



*Analizată și aprobată la ședința catedrei
din 29.08.2019, proces verbal nr.1
Șeful Catedrei de biochimie și biochimie clinică
Tagadiuc O., conf. universitar, dr. hab. în șt. med.*

Indicația metodică nr. 1

**Tema: Convorbire introductivă. Importanța biochimiei pentru disciplina Farmacie.
Aminoacizii – structura, clasificarea, rolul biomedical. Reacțiile de culoare ale aminoacizilor**

Experiența 1. Identificarea aminoacizilor ce conțin sulf (reacția Fol)

Principiul metodei: Ladegradareaproteinelor și peptidelor sub acțiunea hidroxidului de sodiu din grupările sulfhidril se eliberează sulfură sub formă de sulfură de sodiu, care reacționând cu plumbitul de sodiu, formează precipitatul de sulfură de plumb de culoare neagră sau brună.

Mod de lucru: La 5 picături de ovalbumină se adaugă 5 picături de reactiv Fol. Amestecul se pune la fiert. După 1-2 minute de fierbere apare un precipitat negru sau brun de sulfură de plumb (PbS).

Rezultat: _____

Concluzii: _____

Experiența 2. Reacția xantoproteică (Mulder)

Principiul metodei: Aminoacizii aromatici la fierbere cu HNO_3 concentrat se supun nitrării. Ca rezultat soluția capătă o culoare galbenă care trece în oranj la adăugare bazei.

Mod de lucru: La 5 picături de ovalbumină se adaugă 3 picături de HNO_3 concentrat. În urma fierberii, conținutul eprubetei se colorează în galben. Dacă după răcire în eprubetă adăugăm 10-15 picături soluție de NaOH 20%, culoarea soluției devine oranj ca rezultat al obținerii sării de sodiu a dinitrotirozinei.

Rezultat: _____

Concluzii: _____

Experiența 3. Reacția cu ninhidrină

Principiul metodei: Ninhidrina interacționează cu grupările alfa-amino ale proteinelor și aminoacizilor cu formarea unui compus colorat în albastru-violet.

Mod de lucru: La 5 picături de ovalbumină se adaugă 5 picături soluție de ninhidrină 0,5%. Conținutul eprubetei se fierbe 1-2 minute. În cazul prezenței grupelor alfa-amino apare o culoare roz-violetă, care trece apoi în albastră.

Rezultat: _____

Concluzii: _____



Experiența 4. Reacția biuretică (Piotrovski)

Principiul metodei: Legăturile peptidice (-NH-CO-) ale proteinelor în mediul alcalin interacționează cu CuSO_4 formând compuși complecși colorați în roșu-violet.

Mod de lucru: La 5 picături de ovalbumină se adaugă 5 picături soluție de NaOH 10% și 2 picături soluție de CuSO_4 1%. Eprubeta se agită. Apare culoarea violetă.

Rezultat: _____

Concluzii: _____

Întrebări pentru autopregătire

1. Obiectul biochimiei și importanța studiului biochimic pentru disciplina de farmacie.
2. Rolul biologic al proteinelor.
3. Structura și clasificarea aminoacizilor.
4. Teoria polipeptidică a structurii proteinelor. Aminoacizii "N" și "C" terminali.
5. Antibioticele de natură proteică.

Probleme de situație

1. Divizați următorii aminoacizi în grupe conform clasificării biologice: Thr, Cys, Phe, Gln, His, Met, Gly, Arg. Scrieți peptida formată din aminoacizii indispensabili. Dați definiția noțiunii, indicați ce aminoacizi se referă la acest grup și care sunt sursele aminoacizilor indispensabili?
2. Divizați aminoacizii proteinogeni conform proprietăților fizico-chimice (completați tabelul):

Aminoacizii hidrofobi	Aminoacizii hidrofilii fără de sarcină	Aminoacizii acizi	Aminoacizii bazici

3. Scrieți următoarele tripeptide: Lys-Val-Pro; Glu-Pro-Arg; Pro-Asp-His. Evidențiați legăturile peptidice tipice și atipice. Indicați deosebirile lor.

Teste pentru autoevaluare

1. Selectați polimerii biologici:

- | | |
|-----------------|---------------|
| a) nucleozidele | d) ADN |
| b) aminoacizii | e) collagenul |
| c) glucoza | |

2. Ce grupe de aminoacizi sunt prezente în proteine?

- | | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| a) hidroxiaminoacizii | d) aminoacizii diaminodicarboxilici |
| b) aminoacizii homociclici | e) tioaminoacizii |
| c) beta-aminoacizii | |

3. Ce structuri ciclice intră în componența aminoacizilor proteinogeni?

- | | |
|-------------|---------------|
| a) purina | d) pirimidină |
| b) indol | e) scatol |
| c) imidazol | |



4. Selectați proteinele plasmatice cu funcție de transport:

- a) albuminele
- b) protrombina
- c) transferina
- d) proteina C reactivă
- e) imunoglobulinele

5. Selectați proteina plasmatică care participă la coagularea sângelui:

- a) transcortina
- b) ceruloplasmina
- c) fibrinogenul
- d) transferina
- e) prealbumina

6. Selectați afirmațiile corecte referitoare la serină:

- a) este un hidroxiaminoacid
- b) are punctul izoelectric în zona de pH bazic
- c) este aminoacid esențial
- d) este derivat al acidului valerianic
- e) la pH=4 migrează spre catod

7. Selectați afirmațiile corecte referitoare la arginină:

- a) la pH=3 are sarcină negativă
- b) are pH-ul izoelectric în mediul bazic
- c) în forma hidroxilată intră în structura collagenului
- d) este un aminoacid acid
- e) conține gruparea guanidină

8. Care afirmații sunt corecte referitor la metionină:

- a) este un derivat al acidului butanoic
- b) în structura sa sulfurul este slab fixat
- c) la pH-izoelectric aminoacidul migrează spre catod
- d) la pH=4 migrează spre anod
- e) este un aminoacid neesențial

Indicația metodică nr. 2

Tema: Structura proteinelor. Clasificarea proteinelor.
Caracteristica generală a proteinelor simple și conjugate

Experiența 1. Identificarea aminoacizilor prin metoda cromatografiei pe hârtie

Principiul metodei: Metoda se bazează pe diferența coeficientului de repartiție a aminoacizilor în apă și solvent organic (butanol), care nu se amestecă cu apa. Viteza migrării aminoacizilor pe hârtie este direct proporțională cu gradul de dizolvare în butanol.

Mod de lucru: Pe linia de start a benzii de hârtie cromatografică (notată cu creionul simplu la aproximativ 1 cm) cu ajutorul capilarului se aplică o picătură nu mai mare de 5 mm de amestec de aminoacizi. După uscare la aer (fixare) banda se introduce într-un vas închis cu amestec butanol-apă, astfel încât lichidul să ajungă doar până la linia de start (5 mm). Cu ajutorul dopului banda se fixează vertical fără să atingă pereții vasului. După 1,5 ore de expunere, la temperatura camerei, banda se scoate din vas, se notează cu creionul simplu hotarul solventului și se usucă (10 minute la temperatura 70-100°C). Ulterior banda se trece prin soluția alcoolică de ninhidrină 0,2% și din nou se usucă la temperatura de 100°C. Pe cromatogramă apar unele pete violete sau galbene localizate la diferite distanțe de linia de start.



Cu ajutorul riglei se măsoară următoarele distanțe:

1. de la linia de start până la centrul fiecărei pete (a);
2. de la linia de start până la hotarul solventului (b).

Raportul dintre distanțele parcurse de aminoacid (a) și de solvent (b) poartă denumirea de *coeficient de repartiție* (R) specific pentru fiecare aminoacid în condiții standard și se calculează astfel: $R_f = a/b$. După tabelul cu R_f standard identificăm aminoacidul.

Valorile R_f standard

Aminoacidul	R_f	Aminoacidul	R_f
acidul aspartic	0.24	izoleucina	0.72
acidul glutamic	0.30	leucina	0.73
alanina	0.38	lizina	0.14
arginina	0.20	metionina	0.55
asparagina	0.50	prolina	0.43
cysteina	0.40	serina	0.27
fenilalanina	0.68	treonina	0.35
glutamina	0.13	triptofan	0.66
glicina	0.26	tirozina	0.45
histidina	0.11	valina	0.61

Importanța clinico-diagnostică. Metoda permite determinarea atât calitativă, cât și cantitativă a aminoacizilor în obiectele biologice care are importanță în studierea metabolismului proteic. În diferite afecțiuni ale ficatului, rinichilor și altor organe se constată modificarea conținutului aminoacizilor în serul sanguin.

Rezultat: _____

Concluzii: _____

Întrebări pentru autopregătire

1. Nivelurile de organizare a proteinelor: structura primară, secundară, terțiară și cuaternară; legăturile specifice ale acestor structuri. Noțiune de domen structural și funcțional.
2. Principiul metodelor de descifrare a structurii primare, secundare, terțiare și cuaternare a moleculei proteice (Sanger, Edman, enzimatică, peptidelor suprapuse, spectroscopia în infraroșu, metoda rentgenostructurală, rezonanța magnetică nucleară).
3. Clasificarea contemporană a proteinelor.
4. Proteinele simple, proprietățile lor și particularitățile structurale.
5. Colagenul: componența aminoacidică și structurală.
6. Proteinele fixatoare de calciu.
7. Proteinele conjugate: nucleoproteinele, fosfoproteinele, lipoproteinele și altele. Caracteristica generală.



Probleme de situație

1. Care din aminoacizi participă la formarea legăturilor covalente în autostructurarea gradului trei de organizare a moleculei proteice (structurii terțiare)?
2. Colagenul, calmodulina, factorii plasmatici ai coagulării II, VII, IX și X sunt proteine fixatoare de calciu. Ce particularitate structurală comună posedă aceste proteine. Care vitamină asigură realizarea acestei proprietăți? Scrieți reacția respectivă. Care sunt sursele vitaminei? Rolul acestor proteine în organism.
3. Ce modificare a structurii hemoglobinei este caracteristică pentru anemia cu celule falciforme? Care sunt cauzele acestei modificări? Ce repercusiuni are modificarea structurii primare asupra nivelurilor superioare structurale, funcției proteinei și stării eritrocitelor?
4. Divizați următoarele proteine în clase și subclase: albumina, mioglobina, ceruloplasmina, histona H1, folitropina, transferina, succinat dehidrogenaza. Pe ce proprietate se bazează clasificarea lor?

Teste pentru autoevaluare

1. Referitor la structura secundară a proteinei sunt corecte afirmațiile:

- a) reprezintă aranjamentul lanțului polipeptidic într-o structură ordonată
- b) e stabilită de interacțiuni hidrofobe și ionice
- c) este alfa-helixul și beta-structură
- d) este stabilizată de legături de hidrogen
- e) este stabilizată de legăturile peptidice

2. Referitor la structura secundară a proteinei sunt corecte afirmațiile:

- a) apare datorită formării legăturilor ionice între lanțurile polipeptidice adiacente
- b) posedă periodicitate maximă și minimă
- c) conferă proteinelor funcționalitate
- d) apare datorită formării legăturilor de hidrogen atât în limitele unui singur lanț, cât și între lanțurile adiacente
- e) este stabilizată și de legături disulfidice

3. Referitor la alfa-elice sunt corecte afirmațiile:

- a) predomină în moleculele proteinelor fibrilare
- b) posedă simetrie elicoidală
- c) radicalii aminoacizilor participă la stabilizarea alfa-elicei
- d) legăturile de hidrogen se formează între grupările -CO și -NH de pe aceeași catenă polipeptidică
- e) este stabilizată de legăturile peptidice

4. Referitor la structura terțiară a proteinelor sunt corecte afirmațiile:

- a) la baza funcționării proteinelor stau modificările conformaționale
- b) este stabilizată de legături formate de radicalii aminoacizilor
- c) este stabilizată de legături de hidrogen formate între atomii grupării peptidice
- d) în cadrul structurii terțiare, radicalii cisteinei pot forma legături ionice
- e) în cadrul structurii terțiare, radicalii serinei pot forma legături disulfidice

5. Selectați perechile de aminoacizi, radicalii cărora pot forma legături de hidrogen:

- | | |
|---------------|---------------|
| a) Lys Leu | d) Ser Cys |
| b) Phe Val | e) Asn Thr |
| c) Asp Ala | |



6. Selectați perechile de aminoacizi, radicalii cărora pot forma legături ionice:

- a) Lys Glu
- b) Trp Ile
- c) Asp Arg
- d) Gln Val
- e) His Met

7. Referitor la structura cuaternară a proteinelor sunt corecte afirmațiile:

- a) este organizarea protomerilor într-o moleculă proteică unică funcțională
- b) se formează prin legături între suprafețele de contact ale domeniilor
- c) este o structură rigidă
- d) se realizează doar prin legături covalente
- e) nu se distruge prin denaturare

8. Referitor la structura cuaternară a proteinelor sunt corecte afirmațiile:

- a) asamblarea structurii cuaternare decurge prin faza de formare a intermediarilor
- b) este caracteristică pentru toate proteinele
- c) funcționarea proteinelor oligomere e corelată cu deplasarea domeniilor
- d) e o însușire structurală a hemoglobinei
- e) e o însușire structurală a mioglobinei

9. Selectați proteinele oligomere:

- a) hemoglobina (Hb)
- b) mioglobina
- c) LDH (lactatdehidrogenaza)
- d) imunoglobulinele
- e) creatinfosfokinaza

10. Referitor la collagen sunt corecte afirmațiile:

- a) lanțul polipeptidic prezintă conformație de alfa-elice clasică
- b) conține multe resturi de cisteină
- c) se conține doar intracelular
- d) unitatea structurală a collagenului este tropocolagenul
- e) tropocolagenul se assemblează în fibrile doar prin legături slabe, necovalente

Indicația metodică nr. 3

Tema: Proprietățile fizico-chimice ale proteinelor.

Metodele de separare și purificare ale proteinelor

Experiența 1. Dializa proteinelor

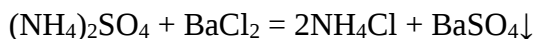
Principiul metodei: Metoda se bazează pe separarea macromoleculelor din soluțiile coloidale de substanțele micromoleculare cu ajutorul membranelor semipermeabile, care pot fi traversate de micromolecule, dar sunt impermeabile pentru macromolecule.

Mod de lucru:

1. Într-un balon se toarnă 20 mL soluție de ovalbumină la care se adaugă 20 picături de soluție saturată de sulfat de amoniu.
2. Dintr-o foiță de celofan, umezită în prealabil cu apă distilată, se confecționează un săculeț în care se toarnă conținutul balonului.
3. Săculețul se introduce într-un pahar cu apă distilată și se cufundă astfel ca nivelul de lichid în săculeț să fie mai jos de nivelul apei în pahar.
4. Se efectuează dializa timp de 90 minute.
5. La finele dializei se iau câte 1 mL de soluție din săculeț și din vas și se transferă în 2 eprubete.



6. Cu ambele soluții se efectuează reacția de identificare a ionului sulfat cu BaCl_2 : la 5 picături de soluție de cercetat se adaugă 3-4 picături soluție de BaCl_2 de 5%. În prezența ionului sulfat, reacția este pozitivă și se observă apariția precipitatului de BaSO_4 , conform ecuației:



7. Cu ambele soluții se efectuează reacția biuretică cu scopul identificării proteinelor: la 5 picături de soluție de cercetat se adaugă 5 picături de NaOH de 10% și 2 picături de CuSO_4 de 1%. În prezența legăturilor peptidice ($-\text{NH}-\text{CO}-$) ale proteinelor soluția se colorează în roz-violet.
8. Rezultatele experienței se introduc în următorul tabel și se trage concluzia despre capacitatea moleculelor, ce se deosebesc după masa moleculară și dimensiuni de a traversa membranele semipermeabile

Rezultat:

Soluția cercetată	Substanțele prezente până la dializă	DIALIZA	Reacția biuretică	Reacția cu BaCl_2	Substanțele prezente după dializă
Soluția din săculeț	Proteină (ovalbumină), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$				
Soluția din vas	H_2O				

Concluzii:

Întrebări pentru autopregătire

- Proprietățile fizico-chimice ale proteinelor: masa moleculară, solubilitatea, proprietățile amfotere și optice.
- Proprietățile coloidale ale proteinelor: factorii de stabilizare. Starea soluțiilor coloidale: sol, gel, xerogel. Importanța stării de xerogel pentru prepararea și păstrarea preparatelor medicamentoase.
- Punctul și starea izoelectrică, sarcina electrică a proteinelor.
- Salifierea, denaturarea și hidroliza proteinelor. Factorii care influențează aceste procese.
- Metodele de separare și purificare a proteinelor: salifierea, electroforeza, gel-filtrarea, cromatografia de afinitate și dializa.

Probleme de situație

- Într-o soluție sunt dizolvate histone și albumine. Alegeți soluția tampon care trebuie utilizată pentru precipitarea fiecărui tip de proteină: sol. 1 $\text{pH}=4,0$; sol. 2 $\text{pH}=7,0$; sol. 3 $\text{pH}=11,0$. Care este mecanismul acestei metode de separare a proteinelor individuale din amestecuri?
- O soluție ce conține un amestec de albumine și globuline este tratată cu soluție de sulfat de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ până la semisaturare, iar ulterior până la saturare. Ce efecte va avea această tratare asupra solubilității albuminelor și globulinelor? Care este mecanismul de acțiune a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ asupra soluției proteice?
- Spre care electrod vor migra albuminele și histonele la $\text{pH}=7,0$, dacă linia de start este la mijlocul distanței dintre anod și catod? Explicați.
- Ce metodă din cele enumerate mai jos poate fi utilizată pentru purificarea lichidelor biologice (ser, plasmă, limfă) de substanțe nocive micromoleculare: denaturarea, hidroliza, electroforeza, dializa, cromatografia de afinitate? Descrieți principiul metodei și utilitatea ei clinică.
- Pentru fabricarea medicamentelor enzimatică este necesar de a separa și purifica din surse biologice vegetale sau animale anumite enzime. Care din metodele enumerate mai jos este cea



mai rapidă și eficientă metodă de separare și purificare a enzimelor: denaturarea, hidroliza, electroforeza, dializa, cromatografia de afinitate? Descrieți principiul metodei.

6. Ce numim xerogel? Exemple de xerogel.

7. Principiul metodei de secare liofilă a soluțiilor coloidale; utilizarea acestei metode în industria medicală. Prioritatea acestei metode la prepararea medicamentelor de origine proteică.

Teste pentru autoevaluare

1. pH izoelectric al tetrapeptidei Arg - Lys - His - Ala se află în zona pH-lui:

- a) 3.6 - 4.0
- b) 4.0 - 4.5
- c) 5.0 - 7.0
- d) 2,0 - 3,0
- e) 7.7 - 8.8

2. Proteina contine în % următorii AA: Arg - 10, Lys - 26, Val - 13, Pro - 35, Ala - 8, Gly - 8.

La pH fiziologic proteina:

- a) migrează spre catod
- b) migrează spre anod
- c) are sarcină netă pozitivă
- d) are sarcină netă negativă
- e) nu posedă sarcină electrică

3. Selectați afirmațiile corecte referitoare la solubilitatea proteinelor:

- a) proteinele fibrilare sunt ușor solubile în apa pură
- b) solubilitatea proteinelor depinde de sarcina electrică și membrana apoasă
- c) solubilitatea proteinelor depinde de natura solvenților și temperatură
- d) proteinele fibrilare sunt mai solubile ca cele globulare
- e) solubilitatea proteinelor este maximală în punctul izoelectric

4. Selectați factorii ce stabilizează soluțiile proteice:

- a) membrana apoasă, ce apare la hidratarea grupelor funcționale hidrofile
- b) sarcina electrică, dependentă de pH-ul mediului
- c) sarcina electrică, dependentă de prezența radicalilor hidrofobi ai aminoacizilor
- d) membrana apoasă, ce apare la hidratarea grupelor funcționale nepolare
- e) sarcina electrică, dependentă de aminoacizii N- și C-terminali

5. Selectați condițiile de sedimentare a proteinelor:

- a) înlăturarea membranei apoase
- b) neutralizarea sarcinii electrice
- c) aducerea proteinei bazice la pI prin adaus de acid
- d) aducerea proteinei acide la pI prin adaus de bază
- e) hidroliza proteinei

6. Referitor la salifiere este corectă afirmația:

- a) este hidratarea moleculei proteice
- b) este însoțită de dehidratarea moleculei proteice
- c) este un proces ireversibil
- d) reprezintă trecerea micromoleculelor prin membrana semipermeabilă
- e) afectează structurile terțiară și cuaternară ale proteinei

7. Selectați afirmația corectă referitoare la molecula proteică denaturată:

- a) se scindează legătura peptidică
- b) crește activitatea biologică



- c) se distrug structurile secundară, terțiară și cuaternară
- d) crește solubilitatea proteinei
- e) nu este influențată mobilitatea electroforetică a proteinei

8. Selectați proprietățile soluțiilor coloidale proteice:

- a) putere de difuzie sporită
- b) vâscozitate mărită
- c) difuzie redusă
- d) proprietăți optice
- e) vâscozitate redusă

Indicația metodică nr. 4

Tema: Natura chimică și structura enzimelor.

Vitaminele ca coenzime. Mecanismul de acțiune a enzimelor

Experiența 1. Identificarea vitaminelor B₁, B₂, B₆ și PP (B₅)

Identificarea vitaminei B₁ (tiaminei)

Principiul metodei: Tiamina în mediul alcalin formează cu diazoreactivul un compus complex de culoare oranj.

Mod de lucru: La 5 picături de diazoreactiv (care constă din volume egale de soluție de acid sulfanilic 1% și soluție de nitrit de sodiu 5%), se adaugă 1-2 picături lichid biologic cercetat. Înclinând eprubeta se picură atent pe pereții ei 5-7 picături de sol. 10% carbonat de sodiu (Na₂CO₃). În prezența tiaminei la hotarul dintre lichide apare un inel colorat în oranj.

Rezultat: _____

Concluzie: _____

Identificarea vitaminei B₂ (riboflavinei)

Principiul metodei: Vitamina B₂ posedă proprietatea de a se reduce. În formă oxidată vitamina are culoare galbenă, la începutul reacției de reducere are culoare roză, care în cele din urmă se decolorează, deoarece forma redusă a vitaminei este incoloră.

Mod de lucru: Într-o eprubetă se iau 10 picături de lichid biologic cercetat, se adaugă 5 picături de acid clorhidric concentrat și o granulă de zinc metalic. În prezența riboflavinei se observă degajarea bulelor de hidrogen, lichidul galben se colorează treptat în roz, după care se decolorează.

Rezultat: _____

Concluzie: _____

Identificarea vitaminei PP (B₅)

Principiul metodei: La interacțiunea vitaminei PP cu acetatul de cupru se formează un precipitat albastru al sării de cupru a acidului nicotinic.

Mod de lucru: Se agită soluția de acetat de cupru 5% și se adaugă 20 picături lichid biologic cercetat. Eprubeta se încălzește până la fierbere și după aceea se răcește într-un jet de apă rece. În prezența nicotinamidei la fundul eprubetei se depune un precipitat de culoare albastră de sare de cupru a acidului nicotinic.

Rezultat: _____

Concluzie: _____

Identificarea vitaminei B₆ (piridoxinei)

Principiul metodei: Vitamina B₆ reacționând cu clorura de fier formează o sare complexă de tipul fenolatului de fier de culoare roșie.



Mod de lucru: La 5 picături de lichid biologic cercetat se adaugă un volum egal soluție de clorură de fier 1%. Amestecul se agită. În prezența piridoxinei apare o colorație roșie.

Rezultat: _____

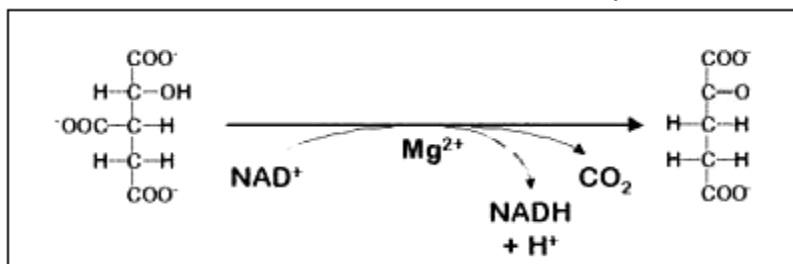
Concluzie: _____

Întrebări pentru autopregătire

1. Noțiuni despre enzime, natura chimică și rolul biologic al enzimelor.
2. Dovezile naturii proteice a enzimelor. Structura enzimelor. Proenzimele (zimogenii).
3. Centrul activ și centrul alosteric al enzimelor.
4. Izoenzimele și rolul lor.
5. Cofactorii enzimelor. Vitaminele în calitate de coenzime.
 - a) Structura chimică și rolul biologic al vitaminelor B₁, B₂, B₆, PP și a biotinei.
 - b) Vitaminele ca preparate farmaceutice.
6. Mecanismul de acțiune a enzimelor. Energia de activare a reacțiilor enzimatice. Ipoteza "broasca-cheie" (Fisher) și "coincidența forțată" (Koshland).
7. Nomenclatura și clasificarea enzimelor. Clasele și subclasele. Codificarea enzimelor.

Probleme de situație

1. E posibil de separat din enzime centrele active, păstrându-le integritatea structurală și funcțională? Explicați.
2. Toate enzimele posedă centre alosterice? Ce denumire mai poartă acestea enzime? Care este mecanismul lor de reglare?
3. Aceste enzime posedă structură și proprietăți fizico-chimice diferite, dar catalizează aceeași reacție. Frecvent ele sunt proteine oligomere formate din monomeri diferiți. Aceste enzime sunt: alosterice, izoenzime, proenzime sau zimogeni? Dați exemple concrete de asemenea enzime și explicați care este valoarea lor clinico-diagnostică.
4. Explicați de ce enzimele proteolitice gastrice și pancreatice se produc și secretă în formă de proenzime neactive? Care este mecanismul activării lor?
5. Determinați clasa, subclasa și subsubclasa următoarelor enzime: a) amilazei; b) pepsinei; c) lipazei.
6. La ce clasă de enzime se referă fermentul care catalizează reacția:



Ce vitamină reprezintă fragmentul activ al coenzimei?

Care este mecanismul acțiunii coenzimei?

Care sunt consecințele metabolice și fiziologice ale carenței acestei vitamine?

7. Care este rolul vitaminelor în metabolism și activitatea vitală a organismului? Ce modificări metabolice ilustrează stările de hipo- și avitaminoză?



Teste pentru autoevaluare

1. Selectați afirmația corectă referitoare la centru activ (CA) al enzimelor:

- a) este o linie frântă în molecula enzimei
- b) reprezintă un plan în molecula proteică
- c) este structură compusă unicală tridimensională
- d) este un punct din structura terțiară a enzimei
- e) reprezintă locul de legare a modulatorilor

2. Referitor la centrul activ (CA) al enzimelor sunt corecte afirmațiile:

- a) CA este partea enzimei care fixează substratul
- b) grupele funcționale din CA aparțin aminoacizilor amplasați succesiv în lanțul polipeptidic
- c) la enzimele compuse CA conține și gruparea prostetică
- d) CA al enzimelor simple conține coenzima
- e) CA se formează în baza structurii secundare

3. Indicați afirmațiile corecte referitoare la substrat:

- a) substratul este compusul asupra căruia acționează enzima
- b) toate enzimele fixează numai un singur substrat
- c) unele enzime interacționează cu câteva substraturi
- d) substratul se leagă ireversibil la centrul activ al enzimei
- e) substratul nu este modificat în procesul de cataliză

4. Referitor la centrul alosteric al enzimelor sunt corecte afirmațiile:

- a) este separat spațial de centrul activ
- b) conține gruparea prostetică
- c) este caracteristic tuturor enzimelor
- d) este „sinonim” cu centrul activ
- e) este locul în care se fixează activatorii și inhibitorii

5. Referitor la mecanismul de acțiune a enzimelor sunt corecte afirmațiile:

- a) în procesul de cataliză are loc formarea complexului enzima-substrat [ES]
- b) complexul ES e o structură rigidă, stabilă
- c) complexul ES nu disociază
- d) enzimele scad energia de activare a reacției chimice
- e) formarea complexului ES este ultima etapă a mecanismului de acțiune a enzimei

6. Selectați afirmațiile corecte referitoare la mecanismul de acțiune a enzimelor:

- a) în complexul ES substratul nu se modifică
- b) în complexul ES substratul se deformează
- c) în cadrul activității enzimatică poate avea loc cataliza covalentă
- d) în cadrul activității enzimatică poate avea loc cataliza acido-bazică
- e) la interacțiunea substratului cu enzima se modifică atât structura enzimei, cât și a substratului

7. Ce funcții îndeplinesc cofactorii în cadrul activității enzimatică?

- a) stabilizează conformația activă a enzimelor
- b) nemijlocit îndeplinesc funcție catalitică
- c) determină specificitatea de acțiune a enzimei
- d) leagă substratul la enzimă
- e) determină direcția reacției chimice



8. Selectați enzimele din clasa ligazelor:

- a) argininosuccinatliaza
- b) citratsintaza
- c) piruvatcarboxilaza
- d) glutaminsintetaza
- e) glucokinaza

9. Selectați enzimele care se referă la oxidoreductaze:

- a) fenilalaninhidroxilaza
- b) fumaraza
- c) xantinoxidaza
- d) glutatationreductaza
- e) succinatdehidrogenaza

Indicația metodică nr. 5

Tema: Cinetica reacțiilor enzimatice. Reglarea activității enzimatice

Experiența 1. Determinarea activității α -amilazei urinare cu substrat stabil de amidon (metoda Caraway)

Principiul metodei: α -amilaza scindează amidonul cu obținerea produșilor finali care nu se colorează cu soluția de iod. Activitatea amilazei se apreciază după micșorarea cantității de amidon scindat.

Mod de lucru: Experiențe se efectuează în eprubete calibrate de 10 ml!

Nr.	Reagent	Eprubeta de experiență	Eprubeta martor
1.	Soluție de amidon	1 mL (conține 0,0004 g amidon)	1 mL (conține 0,0004 g amidon)
2.	Incubare	5 minute în baia de apă la temperatura de 37°C	-
3.	Urină	0,02 mL	-
4.	Amestecul se agită și se introduce din nou în baia de apă la 37°C exact 7,5 minute (calculul timpului se face din momentul adăugării urinei)		
5.	Soluție de iod	1 mL	1 mL
6.	Urină	-	0,02 mL
7.	H ₂ O dist.	până la 10 mL	până la 10 mL
8.	Imediat se determină densitatea optică a soluțiilor din eprubeta de martor (E_m) și de experiență (E_{exp}) față de <u>apa distilată</u> la fotocolorimetru (filtrul roșu, $\lambda=630-690$ nm) în cuve de 10 mm.		

Calculul: în unități SI activitatea amilazei se exprimă în grame de amidon hidrolizat de cantitatea de enzimă care se conține într-un litru de urină timp de o oră de incubare la temperatura de 37°C. Calculul se face conform formulei:

$$\text{Activitatea amilazei (g/oră} \cdot \text{L)} = [(E_m - E_{exp}) / E_m] \cdot 0,0004 \cdot 8 \cdot 50000 = [(E_m - E_{exp}) / E_m] \cdot 160,$$

unde:

E_m – extincția probei martor;

E_{exp} – extincția probei de experiență;

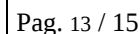
0,0004 – cantitatea de amidon în probă (g);

8 – coeficientul de transformare la o oră de incubare (60 min : 7,5 min = 8);

50000 – coeficientul de transformare la 1 L de urină (1000 mL : 0,02 mL = 50000).

Valorile normale ale activității amilazei din urină – 20-160 g/oră · L.

Valoarea diagnostică. În pancreatitele acute și parotitele epidemice se observă creșteri importante ale α -amilazei în sânge și urină. Creșteri moderate se depistează în pancreatitele



Întrebări pentru autopregătire



Teste pentru autoevaluare

1. Referitor la influența pH-ului asupra activității enzimelor sunt corecte afirmațiile:

- a) fiecare enzimă are pH-ul său optimal de acțiune
- b) pH-ul optim pentru pepsină este 7-8
- c) pH-ul nu modifică activitatea catalitică a enzimei
- d) pH-ul optim al tripsinei este 1-2
- e) pH-ul influențează disocierea grupelor funcționale ale enzimei

2. Selectați afirmațiile corecte referitoare la termolabilitatea enzimelor:

- a) la temperatura mai înaltă de 50°C majoritatea enzimelor denaturează
- b) termolabilitatea e determinată de coenzimă
- c) temperatura optimală pentru majoritatea enzimelor este de 20-40°C
- d) la temperatura mai înaltă de 50°C activitatea majorității enzimelor crește
- e) la temperatură scăzută, mai joasă de 10°C, activitatea enzimelor nu se modifică

3. Referitor la inhibiția competitivă sunt corecte afirmațiile:

- a) inhibiția se înlătură prin exces de substrat
- b) reprezintă o inhibiție ireversibilă
- c) inhibitorul se aseamănă după structură cu substratul
- d) e posibilă simultan fixarea substratului și a inhibitorului
- e) inhibitorul se leagă în centrul alosteric

4. Referitor la succinatdehidrogenază (SDH) și reglarea activității ei sunt corecte afirmațiile:

- a) face parte din clasa transferazelor
- b) acidul malonic provoacă o inhibiție reversibilă a SDH
- c) la inhibiție se modifică structura primară a enzimei
- d) inhibiția SDH nu depinde de concentrația acidului malonic
- e) SDH catalizează reacția: Succinat + FAD → Fumarat + FADH₂

5. Selectați afirmațiile corecte referitoare la creatinfosfochinază (CPK):

- a) CPK este compusă din lanțurile M și H, prezentând 3 izoenzime
- b) CPK este compusă din lanțurile M și B, prezentând 5 izoenzime
- c) CPK este un dimer alcătuit din asocierea lanțurilor M și B
- d) creșterea concentrației serice a izoenzimei MB este caracteristică pentru ciroza hepatică
- e) creșterea concentrației serice a izoenzimei BB este prezentă în infarctul miocardic

6. Referitor la amilază și activitatea ei sunt corecte afirmațiile:

- a) enzima face parte din clasa hidrolazelor
- b) activitatea amilazei crește în sânge în miozită
- c) activitatea amilazei se mărește în sânge în pancreatite
- d) enzima este sintetizată de celulele stomacului
- e) amilaza scindează celuloza

7. Referitor la enzimele alosterice sunt corecte afirmațiile:

- a) cinetica reacțiilor alosterice e asemănătoare cu cea a enzimelor obișnuite
- b) efectorii fixându-se în centrele alosterice nu modifică conformația enzimei
- c) modulatorii se leagă covalent în centrul activ al enzimei
- d) modulatorii alosterici se leagă reversibil în centrele alosterice
- e) substraturile și produsele reacției enzimatice nu pot fi efectori alosterici



Indicația metodică nr. 6
Totalizare la capitolul “Chimia proteinelor și enzimelor”

1. Obiectul biochimiei și importanța studiului biochimic pentru disciplina de farmacie.
2. Rolul biologic al proteinelor.
3. Structura și clasificarea aminoacizilor.
4. Teoria polipeptidică a structurii proteinelor. Aminoacizii “N” și “C” terminali.
5. Antibioticele de natură proteică.
6. Nivelurile de organizare a proteinelor: structura primară, secundară, terțiară și cuaternară; legăturile specifice ale acestor structuri. Noțiuni de domen structural și funcțional.
7. Principiul metodelor de descifrare a structurii primare, secundare, terțiare și cuaternare a moleculei proteice (Sanger, Edman, enzimatică, peptidelor suprapuse, spectroscopia în infraroșu, metoda rentgenostructurală, rezonanța magnetică nucleară).
8. Clasificarea contemporană a proteinelor.
9. Proteinele simple, proprietățile lor și particularitățile structurale.
10. Colagenul: componența aminoacidică și structurală.
11. Proteinele fixatoare de calciu.
12. Proteinele conjugate: nucleoproteinele, fosfoproteinele, lipoproteinele și altele. Caracteristica generală.
13. Proprietățile fizico-chimice ale proteinelor: masa moleculară, solubilitatea, proprietățile amfotere și optice.
14. Proprietățile coloidale ale proteinelor: factorii de stabilizare. Starea soluțiilor coloidale: sol, gel, xerogel. Importanța stării de xerogel pentru prepararea și păstrarea preparatelor medicamentoase.
15. Punctul și starea izoelectrică, sarcina electrică a proteinelor.
16. Salifierea, denaturarea și hidroliza proteinelor. Factorii care influențează aceste procese.
17. Metodele de separare și purificare a proteinelor: salifierea, electroforeza, gel-filtrarea, cromatografia de afinitate și dializa.
18. Noțiuni despre enzime, natura chimică și rolul biologic al enzimelor.
19. Dovezile naturii proteice a enzimelor. Structura enzimelor. Proenzimele (zimogenii).
20. Centrul activ și centrul alosteric al enzimelor.
21. Izoenzimele și rolul lor.
22. Cofactorii enzimelor. Vitaminele în calitate de coenzime.
23. Structura chimică și rolul biologic al vitaminelor B₁, B₂, B₆, PP și a biotinei.
24. Vitaminele ca preparate farmaceutice.
25. Mecanismul de acțiune a enzimelor. Energia de activare a reacțiilor enzimatică.
26. Ipoteza “broasca-cheie” (Fisher) și “coincidența forțată” (Koshland).
27. Nomenclatura și clasificarea enzimelor. Clasele și subclasele. Codificarea enzimelor.
28. Proprietățile generale ale enzimelor (termolabilitatea, specificitatea), acțiunea pH-ului asupra activității enzimatică.
29. Cinetica reacțiilor enzimatică (influența concentrației substratului și a enzimei, influența inhibitorului).
30. Activarea enzimelor (proteoliza parțială, activarea alosterică, autostructurarea cuaternară, modificarea covalentă, cofactorii ca modulatori).
31. Mecanismele de inhibiție (specifică și nespecifică, reversibilă și ireversibilă, alosterică și competitivă, prin exces de substrat). Utilizarea mecanismului de inhibiție competitivă în terapie și toxicologia clinică.
32. Organizarea enzimelor în celulă (ansamblurile enzimatică, compartimentalizarea). Reglarea activității enzimatică în celulă – retroinhibiția.
33. Enzimele organospecifice. Modificarea activității enzimatică în diferite afecțiuni (enzimodiagnosticul).
34. Utilizarea enzimelor în terapie. Întrebuințarea enzimelor imobilizate în medicină.
35. Metodele de obținere și purificare a enzimelor. Cromatografia de afinitate.
36. Unitățile de activitate a enzimelor.