

**ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ –
филиал федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Кафедра микробиологии и иммунологии с курсом биологической химии

Е.О. Куличенко, С.А. Лужнова, А.М. Темирбулатова, С.С.Сигарева
Ю.К. Василенко, Е.О. Сергеева, Е.П. Парфентьева, И.В. Скульте.

**Учебно-методическое пособие для
студентов по дисциплине «Свободно-
радикальные процессы в биологии и
медицине»**

**Направление подготовки: 30.05.01 «Медицинская биохимия» (уровень
специалитета)**

Курс VI
Семестр XI

Пятигорск, 2021

УДК 577.1 (072)
ББК 28.072 я 73
В 19

Рецензент:

Доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии, кандидат фармацевтических наук Д.И. Поздняков.

Авторы:

Старший преподаватель Е.О. Куличенко, зав.каф., доцент, к.б.н. С.А. Лужнова, к.ф.н., доцент А.М. Темирбулатова, старший преподаватель С.С. Сигарева, д.м.н., профессор Ю.К. Василенко, к.ф.н., доцент Е.О. Сергеева, к.ф.н., доцент Е.П. Парфентьева, к.ф.н., доцент И.В. Скульте.

Учебно-методическое пособие для студентов по дисциплине «Свободно-радикальные процессы в биологии и медицине»/ Е.О. Куличенко, С.А. Лужнова, А.М. Темирбулатова, С.С.Сигарева, Ю.К. Василенко, Е.О. Сергеева, Е.П. Парфентьева, И.В. Скульте. –ПМФИ – филиал ГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ. Пятигорск, 2021. –87 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов VI курса факультета высшего образования специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия», изучающих дисциплину «Свободно-радикальные процессы в биологии и медицине».

Методические рекомендации разработаны согласно действующему учебному плану (Пятигорск, 2020), ФГОС ВО по специальности «Медицинская биохимия», с учётом рекомендаций примерной основной образовательной программы ВО по специальности «Медицинская биохимия».

УДК 577.1 (072)
ББК 28.072 я 73

*Печатается по решению Центральной методической комиссии
Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ
ВО ВолгГМУ Минздрава РФ*

©ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ –
филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ, 2021

№ зан	Тема занятия	Количество часов
1.	Активные формы кислорода, образующиеся в живых организмах.	3
2.	Активные формы азота.	3
3.	Ферментативные механизмы образования свободных радикалов и активных форм кислорода.	3
4.	Неферментативные механизмы образования свободных радикалов и активных форм кислорода.	3
5.	Взаимосвязь действия активных форм кислорода и окислительно-восстановительного статуса клетки с регуляцией клеточной пролиферации и дифференцировки.	3
6.	Роль активных форм кислорода и азота в регуляции функций сосудистой системы организма и микроциркуляции крови, в процессах иммунной защиты организма, в функционировании адаптационных механизмов живых организмов.	3
7.	Свободно-радикальное окисление полиненасыщенных жирных кислот.	3
8.	Продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот.	3
9.	Методы идентификации и количественного определения продуктов окислительного повреждения аминокислот, пептидов и белков в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах.	3
10.	Методы идентификации и количественного определения продуктов окислительной модификации нуклеотидов и нуклеиновых кислот в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах.	3
11.	Механизмы окислительного повреждения углеводов.	3
12.	Способы регуляции и контроля уровня продукции активных форм кислорода внутри и снаружи клеток.	3
13.	Защита клеток от активных форм кислорода, образующихся внутри клетки.	3
14.	Глутатион-зависимые процессы антиоксидантной защиты.	3
15.	Антиоксиданты прямого и косвенного действия.	3
16.	Глутатион. Структура, антиоксидантные свойства, биологическое значение, метаболизм в организме.	3
17.	Процессы свободнорадикального окисления и сердечно-сосудистая патология.	3

ВВЕДЕНИЕ

Рабочая программа дисциплины разработана в соответствии федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия» (уровень специалитета). Дисциплина «Свободно-радикальные процессы в биологии и медицине» относится к группе дисциплин по выбору — Б1.В.ДВ.5.2.

Цель дисциплины: сформировать у студентов понимание принципов и биохимических механизмов протекания свободнорадикальных процессов в живых организмах, функционирования живой клетки в условиях аэробного метаболизма, защиты клетки от окислительного стресса, а также, на основе понимания фундаментальных достижений свободнорадикальной биологии – принципов практического применения методов оценки и коррекции нарушений окислительно-антиоксидантного баланса организма и его отдельных частей в современной медицине.

Задачи дисциплины: представить современные понятия о протекании свободнорадикальных процессов в живых организмах, о физиологическом и патологическом значении активных форм кислорода и свободных радикалов, обращая особое внимание на взаимосвязь развития патологических состояний человека с нарушением физиологического окислительно-антиоксидантного баланса, а также о принципах и методах оценки и возможных подходах к коррекции нарушений указанного баланса в практическом здравоохранении.

Тема: Активные формы кислорода, образующиеся в живых организмах.

Цель: Ознакомиться с механизмами образования активных форм кислорода, изучить классификацию свободных радикалов, научиться писать реакции образования свободных форм кислорода, провести количественное определение каталазы крови.

Перечень практических навыков:

Знать:

- механизмы образования активных форм кислорода;
- классификацию свободных радикалов.

Уметь:

- писать реакции образования свободных форм кислорода;
- провести количественное определение каталазы крови.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Активные формы кислорода.
2. Классификация и характеристика образования свободных радикалов и активных форм кислорода.
3. Ферментативные и неферментативные механизмы образования свободных радикалов и активных форм кислорода.

Во время объяснения преподавателем обратить внимание на следующие моменты:

- пути образования свободных радикалов;
- виды активных форм свободных радикалов;
- провести количественное определение каталазы в крови.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Заполнение таблицы «Радикалы в организме человека».

Таблица №1.

Радикалы в организме человека.

	Радикалы в организме человека	
Природные		Чужеродные
Первичные		УФ-облучение
Вторичные		Ксенобиотики
Третичные		

Работа №2. Заполнение таблицы «Количественное определение каталазы крови» (таблица №2).

Количественное определение каталазы крови

Количественное определение каталазы крови.

Принцип: основан на определении количества H_2O_2 , разложившей каталазой за определенное время,

Пробы (в стакан-стакан-)	Разведен-ная кровь	Дист вода	H_2O_2 1%р-р	H_2SO_4 , 10 % р-р	Экспозиц ия	H_2O_2 1%р-р	H_2SO_4 10 %р-р	Количество 0,1 М р-ра $KMnO_4$ в	Расчет
Опыт	1 мл	7 мл	2 мл	-	30 мин При комнт. темпер.	-	5 мл	B = ?	Каталазное число $(KЧ) = (A-B)$ * 1,7 = ? мг
Контроль	1 мл	7 мл	-	5 мл		2 мл	-	A = ?	

Выпол. ? **В норме каталазное число = 10-15**

Объекты для исследования:разведенная кровь 1:1000.

Аппаратура и посуда:автоматические пипетки, колбы конусовидные, бюретка для титрования, стаканчики химические, термостат.

Методическое обеспечение:нметодические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия, описание принципа метода определения и деталей опыта.

Вопросы итогового контроля:

1. Какой принцип положен в основу количественного определения каталазы по методу Баха и Зубковой ?
2. Как выражается активность каталазы, что обозначает каталазное число?
3. Каково клинико – диагностическое значение определения каталазы крови ?
4. К какому классу ферментов относится каталаза ?
5. Какую роль выполняет фермент каталаза при перекисном окислении липидов мембран?

Занятие №2

Тема: Активные формы азота.

Цель: Научиться писать реакции катализируемые NO-синтазами, описывать роль NO как нейромедиатора, изучить физико-химические свойства азотных соединений, образование комплексов NO с гемоглобином, названия, формулы и степень окисления некоторых соединений азота, спектр биологического действия NO.

Перечень практических навыков:

Знать:

- физико-химические свойства азотных соединений;
- комплексы, образуемые NO с гемоглобином;
- название, формулы и степень окисления некоторых соединений азота;
- спектр биологического действия NO.

Уметь:

- писать реакции катализируемые NO-синтазами;
- описать роль NO как нейромедиатора.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Физико-химические свойства азотных соединений.
2. Опишите спектр биологического действия NO.
3. Опишите роль цитохром P-450-подобных гемопротеинов-NO-синтаз в синтезе NO.
4. По характеру индукции и действия ферменты подразделяются на какие классы? Дайте названия этим классам и охарактеризуйте их.
5. Какие кофакторы используют все типы синтаз.
6. Напишите уравнения реакций взаимодействия в физиологических условиях NO с молекулярным кислородом с образованием ряда интермедиаторов.
7. Назовите вещество которое образуется в реакции NO с супероксид-анионом, напишите уравнение реакции. Опишите физико-химические свойства.

8. Опишите роль NO в защите от ишемического поражения миокарда.

Преподаватель в процессе опроса студентов и разбора материалов темы останавливается на понятии NO, его функции в организме. Подробно рассматривают физико-химические свойства NO. Необходимо обратить особое внимание на роль NO в жизнедеятельности организма.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Заполните таблицу «Реакции, катализируемые NO-синтазами».

Таблица №1.

Реакции, катализируемые NO-синтазами.

Активность	Катализируемые реакции
1. Аргинин-N-гидроксидаза	
2. N-гидроксиаргинин-монооксигеназа	
3. НАДФН-диафораза	
4. Цитохром-с-редуктаза	
5. НАДФ-оксидаза	

Работа №2. Заполните таблицу «Ткани, органы и клетки в которых выявлена конструктивно экспрессируемая NO-синтаза».

Таблица №2.

Ткани, органы и клетки в которых выявлена конструктивно экспрессируемая NO-синтаза.

Клетки	Ткани и органы
1	1
2	2
3	3
4	3

Работа №3. Заполните таблицу «Наличие разных изоформ NO-синтаз в клетках человека».

Наличие разных изоформ NO-синтаз в клетках человека.

	Нейрональная NO-синтаза	Индукцибельная NO-синтаза	Эндотелиальная NO-синтаза
Тромбоциты			
Мегакариоциты			
Нейтрофилы			
Эозинофилы			

Работа №4. Подготовка рефератов по тема:

1. Цитотоксическое действие NO.
2. Методы регистрации NO в биологических средах.

Объекты для исследования: активные формы азота.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Опишите роль NO как нейромедиатора.
2. Охарактеризуйте спектр биологического действия NO.
3. Роль NO в защите от ишемического поражения миокарда.

Занятие №3

Тема: Ферментативные механизмы образования свободных радикалов и активных форм кислорода.

Цель: Узнать о ферментативных процессах механизма образования активных форм кислорода и ферментативных процессах механизма образования свободных радикалов. Научиться писать реакции образования свободных форм кислорода, охарактеризовать участки и механизмы образования активных форм кислорода в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме.

Перечень практических навыков:

Знать:

- ферментативные процессы механизма образования активных форм кислорода;
- ферментативные процессы механизма образования свободных радикалов.

Уметь:

- писать реакции образования свободных форм кислорода;
- охарактеризовать участки и механизмы образования активных форм кислорода в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Ферментативные механизмы образования свободных радикалов.
2. Ферментативные механизмы образования активных форм кислорода.
3. Участки и механизмы образования активных форм кислорода в митохондриях.
4. Участки и механизмы образования активных форм кислорода эндоплазматическом ретикулуме и при участии цитозольных и внеклеточных оксидаз (ксантиноксидаза, NAD (P)H-аминоксидазы).
5. Образование свободных радикалов в ксантиноксидазной реакции.

Преподаватель в процессе опроса студентов и разбора материалов темы останавливается на ферментативных механизмах образования свободных

радикалов и активных форм кислорода. Подробно рассматривают образование свободных радикалов в ксантиноксидазной реакции. Необходимо обратить особое внимание на участки и механизмы образования активных форм кислорода.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Заполнение таблицы «Характеристика активных форм кислорода».

Таблица №1.

Характеристика активных форм кислорода.

Активные формы кислорода	
Название активных форм кислорода	Характеристика активных форм кислорода
1.Супероксидный анион-радикал (O_2^-).	
2.Перекись водорода ($H_2 O_2$).	
3.Синглетный кислород (O_2').	
4.Гидроксильный радикал ($\bullet OH$).	

Работа №2. Заполнение таблицы «Первичные и вторичные радикалы, образующиеся в организме».

Таблица №2.

Первичные и вторичные радикалы, образующиеся в организме.

Первичные радикалы:			
Название радикала	Структура радикала	Ферментная система, ответственная	Биологическая роль радикала

		за образование радикала	
Супероксид	$\cdot\text{OO}^-$		
Нитроксид	$\cdot\text{NO}$		
Убихинол	$\cdot\text{Q}$		
Вторичные радикалы:			
Название радикала	Структура радикала	Образуется в реакции	Биологическая роль радикала азвание радикала
Радикал гидроксила	$\cdot\text{OH}$	$\text{Fe}^{2+} + \text{HOON}$ $\rightarrow \text{Fe}^{3+} +$ $\text{HO}^- + \cdot\text{OH}$ $\text{Fe}^{2+} + \text{ClO}^- +$ $\text{H}^+ \rightarrow$ $\text{Fe}^{3+} + \text{Cl}^- +$ $\cdot\text{OH}$	
Липидные радикалы	$\text{LO}\cdot$ $\text{L}\cdot$ $\text{LOO}\cdot$	$\text{Fe}^{2+} + \text{LOON} -$ $> \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- +$ $\text{LO}\cdot$ $\text{LO}\cdot + \text{LH}$ $\rightarrow \text{LOH} + \text{L}\cdot$ $\text{L}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow$ $\text{LOO}\cdot$	

Объекты для исследования: ферментативных механизмах образования свободных радикалов и активных форм кислорода.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Охарактеризовать образование супероксидного радикала.
2. Охарактеризовать образование синглетного кислорода.
3. Охарактеризовать образование гидроксильного радикала.
4. Опишите первичные радикалы, образующиеся в организме.
5. Опишите вторичные радикалы, образующиеся в организме.

Занятие №4

Тема: Неферментативные механизмы образования свободных радикалов и активных форм кислорода.

Цель: Изучить неферментативные механизмы образования свободных радикалов и активных форм кислорода. Изучить механизмы и протекание реакций Фентона, Хабера-Вейса и Осипова. Сравнить значения катионов различных металлов переменной валентности для продукции свободных радикалов в живых организмах. Изучить влияние различных переходных металлов на образование свободных радикалов в реакции Фентона.

Перечень практических навыков:

Знать:

- неферментативные механизмы образования свободных радикалов и активных форм кислорода;
- механизмы и протекание реакций Фентона, Хабера-Вейса и Осипова;
- влияние различных переходных металлов на образование свободных радикалов в реакции Фентона.

Уметь:

- сравнивать значения катионов различных металлов переменной валентности для продукции свободных радикалов в живых организмах.

Владеть:

- навыками работы со справочной, методической и учебной литературой.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Неферментативные механизмы образования свободных радикалов и активных форм кислорода.
2. Реакции Фентона, Хабера – Вейсса и Осипова.
3. Сравнительное значение катионов различных металлов переменной валентности для продукции свободных радикалов в живых организмах.

4. Изучение влияния различных переходных металлов на образование свободных радикалов в реакции Фентона.

Преподаватель в процессе опроса студентов и разбора материалов темы останавливается на ферментативных механизмах образования свободных радикалов и АКМ, кратко рассказывает об их функциях в организме. Подробно рассматривают и описывают на доске реакции Фентона, Хабера-Вейсса и Осипова. Необходимо обратить особое внимание на роль металлов переменной валентности в жизнедеятельности организма и формировании свободных радикалов.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Заполните таблицу «Пути образования активных форм кислорода».

Таблица №1.

Пути образования активных форм кислорода.

Ферменты, типы реакций	Общая формула протекания процесса	Активные формы кислорода
Реакция Хабера – Вейсса	$\cdot\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$ Катализаторами реакции являются металлы переменной валентности	$\cdot\text{OH}$
Реакция Фентона	$\text{Me}^{n+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Me}^{(n+1)+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ или $\text{Me}^{n+} + \text{ROOH} \rightarrow \text{Me}^{(n+1)+} + \text{RO}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ В реакции Фентона участвуют катионы металлов переменной валентности в низшей степени окисления (Fe^{2+} , Cu^+ , Ti^{3+} , Cr^{2+} , Co^{2+})	$\cdot\text{OH}$, $\text{RO}\cdot$

Реакция Осипова	$\text{HOCl} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{Cl}^- + \text{HO}\cdot$	$\cdot\text{OH}$
--------------------	--	------------------

Работа №2. Заполните таблицу «Механизм протекания реакции Хабера-Вейсса».

Таблица №2.

Механизм протекания реакции Хабера-Вейсса.

Название стадии:	Механизм протекания стадии:
1. Восстановление Fe^{3+} :	$\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
2. Вторая стадия:	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$
3. Возникновение цепи	$\cdot\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{HO}^- + \text{O}_2$

Работа №3. Определение общей антиокислительной активности плазмы крови.

Принцип метода. Ненасыщенные жирные кислоты подвергаются перекисному окислению в присутствии ионов двухвалентного железа. Об интенсивности перекисного окисления судят по накоплению в среде инкубации МДА. По степени торможения накопления МДА в присутствии плазмы крови судят о ее суммарной АОА.

Реактивы и их приготовление.

1. Суспензия линоленовой кислоты. К 1 мл дистиллированной воды (37 °С) добавляют 50 мкл тритона X-100, после перемешивания добавляют 10 мкл линоленовой кислоты. Хорошо перемешивают и переносят в стаканчик

с 24 мл дистиллированной воды. Суспензию постоянно перемешивают на магнитной мешалке. Готовят каждый день.

2. 1 мМ раствор сульфата железа (II). 27,8 мг соли растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

3. 0,8 %-ный раствор тиобарбитуровой кислоты. Объем приготавливаемого раствора ТБК зависит от количества проб. 80 мг ТБК при нагревании (60–70 °С) растворяют в 10 мл дистиллированной воды. Раствор готовят перед опытом.

4. 0,9 %-ный раствор хлорида натрия.

5. 1 %-ный раствор фосфорной кислоты. 3,4 мл концентрированной кислоты (плотность 1,705 г/мл) разбавляют дистиллированной водой до 500 мл.

6. Бутанол.

Ход определения. Отобранную плазму крови разводят, для чего к 0,1 мл плазмы добавляют 0,3 мл физиологического раствора.

Для определения общей АОА используют две пробы: контрольную (без плазмы крови) и опытную (с плазмой крови). С этой целью в 2 пробирки помещают 0,5 мл суспензии линоленовой кислоты, 0,1 мл 1 мМ раствора сульфата железа. В опытную пробу добавляют 0,01 мл разведенной плазмы крови, а в контрольную – 0,01 мл физиологического раствора. Параллельно ставят контрольные пробы, где вместо линоленовой кислоты берут 0,5 мл дистиллированной воды. Все пробы инкубируют в течение 1 ч при 37 °С, постоянно перемешивая.

Накопление в среде инкубации МДА устанавливают с помощью ТБК (Андреева и др., 1988). Для этого по окончании инкубации из каждой пробы отбирают 0,2 мл, добавляют 3 мл 1 %-ной фосфорной кислоты и после перемешивания добавляют 1 мл 0,8 % раствора ТБК. Пробы хорошо перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 1 ч, затем охлаждают до комнатной температуры. В каждую пробирку добавляют 4 мл бутанола, тщательно перемешивают и для разделения фаз центрифугируют 10 мин при

3000 об./мин. Измеряют оптическую плотность верхней бутанольной фазы при длине волны 515 и 532 нм против контрольной пробы. В расчет берут разность экстинкций: $DE = E_{532} - E_{515}$.

АОА вычисляют в процентах по формуле, где за 100 % принимается активность такого антиоксиданта, который полностью подавляет образование МДА в опытной пробе за 1 ч инкубации:

$$X = 1 - \frac{[МДА_{оп}] * 60' - [МДА_{оп}] * 0'}{[МДА_{к}] * 60' - [МДА_{к}] * 0'}$$

где $[МДА_{оп}]$ – содержание МДА (в единицах экстинкции) в опытной пробе с добавкой плазмы крови; $[МДА_{к}]$ – содержание МДА в контроле без биоматериала соответственно в начальный момент времени (0ϕ) и после инкубации (60ϕ).

Объекты для исследования: активные формы азота.

Оборудование: центрифуга с охлаждением, термостат, электроплитка, фотоэлектроколориметр типа КФК-3 или спектрофотометр СФ-46, магнитная мешалка.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Опишите принцип определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови.
2. Опишите реакцию Фентона.
3. Опишите реакцию Хабера-Вейсса.
4. Опишите реакцию Осипова.

Занятие №5

Тема: Взаимосвязь действия активных форм кислорода и окислительно-восстановительного статуса клетки с регуляцией клеточной пролиферации и дифференцировки.

Цель: Изучить возможности регуляторного действия АКМ в качестве эффективного механизма внутри- и межклеточной коммуникации, связанной с их метаболической активностью, дифференцировкой и пролиферацией на примерах работы некоторых редокс-чувствительных факторов транскрипции.

Перечень практических навыков:

Знать:

- понятие «активированные кислородные метаболиты» (АКМ);
- механизмы регуляторного действия АКМ;
- редокс-чувствительные факторы транскрипции;
- транскрипционный фактор NF-κB;
- транскрипционный фактор AP-1;
- антиоксидант-респонсивный элемент;
- гены с АКМ-контролируемой экспрессией;
- механизм активации АКМ;
- физиологическое значение АКМ.

Уметь:

- систематизировать знания об изученных ранее свободных радикалах и окислительно-восстановительном статусе клетки.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Механизмы регуляторного действия АКМ:
 - два главных механизма (мишени):
 - а) взаимодействие с атомами металлов переменной валентности в составе белков;

- б) окисление SH-групп в белках.
- редокс-чувствительные факторы транскрипции:
 - а) участие АКМ в регуляции активности многих ферментов и факторов транскрипции у прокариот и эукариот: функции OxyR, SoxR-белка и AP-1-респонсивных элементов.
- транскрипционный фактор NF-κB:
 - а) ключевая роль в развитии воспалительного процесса: регулирует экспрессию белков острой фазы, молекул адгезии и провоспалительных цитокинов;
 - б) влияние на активность NF-κB, H₂O₂, нитрозилированных белков, УФ-облучения, радиации, NO-радикалов и др.
- 2. Транскрипционный фактор AP-1:
 - а) структура этой группы белков;
 - б) связь AP-1 и NF-κB в условиях окислительного стресса.
- 5. Антиоксидант-респонсивный элемент (АКМ):
 - а) главная функция – поддержание внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях;
 - б) ксенобиотики – антиоксиданты, активирующие АКМ: фенолы природного и синтетического происхождения; тиолсодержащие соединения, гидроперекиси, каратиноиды, атомы тяжелых металлов, витамин С.
- 6. Гены с АКМ-контролируемой экспрессией:
 - а) гены белков – ферментов детоксикации ксенобиотиков (глутатион-S-трансферазы, гемоксигеназы и др.)
 - б) гены белков – антиоксидантов: глутатионпероксидазы, глутаматцистеинлигазы, тиоредоксины и глутаредоксины.
- 7. Механизм активации АКМ.
- 8. Физиологическое значение АКМ.

В ходе разбора материала темы со студентами преподаватель обращает внимание, что в процессе эволюции многоклеточные организмы научились

использовать уникальные свойства АКМ не только для защиты от бактериальных агрессий, но и в качестве эффективного механизма внутри- и межклеточной коммуникации, являясь универсальным индуктором редокс-баланса в ответ на стрессовые воздействия совместно с продуктами свободно-радикальных процессов ПОЛ. Подчеркивает, что механизмов действия АКМ на регуляторные процессы в клетках очень много, т.к. они могут окислять, восстанавливать или повреждать любую органическую молекулу, но можно выделить два главных механизма (мишени): взаимодействие с металлосодержащими белками и окисление SH-групп в белках. Останавливается на таких редокс-чувствительных элементах, как факторы транскрипции NF-κB и AP-1, белок-супрессор опухолей p53, Nrf2 активация которых приводит к изменению экспрессии нескольких сотен генов и, соответственно, активности многих ферментативных процессов. Поэтому эти регуляторные элементы служат ключевыми звеньями клеточной пролиферации и дифференцировки, индукции апоптоза и развития множественной лекарственной устойчивости. Характеризует роль регуляторной системы АКМ в поддержании внутреннего гомеостаза в результате воздействия на соответствующие гены. Останавливается на механизмах активности АКМ и подчеркивает физиологическое значение АКМ как системы универсального действия.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Заполните таблицу «Факторы АКМ».

Таблица №1.
Факторы АКМ.

Белки острой фазы	Молекулы адгезии	Цитокины	Регуляторы апоптоза
Ангиотензиноген Фактор комплимента В, С4	Молекула межклеточной адгезии	Интерлейкины ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-	Гомолог Вc1-2

С-реактивный белок Активатор плазминогенаурокиназног о типа	Рецептор адгезии тромбоцитов Молекула адгезии клеток сосудов Эндотелицитарна я молекула адгезии лейкоцитов	3, ИЛ-6, ИЛ- 8, ИЛ-9, ИЛ- 11, ИЛ-12, ИЛ-15 Интерферон γ Лимфотоксин α , β Фактор некроза опухолей (ФНО) α , β	cCD95 (Fas) Индуктор ы апоптоза
--	---	--	--

Работа №2. Подготовка рефератов по тема:

1. Ксенобиотики – антиоксиданты, активирующие АКМ
2. Цитокины, как факторы АКМ.

Объекты для исследования: факторы АКМ.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Назовите и охарактеризуйте белки острой фазы.
2. Назовите и охарактеризуйте молекулы адгезии.
3. Назовите и охарактеризуйте цитокины.
4. Назовите и охарактеризуйте регуляторы апоптоза.

Занятие №6

Тема: Роль активных форм кислорода и азота в регуляции функций сосудистой системы организма и микроциркуляции крови, в процессах иммунной защиты организма, в функционировании адаптационных механизмов живых организмов.

Цель: Ознакомиться с концепцией выполнения в современном понимании биохимических процессов в живых организмах; изучить главные характеристики воспаления и роль АКМ и продуктов ПОЛ в усилении различных патологических процессов при воспалении.

Перечень практических навыков:

Знать:

- понятие воспаление как патофизиологический феномен или синдром. Концепция воспаления в современном понимании биохимических процессов в живых системах;
- главные характеристика воспаления;
- эффекторы и модуляторы воспаления;
- роль первичных продуктов ПОЛ в усилении различных патологических процессов;
- роль NO-радикалов эндотелиальных клеток в физиологической регуляции тонуса сосуда, предупреждения тромбообразования и снижение адгезии нейтрофилов к эндотелию;
- вторичная альтерация воспалительной реакции: роль АКМ и NO-радикалов и активности фагоцитирующих клеток;
- процессы экссудации и развитие отека; действие цитокинов как модуляторов в очаге воспаления;
- пролиферацияи апоптоз важные элементы воспаления.

Уметь:

- систематизировать знания об изученных ранее свободных радикалах;
- устанавливать причинно-следственную связь между активными формами кислорода и азота и иммунной и сердечно-сосудистой системой.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Концепция воспаления в современном понимании биохимических процессов в живых системах.
2. Три фазы в развитии острого воспаления: альтерация, экссудация и пролиферация; эффекторы и модуляторы воспаления.
3. Роль первичных продуктов ПОЛ с участием АКМ в развитии первичной альтерации.
4. Роль конечных продуктов ПОЛ в усилении различных патологических: 1) усиление хемотаксиса гранулоцитов; 2) изменение активности ферментов; 3) ингибирование действия шаперонов; 4) изменение структуры апо-ЛП.
5. Роль NO-радикалов эндотелиальных клеток в физиологической регуляции тонуса сосудов, предупреждение тромбообразования и снижение адгезии нейтрофилов к эндотелию.
6. Вторичная альтерация воспалительной реакции: роль АКМ, NO-радикалов и активности фагоцитирующих клеток.
7. Процессы экссудации и развитие отека; действие цитокинов как модуляторов в очаге воспаления.
8. Пролиферация и апоптоз – важные элементы воспаления.

В ходе разбора материала темы со студентами преподаватель обращает внимание, что в процессе эволюции многоклеточные организмы научились использовать уникальные свойства АКМ не только для защиты от бактериальных агрессий, но и в качестве эффективного механизма внутри- и межклеточной коммуникации, являясь универсальными индукторами редокс-баланса в ответ на стрессовые воздействия совместно с продуктами свободно-радикальных процессов ПОЛ. Подчеркивает, что механизмов действия АКМ

на регуляторные процессы в клетках очень много, т.к. они могут окислять, восстанавливать или повреждать любую органическую молекулу, но можно выделить два главных механизма (мишени): взаимодействие с металлосодержащими белками и окисление SH-групп в белках. Останавливается на таких редокс-чувствительных элементах, как факторы транскрипции NF-kB и AP-1, белок-супрессор опухолей p53, N2f2 активация которых приводит к изменению экспрессии нескольких сотен генов и, соответственно, активности многих ферментативных процессов. Поэтому эти регуляторные элементы служат ключевыми звеньями клеточной пролиферации и дифференцировки, индукции апоптоза и развития множественной лекарственной устойчивости. Характеризует роль регуляторной системы АКМв поддержании внутреннего гомеостаза в результате воздействия на соответствующие гены. Останавливается на механизмах активности АКМ и подчеркивает физиологическое значение АКМ как системы универсального действия.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Заполните таблицу «Действие цитокинов на продукцию АКМ фагоцитирующими клетками».

Таблица №1.

Действие цитокинов на продукцию АКМ фагоцитирующими клетками.

Фактор	Эффект
Г-КСФ	
М-КСФ	
ГМ-КСФ	
Инсулиноподобный фактор роста-1	
Росттрансформирующие факторы $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$	
ФНО- α	
Интерферон- γ	

ИЛ-1	
ИЛ-2	
ИЛ-3	
ИЛ-4	
ИЛ-5	
ИЛ-6	
ИЛ-8	
ИЛ-10	
ИЛ-12	
ИЛ-13	
Фактор активации тромбоцитов	

Работа №2. Подготовка рефератов по тема:

1. Оценка жизнеспособности клеток инфузорий в условиях индукции и окислительного стресса.

2. Оценка жизнеспособности клеток инфузорий в условиях индукции окислительного стресса после их адаптации к низким концентрациям окислителей.

Объекты для исследования: роль активных форм кислорода и азота в регуляции функций сосудистой системы организма и микроциркуляции крови, в процессах иммунной защиты организма, в функционировании адаптационных механизмов живых организмов.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Охарактеризуйте цитокины Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ.
2. Охарактеризуйте инсулиноподобный фактор роста-1.
3. Охарактеризуйте росттрансформирующие факторы $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$.
4. Охарактеризуйте ФНО- α .
5. Охарактеризуйте Интерферон- γ .
6. Назовите и кратко охарактеризуйте интерлейкины.
7. Охарактеризуйте фактор активации тромбоцитов.

Занятие №7

Тема: Свободно-радикальное окисление полиненасыщенных жирных кислот.

Цель: узнать основные механизмы свободно-радикального окисления полиненасыщенных жирных кислот, перекисного окисления холестерина и других стероидных соединений. Научиться писать реакции окисления полиненасыщенных жирных кислот и проводить количественное определение ТБК-реактивных продуктов и гидроперекисей липидов в модельных биологических образцах.

Перечень практических навыков:

Знать:

- свободно-радикальное окисление полиненасыщенных жирных кислот;
- перекисное окисление холестерина и других стероидных соединений.

Уметь:

- писать реакции окисления полиненасыщенных жирных кислот;
- провести количественное определение ТБК-реактивных продуктов и гидроперекисей липидов в модельных биологических образцах.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Свободно-радикальное окисление полиненасыщенных жирных кислот.
2. Роль алкильных, алкоксильных и пероксильных радикалов в окислительном повреждении организма.
3. Перекисное окисление холестерина и других стероидных соединений.
4. Значение ПОЛ в норме и при патологии.

В ходе разбора материала темы со студентами преподаватель обращает внимание, что в процессе эволюции многоклеточные организмы научились

использовать уникальные свойства АКМ не только для защиты от бактериальных агрессий, но и в качестве эффективного механизма внутри- и межклеточной коммуникации, являясь универсальными индукторами редокс-баланса в ответ на стрессовые воздействия совместно с продуктами свободно-радикальных процессов ПОЛ. Преподаватель объясняет ход практической работы занятия: вследствие индукции перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран и липопротеинов крови в организме накапливаются различные дериваты полиненасыщенных жирных кислот. Активность ПОЛ оценивают по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основную массу которых составляет малоновыйдиальдегид (МДА). Возможна частичная реакция ТБК с различными альдегидами, аминокислотами, веществами, содержащими SH-, NH₂-группы, поэтому при использовании метода говорят об изменении концентрации не МДА, а ТБК-реактивных продуктов или МДА-подобных соединений.

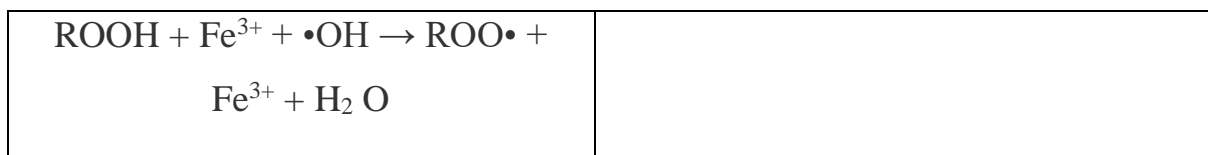
Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Заполнить таблицу «Реакции перекисного окисления липидов».

Таблица №1.

Реакции перекисного окисления липидов.

Реакции ПОЛ	
Стадии Пол	Характеристика стадий
1. $RH + \cdot OH \rightarrow H_2O + R\cdot$	
2. $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$	
3. $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$	
4. $ROOH + Fe^{2+} \rightarrow RO\cdot + Fe^{3+} + H_2O$	



Работа №2. Определения содержания ТБК-реактивных продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови (метод А. Кона и В. Ливерсейджа в модификации Ю. Владимирова и А. Арчакова).

Принцип метода: В основе метода лежит реакция между МДА и 2-ТБК, которая при высокой температуре и кислом значении рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего 1 молекулу МДА и 2 молекулы ТБК. Максимум поглощения этого комплекса определяется при длине волны 532 нм.

Ход работы. В опытную центрифужную пробирку добавляют 0,5 мл сыворотки крови, в контрольную – 0,5 мл дистиллированной воды. В каждую пробирку последовательно добавляют 1,5 мл трис-НСl буфера (рН 7,2), 1,0 мл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты и 1,0 мл 0,75 % свежеприготовленного раствора ТБК (навеску реактива растворяют в дистиллированной воде при нагревании на водяной бане). Пробы инкубируют 15 минут в кипящей водяной бане, содержимое окрашивается в розовый цвет. Пробы охлаждают, осадок белка удаляют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости опытной пробы измеряют в кювете толщиной 1,0 см при длине волны 532 нм против контрольной пробы.

РАСЧЁТ. Расчеты проводят по формуле, учитывая коэффициент молярной экстинкции: , где: V – объем вносимой плазмы крови в литрах, $1,56 \cdot 10^5$ M–1см–1 – коэффициент молярной экстинкции триметинового комплекса E – экстинкция опытной пробы, C – концентрация малонового диальдегида, мкмоль/л.

Объекты для исследования: сыворотка крови.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по

теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Описать реакции перекисного окисления липидов.
2. Охарактеризовать определение содержания ТБК-реактивных продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови.
3. Описать определение содержания диеновых конъюгатов гидроперекисей липидов в сыворотке крови.
4. Описать значение ПОЛ в норме и при патологии.

Занятие №8

Тема: Продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот.

Цель: изучить основные продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот. Установить возможный спектр, источники образования, строение и химические свойства. Изучить неблагоприятные и токсические эффекты продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот на молекулярном, клеточном и тканевом уровне. Разобрать методы идентификации и количественного определения продуктов перекисного окисления липидов в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах. Провести моделирование перекисного окисления липидов в лецитиновых липосомах.

Перечень практических навыков:

Знать:

- продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот;
- возможный спектр, источники образования, строение и химические свойства;
- неблагоприятные и токсические эффекты продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот на молекулярном, клеточном и тканевом уровне;
- методы идентификации и количественного определения продуктов перекисного окисления липидов в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах;
- моделирование перекисного окисления липидов в лецитиновых липосомах.

Уметь:

- писать реакции окисления полиненасыщенных жирных кислот;
- провести количественное определение ТБК-реактивных продуктов и гидроперекисей липидов в модельных биологических образцах.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Основные продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот.
2. Возможный спектр, источники образования, строение и химические свойства.
3. Неблагоприятные и токсические эффекты продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот на молекулярном, клеточном и тканевом уровне.
4. Методы идентификации и количественного определения продуктов перекисного окисления липидов в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах.
5. Моделирование перекисного окисления липидов в лецитиновых липосомах.

В ходе разбора материала темы со студентами преподаватель обращает внимание, что в процессе эволюции многоклеточные организмы научились использовать уникальные свойства АКМ не только для защиты от бактериальных агрессий, но и в качестве эффективного механизма внутри- и межклеточной коммуникации, являясь универсальными индукторами редокс-баланса в ответ на стрессовые воздействия совместно с продуктами свободно-радикальных процессов ПОЛ. Преподаватель объясняет ход практической работы занятия: вследствие индукции перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран и липопротеинов крови в организме накапливаются различные дериваты полиненасыщенных жирных кислот. Активность ПОЛ оценивают по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основную массу которых составляет малоновыйдиальдегид (МДА). Возможна частичная реакция ТБК с различными альдегидами, аминокислотами, веществами, содержащими SH-, NH₂-группы, поэтому при использовании метода говорят об изменении концентрации не МДА, а ТБК-реактивных продуктов или МДА-подобных соединений.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Количественное определение ТБК-реактивных продуктов и гидроперекисей липидов в модельных биологических образцах.

Определение концентрации малонового диальдегида (МДА)

Принцип метода. При высокой температуре в кислой среде МДА реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 532нм.

Ход работы. К 3мл фосфатного буфера (рН 7,4) добавляют 0,2мл сыворотки донорской крови, 0,5мл 1мМ калий перманганата, раствор перемешивают, через 10 минут добавляют 0,5мл 1мМ раствора феррум сульфата, 1мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты и центрифугируют 10 минут при скорости 3000об/мин. К 2мл супернатанта добавляют 0,5мл 1М раствора хлоридной кислоты и 1мл 0,7% тиобарбитуровой кислоты. Смесь выдерживают 20минут на кипящей водяной бане. После быстрого охлаждения в пробирку наливают 3мл бутанола, старательно перемешивают и центрифугируют 10мин при скорости 3000об/мин.

Экстинкцию раствора определяют спектрофотометрически. Концентрацию выражают в мкмоль МДА/мл сыворотки: $E = \frac{A}{\epsilon \cdot d}$, где E – экстинкция раствора; 52,88 – коэффициент пересчета; 0,2 – объем сыворотки крови в пробе, мл. Клинико-диагностическое значение. Увеличение концентрации МДА свидетельствует об интенсификации процессов ПОЛ, что лежит в основе возникновения таких патологических состояний как канцерогенез, лучевая, ожоговая, язвенная болезни и т.д.

Определение содержания диеновых конъюгатов гидроперекисей липидов в сыворотке крови (метод Плацера в модификации В.Б. Гаврилова и М.И. Мишкорудной).

Процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) сопровождается преобразованиями в области двойных связей полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран. Смещение таких связей приводит к появлению сопряженных диеновых и триеновых конъюгатов гидроперекисей липидов, которые имеют максимумы поглощения света в ультрафиолетовой области.

ПРИНЦИП МЕТОДА. О содержании конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов судят по интенсивности поглощения липидным экстрактом при длине волны 233 нм.

РЕАКТИВЫ: концентрированная HCl, гептан, изопропанол.

ХОД РАБОТЫ. К 0,2 мл сыворотки крови (в контроле – 0,2 мл H₂O) добавляют 4 мл смеси гептан : изопропанол (1:1) и встряхивают 10–15 мин на лабораторном встряхивателе. Экстракцию удобно проводить в высоких пробирках (18–20 см) во избежание потери гептановой фазы, что может привести к завышению результатов. Для расслоения смеси добавляют 0,4 мл концентрированной HCl. Для устранения мутности из-за преципитированного белка желательно центрифугировать пробы в течение 10 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования проб и расслоения фаз отбирают верхний гептановый слой и измеряют интенсивность поглощения опытных проб против контроля при длине волны 233 нм (ультрафиолетовый диапазон).

РАСЧЁТ. Результат анализа представляют в относительных единицах оптической плотности с пересчётом на 1 мл сыворотки крови. Расчёт производят по формуле:

$$A_{233 \text{ на } 1 \text{ мл плазмы}} = A_{233} \cdot V_{\text{Э}} : V_{\text{ПЛ}} = (A_{233} \cdot 4) : 0,2 = A_{233} \cdot 206$$

где: $V_{\text{Э}}$ – конечный объём гептан-изопропанолового экстракта (4,0 мл); $V_{\text{ПЛ}}$ – объём сыворотки крови (0,2 мл); D_{233} – оптическая плотность гептан-изопропанолового экстракта, измеренная при длине волны

233 нм. Провести расчет можно, исходя из величины молярного коэффициента экстинкции для сопряженных диенов при 233 нм: $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Работа №2. Приготовление липосом.

Липосомы для использования в модельных системах готовятся инъекционным способом. Для этого в 5 мл дистиллированной воды или соответствующего буферного раствора при постоянном интенсивном перемешивании шприцом с тонкой иглой быстро впрыскивали 0,25 мл раствора фосфолипида необходимой концентрации. Конечная концентрация фосфолипида в суспензии липосом в большинстве экспериментов составляла 2,38 мг/мл.

Гидрофильные исследуемые вещества добавляются до нужной концентрации к этанольному раствору фосфолипидов перед приготовлением липосом.

Липофильные исследуемые вещества добавляют до нужной концентрации к этанольному раствору фосфолипидов перед приготовлением липосом.

Липосомы подвергали спонтанному и индуцированному окислению при температуре 37°C.

Работа №3. Определение концентрации карбонильных соединений с использованием N-(2,4-динитрофенил)гидразина.

Концентрацию карбонильных соединений в суспензии липосом определяли оригинальным методом. Для этого к 0,05 мл суспензии липосом добавляют 0,2 мл реактива А. через 10 минут к реакционной смеси прибавляют 1 мл 0,75 М NaOH. Еще через 10 минут оптическую плотность реакционной смеси измеряют при длине волны 460 нм против соответствующим образом обработанной контрольной пробы (воды).

Реактив А. 5 мМ раствор N-(2,4-динитрофенил) гидразина (ДНФГ) в 1,9 М HCl. Для приготовления реактива требуемое количество ДНФГ суспендировали в концентрированной HCl. Через 30-60 сек к суспензии медленно при интенсивном перемешивании добавляли дистиллированную

воду до получения требуемой концентрации HCl . Реактив готовят за 30-40 минут до проведения анализа.

Объекты для исследования: сыворотка крови, фосфолипиды.

Оборудование: Водяная баня, центрифуга со скоростью 6000 об./мин, колориметр КФК-3 или спектрофотометр.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Описать реакции перекисного окисления липидов.
2. Охарактеризовать определение содержания ТБК-реактивных продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови.
3. Описать определение содержания диеновых конъюгатов гидроперекисей липидов в сыворотке крови.
4. Описать значение ПОЛ в норме и при патологии.
5. Охарактеризовать окислительные процессы, происходящие в клетке в норме и при патологии.
6. Дать определение окислительному стрессу. При каких условиях возникает окислительный стресс в клетке?
7. Дать характеристику механизмам активации ПОЛ, приводящие к повреждению клетки?
8. Какие соединения являются инициаторами ПОЛ?
9. Охарактеризовать АФК (какие химические соединения относятся к АФК и их роль в клетке?).
10. АФК и повреждение мембран.
11. АФК и повреждение ДНК.

12. АФК и модификация белков (ферментов).
13. Охарактеризовать взаимосвязь окислительного стресса и апоптоза.
14. Дать характеристику Шиффовым основаниям.
15. Дать характеристику диеновым и триеновым конъюгатам (образование и регистрации данных соединений).

Занятие №9

Тема: Методы идентификации и количественного определения продуктов окислительного повреждения аминокислот, пептидов и белков в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных

системах.

Цель: изучить механизмы окислительной модификации белков и методы определения продуктов окислительной модификации белков.

Перечень практических навыков:

Знать:

- методы идентификации и количественного определения продуктов окислительного повреждения аминокислот, пептидов и белков в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах;
- механизмы окислительной модификации белков;
- методы обнаружения функциональных нарушений белков, вызываемых реакциями свободнорадикального окисления, в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах.

Уметь:

- определение окислительной модификации белков плазмы крови по уровню карбонильных производных, регистрируемых с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидразином;
- определение окислительной модификации мембранных белков эритроцитов.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Каковы механизмы окислительной модификации белков?
2. Каково образование углеродных радикалов, локализованных в глубине белковой молекулы?
3. Каково образование радикалов азота белковой молекулы?
4. Каково образование тиольных радикалов белковой молекулы?
4. Каково образование радикалов кольцевых остатков аминокислот?
5. Охарактеризуйте металл-катализируемое окисление белков?
6. Как происходит образование гидропероксидов белков?
7. Охарактеризуйте методику определения окислительной модификации белков плазмы крови по уровню карбонильных

производных, регистрируемых с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидразином.

8. Охарактеризуйте методику определения окислительной модификации мембранных белков эритроцитов.

9. Охарактеризуйте методику определения окислительной модификации белков в тканях.

10. Охарактеризуйте методику определения окисляемости белков сыворотки и плазмы крови.

11. Охарактеризуйте методику определения железо-зависимого образования битирозина и окисления триптофана в белках.

В ходе разбора материала темы со студентами преподаватель на то, что белки в силу особенностей своего строения являются одними из основных ловушек АФК, которые образуются в процессе действия ионизирующей радиации, фотохимических воздействий, металл-зависимого окисления или как продукт ряда окислительно-восстановительных реакций ферментативной и неферментативной природы. Преподаватель выясняет, есть ли отсутствующие, обращает внимание на форму одежды студентов, сообщает цели занятия, интересуется посещаемостью лекций. Студенты каждый самостоятельно выполняют практическую работу и заполняют таблицы. Преподаватель контролирует и корректирует работу студентов, чтобы научить их необходимым практическим навыкам. Результаты работы оформляются протоколом.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Определение окислительной модификации белков плазмы крови по уровню карбонильных производных, регистрируемых с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидразином.

Принцип метода. В результате окисления белков под действием свободных радикалов кислорода образуются альдегидные и кетонные группировки аминокислотных остатков (карбонильные группы), которые взаимодействуют с 2,4-ДНФГ с образованием производных 2,4-

динитрофенилгидразона. Образующиеся 2,4-динитрофенилгидразоны имеют максимум поглощения около 370 нм.

Реактивы и их приготовление. Все реактивы готовят на бидистиллированной воде.

1. 0,067 М раствор KH_2PO_4 . В мерной колбе на 100 мл в воде растворяют 0,907 г KH_2PO_4 .

2. 0,067 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. В мерной колбе емкостью 100 мл в воде растворяют 11,866 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

3. 0,067 М фосфатный буфер (рН 7,4). 18,2 мл 0,067 М раствора KH_2PO_4 смешивают с 81,8 мл 0,067 М раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Проверяют рН на рН-метре.

4. 1 мМ раствор сульфата железа (II). 5,6 мг сульфата железа растворяют в 10 мл воды. Готовят перед опытом.

5. 1 мМ раствор ЭДТА. 6,4 мг ЭДТА растворяют в 10 мл воды.

6. 0,1 мМ раствор перекиси водорода. Готовят после установления исходной концентрации перекиси водорода путем титрования.

7. 20 %-ный раствор ТХУ.

8. 10 мМ раствор 2,4-ДНФГ. 200 мг 2,4-ДНФГ растворяют при нагревании на водяной бане в 100 мл 2 н. соляной кислоты. Раствор хранят в темной склянке при комнатной температуре в течение 1 месяца.

9. 2 н. раствор соляной кислоты. Готовят из фиксанала.

10. 8 М раствор мочевины. В мерной колбе на 50 мл растворяют в воде 24 г мочевины.

11. Этилацетат.

12. 96 %-ный этиловый спирт.

13. 0,9 %-ный раствор хлорида натрия.

Ход определения. Исследуют исходный уровень окисления белков, а также интенсивность этого процесса в инкубируемых пробах в отсутствие прооксидантов (спонтанный процесс) и в присутствии $\text{Fe}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$.

1. *Определение исходного уровня окисления белков.* В опытную пробирку вносят 0,05 мл неразведенной плазмы, 0,95 мл 0,067 М фосфатного буфера (рН 7,4), 1,0 мл 10 мМ 2,4-ДНФГ и 1,0 мл 20 %-ного раствора ТХУ. Контрольная проба содержит все указанные компоненты, но вместо 2,4-ДНФГ вносят такое же количество 2 н. соляной кислоты.

2. *Определение уровня спонтанного окисления белков.* В опытную и контрольную пробирки вносят 0,05 мл в 6 раз разведенной физраствором плазмы, 0,95 мл 0,067 М фосфатного буфера (рН 7,4). Пробы инкубируют 15 мин при 37 °С. По истечении времени в опытную пробу добавляют 1,0 мл 10 мМ раствора 2,4-ДНФГ и 1 мл 20 %-ного раствора ТХУ. В контрольную пробу вместо 2,4-ДНФГ вносят такой же объем 2 н. соляной кислоты.

3. *Определение уровня Fe-зависимого окисления белков.* В опытную и контрольную пробирки вносят 0,75 мл 0,067 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,05 мл 6 раз разведенной плазмы, 0,1 мл смеси 1 мМ ЭДТА и 1 мМ сульфата железа (1:1, готовят перед опытом) и 0,1 мл 0,1 мМ H_2O_2 . Пробы инкубируют 15 мин при 37 °С. Затем в опытную пробирку добавляют 1,0 мл 10 мМ 2,4-ДНФГ и 1,0 мл 20 %-ного раствора ТХУ. В контрольную пробу вместо 2,4-ДНФГ вносят такой же объем 2 н. соляной кислоты.

Все пробы после добавления ТХУ оставляют на 1 ч при комнатной температуре, периодически перемешивая. По истечении времени пробы центрифугируют при 3000 об./мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок промывают 2 раза 4 мл смеси этилацетат – этиловый спирт (1:1). Промытые осадки белков высушивают либо в сушильном шкафу при 40 °С, либо помещением проб в холодильник на ночь без крышек. Высушенные осадки растворяют в 8 М растворе мочевины. Для чего к осадкам добавляют 3 мл 8 М раствора мочевины и по 1 капле 2 н. соляной кислоты. Пробы перемешивают и оставляют на 30 мин. Оптическую плотность пробы (E_{on}) измеряют на спектрофотометре в кюветах с толщиной слоя жидкости 1 см при длине волны 370 нм против контрольной пробы (E_k).

Содержание карбонильных групп (нмольфенилгидразонов/мг белка) рассчитывают, используя коэффициент молярной экстинкции, равный 22000 моль⁻¹·см⁻¹ для ДНФГ-производных, по формуле:

$$x = \frac{(\Delta E) \cdot V \cdot 10^6}{22000 \cdot c},$$

где $\Delta E = E_{on} - E_k$; V – конечный объем пробы (3 мл); C – содержание белка в пробе, мг; 10^6 – коэффициент пересчета на нмоли.

Вывод:

Работа №2. Определение окислительной модификации мембранных белков эритроцитов.

Отбор проб и их хранение. В опытах используют суспензию мембран эритроцитов.

Реактивы и их приготовление.

1. 1 мМ раствор сульфата железа (II).
2. 1 мМ раствор ЭДТА.
3. 0,1 мМ раствор перекиси водорода.
4. 20 %-ный раствор ТХУ.
5. 10 %-ный раствор ТХУ.
6. 0,1 н. раствор гидроксида натрия.
7. 10 мМ раствор 2,4-ДНФГ.
8. 2 н. раствор соляной кислоты.
9. 6 М раствор гуанидингидрохлорида.
10. Этилацетат.
11. 96 %-ный этиловый спирт.

12. Реактивы для определения белка по методу Лоури.

Все реактивы готовят на бидистиллированной воде.

Ход определения. Исследуют исходное содержание карбонильных групп в мембранных белках эритроцитов, а также интенсивность этого процесса в инкубируемых пробах в присутствии $\text{Fe}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$.

Пробы предварительно осаждают 20 %-ным раствором ТХУ и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают, и осадок мембранных белков растворяют в 0,1 мл 0,1 н. NaOH в течение 5 минут.

При определении исходного уровня карбонильных групп белков в опытную пробирку вносят суспендированный осадок мембран эритроцитов, содержащий примерно 0,33 мг белка, 1 мл 10 мМ 2,4-ДНФГ и 1 мл 20 %-го раствора ТХУ. В контрольную пробирку вносят те же компоненты, кроме 2,4-ДНФГ, вместо него вносили 1 мл 2 н. HCl.

При определении карбонильных групп белков, стимулированных системой $\text{Fe}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$, в пробирку вносят суспендированный осадок мембран эритроцитов, содержащий примерно 0,33 мг белка, 0,1 мл смеси 1 мМ ЭДТА и 1 мМ сульфата железа (1:1, готовят перед опытом) и 0,1 мл 0,1 мМ H_2O_2 . Пробы инкубируют 15 мин при 37 °С. Затем в опытную пробирку добавляют 1 мл 10 мМ 2,4-ДНФГ и 1 мл 20 %-ного раствора ТХУ. В контрольную пробирку вместо 2,4-ДНФГ вносят такой же объем 2 н. соляной кислоты.

Все пробы после добавления ТХУ оставляют на 1 час при комнатной температуре, перемешивая каждые 15 мин. По истечении времени пробы центрифугируют при 3000 об./мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадки промывают 2 раза – 4 мл смеси этилацетат-этиловый спирт (1:1) и 1 раз 4 мл 10 %-ного раствора ТХУ для отмывания белков от несвязавшегося ДНФГ и липидов.

Промытые осадки высушивают либо в сушильном шкафу при 40 °С, либо помещением пробирок в холодильник на ночь без крышек.

Высушенные осадки растворяют в 3 мл 6 М раствора гуанидингидрохлорида. Пробы перемешивают и оставляют на 30 минут. Содержание белка в контрольной пробе определяют спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Уровень карбонильных групп, измеренный по поглощению при 370 нм против контрольной пробы, рассчитывают, используя коэффициент молярной экстинкции, равный $22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для ДНФГ-производных.

$$x = \frac{(\Delta E) \cdot 10^6}{22000 \cdot c}$$

где X – содержание фенилгидразонов в нмолях на 1 мг белка; C – содержание белка в пробе, мг; 10^6 – коэффициент пересчета на нмоли.

Объекты для исследования: плазма крови, суспензия мембран эритроцитов.

Аппаратура: низкоскоростная центрифуга с охлаждением, термостат, спектрофотометр.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

6. Изобразите схематически окислительную деструкцию белков.
2. Изобразите схематически образование углеродных радикалов, локализованных в глубине белковой молекулы.
3. Изобразите схематически образование радикалов азота белковой молекулы?
4. Изобразите схематически тиольных радикалов белковой молекулы?

5. Изобразите схематически образование радикалов кольцевых остатков аминокислот?
6. Охарактеризуйте металл-катализируемое окисление белков?
7. Как происходит образование гидропероксидов белков?

Занятие №10

Тема: Методы идентификации и количественного определения продуктов окислительной модификации нуклеотидов и нуклеиновых кислот в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в

модельных системах.

Цель: изучить методы идентификации и количественного определения продуктов окислительной модификации нуклеотидов и нуклеиновых кислот в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах. Выявить основные методы обнаружения нарушений наследственной информации и её реализации, вызываемых реакциями свободнорадикального окисления, в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах. Изучить оценку степени поврежденности ДНК клеток методом электрофореза единичных клеток.

Перечень практических навыков:

Знать:

- методы идентификации и количественного определения продуктов окислительной модификации нуклеотидов и нуклеиновых кислот в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах;
- методы обнаружения нарушений наследственной информации и её реализации, вызываемых реакциями свободнорадикального окисления, в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах.

Уметь:

- оценивать степень поврежденности ДНК клеток методом электрофореза единичных клеток.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Методы идентификации и количественного определения продуктов окислительной модификации нуклеотидов и нуклеиновых кислот в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах.

2. Методы обнаружения нарушений наследственной информации и её реализации, вызываемых реакциями свободнорадикального окисления, в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных

системах.

3. Оценка степени поврежденности ДНК клеток методом электрофореза единичных клеток.

В ходе разбора материала темы со студентами преподаватель обращает внимание на продукты окисления ДНК и РНК. Останавливается и детально разбирает методы обнаружения нарушений наследственной информации и значение их для диагностики наследственных заболеваний.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Опишите метод оценки поврежденности ДНК методом электрофореза единичных клеток.

Таблица №1.

Метод оценки поврежденности ДНК методом электрофореза единичных клеток.

Принцип метода	Оборудование, материалы и реактивы
Область применения:	

Работа №2. Подготовка рефератов по тема:

1. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*.
2. Наследственные патологии, связанные с окислительным повреждением ДНК.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Опишите метод электрофореза ДНК.
2. Какие повреждения могут возникнуть при воздействии на ДНК свободных радикалов?
3. Напишите реакцию окисления ДНК свободным радикалом.

Занятие №11

Тема: Механизмы окислительного повреждения углеводов.

Цель: изучить механизмы окислительного повреждения углеводов, окислительную модификацию продуктов неферментативного гликозилирования белков, деградацию полисахаридов под

действием активных форм кислорода, токсические эффекты продуктов окисления углеводов, механизмы окислительного повреждения низкомолекулярных регуляторов, витаминов и коферментов, методы идентификации и количественного определения продуктов окислительного повреждения низкомолекулярных метаболитов и биологически активных соединений в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах, количественное определение продуктов окислительного распада углеводов в дезоксирибозном тесте.

Место проведения: учебная аудитория кафедры биологической химии.

Трудоёмкость: 3 часа

Перечень практических навыков:

Знать:

- механизмы окислительного повреждения углеводов;
- окислительную модификацию продуктов неферментативного гликозилирования белков;
- деградацию полисахаридов под действием активных форм кислорода, токсические эффекты продуктов окисления углеводов, механизмы окислительного повреждения низкомолекулярных регуляторов, витаминов и коферментов;
- методы идентификации и количественного определения продуктов окислительного повреждения низкомолекулярных метаболитов и биологически активных соединений в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах,
- количественное определение продуктов окислительного распада углеводов в дезоксирибозном тесте.

Уметь:

- проводить амперометрически определение низкомолекулярных и белковых сульфгидрильных групп в крови.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Механизмы окислительного повреждения углеводов.

2. Окислительная модификацию продуктов неферментативного гликозилирования белков.

3. Деградация полисахаридов под действием активных форм кислорода, токсические эффекты продуктов окисления углеводов, механизмы окислительного повреждения низкомолекулярных регуляторов, витаминов и коферментов.

4. Методы идентификации и количественного определения продуктов окислительного повреждения низкомолекулярных метаболитов и биологически активных соединений в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах.

5. Количественное определение продуктов окислительного распада углеводов в дезоксирибозном тесте.

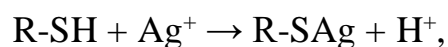
В ходе разбора материала темы со студентами преподаватель обращает внимание, что в процессе эволюции многоклеточные организмы научились использовать уникальные свойства АКМ в качестве эффективного механизма внутри- и межклеточной коммуникации. Преподаватель объясняет ход практической работы занятия, выясняет количество отсутствующих и выясняет общий уровень подготовки студентов.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Амперометрический метод определения низкомолекулярных и белковых сульфгидрильных групп в крови.

Для определения различных типов SH-групп в крови, белках мембран эритроцитов и синаптосомиспользовали амперометрический метод титрования. Этот метод является одним из видов электрометрического объемного анализа. В своих исследованиях мы использовали методику, разработанную профессором В.В. Соколовским на аппарате, сконструированном в лаборатории кафедры биохимии Дагестанского государственного университета.

Принцип метода. При титровании растворов, содержащих тиоловые соединения, азотнокислым серебром ионы серебра связываются с SH-группами с образованием меркаптида по уравнению



где R-SH – соединения, содержащие сульфгидрильные группы; R-SAg – меркаптиды серебра. По достижении конечной точки титрования (когда все SH-группы оказываются блокированными) в растворе появляется избыток ионов серебра. При этом в электрическом элементе, состоящем из погруженных в титруемый раствор платинового индикаторного электрода и электрода сравнения, возникает диффузионный ток, пропорциональный концентрации ионов серебра и измеряемый с помощью миллиамперметра. Содержание SH-групп в исследуемом растворе эквивалентно количеству раствора азотнокислого серебра, затраченного на титрование. Чувствительность метода составляет 0,1–1,0 мкмоль SH-групп.

Данным методом определяются свободные и вяло реагирующие сульфгидрильные группы нативных белков. Замаскированные сульфгидрильные группы белков определяются только после их денатурации.

Реактивы и их приготовление.

1. 0,2 М водный раствор аммиака. 28 мл концентрированного раствора аммиака с плотностью 0,9 г/см³ доводят дистиллированной водой до 1 л.

2. 0,2 М раствор азотнокислого аммония. 16 г азотнокислого аммония растворяют в дистиллированной воде, и объем доводят до 1 л.

3. 0,1 М аммиачный буфер (рН 9,2). Для приготовления буфера 0,2 М раствор аммиака смешивают с 0,2 М раствором азотнокислого аммония в отношении 1:1. В день опыта буфер разводят 10-кратно.

4. Насыщенный раствор хлорида калия. 30 г соли растворяют в дистиллированной воде, и объем доводят до 100 мл.

5. 30 %-ный раствор азотнокислого аммония.

6. Гель для заполнения электрического мостика. При нагревании на водяной бане растворяют 3 г агар-агара в 100 мл насыщенного раствора хлорида калия (азотнокислого аммония).

7. Раствор электролита для электрода сравнения. 4,2 г йодида калия, и 1,3 г йодистой ртути растворяют в насыщенном растворе хлорида калия, и объем доводят до 100 мл. Во избежание подскока напряжения в цепи раствор электролита электрода сравнения следует ежемесячно заменять свежим.

8. Ртуть металлическая. Очистка ртути осуществляется следующим образом: ртуть промывают разбавленной азотной кислотой (разведенной дистиллированной водой в отношении 1:1), затем многократно промывают дистиллированной водой и фильтруют через плотную ткань. *Все работы с ртутью производят под тягой в приспособленном для этого помещении.*

9. 0,001 н. водный раствор азотнокислого серебра.

10. 1 %-ный раствор додецилсульфата натрия.

11. 6 %-ный раствор сульфосалициловой кислоты.

12. Реактивы для определения белка по Лоури.

13. Растворы для выделения мембран эритроцитов.

Ход определения. Плазма крови. Для определения суммарного (содержания как в белках, так и низкомолекулярных соединениях) количества SH-групп к 0,2 мл плазмы добавляют 1 мл 1 %-ного раствора додецилсульфата натрия и выдерживают 5 мин при 37 °С, периодически перемешивая. Затем общий объем пробы доводят аммиачным буфером до 20 мл и титруют.

При определении содержания тиоловых групп низкомолекулярных соединений к 0,5 мл плазмы добавляют 0,7 мл дистиллированной воды и 0,8 мл 6 %-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Через 10 мин белки осаждают центрифугированием при 4000 об./мин в течение 10 мин. Из надосадочной жидкости отбирают 1 мл и к нему добавляют 19 мл аммиачного буфера для титрования.

Гемолизат. К 0,5 мл трижды отмытых эритроцитов добавляют 9,5 мл холодной бидистиллированной воды и оставляют на 10 мин на холоде для гемолиза. Неразрушенные клетки и стромы эритроцитов осаждают при 10000 об./мин в течение 20 мин. Для определения суммарного количества SH-групп из верхнего слоя жидкости (гемолизата) отбирают 0,1 мл и вносят в сосуд для титрования, содержащий 19,9 мл аммиачного буфера.

Для определения количества низкомолекулярных тиоловых соединений к 1 мл гемолизата добавляют 0,8 мл 6 %-ного раствора сульфосалициловой кислоты. После осаждения белков 1 мл надосадочной жидкости используют для титрования.

Как в плазме, так и в гемолизате количество белковых SH-групп рассчитывают по разности между содержанием суммарных SH-групп и SH-групп низкомолекулярных тиоловых соединений.

Мембраны эритроцитов. В белках мембран эритроцитов общее количество свободных SH-групп складывается из поверхностных (легкодоступных) и скрытых (труднодоступных).

При определении суммарного количества SH-групп белков мембран эритроцитов 0,2 мл суспензии мембран солибилизируют в 1 мл 1 %-ного раствора додецилсульфата натрия (5 мин при 37 °С). Затем общий объем среды аммиачным буфером доводят до 20 мл и титруют.

Измерение количества поверхностных SH-групп мембранных белков проводят в 0,4 мл исходной суспензии.

По разности между содержанием общих и поверхностных SH-групп рассчитывают количество скрытых сульфгидрильных групп белков.

Порядок титрования. Для титрования собирают установку по схеме (рис. 14). В нерабочем состоянии платиновый электрод погружен в стаканчик с дистиллированной водой, конец агарового мостика электрода сравнения погружен в насыщенный раствор азотнокислого аммония.

При анализе в стаканчик с образцом и буфером опускают электрод, агаровый мостик, остеклованный цилиндр для перемешивания. Включают

магнитную мешалку. После того как показание измерительного прибора будет стабильным, начинают титрование, добавляя по 0,05 мл 0,001 н. раствора азотнокислого серебра и отмечая показания прибора.

Для определения результатов титрования строят график, откладывая на оси ординат показания величин тока, а на оси абсцисс – соответствующие им объемы добавленного раствора азотнокислого серебра.

Содержание SH-групп, эквивалентное количеству затраченного на титрование раствора азотнокислого серебра, вычисляют, исходя из расчета, что 1 мл 0,001 н. раствора азотнокислого серебра эквивалентен 1 мкмолью SH-групп (или 0,033 мг SH-групп).

Содержание сульфгидрильных групп в плазме крови выражают в мкмольях на 100 мл, а в гемолизате – в мкмольях на 100 мл упакованных эритроцитов:

$$C = \frac{V_T \cdot m \cdot 100}{V_{np}},$$

где C – количество SH-групп в мкмольях на 100 мл; V_T – объем 0,001 н. раствора азотнокислого серебра, соответствующий эквивалентной точке; m – разведение пробы; 100 – коэффициент пересчета на 100 мл; V_{np} – объем пробы, взятой на титрование.

Количество SH-групп в белках мембран эритроцитов выражают в мкмольях SH-групп на 1 мг белка. Белок определяют по методу Лоури.

Работа №2. Определение активности ксантиноксидазы в печени.

Принцип метода. Метод определения активности ксантиноксидазы основан на способности фермента при преобразовании ксантина в мочевую кислоту генерировать супероксид-анион радикал, о содержании которого можно судить по скорости восстановления нитросинего тетразолия в окрашенный продукт – формазан, имеющий максимум поглощения при длине волны 540 нм.

Реактивы и их приготовление.

1. 0,05 М натрий-фосфатный буфер с 1 мМЭДТА, pH 7,8.

2. Субстратная смесь: к 100 мл буфера добавляют 680 мкг (50 мкМ) гипоксантина, 460 мкг (15 мкМ) феназинметасульфата, 5,71 мг (420 мкМ) нитросинего тетразолия, 140 мг желатина. Раствор готовят перед исследованием либо хранят в замороженном виде.

Ход определения. 3 мл субстратной смеси прогревают в течение 5 мин в кювете спектрофотометра при температуре 37°C. Реакцию запускают добавлением 100 мкл цитозольной фракции ткани печени, полученной при дифференциальном центрифугировании. Регистрируют скорость увеличения оптической плотности пробы в течение 10 мин при длине волны 540 нм и температуре инкубации 37 °С в кювете с длиной оптического пути 10 мм против инкубационной среды равного объема, куда вместо пробы добавляют дистиллированную воду.

Расчет производят с учетом коэффициента молярной экстинкции формазана, равного $7,2 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Работа №3. Подготовка рефератов по тема:

1. Продукты окислительной модификации углеводов.
2. Свободно-радикальное окисление углеводов при диабете.

Объекты для исследования: плазма крови.

Оборудование.

1. Милливольтмиллиамперметр М-198/1 с ценой деления 10^{-8}A или вольтамперметр универсальный В7-21А, В7-4Б и др.

2. Платиновый индикаторный электрод. Это стеклянная трубка длиной 100–150 мм, в нижний конец которой впаяна платиновая проволока так, чтобы снаружи находилась часть проволоки длиной 5–8 мм. Трубку заполняют металлической ртутью, в которую свободно погружен конец проводника (стальная проволока; $d = 0,5$ мм), связывающего электрод с амперметром.

3. Электрод сравнения. Электродом служит слой ртути, залитый в специальный сосуд (рис. 14). Над ртутью находится раствор электролита (йодид калия и йодид ртути в насыщенном растворе хлорида калия). В раствор

электролита опускают проводник, связывающий электрод сравнения с амперметром, и один конец солевого мостика, представляющего собой U-образную стеклянную трубку, заполненную агаровым гелем, приготовленным на насыщенном растворе хлорида калия. Другой конец солевого мостика электрода сравнения опускают в ячейку с насыщенным раствором нитрата аммония. В эту же ячейку опускают вторую U-образную стеклянную трубку с агаровым гелем, приготовленным на насыщенном растворе нитрата аммония. Другой конец этого солевого мостика опускают в ячейку для титрования.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Опишите принцип определения амперометрического определения сульфгидрильных групп.
2. Опишите принцип определения ксантиоксидазы в печени.
3. Назовите основные продукты окисления углеводов.

Занятие №12

Тема: Способы регуляции и контроля уровня продукции активных форм кислорода внутри и снаружи клеток.

Цель: изучить способы регуляции и контроля уровня продукции активных форм кислорода внутри и снаружи клеток, механизмы регуляции продукции активных форм кислорода в органеллах и цитозоле клеток в ферментативных реакциях, определить количественное определение активности

супероксиддисмутазы в биологических образцах.

Место проведения: учебная аудитория кафедры биологической химии.

Трудоёмкость: 3 часа

Перечень практических навыков:

Знать:

- изучить способы регуляции и контроля уровня продукции активных форм кислорода внутри и снаружи клеток;
- механизмы регуляции продукции активных форм кислорода в органеллах и цитозоле клеток в ферментативных реакциях.

Уметь:

- определить количественное определение активности супероксиддисмутазы в биологических образцах.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Способы регуляции и контроля уровня продукции активных форм кислорода внутри и снаружи клеток.
2. Механизмы регуляции продукции активных форм кислорода в органеллах и цитозоле клеток в ферментативных реакциях, определить количественное определение активности супероксиддисмутазы в биологических образцах.

Преподаватель выясняет, есть ли отсутствующие, обращает внимание на форму одежды студентов, сообщает цели занятия, интересуется посещаемостью лекций. Студенты каждый самостоятельно выполняют практическую работу и заполняют таблицы. Преподаватель контролирует и корректирует работу студентов, чтобы научить их необходимым практическим навыкам. Результаты работы оформляются протоколом.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Определение активности супероксиддисмутазы в эритроцитах.

Принцип метода. Метод основан на способности СОД ингибировать процесс

восстановления тетразолиевого нитросинего (ТНС) в условиях генерации супероксидного анион-радикала.

Отбор проб и их хранение. Кровь собирают в пробирку с гепарином (200 ед./мл) и центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10 мин. Плазму отбирают и хранят на холоде, а эритроциты трижды отмывают физраствором. Отмытые эритроциты гемолизируют. Для этого к 0,3 мл упакованных эритроцитов с помощью пипетки сильной струей приливают 2,7 мл охлажденной бидистиллированной воды. Суспензию периодически встряхивают в течение 5 мин, а затем центрифугируют при 14000 об./мин в течение 20 мин для осаждения стром клеток. Полученный 10 %-ный гемолизат разбавляют до 1 % (0,1 мл гемолизата + 0,9 мл воды). Из разбавленного гемолизата отбирают аликвоту для анализа содержания гемоглобина.

Реактивы и их приготовление. При приготовлении реактивов используют бидистиллированную воду.

1. 0,067 М раствор KH_2PO_4 . В мерной колбе на 1000 мл в дистиллированной воде растворяют 0,907 г KH_2PO_4 .

2. 0,067 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. В мерной колбе на 1000 мл в дистиллированной воде растворяют 11,866 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

3. 0,067 М фосфатный буфер (рН 7,8). 36 мл 0,067 М раствора KH_2PO_4 смешивают с 964 мл 0,067 М раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Проверяют рН на рН-метре.

4. 26,9 мкМ раствор ЭДТА. 10 мг динатриевой соли ЭДТА растворяют в 100 мл воды. Перед работой исходный раствор разбавляют в 10 раз.

5. 4,04 мМ раствор тетразолиевого нитросинего. 33 мг ТНС растворяют в 10 мл фосфатного буфера. Готовят перед опытом, хранят в темноте на холоде.

6. 65 мкМ раствор феназинметасульфата (ФМС). 2 мг реактива растворяют в 100 мл фосфатного буфера. Хранят в темноте не более недели. В замороженном состоянии в темноте хранится несколько месяцев.

7. 1 мМ раствор НАД·Н. 7,63 мг реактива растворяют в 10 мл фосфатного буфера. Готовят перед опытом и хранят на холоде.

8. 0,9 %-ный раствор хлорида натрия.

9. 96 %-ный этиловый спирт.

10. Желатин.

11. Реактивы для определения гемоглобина аммиачным методом.

12. Реактивы для определения белка по методу Лоури.

Необходимо предварительно определить содержание НАДН в сухих коммерческих препаратах реактива по методу Butler. С этой целью вначале измеряют оптическую плотность растворатрис-ЭДТА без НАДН, а затем добавляют раствор НАДН, содержащий 2 мг НАДН в 1 мл трис-ЭДТА буфера, и снова регистрируют оптическую плотность раствора при длине волны 340 нм. Концентрацию НАДН в мМ рассчитывают по формуле

$$c = \frac{E_0 - E_k}{0,311},$$

где E_0 – оптическая плотность с НАДН; E_k – оптическая плотность трис-ЭДТА буфера; 0,311 – коэффициент молярной экстинкции НАДН.

Ход определения. Для осаждения гемоглобина и частичной очистки СОД к 1 мл 1 %-ного гемолизата добавляют 0,3 мл 96 %-ного этанола и 0,15 мл хлороформа. Смесь перемешивают на магнитной мешалке на холоде 15 мин, затем столько же времени оставляют на холоде, время от времени встряхивая. Хлороформ-этаноловую смесь центрифугируют при 10000 об./мин в течение 15 мин. Отбирают верхний слой и используют в качестве источника фермента. Супернатант должен быть прозрачным или слегка опалесцирующим, без желтого оттенка.

Непосредственно перед определением активности фермента готовят инкубационную смесь следующего состава: 1 мл 26,9 мкМ ЭДТА, 1 мл 4,04 мМ ТНС, 1 мл 65 мкМ ФМС, 1 мг желатина, 26 мл 0,067 М фосфатного буфера (рН 7,8).

В пробирки разливают по 2,85 мл (в случае плазмы 2,7 мл) инкубационной смеси и прогревают их 5 мин при 25°С. Затем в инкубационную смесь добавляют по 0,05 мл супернатанта гемолизата (0,2–0,3 мл супернатанта плазмы) и 0,1 мл 1 мМ НАДН. В контрольную пробу вместо супернатанта вносят 0,1 мл фосфатного буфера. Инкубацию проводят в течение 10 мин в термостате при 25 °С в аэробных условиях в темноте. Реакцию останавливают освещением проб. Оптическую плотность проб измеряют при длине волны 540 нм в кювете с шириной оптического пути 5 мм против смеси, содержащей все компоненты инкубационной смеси, кроме НАДН.

Расчет активности фермента проводят следующим образом. Вначале определяют процент ингибирования восстановления ТНС (T , %) за счет СОД по отношению к контрольной пробе по формуле

$$T = \frac{E_k - E_{оп}}{E_k} * 100\%,$$

где E_k и $E_{оп}$ – экстинкции контрольной и опытной проб.

Колебания степени ингибирования ферментативной реакции должны находиться в пределах от 30 до 70 %. Если процент ингибирования за счет СОД выходит за указанные ограничения, необходимо изменять количество вносимого в инкубационную смесь фермента.

За одну условную единицу активности СОД принимают 50-процентное торможение процесса восстановления ТНС за время инкубации.

Активность фермента выражают в условных единицах на мг гемоглобина (мг белка, мл плазмы):

а) гемолизат:

$$A = \frac{20 * T\%}{(100 - T\%) * C}$$

где 20 – кратность разведения гемолизата; C – концентрация гемоглобина (мг) в 1 мл 1 %-ного гемолизата;

б) плазма:

$$A = \frac{T\%}{(100-T\%)*C}$$

где C – концентрация белка (мг) в пробе или эквивалентное количество плазмы (мл) в пробе.

Объекты для исследования: плазма и гемолизат крови.

Оборудование. Центрифуга с охлаждением, магнитная мешалка, термостат.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Описать принцип определения супероксиддисмутазы в плазме крови.
2. Как получить плазму крови?
3. Как получить гемолизат крови?

Занятие №13

Тема: Защита клеток от активных форм кислорода, образующихся внутри клетки.

Цель:изучить принципы и механизмы системы антиоксидантной защиты (ферментативной) клеток от активных форм кислорода.

Перечень практических навыков:

Знать:

- понятие «активные формы кислорода (или активированные кислородные метаболиты –АКМ);
- антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов;
- химическая природа биоантиокислителей;
- принципы (механизмы) антиоксидантного действия защиты клеток;
- специализированные системы защиты клеток от АКМ (ферментативные);
- антиоксидантное действие СОД;
- каталаза: строение, локализация и действие;
- семейство глутатионпероксидаз, обладающих антиоксидантным действием.

Уметь:

- определять активность каталазы в биологических образцах.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Что понимают под «активные кислородные метаболиты» АКМ?
2. Понятие «антиоксиданты и ингибиторы антирадикальных процессов»
3. Химическая природа антиокислителей: фенолы и полифенолы; ферменты, флавоноиды, стероидные гормоны и др.
4. Принципы (механизмы) антиоксидантного действия защиты клеток:
 - а) антиоксиданты косвенного действия;
 - б) антиоксиданты прямого действия.
5. Ферментативные специализированные системы защиты клеток от АКМ: СОД, каталаза, глутатионпероксидазы.
6. Характеристика антиоксидантного действия СОД.
7. Каталаза: строение, локализация и действие; сопряженное действие каталазы и СОД.
8. Семейство глутатионпероксидаз, обладающих антиоксидантным действием.

В ходе разбора материала темы со студентами преподаватель обращает внимание, что в процессе эволюции многоклеточные организмы научились использовать уникальные свойства АКМ не только для защиты от бактериальных агрессий, но и в качестве эффективного механизма внутри- и межклеточной коммуникации, являясь универсальными индукторами редокс-баланса в ответ на стрессовые воздействия совместно с продуктами свободно-радикальных процессов ПОЛ.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Количественное определение каталазы в крови по Баху и Зубковой.

Таблица №1

Принцип:

Пробы (в стаканч иках)	Разведе нная кровь 1: 1000	Ди ст. вод а	H ₂ O 2 1% раст вор	H ₂ S O ₄ 10% р-р	Экспоз иция	H ₂ O 2 1% раст вор	H ₂ S O ₄ 10% р-р	Кол-во 0,1 М р- раКМп O ₄ в мл, пошед шего на титров ание	Рассче т
									Катала зное число (КЧ)=(А- В)*1,7 = ? мг
Опыт	1 мл	7 мл	2 мл	-	30 мин. при	-	5 мл	В=?	

Контроль	1 мл	7 мл	-	5 мл	комн. темпер.	2 мл	-	A=?	
----------	------	------	---	------	---------------	------	---	-----	--

Вывод: _____

В норме каталазное число = 10-15

Работа №2. Подготовка реферата по теме:

1. Генетический контроль уровня внутриклеточных ферментативных антиоксидантов (каталазы и НАДФН-зависимой алкилгидропероксидредуктазы) факторами регуляции SoxR, SoxS и OxyR у *E. coli*.

Объекты для исследования: разведенная кровь 1:1000.

Аппаратура и посуда: автоматические пипетки, колбы конусовидные, бюретка для титрования, стаканчики химические, термостат.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия.

Вопросы итогового контроля:

1. Опишите принцип количественного определения каталазы..
2. Каково нормальное значение каталазного числа?
3. Назовите примеры природных антиоксидантов.
4. Охарактеризуйте строение каталазы.

Занятие №14

Тема: Глутатион-зависимые процессы антиоксидантной защиты.

Цель: Знать процессы свободно-радикального окисления, факторы антиоксидантной защиты клеток, классификацию антиоксидантов, антиоксидантные ферменты.

Перечень практических навыков:

Знать:

- процессы свободно-радикального окисления;
- факторы антиоксидантной защиты клеток;

- классификация антиоксидантов;
- антиоксидантные ферменты.

Уметь:

- определить количественно активность глутатионпероксидазы в биологических образцах;
- проанализировать результаты определений, дать диагностическую оценку этих показателей при патологических состояниях человека, оформить протокол и сформулировать выводы.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Определение понятия антиоксидант.
2. На какие группы по механизму действия делятся антиоксиданты.
3. Охарактеризовать группу «перехватчиков» органических радикалов – витамин Е (α -токоферол), убихинон (K_oQ), витамин С (аскорбиновую кислоту), β -каротин, глутатион.
4. Глутатион, как компонент антиоксидантной системы.
5. Значение глутатионпероксидазы в защите мембранных структур клетки.
6. Биохимический полиморфизм глутатионпероксидазы.
7. Значение глутатионредуктазы в восстановлении глутатиона окисленного.

Преподаватель выясняет, есть ли отсутствующие, обращает внимание на форму одежды студентов, сообщает цели занятия, интересуется посещаемостью лекций. Студенты каждый самостоятельно выполняют практическую работу и заполняют таблицы. Преподаватель контролирует и корректирует работу студентов, чтобы научить их необходимым практическим навыкам. Результаты работы оформляются протоколом.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Определение активности глутатионпероксидазы в крови.

Принцип метода: Метод определения активности фермента основан на определении величины убыли восстановленного глутатиона в среде инкубации при восстановлении гидроперекисей глутатионпероксидазой.

Реактивы.

1. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4 (6,8 г KH_2PO_4 растворяют в 500 мл воды, 11,4 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 500 мл воды. Полученные растворы смешивают под контролем рН-метра до получения необходимого значения рН).

2. 31,88 мМ раствор восстановленного глутатиона (24,3 мг восстановленного глутатиона, 14,5 мг азиды натрия и 27,7 мг ЭДТА- Na растворяют в 35 мл фосфатного буфера рН 7,4). Раствор готовится непосредственно перед проведением исследования).

3. 13,8 мМ раствор пероксида водорода (На титрацию 10 мл 13,8 мМ раствора пероксида водорода должно идти 6,96 мл 0,01 Н раствора KMnO_4 . По результатам титрования раствор пероксида водорода доводится водой до необходимой концентрации).

4. 10% раствор трихлоруксусной кислоты (10 г ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды).

5. 0,3 М фосфатный буфер, рН 8,0 (10,2 г KH_2PO_4 растворяют в 250 мл воды, 34,2 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 500 мл воды. Под контролем рН-метра растворы смешивают до получения необходимого значения рН).

6. 10,0 мМ раствор реактива Элмана (39,6 мг 5,5 дитиобис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта).

Ход определения.

1. В химическую пробирку наливают 0,5 мл крови и добавляют 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 10-15 минут для более полного гемолиза.

2. В химическую пробирку приливают 1 мл раствора глутатиона и прибавляют 1 мл гемолизата.

3. Переносят по 0,5 мл смеси в две центрифужные пробирки, помещают их в водяную баню при 37°C и инкубируют в течение 5 минут.

4. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора пероксида водорода, интенсивно встряхивают и оставляют в водяной бане.

5. Ровно через 1 минуту с момента добавления раствора пероксида водорода (по секундомеру) в опытную и контрольную пробирки приливают по 2 мл холодной 10% ТХУ. В контрольную пробирку только после этого добавляют 0,1 мл раствора пероксида водорода.

6. Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 минут в холодильник.

7. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин и 0-4°C.

8. По 0,5 мл надосадочной жидкости из контрольной и опытной пробирок переносят в химические пробирки и приливают по 10 мл фосфатного буфера, pH 8,0.

9. В обе пробирки прибавляют по 0,05 мл реактива Элмана и содержимое тщательно перемешивают.

10. Измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

11. Для определения скорости неферментативного окисления восстановленного глутатиона проводят исследование проб по п. п. 5.2.-5.10. в которые вместо гемолизата прибавляют 1 мл воды.

12. Расчет результатов.

Активность глутатионпероксидазы крови рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(E_0 - E_K) \times 10,55 \times 10^6 \times 166,4}{13100}$$

где

A - активность фермента в мкМ восстановленного глутатиона / (л > мин);

E₀ - оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при ферментативном окислении глутатиона;

Ек - оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при неферментативном окислении глутатиона по п. 5.11;

10,55 - конечный объем пробы, мл;

166,4 - фактор разведения;

106 - пересчет мМоль в мкМоль;

13100 - коэффициент молярной экстинкции ТНФА.

Объекты для исследования: гепаринизированная кровь.

Аппаратура и посуда: спектрофотометр, центрифуга рефрижераторная, баня водяная, секундомер, холодильник бытовой, весы аналитические, рН-метр, пипетки измерительные, пробирки химические и центрифужные, колбы мерные.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Работа студента на занятии оценивается по результатам собеседования при разборе темы, по активности на занятии, правильности выполнения самостоятельной работы.

Оценка за устный ответ выставляется в кафедральном журнале, а оценка самостоятельной работы проводится путем выставления зачета в рабочей тетради и оценки в кафедральном журнале.

Вопросы итогового контроля:

1. Каков принцип метода определения активности глутатионпероксидазы в крови?
2. Как рассчитывают активность глутатионпероксидазы в крови?
3. Каково диагностическое значение определения активности глутатионпероксидазы в крови?
4. Опишите ход определения активности глутатионпероксидазы в крови.

Занятие №15

Тема: Антиоксиданты прямого и косвенного действия.

Цель: Изучить антиоксиданты прямого и косвенного действия, классификацию антиоксидантов и их механизм действия. Знать характеристику антиоксидантов – донаторов атомов водорода. Уметь определять суммарную антиоксидантную активность в биологических

Перечень практических навыков:

Знать:

- антиоксиданты прямого и косвенного действия;
- основные понятия, определения и механизмы действия антиоксидантов;
- антиоксиданты, способные функционировать как доноры атома водорода;
- общую характеристику данного класса антиоксидантов.

Уметь:

- воспроизводить методы идентификации и количественного определения антирадикальной и суммарной антиоксидантной активности в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах;
- определять суммарную антирадикальную активность сыворотки крови.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Антиоксиданты прямого и косвенного действия.
8. Основные понятия, определения, механизмы действия.
9. Антиоксиданты, способные функционировать как доноры атома водорода.
10. Общая характеристика данного класса антиоксидантов.
11. Методы идентификации и количественного определения антирадикальной и суммарной антиоксидантной активности в биологических образцах, пробах из окружающей среды и в модельных системах.

Преподаватель выясняет, есть ли отсутствующие, обращает внимание на форму одежды студентов, сообщает цели занятия, интересуется посещаемостью лекций. Студенты каждый самостоятельно выполняют практическую работу и заполняют таблицы. Преподаватель контролирует и корректирует работу студентов, чтобы научить их необходимым практическим навыкам. Результаты работы оформляются протоколом.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Определение суммарной антиоксидантной активности на анализаторе антиоксидантной активности «Цвет Яуза-01-АА».

Принцип метода: В основе данной методики лежит амперометрический способ определения содержания антиоксидантов, заключающийся в

измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале и сравнении полученного сигнала с сигналом стандарта (кверцетина), измеренного в тех же условиях. В качестве стандартного вещества был использован рутин (кверцетин-3-рутинозид).



Рис. 2. Анализатор антиоксидантной активности «Цвет Яуза-01-АА»

На этом приборе, варьируя полярность и величины приложенных потенциалов, можно определять не только суммарную антиоксидантную активность, но и активность отдельных классов биологических соединений. Прибор включает в себя: емкость для растворителя; насос; дозатор, выполненный в виде многоходового крана; амперометрический детектор, состоящий из термостатируемой электрохимической ячейки со сменными рабочими электродами; усилитель тока; аналогоцифровой преобразователь (АЦП) и устройство регистрации выходного сигнала.

Прибор позволяет проводить прямые количественные измерения антиоксидантной активности (АОА) исследуемых проб, содержащих биологически активные соединения. Амперометрический детектор может работать в трех режимах: постоянном потенциале, импульсных потенциалах и при сканировании потенциалов во всем диапазоне.

Возникающие электрические токи очень малы (в пределах 10^{-6} - 10^{-9} А), эти аналоговые сигналы усиливаются, а затем с помощью АЦП преобразуются в цифровой сигнал, который регистрируется на дисплее компьютера. Сигнал регистрируется в виде дифференциальных выходных кривых. С помощью специального программного обеспечения производится расчет площадей или высот пиков анализируемого и стандартного веществ. В случае необходимости выходные результаты можно распечатать на принтере.

Рабочий электрод выполнен из стеклоуглерода, который наиболее универсален при определении полифенольных соединений. Потенциал может изменяться в пределах от +2,0 до -2,0 В, для построения калибровочного графика устанавливается значение +1,3 В.

В качестве элюента используется 2,2 мМ раствор H_3PO_4 , скорость подачи которого составляет $1,2 \text{ см}^3/\text{мин}$. Проводят по 5 последовательных измерений сигналов (площади выходной кривой) стандартных растворов кверцетина. За результат принимают среднее арифметическое значение из 5 измерений. По полученным данным строят калибровочный график в координатах: X – сигнал кверцетина (площадь выходной кривой); Y – концентрация кверцетина, $\text{мг}/\text{дм}^3$, описываемый уравнением: $Y = aX + b$. Далее рассмотрим последовательность расчета антиоксидантной активности. Основная формула для расчета антиоксидантной активности следующая:

$$CA = \frac{CA_{sp} \cdot V_{II} \cdot N}{m_{np} \cdot 1000},$$

где CA_{sp} – концентрация антиоксидантной активности по графику, $\text{мг}/\text{дм}^3$; V_{II} – объем раствора (экстракта) анализируемой пробы, см^3 ; N – разбавление анализируемого образца; m_{np} – навеска анализируемого вещества, г.

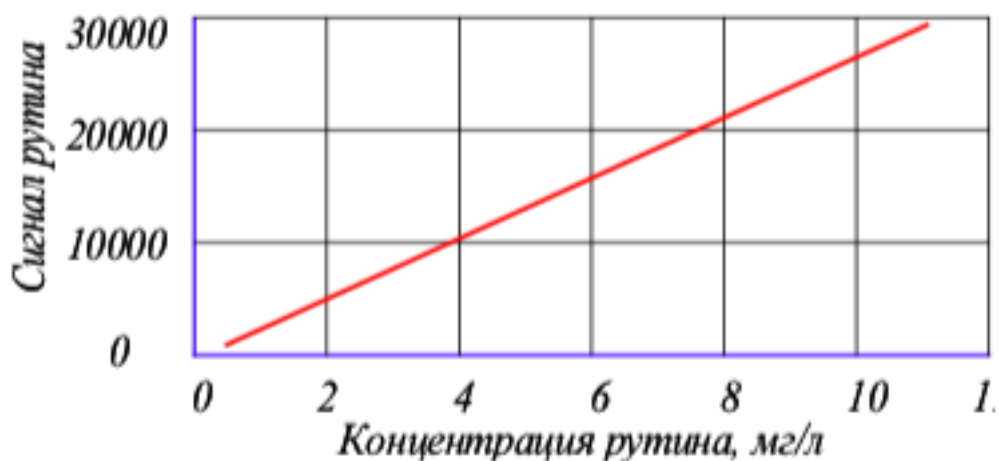


Рис. 4. Калибровочный график рутина.

Расчетное уравнение для определения концентрации антиоксидантной активности по графику:

$$CA_{cp} = S_{cp} \cdot 0,0029 + 0,2322, \quad (2)$$

где S_{cp} - площадь выходной кривой кверцетина (из показаний отчета).

Определим величину концентрации антиоксидантной активности по графику. Для этого подставим в формулу (2) величину S_{cp} , полученную из печатного отчета, выдаваемого прибором по окончании эксперимента.

Вывод:

Работа №2.Рефераты на темы:

1. Флавоноиды – как растительные антиоксиданты.
2. Методы измерения антиоксидантной активности.
3. Определение суммарной антирадикальной активности сыворотки крови.

Объекты для исследования: извлечения из растительных объектов..

Аппаратура и посуда:анализатор антиоксидантной активности «Цвет Яуза-01-АА», пипетки измерительные, пробирки химические, стаканчики, колбы мерные.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Работа студента на занятии оценивается по результатам собеседования при разборе темы, по активности на занятии, правильности выполнения самостоятельной работы.

Оценка за устный ответ выставляется в кафедральном журнале, а оценка самостоятельной работы проводится путем выставления зачета в рабочей тетради и оценки в кафедральном журнале.

Вопросы итогового контроля:

1. Опишите принцип работы анализатора.
2. Приведите примеры антиоксидантов природного происхождения.
3. Какие витамины обладают антиоксидантным действием?

Занятие №16

Тема: Глутатион. Структура, антиоксидантные свойства, биологическое значение, метаболизм в организме.

Цель: Изучить основные природные источники глутатиона, строение, физико-химические свойства глутатиона, функции глутатиона, биологическое значение глутатиона.

Перечень практических навыков:

Знать:

- основные природные источники глутатиона;
- строение, физико-химические свойства глутатиона;
- функции глутатиона;
- биологическое значение глутатиона.

Уметь:

- писать реакции участия глутатиона в восстановлении металлов переменной валентности;
- описывать основные антиоксидантные эффекты глутатиона;
- описывать методы по определению глутатиона.

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Строение, физико-химические свойства, функции глутатиона..
2. Биологическое значение глутатиона.
3. Перечислите ферменты участвующие в эндогенном синтезе глутатиона.
4. Опишите основные антиоксидантные эффекты глутатиона.
5. Роль глутатиона в защите эритроцитов.
6. Роль глутатиона в защите клеток с высоким уровнем окислительного фосфорилирования.
7. Напишите реакции участия глутатиона в восстановлении металлов переменной валентности.
8. Опишите методы для анализа глутатиона.
9. Синергисты и антагонисты глутатиона.
10. Напишите структуру восстановленной и окисленной форм глутатиона.

Преподаватель в процессе опроса студентов и разбора материалов темы останавливается на понятии глутатион, его функции в организме. Подробно рассматривают физико-химические свойства биологическую роль. Необходимо обратить особое внимание на антиоксидантную роль глутатиона в жизнедеятельности организма.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Заполните таблицу «Характеристика глутатиона».

Таблица №1.

Характеристика глутатиона.

Название вещества	Основные функции в организме	Влияние на работу систем организма	Основные природные источники
Глутатион			

Работа №2. Заполните таблицу «Характеристика глутатиона».

Таблица №2.

Состояния, развивающиеся при избытке глутатиона.

Последствия дефицита (избытка) глутатиона	Предшественники (из чего синтезируется в организме)	Биохимия и фармакокинетика	Болезни и состояния систем организма на которые оказывает влияние

Работа №3. Подготовка реферата по теме:

1. Роль глутатиона как компонента антиоксидантной системы организма.
2. Биологическое значение, метаболизм в организме глутатиона.

Объекты для исследования: глутатион.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Работа студента на занятии оценивается по результатам собеседования при разборе темы, по активности на занятии, правильности выполнения самостоятельной работы.

Оценка за устный ответ выставляется в кафедральном журнале, а оценка самостоятельной работы проводится путем выставления зачета в рабочей тетради и оценки в кафедральном журнале.

Вопросы итогового контроля:

1. Методы для анализа глутатиона.
2. Биологическое значение глутатиона.

Занятие №17

Тема: Процессы свободнорадикального окисления и сердечно-сосудистая патология.

Цель: изучить взаимосвязь между значительным повышением концентрации активных форм кислорода и возникновением эссенциальной гипертензии, атеросклероза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда.

Перечень практических навыков:

Знать:

- приобретенные нарушения липидного метаболизма;
- проатерогенные и антиатерогенные липиды.

Уметь:

- приводить примеры взаимодействия активных форм кислорода с клетками интимы и меди сосудов;
- определять перекисную резистентность эритроцитов.

Владеть:

- навыками работы на спектрофотометре

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения:

1. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе болезней системы кровообращения
2. Процессы свободнорадикального окисления и сердечно-сосудистая патология.
3. Значение свободнорадикальных процессов в развитии атеросклероза.
4. Окислительные и неокислительные гипотезы атерогенеза.
5. Процессы свободнорадикального окисления и заболевания крови.
6. Ферментопатии, ассоциированные с внутрисосудистым гемолизом эритроцитов.
7. Процессы свободнорадикального окисления и дисфункции системы свертывания крови и агрегации тромбоцитов.

Во время объяснения преподаватель обращает внимание на следующие моменты:

- роль оксида азота в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний;
- окислено модифицированные липопротеины;
- факторы, влияющие на перекисный гемолиз эритроцитов.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Работа №1. Определение перекисной резистентности эритроцитов.

2 мл 0,068% раствора перекиси водорода добавляют к 2 мл 5% суспензии эритроцитов и 0,16 мл 0,2% раствора азида натрия. Суспензия эритроцитов и растворы перекиси водорода и азида натрия готовят на забуференном физиологическом растворе с рН 7,4.

Готовятся две опытные пробы. Третья - контрольная проба, предназначенная для определения спонтанного гемолиза эритроцитов, состоит из тех же объемов суспензии эритроцитов и раствора азида натрия, но вместо раствора перекиси водорода берут равный объем забуференного физиологического раствора с рН 7,4.

Опытные и контрольную пробы инкубируют 1 час при 37°C. Для получения 100% гемолиза эритроцитов к одной из опытных проб добавляют 0,2 мл 4% раствора сапонины. После инкубации все пробы (опытные и контрольную) центрифугируют 10' при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для определения степени гемолиза. Для этого к 0,3 мл надосадочной жидкости добавляют 2,7 мл трансформирующего раствора (см. Инструкцию Минздрава СССР от 07.06.82 "Определение гемоглобина крови гемоглобинцианидным методом") и далее определяют оптическую плотность E_{541} , пропорциональную количеству гемоглобина в пробе.

Степень гемолиза А (в %), определяемую в стандартных условиях, под влиянием перекиси водорода рассчитывают по формуле $A = 100 (a - b) / (b - b)$, (1)

где а - величина оптической плотности опытной пробы E_{541} ;
б - величина оптической плотности при полном (100%) гемолизе под влиянием сапонины;

в - величина оптической плотности контрольной пробы - характеристика спонтанного гемолиза эритроцитов в условиях опыта.

Рассчитанная таким образом средняя перекисная резистентность эритроцитов для группы здоровых людей $A = 8,9 + 1,13$

Объекты для исследования: суспензия эритроцитов.

Аппаратура и посуда: автоматические пипетки, колбы конусовидные, стаканчики химические, термостат, центрифуга, спектрофотометр.

Методическое обеспечение: методические разработки, настенные таблицы по теме занятия, учебники, источники сети-интернет.

Студенты выполняют практические работы, указанные в рабочих тетрадях (Пятигорск, 2018г.).

Итоговый контроль:

Проверка рабочих тетрадей, индивидуальное собеседование по теме занятия, описание принципа метода определения и деталей опыта.

Вопросы итогового контроля:

1. Каков принцип метода определения перекисной резистентности эритроцитов ?
2. В каких единицах измерения рассчитывают степень гемолиза
3. Каково клиничко – диагностическое значение определения гемолиза эритроцитов?
4. Назовите среднюю перекисную резистентность эритроцитов для группы здоровых людей.
5. Имеются ли недостатки в изучаемом методе определения гемолиза эритроцитов?
6. Каким образом инициируются процессы свободнорадикального окисления и повреждения биополимеров стенки сосудов.

Рекомендуемая литература:

1. Основная литература				
	Авторы, составители	Заглавие	Издательство, год	Колич-во
Л1.1	Под ред. Е. С. Северина	Биохимия : учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. и доп.	М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015	5
Л1.2	Зезеров Е.Г.	Биохимия (общая, медицинская и фармакологическая): Курс лекций	МИА, 2014, 456 с.	15
2. Дополнительная литература				
	Авторы, составители	Заглавие	Издательство, год	Колич-во
Л2.1	Литвицкий П.Ф.	Патофизиология. учеб.: в 2 т. 5-е изд., перераб. и доп.	М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.	30
Л2.2	Уилсон К., Уолкер Дж.	Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии.	Бином, 2015.	5
Л2.3	Е.Б. Меньщиков	Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты .	М.: Слово, 2006	-
Л2.4	Алехин Е.К., Богданова А.Ш., Плечев	Влияние лекарственных средств на процессы свободно-радикального окисления.	Уфа, 2002.	-
Л2.5	Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н.	Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма.	СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000.	-
Л2.6	Бакумов П.А., Островский О.В., Уваров С.Б.	Современные антиоксиданты в медицине.	Волгоград: ИПК «Царицын», 2001.	-
Л2.7	Под ред. Е.С. Северина	Биохимические основы патологических процессов: Учеб. пособие	М.: Медицина, 2000.	-
Л2.8	Зайчик А.Ш.; Чурилов Л.П.	Основы патохимии. [Текст] : учеб. пособие для студентов мед. Вузов	СПб.: ЭЛБИ, 2000.	2
Л2.9	Никулин Б.А.	Пособие по клинической биохимии. [Текст] : учеб. пособие для системы послевузовского профессионального образования	М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.	2

3. Электронные образовательные ресурсы			
1	Северин Е.С.	Биохимия : учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. и доп. - М. :	
2	Никулин Б.А.	Пособие по клинической биохимии: учебное пособие. Никулин Б.А. / Под ред. Л.В. Акуленко. 2007. - 256 с. [Электронный ресурс]. – Режим	
3	Под ред. В.А. Ткачука.	Клиническая биохимия: учебное пособие. Бочков В.Н., Добровольский А.Б., Кушлинский Н.Е. и др. / Под ред. В.А. Ткачука. 3-е изд., испр. и доп. 2008. - 264 с. [Электронный ресурс]. – Режим	
4	Кишкун А.А.	Клиническая лабораторная диагностика : учебное пособие Кишкун А.А. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 976 с	
5	П.Ф. Литвицкий	Патофизиология. В 2 т. Т. 2 [Электронный ресурс] : учебник / П.Ф. Литвицкий. - 5-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. .[Электронный ресурс]. – Режим доступа. www..studmedlib.ru	

Авторы:
Е.О. Куличенко, С.А. Лужнова, А.М. Темирбулатова, С.С.Сигарева
Ю.К. Василенко, Е.О. Сергеева, Е.П. Парфентьева, И.В. Скульте.

Учебно-методическое для студентов по дисциплине «Свободно-радикальные процессы в биологии и медицине»

Направление подготовки: 30.05.01 «Медицинская биохимия» (уровень
специалитета)

Курс VI
Семестр XI

Подписано в печать «__» _____ 2021 г.
Формат 60*84 1/16 Бумага офсетная .
Печать ротапунктная. Усл.печ3,0
Уч.-изд.л. 3,0
Тираж _____ заказ _____

ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ –
филиал ФГОУ ВО ВолгГМУ, г.Пятигорск, пр. Калинина, 11.