

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ЦЕНТР РАЗВИТИЯ МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

ТАШКЕНТСКИЙ ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

“Утверждаю”

Начальник главного управления

Науки и учебных заведений

Минздрава РУз

_____ **проф. Ш.Э. Атаханов**

«_____» _____ 2006

**ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

(учебное пособие для студентов II -курса медицинских институтов)

ТАШКЕНТ – 2006 г.

Составители: Зав. каф. биологической химии ТашПМИ, академик **Саатов Т.С.**

Доц. каф. биологической химии ТашПМИ, **Султанходжаев У.Л.**

Доц. каф. биологической химии ТашПМИ, **Зиямутдинова З.К.**

Доц. каф. биологической химии ТашПМИ, **Каримова Ш.Ф.**

Асс. каф. биологической химии ТашПМИ, **Хайбуллина З.Р.**

Асс. каф. биологической химии ТашПМИ, **Акбарходжаева Х.Н.**

Рецензенты: 1. Заведующий кафедрой «Биологической химии» Ташкентской медицинской академии, профессор **Сабирова Р.А.**

2. Доктор биологических наук, профессор Института Биохимии АН РУз **Бабаев Т.А.**

3. Заведующий кафедрой «Фармакологии» ТашПМИ, профессор **Абдусаматов А.А.**

Методическая разработка обсуждена на ЦМС ТашПМИ (протокол № 1 от «20» сентября 2006 г.) и утверждена на Ученом Совете ТашПМИ (протокол № 2 от «27» сентября 2006 г.).

Практическое занятие № 1.

Тема: Строение, свойства и функции белков.

4. Цели:

- Дать студентам представление о предмете и задачах биохимии.
- Рассмотреть структурную организацию белков, их функции в организме.
- Научить студентов проводить качественные реакции на определение аминокислот, входящих в состав белков, и определять качественно наличие белка в биологических средах биуретовым методом.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать задачи биохимии, основные вопросы, рассматриваемые этой наукой.
- Знать функции белков в организме, белковый состав крови и др. органов и тканей.
- Знать классификацию аминокислот, уметь писать формулы отдельных аминокислот.
- Уметь дать определение первичной структуре белка, знать связи, стабилизирующие ее, уметь характеризовать пептидную связь.
- Знать и уметь объяснить связь первичной структуры белков с их функцией, назвать заболевания, вызванные изменением первичной структуры белка (серповидноклеточная анемия).
- Уметь качественно определять белок в биологических средах биуретовым методом.
- Уметь провести качественные реакции на тирозин и цистеин.

6. Перечень вопросов.

1. Предмет и задачи биохимии: понятие «минимальная клетка», молекулярная логика клеток и свойства живой материи; разделы биохимии.
2. Функции белков, белковый состав органов и тканей: белки сыворотки крови, мышц.
3. Аминокислотный состав белка: классификация аминокислот.
4. Первичная структура белка: определение, пептидная связь и ее характеристика.
5. Связь первичной структуры с функцией белка.

7. План занятия

- I. Введение. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов:
 - 1) Вопрос № 1. Предмет и задачи биохимии.

- a) Предмет биохимии, основные вопросы, рассматриваемые этой наукой.
- b) Понятие «минимальная клетка», свойства живого материи.
- c) Разделы биохимии
- 2) Функции белков. Белковый состав органов и тканей организма
 - a) Характеристика белков как класса органических соединений.
 - b) Функции белков
 - c) Белковый состав сыворотки крови, печени, мышц
- 3) Аминокислотный состав белков
 - a) Классификации аминокислот
 - b) Свойства аминокислот
- 4) Первичная структура белков.
 - a) Связи, стабилизирующие первичную структуру белка
 - b) Свойства пептидной связи
- 5) Связь первичной структура белков с их функцией.
 - a) Уникальность первичной структуры белка
 - b) Болезни, возникающие при изменении первичной структуры белка.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть.
 - 1. Лабораторная работа: Реакция на тирозин (реакция Миллона).
 - 2. Лабораторная работа: Реакция на цистеин (реакция Фоля).
 - 3. Лабораторная работа: Биуретовая реакция на белки.
- VI. Оценка знаний студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа:

«Реакция на тирозин (реакция Миллона)».

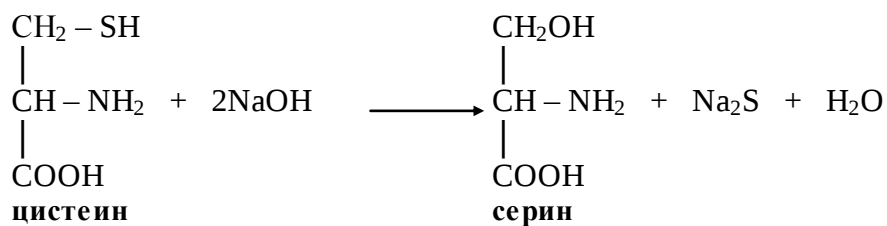
Химизм: реакция обусловлена наличием в белках аминокислоты тирозина. При нагревании или продолжительном стоянии раствора белка с реактивом Миллона [раствор нитратов ртути (I) и (II) в HNO_3 с примесью HNO_2] образуется осадок, окрашенный сначала в розовый, а затем в кроваво-красный цвет. Реактив Миллона дает окрашивание почти со всеми фенолами.

Ход работы. В четыре пробирки наливают по 5 капель: в первую – раствора яичного белка, во вторую – раствора желатина, в третью – раствора миозина, в четвертую – раствора тирозина. Во все четыре пробирки добавляют по 2-3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. Наблюдают и записывают изменение окраски раствора в таблицу.

«Реакция на цистеин (реакция Фоля)».

При добавлении к раствору белка раствора гидроксида натрия, ацетата свинца и последующем кипячении раствор начинает темнеть. Реакция

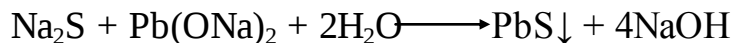
обусловлена присутствием в белке цистеиновых и полуцистеиновых остатков, которые при нагревании в присутствии крепкой щелочи разрушаются с образованием сульфида натрия:



Ацетат свинца реагирует со щелочью с образованием плюмбита натрия:



Сульфид натрия при взаимодействии с плюмбитом дает черный осадок сульфида свинца:



Ход работы. В одну пробирку наливают 5 капель 1%-ного раствора яичного белка, во вторую – 1%-ного раствора желатина, в третью – раствора миозина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и по 1 капле 5%-ного раствора ацетата свинца. При интенсивном кипячении жидкость в пробирках с яичным белком и миозином темнеет, так как образуется черный осадок сульфида свинца. В пробирке с желатином, который не содержит серосодержащих аминокислот, черного осадка не будет.

Результаты опыта вносят в таблицу.

«Биуретовая реакция на белки».

В щелочной среде раствор белка при добавлении разбавленного раствора сульфата меди окрашивается в синефиолетовый цвет. Окраска обусловлена образованием комплексов ионов меди с пептидными группами белка.

Биуретовую реакцию дает все белки, а также олигопептиды, содержащие не менее двух пептидных связей.

Ход работы. В одну пробирку наливают 5 капель раствора яичного белка, в другую – раствора желатина, в третью – раствора миозина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 10%-ного раствора NaOH и во всех пробирках наблюдают устойчивое сине-фиолетовое окрашивание.

Практическое занятие № 2.

Тема: Зависимость функций белков от их пространственной конфигурации.

4. Цель:

- Дать представление студентам об уровнях структурной организации белков.

- Показать значение конформации белковой молекулы в функционировании белка.
- Научить студентов производить количественное определение белка биуретовым методом.

5. Задачи.

После проведения занятия студент должен:

- Знать определение вторичной, третичной и четвертичной структуры белка;
- Уметь охарактеризовать связи, стабилизирующие вторичную, третичную и четвертичную структуру белка;
- Знать и уметь перечислить глобулярные и фибриллярные белки;
- Уметь охарактеризовать понятие «активный центр» в молекуле белка;
- Знать и уметь перечислить изофункциональные белки, назвать их сходства и различия между собой;
- Дать определение «лиганду», конформационным и кооперативным изменениям в молекуле белка;
- Уметь классифицировать белки.
- Знать количественный и качественный состав белков сыворотки крови и изменения его при патологии, протеинопатии.

6. Перечень вопросов.

1. Вторичная, третичная и четвертичная структура белков.
2. Роль разных уровней структурной организации белков в формировании конформации активного центра. Изофункциональные белки.
3. Взаимосвязь белков с лигандами.
4. Классификация белков.
5. Изменение белкового состава организма в онтогенезе и при болезнях.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов.
 - 1) Вторичная, третичная, четвертичная структура белков.
 - а) Дать определение вторичной, третичной, четвертичной структуре белка
 - б) Назвать связи, стабилизирующие вторичную, третичную, четвертичную структуры белка.
 - с) Характеристика водородных связей
 - д) Понятие об активном центре белковой молекулы.
 - 2) Роль разных уровней структурной организации белков в формировании конформации активного центра.
 - 3) Взаимосвязь белков с лигандами.

- a) Понятие «лиганд», виды связи между белком и лигандом.
- b) Конформационные и кооперативные изменения в белковой молекуле.
- 4) Классификация белков.
- 5) Изменение белкового состава организма в онтогенезе и при болезнях.
 - a) Врожденные и приобретенные протеинопатии.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, задания.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Количественное определение белка биуретовым методом.
- VI. Оценка знаний студентов.
- VII. Объясните темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Количественное определение белка биуретовым методом»

В основе метода лежит биуретовая реакция. Все белки обладают способностью в щелочной среде давать с раствором сульфата меди фиолетовое окрашивание. Интенсивность развивающейся окраски пропорциональна концентрации белка в растворе.

Ход работы. В четыре сухие пробирки отмеривают из бюреток по 1 мл раствора белка. В первые три пробирки помещают стандартные растворы с содержанием белка 0,5 и 1 и 1,5%. Эти пробы служат для построения калибровочной кривой. В четвертую пробирку наливают раствор с неизвестной концентрацией белка, которую нужно определить.

2. В каждую пробирку наливают по 4 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин для развития окраски. Окрашенные растворы колориметрируют на ФЭКе в кюветах с толщиной слоя 1 см, пользуясь зеленым светофильтром (длина волны 540 нм). В качестве контрольного раствора при измерении на ФЭКе используют биуретовый реактив.

3. Строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс известные концентрации стандартных растворов белка, а на оси ординат – соответствующие значения оптической плотности.

Зная оптическую плотность раствора белка с неизвестной концентрацией, по калибровочной кривой находят в нем содержание белка.

Практическое занятие № 3.

Тема: Изучение физико-химических свойств белков.

4. Цель: Дать представление студентам о свойствах белков, методах их фракционирования и их клинко-диагностическом значении.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать свойства белков.
- Иметь представление о молекулярной массе белков и форме белковых молекул
- Уметь объяснить с чем связана растворимость белков
- Уметь дать определение денатурации и ренативации белков, привести примеры
- Иметь представление о методе хроматографии и ее видах

6. Перечень вопросов.

1. Молекулярная масса белков
2. Форма белковых молекул
3. Растворимость и осаждаемость белков
4. Коллоидные свойства белков
5. Высаливание, гельфильтрация, диализ
6. Денатурация и ренативация белков
7. Хроматография и ее виды.

7. План занятия

- I. Введение. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов.
 - 1) Молекулярная масса белков.
 - а) Перечислить методы определения M_r белков, охарактеризовать каждый метод
 - 2) Форма белковых молекул
 - а) Глобулярные белки
 - б) Фибриллярные белки
 - 3) Растворимость и осаждаемость белков.
 - а) Физико-химические свойства белков.
 - б) Растворимость белков.
 - с) Осаждение белков
 - 4) Коллоидные свойства белков.
 - 5) Высаливание, гельфильтрация. диализ.
 - 6) Денатурация и ренативация белков.
 - 7) Хроматография и ее виды.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.

- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Осаждение белков при нагревании.
- VI. Оценка знаний студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Осаждение белков при нагревании».

Ход работы. В пять пробирок наливают по 0.5 мл раствора яичного белка.

Содержимое первой пробирки нагревают и наблюдают появление опалесценции (помутнение раствора).

К раствору яичного белка во второй пробирке добавляют осторожно одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты, нагревают и наблюдают вначале появление опалесценции, а при дальнейшем нагревании выпадение белого хлопьевидного осадка белка. Это объясняется тем, что белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии.

К раствору яичного белка в третьей пробирке добавляют 1-2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок при этом не образуется, так как частицы белка перезаряжаются, приобретают положительный заряд.

К раствору яичного белка в четвертой пробирке добавляют 1-2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты, 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Выпадает осадок белка, так как происходит нейтрализация заряда на частицах белка.

К раствору яичного белка в пятой пробирке добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок не образуется, так как положительный заряд на частицах белка усиливается.

Практическое занятие № 4.

Тема: Строение нуклеиновых кислот.

4. Цель: Дать представление студентам о строении и биологических функциях нуклеиновых кислот.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать строение, нуклеотидный состав, локализацию в клетке и функции ДНК и различных видов РНК, строение рибосом, нуклеосом;
- Уметь дать определение первичной, вторичной, третичной структуре ДНК и РНК. Знать отличия хроматина и хромосомы;
- Уметь писать правила Чаргаффа;

- Иметь представление о денатурации и ренативации нуклеиновых кислот, ДНК-ДНК и ДНК-РНК – гибридизации;
- Уметь определять качественно компоненты нуклеопротеинов дрожжей.

6. Перечень вопросов.

1. Нуклеиновые кислоты: ДНК, РНК. Основные нуклеотиды.
2. Первичная, вторичная, третичная структура нуклеиновых кислот.
3. Коэффициент специфичности нуклеиновых кислот.
4. Денатурация и ренативация нуклеиновых кислот.
5. Строение хроматина, рибосом, нуклеосом и их роль в синтезе белка.

7. План занятия.

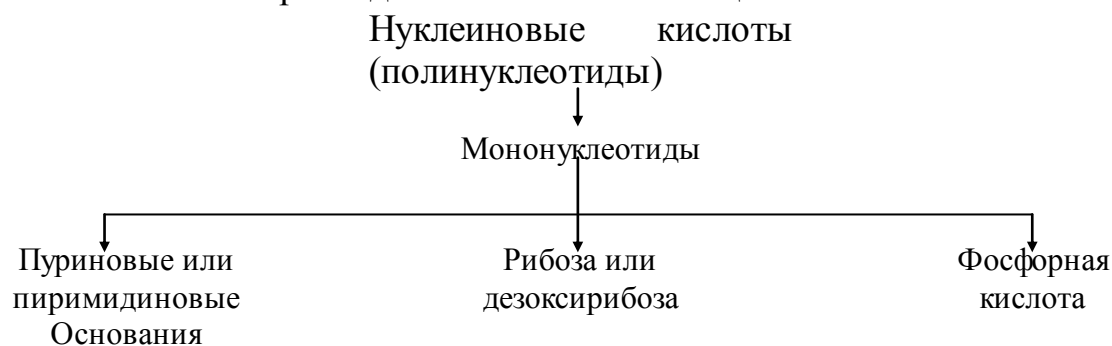
- I. Введение. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Нуклеиновые кислоты: ДНК, РНК. Основные нуклеотиды.
 - а) Строение нуклеотидов и нуклеозидов.
 - б) Отличие РНК от ДНК, локализация в клетке ДНК и РНК.
 - 2) Вопрос № 2. Первичная, вторичная, третичная структура нуклеиновых кислот.
 - а) Определение первичной структуры нуклеиновых кислот, связь, стабилизирующая ее.
 - б) Вторичная структура нуклеиновых кислот, правила Чаргаффа, строение т-РНК.
 - 3) Вопрос № 3. Коэффициент специфичности нуклеиновых кислот.
 - 4) Вопрос № 4. Денатурация и ренативация нуклеиновых кислот.
 - 5) Вопрос № 5. Строение хроматина, рибосом, нуклеосом и их роль в синтезе белка.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, заданий.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Реакция на компоненты нуклеопротеинов в гидролизате дрожжей.
- VI. Оценка знаний студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Реакция на компоненты нуклеопротеинов в гидролизате дрожжей»

Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопротеиновых комплексов, которые рассматриваются как сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты. Для качественного анализа химического состава нуклеопротеинов может быть использован гидролизат дрожжей как объект, богатый нуклеопротеинами.

При частичном гидролизе нуклеопротеины распадаются на белок (протамины или гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на составляющие их компоненты по схеме:



Для изучения компонентов нуклеопротеинов удобно использовать растительный объект – пекарские дрожжи. Продукты кислотного гидролиза нуклеопротеинов могут быть обнаружены специфическими реакциями: буретовой реакцией обнаруживают наличие полипептидов в гидролизате, пуриновые основания дают специфическую реакцию образования осадка солей серебра, фосфорную кислоту обнаруживают по реакции с молибдатом аммония, рибозу или дезоксирибозу – с помощью реакции Троммера.

Ход работы. 1. Гидролиз. В широкую пробирку для гидролиза помещают 0,5г свежих пекарских дрожжей и заливают 4мл 10%-ного раствора серной кислоты. Пробирку закрывают пробкой, в которую вставлен обратный холодильник (стеклянная трубка длиной 25-30 см), и ставят на песчаную баню или асбестовую сетку.

Через 1ч после начала кипения жидкости гидролиз прекращают, дают содержимому пробирки остыть и фильтруют через бумажный фильтр. В фильтрате открывают продукты гидролиза нуклеопротеинов качественными реакциями на компоненты нуклеопротеинов.

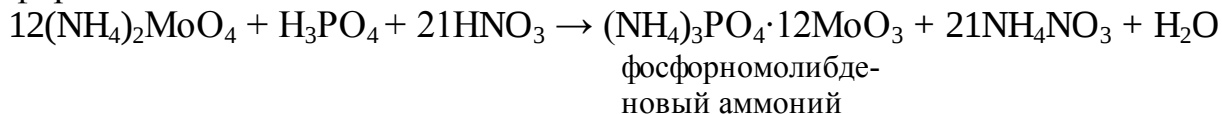
2. Биуретовая реакция на полипептиды. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10%-ного раствора NaOH и 1 каплю 1%-ного раствора сульфата меди(II). Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

3. Серебряная проба на пуриновые основания. 10 капель гидролизата нейтрализуют 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1%-ного раствора нитрата серебра. При стоянии через 3-5 мин выпадает небольшой рыхлый осадок серебряных соединений пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенный в бурый цвет.

4. Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 30%-ного раствора NaOH и 1-3 капли 7%-ного раствора сульфата меди(II) до появления исчезающей мути гидроксида меди(II). Жидкость перемешивают и верхний слой ее нагревают до начала кипения.

Выпадает красный осадок оксида меди(II) или желтый осадок гидроксида меди(II) вследствие окисления рибозы и восстановления $\text{Cu}(\text{OH})_2$ до Cu_2O .

5. Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 20 каплям молибденового реактива (раствор молибдата аммония в азотной кислоте) добавляют 2-3 капли гидролизата и кипятят несколько минут на открытом огне. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорномолибденового аммония:



Практическое занятие № 5.

Тема: Биосинтез нуклеиновых кислот.

4. **Цель:** Дать представление студентам о механизмах репликации и транскрипции.

5. Задачи:

После проведения занятия студенты должны:

- Знать пути передачи реализации генетической информации;
- Знать этапы биогенеза ДНК, ферменты, условия протекания процесса;
- Уметь охарактеризовать каждый этап;
- Знать субстраты РНК и ДНК-полимеразы, уметь охарактеризовать «фрагмент Оказаки»;
- Уметь объяснить, как устраняются ошибки репликации;
- Уметь назвать фазы клеточного цикла;
- Знать строение транскриптазы;
- Уметь перечислить и охарактеризовать этапы транскрипции;
- Уметь расшифровать понятия «процессинг», «спласинг», «капирование», «полиаденилирование»;

6. Перечень вопросов.

1. ДНК и наследственность, биосинтез ДНК (репликация – способ передачи генетической информации).
2. Репликация и фазы клеточного цикла.
3. Биосинтез РНК (транскрипция). Транскрипция как способ формирования информации ДНК в виде РНК.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. ДНК и наследственность, биосинтез ДНК.
 - a) Условия, необходимые для протекания репликации;
 - b) Виды репликации;
 - c) Ферменты, участвующие в репликации;
 - d) Этапы репликации;
 - e) Мутации, их виды;
 - f) Репарация ДНК.
 - 2) Вопрос № 2. Репликация и фаза клеточного цикла.
 - 3) Вопрос № 3. Биосинтез РНК (транскрипция). Транскрипция как способ формирования информации ДНК в виде РНК.
 - a) Ферменты транскрипции;
 - b) Этапы транскрипции;
 - c) Процессинг и РНК.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Выделение дезоксирибонуклеопroteина из ткани зубной железы или селезенки.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Выделение дезоксирибонуклеопroteина из ткани зубной железы или селезенки».

Выделение дезоксирибонуклеопroteина (ДНП) из зубной железы основано на том, что ДНП нерастворим в воде, но хорошо растворяется в щелочных и солевых растворах, поэтому при нейтрализации щелочных растворов или при разведении водно-солевых растворов он выпадает в осадок. Обнаружить ДНК в ДНП можно с помощью качественной реакции на дезоксирибозу. Для этого выделенный ДНП нагревают с дифениламиновым реактивом в кислоте. При этом происходит гидролиз ДНП и освобождение дезоксирибозы, которая дает с дифениламиновым реактивом синее окрашивание. Белковый коипонент в ДНП можно обнаружить с помощью биуретовой реакции.

1.Выделение ДНП. 0,5г зубной железы или селезенки растирают в фарфоровой ступке со 100мг стеклянного порошка, постепенно добавляя небольшими порциями 15мл 5%-ного раствора хлорида натрия. Фильтруют содержимое ступки через марлевый фильтр. Затем в стакан наливают 80 – 90мл дистиллированной воды и медленно, при помешивании стеклянной палочкой,

вливают в воду полученный фильтрат. Нерастворимый в воде ДНП выпадает в осадок, нити его наматывают в виде комка на стеклянную палочку. Собранную массу ДНП осторожно вынимают вместе с палочкой, переносят в чистую пробирку и растворяют в 1-2мл 0,4%-ного раствора гидроксид натрия (следить за тем, чтобы произошло полное растворение ДНП).

2. Обнаружение ДНК. В пробирку вносят 5 – 10капель раствора ДНК,добавляют в два раза больший объем дифениламинового реактива, перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 5 – 10мин. Жидкость постепенно приобретает синее окрашивание, обусловленное реакцией дифениламина с дезоксирибозой.

3. Биуретовая реакция на белковый компонент в ДНП. К 5 – 10каплям раствора ДНП добавляют 10 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и по 1капле 1%-ного раствора сульфата меди (II). Раствор окрашивается в сине-фиолетовый цвет.

Практическое занятие № 6.

Тема: Биосинтез белка.

4. Цель:

- 1) Дать студентам представление о механизме реализации генетической информации.
- 2) Рассмотреть этапы биосинтеза белка и его регуляцию.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать генетический код и его состав;
- Знать стадии биосинтеза белка;
- Знать строение и функции м-РНК, т-РНК, р-РНК;
- Уметь назвать посттрансляционные изменения белка;
- Знать структуру и уметь объяснить функционирование оперона;
- Уметь перечислить и назвать механизм действия ингибиторов синтеза белка.

6. Перечень вопросов.

1. Генетический код, его состав.
2. Стадии биосинтеза белка.
3. Адапторная функция т-РНК.
4. Роль матричной РНК.
5. Посттрансляционные изменения белков.
6. Регуляция биосинтеза белка, ингибиторы синтеза белков.

7. Регуляция действия генов, дифференцирование.

7. План занятия.

I. Введение. Осветить значимость темы.

II. Приступить к разбору вопросов.

1) Вопрос № 1. Генетический код, его состав.

а) Смысловые и бессмысленные кодоны;

б) Свойства генетического кода.

2) Вопрос № 2. Стадии биосинтеза белка.

а) Адапторная функция т-РНК;

б) Активация аминокислот;

с) Инициация трансляции, инициаторный комплекс;

д) Элонгация и терминация трансляции.

3) Вопрос № 3. Роль матричной РНК.

4) Вопрос № 4. Посттрансляционные изменения белков.

5) Вопрос № 5. Регуляция биосинтеза белка, ингибиторы синтеза белков.

а) Структура оперона;

б) Виды репрессии;

с) Ингибиторы матричных биосинтезов.

III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.

IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.

V. Практическая часть. Лабораторная работа: Количественное определение ДНК колориметрическим методом.

VI. Оценка знаний студентов

VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Количественное определение ДНК колориметрическим методом».

Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, давать синне окрашивание с дифениламиновым реактивом. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации ДНК.

Ход работы. 1. Готовят две пробирки. В опытную пробирку отмеривают 1 мл водного раствора ДНК и 2 мл дифениламинового реактива. В контрольную пробирку отмеривают 1 мл дистиллированной воды и 2 мл дифениламинового реактива.

Обе пробы помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем пробы охлаждают и измеряют интенсивность окраски на ФЭКе против контроля (светофильтр красный).

Зная оптическую плотность опытной пробы, по калибровочному графику находят содержание в ней ДНК.

2. Построение калибровочного графика. В три пробирки наливают 1 мл раствора ДНК с различной концентрацией (50, 100, 200 мкг/мл) и по 2 мл дифениламинового реактива. Помещают пробирки на 10 мин в кипящую водяную баню, затем измеряют оптическую плотность каждого из растворов. Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс концентрации использованных растворов ДНК, а на оси ординат – соответствующие им значения оптической плотности.

Практическое занятие № 7.

Тема: Ферменты. Изучение свойств ферментов как биологических катализаторов.

4. Цель:

- Обсудить со студентами детали строения и функций ферментов.
- Показать зависимость скорости ферментативной реакции от температуры, pH, концентрации субстрата и фермента.
- С помощью химических реакций рассмотреть состава ферментов и выявить особенности их протекания.
- Закрепить полученные знания, рассмотрев клинико-диагностическое значение поставленных практических работ.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать химическое строение ферментов
- Знать физико-химические свойства ферментов
- Знать классификацию ферментов
- Знать единицы измерения ферментов
- Уметь на основе химических анализов ставить диагноз

6. Перечень вопросов.

1. Химическая природа ферментов. Кофакторы.
2. Общие свойства ферментов, специфичность и ее значение.
3. Зависимость скорости ферментативной реакции от t^0 и pH.
4. Классификация, номенклатура ферментов.
5. Единицы измерения активности ферментов.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.

- 1) Вопрос № 1. Химическая природа ферментов.
 - a) Рассмотреть кофермент, кофактор, простетические группы;
 - b) Строение активного центра;
- 2) Вопрос № 2. Общие свойства ферментов специфичность и ее значение.
 - a) амфотерность;
 - b) электрофоретическая подвижность;
 - c) определение лиганда;
 - d) избирательность
 - e) комплементарность субстрату.
- 3) Вопрос № 3. Зависимость скорости ферментативной реакции.
 - a) От концентрации субстрата;
 - b) От концентрации фермента;
 - c) От t^0 и pH.
- 4) Вопрос № 4. Принципы определения активности фермента.
- 5) Вопрос № 5. Классификация, номенклатура.
 - a) оксидоредуктазы;
 - b) трансферазы;
 - c) гидролазы;
 - d) лиазы;
 - e) изомеразы;
 - f) лигазы.
- 6) Вопрос № 6. Единицы измерения активности ферментов.
 - a) Дать определение Е, катал, удельной активности.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть.
 1. Лабораторная работа: Определение зависимости активности амилазы слюны от pH среды.
 2. Лабораторная работа: Изучение влияния t^0 на активность амилазы слюны.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

1. «Влияние температуры на активность амилазы».

Материалы исследования: амилаза слюны (наклонив голову, приоткрывают рот, подносят пробирку к нижней губе и собирают слюну).

Реактивы: I_2 , 1%-ный раствор в KI; крахмал, 1%-ный раствор; дистиллированная вода.

Оборудование: пипетки; пробирки; термостат (40^0C); водяная баня и баня со льдом; предметные стекла.

Расщепление крахмала амилазой наблюдать, используя реакцию с йодом.

Ход работы. 1. Наливают в четыре пробирки по 0,5 мл раствора крахмала. Еще в четыре пробирки наливают по 0,5 мл разбавленной (1:10) слюны.

2. Берут первую пару пробирок (одна с ферментом, другая – с крахмалом) и помещают в баню со льдом. Вторую пару оставляют при комнатной температуре. Третью пару пробирок помещают в термостат (40⁰С), а четвертую – в кипящую водяную баню.

3. Через 10 мин содержимое каждой пары пробирок сливают вместе, тщательно перемешивают и оставляют стоять еще 10 мин в тех же условиях.

4. Из третьей пробирки отбирают 3 капли жидкости и проделывают реакцию с каплей йода на стекле. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще 10 мин и после этого повторяют реакцию с йодом на стекле. Затем добавляют 2 капли раствора йода во все пробирки и наблюдают за появлением окрашивания.

2. «Влияние рН на активность амилазы слюны».

Материалы исследования: амилаза слюны.

Реактивы: I₂, 1%-ный раствор в KI; крахмал, 1%-ный раствор; дистиллированная вода; 1/15 моль/л раствора фосфатного буфера с разным значением рН (5,4-8,0).

Оборудование: пипетки; пробирки; предметные стекла.

Оптимум рН для действия амилазы слюны можно определить при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях рН среды. О степени расщепления крахмала можно судить по реакции крахмала с раствором йода в течение времени. При оптимальном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью (окраска с йодом отсутствует). По мере удаления от точки оптимального рН в кислую или щелочную зону расщепление крахмала произойдет только до стадии декстринов (краско-бурная или фиолетовая окраска) или крахмал вообще расщепляться не будет (синяя окраска).

Ход работы. 1. Перед началом работы готовят раствор амилазы и определяют ее активность. Для этого смешивают 1 мл раствора крахмала и 0,5 мл разбавленной 1:10 слюны. Через каждые 2 мин отбирают по 1 капле этой смеси и смешивают ее с каплей раствора йода на предметном стекле. Крахмал должен полностью расщепляться приблизительно за 10 мин (появляется желтая окраска при пробе с йодом). Если расщепление происходит быстрее, слюну надо развести еще в 2, 3 или 4 раза.

2. В восемь пронумерованных пробирок добавляют по 2 мл фосфатного буфера с различным рН (от 5,4 до 8,0).

№ пробы.....	1	2	3	4	5	6	7	8
рН.....	5,4	5,8	6,2	6,6	6,8	7,0	7,4	8,0

Следует помнить, что при отмеривании разных буферных растворов нельзя пользоваться одной пипеткой. Необходимо использовать каждый раз чистую пипетку (или наливать из бюретки).

3. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора крахмала и по 0,5 мл приготовленного раствора слюны (разбавленного в зависимости от активности амилазы 1:10; 1:20; 1:50; см.п. 1) и оставляют стоять в штативе на столе в течение 10 мин.

4. Из каждой пробирки каплю жидкости смешивают с каплей раствора йода на предметном стекле и сравнивают окрашивание в каждой пробирке. Повторяют эту пробу через 1-2 мин до тех пор, пока проба из пятой пробирки даст с йодом на предметном стекле красно-бурое окрашивание. Через 1-2 мин после этого во все пробирки добавляют по 2-3 капли раствора йода (начинать с первой пробирки). Содержимое пробирок хорошо взбалтывают.

Сравнивают между собой окрашивание во всех пробирках и делают вывод о степени расщепления крахмала, а следовательно, об активности фермента при этом значении pH среды.

Единицы измерения активности ферментов:

Практическое занятие № 8.

Тема: Регуляция действия ферментов, клиническая энзимология.

4. Цель:

- Обсудить со студентами регуляцию активности ферментов.
- Показать зависимость активности ферментов от активаторов и ингибиторов
- Дать понятие об иммобилизованных ферментах
- Рассмотреть вопросы и проблемы энзимотерапии
- На конкретных примерах разобрать причины и способы лечения энзимопатии
- Закрепить полученные данные, проделав лабораторную работу по влиянию различных регуляторов на активность ферментов.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать различные типы регуляции активности ферментов
- Иметь понятия об ингибиторах и активаторах действия ферментов
- Знать об применении иммобилизованных ферментов
- Уметь разбираться в клинической энзимологии, энзимодиагностике, энзимотерапии и энзимопатиях

6. Перечень вопросов.

1. Регуляция активности ферментов
2. Ингибиторы и активаторы действия ферментов. Вещества ингибирующие ферменты.

3. Иммуобилизироваанные ферменты
4. Клиническая энзимология, энзимопатия, энзимодиагностика, энзимотерапия.

7. План занятия:

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Регуляция активности ферментов.
 - a) Аллостерическая регуляция
 - b) Регуляция белковыми ингибиторами
 - c) Регуляция по закону действия масс
 - d) Регуляция по принципу обратной отрицательной связи.
 - e) Регуляция гормонами
 - f) Фосфорилирование и дефосфорилирование
 - g) Регуляция частичным протеолизом.
 - 2) Вопрос № 2. Ингибиторы и активаторы действия ферментов, вещества – ингибирующие ферменты.
 - a) Обратимое и необратимое ингибирование
 - b) Конкурентное и неконкурентное ингибирование
 - c) Активаторы действия ферментов
 - 3) Вопрос № 3. Иммуобилизироваанные ферменты.
 - a) Принципы иммуобилизации
 - b) Применение иммуобилизации в промышленности и медицине.
 - 4) Вопрос № 4. Клиническая энзимология.
 - a) Энзимодиагностика
 - b) Энзимопатия
 - c) энзимотерапия
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть. Изучение влияния активаторов и ингибиторов на активность амилазы.
- VI. Оценка занятий студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы».

Материалы исследования: амилаза слюны.

Реактивы: NaCl, 1%-ный раствор; сульфат меди (II), 1%-ный раствор; крахмал, 1%-ный раствор; 1%-ный раствор йода и йодиде калия; дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки; пипетки вместимостью 1 мл; мерные цилиндры вместимостью 10 мл.

Ход работы. 1. В одну пробирку вносят 10 капель дистиллированной воды, во вторую – 8 капель воды и 2 капли 1%-ного раствора хлорида натрия, в третью – 8 капель воды и 2 капли раствора сульфата меди (II).

2. В каждую пробирку добавляют по 20 капель разведенной (1:10) слюны, содержимое пробирки перемешивают, добавляют по 5 капель раствора крахмала и оставляют стоять при комнатной температуре 5 мин.

3. Тем временем готовят три пробирки с водой (по 1 мл в каждой), подкрашенной каплей раствора йода, и добавляют в них по 2-3 капли содержимого опытных проб. Наблюдают окрашивание в зависимости от степени расщепления крахмала амилазой. В первой пробирке появляется фиолетовая или красно-бурная окраска, во второй пробирке, где ионы хлора играют роль активатора, появляется желтая окраска, а в третьей пробирке, где ионы меди тормозят действие амилазы, окраска остается синей. Если описанной картины не наблюдается, то опыт повторяют через 10 и 15 мин. Результаты вносят в таблицу:

фермент	субстрат	Время действия фермента, мин	Окраска с йодом		
			Проба 1 (H ₂ O)	Проба 2 (NaCl)	Проба 3 (CuSO ₄)
Амилаза	Крахмал	5			
		10			
		15			

Практическое занятие № 9.

Тема: Витамины и их коферментные функции, витамины растворимые в жирах.

4. Цель: Обсудить со студентами классификацию витаминов. Особое внимание уделить коферментным функциям витаминов. Объяснить значение жирорастворимых витаминов.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать классификации витаминов;
- Знать коферментные функции витаминов;
- Знать особенности жирорастворимых витаминов;
- Уметь делать качественные реакции на отдельные витамины;
- Уметь дифференцировать гипо, гипер и авитаминозы.

6. Перечень вопросов.

1. Общие представления о витаминах.
2. Классификация витаминов.
3. Гипо и гипervитаминозы.
4. Коферментные функции витаминов.
5. Жирорастворимые витамины А, Д, Е, К, F.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов поставленной темы:
 - 1) Вопрос № 1. Общие представления о витаминах.
 - а) История открытия витаминов;
 - б) Химическое строение;
 - с) Понятия о гипер-, гипо- и авитаминозах.
 - 2) Вопрос № 2. Классификация витаминов.
 - а) Жирорастворимые витамины;
 - б) Водорастворимые витамины.
 - 3) Вопрос № 3. Коферментные функции витаминов.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Качественные реакции на витамины А, Д, Е.
- VI. Оценка занятий студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Качественные реакции на витамины А, Д, Е».

1. Качественные реакции на витамин А.

Ход работы. В сухую пробирку отмеривают 3 капли рыбьего жира в хлороформе и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в красно-бурое.

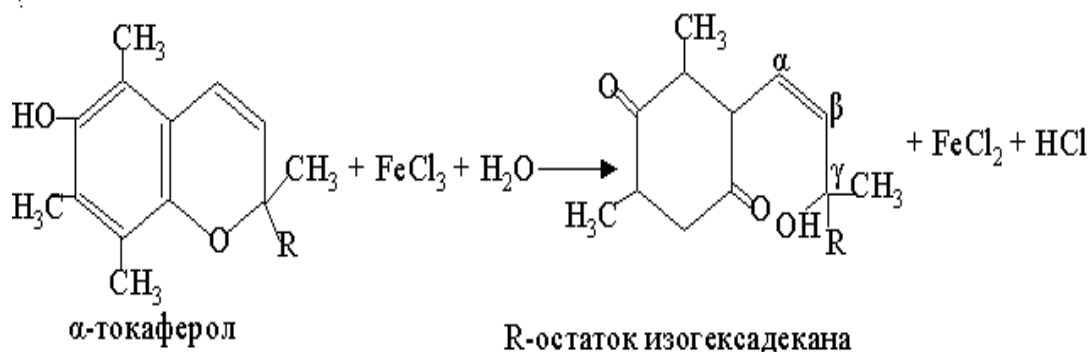
2. Качественные реакции на витамин Д.

Бромхлороформная проба. Принцип метода. Витамин Д, содержащийся в рыбьем жире, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе приобретает зеленовато-голубую окраску.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 2-3 капли рыбьего жира или 1 каплю концентрата витамина Д и 2-4 капли раствора брома в хлороформе (1:60). В присутствии витамина Д постепенно появляется зеленовато-голубое окрашивание.

Качественные реакции на витамин Е.

Реакция с хлоридом железа. Принцип метода. Спиртовой раствор α -токоферола окисляется хлоридом железа (Fe^{+3}) в токоферилхинон и раствор окрашивается в красный цвет:



Ход работы. В сухую пробирку берут 4-5 капель 0,1% спиртового раствора α -токоферола, прибавляют 0,5 мл 1% раствора хлорида железа, тщательно пермешивают. Содержимое пробирки приобретает окрашивание.

Практическое занятие № 10.

Тема: Водорастворимые витамины.

4. Цель: Обсудить со студентами строение, значение и коферментную функцию витаминов группы В, а также Н, С, РР и Р. Объяснить строение, функции витаминopodobных соединений. Рассмотреть строение и значение антивитаминов. На практике провести анализы по обнаружению витаминов в пищевых продуктах и биологических препаратах.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать строение, суточную потребность, коферментную функцию витаминов группы В, витамин Н, С и РР;
- Знать химическое и медицинское название всех ферментов;
- Знать способы определения витаминов в биологических объектах;
- Знать и уметь выделить витаминородобные соединения;
- Знать значение антивитаминов.

6. перечень вопросов.

1. Водорастворимые витамины В₁, В₂, РР, В₆, Н₂, фолевая кислота, В₃, С, Р.
2. Витаминopodobные вещества.
3. Антивитамины.

7. План занятия.

I. Введение. Осветить значимость темы.

II. Приступить к разбору вопросов.

1) Вопрос № 1. Водорастворимые витамины.

- a) Витамины B_1 - тиамин;
- b) Витамины B_2 - рибофлавин;
- c) Витамины PP – никотинамид;
- d) Витамины B_6 – пиридоксин;
- e) Витамины H – биотин;
- f) Фолиевая кислота – витамин B_{12} ;
- g) Витамин B_3 – пантотеновая кислота;
- h) Витамин C – аскорбиновая кислота;
- i) Витамин P – рутин.

2) Вопрос № 2. Витаминоподобные вещества.

- a) Парааминобензойная кислота;
- b) Витамин B_{15} – пангамовая кислота;
- c) Инозит;
- d) Коэнзим Q – убихинон;
- e) Витамин U – S-метилметионин;
- f) Липоевая кислота;
- g) Холин.

3) Вопрос № 3. Антивитамины.

- a) Антивитамины сходные по структуре с витамином;
- b) Антивитамины – вызывающие химическую модификацию природы витаминов.

III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.

IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.

V. Практическая часть. Лабораторная работа: Качественные реакции на витамины B_1 , B_2 , PP, B_6 .

VI. Оценка знаний студентов

VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Качественные реакции на витамины B_1 , B_2 , PP, B_6 ».

Качественные реакции на витамин B_1 .

Реакция окисления. Принцип метода. В щелочной среде тиамин окисляется в тиохром феррицианидом калия. Тиохром обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора на флюороскопе.

Ход работы. К 1 капле 5% раствора тиамина прибавляют 5-10 капель 10% раствора едкого натра, 1-2 капли 5% раствора феррицианида калия и взбалтывают.

Прогрев флюороскоп в течение 10 мин, наблюдают синюю флюоресценцию при облучении раствора ультрафиолетовыми лучами.

Диазореакция. Принцип метода. В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

Ход работы. К диазореактиву, состоящему из 5 капель 1% раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5% раствора натрата натрия, добавляют 1-2 капли 5% раствора тиамина и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5-7 капель 10% раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Качественная реакция на витамина В₂.

Принцип метода. Окисления форма витамина В₂ представляет собой желтое флюоресцирующее в ультрафиолетовых лучах вещество. Реакция на витамин В₂ основана на способности его легко восстанавливаться; при этом раствор витамина В₂, обладающий желтой окраской, приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, так как восстановленная форма витамина В₂ бесцветна.

Ход работы. В пробирку наливают 10 капель раствора витамина В₂, добавляют 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и опускают зернышко металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается. Сравнивают обе формы витамина В₂ по флюоресценции, поместив каждую пробирку у флюороскопа.

Качественная реакция на витамин РР.

Принцип метода. Витамин РР при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок медной соли никотиновой кислоты, плохо растворимый.

Ход работы. Перед определением 3% раствор витамин РР следует обязательно взболтать. Затем набирают в пробирку 20 капель его и нагревают до кипения; при этом мутный раствор становится прозрачным. Взболтав 5% раствор ацетата меди, приливают 20 капель его к нагретому раствору витамина РР. Затем содержимое пробирки доводят до кипения и сразу охлаждают ее под струей холодной воды; на дне пробирки выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Качественная реакция на витамин В₆.

Принцип метода. Витамин В₆ при взаимодействии с раствором хлорного желез образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора витамина В₆ приливают равное количество 1% раствора хлорного железа и перемешивают. Развивается красное окрашивание.

Практическое занятие № 12.

Тема: Биохимия питания. Стадии метаболизма.

4. Цель: Обсудить со студентами значение обмена веществ и энергии. В результате обмена веществ потребляемые с пищей вещества превращаются в собственные вещества и структуры клетки и, кроме того, организм обеспечивается энергией. Объяснить студентам, что обмен веществ живых организмов включает поступление веществ из среды в организм (питание и дыхание), перемещение и превращение веществ в организме (промежуточный обмен) и выделение конечных продуктов.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать что основным источником энергии для человека является энергия, заключенная в химических связях компонентов питания;
- Знать что существует понятие о сбалансированном рациональном питании;
- Знать что существуют две стороны обмена веществ – анаболизм и катаболизм и понимать их сущность;
- Знать о значении и видах трансмембранного переноса веществ;
- В процессе исследования ферментативного действия сукцинатдегидрогеназы закрепить знания о локализации ферментов дегидрогеназ и молекулярном механизме действия ЦПЭ.

6. Перечень вопросов.

1. Обмен веществ. Биохимия питания.
2. Заменяемые и незаменимые компоненты пищи.
3. Биохимия молока
4. Анаболизм и катаболизм.
5. Биологические мембраны, их структура и функции.
6. Трансмембранный перенос веществ.

7. План занятия.

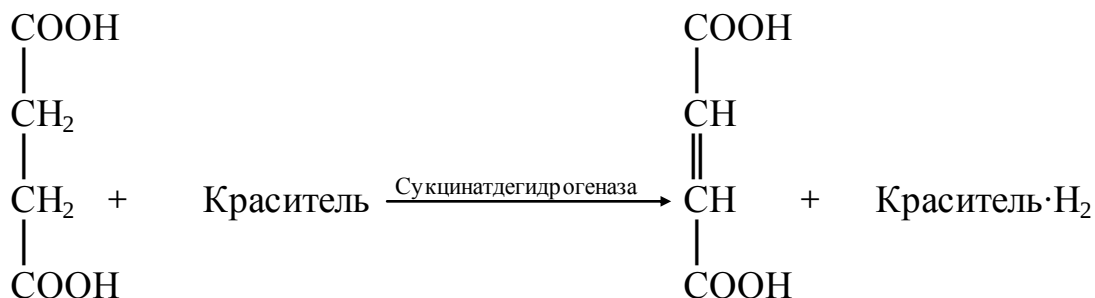
- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Обмен веществ. Биохимия питания.
 - а) Основные и минорные компоненты пищи;
 - б) Самовоспроизведение – наиболее характерная особенность обмена веществ в живых организмах.

- 2) Вопрос № 2. Заменяемые и незаменимые компоненты пищи.
 - а) Пищевая ценность белков;
 - б) Незаменимые жирные кислоты, витамины;
 - с) Минеральные вещества;
- 3) Вопрос № 3. Анаболизм и катаболизм.
 - а) Два основных направления превращения веществ в организме;
 - б) Регуляция концентрации метаболитов.
- 4) Вопрос № 4. Биологические мембраны.
 - а) Строение мембран, функции;
 - б) Асимметрия мембран, жидкость мембран.
- 5) Вопрос № 5. Трансмембранный перенос веществ.
 - а) Диффузия. Простая и облегченная;
 - б) Активный транспорт;
 - с) Эндцитоз, фагоцитоз, симпорт и антипорт.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть.
1. Лабораторная работа: Сукцинатдегидрогеназа мышц и конкурентное торможение, ее активности.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Сукцинатдегидрогеназа мышц и конкурентное торможение ее активности».

Сукцинатдегидрогеназа мышц является железофлавопротеином и прочно связано с клеточной структурой. В качестве окисляемого субстрата берут янтарную кислоту, а в качестве акцептора водорода – краситель 2,6-дихлорфенолиндифенол (синего цвета), который, восстанавливаясь, превращается в бесцветную лейкоформу. Источником фермента служит отмтая мышечная ткань (кашица). Сукцинатдегидрогеназная активность тормозится в присутствии малоновой кислоты $\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$, являющейся структурным аналогом янтарной кислоты:



Янтарная к-та**фумаровая к-та**

Ход работы. 1. Для получения ферментного препарата 1-2 г свежей мышцы, измельченной ножницами, растирают в ступке с небольшим количеством воды, затем мышечную кашицу переносят на двойной слой марли помещенной на воронку, и промывают 25 мл дистиллированной воды. Промытую кашицу отжимают, переносят в пробирку и суспендируют стеклянной палочкой с 4 мл воды. Полученную суспензию равномерно разливают в четыре пробирки.

2. Содержимое первой пробирки кипятят в течение 1-2 мин для инактивации фермента. Затем в пробирки приливают реактивы по схеме, приведенной в таблице.

№ пробы	Сукцинат, мл	H ₂ O, мл	Малонат, мл	Краситель
1	1	0,5	-	2 капли
2	1	0,5	-	то же
3	-	1,5	-	«
4	1	-	0,5	«

Через 15 мин наблюдают исчезновение синей окраски только во второй пробирке.

Практическое занятие № 13.

Тема: Биохимия молока.

4. Цель: Обсудить со студентами вопрос о том, что представляет собой регуляция лактации. Белки молока, их значение. Основные компоненты молока.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Регуляция лактации;
- Белки молока, их значение;
- Основные липиды молока их значение;
- Витамины и минеральные соединения молока;
- Защитные факторы молока, их клинико-диагностическое значение;
- Гормоны и другие, биологически активные соединения молока;
- Реакции на компоненты молока.

6. Перечень вопросов.

1. Регуляция лактации;
2. Белки молока, их значение;
3. Основные липиды молока их значение;
4. Витамины и минеральные соединения молока;

5. Защитные факторы молока, их клинико-диагностическое значение;
6. Гормоны и другие, биологически активные соединения молока;
7. Реакции на компоненты молока.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Регуляция лактации.
 - 2) Вопрос № 2. Белки молока, их значение.
 - 3) Вопрос № 3. Основные липиды молока их значение.
 - 4) Вопрос № 4. Витамины и минеральные соединения молока.
 - 5) Вопрос № 5. Защитные факторы молока, их клинико-диагностическое значение.
 - 6) Вопрос № 6. Гормоны и другие, биологически активные соединения молока.
 - 7) Вопрос № 7. Реакции на компоненты молока.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть.
 1. Лабораторная работа: Выделение казеина из молока.
 2. Лабораторная работа: Определение плотности молока.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Выделение казеина из молока».

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА. В пробирку, содержащую 4,5 мл смеси фолча, приливают 0,05 мл молока, тщательно встряхивают в течении 1 минуты, центрифугируют при скорости 3000 об/мин в течении 5 минут и супернатант сливают. К осадку добавляют 1 мл биуретового реактива, тщательно перемешивают и оставляют на 30 минут при комнатной температуре для развития реакции. Пробы фотометрируют против биуретового реактива на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОГО ВЕСА МОЛОКА. Определение производится с помощью ареометра. Для анализа молоко наливают в специальный цилиндр и по уровню погружения ареометра определяют удельный вес молока

Удельный вес коровьего молока – 1,028; женского молока – 1,026

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРАЦИОННОЙ КИСЛОТНОСТИ МОЛОКА. Титрационной кислотностью молока называют количество 0,1 Н раствора едкого натра необходимое для титрования по фенолфталеину 100 мл молока. В две

конические колбы отмеривают пипеткой по 10 мл молока. Добавляют по две три капли фенолфталеина. Содержимое одной колбы титруют из микробюретки 0,1 N раствором едкого натра до слабо – розовой окраски. Для того чтобы заметить появление этой окраски, цвет титруемой жидкости сравнивают с цветом молока в другой колбе. Титрационную кислотность вычисляют по пропорции:

$$\frac{a}{x} = \frac{10}{100}$$

где:

a – количество раствора едкого натра, пошедшего на титрование, мл.

10 – объем молока взятый для анализа, мл.

x – титрационная кислотность.

Кислотность женского молока – 5 – 9
коровьего – 17 – 18

Практическое занятие № 14.

Тема: Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата).

4. Цель: Обсудить со студентами вопрос о том, что представляет собой процесс биологического окисления, где он протекает и каковы его функции. Какие ферменты принимают участие в переносе электронов от субстратов к молекулярному кислороду. Понятие окислительное фосфорилирование, его взаимосвязь с митохондриями, ознакомить студентов со строением и функциями митохондрии и их разобщением. Разобраться в том, что представляет собой дыхательная цепь, где она локализована и каковы ее функции. Объяснить принцип метода количественного определения макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата) и ход работы.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать сущность биологического окисления в организме человека;
- Знать какие ферменты участвуют в переносе атомов водорода от субстратов на молекулярный кислород;
- Знать, что называют окислительным фосфорилированием, пути его разобщения;
- Знать, что из себя представляет дыхательная цепь, локализацию, функции;
- Уметь определять содержание макроэргических соединений в мышцах (АТФ и креатинфосфата).

6. Перечень вопросов.

1. Обмен энергии. Понятие о биологическом окислении.
2. Ферменты биологического окисления.
3. Дыхательная цепь, основной путь синтеза АТФ в организме.
4. Окислительно-восстановительный потенциал переноса электронов

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Обмен энергии. Понятие о биологическом окислении.
 - а) Энергетический обмен;
 - б) Биологическое окисление.
 - 2) Вопрос № 2. Ферменты биологического окисления.
 - а) НАД – зависимые дегидрогеназы;
 - б) ФАД – зависимые дегидрогеназы;
 - с) Ферменты дыхательной цепи.
 - 3) Вопрос № 3. Дыхательная цепь, основной путь синтеза АТФ в организме.
 - а) Строение и локализация дыхательной цепи;
 - б) Пути синтеза АТФ в организме.
 - 4) Вопрос № 4. Окислительно-восстановительный потенциал переноса электронов.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата).
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата)».

В мышечной ткани содержится два макроэргических соединения – АТФ и креатинфосфат, которые обеспечивает мышцу энергией.

Основным путем образования АТФ в тканях является окислительное фосфорилирование в процессе тканевого дыхания. Креатинфосфат образуется в мышце при участии АТФ в состоянии покоя и служит резервом высокоэргического фосфата для синтеза АТФ из АДФ при активной мышечной работе.

Принцип метода количественного определения макроэргических соединений основан на том, что два последних остатка фосфорной кислоты в АТФ, богатые энергией, легко отщепляются при непродолжительном гидролизе в кислой среде. Сравнение содержания неорганического фосфата в пробах до гидролиза и после дает представление о количестве лабильно связанного фосфора, которое приходится на долю макроэргических соединений мышц.

Количество фосфора определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты.

Ход работы. 1. 0,5 г мышечной кашицы помещают в пробирку, стоящую в ледяной бане, и добавляют в нее 5 мл охлажденного раствора ТХУ. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой для экстрагирования АТФ и креатинфосфата в течение 5 мин. Экстракт фильтруют в мерную пробирку, стоящую в ледяной бане.

Остаток мышечной кашицы в пробирке заливают 5 мл дистиллированной воды и продолжают экстракцию 5 мин на холоду. Полученный экстракт фильтруют в ту же мерную пробирку и доводят общий объем до 10 мл дистиллированной водой.

2. В две пробирки отбирают по 0,5 мл безбелкового фильтрата. Первая пробирка – контрольная, вторая – опытная.

В опытную пробирку добавляют 1 мл 1 моль/л HCl , закрывают фольгой и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин для гидролиза фосфорных связей. Затем раствор охлаждают и добавляют 1 мл 1 моль/л NaOH .

В контрольную пробирку (без предварительного кипячения) добавляют 1 мл 1 моль/л раствора HCl и 1 мл 1 моль/л раствора NaOH .

В опытную и контрольную пробирки добавляют из бюретки по 7,5 мл дистиллированной воды для получения объема 10 мл.

3. Дальнейшие процедуры обязательно проводят одновременно с опытной и контрольной пробами. Из обеих пробирок отбирают по 5 мл жидкости, переносят в две другие пробирки и добавляют в каждую из них по 0,5 мл раствора молибдата аммония, 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты и по 2 мл дистиллированной воды. Смесь в каждой пробирке быстро перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре точно 10 мин.

4. Контрольную и опытную пробы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром (длина волны 670 нм) против воды. В опытной пробе (после гидролиза) определяемый неорганический фосфор представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и фосфатных солей, присутствующих в тканях. В контрольной пробе – только фосфатные соли.

5. Вычитают из оптической плотности, найденной для опытной пробы, оптическую плотность, полученную для контрольной пробы. Концентрацию

лабильно связанного неорганического фосфора в пробе находят по калибровочному графику.

Практическое занятие № 15.

Тема: Цитохромоксидаза мышц.

4. Цель: Объяснить значение ферментативного действия цитохромоксидазы мышц, локализацию фермента в клетке и молекулярный механизм действия цепи переноса электронов (ЦПЭ). Объяснить сущность процесса биологического окисления, окислительного фосфорилирования, регуляции этих процессов. Обсудить со студентами необходимость умения использования механизма дыхания, его связи с питанием и анализа патологических состояний, возникающих при различных типах гипоксии.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Продемонстрировать в опыте ферментативное действие цитохромоксидазы мышц, закрепить знания о локализации фермента в клетке, его строении и функциях;
- Уметь использовать знания о процессе окислительного фосфорилирования, дыхательном контроле для анализа патологических состояний, связанных с нарушением нормальных условий жизнедеятельности (питания, динамики гипоксии обмена веществ и др.).

6. Перечень вопросов.

1. Окислительное фосфорилирование, регуляция.
2. Основные пути синтеза АТФ.
3. Дыхательный контроль.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Окислительное фосфорилирование, регуляция.
 - а) Образование трансмембранного потенциала;
 - б) Фосфорилирование, сопряженное с процессом окисления.
 - 2) Вопрос № 2. Основные пути синтеза АТФ.
 - а) Путь окислительного фосфорилирования;
 - б) Путь субстратного фосфорилирования.

- 3) Вопрос № 3. Дыхательный контроль.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
 - IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
 - V. Практическая часть. Лабораторная работа: Цитохромоксидаза мышц.
 - VI. Оценка знаний студентов
 - VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Цитохромоксидаза мышц».

Цитохромоксидаза мышц является заключительным звеном цепи переноса электронов и катализирует перенос электронов на кислород воздуха. По химической природе цитохромоксидаза является медьгемопротеином, т.е. белком, содержащим гем и медь в составе простетической группе. Цитохромоксидаза, как и цитохрома, прочно связана с клеточными структурами. Принцип обнаружения ферментативного действия цитохромоксидазы мышц. Фенилендиамин с α -нафтом в составе индофенольного реактива «Нади» при взаимодействии с мышечной тканью образует продукт окисления и конденсации α -нафтола и п-фенилендиамина, обладающий сине-фиолетовым цветом.

Ход работы. 1. Для получения ферментативного парата 0,3-0,5 г свежей мышцы растирают в ступке с 20-кратным объемом дистиллированной воды, воду осторожно сливают, после чего мышечную кашицу отжимают между листиками фильтровальной бумаги.

2. Отмытую от редуцирующих веществ и водорастворимых ферментов мышечную кашицу делят на две части. Одну часть помещают на фильтровальную бумагу, а другую – в пробирку, добавляют 1 мл дистиллированной воды и кипятят в течение 1 мин. После остывания жидкость осторожно сливают из пробирки, а мышцу стеклянной палочкой переносят на фильтровальную бумагу.

3. На обе порции мышц наносят по 1-2 капли индофенольного реактива «Нади», представляющего собой смесь п-фенилендиамина и α -нафтола. Через 5 – 10 мин на одной порции мышечной кашицы появляется синефиолетовое окрашивание, обусловленное образованием индофенолового синего – продукта окисления и конденсации α -нафтола и п-фенилендиамина:

Эта реакция катализируется цитохромоксидазой мышц. На прокипяченной порции мышечной кашицы окрашивания не появляется вследствие тепловой денатурации фермента.

Практическое занятие № 16.

Тема: Количественное определение пировиноградной кислоты в сыворотке крови и моче.

4. Цель: Обсудить со студентами общие пути катаболизма. Объяснить студентам значение окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты, как одного из главных метаболитов промежуточного обмена веществ. Обсудить со студентами значение единства процессов, протекающих в общем пути катаболизма и дыхательной цепи.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Определять концентрацию пирувата в моче и сыворотке крови, знать клинко-диагностическое значение определения пирувата - основного субстрата общего пути катаболизма;
- Закрепить знания о строении и роли АТФ как основного макроэнергетического соединения организма;
- Уметь использовать знания о биологическом окислении для объяснения механизма дыхания, его связи с питанием и анализа патологических состояний, возникающих при различных гипоксиях.

6. перечень вопросов.

1. Общие пути катаболизма.
2. Значение катаболизма.
3. Окислительное декарбоксилирование пирувата.
4. Цикл Кребса, функции, регуляция.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Общие пути катаболизма.
 - а) Специфические и общие пути катаболизма.
 - 2) Вопрос № 2. Значение катаболизма.
 - а) Путь поставки водорода в дыхательную цепь;
 - б) Единство общего пути катаболизма и дыхательной цепи.
 - 3) Вопрос № 3. Окислительное декарбоксилирование пирувата.
 - а) Последовательность реакций;
 - б) Строение и локализация пируватдегидрогеназного комплекса.
 - 4) Вопрос № 4. Цикл Кребса, функции, регуляция.
 - а) Последовательность реакций цикла Кребса;
 - б) Значение цикла, регуляция.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.

- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Количественное определение пировиноградной кислоты в сыворотке крови и моче.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Количественное определение пировиноградной кислоты в сыворотке крови и моче».

Пировиноградная кислота является одним из главных метаболитов промежуточного обмена веществ. Содержание пирувата в крови здорового человека колеблется от 0,4 до 1,2 мг в децилитре крови (0,05-0,14 ммоль/л), а в моче – от 10 до 25 мг в суточном диурезе.

При таких заболеваниях, как сахарный диабет, паренхиматозные заболевания печени, сердечная недостаточность, а также при усиленной физической нагрузке и недостатке витамина В₁ содержание пирувата в крови повышается в 3-4 раза. Повышенное содержание пирувата токсично для организма.

Метод основан на том, что пировиноградная кислота при взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином в кислой среде образует 2,4-динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты:



Образующееся соединение в щелочной среде приобретает коричнево-красную, интенсивность которой прямо пропорциональна содержанию пировиноградной кислоты.

Этим методом можно определять пировиноградную кислоту в сыворотке крови или в моче.

Ход работы. 1. Готовят 3 пробирки. В первую (опытную) приливают 1 мл мочи (или 1 мл сыворотки), в две другие (контрольные) приливают по 1 мл дистиллированной воды.

Во все три пробирки добавляют по 0,5 мл 0,1%-ного раствора 2,4-динитрофенилгидразина (**осторожно, концентрированная соляная кислота!**), перемешивают и оставляют стоять на 5 мин.

2. По истечении этого времени прибавляют с помощью мерного цилиндра по 3 мл толуола в каждую пробирку. Пробирки закрывают пробками, обернутыми в фольгу, встряхивают в течение 3 мин и оставляют на столе на 2 мин до четкого появления двух фаз: нижняя – вода, верхняя – толуол.

Верхний слой отсасывают пипеткой с резиновым колпачком в несколько приемов, стараясь не перемешивать слои, и переносят в сухую пробирку. Не нужно стараться перенести весь слой толуола, важно собрать несколько больше 1 мл жидкости.

3. Из собранной жидкости мерной пипеткой отбирают точно 1 мл и переносят в сухую пробирку. Точно так же поступают и с двумя контрольными пробами. К содержимому всех трех пробирок приливают по 2 мл спиртового раствора гидроксида калия с помощью мерного цилиндра. Спустя 10 мин пробы колориметрируют на ФЭКе со светофильтром № 4 в кюветах с толщиной слоя 1 см.

Расчет. Содержание пирувата в пробе определяют по калибровочному графику, а затем для мочи пересчитывают на суточный диурез (т.е. умножают на 1500), получая ответ в миллиграммах на 1500 мл. Если работу выполняли с сывороткой, производят расчет на 1 л сыворотки.

Практическое занятие № 17

Тема: Обмен углеводов. переваривание углеводов.

4. Цель: Научить студентов методам выделения и обнаружения гликогена печени. Изучить процессы переваривания и усвоения углеводов организмом.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать строение, функции основных углеводов, поступающих с пищей.
- Знать реакции синтеза и распада гликогена в печени и в мышцах и регуляцию этих процессов
- Объяснить патогенез заболеваний, связанных с нарушением обмена углеводов (лактоземия, гликогенозы, агликогенозы)

6. Перечень вопросов:

1. Основные углеводы пищи, их переваривание, всасывание в организме
2. Непереносимость молока
3. Судьба углеводов, всасывавшихся в ткани
4. Синтез и распад гликогена в печени и в мышцах. Регуляция
5. Гликогенные болезни (гликогенозы и агликогенозы)

7. План занятия:

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Основные углеводы пищи, их переваривание и в организме
 - ж) Классификация углеводов. Значение углеводов для жизнедеятельности организма.
 - к) Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте. Ферменты.

- 2) Вопрос № 2. Непереносимость молока.
 - а) Лактоземия, причины.
 - б) Пути устранения признаков лактоземии.
- 3) Вопрос № 3. Судьба углеводов всосавшихся в ткани.
- 4) Вопрос № 4. Синтез и распад гликогена в печени и в мышцах. Регуляция.
 - а) Последовательность реакции синтеза гликогена, участие ферментов. Гормональная регуляция.
 - б) Распад гликогена в печени и в мышцах. Участие ферментов. Гормональная регуляция.
- 5) Вопрос № 5. Гликогенные болезни (гликогенозы и агликогенозы).
 - а) Виды гликогенозов. Причины возникновения.
 - б) Агликогенозы. Причины возникновения.
 - с) Клинические проявления гликогенозов и агликогенозов.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть.
 1. Лабораторная работа: Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте.
 2. Лабораторная работа: Выделение гликогена из печени.
- VI. Оценка занятий студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа:

1. работа. Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте.

Целью работы является изучение влияния слюны, желудочного сока и панкреатина (ферментного препарата, полученного из поджелудочной железы) на полисахариды пищи: крахмал и целлюлозу.

Ход работы. 1. Готовят пробы соответственно таблице:

№ пробы	Р-р крахмала, мл	Суспензия целлюлозы, мл	Слюна, мл	Желудочный сок, мл	Панкреатин, мл
1	1,0	-	1,0	-	-
2	-	1,0	1,0	-	-
3	1,0	-	-	1,0	-
4	-	1,0	-	1,0	-
5	1,0	-	1,0	1,0	-
6	-	1,0	1,0	1,0	-
7	1,0	-	-	-	2,0
8	-	1,0	-	-	2,0

Для инкубации пробирки помещают в термостат при 37⁰С на 30 мин. После инкубации содержимое каждой пробирки анализируют на присутствие продуктов расщепления полисахарида с помощью реакции Троммера. Для этого в каждую из 8 пробирок добавляют по 1 мл 10%-ного раствора сульфата меди. Осторожно нагревают верхнюю часть раствора в пробирке до закипания на газовой горелке и

кипятят в течение 1 мин. Появление красного осадка оксида меди (1) указывает на положительную реакцию Троммера в присутствии глюкозы и мальтозы.

2. работа. Выделение гликогена из печени.

Гликоген представляет собой белый порошок, хорошо растворяющийся в воде с образованием коллоидного раствора. Гликоген, подобно белкам, обладает резко выраженными гидрофильными свойствами, поэтому его можно легко осадить из растворов при высаливании солями щелочных и щелочно-земельных металлов, солями тяжелых металлов, спиртом. В печени человека при нормальном питании запасается 80-120 г гликогена. При голодании в течение суток почти весь запас гликогена расходуется и его не удастся обнаружить обычными качественными реакциями.

Метод основан на том, что гликоген хорошо растворим в воде и достаточно устойчив в слабокислой среде. Поэтому подвергают разрушению ткани и экстракции гликогена 5%-ным раствором ТХУ. Основная масса белков при процедуре денатурирует и их легко удалить из раствора фильтрованием.

Ход работы. 1. В опыте используют печень сытого и голодного животных. Печень забитых животных быстро извлекают, разрезают на тонкие пласты и немедленно опускают в стаканы с кипящим физиологическим раствором для инактивации фермента фосфорилазы гликогена. Дальнейшее исследование печени сытого и голодающего животного проводится параллельно.

2. Освешивают на весах 0,5 г печени, помещают в ступку, заливают 3 мл 5%-ного раствора ТХУ и растирают пестиком в течение 10 мин. Затем к экстракту примешивают и фильтруют через смоченный водой бумажный фильтр в чистую пробирку.

3. С полученными фильтратами выполняют качественные реакции на гликоген. А) в одну пробирку наливают 1 мл дистиллированной воды, во вторую и третью пробирку – по 1 мл фильтратов. После этого в каждую пробирку добавляют по 1-2 капли раствора Люголя и сравнивают окраску.

Б) в три пробирки наливают по 10 капель фильтрата, полученного из печени сытого животного, и проводят реакции осаждения. Для этого в первую пробирку приливают 10 капель 10%-ного раствора ацетата свинца, в третью насыпают порошок сульфата аммония до полного насыщения (т.е. до тех пор, пока на дне пробирки останутся не растворяющиеся кристаллы соли). Наблюдают: выпадает ли осадок.

Те же реакции выполняются с фильтратом, полученным из печени голодавшего животного.

Практическое занятие № 18

Тема: Обмен углеводов. Значение гликолиза. Биосинтез глюкозы. Регуляция гликолиза и глюконеогенеза.

4. Цель:

Научить студентов методу определения лактата – конечного продукта гликолиза в мышцах. Ознакомить студентов с путями превращения углеводов в клетках в аэробных и анаэробных условиях и значением этих процессов для жизнедеятельности организма.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- знать реакции аэробного и анаэробного гликолиза, физиологическое значение;
- знать реакции гликогенолиза и его физиологическое значение;
- знать механизмы переноса водорода из цитозоля в митохондрии;
- знать реакции глюконеогенеза;
- знать ключевые ферменты гликолиза и глюконеогенеза и их регуляцию.

6. Перечень вопросов.

1. Аэробный гликолиз, его физиологическое значение;
2. Механизмы переноса водорода из цитозоля в митохондрии;
3. Анаэробный гликолиз, его значение. Гликогенолиз и его взаимосвязь с гликолизом;
4. Глюконеогенез. Образование глюкозы из молочной кислоты. Цикл Кори;
5. Ключевые ферменты гликолиза и глюконеогенеза, их регуляция.

7. План занятия

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов:
 - 1) Вопрос 1. Аэробный гликолиз и его физиологическое значение.
 - а) реакции аэробного гликолиза, ферменты;
 - б) энергетический эффект аэробного распада глюкозы.
 - 2) Вопрос 2. Механизм переноса водорода из цитозоля в митохондрии.
 - а) В чем заключается необходимость челночных механизмов переноса водорода от НАДН₂ в митохондрии;

- b) Глицеролфосфатный и малатаспартатный механизмы переноса водорода, вклад их в энергетический статус организма.
- 3) Вопрос 3. Анаэробный гликолиз, значение. Гликогенолиз и его взаимосвязь с гликолизом.
 - a) Реакции анаэробного гликолиза, отличие их от аэробного гликолиза;
 - b) Гликогенолиз и его взаимосвязь с гликолизом.
 - c) Энергетический эффект гликолиза и гликогенолиза.
- 4) Вопрос 4. Глюконеогенез. Образование глюкозы из молочной кислоты. Цикл Кори.
 - a) Реакции глюконеогенеза. Его взаимосвязь с гликолизом.
 - b) Ключевые ферменты гликолиза и глюконеогенеза.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа – анаэробный гликолиз в мышечной ткани.
- VI. Оценка занятий студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа:

Анаэробный гликолиз в мышечной ткани.

Обнаружение в пробе молочной кислоты после инкубации глюкозы в присутствии ферментов мышечной кашицы свидетельствует о протекании гликолиза в мышце. Молочную кислоту можно открыть в реакции с вератролом (диметиловый эфир пирокатехина). Предварительно молочная кислота под действием крепкой серной кислоты превращается в уксусный альдегид, который при взаимодействии с вератролом дает окрашенное соединение.

Ход работы. 1. Приготовление инкубационной смеси. В две пробирки (опытную и контрольную) приливают по 3 мл фосфатного буфера рН 8,0 и по 1 мл 1%-ного раствора глюкозы. В контрольную пробирку приливают 1 мл 10%-ного раствора ТХУ для предотвращения действия ферментов гликолиза. Содержимое пробирок хорошо перемешивают.

В обе пробирки добавляют по 1 г измельченной ножницами свежеприготовленной мышечной кашицы и доливают по 8-10 капель вазелинового масла для разобщения инкубационной смеси с кислородом воздуха. Обе пробирки инкубируют в термостате при 37° в течение 1,5 ч.

2. Осаждение белков. По окончании инкубации пробирки вынимают из термостата. В опытную пробирку добавляют 1 мл 10%-ного раствора ТХУ для осаждения белков и прекращения гликолиза. Содержимое каждой пробирки отфильтровывают в две чистые пронумерованные пробирки.

3. Осаждение углеводов. В две пробирки, содержащие безбелковый фильтрат, добавляют по 1 мл полунасыщенного раствора сульфата меди и по 0,5 г порошка гидроксида кальция. Пробирки закрывают пробками, встряхивают в течение 15 мин и фильтруют через фильтр, смоченный водой. Осадок на фильтре отбрасывают. С помощью этой процедуры удаляют избыток глюкозы из раствора.

4. Обнаружение молочной кислоты. Пробирки с фильтратом помещают в воду со льдом и медленно, по каплям, добавляют по 1 мл концентрированной серной кислоты. Пробирки следует все время осторожно встряхивать и следить, чтобы их содержимое не нагревалось. Для ускорения процесса окисления молочной кислоты обе пробирки переносят в кипящую баню на 4 мин, а затем быстро охлаждают в ледяной воде. После охлаждения в каждую пробирку добавляют по 1-2 капли 0,1%-ного раствора вератрола, осторожно встряхивают несколько минут. В опытной пробе развивается ярко-розовое окрашивание, так как произошел гликолиз под влиянием ферментов мышечной ткани. В контрольной пробе окраска слабо-розовая за счет молочной кислоты, которая присутствовала в мышечной каше до начала опыта.

Практическое занятие № 19

Тема: Обмен фруктозы и галактозы. Значение пентозофосфатного цикла превращения глюкозы.

4. Цель:

- Научить студентов методу определения сахара в крови О-толуидиновым методом.
- Ознакомить студентов с метаболическими превращениями фруктозы, галактозы и глюкозы, что необходимо для диагностики и контроля лечения.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать пути превращения фруктозы и галактозы в тканях;
- Знать причины фруктоземии и галактоземии;
- Знать реакции пентозофосфатного цикла, регуляцию и причину возникновения гемолитической анемии;
- Знать регуляцию сахара в крови и метод определения сахара в крови О-толуидиновым методом;
- Иметь понятие о гликопротеинах;

6. Перечень вопросов:

1. Обмен фруктозы и галактозы. Наследственные фруктоземия и галактоземия;

2. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы, значение;
3. Регуляция сахара в крови;
4. Гликопротеины и протеогликианы, понятие об углеводной части их.

7. План занятия:

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Обмен фруктозы и галактозы. Наследственные фруктоземия и галактоземия.
 - а) Источники фруктозы, реакции превращения фруктозы и ферменты, катализирующие их;
 - б) Причины возникновения фруктоземии;
 - с) Поступление в организм галактозы. Пути превращения галактозы в организме, ферменты;
 - д) Причины возникновения галактоземии. Проявления этого заболевания.
 - 2) Вопрос № 2. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы, значение.
 - а) Реакции пентозофосфатного цикла. Распространенность в организме.
 - б) Значение метаболитов пентозофосфатного цикла. Причина возникновения гемолитической анемии.
 - 3) Вопрос № 3. Регуляция сахара в крови.
 - а) Пути мобилизации и депонирования глюкозы в организме.
 - б) Гормональная регуляция сахара в крови.
 - 4) Вопрос № 4. Гликопротеины и протеогликианы. Понятие об их углеводной части.
 - а) Значение гликопротеинов и протеогликанов в жизнедеятельности клеток
 - б) Значение углеводной части гликопротеинов и протеогликанов.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Определение сахара в крови по цветной реакции с О-толуидином (метод Hulmann'a).
- VI. Оценка занятий студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа:

1. Определение сахара в крови по цветной реакции с о-толуидином (метод Hulmann'a)

Метод состоит в колориметрическом определении интенсивности окрашивания раствора образующегося при нагревании о-толуидина с глюкозой в присутствии уксусной кислоты. Метод является специфическим и дает возможность определять «истинную» глюкозу, так как другие редуцирующие

вещества крови (глутатион, глюкуроновая кислота, аскорбиновая кислота и др.) с о-толуидиновым реактивом не дают окрашивания:

Ход работы. 1. В три пробирки (одна из них – центрифужная) отмеривают по 1,8 мл раствора ТХУК. В первую (центрифужную) пробирку прибавляют 0,2 мл крови (опытная проба), во вторую – 0,2 мл стандартного раствора глюкозы (стандартная проба) и в третью – 0,2 мл воды (контрольная проба).

Содержимое пробирок перемешивают и опытную пробу (с кровью) центрифугируют в течение 10 мин при 2500-3000 об/мин. Центрифугат сливают в сухую пробирку. Осадок белка в опытной пробе можно отделить путем фильтрования в сухую пробирку через маленький бумажный фильтр.

2. Из каждой пробы отбирают по 0,5 мл раствора, переносят в другие пробирки, помеченные соответственно стеклогграфом, и добавляют во все пробирки по 4,5 мл о-толуидинового реактива. Пробирки закрывают кусочками фольги вместо пробок. Растворы перемешивают и помещают в кипящую водяную баню точно на 8 мин. После этого пробирки охлаждают под водопроводной водой и измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб на ФЭКе с красным светофильтром (длина волны 670 нм) в кювете с толщиной слоя 1 см против контрольной пробы.

Расчет производят по формуле

$$c_{\text{оп}} = c_{\text{ст}} \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}}$$

где $c_{\text{оп}}$ – концентрация глюкозы в крови, ммоль/л; $c_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора глюкозы, ммоль/л; $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытной пробы; $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандартной пробы.

В норме содержание глюкозы в крови 3,3 – 5,5 ммоль/л.

Практическое занятие № 21

Тема: Обмен липидов. Переваривание и всасывание липидов.

4. Цель:

Ознакомить студентов с процессами переваривания, всасывания липидов и транспорта липидов в организме.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать состав липидов, переваривание, всасывание липидов в желудочно-кишечном тракте, значение желчи в этих процессах;
- Знать процессы метаболизма глицерина и жирных кислот в организме;

- Знать синтез, значение липопротеинов и липопротеинлипазы в метаболизме липидов.

6. Перечень вопросов.

1. Основные липиды пищи и организма. Значение липидов для организма.
2. Окисление жирных кислот, регуляция.
3. Окисление глицерина.
4. Синтез хиломикронов и участие в транспорте жиров.
5. Липопротеины крови. Значение липопротеинлипазы.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 6) Вопрос № 1. Основные липиды пищи и организма. Значение липидов для организма.
 - а) Классификация липидов. Источники липидов в организме;
 - б) Переваривание липидов в желудочно-кишечном тракте, ферменты. Значение желчи;
 - с) Функции липидов в организме.
 - 7) Вопрос № 2. Окисление жирных кислот, регуляция
 - а) Виды жирных кислот;
 - б) В-окисление жирных кислот. Энергетический эффект.
 - 8) Вопрос № 3. Окисление глицерина.
 - с) Превращение глицерина, значение.
 - 9) Вопрос № 4. Синтез липопротеинов, участие в транспорте жиров. Значение липопротеинлипазы.
 - а) Виды липопротеинов, их состав;
 - б) Значение липопротеинов в транспорте липидов.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть.
 1. Лабораторная работа: Качественные реакции на желчные кислоты.
 2. Лабораторная работа: Влияние желчи на активность липазы.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Качественные реакции на желчные кислоты»

Ход работы. 1. Влияние желчи на поверхностное натяжение воды. В пробирку с 1-2 мл воды насыпают щепотку тонкого порошка серы (серный цвет) –

порошок остается плавать на поверхности воды. В другую пробирку к 1-2 мл воды добавляют 5-10 капель желчи, смешивают и насыпают щепотку порошка серы – порошок тонет; это обусловлено тем, что содержащиеся в желчи соли желчных кислот понижают поверхностное натяжение воды.

Способностью желчнокислых солей понижать поверхностное натяжение воды и растворять некоторые трудно-растворимые в воде соединения обусловлено прохождением жира через бумажный фильтр, смоченный раствором желчи, тогда как через фильтр, смоченный водой, жир не проходит. Эти действия желчнокислых солей имеют значение и при всасывании жиров в кишечнике.

2. Реакция на желчные кислоты (реакция Петтенкофера). В пробирку наливают 10-20 капель концентрированной серной кислоты и осторожно наливают равный объем желчи, смешанной в отдельной пробирке с 1 каплей свежеприготовленного раствора тростникового сахара. На границе раздела жидкостей образуется осадок желчных кислот и появляется красновато-фиолетовое кольцо. При осторожном смешивании обеих жидкостей, так чтобы не происходило саморазогревание свыше 70°C^* , жидкость принимает вишнево-красную окраску, которая при взбалтывании на воздухе быстро темнеет и приобретает пурпурный цвет.

Окраска обусловлена взаимодействием хелевой кислоты с оксиметилфуролом, образующимся из тростникового сахара под действием серной кислоты. Надо избегать избытка сахара и нагревания выше 70°C ; так как может наступить обугливание, затемняющее окраску.

Лабораторная работа: «Исследование действия липазы поджелудочной железы. Влияние желчи на активность липазы»

Жиры или триацилглицерины практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонком кишечнике происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой. Существует несколько типов панкреатических липаз. Одни из них специфичны в отношении эфирных связей в α -положении триацилглицерина, а другие гидролизуют связи в β -положении. Полный гидролиз триацилглицеринов происходит постадийно: сначала ферментами атакуются α - и α_1 -связи, а затем более медленно гидролизуются β -моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты и моноглицерины) всасываются в стенки кишечника.

В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых подуктов переваривания.

Для наблюдения за действием липазы используют растертую с водой свежемороженную поджелудочную железу или приготовленную из нее глицериновую вытяжку липазы.

Для изучения действия липазы готовят смесь липазы с жиром (молоко или подсолнечное масло) и определяют количество жирных кислот, образовавшихся в результате расщепления жира через различные, от начала опыта, промежутки времени. Количество жирных кислот определяют титрованием 0,01 моль/л раствором NaOH в присутствии фенолфталеина.

Ход работы. 1. Готоят три колбы – две опытные и одну контрольную. В них смешивают препарат липазы и субстрат (молоко или подсолнечное масло), как указано в таблице:

Компоненты инкубационной смеси	Опытная проба, мл	Опытная проба с желчью, мл	Контрольная проба, мл
Молоко (разведенное 1:10)	10	10	10
Глицериновая вытяжка из пожелудочной железы	1	1	1 (предварительно прокипятить 10 мин)
Раствор желчи	-	1	1
H ₂ O	1	-	1

2. Приготовленные инкубационные смеси тщательно перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 2 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. Добавляют в каждый стаканчик по 1-2 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. При первом титровании нейтрализуются органические кислоты – молочная и другие, которые присутствовали в молоке до начала действия липазы.

3. Оставшуюся смесь в колбах помещают в термостат, температура которого 38-40⁰C, и через определенные интервалы времени (15, 30, 90 мин) отбирают из каждой колбы (не вынимая их из термостата) по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л раствором гидроксида натрия. Время титрования и объем израсходованного гидроксида натрия фиксируют в таблице:

Время инкубации, мин	Объем 0,01 моль/л NaOH, пошедшего на титрование, мл		
	Опытная проба без желчи	Опытная проба с желчью	контроль
15			
30			
90			

Результаты первого титрования, полученные до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований.

4. На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в минутах), а по оси ординат – активность липазы, выраженную объемом 0,01 моль/л раствора гидроксида натрия (в миллилитрах), пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени. Сравнивают активность липазы в присутствии желчи и без нее.

Практическое занятие № 22

Тема: Промежуточный обмен липидов.

Количество часов – 4 ч.

4. Цель:

Ознакомить студентов с путями превращения жиров, их функциями.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать пути депонирования и мобилизации жиров;
- Знать реакции биосинтеза жирных кислот;
- Знать значение структурных компонентов мембран – фосфолипидов и гликолипидов.

6. Перечень вопросов.

1. Депонирование и мобилизация жиров.
2. Синтез жирных кислот.
3. Основные фосфолипиды и гликолипиды организма, их функции.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Депонирование и мобилизация липидов. Регуляция.
 - а) Источники накопления жиров в жировом депо. Значение депонированного жира;
 - б) Регуляция мобилизации липидов из запаса.
 - 2) Вопрос № 2. Биосинтез жирных кислот. Регуляция.
 - а) Реакции синтеза жирных кислот;
 - б) Регуляция этого процесса. Значение пентозофосфатного цикла окисления глюкозы.
 - 3) Вопрос № 3. Основные фосфолипиды и гликолипиды организма, их функции.
 - а) Строение и функции фосфолипидов;
 - б) Строение и функции гликолипидов.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Качественные реакции на продукты гидролиза лецитина.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Выделение лецитинов и кефалинов из желтка курного яйца. Качественные реакции на структурные компоненты».

Лецитины и кефалины (холинфосфатиды и этаноламинфосфатиды) выделяют из сухого яичного желтка путем экстрагирования их спиртом при нагревании. Затем в кислотном гидролизате спиртовой вытяжки с помощью качественных реакций обнаруживают структурные компоненты лецитинов.

Ход работы. 1. Выделение лецитинов и кефалинов (холин- и этаноламинфосфатидов). 1 г высушенного на воздухе желтка куриного яйца помещают в пробирку с обратным холодильником, наливают 5 мл этилового спирта и пробирку ставят в заранее нагретую до 70-75⁰С водяную баню (огонь под баней должен быть погашен, так как иначе могут загореться пары спирта). Пробирку держат в бане 10 мин, считая от момента закипания спирта, время от времени встряхивая содержимое пробирки. Происходит экстрагирование из желтка лецитинов и кефалинов и части пигментов. Спиртовая вытяжка при этом окрашивается в желтый цвет, а желток значительно обесцвечивается (если значительная часть спирта испарилась, то его следует долить).

После экстрагирования содержимое пробирки отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр. Если фильтрат оказывается мутным, то его фильтруют второй раз через тот же фильтр.

2. Гидролиз лецитинов и качественные реакции на их компоненты. К 1-2 мл спиртового экстракта добавляют равный объем раствора серной кислоты и кипятят 10-15 мин на водяной бане. Происходит гидролиз лецитинов с отщеплением свободного холина и жирных кислот.

а) Гидролизат охлаждают и наблюдают появление маслянистых капель на поверхности жидкости – это жирные кислоты.

б) Маленькую каплю гидролизата переносят пипеткой или палочкой на предметное стекло и прибавляют большую каплю насыщенного раствора йода в йодиде калия. Накрыв ее покровным стеклом, наблюдают под микроскопом образование кристаллов холина в виде косо срезанных пластинок и призм бурого цвета (кристаллы Флоранса).

в) Оставшийся экстракт упаривают в фарфоровой чашке на водяной бане. Остаток после упаривания растворяют в нескольких каплях концентрированной уксусной кислоты, добавляют кристаллик FeSO₄, 1 мл раствора пероксида водорода и слабо подогревают (мокрое озонирование). Реакция идет бурно. По окончании реакции (прекращение выделения пузырьков газа) экстракт фильтруют и фильтрат используют для качественной реакции на фосфатный остаток. К 1 капле фильтрата прибавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты и большой избыток (5-6 мл) раствора молибдата аммония, содержащего азотную кислоту, и

нагревают. При стоянии образуется желтый кристаллический осадок фосфономолибденового аммония.

Практическое занятие № 23

Тема: Обмен фосфолипидов и стероидов.

4. Цель: Ознакомить студентов с метаболизмом, функциями фосфо- и гликолипидов, стероидов.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать биосинтез фосфо- и гликолипидов
- Знать катаболизм фосфо- и гликолипидов;
- Знать значение и биологические свойства холестерина. Биосинтез холестерина.
- Знать значение ЛХАТ в обмене холестерина.

6. Перечень рассматриваемых вопросов.

1. Биосинтез и катаболизм фосфо- и гликолипидов.
2. Стероиды и стериды. Холестерин, значение и функции.
3. Биосинтез холестерина. Регуляция.
4. Транспорт холестерина в крови. Значение ЛХАТ.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Биосинтез и катаболизм фосфо- и гликолипидов.
 - а) Основные фосфолипиды и гликолипиды мембран и их функции;
 - б) Биосинтез фосфолипидов и гликолипидов в организме. Роль печени в данном процессе;
 - с) Катаболизм фосфо- и гликолипидов в организме.
 - 2) Вопрос № 2. Стероиды и стериды. Холестерин, значение и функции.
 - а) Функции стероидов и стеридов;
 - б) Функции холестерина в организме.
 - 3) Вопрос № 3. Биосинтез холестерина. Регуляция.
 - 4) Вопрос № 4. Транспорт холестерина. Значение ЛХАТ.
 - а) Значение липопротеинов в транспорте холестерина;
 - б) Значение фермента ЛХАТ-лецитинхолестеринаацилтрансферазы.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.

- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Определение концентрации общего холестерина по методу Ильяка.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Определение общего холестерина в сыворотке крови по методу Ильяка».

Содержание общего холестерина в сыворотке крови здорового человека колеблется в пределах 150-250 мг/дл (среднее значение 200 мг/дл). На эфиры холестерина с жирными кислотами приходится 60 – 70% от общего холестерина и 30-40% - на свободный холестерин. В сыворотке крови отношение свободного холестерина к эфирсвязанному - величина постоянная.

Увеличение содержания холестерина в плазме крови (гиперхолестеринемия) наблюдается при микседеме, менингитах, диабете, атеросклерозе, при некоторых заболеваниях печени. Описана также наследственная гиперхолестеринемия.

Снижение содержания холестерина в плазме (гипохолестеринемия) отмечается при хронической сердечной недостаточности, острых инфекционных заболеваниях, острых панкреатитах, гипертиреозе.

Метод основан на том, что холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот образует окрашенные продукты, интенсивность окраски которых определяется колориметрически.

Ход работы. В сухую пробирку (присутствие следов воды мешает развитию окраски) вносят 2 мл рабочего реактива (реактив отмеривают стеклянным цилиндром) и 0,1 мл негемолизированной сыворотки. Сыворотку добавляют медленно, так, чтобы она стекала по стенке пробирки. Пробирку энергично встряхивают 10-12 раз и помещают в термостат при 37⁰С на 20 мин.

Для приготовления контрольной пробы (одна-две пробы на группу) в сухую пробирку отмеривают 2 мл рабочего реактива.

Окраску растворов измеряют на ФЭКе против контроля с красным светофильтром.

Содержание холестерина в пробах определяют по калибровочной кривой.

Практическое занятие № 24.

Тема: Регуляция и нарушение липидного обмена.

- 4. **Цель:** Изучить механизмы резервирования и мобилизации жиров и их регуляции. А также нарушения липидного обмена: гиперхолестеринемия и ее роль в развитии атеросклероза, желчекаменную болезнь:

биохимические основы ее развитие и методы ее лечения, кетонемия, кетонурия, гиперлипидемия, ожирение, сфинголипидоз.

5. Задача.

После проведения занятия студенты должны знать:

- Определению общих липидов в сыворотке крови;
- Определению общего холестерина в сыворотке крови;
- Определению β -липопротеидов в сыворотке крови;
- Умению на основании полученных лабораторных показателей, грамотно ставить диагноз.

6. Перечень рассматриваемых вопросов.

1. Резервирование и мобилизация жиров, их регуляция.
2. Гиперхолестеринемия и ее роль в развитии атеросклероза.
3. Желчекаменная болезнь. Биохимические основы развития желчекаменной болезни и ее лечение.
4. Кетонемия, кетонурия, гиперлипидемия, ожирение, сфинголипидоз.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Резервирование и мобилизация жиров, их регуляция.
 - 2) Вопрос № 2. Гиперхолестеринемия и ее роль в развитии атеросклероза
 - 3) Вопрос № 3. Желчекаменная болезнь. Биохимические основы развития желчекаменной болезни и ее лечение.
 - 4) Вопрос № 4. Кетонемия, кетонурия, гиперлипидемия, ожирение, сфинголипидоз.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Метод определения общих липидов в сыворотке крови (метод Криницкого).
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Определение общих липидов в сыворотке крови».

Содержание общих липидов в сыворотке крови здоровых людей колеблется от 400 до 800 мг/дл. Липиды в плазме в основном находятся в форме липопротеинов. Увеличение содержания липопротеинов в сыворотке носит название гиперлипипротейнемия. Она наблюдается после приема пищи (через 4-5 ч) – это физиологическое явление (алиментарная гиперлипипротейнемия). Через

12-16 ч количество липопротеинов снижается до нормы. Патологическая гиперлипопротеинемия наблюдается при механической и паренхиматозной желтухах, диабете, заболевании почек, алкоголизме и других заболеваниях. Известны наследственные гиперлипопротеинемии. Существует несколько типов липопротеинемий, они характерны для групп заболеваний. Например, при диабете гиперлипопротеинемия «транспортная», так как вызвана усиленной мобилизацией жира из жировых депо и переносом липидов в печень.

Для определения липидов сыворотку предварительно гидролизуют концентрированной серной кислотой. Продукты распада окрашенное соединение, интенсивность окраски которого определяют колориметрически.

Ход работы. Готовят опытную и контрольную пробы (можно делать одну контрольную пробу на группу), как указано в таблице. Серную кислоту отмеривают цилиндром.

Проба	Сыворотка крови, мл	Дистиллированная вода, мл	Серная кислота, мл
Опытная	0,1	-	5,0
Контрольная	-	0,1	5,0

1. Пробы тщательно перемешивают и помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. Затем охлаждают под водопроводной водой до комнатной температуры. Отбирают пипеткой из опытной и контрольной пробы по 0,2 мл гидролизата и переносят в сухие пробирки. Добавляют в каждую пробирку 3 мл фосфорнованилиновой смеси, тщательно перемешивают и оставляют стоять 45 мин при комнатной температуре.

2. Интенсивность окраски измеряют на ФЭКе против контроля при зеленом светофилтре.

3. Расчет производят по калибровочному графику. Результат выражают в миллиграммах на 100 мл крови.

Практическое занятие № 25.

Тема: Обмен белков. Переваривание и всасывание белков.

4. Цель: Изучить студентов значение белков, азотистый баланс, динамическое состояние белков тела, состав желудочного сока pH, общую кислотность, свободную и связанную HCl, наличие крови и молочной кислоты. Использовать полученные значения для диагностики.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны знать:

- Факторы, определяющие состояние белкового обмена
- Азотистый баланс
- Нормы белка в питании
- Биологическая ценность белков.
- Белковые резервы
- Переваривание белков в желудке
- Переваривание белков в кишечнике
- Превращение аминокислот под действием микрофлоры кишечника

6. Перечень вопросов.

1. Значение белков, азотистый баланс, биологическая ценность белков, динамическое состояние белков тела
2. Переваривание белков в желудке, кишечнике, всасывание продуктов распада белков.
3. Нормальное, патологический состав желудочного сока и значение желудочного сока при переваривании белков
4. Превращение аминокислот под действием микрофлоры кишечника.

7. План занятия

I. Введения. Осветить значимость темы.

II. Разбор вопросов:

- 1) Вопрос № 1. Значение белков, азотистый баланс, биологическая ценность белков, динамическое состояние белков тела
- 2) Вопрос № 2. Переваривание белков в желудке, кишечнике, всасывание продуктов распада белков.
- 3) Вопрос № 3. Нормальный, патологический состав желудочного сока и значение желудочного сока при переваривании белков
- 4) Вопрос № 4. Превращение аминокислот под действием микрофлоры кишечника.

III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.

IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.

V. Практическая часть.

1. Лабораторная работа: Анализ желудочного сока.
2. Лабораторная работа: Определение кислотности желудочного сока.

VI. Оценка занятий студентов.

VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Анализ желудочного сока».

Желудочный сок представляет собой бесцветную жидкость с сильноокислой реакцией (рН 1,5-2). За сутки у человека отделяется около 1,5 л желудочного сока, в его состав входят вода, белки. Ферменты (пепсин, гастриксин), лизцин, соляная кислота, кислорегулирующие фосфаты и ряд других веществ.

Кислая реакция желудочного сока обусловлена присутствием соляной кислоты, кислорегулирующих фосфатов, а при патологических процессах – молочной кислотой и мутными кислотами. Совокупность всех кислорегулирующих веществ желудочного сока обычно называют общей кислотностью. Соляную кислоту, связанную с белками и продуктами их переваривания называют связанной соляной кислотой, а остающуюся в избытке соляную кислоту называют свободной соляной кислотой. При различных заболеваниях могут меняться как количество отделяемого желудочного сока, так и содержание в нем соляной кислоты и ферментативная широко используется методы анализа желудочного сока, играющие важную роль в диагностике и лечении многих заболеваний желудочно-кишечного тракта.

При анализе желудочного сока определяют общее количество его, цвет, запах, наличие слизи, общую кислотность, свободную соляную кислоту, связанную соляную кислоту, присутствие в соке молочной кислоты, желчи и крови.

а) Цветная реакция на свободную соляную кислоту. На бумагу конго стеклянной палочкой капают 0,2%-ного раствора соляной кислоты в месте нанесения появляется синее окрашивание. Повторяют эту реакцию с желудочным соком: в месте нанесения капли желудочного сока на бумагу конго появляется синее окрашивание, обусловленное присутствием свободной соляной кислоты в желудочном соке.

2. В одну пробирку добавляют несколько капель раствора HCl , в другую – несколько капель желудочного сока, затем в обе пробирки добавляют по 1-2 капли раствора диметиламиноизобензола. В обеих пробирках наблюдают появлению вишнево-красной окраски.

б) Реакция на молочную кислоту (реакция Уффельмона). Реакция на молочную кислоту основано на ее способности образовывать с солями трехвалентного железа лактат железа (III), при этом раствор окрашивается в желто-зеленный цвет.

Ход работы. 1. В одну пробирку наливают по 20 капель 2%-ного раствора фенола и добавляют по каплям 1%-ный раствор хлорида железа (III) до появления фиолетового окрашивания.

2. К полученному реактиву добавляют по каплям в первую пробирку сок, содержащий молочную кислоту и пониженное количество соляной кислоты, во вторую – нормальный желудочный сок.

3. В первой пробирке появляется желто-зеленое окрашивание, во второй окраска исчезает, так как соляная кислота вызывает обесцвечивание раствора.

б) Реакция на крови с бензидином.

Реакция основана на окислении бензидина кислородом, образовавшийся при разложении пероксида водорода под действием Нв крови.

Ход работы. В пробирку отмеривают 1 мл желудочного сока, добавляют 4-5 капель 0,2%-ного спиртового раствора бензидина и 5 капель 1%-ного раствора пероксида водорода. Если желудочный сок содержит кровь, то в результате окисления бензидина до п-хиноидинмида развивается синее окрашивание.

«Определение кислотности желудочного сока».

Кислотность желудочного сока определяют титрованием его 0,1 моль/л раствора NaOH в присутствии индикаторов.

Общая кислотность желудочного сока численно выражается как объем (в мл) 0,1 моль/л раствора NaOH, пошедший на титрование 100 мл желудочного сока в присутствии индикатора фенофталеина (интервал перехода окраски pH 8,2-10). В норме общая кислотность равна 40-60 титронионным единицам (Е).

Свободную соляную кислоту принято выражать как объем (в мл) 0,1 моль/л раствора NaOH, пошедший на титрование 100 мл желудочного сока, по в присутствии индикатора диметиламиноазобензола; при титровании нейтрализуется только свободная HCl (pH 1,0-3,0), так как слабые кислоты (молочная, уксусная) в присутствии сильной HCl (1,0-3,0) находятся в растворе в недиссоциированном состоянии и в реакцию со щелочью не вступают.

При pH 3,0, когда окраска диметиламиноазобензола изменяется от красный к желто-розовой, почти вся свободная HCl нейтрализуется NaOH. В норме содержание свободной HCl равно 20-40 титрационным единицам. Общее количество щелочи, пошедшей на титрование 100 мл желудочного сока с индикатором ализарингидросульфонатом натрия (интервал перехода окраски 4,3-6,3 pH), при переходе первоначальной желтой окраски в фиолетовую соответствует сумме всех кислореагирующих веществ, кроме связанной соляной кислоты.

Количество связанной соляной кислоты определяются как разность между общей кислотностью и объемом щелочи, пошедшие на титрование суммы кислореагирующих веществ.

Ход работы. 1. В две колбы наливают по 5 мл желудочного сока. В первую добавляют 1-2 капли раствора фенофталеина и 1-2 капли раствора диметиламиноазобензола, во вторую 1-2 капли ализарингидросульфоната натрия и титрируют 0,1 моль/л раствором гидроксида натрия при постоянном помешивании. В процессе титрования содержимое колб меняет окраску.

2. При титровании содержимого первой колбы отмечает: а) объем щелочи, пошедшей на титрование с индикатором диметиламиноазобенолом, до перехода

первоначального красного цвета в желто-розовый, что соответствует количеству свободной соляной кислоты.

б) общий объем щелочи, пошедший на титрование с индикатором фенолфталеинам, до перехода окраски в стойкий красный цвет, что соответствует общей кислотности.

3. Во второй колбе отмечают объем щелочи, пошедшей на титрование до появления в место желтой окраски фиолетовой. Что соответствует сумме всех кислореагирующих веществ, кроме связанной соляной кислоты, и выявляется индикатором ализарингидросульфонатом натрия.

Пример расчета: В пробе колбе

а) 1,5 мл 0,1 моль/л NaOH (желто-розовая окраска), $1,5 \times 20 = 30$ ТЕ (свободная соляная кислота в 100 мл соке).

б) 2,6 мл 0,1 моль/л NaOH (красная окраска), $2,6 \times 20 = 52$ ТЕ (общая кислотность) во второй колбе.

2,0 мл 0,1 моль/л NaOH (фиолетовая окраска) $2,0 \times 20 = 40$ ТЕ (все кислотурегирующие вещества, кроме связанной HCl)
 $52 - 40 = 12$ ТЕ (связанная соляная кислота).

Практическое занятие № 26.

Тема: Обмен белков. Общие пути обмена аминокислот в тканях.

4. Цель: изучить промежуточный обмен аминокислот в тканях, пути использования аминокислот. Значение дезаминирования, трансаминирования (трансаминирование в диагностике).

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны знать:

- Промежуточный обмен аминокислот в тканях
- Общие пути обмена аминокислот
- Виды дезаминирования аминокислот
- Трансаминирование аминокислот
- Клиническое значение изучение трансаминазы

6. Перечень вопросов.

1. Органоспецифичность белков.
2. Судьба всосавшихся аминокислот.
3. Общие пути катаболизма аминокислот.
4. Дезаминирование аминокислот.
5. Трансаминирование аминокислот.

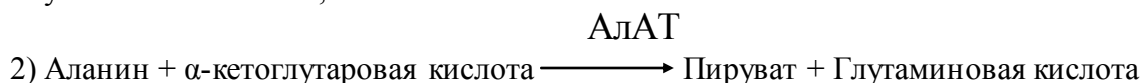
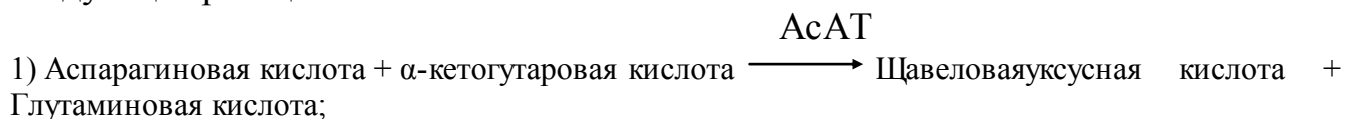
7. План занятия.

- I. Введения. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов:
 - 1) Вопрос № 1. Органоспецифичность белков.
 - 2) Вопрос № 2. Судьба всасывшихся аминокислот.
 - 3) Вопрос № 3. Общие пути катаболизма аминокислот.
 - 4) Вопрос № 4. Дезаминирование аминокислот.
 - 5) Вопрос № 5. Трансаминирование аминокислот.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Определение активности АсАТ и АлАТ в тканях сердца и печени животных динитрофенилгидразиновым методом.
- VI. Оценка занятий студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

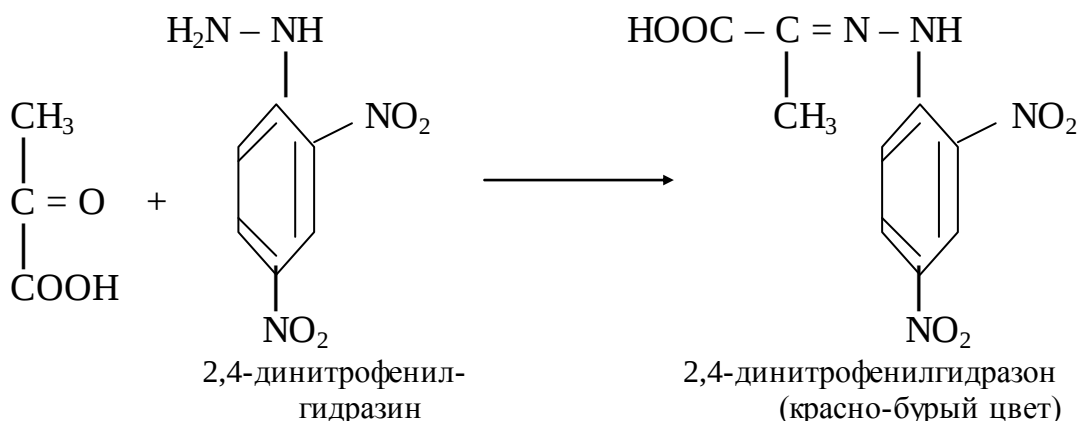
«Определение активности аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланиноаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови».

Аминотрансферазы или трансаминазы катализируют межмолекулярной перенос аминогруппы с аминокислот на кетокислоты. Коферментом трансаминаз является фосфопиродоксаль. Он служит непосредственным переносчиком аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту. АсАТ и АлАТ катализируют следующие реакции:



АсАТ (L-аспартат: 2-оксоглутаратаминотрансфераза) и АлАТ (L-аланин: 3-оксоглутаратаминотрансфераза) обладают различной активностью в разных органах. Так наибольшая активность АсАТ наблюдается в сердечной мышце, а АлАТ – в ткани печени. В сыворотке крови в норме активность аминотрансфераз очень низка и заметно повышается при нарушении целостности мембран печени или сердечной мышцы. Поэтому определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови является важным тестом для диагностики целого ряда тяжелых заболеваний, например, инфаркта миокарда, вирусного гепатита, цирроза печени и др.

При определении активности этих ферментов пользуются тем, что образующиеся продукты реакции – кетокислоты (пировиноградная и щавелевоуксусная, которая относительно легко превращается в пировиноградную) при добавлении 2,4-фенилгидразина в щелочной среде образуют окрашенный гидразон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству пировиноградной кислоты:



Изучают активность АлАТ и АсАТ в тканях сердца и печени (используя экстракты этих тканей), а также в сыворотке крови (в норме и при патологии).

Ход работы. Определение активности АсАт. 1. Готовят четыре пробирки (опытных) для исследования активности фермента в экстрактах тканей сердца, печени и в сыворотке (в норме и при патологии).

Проба	Раствор субстрата, мл	Экстракт ткани сердца, мл	Экстракт ткани печени, мл	Сыворотка	
				Нормальная, мл	Патологическая, мл
1	0,5	0,2	-	-	-
2	0,5	-	0,2	-	-
3	0,5	-	-	0,2	-
4	0,5	-	-	-	0,1

Реакционные смеси готовят, как указано в таблице. Раствор субстрата предварительно выдерживают в термостате 5 мин при 37°C.

2. Одновременно готовят для каждой опытной пробы соответствующие контрольные пробы. Их готовят, как и опытные, но раствор 2,4-динитрофенилгидразина добавляют до инкубации (т.е. до добавления в пробирку раствора субстрата).

3. Содержимое опытных и контрольных пробирок перемешивают и инкубируют в термостате при 37°C в течение 60 мин. Затем в каждую опытную пробирку добавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Все пробы

выдерживают при комнатной температуре 20 мин. После этого во все пробирки вносят по 5 мл 0,4 моль/л раствора NaOH. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 мин при комнатной температуре.

4. Измеряют на ФЭКе оптическую плотность опытных проб против контрольных при длине волны 500-560 нм (светофильтр зеленый).

Определение активности АлАТ. Анализ проводят по той же схеме, что и определение АсАТ, но используют другой субстратный раствор (для определения АлАТ) и инкубируют в термостате после внедрения исследуемых тканей 30 мин.

Расчет активности ферментов.

По калибровочному графику находят количество пирувата натрия, соответствующее оптической плотности пробы. Затем пересчитывают активность фермента на пировиноградную кислоту (в мкмоль), образовавшуюся при инкубации 1 мл сыворотки в течение 1 ч при 37⁰С, по формуле.

$$\text{АсАТ} = (a \cdot 10) / 88; \text{АлАТ} = (a \cdot 2 \cdot 10) / 88 \text{ мкмоль/л.}$$

Где

10 – коэффициент перевода по 1 мл сыворотки

a – содержание пирувата в пробе сыворотки, найденное по калибровочному графику, МКГ;

88 – масса 1 мкмоль пировиноградной кислоты, МКГ;

2 – коэффициент пересчета на 1 ч инкубации.

13 норме активность АсАТ составляет 0,1-0,45 мкмоль пирувата за 1 ч инкубации 1 мл сыворотки при 37⁰С.

Практическое занятие № 27.

Тема: Обмен отдельных аминокислот.

4. Цель: Изучение обмена отдельных аминокислот серина, глицина, метионина, фенилаланина и тирозина.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны знать:

- Обмен отдельных кислот
- Обмен глицина
- Обмен серина
- Обмен метионина
- Обмен цистеина
- Обмен фенилаланина и тирозина

6. Перечень вопросов.

1. Обмен серина и глицина образование одноуглеродных групп.
2. Обмен метионина и реакции трансметилического обмена.
3. Синтез (метилического обмена) адреналина, креатина и холина, ДНК. Недостаточность фолиевой кислоты.
4. Механизм бактериостатического действия сульфаниламидных препаратов.
5. Обмен фенилаланина и тирозина, наследственные нарушения обмена.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов:
 - 4) Вопрос № 1. Обмен серина и глицина образование одноуглеродных групп.
 - 5) Вопрос № 2. Обмен метионина и реакции трансметилического обмена.
 - 6) Вопрос № 3. Синтез (метилического обмена) адреналина, креатина и холина, ДНК. Недостаточность фолиевой кислоты.
 - 7) Вопрос № 4. Механизм бактериостатического действия сульфаниламидных препаратов.
 - 8) Вопрос № 5. Обмен фенилаланина и тирозина, наследственные нарушения обмена.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть.
 1. Лабораторная работа: Исследование действия тирозиназы.
 2. Лабораторная работа: Определение мочевины в сыворотке крови и моче
- VI. Оценка занятий студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Исследование действия тирозиназы.

В меланацитах при окислении тирозина образуются меланин, представляющее собой полимеры невыясненного строения. От наличия этих пигментов зависят цвет волос, кожи, радужной оболочки глаз. Единственным ферментом, участвующим в образовании меланинов из тирозина, является тирозиназа. В химическом отношении этот фермент является металлопротеином, содержащим медь. Тирозина относится к оксидазам, ферментам, окисляющим субстраты кислородом воздуха. Тирозиназа широко распространена в растениях.

Ход работы. Для получения ферментного препарата тирозиназы сырой картофельный клубень очищают от кожуры, верхний слой клубня (2,0-4,0 г) кусочками нарезают в ступку, растирают с 10 мл дистиллированной воды и фильтруют через фильтр. В две пробирки отмеривают по 1 мл полученного фильтрата;

содержимое одной пробирки кипятят в течение 1-2 мин и затем охлаждают под струей водопроводно воды. В обе пробирки добавляют по 0,5-1,0 мл 0,1%-ного раствора тирозина, содержимое пробирок перемешивают и пробирки помещают в термостат при 37-40⁰С. Время от времени пробирки энергично встряхивают для лучшего соприкосновения с воздухом. Постепенно в одной пробирке под действием тирозиназы жидкость темнеет за счет образования окрашенных в черные цвет продукт окисления тирозина типа меланинов. В контрольной пробирке, где фермент иактивирован нагреванием, цвет жидкости не изменяется.

«Определение мочевины в сыворотке крови и моче».

Мочевина является одним из основных конечных продуктов белкового обмена. Выделение мочевины из организма свидетельствует об интенсивности белкового обмена – увеличивается при употреблении пищи, богатой белками, и снижается при безбелковой диете. В норме в сутки у здорового человека выделяется 20-35 г.мочевины (333-582 ммоль/сут). В сыворотке содержится 2,49-8,33 ммоль/л мочевины.

Азот мочевины составляет примерно половину остаточного азота сыворотки. Содержание мочевины в крови увеличивается при любых патологических состояниях. Однако наиболее важное диагностическое значение имеет увеличение количества мочевины при заболеваниях почек, когда наблюдается увеличение в 2-10 раз и более.

Метод основан на том, что мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию мочевины в растворе.

Ход работы. Определение мочевины в сыворотке крови. 1. В центрифужную пробирку наливают 0,8 мл дистиллированной воды, отмеривают микропипеткой 0,2 мл сыворотки и добавляют 1 мл 10%-ного раствора ТХУ. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре.

2. Через 15-20 мин центрифужную пробирку помещают в центрифугу, уравнивают и центрифугируют в течение 10 мин при 2500 об/мин. Вместо центрифугирования можно отфильтровать надсадочную жидкость в сухую чистую пробирку через маленький фильтр.

3. В одну пробирку вносят 0,5 мл надсадочной жидкости и 5 мл цветного реактива, в другую – 0,5 мл дистиллированной воды (контрольная проба), а в третью – 0,5 мл стандартного раствора мочевины (стандартная проба). Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 20 мин.

Затем пробирки охлаждают под струей воды и фотометрируют с зеленым светофильтром (длина волны 540 нм) против контрольной пробы.

Расчет производят по формуле:

$$x = (\varepsilon_{\text{оп}} \cdot 0,2 \cdot 20 \cdot 1000) / \varepsilon_{\text{ст}},$$

где x – концентрация мочевины в сыворотке, ммоль/л; $\varepsilon_{\text{оп}}$ – показания ФЭКа для опытной пробы; $\varepsilon_{\text{ст}}$ – показания ФЭКа для стандартной пробы; 0,2 – содержание мочевины в стандартной пробе, ммоль; 20 – разведение сыворотки; 1000 – коэффициент для пересчета на 1 л.

Определение мочевины в моче. 1. Перед определением профильтрованную мочу разводят физиологическим раствором в отношении 1:200.

2. Готовят три чистые, сухие пробирки: в одну отмеривают 0,5 мл разведенной мочи, во вторую – 0,5 мл ванной воды. В каждую пробирку добавляют по 5 мл цветного реактива.

3. Содержимое пробирок перемешивают, пробирки помещают в кипящую баню на 20 мин, после чего их охлаждают под струей воды и колориметрируют опытную и стандартную пробы против контроля с зеленым светофильтром.

Расчет производят по формуле:

$$x = (\varepsilon_{\text{оп}} \alpha_{\text{ст}} V_{\text{сут}} k) / (\varepsilon_{\text{ст}} V_{\text{оп}}),$$

где x – содержание мочевины в суточной моче, ммоль/л; $\varepsilon_{\text{оп}}$ – показания ФЭКа для стандартной пробы; $\alpha_{\text{ст}}$ – содержание мочевины в пробе (в 0,5 мл), равное 0,2 ммоль; $V_{\text{сут}}$ – суточный объем мочи, мл; $V_{\text{оп}}$ – объем мочи, взятый для анализа (0,5 мл); k – разведение мочи ($k=200$).

Практическое занятие № 28.

Тема: Нуклеопротейды. Количественное определение мочевой кислоты в моче.

4. Цель: Обсудить со студентами физико-химические свойства мочи и методы количественного определения нормальных составных компонентов мочи. Обсудить со студентами обусловленность появления патологических компонентов в моче соответствующими нарушениями метаболизма.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать методы качественного и количественного анализа определения мочевой кислоты для понимания значения определения этого метаболита при диагностике заболеваний, связанных с нарушением обмена пуриновых нуклеотидов;
- Ознакомиться с методами выделения нуклеиновых кислот, их строением и свойствами, что необходимо для понимания структурной организации в клетке ДНК и РНК;

- Знать клинико-диагностическое значение определения содержания в крови и моче – мочевой кислоты – основного продукта катаболизма пуриновых нуклеотидов у человека (1,6-3,54 ммоль/сут), а также отклонения в содержании его при подагре, нефрите, гиперурикемии, почечной недостаточности и т.д.
- Иметь понятие об обмене нуклеиновых кислот, их функциях, синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, а также их катаболизме;
- Знать основные заболевания, связанные с нарушениями обмена пуриновых нуклеотидов, таких как гиперурикемия и подагра, оротацидурия и др.

6. Перечень вопросов.

1. Обмен нуклеиновых кислот. Переваривание и высасывание нуклеопротеидов.
2. Синтез пуринов, регуляция синтеза.
3. Гиперурикемия, подагра, аллопуринол.
4. Синтез пиримидиновых нуклеотидов, регуляция.
5. Синтез дезоксирибонуклеотидов, тимидиловых нуклеотидов.
6. Оротацидурия, причины, лечение уридином.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Обмен нуклеиновых кислот. Переваривание и высасывание нуклеопротеидов.
 - а) Обмен нуклеиновых кислот;
 - б) Переваривание и высасывание нуклеопротеидов.
 - 2) Вопрос № 2. Синтез пуринов, регуляция синтеза.
 - а) Происхождение атомов пуринового ядра;
 - б) Последовательность реакций синтеза пуриновых нуклеотидов;
 - с) Регуляция биосинтеза пуриновых нуклеотидов.
 - 3) Вопрос № 3. Гиперурикемия, подагра, аллопуринол.
 - 4) Вопрос № 4. Синтез пиримидиновых нуклеотидов, регуляция.
 - а) Последовательность реакций биосинтеза УТФ;
 - б) Регуляция биосинтеза.
 - 5) Вопрос № 5. Синтез дезоксирибонуклеотидов, тимидиновых нуклеотидов.
 - а) Синтез дезоксирибонуклеотидов;
 - б) Синтез тимидиловых нуклеотидов.
 - 6) Вопрос № 6. Оротацидурия, причины, лечение уридином.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Количественное определение мочевой кислоты.

- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Количественное определение мочевой кислоты в моче».

Метод количественного определения мочевой кислоты в моче основан на способности мочевой кислоты в щелочной среде восстанавливать фосфорновольфрамный реактив. Количество восстановленного фосфорновольфрамного реактива окрашенного в интенсивный синий цвет, можно определить титрованием раствором $K_3[Fe(CN)_6]$, который при этом окисляется к образованию бесцветного продукта. Количество $K_3[Fe(CN)_6]$, израсходованного на окисление, эквивалентно количеству мочевой кислоты.

Ход работы. 1. В опытную пробирку вносят 2 мл мочи, в стандартную – 2 мл стандартного раствора мочевой кислоты (0,5 мг/мл). Затем в обе пробирки добавляют по 1 мл раствора NaOH и по 1 мл фосфорновольфрамного реактива. Появляется синее окрашивание.

2. Раствор титруют до обесцвечивания раствором $K_3[Fe(CN)_6]$.

3. Рассчитывают концентрацию мочевой кислоты в опытной пробе по стандартной. Пример расчета: на титрование опытной пробы пошло 3 мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, на титрование стандартной пробы – 2 мл. Содержание мочевой кислоты в стандартном растворе 0,5 мг/мл.

Составляем пропорцию:

1 мг мочевой кислоты – 2 мл $K_3[Fe(CN)_6]$

x мг мочевой кислоты – 3 мл $K_3[Fe(CN)_6]$

Отсюда в 2 мл исследуемой мочи содержится мочевой кислоты
 $x = (3,0 \times 1) / 2,0 = 1,5$ мг.

Затем рассчитывают количество мочевой кислоты в суточном количестве мочи (1,5-2 л). В норме в сутки выделяется 0,3-1,2 г мочевой кислоты.

Практическое занятие № 30.

Тема: Регуляция обмена веществ и функций гормонами.

4. Цель: Обсудить со студентами классификацию гормонов по химической природе. Обсудить классификацию гормонов по механизму действия на клетку. Рассмотреть иерархию регуляторных систем. На примере гипоталамических гормонов рассмотреть взаимосвязь эндокринной и нервной систем; выделить особое место в регуляции гормона адреналина. Обсудить биосинтез и катаболизм стероидных гормонов.

На примере вазопрессина и минераллокортикоидов рассмотреть регуляцию водно-солевого обмена.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать химическую природу гормонов и классификацию их на этой основе;
- Знать механизм действия всех гормонов;
- Уметь показать взаимосвязь нервной и эндокринной систем;
- Разбираться в биосинтезе и катаболизме стероидных гормонов;
- Разбираться в особенностях водно-солевого обмена;
- Уметь определить белковую природу гормонов и наличия йода в тиреоидных гормонах.

6. Перечень вопросов.

1. Иерархия регуляторных систем.
2. Классификация гормонов по их химической природе и механизму действия на клетку.
3. Взаимосвязь эндокринной и нервной систем.
4. Биосинтез и катаболизм стероидных гормонов.
5. Регуляция водно-солевого обмена.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Иерархия регуляторных систем.
 - a) Три уровня регуляции;
 - b) - клеточный;
 - c) – гормональный;
 - d) – центральная нервная система.
 - 2) Вопрос № 2. Классификация гормонов по их химической природе.
 - a) Гормоны белковой и пептидной структуры;
 - b) Гормоны стероидной структуры;
 - c) Производные аминокислот;
 - d) Производные жирных кислот.
 - 3) Вопрос № 3. Взаимосвязь эндокринной и нервной систем.
 - a) – статины;
 - b) – либерины;
 - c) гипоталамические гормоны.
 - 4) Вопрос № 4. Биосинтез и катаболизм стероидных гормонов.
 - a) Глюко- и минералокортикоиды;

- b) Мужские и женские половые гормоны.
- 5) Вопрос № 5. Регуляция водно-солевого обмена.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Обнаружение 17-кетостероидов в моче.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Обнаружение 17-кетостероидов в моче».

Метод основан на взаимодействии 17-кетостероидов с м-динитробензолом в щелочной среде с образованием продуктов конденсации розово-фиолетового цвета.

Ход работы. В пробирку вносят 20 капель мочи и 30 капель раствора м-динитробензола. Раствор динитробензола добавляют медленно, так, чтобы он стекал по стенке пробирки. Пробирку не встряхивать. Затем, также по стенке пробирки, добавляют 6 капель раствора гидроксида натрия. Верхний слой жидкости окрашивается в розово-фиолетовый цвет.

Практическое занятие № 31.

Тема: Регуляция обмена веществ и функций гормонами.

Количество часов – 4 ч.

- 4. Цель:** Обсудить со студентами регуляцию обмена белков углеводов и липидов. Рассмотреть основные закономерности в регуляции Са и фосфатного обмена. Обсудить строение, функции половых гормонов, гормонов щитовидной железы. Объяснить значение, механизм действия и особенности гормонов местного назначения.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны:

- Знать принципы регуляции обмена белков, липидов и углеводов;
- Знать химическое строение механизм действия и функцию гормонов, регулирующих обмен кальция и фосфатов;
- Знать химическое строение особенности синтеза и катаболизма половых гормонов;

- Знать место выработки, пути синтеза и основное биологическое действие тиреоидных гормонов;
- Уметь выделить гормоны местного назначения и разбираться в их биологическом действии.

6. Перечень вопросов.

1. Регуляция обмена белков, углеводов и липидов.
2. Регуляция обмена Са и фосфатов.
3. Половые гормоны, гормоны щитовидной железы.
4. Местные гормоны.

7. План занятия.

- I. Введение. Осветить значимость темы.
- II. Приступить к разбору вопросов.
 - 1) Вопрос № 1. Регуляция обмена белков, углеводов и липидов.
 - a) Инсулин;
 - b) Глюкагон;
 - c) Адреналин;
 - d) Кортизол.
 - 2) Вопрос № 2. Регуляция обмена Са и фосфатов.
 - a) Кальцитонин;
 - b) Паратгормон;
 - c) 1.25 диоксихолекальциферол.
 - 3) Вопрос № 3. Половые гормоны, гормоны щитовидной железы.
 - a) Эстрогены;
 - b) Андрогены;
 - c) Тироксин, трийодотиронин.
 - 4) Вопрос № 4. Местные гормоны.
 - a) Кинины;
 - b) Простагландины;
 - c) Гормоны пищеварительного тракта.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам.
- IV. Решение ситуационных задач, тестов, ролевые игры.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Обнаружение йода в препарате щитовидной железы.
- VI. Оценка знаний студентов
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Обнаружение йода в препарате щитовидной железы».

При щелочном гидролизе тироксина образуется йодид калия, из которого йод вытесняется йодатом калия. Выделившийся свободный йод дает с крахмалом синее окрашивание.

Ход работы. В фарфоровой ступке растирают 1 таблетку тиреоидина. Полученный порошок высыпают в пробирку для гидролиза и заливают 3 мл раствора K_2CO_3 . Перемешивают, закрывают пробкой с обратным холодильником и ставят на песчаную баню. Содержимое пробирок кипят 10-15 мин.

Полученный гидролизат охлаждают и нейтрализуют раствором серной кислоты, добавляя его по каплям до слабокислой реакции на лакмус. Затем добавляют 1 капля раствора крахмала и 1-2 капли раствора KIO_3 . Выделившийся йод окрашивает жидкость в синий цвет.

Практическое занятие № 32.

Тема: Биохимия крови.

4. Цель: Дать представление студентам о состав крови (основные белки крови, альбумина, глобулина, фермента), синтез гемоглобина, обмен железа. Использовать полученные результаты для диагностики заболеваний крови.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны знать:

- Химический состав крови.
- Белки плазмы крови
- Характеристика основных белковых фракции.
- Отдельные наиболее изученные (альбумины, глобулины) имеющие значение в клиническом отношении
- Ферменты плазмы крови.
- Небелковые азотистые компоненты крови.
- Электролитный состав плазмы крови.

6. Перечень вопросов.

1. Функции крови химический состав крови.
2. Белки плазмы крови (альбумин, глобулин, транспортные белки, ферменты).
3. Роль альбуминов в транспортировке воды.
4. Эритроциты и гемоглобин. Синтез гемоглобина и ее регуляция.
5. Обмен железа.

7. План занятия.

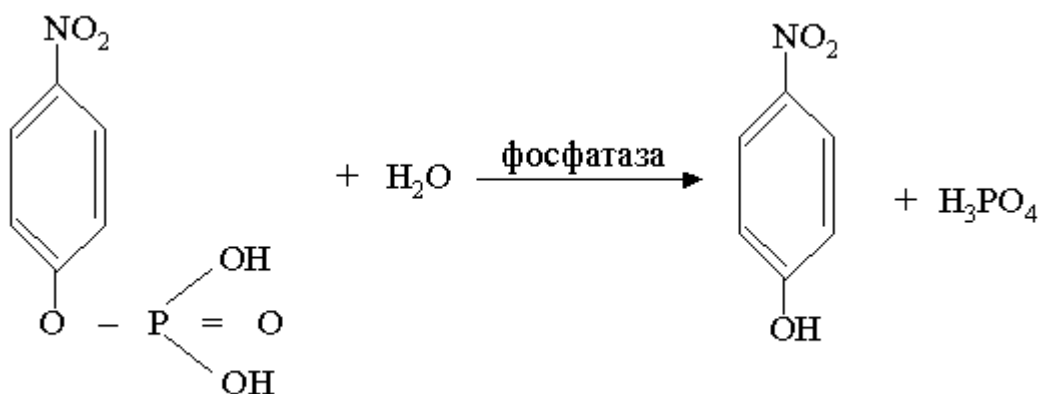
- I. Введения. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов:
 - 1) Вопрос № 1. Функции крови, химический состав крови.
 - 2) Вопрос № 2. Белки плазмы крови.
 - а) Альбумины
 - б) Глобулины
 - с) Транспортные белки
 - 3) Вопрос № 3. Роль альбуминов в транспортировке воды
 - 4) Вопрос № 4. Эритроциты и гемоглобин. Синтез гемоглобина и ее регуляция.
 - 5) Вопрос № 5. Обмен железа.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови (метод Бесия и Лоури).
- VI. Оценка занятий студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови (метод Бесия и Лоури)».

Щелочная фосфатаза катализирует отщепление фосфорной кислоты от эфиров с органическими соединениями. Оптимум pH 8,6-10,1. Щелочная фосфатаза преимущественно сосредоточена в костной ткани, слизистой оболочке кишечника, почках и печени.

Определение ее в сыворотке крови имеет клинико-диагностическое значение. Активность щелочной фосфатазы резко повышается в сыворотке при рахите, остеомалации, остеосаркомах, при заболеваниях печени. В некоторых случаях повышение активности щелочной фосфатазы судят по количеству п-нитрофенола, образующегося при гидролизе п-нитрофенилфосфата под действием фермента.



p- нитрофениль фосфат

p-нитрофенол

Ход работы. Готовят две пробирки для опытной и контрольной проб. В обе пробирки вносят по 1 мл субстратно-буферного раствора. Пробы помешают в термостат при 37⁰С на 5 мин. Затем в опытную пробу добавляют 0,1 мл сыворотки и смесь тщательно перемешивают.

Опытную и контрольную пробы ингибируют в термостате при 37⁰С в течение 30 мин, а затем переносят в баню со льдом. После охлаждения в контрольную пробу вносят 0,1 мл 10 мл раствора NaOH.

Через 5 мин пробы измеряют на ФЭКе с фиолетовым светофильтром (длина волны 400-420 нм).

Расчет делают по калибровочному графику. Активность фермента выражают в макромольх p-нитрофенола, освобожденного 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации.

В норме активность щелочной фосфотазы в сыворотке крови равна 1,0-4,0 мкмоль/мл час.

Практическое занятие № 33

Тема. Биохимия крови (продолжение).

4. Цель: Изучение буферные системы крови и кислотно-основное равновесие, буферные системы крови, дыхательную функцию крови, свертывания крови и роль витамина К в свертывания крови. Изучение биохимических механизмов этих процессов и диагностическое значение изучения болезней, связанных с нарушением биохимии крови.

5. Задачи.

После проведения занятия студенты должны знать:

- Дыхательная функция крови.
- Перенос кислорода кровью.

- Различные формы гипоксии
- Перенос углекислого газа кровью от тканей к легким
- Система свертывания крови.
- Противосвертывающая система крови.

6. Перечень вопросы.

1. Буферные системы крови и кислотно-основное равновесие и ее нарушение.
2. Дыхательная функция крови (перенос кислорода, углекислого газа кровью).
3. Дыхательная регуляция рН внеклеточной жидкости.
4. Роль витаминов в свертывание крови и фибринолизе.
5. Противосвертывающая система.

7. План занятия.

- I. Введения. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов:
 - 1) Вопрос № 1. Буферные системы крови и кислотно-основное равновесие и ее нарушение.
 - 2) Вопрос № 2. Дыхательная функция крови (перенос кислорода, углекислого газа кровью).
 - 3) Вопрос № 3. Дыхательная регуляция рН внеклеточной жидкости.
 - 4) Вопрос № 4. Роль витаминов в свертывание крови и фибринолизе.
 - 5) Вопрос № 5. Противосвертывающая система.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть. Лабораторная работа: Колориметрическое определение остаточного азота крови.
- VI. Оценка занятий студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Количественное определение остаточного азота крови».

Остаточный азотом крови называют небелковый азот, т.е. азот органических и неорганических соединений, который остается в растворе после осаждения белков крови. В норме содержание остаточного азота равно 0,2-0,4 г/л. Около 50% его приходится на азот мочевины, 25%-на азот аминокислот, 7,5%-на креатинин и креатин, 0,5%-на аммонийные соли и индикан, 13% остаточного азота приходится на долю остальных азотистых веществ крови, содержание которых в крови варьирует.

Как правило, повышение остаточного азота обусловлено нарушением нормальных взаимоотношений между образованием и выведением продуктов

азотистого метаболизма из организма. Увеличение концентрации остаточного азота в крови свыше 0,4-0,5г/л называется азотемией. Это состояние называется задержкой выведения азотистых веществ или усиленном их образовании(при заболеваниях печени и сердца). Поэтому определение остаточного азота является важным клиническим тестом.

При определении остаточного азота крови безбелковый фильтрат, полученный после осаждения белков сыворотки крови, сжигают с серной кислотой. При этом азот всех органических соединений переходит в сульфат аммония. Образовавшаяся аммонийная соль при взаимодействии с реактивом Несслера дает желтое окрашивание, интенсивность которого сравнивают в колориметре с окраской стандартного раствора содержащего известное количества азота.

Ход работы. В пробирку наливают из бюретки 2,8 мл реактива для осаждения белка. Микропипеткой набирают 0,2 мл реактива для сыворотки крови и вносят в пробирку. Перемешивают содержимое пробирки, по выдувая ее обратно. Пробирку оставляют стоять на столе 7-10 мин для осаждения белков, затем фильтруют в сухую пробирку.

2. Пипеткой переносят 0,5 мл фильтрата в термостойкую пробирку и добавляют 5 капель концентрированной серной кислоты. В контрольную пробирку добавляют в место фильтрата 0,5 мл дистиллированной воды, 5 капель серной кислоты.

3. Для минерализации органических веществ пробирки помещают на песчаную баню. При сжигании пробирки должны только касаться верхнего слоя типа, так как в результате перегрева азота может выделяться в свободном виде. Пробирки нужно размещать на бане в наклонном положении во избежание разбрызгивания.

4. При нагревании содержимого пробирок сначала испаряется вода, затем появляется белые тяжелые пары и исследуемая жидкость темнеет. Пробирки снимают с бани, охлаждают, в каждую добавлено 2 капли пероксида водорода и снова помещают на баню, нагревают 2-3 мин. Жидкость должна быть бесцветной.

5. После охлаждения в пробирки добавляют по 10 мл дистиллированной воды и нейтрализуют 50%-ным раствором NaOH до слабощелочной реакции по лакмусу (приблизительно 0,3 мл). лакмус меняет красную окраску на синюю. Излишек щелочи вызывает помутнение раствора.

6. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Несслера. Содержимое пробирок окрашивается в желтый цвет разной интенсивности в зависимости от содержания азота.

7. Оптическую плотность испытуемой пробы измеряют на ФЭКе против контрольной с синим светофильтром. Содержание остаточного азота определяют по калибровочной кривой.

Практическое занятие № 34.

Тема: Биохимия печени.

4. Цель: Изучить микросомальное окисление и реакции конъюгации в печени, а также пути обезвреживания метаболитов и чужеродных веществ в печени, метаболизм гема, желтушность и её разновидности. Инактивацию гормонов, роль печени в обмене углеводов. Пути обезвреживания пестицидов в организме.

5. Задачи:

После занятия студенты должны знать:

- Микросомальное окисление и реакции конъюгации в печени.
- Пути обезвреживания метаболитов и чужеродных веществ в печени.
- Метаболизм гема, желтушность и его разновидности. Инактивация гормонов.
- Роль печени в обмене углеводов.
- Пути обезвреживания пестицидов в организме.
- Роль печени в обмене белков.
- Химический канцерогенез.
- Печеночно-клеточная недостаточность и биохимические основы развития печеночной комы.

6. Перечень вопросов.

1. Микросомальное окисление и реакции конъюгации в печени.
1. Пути обезвреживания метаболитов и чужеродных веществ в печени.
2. Метаболизм гема, желтушность и его разновидности. Инактивация гормонов.
3. Роль печени в обмене углеводов.
4. Пути обезвреживания пестицидов в организме.
5. Роль печени в обмене белков.
6. Химический канцерогенез.
7. Печеночно-клеточная недостаточность и биохимические основы развития печеночной комы.

7. План занятия

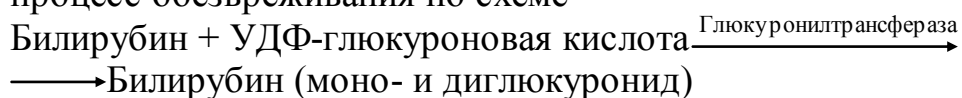
- I. Введение. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов:
 - 1) Вопрос № 1. Микросомальное окисление и реакции конъюгации в печени.
 - 2) Вопрос № 2. Пути обезвреживания метаболитов и чужеродных веществ в печени.

- 3) Вопрос № 3. Метаболизм гема, желтушность и его разновидности. Инактивация гормонов.
 - 4) Вопрос № 4. Роль печени в обмене углеводов.
 - 5) Вопрос № 5. Пути обезвреживания пестицидов в организме.
 - 6) Вопрос № 1. Роль печени в обмене липидов.
 - 7) Вопрос № 2. Роль печени в обмене белков.
 - 8) Вопрос № 3. Химический канцерогенез.
 - 9) Вопрос № 4. Печеночно-клеточная недостаточность и биохимические основы развития печеночной комы.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
 - IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
 - V. Практическая часть. Лабораторная работа: Определение общего билирубина в сыворотке крови (метод Йендрашека и Клеггорна).
 - VI. Оценка знаний студентов.

Лабораторная работа.

«Определение общего билирубина в сыворотке крови (метод Йендрашека и Клеггорна)».

Билирубин образуется в организме в результате естественного распада гемоглобина эритроцитов в клетках ретикуло-эндотелиальной системы (печень, селезенка). Билирубин относится к группе желчных пигментов и является токсическим веществом; он обезвреживается в клетках печени. Транспортируется билирубин к месту обезвреживания в комплексе с белком. В печени происходит процесс обезвреживания по схеме



Глюкурониды билирубина хорошо растворимы, они выводятся из печени по желчевыводящим путям.

В сыворотке крови содержится два вида билирубина: нерастворимый (в виде комплекса с белками, обеспечивающими транспорт) и растворимый (диглюкуронид). Вместе обе формы составляют общий билирубин.

Определение содержания билирубина в крови является важным диагностическим тестом. Билирубин обычно содержится в крови в небольших количествах – 0,5-1,2 мг/дл, причем 75% из них составляет билирубин, связанный с белками (нерастворимый).

При различных поражениях печени и желтухах часто наблюдается гипербилирубинемия, концентрация билирубина повышается до 30-35 мг/дл.

Метод основан на колориметрическом определении интенсивности окраски продукта взаимодействия билирубина с диазореактивом. Этот продукт окрашен в малиново-красный цвет. Билирубиндиглюкуронид реагирует с диазосмесью

непосредственно. Связанный с белками билирубин реагирует с диазосмесью после диссоциации белкового комплекса, которая достигается прибавлением к сыворотке кофеинового реактива.

Ход работы. Готовят две пробирки (контрольную и опытную). Составляют реакционную смесь по схеме:

проба	Сыворотка крови, мл	Кофеиновый реактив, мл	Дистиллированная вода, мл	Диазосмесь, мл
Опытная	1	3,5	-	0,5
Контрольная	-	3,5	1	0,5

Диазосмесь готовят (в количестве, достаточном для всей учебной группы), смешивая 10 мл 0,5%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 0,3 мл 0,5%-ного раствора нитрата натрия.

Содержимое опытной и контрольной проб хорошо перемешивают, ставят на 20 мин в темноту, затем колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром (длина волны 500-560 нм) против контроля.

Если в пробах развивается слабая окраска, то перед колориметрированием в обе пробирки добавляют по 3 капли 30%-ного раствора NaOH. При этом цвет раствора переходит в зеленый, а при большой концентрации билирубина в синий, часто наблюдается исчезновение муты. Пробы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром. Расчет производят по калибровочному графику.

Практическое занятие № 35.

Тема: Биохимия мочи.

4. Цель: Изучить механизм образования мочи, роль почек в поддержании кислотно-щелочного равновесия, особенности обмена веществ в почках при нормальных и патологических состояниях, а также химический состав мочи в норме и при патологических состояниях.

5. Задачи:

После проведения занятия студенты должны знать:

- Механизм образования мочи.
- Роль почек в поддержании кислотно-щелочного равновесия.
- Особенности обмена веществ в почках при нормальных и патологических состояниях.
- Общие свойства мочи.
- Химический состав мочи.

➤ Патологический состав мочи.

6. Перечень вопросов.

1. Механизм образования мочи.
2. Роль почек в поддержании кислотно-щелочного равновесия.
3. Особенности обмена веществ в почках при нормальных и патологических состояниях.
4. Общие свойства мочи.
5. Химический состав мочи.
6. Патологический состав мочи.

7. План занятия

- I. Введение. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов:
 - 1) Вопрос № 1. Механизм образования мочи.
 - 2) Вопрос № 2. Роль почек в поддержании кислотно-щелочного равновесия.
 - 3) Вопрос № 3. Особенности обмена веществ в почках при нормальных и патологических состояниях.
 - 4) Вопрос № 4. Общие свойства мочи.
 - 5) Вопрос № 5. Химический состав мочи.
 - 6) Вопрос № 6. Патологический состав мочи.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть.
 1. Лабораторная работа: Количественное определение белка.
 2. Лабораторная работа: Обнаружение кетоновых в моче.
- VI. Оценка знаний студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

«Количественное определение белка».

Метод основан на образовании тонкого кольца осадка белка при наслоении мочи на азотную кислоту. Если при взаимодействии крепкой азотной кислоты и слоя мочи образование кольца белка происходит между второй и третьей минутами, то в моче содержится приблизительно 0,033 г/л белка. Поэтому готовят порции мочи с разным разведением.

Ход работы. 1. Готовят ряд пробирок с разведенной мочой. Для этого берут пять пробирок, нумеруют их, наливают в каждую по 2 мл смеси переносят во вторую пробирку и т.д. Из пятой пробирки также берут 2 мл смеси и отбрасывают их, таким образом получают пробы мочи с разведением в 2, 4, 8, 16 и 32 раза.

2. Берут пять пробирок и наливают в каждую по 1 мл 50%-ного раствора азотной кислоты или реактива Ларионовой. Затем осторожно, по стенке, наслаивают такое же количество мочи. Отмечают, в какой пробирке между второй и третьей минутами появилось белковое кольцо.

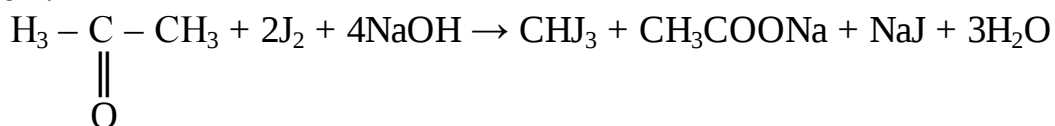
3. Чтобы вычислить содержание белка в исследуемой моче, необходимо 0,033 г/л умножить на степень разведения в этой пробирке.

«Обнаружение кетоновых тел».

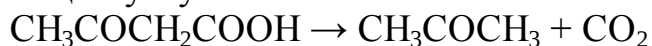
Кетоновые тела (β -гидрооксимасляная кислота, ацетоуксусная и ацетон) появляются в моче при нарушениях углеводного и жирового обменов, в частности при диабете, а также при голодании. В нормальной моче кетоновые тела обычными реакциями не обнаруживаются. Определение кетоновых тел в моче очень важно для диагностики заболевания, для контроля за ходом лечения и установлением диеты для больного диабетом.

Ход работы. 1. Проба Люголя на ацетон. К 2 мл мочи добавляют 3-4 капли раствора нитропруссиды натрия и 2-3 капли раствора гидроксида натрия. Появляется красно-бурое окрашивание. При подкислении становится ярко-красным. Если ацетон отсутствует в моче, при подкислении уксусной кислотой красное окрашивание переходит в желтое (реакция на креатинин в моче).

2. Проба Либена на ацетон. К 2 мл мочи добавляют 3-4 капли раствора гидроксида натрия и затем по каплям раствор Люголя до слабо-желтой окраски раствора. При наличии ацетона в моче жидкость мутнеет вследствие выделения бледно-желтого кристаллического осадка йодоформа, обладающего характерным запахом:



3. Проба Герхарда на ацетоуксусную кислоту. К 5 мл мочи прибавляют по каплям раствор хлорида железа (III), выпадает осадок фосфатов в форме FePO_4 ; при наличии ацетоуксусной кислоты от прибавления лишней капли хлорида железа (III) появляется винно-красное окрашивание (реакция на енолы), постепенно бледнеющее при стоянии вследствие самопроизвольного декарбоксилирования ацетоуксусной кислоты:



Практическое занятие № 36.

Тема: Биохимия мышц и соединительных тканей.

4. Цель: Изучить основные белки миофибрилл и их молекулярное строение. Биохимические механизмы мышечного сокращения и расслабления.

Биохимические изменения при мышечных дистрофиях и дегидратациях мышц, креатинурия.

5. Задачи:

После проведения занятия студенты должны знать:

- Основные белки миофибрилл и их молекулярное строение. Биохимические механизмы мышечного сокращения и расслабления.
- Роль градиента одновалентных ионов кальция в регуляции мышечного сокращения.
- Саркоплазматические белки и их функции. Экстрактивные вещества мышц и особенности энергетического обмена в мышцах, креатинфосфат.
- Биохимические изменения при мышечных дистрофиях и дегидратациях мышц, креатинурия.
- Коллаген и эластин, его аминокислотный состав. Первичная и пространственная конформация и его биосинтез. Роль аскорбиновой кислоты в гидроксировании лизина и пролина. Авитаминоз С.
- Образование коллагеновых волокон, фибриллярные белки соединительной ткани.
- Биологические функции гликозаминогликанов и протеогликанов (опорная, защитная, механическая, связывающая, регуляция иона). Оксипролинурия при коллагенозах.

6. Перечень вопросов.

1. Основные белки миофибрилл и их молекулярное строение. Биохимические механизмы мышечного сокращения и расслабления.
2. Роль градиента одновалентных ионов кальция в регуляции мышечного сокращения.
3. Саркоплазматические белки и их функции. Экстрактивные вещества мышц и особенности энергетического обмена в мышцах, креатинфосфат.
4. Биохимические изменения при мышечных дистрофиях и дегидратациях мышц, креатинурия.
5. Коллаген и эластин, его аминокислотный состав. Первичная и пространственная конформация и его биосинтез. Роль аскорбиновой кислоты в гидроксировании лизина и пролина. Авитаминоз С.
6. Образование коллагеновых волокон, фибриллярные белки соединительной ткани.
7. Биологические функции гликозаминогликанов и протеогликанов (опорная, защитная, механическая, связывающая, регуляция иона). Оксипролинурия при коллагенозах.

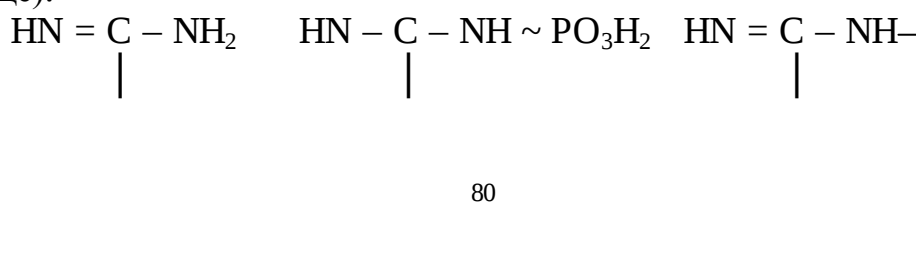
7. План занятия

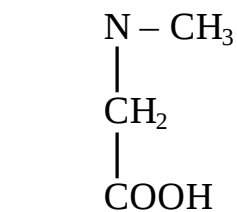
- I. Введение. Осветить значимость темы, перечень вопросов.
- II. Разбор вопросов:
 - 1) Вопрос № 1. Основные белки миофибрилл и их молекулярное строение. Биохимические механизмы мышечного сокращения и расслабления.
 - 2) Вопрос № 2. Роль градиента одновалентных ионов кальция в регуляции мышечного сокращения.
 - 3) Вопрос № 3. Саркоплазматические белки и их функции. Экстрактивные вещества мышц и особенности энергетического обмена в мышцах, креатинфосфат.
 - 4) Вопрос № 4. Биохимические изменения при мышечных дистрофиях и дегидратациях мышц, креатинурия.
 - 5) Вопрос № 1. Коллаген и эластин, его аминокислотный состав. Первичная и пространственная конформация и его биосинтез. Роль аскорбиновой кислоты в гидроксировании лизина и пролина. Авитаминоз С.
 - 6) Вопрос № 2. Образование коллагеновых волокон, фибриллярные белки соединительной ткани.
 - 7) Вопрос № 3. Биологические функции гликозаминогликанов и протеогликанов (опорная, защитная, механическая, связывающая, регуляция иона). Оксипролинурия при коллагенозах.
- III. Резюме педагога по теоретическим вопросам занятия.
- IV. Решение ситуационных задач, ролевые игры, тесты.
- V. Практическая часть.
 1. Лабораторная работа: Качественное и количественное определение креатинина в моче.
 2. Лабораторная работа: Количественное определение мочевой кислоты в моче.
- VI. Оценка знаний студентов.
- VII. Объяснение темы следующего занятия.

Лабораторная работа.

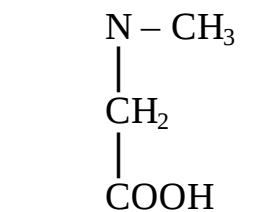
«Качественное и количественное определение креатинина в моче».

Креатинин образуется из креатинфосфата и является постоянной составной частью мочи. За сутки с мочой выделяется 0,5-2,0 г (4,4-17,6 ммоль/сут) креатинина, что составляет 2-7% азота всех азотсодержащих соединений мочи. Количество выделенного с мочой креатинина зависит от интенсивности процессов распада белков тканей организма и от содержания креатинина в пище (его много в мясной пище):

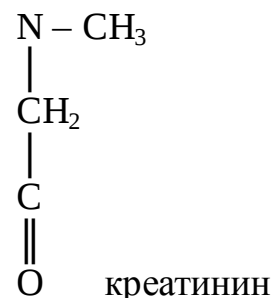




креатин



креатинфосфат



креатинин

Повышенное содержание креатинина в моче наблюдают при острых инфекциях, лихорадочных состояниях, у больного сахарным и несахарным диабетом. Моча здорового человека не содержит креатина, и выделение его с мочой свидетельствует о патологии поперечно-полосатых мышц (миастения, мышечная дистрофия).

Качественные реакции на креатинин.

1. Реакция Вейля. К 2 мл мочи прибавляют 2-3 капли свежеприготовленного раствора нитропруссид натрия $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ и подщелачивают по каплям 10%-ным раствором натрия: жидкость приобретает красное окрашивание, переходящее в желтое. Еще быстрее окрашивание переходит в желтое при подкислении уксусной кислотой. Последнее отличает эту реакцию от реакции на ацетон, при которой первоначальное окрашивание более устойчиво и приобретает при подкислении уксусной кислотой вишневый оттенок.

2. Реакция Яффе. К 2 мл мочи добавляют несколько капель насыщенного водного раствора пикриновой кислоты и подщелачивают гидроксидом натрия: появляется оранжево-красное окрашивание, обусловленное образованием красного таутомера пикрата креатинина.

«Количественное определение мочевого кислоты в моче».

Метод основан на способности мочевого кислоты в щелочной среде восстанавливать фосфорновольфрамный реактив. Количество восстановленного фосфорновольфрамного реактива, окрашенного в интенсивный синий свет, можно определить титрованием раствором $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, который при этом окисляется с образованием бесцветного продукта. Количество $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, израсходованного на окисление, эквивалентно количеству мочевого кислоты.

Ход работы. 1. В опытную пробирку вносят 2 мл мочи, в стандартную – 2 мл стандартного раствора мочевого кислоты (0,5 мг/мл). Затем в обе пробирки добавляют по 1 мл раствора NaOH и по 1 мл фосфорновольфрамного реактива. Появляется синее окрашивание.

2. Раствор титруют до обесцвечивания раствором $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Рассчитывают концентрацию мочевого кислоты в опытной пробе по стандартной. Пример расчета: на титрование опытной пробы пошло 3 мл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, на титрование стандартной пробы – 2 мл. Содержание мочевого кислоты в стандартном растворе 0,5 мг/мл.

Составляем пропорцию:

1 мг мочевой кислоты – 2 мл $K_3[Fe(CN)_6]$
х “-“ “-“ - 3 мл $K_3[Fe(CN)_6]$

Отсюда в 2 мл исследуемой мочи содержится мочевой кислоты

$$x = \frac{3,0 \cdot 1}{2,0} = 1,5 \text{ мг.}$$

Затем рассчитывают количество мочевой кислоты в суточном количестве мочи (1,5-2 л). в норме в сутки выделяется 0,3-1,2 г мочевой кислоты.