохондрий.* Для выделения фракции митохондрий гомогенат центрифугировать при +2–4 °С в течение 10 мин при 600 g для осаждения неразрушенных клеток и ядерной фракции. Надосадочную жидкость перенести в другие пробирки и центрифугировать в течение 15 мин при 8500 g для осаждения фракции митохондрий. Процедуру повторить для отмывки митохондрий. К осадку отмывтых митохондрий добавить 0,5–1,0 мл этой же среды и приготовить рабочую суспензию органелл, которая хранится на ледяной бане не более 1,5 часов. В суспензии определить концентрацию белка биуретовым методом, что необходимо для расчета скорости дыхания митохондрий на 1,0 мг белка.



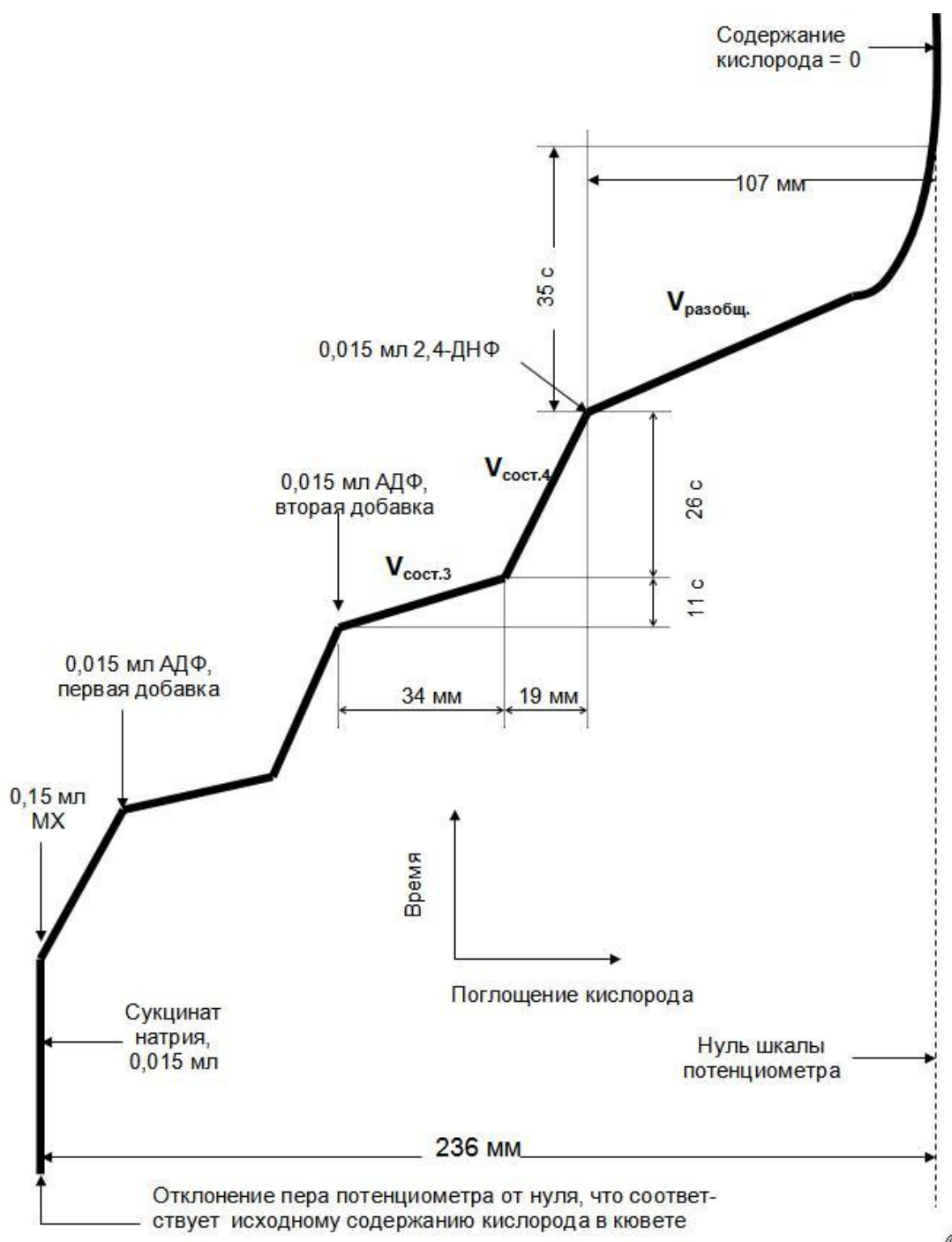
*Рис. 2. Схема полярографической ячейки для измерения поглощения кислорода*

3. Заполнить кювету средой инкубации и установить электрод Кларка так, чтобы в кювете не осталось, пузыря воздуха.
4. Включить магнитную мешалку и подключить электрод к полярографу.
5. На ленте регистрирующего потенциометра записать линию, соответствующую исходному содержанию кислорода в среде инкубации (максимальное отклонение пера потенциометра от нуля шкалы).
6. Через специальный канал кюветы с помощью микропипетки последовательно ввести 150 мкл гомогената или суспензии митохондрий и 15 мкл 1 М раствора сукцината натрия. В течение 1–2 мин записывать кинетику поглощения кислорода в метаболическом состоянии 4 по Чансу (в среде инкубации присутствуют  $O_2$ , субстрат окисления, неорганический фосфат, но отсутствует акцептор неорганического фосфата – АДФ).
7. Ввести в кювету 10 мкл 16 мМ раствора АДФ и записать кинетику поглощения кислорода в процессе смены метаболических состояний: состояние 4 → состояние 3 (активное фосфорилирование добавленного АДФ) → возврат в состояние 4 в результате расходования внесенного количества АДФ.
8. Внести в кювету 15 мкл 5,3 мМ спиртового раствора 2,4-ДНФ (разобщитель), записать поглощение кислорода в состоянии разобщения дыхания и фосфорилирования.
9. Дождаться полного расходования кислорода в объеме среды инкубации: линия на ленте потенциометра сливается с нулевой отметкой шкалы потенциометра.

Типичная полярографическая кривая поглощения кислорода изолированными митохондриями в различных метаболических состояниях схематично представлена на рисунке 3.

*Ответить на вопросы:*

1. Опишите принцип определения концентрации кислорода в водных растворах с помощью полярографического метода.
2. Для чего необходимо начинать обработку (обсчет) каждой полярографической кривой с определения цены деления шкалы (в нг атомах кислорода на 1 мм всей шкалы)?
3. Как отличаются и какую информацию несут скорости поглощения кислорода в метаболических состояниях 3 и 4 по Б. Чансу (табл. 11).
4. Что характеризует показатель «дыхательный контроль» (ДК) по Б. Чансу и как его вычислить? В какую сторону изменяется величина ДК в случае повреждения митохондриального аппарата клеток? Чему равен ДК в препарате полностью разобщенных митохондрий?
5. Какую информацию несет сопоставление скоростей дыхания митохондрий в метаболическом состоянии 3 (активное фосфорилирование) и в присутствии разобщителя 2,4-динитрофенола? Опишите механизм действия веществ – разобщителей дыхания и фосфорилирования.



**Рис. 3.** Схема типичной записи эксперимента по изучению дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях по Б. Чансу

**Примечание:**

Объём кюветы составляет 1,6 мл. В кювету вводили 0,15 мл суспензии митохондрий. Концентрация белка в суспензии 28,3 мг/мл. Объёмы добавок: 0,015 мл 1 М раствора сукцината натрия; 0,015 мл 16 мМ раствора динатриевой соли АДФ; 0,015 мл 5,3 мМ спиртового раствора 2,4-ДНФ. На горизонтальных отметках указаны пробеги пера потенциометра в мм. На вертикальных отметках указаны отрезки времени в секундах, соответствующие длительности существования различных метаболических состояний митохондрий.  $V_{\text{сост.3}}$ ,  $V_{\text{сост.4}}$  и  $V_{\text{разобщ.}}$  – скорости дыхания в метаболических состояниях 3, 4 и в присутствии разобщителя, соответственно.

6. Что обозначает коэффициент АДФ/О? Каким будет теоретическое значение этого коэффициента для субстратов: янтарная кислота (сукцинат) и для смеси пирувата с малатом? Объясните, почему теоретические значения АДФ/О будут отличаться для упомянутых субстратов окисления? В какую сторону измениться этот коэффициент в условиях разобщения дыхания и фосфорилирования?
7. Пользуясь схемой на рис. 3 и информацией в подрисуночной подписи, вычислите комплекс показателей, которые характеризуют степень сопряжения дыхания и фосфорилирования у изучаемого препарата митохондрий:
- цену деления шкалы потенциометра в нг атомах кислорода / мм шкалы. Для расчёта принимаем, что исходное содержание в среде инкубации кислорода при температуре от +20 °С до +25 °С составляет в среднем 538 наноатомов кислорода / мл;
  - рассчитать скорости поглощения кислорода митохондриями в метаболических состояниях 4 и 3, а также в присутствии разобщителя. Скорость выразить в нг атомах кислорода / мин·мг белка;
  - сравнить скорости дыхания в метаболических состояниях 3 и в присутствии разобщителя;
  - рассчитать величину дыхательного контроля по Чансу как отношение скорости дыхания в состоянии 3 / дыхания в состоянии 4;
  - рассчитать скорость фосфорилирования добавки АДФ и выразить в нмоль АДФ/ мин·мг белка;
  - рассчитать коэффициент АДФ/О.

Таблица 11

*Классификация метаболических состояний изолированных митохондрий, согласно Бриттону Чансу*

Состояние	Наличие O <sub>2</sub>	Наличие субстрата окисления	Наличие Фн + АДФ	Интенсивность дыхания	Название
1	избыток	эндогенный	эндогенный	низкая	
2	избыток	нет	избыток	очень низкая	истощение по субстрату
3	избыток	избыток	избыток	высокая	активное, неконтролируемое
4	избыток	избыток	нет	низкая	неактивное, контролируемое
5	нет	избыток	избыток	нет	анаэробноз

## СЕМИНАР

### ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

*Вопросы для самоподготовки:*

*Часть первая*

1. Эндосимбиотическая гипотеза происхождения митохондрий. Постулаты хемиосмотической гипотезы П. Митчела. Механизм окислительного фосфорилирования.
2. Доказательство хемиосмотической гипотезы П. Митчела в экспериментах по созданию искусственной химеры Э. Рэкера и У. Стоккениуса.
3. Строение и функции комплексов дыхательной цепи митохондрий.
4. Устройство и функционирование сопрягающего устройства дыхательной цепи митохондрий.
5. Окислительное повреждение митохондрий. Старение организма.
6. Аэробный и анаэробный пути окисления в клетке, Причины лактатацидоза.
7. Принципы функционирования водородпереносящих шунтов цитозоль-митохондрии в клетке.
8. Источники появления восстановленных пиридиннуклеотидов и флавиннуклеотидов в митохондриях и механизм их использования.
9. Механизм действия ингибиторов переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий и механизм работы разобщителей окисления и фосфорилирования.
10. Механизм появления протонного градиента в межмембранном пространстве митохондрий.
11. Заряженные ионы В.П. Сулачева для доказательства наличия мембранного потенциала на мембране митохондрий и современное использование этих ионов для продления жизни.
12. Представление о химической и механо-химической гипотезе сопряжения окислительного фосфорилирования.

*Темы докладов и рефератов:*

1. Комплексы цепи электронного транспорта митохондрий. Механизм сопряжения процессов окисления и фосфорилирования.
2. Полярнографический метод изучения дыхания митохондрий.
3. Строение митохондриального генома. Метаболические последствия мутаций и нарушений генома митохондрий.



### *Часть вторая*

1. Очевидные особенности митохондриальных болезней.
2. Особенности построения генетического кода митохондриальной ДНК.
3. Строение митохондриального генома. Гены, закодированные в ДНК митохондрий.
4. Основные общие проявления митохондриальных болезней.
5. Особенности наследования митохондриальных болезней.
6. Классификация митохондриальных болезней.
7. Мутации тРНК<sub>мит</sub> и вызванные болезни.
8. Мутации рРНК и вызванные этими мутациями болезни.
9. Мутации в генах, кодирующих субъединицы белковых комплексов дыхательной цепи и сопрягающего фактора (АТФазы) митохондрий.
10. Механизмы делеций ДНК митохондрий и митохондриальные болезни.
11. Механизмы дупликаций ДНК митохондрий и митохондриальные болезни.
12. Особенности наследования митохондриальных болезней и условия их проявления (гетероплазмия).
13. Современное представление об ЭКО. Использование генетического материала от трех доноров. Как избежать митохондриальных болезней.
14. Примеры обнаружения нарушений в геноме митохондрий. Почему рДНК митохондрий может быть основой эволюционного распространения человека по Земле?

### *Темы докладов и рефератов:*

1. Митохондриальная ДНК, особенности структуры.
2. Мутации генов митохондриальной ДНК.
3. Основные патологии, связанные с мутацией митохондриального генома. Митохондриальные болезни человека.

## ТЕМА 5. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

### *Информационный блок*

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) представляет собой цепной свободнорадикальный процесс окисления ненасыщенных жирных кислот, характеризуется образованием продуктов, различающихся по химической структуре, времени жизни и биологической активности. Активные формы кислорода и продукты реакций ПОЛ обладают высокой токсичностью для клетки и организма в целом.

Анализ продуктов ПОЛ представляет интерес для оценки уровня окислительного стресса в организме, изучения механизма действия лекарственных препаратов и патогенеза заболеваний. Интенсивность процесса ПОЛ в организме оценивают по содержанию продуктов ПОЛ, таких как перекись водорода, диеновые и триеновые конъюгаты, малоновый диальдегид или ТБК-активные продукты, шиффовы основания, карбонилированные производные белков, а также активность антиоксидантных ферментов и глутатионпероксидазной системы.

### *Экспериментальный блок*

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

##### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА

###### *Актуальность*

Малоновый диальдегид (MDA) – альдегид с формулой  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ . Возникает в организме при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода, является одним из маркеров перекисного окисления липидов и окислительного стресса. Показано, что MDA способен реагировать с ДНК, образуя ДНК-аддукты, в первую очередь мутагенный M1G. Содержание MDA повышено в роговице при кератоконусе и буллёзной кератопатии, сахарном диабете.

###### *Цель работы:*

Определить содержание малонового диальдегида в гомогенате печени.

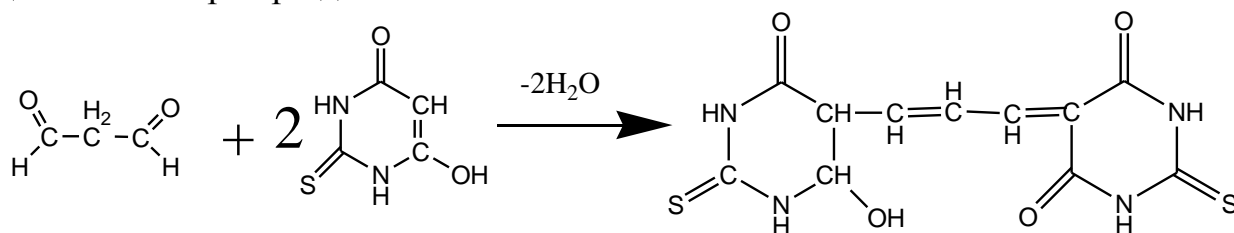
###### *Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой определения содержания малонового диальдегида при спонтанном и индуцированном процессе ПОЛ.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Выполнить лабораторную работу с использованием печени крысы.

5. Рассчитать концентрацию ТБК-активных продуктов с помощью коэффициента молярной экстинкции.
6. Сравнить полученный результат с данными литературы.
7. Сделать выводы.

*Принцип метода:*

В липидных системах в результате процессов ПОЛ образуется МДА, взаимодействие которого с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) приводит к образованию триметинового комплекса с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм.



*Материал исследования:* гомогенат печени крысы.

*Реактивы:*

- среда для приготовления гомогената печени: KCl 0,175 М, трис-HCl буфер 0,025 М (pH 7,35). KCl (Mm=74,5), трис (м.м.=121,14). Готовую среду перед использованием охладить до температуры +2 °С;
- тиобарбитуровая кислота, 0,75 % раствор (навеску реактива растворить в дистиллированной воде при нагревании на водяной бане, не доводя до кипения);
- 10 % раствор ТХУ;
- аскорбиновая кислота (м.м.=179). Водный раствор приготовить ex tempore. Раствор вносят в инкубационную смесь в объёме, обеспечивающем конечную концентрацию аскорбиновой кислоты 0,8 мМ. С учетом разведения раствора аскорбиновой кислоты, готовят её рабочий раствор с концентрацией 8,0 мМ.

*Оборудование:*

- гомогенизатор;
- автоматические пипетки;
- колориметр или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. Навеску печени, необходимую для приготовления 10% гомогената (масса ткани: объем среды), измельчить ножницами на стоящей во льду чашке Петри и перенести в стакан гомогенизатора. Измельченную печень гомогенизировать в охлажденной среде при соотношении объемов 1:10 (ткань/среда) в течение 10–20 секунд. Полученный гомогенат центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин и температуре 0–4°С. Супернатант, не со-

держаций фрагментов неразрушенной печени и клеток (в дальнейшем гомогенат) использовать для определения содержания МДА и белка.

- В ходе исследования необходимо определить исходное содержание МДА в гомогенате, а также его образование в ходе спонтанного (не стимулированного экзогенными оксидантами) окисления гомогената в отсутствие и в присутствии аскорбиновой кислоты. Схема исследования представлена в таблице 12.

Таблица 12

Определение содержания МДА в гомогенате печени

Реагенты	Спонтанный уровень ПОЛ	Окисление материала в отсутствие аскорбиновой кислоты	Окисление материала в присутствии аскорбиновой кислоты
Гомогенат, мл	0,9	0,9	0,9
Реагенты	Спонтанный уровень ПОЛ	Окисление материала в отсутствие аскорбиновой кислоты	Окисление материала в присутствии аскорбиновой кислоты
Среда для гомогената, мл	0,1	0,1	-
Аскорбиновая кислота, 8,0 мМ	-	-	0,1
10 % ТХУ, мл	1,0	-	-
Инкубация в термостате при +37 °С в течение 45 мин при перемешивании смеси			
10 % ТХУ, мл	-	1,0	1,0
0,75 % ТБК, мл	0,5	0,5	0,5

- Все пробирки закрыть колпачками из фольги и выдержать в кипящей водяной бане в течение 15 мин. Одновременно с пробами необходимо провести исследование в слепой пробе, в состав которой входят: 1,0 мл дистиллированной воды, 1,0 мл 10 % ТХУ и 0,5 мл ТБК.
- Пробирки извлечь из водяной бани, охладить до комнатной температуры и центрифугировать при 3000 об/мин. Экстинкцию прозрачной надосадочной жидкости проб измерить при длине волны 532 нм в кюветах из оптического стекла толщиной 0,5 см против слепой пробы.

Расчет:

Концентрацию МДА в гомогенате вычислять с помощью молярного коэффициента экстинкции  $\epsilon$ , величина которого для триметинового комплекса при использовании кювет толщиной 0,5 см составляет  $0,78 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; для кювет толщиной 1,0 см составляет  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$$\text{Концентрация МДА в пробе, мкмоль/л} = \frac{E_{532}}{\epsilon}$$

*Ответить на вопросы:*

1. Каков механизм образования МДА при окислении ненасыщенных жирных кислот?
2. В чем заключается принцип определения МДА при спонтанном и индуцированном процессе ПОЛ?
3. Что входит в состав ТБК-активных продуктов?
4. Как можно оценить эффект добавления аскорбиновой кислоты?
5. В каких структурах клетки происходит образование малонового диальдегида?

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2**

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОКИСЛЕННЫХ БЕЛКОВ**

#### *Актуальность*

Анализ продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) и липидов используется для оценки степени выраженности окислительного стресса. В качестве основных индукторов ОМБ, в первую очередь, рассматриваются активные формы кислорода (АФК), продукты перекисного окисления липидов при снижении антиоксидантной защиты. Окислительная модификация белков - один из ранних индикаторов поражения тканей при свободнорадикальной патологии, важное звено в патогенезе сахарного диабета, рассеянного склероза, хронического гепатита, бронхиальной астмы, атеросклероза.

Наиболее чувствительными к окислению являются SH-группы белков, поэтому первичными центрами модификации являются S-содержащие аминокислотные остатки – цистеин и метионин. Карбонизированные производные белков могут также образовываться при взаимодействии аминокислотных остатков лизина и гистидина с продуктами перекисного окисления липидов. Большое значение имеет ковалентная модификация белков, связанная с их металл-катализируемым окислением (с участием металлов с переменной валентностью).

Для определения продуктов ОМБ обычно используется метод, предусматривающий регистрацию 2,4-динитрофенилгидразонов основного и нейтрального характера, образующихся при спонтанной и/или металл-катализируемой ОМБ. Определение окисленных групп белков как маркеров окислительного стресса имеет ряд преимуществ. Так, карбонильные группы являются химически стабильными соединениями и циркулируют в крови более продолжительный промежуток времени, чем конечные продукты свободнорадикального окисления липидов, например, малоновый диальдегид. Под действием АФК могут происходить два процесса – фрагментация белков, маркерами которой являются АДНФГ, и агрегация белков, маркерами которой являются КДНФГ.

*Цель работы:*

Определить содержание карбонильных производных белков в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином.

*Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой определения содержания карбонильных производных белков при спонтанной и металл-зависимой модификации в сыворотке крови.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Выполнить лабораторную работу с использованием сыворотки крови.
5. Рассчитать концентрацию карбонильных продуктов с помощью коэффициента молярной экстинкции.
6. Сравнить полученный результат с данными литературы.
7. Сделать выводы.

*Принцип метода:*

Метод основан на реакции взаимодействия окисленных карбонильных производных белков, образующихся при спонтанной и/или металл-катализируемой ОМБ, с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ).

*Материал исследования:* сыворотка крови.

*Реактивы:*

- фосфатный буфер 0,05 М, рН 7,4;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 4 мМ раствор (м.м.=278);
- ЭДТА динатриевая соль, 1 мМ раствор (м.м.=372,3);
- $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,3 мМ раствор, готовят ex tempore;
- 2,4-ДНФГ, 0,01 М раствор в 2 М  $\text{HCl}$  (м.м.=198), готовят ex tempore. Для лучшего растворения – подогреть на водяной бане;
- $\text{HCl}$ , 2 М раствор;
- ТХУ, 20% раствор;
- этиловый спирт;
- этилацетат;
- мочевины, 8 мМ раствор (м.м.=60,1);
- $\text{NaCl}$ , 0,154 М раствор;
- биуретовый реактив.

*Оборудование:* автоматические пипетки; колориметр или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. Сыворотку крови перед анализом развести 0,154 М раствором  $\text{NaCl}$  в соотношении 1:10. Параллельно в пробе определить содержание белка биуретовым методом, что необходимо для дальнейших расчётов. Спонтанную и металл-зависимую окислительную деструкцию (модификацию) белков сы-

воротки крови анализировать в параллельных пробах. Для каждого варианта исследования приготовить свой контроль (таблица 13).

2. *Спонтанная окислительная модификация белков in vitro*. Контрольная и опытная пробы содержат 0,05 мл разбавленной сыворотки и 0,95 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,4). Общий объем каждой пробы составляет по 1,0 мл.

Таблица 13

Проведение исследования

Реагенты, мл	Спонтанное окисление		Металл-катализируемое окисление	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Сыворотка (1:10)	0,05	0,05	0,05	0,05
Фосфатный буфер 0,05 М	0,95	0,95	0,75	0,75
Смесь Fe <sup>2+</sup> /ЭДТА	-	-	0,1	0,1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,3 мМ	-	-	0,1	0,1
Суммарный объем, мл	1,0	1,0	1,0	1,0
Все пробы инкубировать в течение 15 мин при 37 °С				
2,4-ДНФГ 0,01 М	1,0	-	1,0	-
HCl 2 мМ	-	1,0	-	1,0
20 % ТХУ	1,0	1,0	1,0	1,0
Все пробы инкубировать в течение 1 часа при комнатной температуре				
Все пробы центрифугировать при 3000 об/мин в течение 15 мин				
Этанол: этил-ацетат (1:1)	3,0	3,0	3,0	3,0
Реагенты, мл	Спонтанное окисление		Металл-катализируемое окисление	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Все пробы центрифугировать при 3000 об/мин в течение 15 мин. Отмытый осадок высушить на воздухе и во все пробы добавить:				
Мочевина 8 мМ	3,0	3,0	3,0	3,0
HCl 2 н.	1 капля	1 капля	1 капля	1 капля

3. *Металл-зависимая окислительная модификация белков in vitro*. Для инициации реакции используют среду Фентона (4 мМ раствор FeSO<sub>4</sub> сливают с 1 мМ раствором ЭДТА в объемном соотношении 1:1), готовят ex tempore. В контрольной и опытной пробах к 0,05 мл разбавленной сыворотки при-

ливают 0,75 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,1 мл среды Фентона и 0,1 мл 0,3 мМ раствора  $H_2O_2$ . Общий объём каждой пробы составляет 1,0 мл.

4. Приготовленные пробы для определения спонтанной и металл-катализируемой модификации белков (опыт и контроль) инкубировать 15 мин на водяной бане при температуре 37 °С. После инкубации в опытные пробы добавить по 1,0 мл 0,01 М раствора 2,4-ДНФГ, растворённого в 2 М растворе HCl. В контрольные пробы добавить вместо 2,4-ДНФГ равный объём 2 М раствора HCl. Для осаждения белков в каждую пробу внести по 1,0 мл 20 % раствора ТХУ. Пробы инкубировать при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин. Полученный осадок дважды промыть 3,0 мл смеси этанола и этилацетата (1:1), что необходимо для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков, содержащихся в пробе. После каждого этапа промывания пробу центрифугировать при 3000 об/мин в течение 15 мин. Отмытый осадок подсушить на воздухе для удаления растворителей, а затем к нему добавить по 3,0 мл 8 М раствора мочевины. Для лучшего растворения белка добавить каплю 2 М раствора HCl.
5. Оптическую плотность 2,4-динитрофенилгидразонов, образующихся в результате окислительной модификации белков, измерить при длине волны 363 нм, опыт измерить против соответствующего контроля.

*Расчет:*

Для расчёта содержания карбонильных производных, регистрируемых при длине волны 363 нм, используют коэффициент молярной экстинкции, равный  $22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Ответить на вопросы:*

1. Что такое окислительная модификация белков?
2. С какой целью определяют содержание карбонильных производных белков?
3. В чем заключается принцип определения окисленных карбонильных производных белков?
4. Какое оборудование необходимо при использовании этого метода?
5. С какой целью определяют спонтанную и металл-катализируемую ОМБ?

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ

*Актуальность*

Антиоксидантная система состоит из ферментативных и неферментативных компонентов. К антиоксидантным ферментам относятся: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, обеспечивающие защиту клетки от по-



вреждения свободными радикалами, перекисью водорода и другими активными продуктами ПОЛ.

*Цель работы:*

Определить активность каталазы в реакции с молибдатом аммония.

*Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой определения активности каталазы в гомогенате печени.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Выполнить лабораторную работу с использованием гомогената печени.
5. Рассчитать содержание перекиси водорода с помощью коэффициента молярной экстинкции.
6. Рассчитать активность каталазы с учетом времени инкубации и объема пробы.
7. Сравнить полученный результат с данными литературы.
8. Сделать выводы.

*Принцип метода:*

Активность фермента оценивают по скорости расщепления перекиси водорода за определённое время инкубации при температуре 37°C. Определение содержания перекиси водорода проводят с помощью цветной реакции с молибденово-кислым аммонием, оценивая интенсивность развивающейся окраски при длине волны 410 нм.

*Материал исследования:* гомогенат печени

*Реактивы:*

- сахараза, 0,25 М, рН 7,4, (85,58);
- ЭДТА-Na, 0,0001М (372,3);
- 4 % водный раствор молибдата аммония;
- 0,03 % раствор перекиси водорода;
- 10 % раствор ТХУ;
- 2,5 % раствор молибдата аммония;
- 1 % раствор аскорбиновой кислоты (свежеприготовленный).

*Оборудование:*

- гомогенизатор;
- автоматические пипетки;
- колориметр или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. Подготовить гомогенат: 300 мг печени крысы гомогенизировать в 3 мл среды выделения 0,25 М сахаразы, содержащем 0,001 М раствора ЭДТА (рН 7,4).

2. К 0,1 мл гомогената добавить 2,0 мл 0,03 % раствора перекиси водорода. В слепую пробу внести 0,1 мл дистиллированной воды.
3. Пробу инкубировать 10 мин при 37 °С, реакцию остановить добавлением 1,0 мл 4 % раствора молибдата аммония. Пробу центрифугировать 10 мин при 4000 об/мин.
4. Интенсивность развивающейся окраски измерить на спектрофотометре при длине волны 410 нм против контроля. В контрольную пробу вместо перекиси добавить 2,0 мл дистиллированной воды.

*Расчет:*

Активность каталазы (мкмоль/мин · л) рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(E_x - E_0) \cdot 3,1}{V \cdot t \cdot \varepsilon},$$

где:  $E_x$  и  $E_0$  – экстинкции холостой и опытной проб;

$V$  – объём исследуемого материала (л);

$t$  – время инкубации (мин);

3,1 – общее разведение;

$\varepsilon$  – коэффициент миллимолярной экстинкции продукта взаимодействия перекиси водорода и молибдата аммония ( $22,2 \cdot 10^3$  ммоль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>).

*Ответить на вопросы:*

1. В чем заключается антиоксидантное действие каталазы?
2. Какие неорганические и органические соединения являются субстратами для каталазы?
3. Какова роль каталазы в клеточном метаболизме в норме и при патологии?
4. В каких единицах выражают активность каталазы в сыворотке крови и в гомогенате ткани?
5. Какое оборудование необходимо при использовании этого метода?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НИТРИТ-ИОНОВ В КОНДЕНСАТЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА И СЫВОРОТКЕ КРОВИ

*Актуальность*

Оксид азота (NO<sup>•</sup>) является свободным радикалом, способным выступать как в роли окислителя, так и в роли восстановителя, синтезируется в организме из аргинина при участии кислорода и НАДФ ферментом NO-синтазой (NOS), КФ. 1.14.13.19. Оксид азота обладает высокой способностью к проникновению сквозь биологические мембраны, является вторичным мессенджером, участвует в регуляции метаболических процессов в норме и при патологии, способствует расслаблению гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, обладает антикоагулянтными свойствами (ингибирует агрегацию и адгезию тромбоцитов), опосре-

дует иммунный ответ и нейротрансмиссию, а также подавляет пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток.

Производство NO катализируют три изофермента NOS. *Конститутивные изоформы*: нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS). NO, продуцируемый конститутивными изоформами NOS, образуется в относительно небольших количествах в течение короткого периода времени. *Индукцибельная изоформа*: (iNOS) – эпизодически синтезирующийся фермент в различных клетках (макрофаги, фибробласты, гепатоциты, клетки эпителия). Экспрессию генов iNOS запускают провоспалительные цитокины, бактериальные липополисахариды, катехоламины и др. агенты. iNOS проявляет активность спустя 2–8 часов после воздействия, продуцируя в 100–1000 раз большее количество NO, чем конститутивные изоферменты. При этом синтез оксида азота удерживается на высоком уровне продолжительное время – до нескольких суток. NO, образующийся в макрофагах при участии iNOS, обеспечивает их цитостатическое и цитотоксическое действие на клетки бактерий и опухолей.

Избыточная продукция NO<sup>•</sup> приводит к образованию высоко реакционно-способного соединения – пероксинитрита. Значительная доля пероксинитрита образуется в результате взаимодействия NO<sup>•</sup> с супероксидным анион-радикалом кислорода. Под влиянием пероксинитрита происходит окислительная модификация (**нитрозилирование**) белков, липидов и нуклеиновых кислот, инактивация железосодержащих ферментов. Избыток NO увеличивает проницаемость сосудистых стенок, что вызывает отеки ткани и прямое кардиотоксическое действие вследствие развития генерализованной вазодилатации. Эти явления получили название «нитрозактивный стресс».

В настоящее время применяются различные модификации метода определения метаболитов NO: нитритов (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) и нитратов (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Стабильным конечным продуктом аутоокисления оксида азота в водной среде являются нитриты, в то время как нитраты образуются при взаимодействии NO с оксигемоглобином. Установлена четкая положительная корреляция между активностью продуцирующего оксид азота изофермента iNOS и содержанием стабильных метаболитов NO в биологических жидкостях пациентов: в сыворотке и плазме крови, моче, конденсате выдыхаемого воздуха, слезной жидкости.

#### *Цель работы:*

Определить содержание нитрит-ионов в конденсате выдыхаемого воздуха и сыворотке крови.

#### *Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методиками получения конденсата выдыхаемого воздуха, депротенинизации сыворотки крови и определения содержания нитрит-ионов.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.

4. Выполнить лабораторную работу с использованием конденсата выдыхаемого воздуха и сыворотки крови.
5. Рассчитать содержание нитрит-ионов с помощью калибровочного графика.
6. Сравнить полученный результат с данными литературы.
7. Сделать выводы.

*Принцип метода:*

Содержание нитритов определяют спектрофотометрическим методом, в основу которого положена реакция диазотирования при взаимодействии нитритов с реактивом Грисса. В результате образуются диазосоединения, окрашенные в малиновый цвет, с максимумом поглощения при длине волны 540 нм.

*Материал исследования:* конденсат выдыхаемого воздуха, сыворотка крови.

*Реактивы:*

- реактив Грисса (готовая сухая смесь N-нафтилэтилендиамина и сульфаниламида);
- ледяная уксусная кислота;
- нитрит натрия ( $\text{NaNO}_2$ , м.м.=69,0);
- этиловый спирт;
- 0,5 М раствор NaOH;
- 10 % раствор  $\text{ZnSO}_4$ .

*Оборудование:*

- гомогенизатор;
- автоматические пипетки;
- колориметр или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. Приготовить реактив Грисса путем растворения 1,0 г сухой смеси в 100 мл 50 % уксусной кислоты.
2. *Получение конденсата выдыхаемого воздуха.* Конденсат выдыхаемого воздуха – жидкость, образующаяся в результате конденсации водяных паров, содержащихся в выдыхаемом воздухе обследуемого пациента. Конденсат содержит также диспергированные частицы с поверхности слизистой оболочки респираторного тракта. Стеклоцентрифужную пробирку поместить в ледяную баню и выдержать её в течение 15–20 минут для достаточного охлаждения. Обследуемый пациент через пластмассовую или стеклянную трубку выдыхает воздух так, чтобы его поток был направлен непосредственно на стенку пробирки. Вдох следует делать через нос, выдох – ртом через трубку. Дышать следует в обычном режиме, не форсируя вдох и выдох. Для анализа достаточно 0,6–1,0 мл конденсата.
3. *Депротенизация сыворотки крови.* Перед определением стабильных конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови, её необходимо депротенизировать. Для этого к 0,4 мл исследуемой сыворотки добавить 0,8 мл 0,5 М раствора NaOH и 0,8 мл 10 % раствора сульфата цинка. Смесь

тщательно перемешать в течение 5 минут и центрифугировать 20 мин при 3000 об/мин. Дальнейшую работу вести с надосадочной жидкостью. При данном методе депротеинизации сыворотки в надосадочной жидкости содержание белка не превышает 20–50 мг/л, что не является помехой для количественного определения стабильных конечных метаболитов оксида азота.

4. Дальнейшую работу ведут с надосадочной жидкостью. При данном методе депротеинизации сыворотки в надосадочной жидкости содержание белка не превышает 20–50 мг/л.
5. *Определение содержания нитрит-ионов в конденсате выдыхаемого воздуха.* 0,6 мл конденсата смешать с 0,6 мл реактива Грисса. Смесь инкубировать при комнатной температуре в течение 15 мин. Экстинкцию раствора, приобретающего розово-малиновый цвет, измерить при длине волны 540 нм против слепой пробы, в которой надосадочная жидкость заменена равным объемом дистиллированной воды.
6. *Определение содержания нитритионов в сыворотке крови.* 1,5 мл надосадочной жидкости, полученной после депротеинизации сыворотки, смешать с 1,5 мл реактива Грисса. Смесь инкубировать при комнатной температуре в течение 15 мин. Экстинкцию раствора, приобретающего розово-малиновый цвет, измерить при длине волны 540 нм против слепой пробы, в которой надосадочная жидкость заменена равным объемом дистиллированной воды.

#### *Расчет:*

Для вычисления концентрации нитрит-ионов в исследуемом материале используют стандартный раствор нитрита натрия, либо строят калибровочный график с диапазоном концентрации нитрита натрия от 5 до 100 мкмоль/л (линейность калибровочного графика сохраняется в пределах данного диапазона концентраций).

$$\text{Концентрация нитрит-ионов, мкмоль/л} = (E_{\text{пробы}} \cdot C_{\text{стандарта}}) / E_{\text{стандарта}},$$

где:  $E_{\text{пробы}}$  и  $E_{\text{стандарта}}$  – экстинкции исследуемой пробы и стандартного раствора нитрита натрия, соответственно, измеренные при длине волны 540 нм.

$C_{\text{стандарта}}$  – концентрации  $\text{NaNO}_2$  в стандартном растворе (калибраторе), концентрация которого должна находиться в диапазоне от 5 до 100 мкмоль/л.

При определении содержания нитратов в сыворотке крови, результат следует умножить на 5, поскольку сыворотка при депротеинизации была разведена в 5 раз.

#### *Построение калибровочного графика*

Для построения калибровочного графика необходимо приготовить основной калибровочный раствор  $\text{NaNO}_2$ . 69 мг  $\text{NaNO}_2$  растворить в небольшом объеме

дистиллированной воды и довести его до 100 мл с помощью мерной колбы. Полученный раствор развести водой в 100 раз. Получают основной калибровочный раствор  $\text{NaNO}_2$  с концентрацией 100 мкмоль/л.

Пробы для построения калибровочного графика готовят согласно таблице 14.

Определение содержания нитрит-ионов в каждом из приготовленных разведений проводят в дублях. 1,0 мл разведения смешивают с 1,0 мл реактива Грисса. Оптическую плотность пробы измеряют через 15 мин при длине волны 540 нм против слепой пробы, в которую вместо разведения  $\text{NaNO}_2$  вносят 1,0 мл дистиллированной воды. Строят калибровочный график в координатах: зависимость оптической плотности калибровочных проб от концентрации в них нитрит ионов.

Таблица 14

*Построение калибровочного графика для определения концентрации нитрит-ионов*

Основной раствор $\text{NaNO}_2$ , мл	Дистиллированная вода, мл	Кратность разведения основного раствора $\text{NaNO}_2$	Конечная концентрация нитрита, мкмоль/л
0,25	4,75	20	5
0,5	4,5	10	10
1,25	3,75	4	25
2,5	2,5	2	50
3,75	1,25	1,33	75
5,0	-	-	100

*Ответить на вопросы:*

1. Продуктом какой реакции является оксид азота?
2. Какие компоненты входят в состав реактива Грисса?
3. В чем заключается принцип определения содержания оксида азота с реактивом Грисса?
4. С какой целью определяют оксид азота в выдыхаемом воздухе?
5. Какова роль оксида азота в норме и при патологии?
6. Каков механизм образования нитрит-ионов?

## СЕМИНАР

### ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС: РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ

*Вопросы для самоподготовки:*

1. Активные формы кислорода и их роль в перекисных процессах.
2. Образование и метаболизм перекиси водорода в клетке.
3. Цепной свободно-радикальный механизм перекисного окисления липидов.
4. Образование продуктов ПОЛ на примере линоленовой кислоты.

5. Методы изучения процессов ПОЛ. Определение содержания свободных радикалов, продуктов ПОЛ, антиоксидантов, ферментов антиоксидантной защиты.
6. Регуляция процессов перекисного окисления липидов.
7. Прооксиданты. Механизмы действия.
8. Ингибирование ПОЛ антиоксидантами.
9. Глутатион-пероксидазная система клетки.
10. Биологическая роль перекисей липидов в клетке.
11. ПОЛ и проблемы злокачественного роста.
12. ПОЛ при атеросклерозе.
13. Образование перекисей липидов в клетке при действии ионизирующего излучения.
14. Окислительный стресс. Перекисная гипотеза гибели клетки.

*Темы докладов и рефератов:*

1. Физические и химические методы оценки перекисного окисления липидов. Определение метаболитов и продуктов.
2. Оценка антиоксидантной активности витаминов, ферментов.
3. Жирорастворимые и водорастворимые антиоксиданты.
4. Пероксисомы. Ферменты, метаболизма  $H_2O_2$ .
5. Активные формы кислорода и свободные радикалы в реакциях перекисного окисления липидов.
6. Окислительная модификация белков, липидов и нуклеиновых кислот.
7. Образование свободных радикалов в фагоцитирующих клетках.
8. Первичные и вторичные радикалы, их роль в патологии.
9. Образование перекисей липидов в клетке при действии ионизирующего излучения.
10. Перекисное окисление липидов при катаракте.
11. Образование свободных радикалов при гипоксии.

## СЕМИНАР

### МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ: ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

*Вопросы для самоподготовки:*

1. Эндоплазматический ретикулум. Структура и функции микросом. Метаболизм ксенобиотиков.
2. Микросомальная система окисления. Ферменты микросом. Монооксигеназы, маркерные ферменты.
3. Характеристика цитохрома P-450. Основные этапы гидроксилирования.
4. НАДФН-зависимые реакции. Значение CYP3A4 в метаболизме лекарств.
5. НАДН-зависимые реакции. Реакции конъюгации.
6. Способы оценки микросомального окисления печени.

7. Участие цитохрома Р-450 в окислении ксенобиотиков и природных субстратов. Субстраты I и II типов.
8. Модификация ксенобиотиков в цепи переноса электронов при микросомальном окислении.
9. Индукторы и ингибиторы микросомального окисления.
10. Химические канцерогены. Механизм токсического действия СС14.
11. Токсификация, детоксикация. Токсический тип повреждения клетки.

*Темы докладов и рефератов:*

1. Механизмы обезвреживания ксенобиотиков.
2. Микросомальная система окисления. Доноры и акцепторы водорода в системе. Особенности монооксигеназного окисления.
3. Характеристика цитохрома Р-450. Основные этапы гидроксилирования.
4. НАДФН-зависимые реакции. Значение СУР3А4 в метаболизме лекарств.
5. НАДН-зависимые реакции. Реакции конъюгации.
6. Лабораторная оценка метаболизма ксенобиотиков.
7. Классификация изоформ цитохрома Р-450. Основные семейства в метаболизме лекарственных средств.
8. Гены цитохрома Р450 у человека.
9. Метаболизм кофеина – субстратного маркера СУР1А2.

## **ЗАДАНИЕ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

**Разработка проекта: организация и планирование эксперимента, выбор методов и объекта исследования, экспертиза проекта.**

**Задания для разработки проекта:**

1. Особенности спектра жирных кислот эритроцитов под влиянием статинов.
2. Состояние ПОЛ и антиоксидантной защиты при сахарном диабете I типа.
3. Роль перекисного окисления липидов при бронхиальной астме.
4. Влияние карнозина на процессы перекисного окисления липидов при алкогольной интоксикации.

*Сформировать план проведения эксперимента по следующим разделам:*

### **Организация и планирование эксперимента**

#### 1. Основы планирования научного эксперимента

- Формирование рабочей гипотезы
- Определение цели и задач исследования
- Объект исследования
- Организация работы: наличие лабораторного оборудования и реактивов, задания сотрудникам
- Материал и методы
- Материально-техническое обеспечение работы



## 2. Планирование научного эксперимента

- Полный план эксперимента
- Группы наблюдения
- Показатели
- Методы
- Оборудование
- Реактивы
- Подача заявки на реактивы и оборудование

## 3. Выбор методики исследования. Критерии

- Чувствительность и специфичность
- Техничко-экономические
- Оценка биологической и медицинской эффективности

## 4. Объект исследования

- Экспериментальные группы, определение размеров выборки
- Факторы: дозы препаратов, наличие активаторов и ингибиторов, показатели, сроки исследования
- Дизайн исследования, выбор модели
- Критерии включения, исключения

## 5. Проведение эксперимента

- Лабораторный журнал
- Единицы измерения
- Приготовление реактивов, обработка биологического материала, центрифугирование
- Сроки инкубации
- Использование лабораторного оборудования: весы, рН-метр, центрифуга, спектрофотометр, ИФ-анализатор
- Оценка измерений: построение калибровочного графика, использование коэффициента молярной экстинкции, расчет концентрации, активности фермента
- Оценка и контроль качества эксперимента

## 6. Статистическая обработка результатов исследования

- Использование параметрических и непараметрических методов
- Корреляционный анализ
- Регрессионный анализ
- Дискриминантный анализ

## 7. Оформление результатов исследования

- Составление таблиц
- Оформление рисунков
- Разработка схем и моделей
- Составление заключения
- Подготовка и оформление выводов исследования

## 8. Оформление отчета

- Общие требования оформления результатов
- Разделы: титульный лист, введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, выводы, список литературы
- Разработка рекомендаций по итогам исследования
- Библиографическое описание: общие требования и правила оформления

## 9. Экспертиза результатов проведенного исследования

- Критерии оценки
- Рецензирование
- Обсуждение результатов и заключение
- Выставление оценок

## РАЗДЕЛ II

# ИНТЕГРАТИВНАЯ БИОХИМИЯ. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА

### *Информационный блок*

Обмен веществ (метаболизм) – всё многообразие химических реакций, катализируемых ферментами, которые протекают в живых организмах и составляют основу его жизнедеятельности. Метаболизм представляет собой высокоинтегрированный и целенаправленный процесс, реализующийся в форме последовательных мультиферментных реакций. Участвующие в обмене веществ химические соединения называются метаболитами. Метаболические реакции обеспечивают обмен веществом, энергией и информацией между живым организмом и средой его обитания. По этой причине живые организмы относят к открытым системам. Современная медико-биологическая наука под информацией подразумевает сложный комплекс сведений, получаемых клеткой из окружающей среды, которые необходимы для своевременного приспособления клетки к постоянно меняющимся условиям её существования. Для одноклеточных организмов – приспособление к условиям среды обитания. Для многоклеточных организмов – с одной стороны, это приспособление определенного типа клетки к изменению функциональных свойств её ближайшего окружения, с другой стороны, для организма как единого целого – его приспособление к новым условиям среды обитания.

В интеграции клеточного метаболизма ведущая роль принадлежит взаимодействию внеклеточного стимула (первичного мессенджера) с поверхностным или внутриклеточным рецептором клетки, что порождает сложный процесс передачи (трансдукции) информации, доставляемой внешним сигналом, к внутриклеточным исполнительным (эффекторным) молекулам-мишеням.

### *Экспериментальный блок*

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

### КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА И ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРНОГО АНАЛИЗА. КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АСПАРТАТКАРБАМОИЛТРАНСФЕРАЗЫ

#### *Актуальность*

Владение корректными методами измерения скорости реакций, катализируемых ферментами, имеет большое теоретическое и практическое значение. Знание этих методов позволяет ответить на вопрос: как быстро данное количество фермента может превратить данное количество субстрата в продукт, или

как быстро образуется и исчезает то или иное промежуточное соединение. Кинетические исследования лежат в основе большинства методов, используемых для установления механизма ферментативных реакций. Важное значение имеет знание особенностей кинетики ферментов, занимающих ключевые позиции в метаболизме клетки – аллостерических ферментов. Эти особенности обусловлены субъединичной структурой, наличием нескольких активных центров и центров связывания аллостерических регуляторов. По мере насыщения активных центров субстратом реализуется кооперативность во взаимодействии этих центров, что существенно меняет их сродство к субстрату. Это составляет основу для выполнения аллостерическими ферментами регуляторных функций в клеточном метаболизме.

#### *Цель работы:*

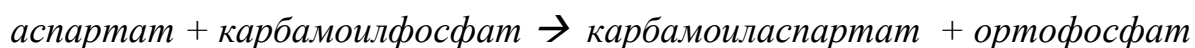
Освоить основные методы обработки, расчета и графического представления кинетических параметров ферментативных реакций, научиться определять тип ингибитора изучаемого фермента и научиться применять метод количественной оценки явления кооперативности аллостерических ферментов с использованием уравнения и графика Хилла.

#### *Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с основными методами обработки и расчета кинетических параметров ферментативных реакций, а также со способами графического представления данных кинетики.
2. Выполнить лабораторную работу по определению типов ингибиторов ферментов.
3. Ознакомиться с методом количественной оценки явления кооперативности при исследовании кинетических свойств аллостерических ферментов.
4. Сделать выводы по работе.

#### *Принцип метода:*

В качестве примера используем данные кинетики, полученные *in vitro*, при изучении кинетических свойств аллостерического фермента аспартаткарбамоилтрансферазы. Фермент катализирует реакцию:



Активность фермента определяется по освобождению неорганического фосфата через определенные промежутки времени.

#### *Оборудование:*

1. Данные исследования, в котором определяли начальную скорость реакции при различных концентрациях аспартата и фиксированной концентрации карбамоилфосфата (3,0 мМ), приведены в таблице 14. При этом использовали как нативный, так и фермент, предварительно прогретый на водяной бане при 60 °С в течение 4 мин. Мягкое температурное

воздействии на аллостерический фермент приводит к диссоциации его субъединиц. В результате фермент не теряет способности катализировать реакцию, но функционирует как «обычный» фермент – демонстрируя кинетику по Михаэлису–Ментен.

Таблица 14

Кинетика аспараткарбамоилтрансферазной реакции

Концентрация аспартата, мМ [S]	Скорость реакции, мкмоль неорг. фосфата/ч (V)				
	Нативный фермент	Фермент после прогрева	Нативный фермент, + 0,1 мМ ЦТФ	Фермент после прогрева, + 0,1 мМ ЦТФ	Нативный фермент, + 0,1 мМ АТФ
1	2	3	4	5	6
1,0	0,15	0,4	0,025	0,4	0,4
2,0	0,25	0,6	0,10	0,6	0,55
2,5	0,3	0,85	0,125	0,85	0,9
4,0	0,7	1,2	0,35	1,3	1,35
5,0	1,1	1,4	0,5	1,4	1,4
7,5	1,7	1,95	1,03	2,0	2,0
10,0	2,2	2,4	1,6	2,4	2,4
15,0	2,95	3,0	2,5	2,95	3,0
20,0	3,05	3,1	2,9	3,1	3,1

*Примечание:* ЦТФ – цитидинтрифосфат; АТФ – аденозинтрифосфат

- Влияние ингибитора малеата на активность фермента изучали, измеряя начальную скорость реакции при нарастающих концентрациях малеата (от 0 до 10 мМ). При этом использовали как нативный, так и фермент, предварительно прогретый при 60 °С в течение 4 мин. Результаты, полученные в присутствии 3,0 мМ карбамоилфосфата и 1,0 мМ аспартата представлены в таблице 15.
- Тип ингибирования предварительно прогретого фермента, оказываемого малеатом, изучали в условиях изменения концентрации аспартата при двух фиксированных концентрациях малеата. Результаты приведены в таблице 16.

Таблица 15

Влияние малеата на активность аспараткарбамоилтрансферазы

Концентрация малеата, mM	Скорость реакции, мкмоль неорган. фосфата/ч	
	Нативный фермент	Прогретый фермент
0	0,15	0,4
0,25	0,25	0,32
0,5	0,285	0,23
0,75	0,30	0,2
1,0	0,255	0,18
2,0	0,16	0,10
5,0	0,08	0,075
10,0	0,06	0,05

Таблица 16

Ингибирование малеатом аспараткарбамоилтрансферазы

Концентрация аспаргата, mM	Скорость реакции, мкмоль неорган. фосфата/ч		
	Без малеата	1 mM малеата	2 mM малеата
5	0,77	0,43	0,28
8	0,95	0,61	0,44
10	1,05	0,69	0,51
20	1,25	0,95	0,77
25	1,33	1,05	0,87
40	1,53	1,25	1,05
100	1,54	1,43	1,33

Проведение анализа:

1. Построить график в координатах Михаэлиса–Ментен по данным таблицы 14 (5 кривых на одном графике, использовать карандаши разного цвета). Построить график в координатах Лайнуивера–Берка на основе данных в столбцах 1 и 3. Определить  $K_m$  и  $V_{max}$  для прогретого фермента (столбец 3) с помощью графиков Михаэлиса–Ментен и Лайнуивера–Берка. Сравнить точность определения  $K_m$  и  $V_{max}$

Объяснить:

- В чем причины полученных различий в форме соответствующих кривых для нативного и предварительно прогретого фермента (столбцы 2 и 3). Как называются формы этих кривых?
- Что означают изменения форм кривых для нативного фермента в присутствии ЦТФ и АТФ (столбцы 4 и 5)?

- Какими регуляторами по отношению к нативному ферменту являются ЦТФ и АТФ?
  - Почему практически не отличаются по форме друг от друга кривые, построенные по данным столбцов 2 и 5?
2. Построить график в координатах Лайнуивера-Берка на основе данных таблицы 3. Определить тип ингибирования, которое оказывает малеат на исследуемый фермент. Определить  $K_m$  и  $V_{max}$  при отсутствии малеата в среде инкубации и сравнить эти значения с таковыми, полученным в присутствии 1 и 2 мМ малеата. Определить  $K_i$  для 1 и 2 мМ малеата.

Объяснить:

- Причину изменения  $K_m$  в рассматриваемом случае.
  - Как сдвиг величины  $K_m$  характеризует изменение сродства субстрата к активному центру фермента в присутствии ингибитора данного типа.
3. Построить график в координатах Михаэлис-Ментен на основе данных таблицы 2. По оси абсцисс откладывать концентрацию малеата.

Объяснить:

- Причину отличий в форме двух кривых в области низких концентраций ингибитора: в диапазоне концентраций малеата от 0 до 1,0 мМ. (Учитывать тип ингибирования, оказываемого малеатом).
  - Причину сходства форм обеих кривых в области больших концентраций малеата, начиная с 1,5 мМ и более.
4. Построить график Хилла на основе данных в таблице 1. Использовать данные в столбцах 1 и 2; в столбцах 1 и 4 и столбцах 1 и 6. Определить наклоны линии графика ( $\text{tg}\alpha$  или коэффициент Хилла –  $n$ ) в трех случаях.

Объяснить:

- Какое явление в функционировании аллостерического фермента количественно характеризует наклон линии графика к оси абсцисс?
- Почему наклоны графиков для данных столбцов 4 и 6 отличаются от такового, построенного на основании столбца 2?
- Что означает уменьшение наклона линии графика? Как в этом случае будет изменяться кооперативность?

*Расчет:*

Результаты работы представить в виде:

- 1) построенные на миллиметровой бумаге графики, в соответствии с изложенными заданиями;
- 2) вычисленные величины  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$  и коэффициент Хилла ( $n$ ), в соответствии с изложенными заданиями.

*Ответить на вопросы:*

1. Назвать классы ферментов.
2. Охарактеризовать строение молекул простых и сложных ферментов.
3. Описать строение активного (каталитического) центра фермента.

4. Что такое энергия активации и переходное состояние реагирующих молекул?
5. Написать уравнение Михаэлиса–Ментен и представьте график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Что характеризуют константа Михаэлиса ( $K_m$ ), максимальная скорость ферментативной реакции ( $V_{max}$ ).
6. Охарактеризовать приемы линеаризации графика Михаэлиса–Ментен (графики и уравнения Лайнуивера–Бэрка, Эдди–Хофсти, Эйзенталя–Корниш–Боуден).
7. Назвать классы и описать механизмы действия различных типов ингибиторов ферментов. Что такое константа ингибирования ( $K_i$ ) и методы её определения.
8. Опишите строение и роль в жизнедеятельности клетки аллостерических ферментов. Какова природа и механизм действия аллостерических регуляторов (эффекторов)?
9. Охарактеризовать особенности кинетики реакций, катализируемых аллостерическими ферментами. Что такое кооперативность в функционировании аллостерических ферментов?
10. Какую информацию об аллостерических ферментах позволяет получить график А. Хилла? Что характеризует коэффициент Хилла и степень насыщения ( $Y$ ) по Хиллу?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА D

#### *Актуальность*

Катепсин D – лизосомальная протеаза, являющаяся одним из маркерных ферментов этих внутриклеточных органелл. Увеличение активности фермента характеризует активацию лизосом, которая сопровождается усилением реакций эндо- и экзоцитоза, аутофагией с последующей апластической гибелью клетки. Катепсин D является одной из молекул – мишеней для церамида, молекулы, выполняющей роль вторичного мессенджера липидной природы. Церамид образуется в результате гидролиза сфингомиелина, содержащегося в мембране лизосом. Реакцию катализирует лизосомальная кислая сфингомиелиназа, активация которой происходит при воздействии на клетку провоспалительных цитокинов или под влиянием химиотерапевтических препаратов. В результате прямого взаимодействия церамида с изначально неактивным катепсином D происходит его аутокаталитический протеолиз с образованием активной формы катепсина D. Наряду с вышеперечисленными эффектами, катепсин D активирует ряд проапоптотических (способствующих протеканию апоптоза) белков (Bax и Bid), стимулирует выход из митохондрий цитохрома C, а также участвует в активации каспаз -9 и -3, необходимых для реализации апоптоза.



В условиях активации лизомального аппарата клетки проницаемость мембран лизосом увеличивается. В результате этого некоторое количество внутрилизомальных ферментов выходят в цитоплазму. Для количественной оценки степени повышения проницаемости мембран лизосом (что отражает степень активации лизомального аппарата) в гомогенате исследуемой ткани определяют свободную и общую активность лизосомальных ферментов. Под свободной активностью подразумевают активность, которая обусловлена той частью внутрилизосомальных ферментов, которая вышла в цитоплазму в состоянии *in vivo*. Общую активность определяют с применением синтетического детергента тритона X-100. Этот синтетический детергент искусственно повышает проницаемость мембран лизосом настолько, что все внутрилизосомальные ферменты выходят наружу. При этом тритон X-100 не оказывает влияния на активность изучаемых ферментов. По сдвигу соотношения свободной активности фермента (определяемую без тритона X-100) к общей его активности (определяемую с тритоном X-100) судят о степени лабильности лизосомальной мембраны, что отражает степень активации лизосомального аппарата клеток изучаемой ткани. Очевидно, что в условиях минимальной активности лизосом отношение свободная активность/общая активность будет существенно ниже единицы. При активации лизосоального аппарата соотношение будет расти, приближаясь к единице.

#### *Цель работы:*

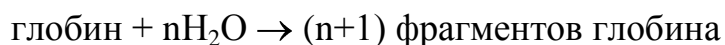
Определить активность катепсина D в гомогенате печени.

#### *Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с методикой определения свободной и общей активности катепсина D.
2. Подготовить материал для анализа и реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Подготовить калибровочный график по тирозину.
5. Выполнить лабораторную работу с использованием гомогената печени.
6. Рассчитать активность фермента в пересчёте на 1 г печени и на 1 мг белка гомогената.
7. Сделать выводы.

#### *Принцип метода:*

Метод основан на спектрофотометрическом определении кислоторастворимых продуктов ферментативного гидролиза глобина – белковой части молекулы гемоглобина:



Одним из продуктов гидролиза гемоглобина является ароматическая аминокислота тирозин, которую можно количественно определить по характерному поглощению раствором светового потока с длиной волны 280 нм.

Для оценки проницаемости лизосомальной мембраны определяют свободную и общую активность катепсина D в отсутствие и в присутствии тритона X-100, соответственно.

*Материал исследования:* гомогенат печени крыс.

*Реактивы:*

- 0,1 М ацетатный буфер, pH 5,0. Приготовление буфера: готовят 0,2 М водный раствор ацетата натрия, для чего 2,72 г кристаллического ацетата натрия ( $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ ) растворяют в мерной колбе на 100 мл и доводят объём раствора до метки. Смешивают 35,2 мл 0,2 М ацетата натрия и 14,3 мл 0,2 М уксусной кислоты.
- Сахароза, 0,25 М раствор.
- 1% раствор гемоглобина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,0).
- ТХУ, 10 % раствор.
- Тритон X-100, 1 % раствор.
- Стандартный раствор тирозина: 30,0 мг тирозина растворить в 100 мл 10 % раствора ТХУ (0,1 мл такого раствора содержит 0,165 мкмоль тирозина).

*Оборудование:*

- гомогенизатор;
- автоматические пипетки;
- спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. Приготовить гомогенат из печени крыс. Навеску печени крысы 200 мг измельчить ножницами на холоде и гомогенизировать в ледяном 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1:2 (ткань/сахароза).
2. Определить свободную активность катепсина D. К 0,3 мл гомогената добавить 0,15 мл раствора гемоглобина. Реакционную смесь перемешать и инкубировать при +37 °С в течение 30 мин при медленном перемешивании. После окончания инкубации реакцию остановить добавлением 0,6 мл 10 % раствора ТХУ.
3. Определить общую активность катепсина D. К 0,3 мл гомогената добавить 0,1 мл 1 % раствора тритона X-100 и преинкубировать смесь при температуре +37 °С в течение 10 мин. По истечении времени преинкубации к смеси прилить 0,15 мл раствора гемоглобина и пробу инкубировать в течение 30 мин при температуре +37 °С. По завершении инкубации реакцию остановить добавлением 0,6 мл 10 % раствора ТХУ.
4. Далее, в пробу на свободную активность катепсина D (без тритона X-100) добавить 2,1 мл дистиллированной воды; в пробу на общую активность катепсина D (с тритоном X-100) добавить 2,0 мл дистиллированной воды. Обе пробы центрифугировать в пластиковых пробирках при 4000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость из каждой пробы аккуратно отбирать, не задев осадок, и измерить их оптические плотности при длине

волны 280 нм в кюветах из кварцевого стекла толщиной 1,0 см против дистиллированной воды.

5. Одновременно с определением свободной и общей активности катепсина D необходимо поставить слепые пробы (контроли) на оптическую плотность субстрата и исследуемого материала. С этой целью готовят:
  - 1 контроль без тритона X-100 (контроль 1): в отдельную пробирку внести 0,3 мл гомогената и помещают её на 30 мин в холодильник (ледяную баню). Затем в пробирку последовательно добавить 0,6 мл раствора ТХУ, 0,15 мл раствора гемоглобина и 2,1 мл дистиллированной воды.
  - 2 контроль с тритоном X-100 (контроль 2): в отдельную пробирку внести 0,3 мл гомогената, 0,1 мл раствора тритона X-100 и поместить на 30 мин в холодильник (ледяную баню). Затем последовательно добавить 0,6 мл раствора ТХУ; 0,15 мл раствора гемоглобина и 2,0 мл дистиллированной воды.
6. Обе контрольные пробы центрифугировать при 4000 об/мин в течение 10 мин. Супернатанты из каждой пробы аккуратно отбирать и измерить их оптические плотности, как описано выше.

*Расчет:*

Активность катепсина D (нмоль тирозина /мин на 1 г печени) вычисляют

по формуле: 
$$\frac{X \cdot 10 \cdot 1000 \cdot 20}{3 \cdot 30},$$

где X – количество мкмоль тирозина по калибровочному графику, найденное с помощью ΔE.

Свободная активность фермента: ΔE является разницей оптических плотностей между опытом (проба на свободную активность фермента) и контролем без тритона X-100 (контроль 1).

Общая активность фермента: ΔE является разницей оптических плотностей между опытом (проба на общую активность фермента) и контролем с тритоном X-100 (контроль 2);

10/3 – коэффициент пересчёта на 1 мл исследуемого материала;

1000 – коэффициент пересчёта в нмоль;

30 – коэффициент пересчёта на 1 мин инкубации.

$$\text{Составляют отношение} = \frac{\text{свободная активность катепсина D}}{\text{общая активность катепсина D}}$$

Расчет активности фермента проводят с помощью калибровочного графика, который строят с помощью стандартных растворов тирозина по схеме, представленной в таблице 17.

*Схема приготовления стандартных растворов тирозина  
для калибровочного графика*

<b>Пробы, стандартные растворы</b>	<b>Стандартный раствор тирозина, мл</b>	<b>Содержание тирозина в пробе, мкмоль</b>	<b>Дист. вода, мл</b>	<b>10 % раствор ТХУ, мл</b>
Слепая проба	–	–	2,55	0,6
1	0,1	0,165	2,55	0,5
2	0,2	0,330	2,55	0,4
3	0,3	0,495	2,55	0,3
4	0,4	0,660	2,55	0,2
5	0,5	0,825	2,55	0,1

Оптические плотности стандартных растворов тирозина измеряют при длине волны 280 нм в кювете из кварцевого стекла толщиной 1,0 см против слепой пробы.

*Ответить на вопросы:*

1. Какие ферменты относятся к маркерным для лизосом?
2. В чем заключается принцип определения свободной и общей активности катепсина D?
3. Что является субстратом и продуктом реакции, катализируемой катепсином D?
4. С какой целью используют тритон X-100 при определении активности катепсина D?
5. Какое оборудование необходимо для проведения работы?
6. Оцените полученные результаты.
7. Сравните с данными литературы.

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3**

#### **ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА G-AKТИНА ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫС**

*Актуальность*

Актин – белок мышечных фибрилл, молекулярная масса которого равна 70 кД. Различают глобулярную форму белка, представляющую собой мономеры G-актина, которые содержат молекулу АТФ и ион  $Ca^{2+}$ . G-актин полимеризуется в нити F-актина, образуя фибриллярную форму. Молекулы F-актина существуют в виде линейных полимеров, свёрнутых в сверхспираль, напоминающую две нити бус, скрученных по оси относительно друг друга с шагом спирали 36,5 нм. Процесс перехода G-актина в F-актин сопровождается отщепле-

нием неорганического фосфора от АТФ. Этому переходу способствуют ионы металлов: калия и магния. F-актин легко образует комплекс с миозином, носящий название актомиозина. Актин и миозин – базис основных единиц микрофиламентов.

*Цель работы:*

Изучить метод выделения очищенного белка мышечных фибрилл актина из скелетных мышцы крыс.

*Задания для самостоятельной работы:*

1. Ознакомиться с особенностью метода выделения актина из скелетных мышц с применением ацетоновой экстракции.
2. Подготовить реактивы.
3. Выполнить лабораторную работу и сделать необходимые расчеты.
4. Сделать выводы по работе.

*Принцип метода:*

Принцип метода заключается в обработке измельчённой ткани мышц органическим растворителем – ацетоном. При этом происходит денатурация большей части сопутствующих актину белков, а также экстрагируются липиды, мешающие извлечению актина. Актин легко экстрагируется водой из ацетонового порошка, то есть гомогената, высушенного после обработки ацетоном. Дополнительно очистку выделенного актина проводят осаждением в изоэлектрической точке при рН 4,7. Необходимое значение рН получают подкислением надосадочной жидкости соляной кислотой.

*Материал исследования:* скелетные мышцы крысы.

*Реактивы:*

- ацетон (перед работой охладить в холодильнике);
- 1 N раствор HCl;
- 0,1 M Na-фосфатный буфер (рН 7,4) с 1 % додецилсульфатом натрия.

*Оборудование:*

- Центрифуга;
- автоматические пипетки;
- колориметр или спектрофотометр.

*Проведение анализа:*

1. Все операции по выделению актина проводить на холоде (0–4 °С). Мышечную ткань (от 1 до 5 г) тщательно размельчить, дважды пропуская через мясорубку, либо с помощью ножниц. Полученную кашицу перенести в химический стакан и залить трёхкратным объёмом холодного ацетона.

2. Смесь выдержать в ледяной бане 30–40 мин при периодическом помешивании стеклянной палочкой – не реже чем через каждые 5 мин. Далее смесь центрифугировать при 2500 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость слить. Полученный осадок извлечь на фильтровальную бумагу, хорошо промакнуть другим листом фильтровальной бумаги и разрыхлить, равномерно распределяя по поверхности листа.
3. Далее осадок тщательно подсушить на воздухе. Высушенный осадок суспендировать в равном объёме дистиллированной воды и выдержать 15–20 мин при тщательном перемешивании смеси стеклянной палочкой.
4. Далее суспензию центрифугировать при 2000 об/мин в течение 10 мин. Полученную надосадочную жидкость (водный экстракт G-актина) перенести в другую пробирку, подкислить 0,1 N раствором HCl до значений pH 4,7 и оставить на холоде на 20–30 мин.
5. Выпавший в осадок G-актин отделить центрифугированием при 7000 об/мин в течение 15 мин. Осадок G-актина растворить в минимальном объёме буфера – 3,0 мл и оставить в плотно закрытой пробирке до следующего занятия.
6. В полученных препаратах G-актина (предварительно измерить объем препарата) определить содержание белка биуретовым методом. Выход белка представить по отношению к взятой навеске ткани: мг выделенного G-актина из 1 г скелетных мышц.

*Ответить на вопросы:*

1. Назвать основные и вспомогательные белки, участвующие в акте мышечного сокращения.
2. Перечислить структурные элементы миоцита (клетки скелетных мышц).
3. Назвать и охарактеризовать виды мышечной ткани.
4. Описать механизм сокращения мышечного волокна.
5. Что является источником энергии для мышечного сокращения? В чем состоит роль креатинфосфата?
6. Указать биохимические маркеры повреждения мышечной ткани.

## СЕМИНАР

### ЗАКОНЫ КЛАССИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ. ИНГИБИТОРЫ И ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ НЕАЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

*Вопросы для самоподготовки:*

1. Молекулярность и порядок реакции. Константа скорости реакции, её значение в практике энзимологии.
2. Стационарная кинетика ферментативных реакций. Уравнение Михаэлиса–Ментен.

3. График Михаэлис-Ментен и его ограничения.
4. Константа Михаэлиса, константа диссоциации, максимальная скорость и начальная скорость ферментативной реакции.
5. Графическое представление данных кинетики в координатах Михаэлиса–Ментен.
6. Уравнение и график Лайнуивера-Берка, его преимущества.
7. Уравнение и график Эди–Хофсти, его преимущества.
8. Уравнение и график Эйзенталя–Корниш–Боуден, его преимущества.
9. Единицы активности ферментов. Условия для корректного измерения активности фермента. Представление о кинетическом методе определения активности фермента и о методе по «конечной точке».
10. Двухсубстратные ферментативные реакции.
11. Последовательный механизм ферментативной реакции. Механизм «пинг-понг» взаимодействия активного центра фермента с субстратом.
12. Ингибиторы (обратимые и необратимые) и инактиваторы ферментативных реакций.
13. Ингибиторы и их классификация. Конкурентное ингибирование. Способ выявления типа ингибирования по данным кинетического анализа.
14. Неконкурентное и бесконкурентное ингибирование. Способ выявления типа ингибирования по данным кинетического анализа.
15. Константа ингибирования при конкурентном ингибировании. Способы определения константы ингибирования (по формуле и графически).

*Темы докладов, рефератов:*

1. Основные внутриклеточные факторы регуляции активности ферментов.
2. Стратегии интеграции метаболизма на основе быстрого изменения каталитической активности ферментов.
3. Суть стратегии нековалентной модификации молекул ферментов.
4. Стратегия интеграции метаболизма на основе изменения количества фермента в клетке? Конститутивные и индуцибельные ферменты.
5. Компартиментализация ферментов в клетке. Ферменты, чья компартиментализация меняется при переходе из неактивной формы в активную.
6. Роль гормональной регуляции в интеграции метаболизма. Анаболические и катаболические гормоны.
7. Мультиферментные комплексы, как пример нековалентной модификации ферментов.
8. Изоферменты. Происхождение свойства и выполняемые функции.
9. Оценка активности изоферментов в сыворотке крови, как метод определения тканевой локализации патологического процесса.
10. Отличия ферментов, как биокатализаторов, от химических катализаторов, действующих в неживых системах.
11. Механизмы ферментативного катализа: кислотно-основной и ковалентный катализ.

## СЕМИНАР

### ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА С УЧАСТИЕМ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ (РЕГУЛЯТОРНЫХ) ФЕРМЕНТОВ

*Вопросы для самоподготовки:*

1. Аллостерические ферменты: особенности строения: активные (каталитические) и регуляторные центры.
2. Кооперативность во взаимодействии каталитических центров аллостерического фермента, её молекулярные основы.
3. Гомотропные и гетеротропные аллостерические ферменты.
4. Представление о кооперативном эффекте аллостерических белков на примере насыщения кислородом субъединиц гемоглобина.
5. Особенности кинетики реакций, катализируемых аллостерическими ферментами. Вид графика зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. На каком участке графика в наибольшей мере проявляется явление кооперативности.
6. Значение кооперативности взаимодействия каталитических центров аллостерических ферментов в реализации их регуляторной функции.
7. Аллостерические регуляторы. Природа и механизмы влияния данных регуляторов на активность аллостерических ферментов. Положительная и отрицательная кооперативность. Варианты изменения  $K_m$  и  $V_{max}$  под влиянием аллостерических регуляторов.
8. Примеры аллостерических регуляторов.
9. Модель согласованного механизма кооперативного взаимодействия аллостерического фермента и субстрата: «симметричная» модель по Моно–Уаймену–Шанжё.
10. Модель последовательного кооперативного связывания аллостерического фермента с субстратом по Кошланду.
11. Представление о параметре «степени насыщения» ( $Y$ ) по А. Хиллу.
12. Уравнение А. Хилла и его практическое значение для оценки степени кооперативности, проявляемой аллостерическим ферментом (белком), в данных условиях.
13. График А. Хилла и информация, которую несет показатель « $n$ » (коэффициент Хилла).
14. Алгоритм практического построения графика А. Хилла и способ определения величины « $n$ ».
15. Изменение наклона линий графика А. Хилла в случаях положительной и отрицательной кооперативности. Причины изменения величины показателя « $n$ » в этих случаях.



*Темы докладов, рефератов:*

1. Суть эффекта ориентации реагентов и их сближения и эффекта деформации молекулы субстрата. Роль этих эффектов в снижении энергии активации реагирующих молекул при ферментативном катализе.
2. Особенности протекания двухсубстратных ферментативных реакций. Модель Фердинанда.
3. Уравнение и график Михаэлиса–Ментен. Ограничения, присущие этому графику. Константа Михаэлиса, субстратная константа и максимальная скорость ферментативной реакции.
4. Приёмы линеаризации графика Михаэлиса–Ментен и причины, обусловившие необходимость разработки этих приемов.
5. Ингибиторы и инактиваторы ферментов. Классификация ингибиторов ферментов и механизмы их действия. Способы определения природы ингибитора ферментативной активности. Субстратное ингибирование.
6. Аллостерические ферменты, как регуляторы активности метаболических путей. Особенности строения их молекул. Суть явления кооперативности во взаимодействии активных центров аллостерического фермента.
7. Вид графика зависимости скорости реакции, катализируемой аллостерическим ферментом, от концентрации субстрата. Каким образом эффект кооперативности находит отражение в форме кривой графика?
8. Природа и механизм действия аллостерических регуляторов? Гомотропные и гетеротропные аллостерические ферменты.
9. Как аллостерические регуляторы могут повлиять на величину  $K_m$  и максимальную скорость реакции, катализируемой аллостерическими ферментами? Положительная и отрицательная кооперативность.
10. Что такое «степень насыщения» ( $Y$ ) по Хиллу? Уравнение и график Хилла, как способ количественной оценки степени кооперативности.
11. Суть модели согласованного механизма кооперативного взаимодействия и модели последовательного кооперативного связывания.
12. Современное понятие о сигнальных молекулах. Направления и дистанции, на которые действуют сигнальные молекулы в организме.

## СЕМИНАР

### ИНТЕГРАЦИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ, ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ

*Вопросы для самоподготовки:*

1. Современные представления об интеграции метаболических процессов в организме.
2. Организации метаболических процессов и основные задачи метаболизма.
3. Катаболизм и анаболизм, Представление о ключевых метаболитах.
4. Пять стратегий регуляции метаболических процессов.
5. Три формы аккумуляции свободной энергии, извлекаемой в ходе катаболических процессов.

6. Печень – центральный орган метаболизма.
7. Роль печени в обмене углеводов. Глюкозо-6-фосфат – ключевая молекула обмена углеводов.
8. Взаиморегуляция гликолиза, глюконеогенеза и цикла трикарбоновых кислот. Связь с дыхательной цепью митохондрий.
9. Роль печени в обмене липидов.
10. Роль печени в обмене белков.
11. Инсулин, глюкагон и адреналин – ведущие гормоны в интеграции метаболизма углеводов, липидов и белков на уровне печени.
12. Согласованная гормональная регуляция активности гликолиза и глюконеогенеза. Ключевая регуляторная роль фруктозо-2,6-дифосфата.
13. Согласованная гормональная регуляция синтеза гликогена в печени и скелетных мышцах.
14. Согласованная гормональная регуляция расщепления гликогена в печени и скелетных мышцах.
15. Согласованная гормональная регуляция синтеза и окисления жирных кислот.

*Темы докладов, рефератов:*

1. Понятие «интеграция метаболизма»? Основные системы, обеспечивающие интеграцию обмена на уровне целостного организма.
2. Отличительные особенности, характерные для работы анаболических и катаболических путей. Биомолекулы, «сопрягающие» катаболические и анаболические пути.
3. Ключевые метаболиты и выполняемые ими функции.
4. Три формы аккумуляции свободной энергии, извлекаемой в процессе реакций катаболизма?
5. Пять стратегий регуляции метаболизма.
6. Ключевая роль печени в интеграции метаболизма белков, углеводов и липидов? Суть межорганных взаимоотношений: печень – скелетные мышцы; печень – белая жировая ткань и печень – почки.
7. Основные функции, выполняемые клеточной (цитоплазматической) мембраной.
8. Основные положения жидкостно-мозаичной модели строения плазматической мембраны Сингера и Николсона и дополнения по Симонсу и Ван Мееру.

## **СЕМИНАР**

### **СИСТЕМА ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ – ВТОРИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ**

*Вопросы для самоподготовки:*

1. История открытия Э. Сазерлендом цАМФ-зависимой регуляции активности гликогенфосфорилазы печени.

2. Современные представления о первичных и вторичных мессенджерах. Их краткая характеристика.
3. Рецепторы, сопряженные с G-белком: строение и механизм их активации.
4. Механизм десенситизации рецепторов, сопряженных с G-белком.
5. Циклический АМФ: фермент, катализирующий синтез, структура цАМФ, механизм действия.
6. Характеристика гормонов, действующих на метаболизм клетки посредством цАМФ. цАМФ-зависимые протеинкиназы. Функции белка АКАР.
7. G-белки: строение, механизм активации и инактивации. Механизм активации аденилатциклазы.
8. Принцип многократного усиления регуляторного сигнала, поступающего от гормонов через цАМФ.
9. Механизмы прекращения сигнализации с участием цАМФ.
10. Механизм согласованного регулирования активности гликогенфосфорилазы печени и мышц под влиянием адреналина и глюкагона.
11. цАМФ-зависимая регуляция транскрипции. Механизм: цАМФ-чувствительные элементы (cAMP response elements). Белок, связывающий цАМФ-чувствительные элементы (cAMP responsive elements binding protein, CREB).
12. Молекулы-мишени цАМФ – цАМФ-зависимые протеинкиназы (ПКА). Локализация и функции.
13. Принцип контроля нескольких специфических обменных процессов с помощью одной системы передачи регуляторной информации (цАМФ).
14. Циклический ГМФ. Характеристика рецепторов, участвующих в синтезе цГМФ.
15. Гуанилатциклаза и её изоформы, строение и механизмы активации. Молекулы-мишени цГМФ.

*Темы докладов, рефератов:*

1. Концепция первичных и вторичных мессенджеров по Э. Сазерленду. Характеристика основных групп молекул – первичных мессенджеров. Перечислите молекулы, выполняющие роли вторичных мессенджеров, и назовите характерные свойства этих молекул.
2. Прямое и опосредованное регуляторное действие ионов  $Ca^{2+}$ . Строение молекулы кальмодулина и механизм активации белков под действием комплекса  $Ca^{2+}$ -кальмодулин.
3. Основные структурные элементы мембранных рецепторов и выполняемые ими функции.
4. Классификация мембранных рецепторов, участвующих в регуляции метаболических процессов. Типичные лиганды для каждого класса рецепторов и механизмы их активации.
5. Общий план строения внутриклеточных рецепторов, их лиганды и механизм активации.

6. Механизмы внутриклеточной трансдукции регуляторного сигнала посредством циклического АМФ и протеинкиназы А. Роль гетеротримерного G-белка и разновидности его  $\alpha$ -субъединицы.

## СЕМИНАР

### ФОСФОИНОЗИТИДНАЯ СИСТЕМА ВТОРИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ. МАПК-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

*Вопросы для самоподготовки:*

1. Путь фосфатидилинозитола и  $Ca^{2+}$  – второе направление передачи регуляторного сигнала от гормонов, действующих посредством рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR). Гетеротримерный G-белок: структура, его формы (основные представители семейства), функции, механизм активации и инактивации. Эффекторные молекулы, активируемые G-белком.
2. Мембранная фосфолипаза C, как эффекторный белок каскада фосфатидилинозитол /  $Ca^{2+}$ . Образование диацилглицерола и инозитол-1'4'5'-трифосфата (IP3) – вторичных мессенджеров липидного происхождения. Механизмы эффектов этих мессенджеров.
3. Протеинкиназа C (PKC): структура, механизм активации и инактивации. Форболовый эфир, как искусственный активатор PKC.
4. Молекулярные механизмы прекращения передачи сигнала по пути фосфатидилинозитол /  $Ca^{2+}$ . Последствия нарушения механизмов инактивации PKC.
5.  $Ca^{2+}$  как вторичный мессенджер. Регуляторные эффекты  $Ca^{2+}$ , опосредованные специфическими  $Ca^{2+}$ -связывающими белками: кальмодулин – его структура и функции.
6. Рецепторы, обладающие тирозинкиназной активностью (рецепторные тирозиновые киназы). Молекулярная структура, лиганды и механизм активации.
7. Характеристика белков семейства Ras (мономерные или малые G-белки, малые ГТФазы). Механизм активации белков Ras.
8. Белок Ras, как ключевой компонент, запускающий сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК).
9. Мультивалентные адапторные белки, содержащие SH2- и SH3-домены. Строение и функции.
10. Роль рецепторных тирозиновых киназ и их лигандов в инициации сигнального каскада МАПК, как важнейшего пути передачи пролиферативного сигнала.
11. Белки-посредники, составляющие МАПК-каскад. Механизм последовательной активации протеинкиназ сигнального каскада: белки Ras, Raf, MEK и МАПК.
12. Особенности номенклатуры киназ, составляющих МАПК-каскад. Механизмы «выключения» митогенной сигнализации.

13. Рецептор инсулина: структура, механизм активации.
14. Молекулярный механизм активации инсулином гликогенсинтетазы печени и мышц.
15. Молекулярный механизм регуляции инсулином экспрессии генов, кодирующих ферменты глюконеогенеза в печени.

*Темы докладов, рефератов:*

1. Роль белков, заякоряющих протеинкиназу А. Участие цАМФ в регуляции транскрипции.
2. Строение гетеротримерного G-белка и роль разновидностей его  $\alpha$ -субъединицы (G $\alpha$ s, G $\alpha$ i G $\alpha$ q).
3. Механизм образования диацилглицерола и инозитолтрифосфата.
4. Роль и функции липид-модифицирующих ферментов: ФЛазы С и фосфатидилинозитол-3-киназы.
5. Механизм активации протеинкиназы в результате активации рецептора с тирозинкиназной активностью.
6. Строение протеинкиназы С и роль в механизме её активации с помощью диацилглицерола и инозитолтрифосфата. Охарактеризуйте подсемейства протеинкиназы С. Роль ПКС- $\xi$  в активации сигнального пути, опосредуемого ядерным транскрипционным фактором  $kB$  (NFkB). Действие форболового эфира.
7. Механизмы прекращения передачи сигнала по пути фосфатидилинозитола и ионов  $Ca^{2+}$ .
8. Значение сигнального пути МАПК, как основного пути передачи пролиферативных сигналов.
9. Лиганды и класс активируемых ими рецепторов, запускающих путь МАПК.
10. Строение малого G-белка (белка Ras) и механизм его активации (ГТФазный цикл). Значение Ras белка в активации серин-треониновой киназы Raf.
11. Этапы и участники протеинкиназного каскада, составляющего сигнальный путь МАПК. Мишени действия активированной МАПК.
12. JAK-STAT-сигнальный путь и путь, опосредуемый ядерным транскрипционным фактором NFkB, как дополнительные пути передачи митогенных сигналов внутрь клетки.
13. Особенности строения рецептора инсулина и внутриклеточные механизмы регуляции гормоном экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза жирных кислот и глюконеогенеза. Механизмы регуляция инсулином активности гликолиза, синтеза гликогена и доставки ГЛЮТ4 в плазматическую мембрану инсулин-респонсивных клеток.

## СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

### Задача № 1

В инкубационной среде суспендирован аллостерический фермент и добавлен аллостерический ингибитор фермента. В этих условиях определили активность фермента. Затем стаканчик со смесью поместили в водяную баню и нагревали до температуры +60 °С в течение 4 минут. После этого вновь определили активность фермента.

1. *Изменилась ли активность фермента после обработки?*
2. *Если изменилась, то объясните механизм явления.*

### Задача № 2

Известно, что АТФ и цАМФ не конкурируют за центр связывания для аллостерического активатора на регуляторной субъединице протеинкиназы А.

*Объясните механизм этого явления.*

### Задача № 3

Интенсивная и длительная физическая работа обуславливает поступление в печень по кровотоку большого количества молочной кислоты. В результате этого в печени активируется глюконеогенез на фоне торможения гликолиза.

*Объясните биохимические механизмы, лежащие в основе этих метаболических событий.*

### Задача № 4

При лабораторном обследовании пациента выявлено существенное повышение концентрации кетоновых тел в крови и моче.

1. *Какие дополнительные лабораторные исследования необходимо провести для уточнения причин гиперкетонемии и гиперкетонурии?*
2. *При каких состояниях организма наблюдают физиологический кетоз?*

### Задача № 5

У животных, впадающих в зимнюю спячку, к началу зимы адаптивно изменяется фосфолипидный состав клеточных мембран. В первую очередь в составе фосфолипидов увеличивается содержание полиненасыщенных жирных кислот.

*Как это явление влияет на физико-химические и функциональные свойства липидного бислоя при понижении температуры?*

### **Задача № 6**

Интенсивная работа скелетных мышц способствует изменению ее метаболизма.

*Что станет основным источником энергии для скелетных мышц спустя час после начала интенсивной физической работы?*

### **Задача № 7**

При длительном голодании, на сроках, граничащих с его терминальной фазой, белки скелетных мышц начинают служить источником энергии.

*Какие превращения и в каких тканях происходят с этими белками, прежде чем головной мозг и миокард смогут использовать энергию их распада?*

### **Задача № 8**

К эндокринологу обратились два больных сахарным диабетом. Первый пациент – пожилого возраста, страдает ожирением. Второй пациент – молод с массой тела существенно ниже нормы.

*Объясните разнонаправленность метаболизма липидов у этих больных?*

### **Задача № 9**

Для изучения регенеративного потенциала печени в эксперименте у лабораторных животных проводят частичную гепатэктомию.

*Опишите основные биохимические изменения в обмене белков, углеводов и липидов.*

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

*Выберите один правильный ответ.*

### 1. ПЕРЕКИСНЫЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ ОБУСЛОВЛЕН НАКОПЛЕНИЕМ

- 1) перекисей липидов
- 2) продуктов протеолиза
- 3) жирных кислот
- 4) антиоксидантов

### 2. АПЛАСТИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ ОБУСЛОВЛЕН

- 1) действием ультрафиолетового излучения
- 2) инаktivацией лизосом
- 3) угнетением транспорта протонов
- 4) недостатком питания, активацией лизосом, распадом клеточных структур

### 3. ГИПОКСИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ

- 1) активацией лизосом, распадом клеточных структур
- 2) активацией окислительного фосфорилирования
- 3) активацией митохондриального окисления
- 4) угнетением транспорта электронов, угнетением транспорта протонов, нарушением функций митохондрий

### 4. ТОКСИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ СВЯЗАН С НАРУШЕНИЕМ

- 1) окислительного фосфорилирования
- 2) перекисного окисления липидов
- 3) митохондриального окисления
- 4) гликолиза

### 5. К ИНДУКТОРАМ АПОПТОЗА ОТНОСЯТСЯ

- 1) набухание клеток
- 2) сморщивание клеток
- 3) разрыв мембран
- 4) воспаление

### 6. ОСНОВНЫМ ПРИЗНАКОМ АПОПТОЗА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) деградация белка
- 2) фрагментация полисахаридов
- 3) энзиматическое расщепление РНК
- 4) межнуклеосомная деградация ДНК



7. ИНДУКТОРАМИ АПОПТОЗА ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) глюкокортикоиды
- 2) катехоламины
- 3) минералокортикоиды
- 4) кортикотропины

8. НЕКРОЗ – ЭТО

- 1) сморщивание клеток
- 2) уплотнение гранул
- 3) набухание клеток
- 4) уменьшение объема клеток

9. ПРИМЕРОМ НЕКРОЗА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) пикноз ядра
- 2) фрагментация ДНК
- 3) конденсация цитоплазмы
- 4) повреждение мембран клетки

10. В СОСТАВ ЛИПИДОВ МЕМБРАН НЕ ВХОДЯТ

- 1) холестерол
- 2) фосфолипиды
- 3) гликозамингликаны
- 4) ганглиозиды

11. ОСНОВНЫМИ СУБСТРАТАМИ ПОЛ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) полинуклеотидные последовательности
- 2) ненасыщенные жирные кислоты
- 3) циклические формы рибозы
- 4) полипептидные цепи

12. ПРИ ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ПОДВЕРГАЮТСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ

- 1) углеводы и глюкоза
- 2) нуклеиновые кислоты
- 3) аминокислоты и белки
- 4) липиды, мембраны, свободные радикалы

13. В НЕПОВРЕЖДЕННЫХ КЛЕТКАХ СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ

- 1) всегда присутствуют
- 2) отсутствуют
- 3) появляются при внешних воздействиях
- 4) появляются за счет активации системы вторичных мессенжеров

14. СВОБОДНЫЙ РАДИКАЛ ОТЛИЧАЕТСЯ ОТ ДРУГИХ СОЕДИНЕНИЙ НАЛИЧИЕМ

- 1) положительного заряда

- 2) отрицательного заряда
- 3) неспаренного электрона на внешней орбитали
- 4) спаренных электронов на внешней орбитали

15. К АКТИВНЫМ ФОРМАМ КИСЛОРОДА ОТНОСЯТСЯ

- 1) радикалы атомарного кислорода
- 2) сульфгирильный радикал и атомарный кислород
- 3) малоновый диальдегид, ацетальдегид
- 4) синглетный кислород, супероксидный радикал, гидроксильный радикал

16. КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ ПОЛ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) линолевая кислота
- 2) пропионовая кислота
- 3) малоновый диальдегид
- 4) ацетальдегид

17. К ПРООКСИДАНТАМ ОТНОСЯТСЯ

- 1) линолевая кислота и пропионовая кислота
- 2) малоновый диальдегид и ацетальдегид
- 3) синглетный кислород, супероксидный радикал, гидроксильный радикал
- 4) активные формы кислорода, перекись водорода, ионы железа

18. ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА МОЖЕТ РАЗРУШАТЬСЯ

- 1) супероксиддисмутазой
- 2) каталазой
- 3) моноаминоксидазой
- 4) НАДН-оксидазой

19. К АНТИОКСИДАНТАМ – ЛОВУШКАМ РАДИКАЛОВ ОТНОСИТСЯ

- 1) глутатион
- 2) аскорбат
- 3) цитрат
- 4) сукцинат

20. АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ ОБЛАДАЕТ

- 1) аспирин
- 2) анальгин
- 3) дибунол
- 4) даларгин

21. К ФУНКЦИЯМ ПЕРОКСИСОМ НЕ ОТНОСИТСЯ

- 1) образование и распад  $H_2O_2$

- 2) окисление этанола до ацетальдегида
- 3) окисление уратов
- 4) окисление ксенобиотиков

22. К ЖИРОРАСТВОРИМЫМ АНТИОКСИДАНТАМ ОТНОСИТСЯ

- 1) витамин С
- 2) витамин Е
- 3) витамин Д
- 4) витамин В

23. МИКРОСОМЫ ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ МЕМБРАНЫ

- 1) митохондрий
- 2) ядер
- 3) эндоплазматического ретикулума
- 4) лизосом

24. ДОНОРОМ ЭЛЕКТРОНОВ В МИКРОСОМАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ОКИСЛЕНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) АТФ
- 2) ДНК
- 3) НАДФ
- 4) НАДН

25. АКЦЕПТОРОМ ЭЛЕКТРОНОВ В ПРОЦЕССЕ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) цитохром С
- 2) цитохром Р-450
- 3) НАДН
- 4) НАДФН

26. ФЕРМЕНТЫ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ

- 1) дегидрогеназы
- 2) диоксигеназы
- 3) монооксигеназы
- 4) оксидазы

27. К СУБСТРАТАМ I ТИПА ОТНОСИТСЯ

- 1) фенобарбитал
- 2) метилхолантрен
- 3) бензпирен
- 4) анилин

28. В РЕАКЦИЯХ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ УЧАСТВУЮТ

- 1) циклические нуклеотиды

- 2) циклические углеводороды
- 3) циклические полисахариды
- 4) циклические аминокислоты

29. К КСЕНОБИОТИКАМ ОТНОСИТСЯ

- 1) аланин
- 2) анилин
- 3) адреналин
- 4) дофамин

30. ЦИТОХРОМ P-450 ЛОКАЛИЗОВАН В

- 1) плазматической мембране
- 2) пероксисомах
- 3) лизосомах
- 4) микросомах

31. К ИНДУКТОРАМ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ОТНОСИТСЯ

- 1) хлорпромазин
- 2) фенобарбитал
- 3) фенилацетон
- 4) токоферол

32. ПРИ ТОКСИФИКАЦИИ ДЕЙСТВИЕ КСЕНОБИОТИКОВ СТАНОВИТСЯ

- 1) менее токсичным
- 2) более токсичным
- 3) более гидрофобным
- 4) менее гидрофобным

33. К КАНЦЕРОГЕНАМ ОТНОСИТСЯ

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

34. МАРКЕРНЫМ ФЕРМЕНТОМ ЛИЗОСОМ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) глюкозо-6-фосфатаза
- 2) нуклеотидфосфатаза
- 3) щелочная фосфатаза
- 4) кислая фосфатаза

35. К ФУНКЦИИ ПЕРВИЧНЫХ ЛИЗОСОМ ОТНОСИТСЯ

- 1) накопление белков
- 2) захват белков
- 3) образование ферментов
- 4) переваривание белков

36. К МАРКЕРНЫМ ФЕРМЕНТАМ ПЕРОКСИСОМ ОТНОСИТСЯ

- 1) сукцинатдегидрогеназа
- 2) уратоксидаза
- 3) аденилатциклаза
- 4) цитохромоксидаза

37. ЛИЗОСОМЫ НЕ ПРИНИМАЮТ УЧАСТИЯ В ПРОЦЕССАХ

- 1) экзоцитоза
- 2) эндоцитоза
- 3) солюбилизации
- 4) аутофагии

38. СУБСТРАТОМ II ТИПА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) гексабарбитал
- 2) амидопирин
- 3) антипирин
- 4) метилхолантрен

39. В РЕАКЦИЯХ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ УЧАСТВУЮТ

- 1) монооксигеназы
- 2) диоксигеназы
- 3) дегидрогеназы
- 4) гидролазы

40. К ФЕРМЕНТАМ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОТНОСИТСЯ

- 1) глутатиноксидаза
- 2) глутаминтрансфераза
- 3) глутатионредуктаза
- 4) гликозилтрансфераза

41. ПО СВОЕЙ СТРУКТУРЕ ХОЛОФЕРМЕНТ – ЭТО

- 1) термостабильная небелковая часть фермента
- 2) весь комплекс белковой части фермента с кофактором
- 3) термолабильная белковая часть фермента
- 4) термолабильная небелковая часть фермента

42. ПОД ТЕРМИНОМ «СУБСТРАТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ» ПОДРАЗУМЕВАЕТСЯ

- 1) торможение ферментативной реакции вследствие относительного дефицита субстрата
- 2) торможение ферментативной реакции вследствие избытка субстрата
- 3) торможение ферментативной реакции вследствие полного исчерпания запасов субстрата
- 4) торможение ферментативной реакции вследствие дефекта якорного участка активного центра фермента

43. ВЕЛИЧИНА  $K_M$  НЕ ИЗМЕНЯЕТСЯ ПРИ ТИПЕ ИНГИБИРОВАНИЯ
- 1) конкурентном
  - 2) неконкурентном
  - 3) бесконкурентном
  - 4) смешанном
44. ПРИ БЕСКОНКУРЕНТНОМ ТИПЕ ТОРМОЖЕНИЯ ИНГИБИТОР СВЯЗЫВАЕТСЯ
- 1) с аллостерическим центром фермента
  - 2) с каталитическим участком активного центра фермента
  - 3) с якорным участком активного центра фермента
  - 4) с фермент-субстратным комплексом
45. ВЕЛИЧИНА МАКСИМАЛЬНОЙ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ НЕ ИЗМЕНЯЕТСЯ ПРИ ТИПЕ ИНГИБИРОВАНИЯ
- 1) конкурентном
  - 2) неконкурентном
  - 3) бесконкурентном
  - 4) смешанном
46. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТА К ИНГИБИТОРАМ
- 1) выше его субстратной специфичности
  - 2) равна его субстратной специфичности
  - 3) ниже его субстратной специфичности
  - 4) отсутствует
47. ОТЛИЧИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО МЕХАНИЗМА И МЕХАНИЗМА ДВОЙНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ ДВУХСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ СОСТОЯТ
- 1) в образовании модифицированной формы субстрата
  - 2) в образовании модифицированной формы фермента
  - 3) в образовании модифицированной формы фермента и модифицированной формы субстрата
  - 4) в образовании комплекса модифицированной формы фермента с модифицированной формой субстрата
48. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ ВТОРОГО ПОРЯДКА ХАРАКТЕРИЗУЮТСЯ ТЕМ, ЧТО ИХ СКОРОСТЬ ПРОПОРЦИОНАЛЬНА
- 1) произведению концентраций реагирующих субстрата и фермента
  - 2) произведению концентраций реагирующих субстратов
  - 3) произведению концентраций продуктов реакции
  - 4) сумме концентраций реагирующих субстратов
49. КОЭФФИЦИЕНТ ХИЛЛА ( $N$ ) ХАРАКТЕРИЗУЕТ
- 1) прочность фермент-субстратного комплекса

- 2) степень отклонения от кинетики Михаэлиса-Ментен
- 3) количественное соотношение между активными и аллостерическими центрами в молекуле фермента
- 4) количественно характеризует степень проявления кооперативности

50. СИГМОИДНЫЙ ХАРАКТЕР ГРАФИКА ЗАВИСИМОСТИ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ  $[S]$  ДЛЯ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ОБУСЛОВЛЕН КООПЕРАТИВНОСТЬЮ. КООПЕРАТИВНОСТЬ – ЭТО

- 1) степень комплементарности молекулы субстрата активному центру фермента
- 2) согласованное взаимодействие между аллостерическими и активными центрами молекулы фермента в процессе связывания лигандов
- 3) согласованное взаимодействие между активными центрами фермента, приводящее к нелинейному увеличению их сродства к субстрату
- 4) степень удаленности друг от друга аллостерического и активного центров в молекуле фермента

51. ПРАВИЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМИНА «АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ ЦЕНТР» –

- 1) центр связывает аллостерические эффекторы и является неотъемлемой частью активного центра фермента
- 2) центр входит в состав мультиферментного комплекса и служит для регуляции его активности
- 3) центр пространственно отделен от активного центра фермента и служит для высокоспецифичного связывания аллостерических эффекторов
- 4) это каталитический центр аллостерических ферментов

52. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ПО ТИПУ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ (РЕТРОИНГИБИРОВАНИЕ) ХАРАКТЕРНА

- 1) для аллостерических ферментов
- 2) только для простых ферментов
- 3) только для сложных ферментов
- 4) для ферментов, входящих в ферментативные комплексы

53. РЕШАЮЩЕЕ ЗНАЧЕНИЕ В СНИЖЕНИИ ЭНЕРГИИ АКТИВАЦИИ СУБСТРАТА В ХОДЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ИМЕЕТ

- 1) быстрое образование промежуточного фермент-субстратного комплекса
- 2) снижение стандартной свободной энергии субстрата в активном центре фермента
- 3) эффекты ориентации, сближения и явление индуцированного соответствия конформаций субстрата и функциональных групп активного центра
- 4) повышение стандартной свободной энергии субстрата в аллостерическом центре фермента

54. МЕЖДУНАРОДНАЯ (СТАНДАРТНАЯ) ЕДИНИЦА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА – ЭТО
- 1) количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин
  - 2) активность, отнесенная к 1 мг белка
  - 3) число молекул субстрата, превращаемых одной молекулой катализатора за единицу времени
  - 4) активность катализатора в расчете на его молекулярную массу
55. ПРИМЕРОМ АКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТА ПУТЕМ КОВАЛЕНТНОЙ МОДИФИКАЦИИ НЕ ЯВЛЯЕТСЯ РЕАКЦИЯ
- 1) фосфорилирования фосфоорилазы b
  - 2) образования пепсина из пепсиногена
  - 3) ограниченного протеолиза химотрипсиногена
  - 4) фосфорилирования гликогенсинтазы
56. АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ПРОИСХОДИТ ПУТЕМ
- 1) связывания аллостерического активатора с активным центром
  - 2) присоединения аллостерического ингибитора к аллостерическому центру
  - 3) ковалентной модификации апофермента
  - 4) действия аллостерического активатора на регуляторный центр фермента
57. ИНГИБИРОВАНИЕ НЕАЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА ПРОИСХОДИТ ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ИНГИБИТОРОВ НА
- 1) кофактор фермента
  - 2) аллостерический центр
  - 3) кофермент
  - 4) активный центр, вне активного центра, фермент-субстратный комплекс
58. В IV КЛАСС ВХОДЯТ ФЕРМЕНТЫ, КОТОРЫЕ УСКОРЯЮТ РЕАКЦИИ
- 1) расщепления с образованием двойных связей или присоединения по двойным связям
  - 2) переноса тех или иных групп
  - 3) карбоксилирования
  - 4) фосфорилирования
59. ФЕРМЕНТЫ VI КЛАССА КАТАЛИЗИРУЮТ РЕАКЦИИ
- 1) тканевого дыхания
  - 2) дезаминирования
  - 3) образования изомерных форм органических соединений
  - 4) синтеза, сопряженные с гидролизом макроэргических связей



60. КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ ПУТЕЙ КАТАБОЛИЗМА БЕЛКОВ, ЛИПИДОВ И УГЛЕВОДОВ ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) ацил-КоА
  - 2) малонил-КоА
  - 3) ацетил-КоА
  - 4) сукцинил-КоА
61. В СОПРЯЖЕНИИ АНАБОЛИЧЕСКИХ И КАТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ГЛАВНУЮ РОЛЬ ИГРАЮТ МОЛЕКУЛЫ
- 1) АТФ и креатин-фосфат
  - 2) АТФ и НАДФН
  - 3) НАДН и ацетил-КоА
  - 4) пируват и ацетил-КоА
62. ПРАВИЛЬНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ КЛЮЧЕВЫХ МЕТАБОЛИТОВ
- 1) рибулёзо-5-фосфат, малонил-КоА, пируват
  - 2) глюкозо-6-фосфат, пируват, ацетил-КоА
  - 3) пируват, цитрат, оксалоацетат
  - 4) фруктозо-2,6-дифосфат, цитрат, малонил-КоА
63. ЦИКЛ «ГЛЮКОЗА – АЛАНИН» СЛУЖИТ ДЛЯ
- 1) доставки из мышц аминокислот в орнитинный цикл и синтеза в печени глюкозы из аланина
  - 2) доставки из печени в мышечную ткань глюкозы и кетоновых тел
  - 3) обмен мочевиной и глюкозой между печенью и почками
  - 4) обмена глюкозой и глицеролом между печенью и жировой тканью
64. ПРОЦЕССЫ, ПРИВОДЯЩИЕ К АКТИВАЦИИ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ ПЕЧЕНИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТЕИНАЗИНЫ
- 1) диссоциация фосфопроteinфосфатазы-1 из комплекса с гликоген-связывающим белком
  - 2) ингибирование киназы гликогенсинтазы-3
  - 3) активация фосфопроteinфосфатазы-1
  - 4) активация киназы гликогенфосфорилазы и фосфорилирование гликоген-связывающего белка
65. ФРУКТОЗО-2,6-БИФОСФАТ ВЫПОЛНЯЕТ ФУНКЦИЮ
- 1) аллостерического активатора фосфофруктокиназы-2
  - 2) аллостерического ингибитора фруктозо-бисфосфатазы-2
  - 3) аллостерического ингибитора фосфопроteinфосфатазы-1
  - 4) аллостерического активатора фосфофруктокиназы-1 и ингибитора фруктозо-бисфосфатазы-1
66. АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА АЦЕТИЛ-КОА-КАРБОКСИЛАЗЫ ПРИВОДИТ К
- 1) снижению в клетках печени малонил-КоА, активации окисления свободных жирных кислот

- 2) торможению синтеза жирных кислот и активации глюконеогенеза
- 3) активации процессов ПОЛ
- 4) повышению концентрации в клетках печени малонил-КоА, торможению окисления свободных жирных кислот, стимуляции синтеза жирных кислот

67. МИНОРНЫМ ФОСФОЛИПИДОМ ВНУТРЕННЕГО СЛОЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) фосфатидилинозитол
- 2) фосфатидилсерин
- 3) фосфатидилэтаноламин
- 4) фосфатидилхолин

68. СОГЛАСНО ПРИНЦИПУ ПОПЕРЕЧНОЙ АСИММЕТРИИ, ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ В СОСТАВ ЕЁ НАРУЖНОГО СЛОЯ ВХОДЯТ

- 1) фосфатидилсерин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин
- 2) холестерол, сфингомиелин, фосфатидилинозитол
- 3) фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол
- 4) сфингомиелин, фосфатидилхолин, гликолипиды

69. В ИНТЕГРАЛЬНЫХ БЕЛКАХ ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ДОМЕН ПРЕДСТАВЛЕН

- 1)  $\beta$ -складчатыми структурами
- 2) фарнезольным якорем
- 3) одной или несколькими  $\alpha$ -спиралями
- 4) пренильными группами

70. ЛИГАНДЫ ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

- 1) факторы роста, нейромедиаторы
- 2) белково-пептидные гормоны, цитокины
- 3) стероидные и тиреоидные гормоны, витамин Д
- 4) простагландины, витамин Д

71. ПРИМЕРОМ АКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТА ПУТЕМ КОВАЛЕНТНОЙ МОДИФИКАЦИИ НЕ ЯВЛЯЕТСЯ РЕАКЦИЯ

- 1) фосфорилирования гликогенфосфоорилазы b
- 2) образования пепсина из пепсиногена
- 3) ограниченного протеолиза химотрипсиногена
- 4) фосфорилирования гликогенсинтазы

72. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, КОТОРЫМИ ОБЛАДАЮТ ИЗОФЕРМЕНТЫ –

- 1) состоят из разных субъединиц, имеют различное значение  $K_m$ , локализованы в разных тканях

- 2) состоят из разных субъединиц, имеют одинаковое значение  $K_m$ , локализованы в разных тканях
- 3) состоят из одинаковых субъединиц, имеют различное значение  $K_m$ , локализованы в разных тканях
- 4) состоят из одинаковых субъединиц, имеют одно и то же значение  $K_m$ , локализованы в разных тканях

#### 73. МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ОТНОСЯТСЯ К ГРУППЕ ПЕРВИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ – ЭТО

- 1) простагландины, тромбоксаны, лейкотриены
- 2) цАМФ, цГМФ, ДАГ, ИФЗ, NO,  $Ca^{2+}$
- 3) гормоны, факторы роста, цитокины
- 4) нейромедиаторы, вазоактивные агенты

#### 74. МЕХАНИЗМ, КОТОРЫЙ НЕ УЧАСТВУЕТ В АКТИВАЦИИ ЛИГАНДОМ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

- 1) диссоциация ингибиторного белка из комплекса рецептор-ингибиторный белок
- 2) изменение конформации трансмембранного и цитоплазматического доменов
- 3) димеризация молекул рецептора
- 4) изменение конформации молекулы рецепторов, сочетающейся с димеризацией молекул рецептора

#### 75. ЛИГАНДЫ РЕЦЕПТОРОВ С ТИРОЗИНКИНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

- 1) адреналин, глюкагон
- 2) артериальный натрий-уретический фактор, гуанилин
- 3) цитокины, ацетилхолин
- 4) инсулин, факторы роста

#### 76. МЕХАНИЗМ ПРЕКРАЩЕНИЯ СИГНАЛИЗАЦИИ ПОСРЕДСТВОМ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ –

- 1) абберантный сплайсинг рецептора
- 2) синтез лиганда и увеличение чувствительности рецептора
- 3) активация гликопротеина Р
- 4) деградация лиганда, секвестрация лиганда, десенситизация рецептора

#### 77. МОЛЕКУЛЯРНОЕ СТРОЕНИЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ А

- 1) является гетеротримером, состоящим из  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц
- 2) состоит из 12 трансмембранных сегментов и одного цитозольного домена, содержащего активный центр
- 3) две регуляторные и две каталитические субъединицы
- 4) содержит один ингибиторный домен и один каталитический домен

78. СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, КОТОРЫЕ ЗАПУСКАЮТСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ АКТИВАЦИИ ЛИГАНДОМ РЕЦЕПТОРА, СОПРЯЖЕННОГО С G-БЕЛКОМ–

- 1) сигнальные пути цАМФ и  $Ca^{2+}$  фосфатидилинозитола
- 2) сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы
- 3) JAK-STAT – сигнальный путь
- 4) сигнальный путь транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B

79. ДЕЙСТВИЕ ЛИПИД-МОДИФИЦИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ НА МЕМБРАННЫЙ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛ-4,5-БИСФОСФАТ (ФИФ2)

- 1) ФИФ2 подвергается гидролизу фосфолипазой C с образованием диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трисфосфата
- 2) ФИФ2 фосфорилируется в положении 3 инозитола с помощью фосфатидилинозитол-3-киназы с образованием фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата.
- 3) верен ответ 2
- 4) верны ответы 1 и 2

80. ДИАЦИЛГЛИЦЕРОЛ (ДАГ) И ИНОЗИТОЛ-1,4,5-ТРИФОСФАТ УЧАСТВУЮТ В АКТИВАЦИИ

- 1) протеинкиназы A
- 2) протеинкиназы B
- 3) протеинкиназы C
- 4) кальмодулин-зависимой протеинкиназы

81. СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ, ОПОСРЕДОВАННЫЙ ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ NF- $\kappa$ B АКТИВИРУЕТ

- 1) атипичная протеинкиназа  $C\mu$
- 2) атипичная протеинкиназа  $C\zeta$
- 3) новая протеинкиназа  $C\delta$
- 4) традиционная протеинкиназа  $C\gamma$

82. АКТИВАЦИЮ ФЕРМЕНТА НА ОСНОВЕ ДИССОЦИАЦИИ ПСЕВДОСУБСТРАТНОГО ДОМЕНА С СУБСТРАТ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО САЙТА КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА НАЗЫВАЮТ

- 1) регуляция по принципу отрицательной обратной связи
- 2) регуляция по принципу положительной обратной связи
- 3) интрастерическая регуляция
- 4) аллостерическая регуляция

83. ФОРБОЛОВЫЙ ЭФИР АКТИВИРУЕТ ПРОТЕИНКИНАЗУ C, СВЯЗЫВАЯСЬ С

- 1) доменом C1, предназначенным для связывания ДАГ
- 2) доменом C2, предназначенным для связывания с фосфатидилсерином

- 3) доменом C3, являющимся каталитическим доменом
- 4) доменом C4, являющимся каталитическим доменом

84. МЕХАНИЗМ ПРЕКРАЩЕНИЯ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ ПОСРЕДСТВОМ ПУТИ  $Ca^{2+}$ /ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛА

- 1) фосфорилирование инозитол-3-фосфата (ИФ3), дефосфорилирование диацилглицерола (ДАГ)
- 2) активация серин-треониновой протеинкиназы PKB/Akt
- 3) активация c-RAF и GSK-3 $\beta$
- 4) дефосфорилирование инозитол-3-фосфата (ИФ3), катализируемое ИФ3-5-фосфомоноэстеразой, фосфорилирование диацилглицерола (ДАГ), катализируемое ДАГ-киназой, гидролиз ДАГ, катализируемый ДАГ-липазой

85. К МИТОГЕНАМ ОТНОСЯТСЯ

- 1) гормоны и глюкоза
- 2) первичные и вторичные мессенжеры
- 3) киназы внутриклеточных сигнальных каскадов
- 4) цитокины, факторы роста, медиаторы воспаления

86. ГРУППА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ-ПОСРЕДНИКОВ, ОБРАЗУЮЩИХ КАСКАД МАП-КИНАЗЫ (МАПК, МАРК)

- 1) Gbr2, SOS/GEF, Ras
- 2) Raf, MEK, ERK
- 3) G-белок, аценилатциклаза, АКАР
- 4) IRS-1, PDK-1, PKB

87. КАКОЕ КОЛИЧЕСТВО ИОНОВ КАЛЬЦИЯ СПОСОБНА ПРИСОЕДИНИТЬ МОЛЕКУЛА КАЛЬМОДУЛИНА

- 1) 2 иона
- 2) 3 иона
- 3) 4 иона
- 4) 5 ионов

88. ГТФ-АЗНЫЙ ЦИКЛ ВЫПОЛНЯЕТ ФУНКЦИЮ

- 1) активации/инактивации белка Ras
- 2) активации/инактивации растворимой гуанилатциклазы
- 3) участвует в работе энергетического цикла
- 4) регуляции активности мембранной гуанилатциклазы

89. ВАРИАНТЫ ПУТЕЙ АКТИВАЦИИ КИНАЗЫ RAF

- 1) фактор роста – малые G белки – АКТ
- 2) форболовый эфир – фосфотидилинозитол-3-киназа – АКТ
- 3) фактор роста – малые G белки – фосфотидилинозитол-3-киназа
- 4) фактор роста – Gbr2 – SOS/GEF – Ras – Raf, форболовый эфир – PKC – Raf

90. ФАКТОР РОСТА ЭПИДЕРМИСА СПОСОБЕН ИНИЦИИРОВАТЬ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

- 1) сигнальный путь Hedgehog
- 2) сигнальный путь АКТ/mTOR, c-RAF
- 3) сигнальный путь Wnt/GSK-3 $\beta$
- 4) сигнальный путь протеинкиназы В, сигнальный путь МАПК, JAK-STAT сигнальный путь

## ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАЧЕТУ

1. Клеточная адаптация к гипоксии. Типы повреждения клетки.
2. Характеристика некроза и апоптоза.
3. Ингибиторы и индукторы апоптоза.
4. Механизмы гибели клеток при апоптозе.
5. Митохондриальный тип апоптоза.
6. Рецептор-опосредованный апоптоз.
7. Каспазы и их ингибиторы.
8. Биологическое значение апоптоза.
9. Иммунологические маркеры апоптоза.
10. Биохимические основы старения клеток.
11. Значение апоптоза в развитии заболеваний.
12. Методы изучения апоптоза.
13. Ферменты плазматической мембраны клетки. Маркерные ферменты. Взаимодействие с рецепторами, образование эффекторов.
14. Ферменты митохондриальных мембран и митохондриального матрикса.
15. Цитозольные ферменты гликолиза, пентозофосфатного пути, цикла трикарбоновых кислот.
16. Ферменты микросомальной фракции. Участие в метаболизме ксенобиотиков.
17. Пероксисомы. Ферменты, метаболизм  $H_2O_2$ .
18. Ферменты лизосом, пути активации.
19. Активные формы кислорода и их роль в перекисных процессах.
20. Образование и метаболизм перекиси водорода в клетке.
21. Цепной свободно-радикальный механизм перекисного окисления липидов.
22. Образование продуктов ПОЛ на примере линоленовой кислоты.
23. Методы изучения процессов ПОЛ. Определение содержания свободных радикалов, продуктов ПОЛ, антиоксидантов, ферментов антиоксидантной защиты.
24. Регуляция процессов перекисного окисления липидов.
25. Прооксиданты. Механизмы действия.
26. Ингибирование ПОЛ антиоксидантами.
27. Глутатион-пероксидазная система клетки.
28. Биологическая роль перекисей липидов в клетке.
29. ПОЛ и проблемы злокачественного роста.
30. ПОЛ при атеросклерозе.
31. Образование перекисей липидов в клетке при действии ионизирующего излучения.
32. Окислительный стресс. Перекисная гипотеза гибели клетки.

33. Строение и функции комплексов дыхательной цепи митохондрий.
34. Окислительное повреждение митохондрий. Старение организма.
35. Принципы функционирования водородпереносящих шунтов цитозоль-митохондрии в клетке.
36. Механизм действия ингибиторов переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий и механизм работы разобщителей окисления и фосфорилирования.
37. Метаболические последствия мутаций и нарушений генома митохондрий.
38. Основные патологии, связанные с мутацией митохондриального генома. Митохондриальные болезни человека.
39. Строение митохондриального генома. Гены, закодированные в ДНК митохондрий.
40. Классификация митохондриальных болезней.
41. Метаболические последствия мутаций и нарушений генома митохондрий.
42. Основные патологии, связанные с мутацией митохондриального генома. Митохондриальные болезни человека.
43. Особенности наследования митохондриальных болезней и условия их проявления.
44. Современное представление об ЭКО. Использование генетического материала от трех доноров.
45. Эндоплазматический ретикулум. Структура и функции микросом. Метаболизм ксенобиотиков.
46. Микросомальная система окисления. Ферменты микросом. Монооксигеназы, маркерные ферменты.
47. Характеристика цитохрома P-450. Основные этапы гидроксилирования.
48. НАДФН-зависимые реакции. Значение CYP3A4 в метаболизме лекарств.
49. НАДН-зависимые реакции. Реакции конъюгации.
50. Способы оценки микросомального окисления печени.
51. Участие цитохрома P-450 в окислении ксенобиотиков и природных субстратов. Субстраты I и II типов.
52. Модификация ксенобиотиков в цепи переноса электронов при микросомальном окислении.
53. Индукторы и ингибиторы микросомального окисления.
54. Химические канцерогены. Механизм токсического действия CCl<sub>4</sub>.
55. Токсификация, детоксикация. Токсический тип повреждения клетки.
56. Структура и функции лизосом.
57. Мембрана лизосом, проницаемость для субстратов и ферментов. Методы исследования лизосом.
58. Реакции лизосом при адаптации. Защитная функция лизосом.
59. Лизосомные болезни накопления. Дефицит лизосомальных ферментов.



## ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	1	46	3
2	4	47	2
3	4	48	2
4	3	49	4
5	2	50	3
6	4	51	3
7	1	52	1
8	3	53	3
9	4	54	1
10	3	55	3
11	2	56	4
12	4	57	4
13	1	58	1
14	3	59	4
15	4	60	3
16	3	61	2
17	4	62	2
18	2	63	1
19	1	64	4
20	3	65	4
21	4	66	4
22	2	67	1
23	3	68	4
24	4	69	3
25	2	70	3
26	3	71	3
27	1	72	1
28	2	73	2
29	2	74	1
30	4	75	4
31	2	76	4
32	2	77	3
33	3	78	1
34	4	79	4
35	3	80	3
36	2	81	2
37	3	82	3
38	4	83	1
39	1	84	4

<b>Номер задания</b>	<b>Номер ответа</b>	<b>Номер задания</b>	<b>Номер ответа</b>
40	3	85	4
41	2	86	2
42	2	87	3
43	2	88	1
44	4	89	4
45	1	90	4

## ОТВЕТЫ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

### Задача № 1

Тепловая обработка, проведенная в щадящем режиме, вызвала диссоциацию молекулы фермента на субъединицы, но не повлияла на третичную структуру субъединиц, что сохранило способность каждой из них катализировать реакцию. Благодаря диссоциации ингибитор потерял связь с субъединицами и активность фермента увеличилась.

### Задача № 2

Первая причина состоит в том, что молекула АТФ содержится в клетке в форме комплекса Mg-АТФ, который несёт 2 отрицательных заряда, в то время как молекула цАМФ – электронейтральна. Вторая причина – отличия в конфигурации молекул АТФ и цАМФ.

### Задача № 3

Активизация окисления лактата приводит к повышению образования в матриксе митохондрий ацетил-КоА, который является аллостерическим активатором пируваткарбоксилазы, катализирующей первую реакцию глюконеогенеза («обход» пируваткиназной реакции гликолиза). Одновременно с этим, благодаря высокой концентрации ацетил-КоА, в ЦТК образуется повышенное количество цитрата, который выходит из митохондрий в цитоплазму. Цитрат является аллостерическим ингибитором ключевого фермента гликолиза фосфофруктокиназы. Помимо этих механизмов при интенсивной физической работе в крови минимизируется концентрация инсулина. Это приводит к выключению сигнального пути инсулина, который подавляет экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты глюконеогенеза.

### Задача № 4

Содержание кетоновых тел типично повышено при сахарном диабете. Необходимо дополнительно определить концентрацию глюкозы натощак и провести тест толерантности к глюкозе. Физиологический кетоз наблюдают при голодании, интенсивной и продолжительной физической работе, а также при беременности.

### Задача № 5

Для нормального функционирования липидный бислой мембраны должен находиться в жидкокристаллическом состоянии. Полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов, имеют изогнутую форму, что обуславливает «разжижение» мембранного бислоя. Благодаря этому, при понижении температуры окружающей среды, температура фазового перехода липидов

мембран понижается, что обеспечивает сдвиг равновесия *гель*  $\leftrightarrow$  *жидкий кристалл* в пользу жидкого кристалла. Таким образом, в новых условиях существования организма сохраняется нормальная динамичность мембранного бислоя, необходимая для обеспечения латеральной диффузии белков мембраны, что определяет жизнеспособность клетки. Это механизм защиты клетки от криповреждения, в основе которого лежит фазовый переход в гель-состояние.

### **Задача № 6**

Через час от начала физической работы исчерпываются запасы гликогена в скелетных мышцах. Обеспечение мышц энергией для дальнейшей работы осуществляется усилением окисления жирных кислот. При физической работе в крови повышается концентрация катехоламинов, которые активируют триацилглицероллипазу в жировой ткани. Усилившийся поток мобилизованных свободных жирных кислот поступает из крови в миоциты, где окисляется по пути  $\beta$ -окисления.

### **Задача № 7**

При длительном голодании начинается распад мышечных белков. Поток свободных аминокислот с кровью поступает в печень. В печени – основном органе, обеспечивающем глюконеогенез, из глюкогенных аминокислот синтезируется глюкоза. Глюкоза выходит из гепатоцитов в кровь и транспортируется в клетки головного мозга и миокарда, обеспечивая их энергией, способствуя в этих условиях сохранению жизнеспособности организма и адекватности поведенческих реакций.

### **Задача № 8**

У первого пациента инсулиннезависимый сахарный диабет (диабет II типа), в этиопатогенезе которого лежит ожирение. Ожирение развивается вследствие низкой физической активности, сочетающейся с неоправданно высококалорийным и обильным питанием. Избыточное питание на доклинических стадиях заболевания обеспечивает гиперинсулинемию, что способствует усилению поступления пищевой глюкозы в ткани и активации синтеза липидов, которые депонируются в форме ТАГ в жировой ткани. Масса жировой ткани начинает расти. Одновременно с подкожным жиром начинается обильное отложение висцерального жира (сальники брюшной полости и брыжейка кишечника). Более высокая липолитическая активность висцерального жира, по сравнению с подкожным, обеспечивает усиленное поступление в клетки тканей жирных кислот, где из них образуются ряд промежуточных метаболитов, которые внутри клетки нарушают трансдукцию регуляторных сигналов инсулина – формируется резистентность к инсулину. Иными словами, ожирение не только способствует формированию инсулинорезистентности тканей (диабет), но и является фактором, усугубляющим тяжесть заболевания.

Второй пациент страдает инсулинзависимым сахарным диабетом (диабет I типа). Это полиэтиологичное заболевание возникает в детско-юношеском возрасте. Обусловлено первичной недостаточностью инсулина:  $\alpha$ -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы гибнут, либо теряют способность синтезировать инсулин. Вследствие недостатка инсулина ткани лишаются способности утилизировать глюкозу крови и вынуждены «переключиться» на преимущественном окислении липидов. В жировой ткани больных перманентно усилен липолиз ТАГ, что исключает ожирение.

### **Задача № 9**

В послеоперационном периоде пластические реакции будут, в основном, обеспечивать регенеративные процессы. Оставшаяся часть печени в таких условиях не сможет обеспечить потребности организма в полном объеме. Поэтому темпы метаболических процессов, происходящих в печени, будут ниже, чем в норме: обмен гликогена, глюконеогенез, синтез гликопротеинов. Произойдет снижение синтеза белков плазмы крови, образования мочевины, креатина, холестерина, кетоновых тел, фосфолипидов, ЛПОНП. В крови повысится концентрация свободного (неконъюгированного) билирубина. Процессы детоксикации также будут замедлены.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

### Основная литература

1. Биохимия: учебник для студентов медицинских вузов / под ред. Е.С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 768 с.
2. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник для студентов мед. вузов / под ред. Е.С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 768 с.: Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
3. Березов, Т.Т. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – 3-е изд., стереотип. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2008. – 704 с.: Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>

### Дополнительная литература

1. Биохимия с упражнениями и задачами: учебник для вузов / под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 384 с.
2. Биологическая химия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс]: учебник / под ред. С.Е. Северина. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 624 с.: Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru>
3. Кильдиярова Р.Р. Лабораторные и функциональные исследования в практике педиатра [Электронный ресурс] / Р.Р. Кильдиярова – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 176 с.: Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
4. Клиническая лабораторная диагностика: в 2-х томах. [Электронный ресурс]: национальное руководство / под ред. В.В. Долгова – М.: ГЭОТАР-Медиа, Т. 1. – 2012. – 928 с.: Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
5. Клиническая лабораторная диагностика: в 2-х томах. [Электронный ресурс]: национальное руководство / под ред. В.В. Долгова – М.: ГЭОТАР-Медиа, Т. 2. – 2012. – 808 с.: Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
6. Кишкун, А.А. Клиническая лабораторная диагностика [Электронный ресурс] / Кишкун А.А. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 976 с.: Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
7. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов: учебное пособие / под ред. В.Ю. Сереброва и Г.А. Сухановой. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2008. – 180 с.
8. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов [Электронный ресурс]: учебное пособие для студентов, обучающихся по специальности 06.01.12 – «Медицинская биохимия» / Сибирский медицинский университет (Томск); ред. В.Ю. Серебров, Г.А. Суханова; сост. Д.И. Кузьменко [и

- др.], 2008. – 180 с.: Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>
9. Суханова, Г.А. Апоптоз: учебное пособие / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева. – Томск: Изд-во ТПУ. – 2009. – 172 с.
  10. Суханова, Г.А. Апоптоз [Электронный ресурс]: учебное пособие / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева; Сибирский медицинский университет (Томск). – Томск, 2005. – 141 с.: Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>

Учебное издание

**Галина Алексеевна Суханова  
Дмитрий Иванович Кузьменко  
Владимир Юрьевич Серебров  
Людмила Викторовна Спирина**

**Медицинская биохимия:  
патохимия, диагностика. Интегративная  
биохимия. Регуляция метаболизма**

практикум

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

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

---

Подписано в печать 14.03.2018.  
Формат 60x84  $\frac{1}{16}$ . Бумага офсетная.  
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. лист. 7,1. Авт. лист. 4,8.  
Тираж 100 экз. Заказ №

---

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