

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

**УЧЕБНО - МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ ДЛЯ
СТУДЕНТОВ
3-КУРСА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА**

ТАШКЕНТ - 2016 г.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по учебной работе к.ф.н..

----- С.У.Алиев

«-----» ----- 2016 г.

**УЧЕБНО - МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ ДЛЯ
СТУДЕНТОВ
3-КУРСА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА
(II-часть)**

ТАШКЕНТ – 2016г.

СОСТАВИТЕЛЬ:

Максудова А.Н.- кандидат биологических наук, доцент кафедры токсикологической, органической и биологической химии

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Абдуллаева М.М.- доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии УзМУ

Саидов С.С.- доктор медицинских наук, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармации

Учебно-методическое пособие для лабораторных работ по биологической химии для студентов 3-курса фармацевтического факультета написано в соответствии с учебной программой

Учебно-методическое пособие рассмотрены и утверждены на Центральном Методическом совете Ташкентского фармацевтического института

2016 год « » протокол №

Председатель: д.ф.н., профессор

Х.С.Зайнутдинов

Учебно-методические указания рассмотрены и утверждены на Ученом совете Ташкентского фармацевтического института

2016 год « » протокол №

ВВЕДЕНИЕ

Структура лабораторных работ включает следующие компоненты: лабораторная работа, выполнение методов педагогической технологии и текущий контроль, самостоятельная работа студентов.

Студенты фармацевтического факультета третьего курса с пятого семестра начинают изучение биологической химии. Учебным планом с пятого семестра предусматривается 18 четырехчасовых занятий.

Цель проведения лабораторных работ: на основании знания реакционной способности органических молекул сформировать умение и навыки выполнения качественных реакций на функциональные группы, получение отдельных представителей различных классов органических соединений, проведение с ними характерных реакций, что способствует глубокому усвоению теоретического материала.

Студенты приобретают практические навыки работы с органическими веществами, химической посудой и приборами.

На первом занятии студенты обязательно знакомятся с правилами техники безопасности, с оказанием первой помощи при ожогах и отравлениях и оформляют в журнале инструктаж.

Лабораторная работа выполняется каждым студентом индивидуально. С целью экономии аудиторного времени студент дома, используя учебник для лабораторных работ, заранее частично заполняет протокол работы.

На кафедре принята следующая форма протокола, который заполняют на развернутом листе тетради.

N	Название опыта	Схема реакции	Условия реакции (t ⁰ , катализатор, и.т.д.)	Наблюдаемый результат опыта (изм.окраски, выделение газа, появление осадка)	Вывод
1	2	3	4	5	6

Графы 1,2,3,4 заполняются дома при подготовке к занятию, а графы 5 и 6 - после выполнения опыта. Особое внимание следует обратить на заполнение шестой графы. Правильный, хорошо продуманный вывод, с элементами обобщения, сделанный на основе проведенной реакции, свидетельствует о сознательном и глубоком усвоении учебного материала. Полностью оформив протокол, студент защищает работу. Преподаватель оценивает каждого студента к концу занятия и объявляет рейтинговый балл.

Выполнив и защитив указанное в плане количество лабораторных работ по отдельным темам, студент допускается к сдаче контрольных работ.

Знание студента оценивается суммой рейтинговых баллов текущего контроля, промежуточных контрольных работ, самостоятельных работ и заключительной контрольной письменной работы в конце семестра.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 7

**Тема: Обмен веществ и энергии. Окисление пирувата до ацетила-КоА.
Цикл Кребса.**

Цель обучения: Сформировать знания о катаболизме и анаболизме, расщеплении высокомолекулярных веществ на разных уровнях ж.к.т, о фазах освобождения энергии из питательных веществ, образовании ацетил-КоА.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- приготовление препарата сукцинатдегидрогеназы;
- проведение ферментативной реакции с различными субстратами;
- проведение окислительно-восстановительной реакции с красителем;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: выделение сукцинатдегидрогеназы из ткани мышц. Проведение инактивации фермента. Проведение ферментативной реакции с различными субстратами.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. К какому классу относятся сукцинатдегидрогеназа ?
2. В каком биохимическом процессе участвуют фермент сукцинатдегидрогеназа, Сущность принципа обнаружения активности сукцинатдегидрогеназы?
3. Какие вещества служат источником энергии в работающей мышце?
4. Катаболизм основных пищевых веществ (углеводы, жиры, аминокислоты, белки). Понятие о специфических путях катаболизма. Специфические пути катаболизма пищевых веществ. Образование пирувата из углевода и большинства аминокислот.
5. Общий путь катаболизма: окисления пирувата и ацетил КоА до конечных продуктов распада. Биологическое значение и локализация компонентов общего пути катаболизма в клетке.
6. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты: биологическое значение, последовательность реакций, строение пируватдегидрогеназного комплекса, коферменты реакций, механизм катализа. Механизмы регуляции скорости окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты.
7. Цикл лимонной кислоты: биологическая роль, последовательность реакций, характеристика ферментов. Ключевые реакции цикла лимонной кислоты. Реакции, пополняющие цикл лимонной кислоты (анаэробные реакции)
8. Связь между общим путем катаболизма и цепью переноса электронов и протонов. Анаболические функции цикла лимонной кислоты.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Работа 1. Сукцинатдегидрогеназа мышц и конкурентное торможение ее активности

Сукцинатдегидрогеназа мышц является железофлавопротеином и прочно связана с клеточной структурой. В качестве окисляемого субстрата берут янтарную кислоту, а в качестве акцептора водорода – краситель 2,6-дихлорфенолиндофенол.

Материал исследования: мышечная кашица

Реактивы: янтарная кислота 1%, малоновая кислота 1%, 2,6-дихлорфенолиндофенол 0,1 %, дистиллированная вода

Оборудование: пробирки, воронки, стеклянные палочки, бюретки, ступки, пинцеты, водяная баня, термостат.

Ход работы: 1. Для получения ферментного препарата 1-2 гр свежей мышцы, измельченной ножницами, растирают в ступке, затем мышечную кашицу переносят на двойной слой марли, помещенной в 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 4 пробирки.

2. Содержимое первой пробирки кипятят в течении 1-2 мин для инактивации фермента. Затем в пробирки приливают реактивы по схеме:

№	Сукцинат	Вода	Малонат	Краситель
1	1	0,5	-	2 капли
2	1	0,5	-	2 капли
3	-	1,5	-	2 капли
4	1	-	0,5	2 капли

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

Оформление работ: Результаты заносят в таблицу

Заполните таблицу

Промежуточные метаболиты общего пути катаболизма	Источники образования	Возможные продукты превращения
Пировиноградная кислота		
Ацетил – КоА		
Промежуточные метаболиты цикла		

Кребса:		
....		

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 8

Тема: Тканевое дыхание и окислительное фосфорилирование.

Цель обучения: Сформировать знания о структуре и функциях митохондрий. Тканевое дыхание и окислительное фосфорилирование, структура и функции дыхательной цепи.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- приготовление препарата цитохромоксидазы;
- проведение ферментативной реакции с активном и денатурированным ферментами;
- проведение окислительно-восстановительной реакции с красителем;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы.

Основные этапы занятия: Экстракция фермента из мышечной ткани. Инактивация фермента. Проведение ферментативной реакции с активным и денатурированным ферментами.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Структура и функция дыхательной цепи.
2. Организация компонентов дыхательной цепи.
3. Характеристика переносчиков дыхательной цепи.
4. Окислительное фосфорилирование, локализация пунктов фосфорилирования в дыхательной цепи.
5. Механизм сопряжения дыхания и фосфорилирования в митохондриях
6. Механизм фосфорилирования.
7. К какому классу относятся ферменты, с которыми вы познакомились при выполнении практических работ?
8. В каком биохимическом процессе участвуют ферменты сукцинатдегидрогеназа, цитохром С и цитохромоксидаза?
9. Сущность принципа обнаружения активности сукцинатдегидрогеназы?
10. Какие вещества служат источником энергии в работающей мышце?

Ситуационные задачи:

1. Рассчитать энергетический эффект окисления 1 моль пирувата до ацетил –КоА.
2. Рассчитать энергетический эффект окисления 1 моль ацетил КоА до CO_2 и H_2O .

3. Если к суспензии митохондрий, использующих в качестве единственного субстрата дыхания пировиноградную кислоту, добавить малооновую кислоту, то поглощения O_2 митохондриями резко снизятся, в то же время, увеличится концентрация одного из метаболитов цитратного цикл. Какой метаболит ЦТК накапливается? Представьте уравнения реакций.
4. При передозировки барбитуратов значительно снижается скорость реакции ЦТК. Используя схему ЦПЭ и ЦТК объяснить:
 - a. Какие реакции цитратного цикла окажутся заблокированными в этих условиях?
 - b. Какова причина снижения скорости реакции ЦТК?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Работа 2. Цитохромоксидаза мышц

Этот фермент является заключительным звеном цепи переноса электронов и катализирует перенос электронов на кислород воздуха. По химической природе цитохромоксидаза является медьгемопротеином, т.е. белком, содержащем гем и медь в составе протетической группы.

Материал исследования: мышечная кашица

Реактивы: п-фенилендиамин 1% водный, α -нафтол 1% спиртовой, дистиллированная вода

Оборудование: пробирки, ступки, фильтры

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

2. Отмытую от редуцированных веществ и водорастворимых ферментов мышечную кашицу делят на 2 части. Одну часть на фильтровальную бумагу, а другую-в пробирку, добавляют 1 мл дистиллированной воды и кипятят в течении 1 мин. После остывания жидкость осторожно сливают, а мышцу переносят на фильтровальную бумагу.

3. На обе порции наносят по 1-2 капли индофенольного реактива «Нади» смесь п-фенилендиамин и α -нафтола. Через 5-10 мин на одной порции мышечной кашицы появляется сине-фиолетовое окрашивание, обусловленное образованием индофенолового синего – продукта окисления и конденсации α -нафтола и п-фенилендиамина. Реакция катализируется цитохромоксидазой мышц. На прокипяченной порции мышечной кашицы окрашивания не появляется вследствие тепловой денатурации фермента.

Оформление работы: Результаты записывают в таблицу.

Работа 3. Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфат)

Материал исследования: мышечная ткань животного

Реактивы: ТХУ 2,5%, HCL 1моль/л, NaOH 1моль/л, молибдат аммония 1%, аскорбиновая кислота 1%

Оборудование: пробирки, пипетки, воронки, фильтры, цилиндр, вместимостью 10 мл, ледяная и кипящая водяные бани, ФЭК, кювета с толщиной слоя 1 см.

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

Осадок заливают 5 мл дистиллированной воды и продолжают экстракцию 5 мин на холоду. Экстракт фильтруют в ту же мерную пробирку и доводят объем до 10 мл дистиллированной водой.

2. В две пробирки по 0,5 мл безбелкового фильтрата. 1-контрольная, 2-опытная. В опытную пробирку добавляют 1 мл 1моль/л HCL, закрывают фольгой и в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем охлаждают и добавляют 1 мл 1моль/л NaOH. В контрольную пробирку добавляют 1 мл 1моль/л HCL и 1 мл 1моль/л NaOH. В опытную и контрольную пробирки добавляют по 7,5 мл дис воды для получения 10 мл общего объема.

3. Из обеих пробирок по 5 мл жидкости, перенести в 2 другие пробирки и добавить по 0,5 мл молибдата аммония, 0,5 мл аскорбиновой кислоты и по 2 мл дис воды. Смесь быстро перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин.

4. 2 пробы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром против воды. В опытной пробе определяемый неорганический фосфор представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и фосфатных солей. В контрольной пробе – только фосфатные соли.

5. Вычисляют из оптической плотности, найденной для опытной пробы, оптическую плотность, полученную для контрольной пробы. Концентрацию лабильно связанного неорганического фосфора в пробе находят по калибровочному графику.

Расчет. Рассчитывают количество лабильно связанного фосфора в мг на 100г сырой ткани учитывая разведение:

$$X = A \cdot 3,3 \cdot 400 \cdot 100;$$

X-содержание макроэргических соединений в пересчете на 1 г АТФ в 1—г сырой ткани, мг/100 г; А-содержание АТФ в пробе, мг; 3,3*400 –коэффициент пересчета на 1 г ткани с учетом разведения растворов.

Оформление работы: Принцип метода и полученные результаты заносить в тетрадь.

Заполните таблицу:

Комплекс дых. путей	Название фермента	Участвует ли в переносе:		Кофермент (название, формула)	Акцептор электронов	Донор электронов
		Электронов	Протонов			
I						
II						
III						
IV						

Заполните таблицу.

Энергетический эффект и регуляция ЦТК

фермент ЦТК	тип реакции	кофакторы	количество моль АТФ	для регуляторных ферментов	
				активаторы	ингибиторы

Заполните таблицу

Промежуточные метаболиты общего пути катаболизма	Источники образования	Возможные продукты превращения
Пировиноградная кислота		
Ацетил – КоА		
Промежуточные метаболиты цикла Кребса:		
....		

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 9

**Тема: Анаэробное образование энергии из углеводов.
Биосинтез углеводов в тканях. Глюконеогенез.**

Цель обучения: Сформировать знания об анаэробном окислении углеводов. Необратимые реакции гликолиза. Биосинтез углеводов из неуглеводных источников. Переваривание углеводов в ж.к.т. Образование молочной кислоты в мышечной ткани. Энзиматическое определение глюкозы.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- производить сбор слюны;
- приготовление препарата желудочного сока и панкреатина;
- ознакомление с методом определения глюкозы с помощью биотеста;
- создание анаэробных условий в пробирке ;
- определение оптической плотности на ФЭК;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: Приготовление ферментных препаратов. Проведение ферментативной реакции. Определение молочной кислоты в анаэробных условиях. Ферментативное определение глюкозы с помощью биотеста. Определение оптической плотности раствора.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Аэробный гликолиз, последовательность реакций.
2. Реакции субстратного фосфорилирования АДФ в гликолизе.
3. Энергетика и биологическое значение аэробного гликолиза.
4. Анаэробный гликолиз, последовательность реакций.
5. Реакции оксидоредукции в анаэробном гликолизе.
6. Энергетика и биологическая роль анаэробного гликолиза, регуляция.
7. Диагностическое значение определения глюкозы в крови.
8. Биосинтез углеводов в тканях.
7. Процесс новообразования глюкозы в тканях.
8. Неуглеводные источники для глюконеогенеза.

9. Почему амилаза слюны не действует в присутствии желудочного сока?
10. Какой из углеводов пищевых продуктов не переваривается в желудочно-кишечном тракте?

11. Какими свойствами гликогена можно объяснить реакции осаждения его из раствора?

12. Какие вещества являются конечными продуктами гликолиза?

13. Какие фосфорилированные соединения образуются в процессе гликолиза?

Ситуационные задачи:

1. С помощью какого реактива удаляют белки из крови или сыворотки перед определением сахара? Почему нужно обязательно проделать эту процедуру?

2. Какой принцип положен в основу метода определения сахара в крови с о-толуидином и антроном? Почему считают, что с помощью этих методов определяют «истинную глюкозу»?

3. Какое диагностическое значение имеет определение глюкозы в крови?

4. Какое диагностическое значение имеет определение сиаловых кислот.

Впишите в таблицу «Энергетический эффект анаэробного расщепления глюкозы» количество использованных (-АТФ) или синтезированных (+АТФ) молекул АТФ. Подсчитайте суммарный энергетический эффект 1 молекулы глюкозы до CO_2 и H_2O .

Этапы аэробного распада глюкозы	- АТФ	+АТФ	Способ фосфорилирования

Заполнить таблицу «Аллостерические регуляторы гликолиза и глюконеогенеза в печени»

Название процесса	Ключевые ферменты	Ингибиторы	Активаторы
Гликолиз			
Глюконеогенез			

Заполните таблицу: «Переваривание углеводов»

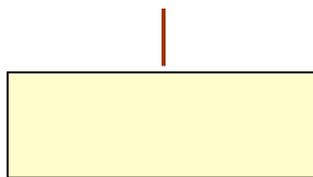
Название ферментов, место их синтеза	Место действия ферментов (отдел ЖКТ)	Химическая реакция	Гидролизуемая связь

Заполните таблицу: «Регуляция обмена углеводов гормонами»

Название гормона	Место синтеза гормона	Сигнал для синтеза и секреции	Клетки - мишени	Влияние на обмен углеводов	Изменения концентрации глюкозы в крови как результат действия гормона

Кластер «Пути превращение углеводов в организме»





САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Работа 4. 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.

Материал исследования: крахмал, 1%- ный раствор; целлюлоза, 1% ная водная суспензия.

Реактивы: желудочный сок; панкреатин, 5%- ный раствор; слюна; сульфат меди, 1%- ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки; бюретки; термостат (37°C); газовая горелка.

Ход работы. 1. Готовят пробы соответственно таблице:

№ Пробы	Раствор 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 37°C 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 гидроксида натрия и по 5 капель 1%-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 (I) указывает на положительную реакцию Троммера в присутствии глюкозы и мальтозы.

Оформления работы. Результаты опыта оформляют в виде таблицы:

№ пробы	Субстрат	Обнаружение продуктов реакции	Фермент, расщепляющий углеводы	Источники фермента	Отдел желудочно-кишечного тракта	Объяснение результатов

Работа 5. Анаэробный гликолиз в мышечной ткани.

Анаэробным гликолизом называется распад глюкозы до молочной кислоты в отсутствие кислорода.

Суммарное уравнение процесса можно выразить так:



Гликолиз и гликогенолиз обеспечивают возможность выполнения организмом физиологических функций в условиях недостаточного снабжения тканей и органов кислородом.

Процесс анаэробного окисления наиболее активно протекает в мышечной ткани, поэтому эта ткань является удобным объектом изучения процесса. При гликолизе образуются промежуточные продукты- глюкозо-6-фосфат, фруктозо-1,6- дифосфат, фосфотриозы, фосфоенолпируват, пируват. Конечным продуктом процесса является молочная кислота. 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 (диметилвый эфир пирокатехина). Предварительно молочная кислота под действием крепкой серной кислоты превращается в уксусный альдегид, который при взаимодействии с вератролом дает окрашенное соединение.

Материал исследования: мышечная кашица.

Реактивы: фосфатный буфер с рН 8,0; глюкоза, 1%-ный раствор; трифлоруксусная кислота, 10%-ный раствор; сульфат меди; полунасыщенный раствор; гидроксид кальция (порошок); серная кислота, концентрированная; вератрол, 0,1%-ный спиртовой раствор.

Оборудование: штатив с пробирками; мерный цилиндр вместимостью 10 мл; бюретки; стеклянные воронки; бумажные фильтры; пробирки; стеклянные палочки; водяные бани ; лед; термостат (37°С); технические весы;

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 разобшения инкубационной смеси с кислородом воздуха. Обе пробирки инкубируют в термостате при 37°C 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 кашице до начала опыта.

Оформление работы. Записывают суммарное уравнение гликолиза, результаты опыта вносят в таблицу:

Субстрат	Источник ферментов гликолиза	Интенсивность окраски проб	
		опытная	контрольная

Количественное определение метаболитов углеводного обмена.

Несмотря на постоянное потребление глюкозы тканями и периодическое поступление ее из кишечника после приема пищи, содержание глюкозы в крови постоянно и колеблется в пределах 3,3-5,5 ммоль/л (60-100 мг/дл). Эта константа сохраняется благодаря наличию сложных механизмов регуляции, включающих центральную нервную систему и гормоны. Очень большое значение в поддержании уровня глюкозы в крови имеет нормальная деятельность печени. При некоторых заболеваниях, например при диабете, содержание сахара в крови может увеличиваться в 2-3 раза по сравнению с нормой; такое состояние называется гипергликоземией. Может наблюдаться и снижение содержания сахара ниже 3,3 ммоль/л, тогда говорят о

гипогликоземии. Установление гипер и гипогликоземии имеет большое диагностическое значение.

Работа 6. Определение сахара в крови по цветной реакции с о-толуидином [метод Hulmanna'a]

Метод состоит в колориметрическом определении интенсивности окрашивания раствора образующегося при нагревании о-толуидина с глюкозой в присутствии уксусной кислоты. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации глюкозы. Содержание глюкозы определяют в безбелковом фильтрате крови, поэтому белки предварительно осаждают 3%-ным раствором ТХУ. Метод является специфическим и дает возможность определять «истинную» глюкозу, так как другие редуцирующие вещества крови

(глютатион, глюкокуроновая кислота, аскорбиновая кислота и др) с о-толуидиновым реактивом не дают окраски.

Материал исследования: цельная кровь.

Реактивы: о-толуидиновый реактив; ТХУ, 3%-ный раствор; глюкоза, стандартный раствор 5,5 ммоль/л (приготовлен разбавлением 27,75 ммоль/л раствора).

Оборудование: штатив с пробирками; центрифужные пробирки; микропипетки; пипетки; бюретки; фильтры; воронки; стеклянные палочки; центрифуга; центрифужные весы; ФЭК; фольга.

Ход работы. 1. В три пробирки (одна из них - центрифужная) отмеривают по 1,8 мл раствора ТХУ. 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, моль/л;

$C_{\text{ст}}$ - концентрация стандартного раствора глюкозы, моль/л;

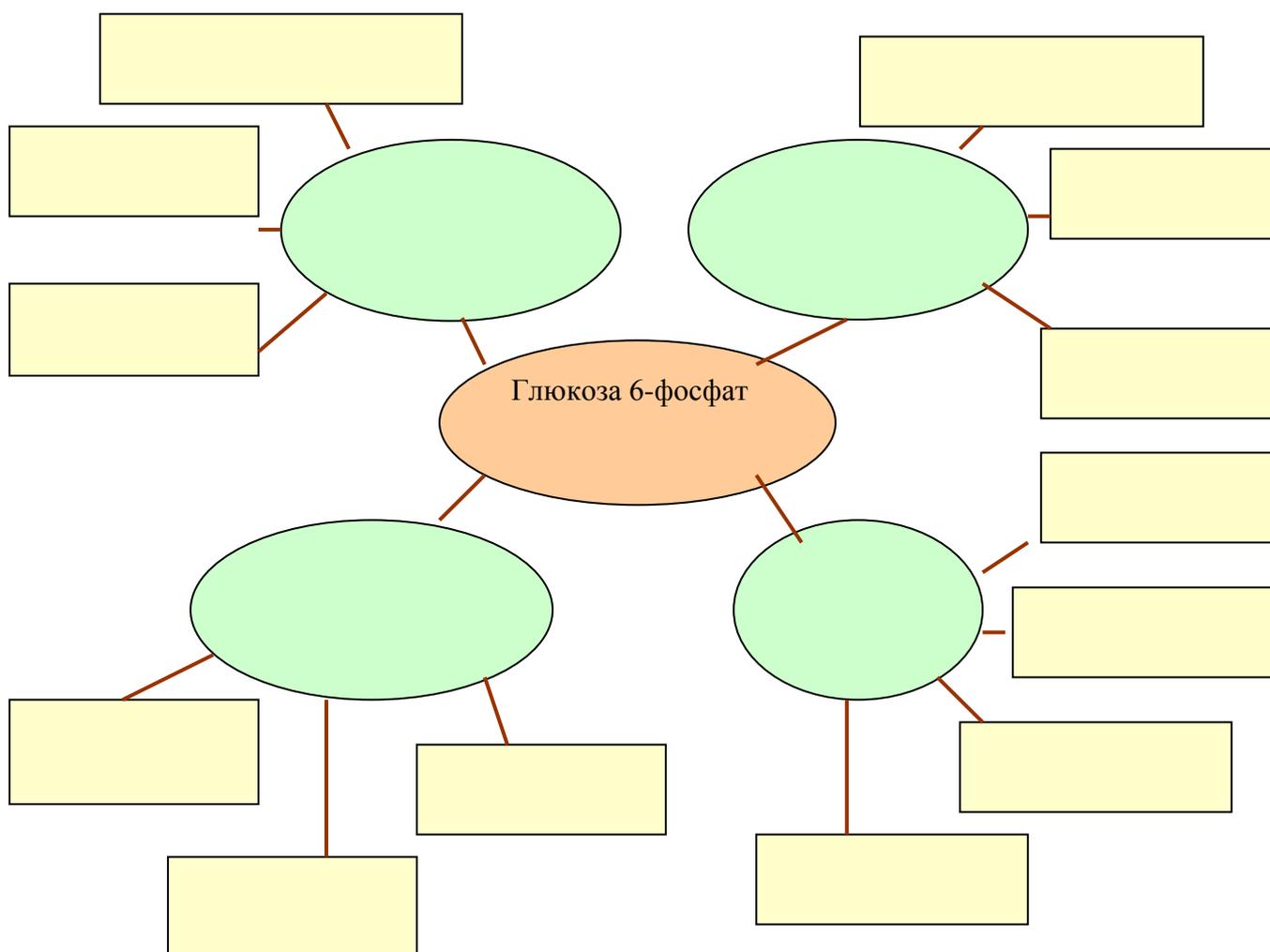
$E_{\text{оп}}$ - оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ - оптическая плотность стандартной пробы.

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

Оформление работы. Принцип метода, уравнение реакции и расчет заносят в протокол опыта. Сравнивая полученный результат с нормой, делают соответствующий вывод.

Кластер «Пути превращения глюкозы 6-фосфат в организме»



**Тема: Переваривание и всасывание углеводов в ж.к.т.
Пентозофосфатный цикл. Синтез и распад гликогена.**

Цель обучения: Сформировать знания о структуре полисахаридов, синтезе и распаде гликогена. Пути превращения глюкозо-6- фосфата в клетке. Выделение гликогена из печени. Спиртовое брожение.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- выделение гликогена из ткани печени сытого и голодного животного;
- осаждение гликогена солями щелочных и щелочноземельных, тяжелых металлов;
- проведение реакции спиртового брожения сахарозы;
- проведение качественных реакций с йодом;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы.

Основные этапы занятия: выделение гликогена из ткани печени сытого и голодного животного, осаждение гликогена солями щелочных и щелочноземельных, тяжелых металлов. Проведение реакции спиртового брожения сахарозы, проведение качественных реакций с йодом.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Основные углеводы пищи, их характеристика.
2. Переваривание и всасывание углеводов в ж.к.т.
3. Общая схема путей метаболизма глюкозы в организме и их оценка.
4. Фосфорилирование глюкозы, дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата пути превращения глюкозо-6- фосфата в клетке.
5. Распад гликогена. Механизм активирования фосфоорилазы В.
6. Биосинтез гликогена. Взаимоотношение процессов синтеза и распада гликогена.
7. Спиртовое брожение.
8. Регуляция обмена углеводов.

Ситуационные задачи:

1. Как строят сахарную кривую?
2. Почему необходимо неоднократно измерить содержание сахара, не ограничиваясь одним определением?
3. Чем различаются сахарные кривые у здорового человека и у больного диабетом?
4. Как объяснить снижение сахара в крови после введения инсулина?
5. Почему после введения адреналина содержание сахара в крови увеличивается?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Работа 7. Спиртовое брожение. Обнаружение продукта спиртового брожения.

Спиртовое брожение – процесс распада глюкозы под влиянием ферментов дрожжей с образованием углекислого газа и этилового спирта. Процесс гликолиза и брожение протекают одинаково до образования пировиноградной кислоты с выделением тепла и образованием двух молекул АТФ. Под действием дрожжевой карбоксилазы пировиноградная кислота теряет углекислый газ и превращается в уксусный альдегид, последний восстанавливается в спирт под действием алкогольдегидрогеназы за счет восстановленной формы кофактора – НАДН(Н⁺)

Ход работы. А) Заполнение бродильного аппарата. 1г свежих пекарских дрожжей или 0,5 г сухих дрожжей растирают в ступке, приливая небольшими порциями 5% раствор глюкозы в количестве 20мл. затем в смесь переносят в бродильный аппарат (аппарат Эйхгорка) так, чтобы закрытое колено было заполнено полностью, а расширенная его часть только до половины. С заполненной трубкой прибор помещают в термостат при 37⁰ С на 30 – 50 мин. Когда произойдет накопление газа в верхней части закрытого колена прибора, можно проделать качественные реакции на углекислый газ и на спирт.

Б) Обнаружение углекислого газа. В бродильный аппарат наливают 10% раствор едкого натра до краев сосуда, и, закрыв отверстие пальцем, перемешивают содержимое прибора. Углекислый газ поглощается щелочью, создавая вакуум, и кожа пальца присасывается к отверстию прибора.

В) Обнаружение этилового спирта с помощью йодоформной пробы. 2 – 3 мл жидкости из бродильного аппарата отфильтровывают в пробирку, добавляют несколько капель 10% раствора йода до появления желтого окрашивания и слегка нагревают. Через некоторое время ощущается запах йодоформа.

Оформление работы: Принцип метода и полученные результаты заносить в тетрадь.

Работа 8. 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 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 удается обнаружить обычными качественными реакциями.

Материал исследования: печень животного сытого и печень животного после суточного голодания.

Реактивы: трихлоруксусная кислота, 5%-ный раствор; этиловый спирт; сульфат аммония (в порошке); ацетат свинца, 10%-ный раствор; раствор Люголя; физиологический раствор.

Оборудование: аптечные весы и разновес; штативы с пробирками; воронки; стеклянные палочки; бумажные фильтры; ступки; химический стакан; газовые горелки.

Метод основан на том, что гликоген хорошо растворим в воде и достаточно устойчив в слабокислой среде. Поэтому метод выделения гликогена сводится к механическому 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 голодавшего животных. Печень забитых животных быстро извлекают, разрезают на тонкие пласты и немедленно опускают в стаканы с кипящим физиологическим раствором для инактивации фермента фосфорилазы гликогена, очень активно разрушающего гликоген. Через 10-15 мин печень извлекают из раствора. Дальнейшее исследование печени сытого и голодавшего животного проводится параллельно.

2. Отвешивают 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 прибавляют 3 мл дистиллированной воды, суспензию перемешивают 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 этилового спирта, во вторую - 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 выполняют с фильтратом, полученным из печени голодавшего животного.

Оформление работы. Внесите результаты в таблицу; сравните результаты, полученные с печенью сытого и голодавшего животного.

Препарат	Реактивы
----------	----------

	спирт	Раствор ацетата свинца	Сульфат аммония
Печень сытого животного			
Печень голодавшего животного			

Работа 9. Влияние сахарной нагрузки на содержание сахара в крови.

Определение содержания сахара в крови после нагрузки глюкозой имеет большое значение для выявления нарушений углеводного обмена. У здорового человека однократный прием 50-100 г глюкозы или тростникового сахара вызывает временное повышение содержания сахара в крови (гиперглюкоземия). Это обусловлено тем, что печень не успевает превратить весь сахар в гликоген и содержание его в крови повышается. Повышение содержания сахара в крови вызывает усиленное выделение инсулина β -клетками островков Лангерганса, что приводит к снижению уровня глюкозы в крови. У здорового человека максимальный подъем наблюдается через 30 мин. Содержание сахара при этом может удваиваться, но через 90-120 мин возвращается к норме и в ряде случаев может быть даже ниже исходной величины. У здоровых людей нагрузка глюкозой, как правило, не вызывает глюкозурию (выделение сахара с мочой). При диабете и некоторых других заболеваниях (акромегалия, гипертиреоз, гепатит, цирроз печени и гликогеновая болезнь) после сахарной нагрузки наблюдается резкое увеличение сахара в крови (до 22,2 ммоль/л) и замедленное снижение его уровня.

Материал исследования: кровь из пальца.

Реактивы: все реактивы для определения сахара по одной из описанных выше методик; раствор глюкозы;

Оборудование: стакан для разведения глюкозы; все оборудование, необходимое для определения сахара крови по соответствующей методике.

Ход работы. Натощак берут кровь из пальца и определяют в ней содержание сахара. Затем дают принять испытуемому глюкозу или тростниковый сахар из расчета 1,0-1,5 г на 1 кг массы тела в виде раствора. Через 30, 60 и 120 мин после приема сахара снова определяют глюкозу в крови.

Оформление работы. Полученные данные вносят в таблицу и на их основании строят кривую, откладывая на оси абсцисс время взятия крови, а на оси ординат - найденное содержание сахара в крови (в ммоль/л).

Метод количественного определения	Принятая глюкоза	Концентрация глюкозы в крови	
		До	После нагрузки

ГЛЮКОЗЫ		нагрузки глюкозой			
			Через 30 мин	Через 60мин	Через 120 мин

Полученный график называют сахарной кривой. При анализе кривых обращают внимание на такие параметры: а) начальное содержание сахара; б) быстрота и высота подъема; в) продолжительность гипергликоземии и характер ее снижения

Работы 10. Количественное определение глюкозы крови глюкозодоксидазным методом.

Глюкоза окисляется кислородом воздуха при каталитическом действии глюкозооксидазы (КФ 1.1.3.4. β- D- глюкоза- O₂ – оксидоредуктаза) с образованием перекиси водорода и δ-глюконалактона. Образовавшуюся перекись водорода определяют по индофеноловой реакции аминокантипирина с хромогеном катализируемая пероксидазой (КФ 1.11.1.7. донор: перекись водорода-оксидоредуктаза). Количество образовавшегося красителя при соблюдении рабочих условий пропорционально содержанию глюкозы. Интенсивность окраски определяют на фотоэлектрочелюстимере.

Ход работы. Готовят три пробы: опытную, эталонную и контрольную по схеме:

	Опыт	Эталон	Контроль
Рабочий раствор (мл)	2,00	2,00	2,00
Инкубируют 5 мин при 37 ⁰ С, затем добавляют			
Сыворотка крови (мл)	0,1	-	-
Калибровочный раствор (мл)	-	0,1	-
Дистиллированная вода (мл)	-	-	0,1

Содержимое встряхивают, инкубируют 30 мин при 37° С и фотометрируют против воды в кювете с длиной хода луча 1см при 490 нм. Причем фотометрирование не должно длиться не более 5 мин.

Содержание глюкозы рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{A_{\text{оп}}}{A_{\text{эт}}} \times C_{\text{эт}} = \frac{A_{\text{оп}}}{A_{\text{эт}}} \times 10$$

Где, $C_{\text{оп}}$ - концентрация глюкозы в крови, Мм.; $A_{\text{оп}}$ - оптическая плотность опытной пробы; $A_{\text{эт}}$ - оптическая плотность стандартной пробы; $C_{\text{эт}} = 10$ ммоль/л

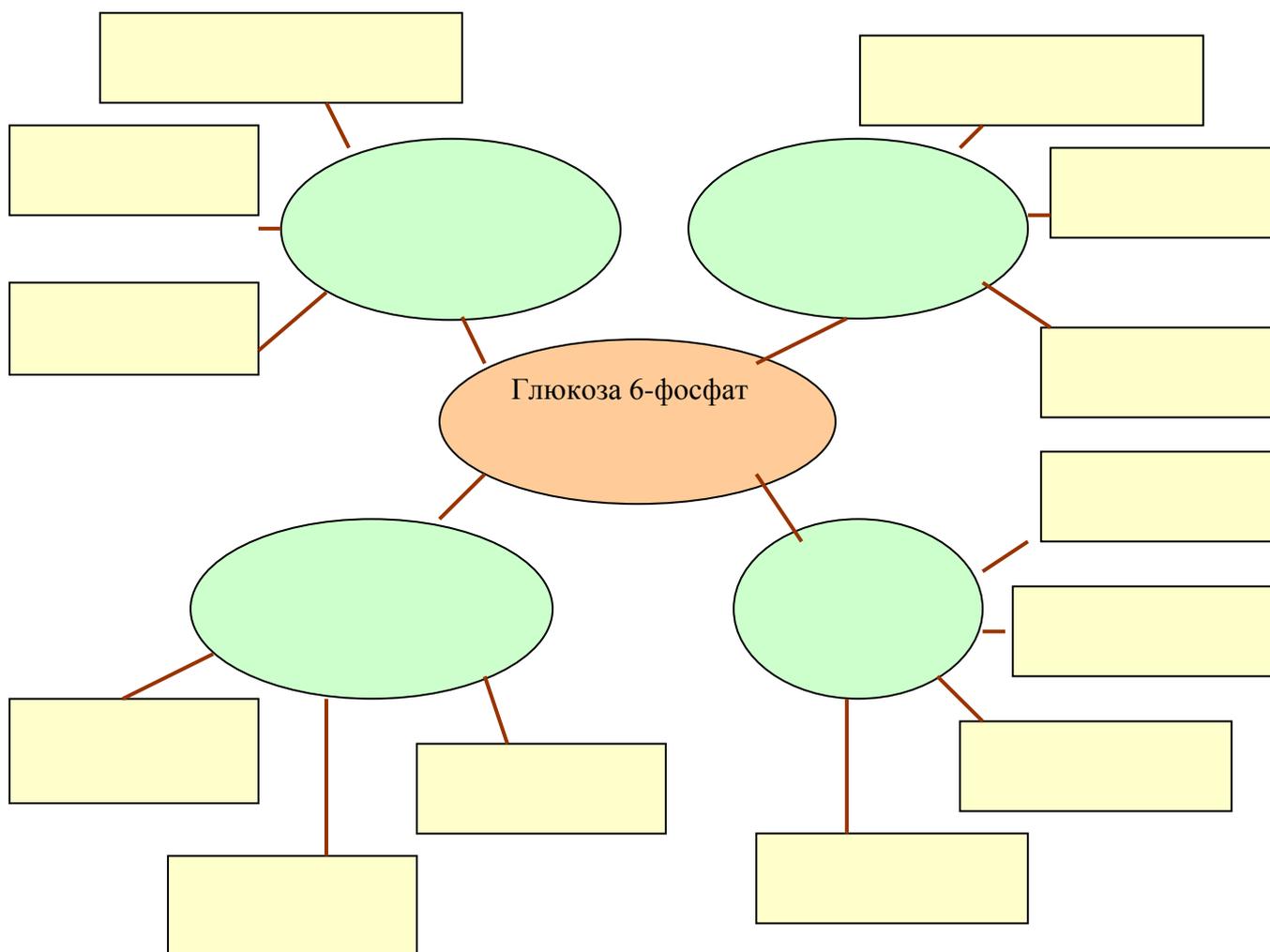
Заполните таблицу: «Переваривание углеводов»

Название ферментов, место их синтеза	Место действия ферментов (отдел ЖКТ)	Химическая реакция	Гидролизуемая связь

Заполните таблицу: «Регуляция обмена углеводов гормонами»

Название гормона	Место синтеза гормона	Сигнал для синтеза и секреции	Клетки - мишени	Влияние на обмен углеводов	Изменения концентрации глюкозы в крови как результат действия гормона

Кластер «Пути превращения глюкозы 6-фосфат в организме»



ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 11

Тема: Переваривание и всасывание липидов в ЖКТ. Распад липидов в тканях.

Цель обучения: Сформировать знания о переваривании и всасывании липидов в ж.к.т. Ресинтез липидов в эндотелиальных клетках кишечника. Распад триглицеридов в тканях. Эмульгирование жиров. Качественные реакции на желчные кислоты

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- проведение эмульгирование жиров в различных растворах;
- изучение влияние желчи на поверхностное натяжение воды;
- проведение реакции Петтенкофера на желчные кислоты;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: Приготовление различных растворов для эмульгирования липидов. Наблюдение поверхностного натяжения воды под влиянием желчных кислот.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Переваривании и всасывании липидов в ж.к.т.
2. Роль желчных кислот в эмульгирование жиров.
3. Ресинтез липидов в эндотолиальных клетках кишечника.
4. Ресинтез триглицеридов в клетках кишечника. Образование хиломикронов, их состав и транспорт.
5. Внутриклеточный липолиз, гормональная регуляция этого процесса
6. Использование резервного жира.
7. Принцип метода качественных реакций эмульгировании триацилглицеридов
внутриклеточный распад триглицеридов.
8. Окисление глицерина.
9. Окисление жирных кислот.
10. Особенности окисления жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов
11. Энергетический баланс окисление жирных кислот.
12. Значение жирных кислот как энергетических субстратов для разных органов и тканей.

Ситуационные задачи:

1. Суточная потребность в липидах. Незаменимые факторы питания, поступающий в организм человека в составе липидов пищи.
2. Желчные кислоты, их структура и биороль. Конъюгация желчных кислот.
3. Ресинтез ТАГ и образование эфиров холестерина в стенке кишечника.
4. Липопротеины плазмы крови. Классификация ЛП по плотности и электрофоретической подвижности.
5. Функция ЛП плазмы. Место образование и превращение различных видов ЛП.
6. Дислипопротеинемии. Гиперхиломикронемия, гипертриглицеридемия

Заполните таблицу: «Переваривание липидов»

	Панкреатическая липаза	Липопротеинлипаза	ТАГ-липаза
Локализация реакции			
Активаторы реакции			
Основные продукты реакции			
Судьба			

продуктов реакции			
----------------------	--	--	--

Заполните таблицу: «Метаболизм жирных кислот»

Процессы	β - окисление	Биосинтез ЖК
Локализация процесса		
Переносчик субстрата через митохондриальную мембрану		
Источник присоединяемого фрагмента или отщепляемый фрагмент		
Регуляторные ферменты		
Регуляторные факторы: Активаторы Ингибиторы		
Коферменты окислительно- восстановительных реакций		

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Работа 11. Качественные реакции на желчные кислоты.

Материал исследования: сера в порошке (серный цвет)

Реактивы: серная кислота, концентрированная; тростниковый сахар, 10%-ный раствор (свежеприготовленный); дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки; пипетки.

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 соединения обусловлено прохождением жира через бумажный фильтр, смоченный водой, жир не проходит. Эти действия желчнокислых солей имеют также 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 холевой кислоты с оксиметилфурфуролом, образующимся из тростникового сахара под действием серной кислоты. Надо избегать избытка сахара и нагревания выше 70°C; так как может наступить обугливание, затемняющее окраску.

Оформление работы. Записывают объяснения к проделанным реакциям.

Работа 12. Эмульгирование жира.

При взбалтывании жира с раствором желчи, белка, мыла или соды образуется стойкая эмульсия.

Образование эмульсии обусловлено тем, что в поверхностный водный слой, окружающий жировые капельки, устремляются поверхностно-активные частицы желчных кислот, белка, мыла, которые обволакивают капельки жира и препятствуют их слиянию. Эмульгирование жира содой обусловлено образованием мыла в результате взаимодействия углекислого натрия с присутствующими в жире свободными жирными кислотами.

Ход работы. В 5 пробирок наливают по 20 капель: в первую – дистиллированной воды, во вторую – желчи, разведенной вдвое, в третью – 1% раствора яичного белка, в четвертую – 1% раствора мыла, в пятую – 1% раствора углекислого натрия. В каждую пробирку добавляют по 2 капли растительного масла и тщательно взбалтывают. Во всех пробирках, кроме первой, образуется стойкая эмульсия. Результат работы фиксируют в таблице:

Эмульгирование жиров

	Вода	Желчь	Белок	Мыло	Сода
Растительное масло					

Выводы:

Заполните таблицу: «Переваривание липидов»

	Панкреатическая липаза	Липопротеинлипаза	ТАГ-липаза
Локализация реакции			
Активаторы реакции			
Основные продукты реакции			
Судьба продуктов реакции			

Заполните таблицу: «Метаболизм жирных кислот»

Процессы	β - окисление	Биосинтез ЖК
Локализация процесса		
Переносчик субстрата через митохондриальную мембрану		
Источник присоединяемого фрагмента или отщепляемый фрагмент		
Регуляторные ферменты		
Регуляторные факторы: Активаторы Ингибиторы		
Коферменты окислительно-восстановительных реакций		

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 12

Тема: Биосинтез липидов в тканях. Регуляция обмена липидов в организме.

Цель обучения: Сформировать знания о синтезе биосинтезе липидов в тканях, взаимосвязи путей синтеза триацилглицеринов и фосфолипидов. Роль эндогенного холестерина в организме. Исследование действия липазы поджелудочной железы. Влияние желчи на активность липазы.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- приготовить ферментные препараты поджелудочной железы;
- определение активности фермента в динамике;
- построение графика изменения активности фермента;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: приготовление ферментных препаратов поджелудочной железы, определение активности фермента в динамике, построение графика изменения активности фермента

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Стадии синтеза жирных кислот на поверхности пальмитатсинтетазы;
2. Роль путей обмена глюкозы в синтезе жирных кислот, источники ацетил-КоА и НАДФН₂;
3. Образование малонил-КоА;
4. Синтетаза жирных кислот – особенности строения;
5. Процесс биосинтеза триацилглицеринов и фосфолипидов локализованных в гиалоплазме клеток;
6. Роль ЦТФ в биосинтезе фосфолипидов;
7. Реакции образования и утилизации кетоновых тел, их биологическая роль;
8. Механизм избыточного накопления кетоновых тел при голодании и сахарном диабете, кетоацидоз;
9. Роль ацетила-КоА биосинтезе холестерина;
10. Пути использования холестерина в организме;
11. Жировое перерождение печени. Роль липотропных факторов;
12. Какие свойства желчных кислот можно обнаружить с помощью качественных реакций?
13. Какие ферменты участвуют в переваривании липидов, где они образуются и как активируются?
14. С помощью каких приемов можно наблюдать действие липазы и ее активирование?
15. Какова роль желчи в переваривании и всасывании липидов?

16. В чем состоит принцип метода определения содержания общих липидов в сыворотке крови?
17. Укажите диагностическое значение определение общих липидов в сыворотке крови
18. Какую роль играют фосфатиды в обмене жиров?

Ситуационные задачи:

1. К какой группе веществ относятся лецитины?
2. К какой группе относится холестерин и какова его структура?
3. В чем состоит принцип метода определение фосфатидов в сыворотке крови?
4. Какова диагностическое значение определение фосфатидов в сыворотке крови?
5. В чем состоит принцип определения холестерина в сыворотке крови?
6. Укажите диагностическое определения холестерина в крови
7. Какие липопротеины содержатся в сыворотке крови?
8. Каким методом можно разделить липопротеины сыворотки на фракции?
9. Какую функцию выполняют отдельные фракции липопротеинов в обмене липидов?
10. Какова диагностическое определение липопротеинов в сыворотке крови?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Работа 13. 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 липолетическими 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 триацилглицерина происходит постадийно: сначала ферментами атакуются α и α_1 - связи, а затем более медленно гидролизуются β – моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, а также диацилглицерины и моноглицерины) всасываются в стенки кишечника.

В процессе переваривания и всасывания липидов важная роль принадлежит желчным кислотам. Они эмульгируют жиры, активируют липазу, и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания.

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

Материал исследования: глицириновый экстракт липазы из поджелудочной железы или измельченная поджелудочная железа.

Реактивы: молоко, разбавленное 1 : 10 или подсолнечное масло; желчь, раствор; NaOH 0,01 моль/л раствор; дистиллированная вода.

Оборудование: колбы вместимостью 25 мл; мерный цилиндр вместимостью 10 мл, пипетки; стаканчики для титрования; термостат (38 – 40 °С); микробюретки; бюретки.

Ход работы. 1. Готовят три колбы – две опытные и одну контрольную. В них смешивают препарат липазы и субстрат (молоко и 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 поджелудочной железы	1	1	1
Раствор желчи	-	1	1
H ₂ O	1	—	—

2. Приготовление инкубационной 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.

3. Оставшуюся смесь в колбах помещают в термостат, температура которого 38-40 °С и через определенные периоды времени (15, 30, 90 мин) отбирают из каждой колбы (не вынимая их и термостата) по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л раствором натрия гидроксида. Результаты вносим в таблицу:

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

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

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

Оформление работы. Записывают в рабочую тетрадь принцип метод и сделанные выводы, зарисовывают график.

Работа 14. 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 находится в виде липопротеинов. Увеличение содержания липопротеинов в сыворотке носит название гиперлипидемии. Она наблюдается после приема пищи (через 4-5ч) – это физиологическое явление. Через 12 – 16 часов количество липопротеинов снижается до нормы. Патологическая гиперлипидемия наблюдается при заболевании почек, алкоголизме и других заболеваний . Существуют несколько типов липопротеинемий, они характерны для групп заболеваний.

Для определения липидов сыворотку предварительно гидролизуют конц. H_2SO_4 . Продукты распада липидов образуют с сульфованилиновым реактивом окрашенное соединение, интенсивность окраски которого определяют колориметрически.

Материал исследования: сыворотка крови (можно хранить в холодильнике 5-6 дней не замораживая)

Реактивы: серная кислота конц (по Савалю); фосфорованилиновая смесь (4:1 фосфорная кислота и 0,6 % раствор ванилина).

Оборудование: сухие пробирки; пипетки; водяная баня; ФЭК; кюветы с $S = 0.5$ см

Ход работы: Готовят опытную и контрольную пробу. Серную кислоту отмеривают цилиндром.

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

1. Пробы тщательно перемешивают и помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. Затем охлаждают при комнатной температуре. 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 на 45 мин при комнатной температуре.

2. Интенсивность окраски измеряют на ФЭЖе против контроля при зеленом светофильтре.

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

Оформление работы. Записывают в рабочую тетрадь принцип метод и сделанные выводы, зарисовывают график.

Работа 15. Обнаружение кетоновых тел в моче

Кетоновые тела образуются в моче при нарушении углеводного и липидного обменов, в частности при сахарном диабете и голодании.

- Реакция на ацетона с йодом (проба Либена).* К 5 каплям исследуемой мочи добавляют 1 каплю 10 % раствора гидроксида натрия и 2-3 капли раствора Льюголя. При наличии ацетона выделяется желтый осадок и появляется запах йодоформа
- Реакция на ацетон и ацетоуксусную кислоту с нитропруссидом натрия(проба Легалья).* К 5 каплям мочи добавляют 1 каплю 10% раствора нитропрусида натрия и 2 капли 10% раствора гидроксида натрия. Появляется оранжево – красное окрашивание. При подкислении концентрированной уксусной кислоты оно становится вишнево – красным.
- Реакция на ацетоуксусную кислоту с хлорным железом(проба Герхарда).* К 5 каплям мочи добавляют несколько капель 1% раствора хлорного железа появляется вишнево – красное окрашивание
- Экспресс – анализ кетоновых тел в моче с помощью диагностических полосок.* Диагностические полоски кетофан или диафан опускают на 1-2 секунды исследуемую мочу так, чтобы зоны индикации были смочены. Избыток мочи снимают с полоски, соприкасаясь со стенкой сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 60 сек

сопоставляют окраску зон индикации с соответствующей цветной шкалой.

Задания для работы в группах
1-группа

Биосинтез ТАГ и фосфолипидов. Общие пути синтеза ТАГ и фосфолипидов.

2-группа

Биосинтез кетоновых тел. Кетонемия и кетонурия.

3-группа

Биосинтез холестерина. Пути использования холестерина и его эфиров в тканях организма.

Диаграмма «Венна»



Заполните таблицу: «Типы гиперлипидемий, вызывающий артеросклероз»

Гиперлипидемия	Молекулярный дефект
1.	
2.	
3.	
4.	

Заполните таблицу: «Препараты используемые при лечении артеросклероза »

Препарат	Механизм действия
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 13

Тема: Переваривание и всасывание белков в ж.к.т. Пути распада аминокислот до конечных продуктов. Пути обезвреживания аммиака.

Цель обучения: Сформировать знания о переваривании и всасывании белков в ж.к.т. Деаминарование и трансаминирование аминокислот в клетках. Пути обезвреживания аммиака. Анализ желудочного сока.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- определение свободной соляной кислоты в желудочном соке;
- определение молочной кислоты в желудочном соке;
- определение кислотности желудочного сока;
- определение действия пепсина;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: Проведение цветной реакции на свободную соляную кислоты. Проведение реакцию на молочную кислоту. Определение кислотности желудочного сока методом титрования. Исследование действия пепсина.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Динамическое состояние белков организма человека. Представление об азотистом балансе.
2. Источники и пути расщедования аминокислот в тканях.
3. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Всасывание аминокислот.
4. Превращение аминокислот микрофлорой кишечника.
5. Общие пути обмена аминокислот в организме.
6. Трансаминирование аминокислот, ферменты. Коферментная функция витамина В₆.
7. Механизм трансаминирования аминокислот. Биологическое значение.

8. Пути дезаминирования аминокислот. Окислительное дезаминирование и восстановительное аминирование.
9. Пути образования и обезвреживания аммиака в организме.
10. Тканевое обезвреживание аммиака (синтез глутамина и аспарагина). Роль глутаминазы в поддержании кислотно-основного равновесия в организме.
11. Биосинтез мочевины. Нарушения синтеза и выведения мочевины.
12. Реакции, катализируемые аланинаминотрансферазой и аспартатамино-трансферазой.
13. Клинико-диагностическое значение исследования аминотрансфераз.
14. Какова роль соляной кислоты при переваривании белков в желудке?
15. Какие условия необходимы для переваривания белков в желудке?
16. Как определяется кислотность, свободная и связанная соляная кислота в желудочном соке?
17. Какие условия необходимы для переваривания белков в кишечнике?
18. В чем заключается принцип метода определения протеолитической активности желудочного сока?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Работа 16. Анализ желудочного сока

Желудочный сок – бесцветная жидкость с сильноокислой реакцией (рН 1,5-2). За сутки вырабатывается около 1,5 л желудочного сока; в его состав входят вода, белки, ферменты (пепсин, гастриксин) муцин, соляная кислота, кислореагирующие фосфаты и ряд других веществ.

Кислая реакция желудочного сока обусловлена присутствием соляной кислоты, кислореагирующих фосфатов, а при патологических процессах – молочной кислотой и летучими жирными кислотами. Совокупность кислореагирующих веществ желудочного сока называют *общей кислотности*. Соляную кислоту, связанные с белками и продуктами их переваривания, называют *связанной соляной кислотой*, остающуюся в избытке называют *свободной соляной кислотой*.

При различных заболеваниях могут меняться как количество отделяемого желудочного сока, так и содержание в нем соляной кислоты и ферментативной активности. Поэтому в клинической практике используют методы анализа желудочного сока. При анализе определяют общее количество его, цвет, запах, наличие слизи, общую кислотность, наличие

свободной соляной кислоты, связанную соляную кислоту, присутствие желчи и крови.

Исследуемый материал: желудочный сок нормальный, желудочный сок с молочной кислотой; желудочный сок, содержащий кровь.

Реактивы: соляная кислота 0,2 % - ный раствор, 2,4 – диметиламиноазобензол, 0,5 % - ный спиртовой раствор (интервал перехода 2,9 – 4,0); бумага конго (интервал перехода 3,0-5,2); фенол , 2% раствор; хлорид железа (III), 1% раствор, пероксид водорода, 1% раствор; бензидин 0,2 % спиртовой раствор.

Оборудование: предметные стекла; стеклянные палочки; бюретки; штативы с пробирками.

а. Цветная реакция на свободную соляную кислоту

Присутствие свободной соляной кислоты в желудочном соке можно обнаружить с помощью индикаторов, меняющих свой цвет в зависимости от изменения реакции среды. Для обнаружения свободной соляной кислоты в желудочном соке использует обычно конго красный, имеющий в сильноокислой среде синюю окраску, а в нейтральной и щелочной – красную, и диметиламинобензол, имеющий в щелочной среде желтую окраску, а в присутствии минеральных кислот – вишнево-красную.

Ход работы:

1. На бумагу конго наносят стеклянной палочкой каплю 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 бумаге конго появляется синее окрашивание, обусловленное присутствием свободной соляной кислоты в желудочном соке.

2. В одну пробирку добавляют несколько капель раствора соляной кислоты, в другую – несколько капель желудочного сока, затем в обе пробирки добавляют по 1-2 капли раствора диметиламиноазобензола. В обеих пробирках появляются вишнево-красная окраска.

б. Реакция на молочную кислоту (реакция Уффельмана)

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

Ход работы:

1. В две пробирки наливают по 20 капель 2% раствора фенола и добавляют по каплям 1% раствор хлорида железа (III) до появления фиолетового окрашивания.

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

3.В 1 ой появляется желто – зеленое окрашивание, во 2 ой окраска исчезает, так как соляная кислота вызывает обесцвечивания раствора.

в. Реакция на кровь с бензидином

Реакция основано на окисления 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 % спиртового раствора бензидина и 5 капель 1% раствора пероксида. Если желудочный сок содержит кровь, то в результате окисления бензидина до п-хинондиимид появляется синее окрашивание

Оформление работы. Полученные данные вносят в таблицу:

Определяемые компоненты	Добавляемые реактивы	Желудочный сок		
		Нормальный	Содержащий молочную кислоту	С кровью
Свободная соляная кислота Молочная кислота Кровь	Конго красный Диметиламиноазобензол Фенолят железа (III) бензидин			

Работа 17. Определение кислотности желудочного сока.

Кислотность определяют титрованием его 0,1 моль/л раствором NaOH в присутствии индикаторов.

Общая кислотность желудочного сока численно выражается как объем (в мл) 0,1 моль/л раствора NaOH, пошедшего на титрования 100 мл желудочного сока в присутствии индикатора фенолфталеина (интервал перехода окраски рН 8,2 - 10). В норме общая кислотность равна 40 – 60 титрационным единицам.

Свободную соляную кислоту принято выражать как объем (в мл) 0,1 моль/л раствора NaOH, пошедший на титрования 100 мл желудочного сока, но в присутствии индикатора диметиламиноазобензола; при титровании нейтрализуется только свободная соляная кислота (рН 1-3), так как слабые кислоты (молочная, уксусная) в присутствии сильной соляной кислоты

находятся в растворе в недиссоциированном состоянии и в реакцию со щелочью не вступают.

При pH 3,0, когда окраска диметиламиноазобензола изменяется от красной к желто – розовой, почти вся свободная соляная кислота нейтрализуется NaOH. В норме содержание свободной HCl равно 20 – 40 титрационным единицам (Е).

Общее количество щелочи, пошедшей на титрование 100 мл желудочного сока с индикатором ализарингидросульфат 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 определяется как разность между общей кислотностью и объемом щелочи, пошедшей на титрования суммы кислореагирующих веществ.

Исследуемый материал: желудочный сок

Реактивы: NaOH 0,1 моль/л раствор; 1% спиртовой раствор фенолфталеин, диметиламиноазобензол 0,5 % спиртовой раствор; ализарингидросульфат натрия 1 % раствор

Оборудование: колбы конические на 50 – 100 мл, бюретка

Ход работы:

1. В 2 колбы наливают по 5 мл желудочного сока. В первую добавляют 1-2 капли раствора фенолфталеина и 1-2 капли раствора диметиламиноазобензола, во вторую – 1-2 капли ализарингидросульфата натрия при постоянном помешивании.

2. При титровании содержимое первой колбы отмечают: а) объем щелочи, пошедший на титрования с индикатором диметиламиноазобензол до перехода в первоначального красного цвета в желто- розовый, что соответствует количеству свободной соляной кислоты; б) общий объем щелочи, пошедший на титрования с индикатором фенолфталеина, до перехода окраски в стойкий красный цвет, что соответствует общей кислотности.

3. Во второй колбе отмечают объем щелочи, пошедший на титрования до появления вместо желтой окраски фиолетовой, что соответствует сумме всех кислореагирующих веществ, кроме связанной соляной кислоты, и выявляется индикатором ализарингидросульфатом натрия.

Примеры расчета. В первой колбе:

А) 1,5 мл 0,1 моль/л NaOH (желто-розовая окраска) $1,5 \cdot 20 = 30$ титр е.д. (свободная HCl в 100 мл сока)

Б) 2,6 мл 0,1 моль/л NaOH (красная окраска) $2,6 \cdot 20 = 52$ титр е.д. (общая кислотность).

Во второй колбе:
 2,0 мл 0,1 моль/л NaOH (фиолетовая окраска).
 $2,0 \cdot 20 = 40$ титр е.д. (все кислотореагирующие вещества, кроме связанной соляной кислотой)
 $52 - 40 = 12$ титр е.д. (связанная соляная кислота)

Оформление работы. Записывают в рабочую тетрадь принцип метод, сделанные выводы и расчеты

Работа 18. Исследование действия пепсина.

Пепсин действует на внутренние пептидные связи, расщепляя белки на пептиды. О действии пепсина на белок, например на фибрин (нерастворимый белок плазмы), можно судить, наблюдая растворение кусочков фибрина.

Исследуемый материал: желудочный сок или 0,1% раствор пепсина в 0,2 % растворе соляной кислоте

Реактивы: кусочки фибрина или кусочки белка сваренного яйца; NaHCO_3 10% раствор; лакмус красный

Оборудование: штатив с пробирками, бюретка, пинцеты, термостат ($37-40^\circ\text{C}$)

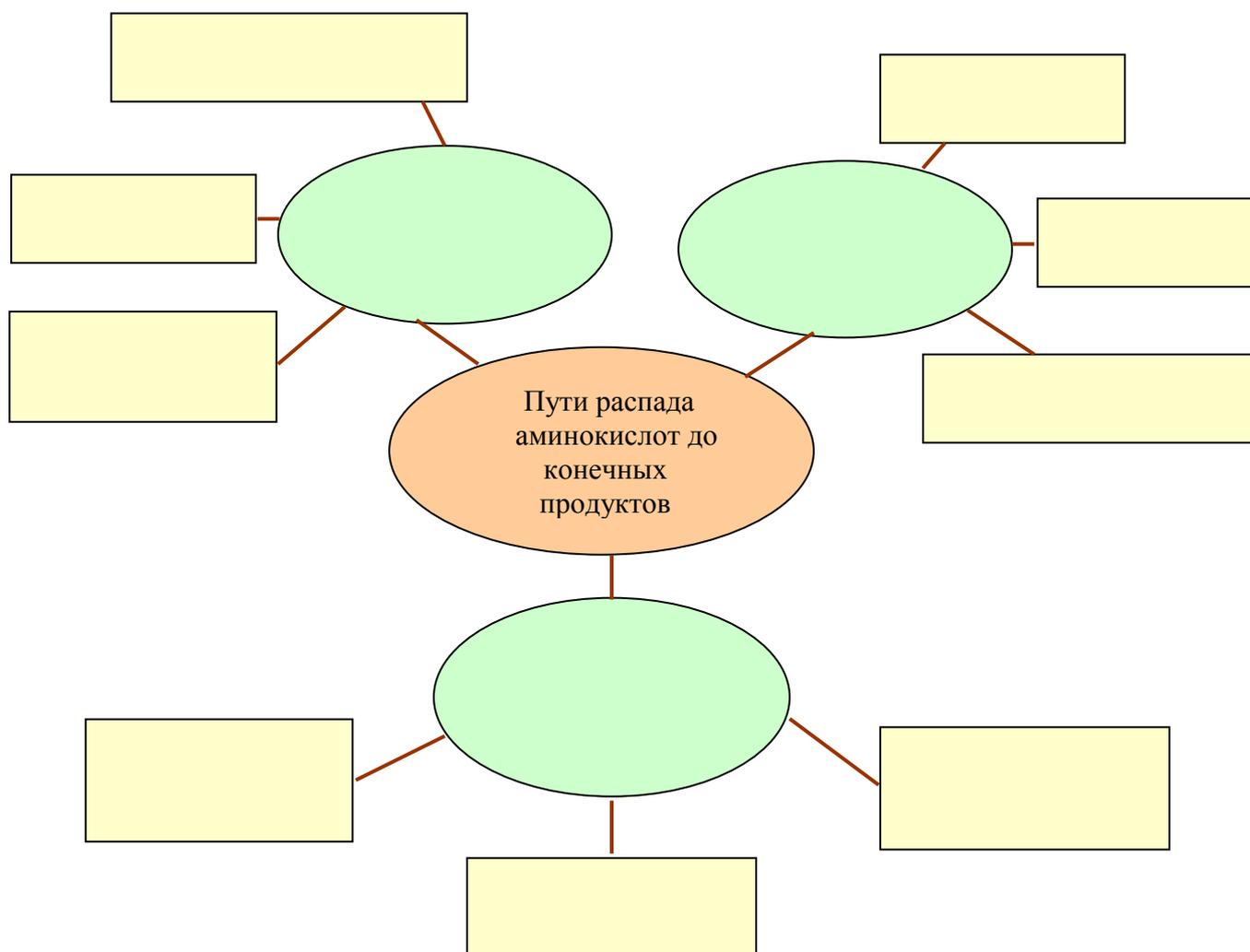
Ход работы:

1. В три пробирки наливают по 1 мл раствора пепсина или желудочного сока. Содержимое 1 пробирки кипятят в течении 2 мин и охлаждают. Вторую пробирку нейтрализуют раствором NaHCO_2 до щелочной реакции по лакмусу (3-4 капли 10% раствора NaHCO_3). Третью пробирку оставляют без изменения.

2. Во все 3 пробирки добавляет несколько кусочков фибрина или яичного белка. Пробирки выдерживают в термостате при 37°C 30-45 мин. Вынимают, встряхивают, отмечают видимые изменения белка (растворение, набухание) и проделывают биуретовую реакцию (см. работу 10). Положительная реакция появляется у третьей.

Оформление работы. Полученные результаты вносят в таблицу

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция среды	Видимые изменения	Биуретовая проба	Выводы



ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 14

Тема: Обмен гемпротеидов. Обмен пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

Цель обучения: Сформировать знания о синтезе и распаде гемпротеидов и нуклеопротеидов. Количественное определение мочевины и билирубина в сыворотке крови. Определение АЛТ и АСТ методом биотестов.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- приготовление сыворотки крови;
- построение калибровочного графика;
- определение оптической плотности растворов;

- умение работать на ФЭК;
 - оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;
- Основные этапы занятия:** приготовление сыворотки крови, проведение качественной реакции, построение калибровочного графика, определение оптической плотности растворов на ФЭК.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Биосинтез гема в клетках.
2. Распад гемпротеидов в организме человека.
3. Патология обмена желчных пигментов.
4. Биосинтез пуриновых нуклеотидов: реакции биосинтеза фосфорибозиламина, происхождение атомов пуринового ядра.
5. Инозиновая кислота как предшественник адениловой и гуаниловой кислот. Регуляция биосинтеза пуриновых нуклеотидов.
6. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов. Регуляция биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов.
7. Распад нуклеиновых кислот в желудочно-кишечном тракте и тканях.
8. Повторное использование нуклеозидов и азотистых оснований для синтеза нуклеотидов.
9. Распад пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.
10. Нарушения обмена нуклеотидов: ксантинурия, оротацидурия, подагра.
11. На чем основан принцип определения активности АсАТ и АлАТ?
12. К какому классу ферментов относятся АсАТ и АлАТ?
13. Какую реакцию катализирует АсАТ?
14. Какую реакцию катализирует АлАТ?
15. Какие вещества являются кофакторами этих аминотрансфераз?

Ситуационные задачи:

1. Объясните диагностическое значение определения АсАТ и АлАТ в сыворотке? Укажите значение активности АсАТ и АлАТ в нормальной сыворотке?
2. В каких единицах выражается активность АсАТ и АлАТ?
3. Как обезвреживается и какими путями выводится билирубин из организма человека?
4. Чем отличаются по структуре и свойствам свободный билирубин и билирубиндиглюкуронид?
5. Какой реакцией можно открыть билирубин в крови?
6. Сколько билирубина содержится в крови здорового человека? Каково диагностическое значение определения билирубина?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Работа 19. Определение активности аспаргатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) в тканях сердца и печени животных динитрофенилгидразиновым методом

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

1) Аспарагиновая кислота + α -Кетоглутаровая кислота \rightarrow Щавелевоуксусная кислота + Глутаминовая кислота;

2) Аланин + α -Кетоглутаровая кислота \rightarrow Пируват + Глутаминовая кислота;

АсАт и АлАт 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 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.

При определении активности этих ферментов пользуются тем, что образующиеся продукты реакции – кетокислоты при добавлении 2,4 – фенилгидразина в щелочной среде образуют окрашенный гидразон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству пировиноградной кислоты.

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

Материал исследования: гомогенаты тканей сердца и печени, сыворотки крови

Реактивы: фосфатный буфер, 0,1 моль/л раствор (рН 7,4); бромтимоловый синий, 0,04%-ный раствор; субстратный раствор для определения АсАТ, содержащий α -кетоглутаровую и аспарагиновую кислоты; субстратный раствор для определения АлАТ, содержащий аланин и α -кетоглутаровую кислоту; 2,4-динитрофенилгидразин; раствор NaOH, 0,4 моль/л раствор; пируват натрия, стандартный раствор, содержащий 110 мкг в 1 мл.

Оборудование: пробирки, пипетки (1 мл), микропипетки, термостат, ФЭК, кюветы с толщиной слоя 1 см.

Ход работы:Определение активности АсАТ. 1.Готовят 4 пробирки для исследования активности фермента в экстрактах тканей сердца, печени и в сыворотке.

Проба	Раствор субстрата (мл)	Экстракт ткани сердца	Экстракт ткани печени	Сыворотка	
				Нормальная (мл)	Патологическая (мл)

		(мл)	(мл)		
1	0,5	0,2	-	-	-
2	0,5	-	0,2	-	-
3	0,5	-	-	0,1	-
4	0,5	-	-	-	0,1

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

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

3. Содержимое опытных и контрольных пробирок перемешивают и инкубируют в термостате при 37°C 60 мин. Затем в каждую опытную пробирку добавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Все пробы выдерживают при комнатной температуре 20 мин. Затем во все пробирки вносят по 5 мл 0,4 моль/л раствора NaOH. Содержимое 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, но используют другой субстратный раствор и инкубируют в термостате после внесения исследуемых тканей 30 мин.

Расчет активности ферментов.

1. Расчет для сыворотки. По калибровочному графику находят количество пирувата натрия, соответствующее оптической плотности пробы. Затем пересчитывают активность фермента на пировиноградную кислоту, образовавшуюся при инкубации 1 мл сыворотки в течении 1 часа при 37°C, по формулам:

$$\text{Активность АсАТ} = \frac{a \cdot 10}{88}; \quad \text{Активность АлАТ} = \frac{a \cdot 2 \cdot 10}{88};$$

Где 10 – коэффициент перевода на 1 мл сыворотки

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

88 – масса 1 мкмоль пировиноградной кислоты, мкг;

2 – коэффициент пересчета на 1 час инкубации.

В норме активность АсАТ равна 0,1-0,45 мкмоль пирувата за 1 ч инкубации 1 мл сыворотки при 37°C.

2. РАСЧЕТ ДЛЯ ТКАНЕЙ. Активность ферментов рассчитывается на 1 мкмоль пировиноградной кислоты, образовавшейся при инкубации 1 г сырой ткани в течении 1 часа при 37°C, по формулам:

$$\text{Активность АсАТ} = \frac{a \cdot \text{разведение гомогената}}{88 \cdot \text{навеска ткани}};$$

$$\text{Активность АлАТ} = \frac{2a \cdot \text{разведение гомогената}}{88 \cdot \text{навеска ткани}};$$

Оформление работы. Записывают в рабочую тетрадь принцип метода, активность ферментов в исследуемых тканях и сыворотке, диагностическое определение АсАТ и АлАТ в сыворотке.

Работа 20. Определение общего билирубина в сыворотке крови (метод Йендрашика 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.

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

Определение содержания билирубина в крови явля- I ется 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 били- jрубина 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.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы: сульфаниловая кислота, 0,5%-ный раствор; нитрат натрия, 0,5%-ный раствор; кофеиновый реактив; NaOH, 30%-ный раствор.

Оборудование: пробирки; пипетки; бюретки; ФЭК; кюветы с толщиной слоя 1 см.

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

Проба	Сыворотка крови, мл	Кофеиновый реактив, мл	Дистиллиро ванная вода, мл	Диазо- смесь, 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 300—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.

Оформление работы. В протокол вносят принцип метода, результаты колориметрии и расчет. Отмечают пределы колебаний концентрации билирубина в норме.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 15

Тема: Понятие о гормонах и гормоноподобных веществах. Механизм действия гормонов.

Цель обучения: Сформировать знания о структуре, механизме действия и гормональной регуляции обмена веществ. Проведение реакции на функциональные группы гормонов.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- проведение реакции на инсулин;
- проведение реакции на адреналин;
- проведение реакции на тироксин;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы.

Основные этапы занятия: Проведение качественных реакций на инсулин подтверждающие белковой природы гормона. Создать щелочную среду для обнаружения йода. Реакции на адреналин.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Какие вещества называются гормонами?
2. Назовите гормоны, имеющие белковую природу?
3. Назовите гормоны, являющиеся производными аминокислот?
4. Назовите гормоны, имеющие стероидную природу?
5. Какие качественные реакции характерны для инсулина, адреналина, тироксина, кортизола?
6. Что лежит в основе качественных реакции на гормоны?

Ситуационные задачи:

1. У ребенка, получающего полноценное питание и витамин D, наблюдаются признаки рахита. Концентрация крови на нижней границе нормы. Каковы возможные причины появления рахита? Ответ поясните, для этого:
 - а. Опишите возможные причины рахита;

- б. Назовите гормоны, регулирующий обмен кальция в организме, и укажите их биологические эффекты;
- в. Представьте схему синтеза гормона для подтверждения предполагаемой вами причины рахита.
2. Пациенту с гипотериозом врач назначил ему лечение, включающий прием тироксина. Спустя 3 месяца после начала лечения уровень тиреотропина в крови понизился. Почему врач этому больному врач рекомендовал увеличить дозу тироксина? Для ответа:
- а. Представьте в виде схемы механизм регуляции синтеза и секреции тиреоидных гормонов;
- б. Используя схему, обоснуйте рекомендацию врача.
3. Больной, проживающий в местности с дефицитом йода, обратился в медицинский центр с жалобами на чувствительность к холоду, вялость, сонливость, раздражительность, частые головные боли, ухудшения памяти, снижения артериального давления. При обследовании обнаружены брадикардия, увеличения щитовидной железы. Назовите причину перечисленных симптомов:
- а. Напишите формулу гормонов, изменение продуктов которых привело к развитию заболевания;
- б. Опишите последовательность событий при синтезе этих гормонов и объясните значения йода в этом процессе;
- с. Почему врач, определив схему лечения, рекомендовал больному добавлять в пищу йодированную соль?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Целью изучения данного раздела является знакомство с химическим строением гормонов, специфическими реакциями на некоторые из них, что необходимо для понимания роли гормонов в регуляции обмена веществ и последующего изучения причин эндокринных заболеваний и их диагностики.

Гормоны принадлежат к различным классам органических соединений, синтезируемых в эндокринных железах или железах внутренней секреции. Это биологически активные вещества, оказывающие регуляторное влияние на обмен веществ. Это влияние проявляется разными путями; гормоны могут изменять скорость ферментативных реакций, скорость синтеза белков, влиять на проницаемость клеточных мембран.

В клинико-биохимических лабораториях применяются методы качественного и количественного определения гормонов, отклонения в содержании гормонов используют для диагностики заболеваний.

Работа 21. Качественные реакции, подтверждающие белковую природу инсулина

Материал исследования: препарат инсулина в ампулах (можно использовать в разведении 1 : 100).

Реактивы: NaOH, 10%-ный раствор; CuSO₄, 1%-ный |Щ| вор; реактив Миллона; ацетат свинца, 5%-ный раствор. Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Ход работы. 1. Биуретовая реакция. К 1 мл раствора инсулина добавляют 5—6 капель раствора гидроксида натрия и 1—2 капли раствора сульфата меди (II), перевешивают. Жидкость окрашивается в розово-фиолетовый цвет.

2. Реакция Миллона. К 5—10 каплям раствора инсулина добавляют 2—3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. Образуется осадок в виде сгустка красного цвета.

3. Реакция Фолья. К 5-10 каплям раствора инсулина (использовать неразбавленный препарат) добавляют 2—3 мл раствора NaOH и кипятят 10 мин на маленьком пламени горелки. После охлаждения добавляют 1—2 капли раствора Pb(OAc)₂ — появляется бурое окрашивание.

Примечание. Раствор Pb(OAc)₂ приготовить в отдельной пробирке. Для этого к одной капле раствора ацетата свинца добавляют по каплям раствор 10%-ного гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка гидроксида свинца.

Работа 22. Обнаружение иода в препарате щитовидной железы

При щелочном гидролизе тироксина образуется иодид калия, из которого иод вытесняется иодатом калия. Выделившийся свободный иод дает с крахмалом синее окрашивание.

Материал исследования: препарат щитовидной железы (таблетки тиреоидина).

Реактивы: K₂CO₃, 10%-ный раствор; серная кислота, 10%-ный раствор; крахмал, 1%-ный раствор; KIO₃, 1%-ный раствор; Лакмусовая бумага.

Оборудование: ступки; песочная баня; пробирки с обратным холодильником.

Ход работы. В фарфоровой ступке растирают 1 таблетку тиреоидина. Полученный порошок высыпают в пробирку для гидролиза и заливают 3 мл раствора K₂CO₃. Перемешивают, закрывают пробкой с обратным

холодильником и ставят на песчаную баню. Содержимое пробирок кипятят 10—15 мин.

Полученный гидролизат охлаждают и нейтрализуют раствором серной кислоты, добавляя его по каплям до слабокислой реакции на лакмус. Затем добавляют 1 каплю раствора крахмала и 1—2 капли раствора КЮ₈. Выделившийся иод окрашивает жидкость в синий цвет.

Работа 23. Качественные реакции на адреналин

Материал исследования: раствор адреналина (1 : 1000).

Реактивы: хлорид железа (III), 1%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; КЮ₃, 10%-ный раствор; уксусная кислота, 10%-ный раствор.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Ход работы. 1. Реакция с хлоридом железа (III). В пробирку вносят 3 капли раствора адреналина и 1 каплю 1%-ного раствора хлорида железа (III). Появляется изумрудно-зеленое окрашивание, которое затем при добавлении 1 капли раствора гидроксида натрия приобретает вишнево-красный цвет. Реакция обусловлена тем, что пирокатехиновое ядро образует с ионами железа (III) соединения типа фенолятов.

2. Диазореакция на адреналин. В пробирку вносят 2—3 капли раствора адреналина, 2 капли раствора КЮ₈ и 2 капли раствора уксусной кислоты. Перемешивают и слегка нагревают. Жидкость окрашивается в красно-фиолетовый цвет.

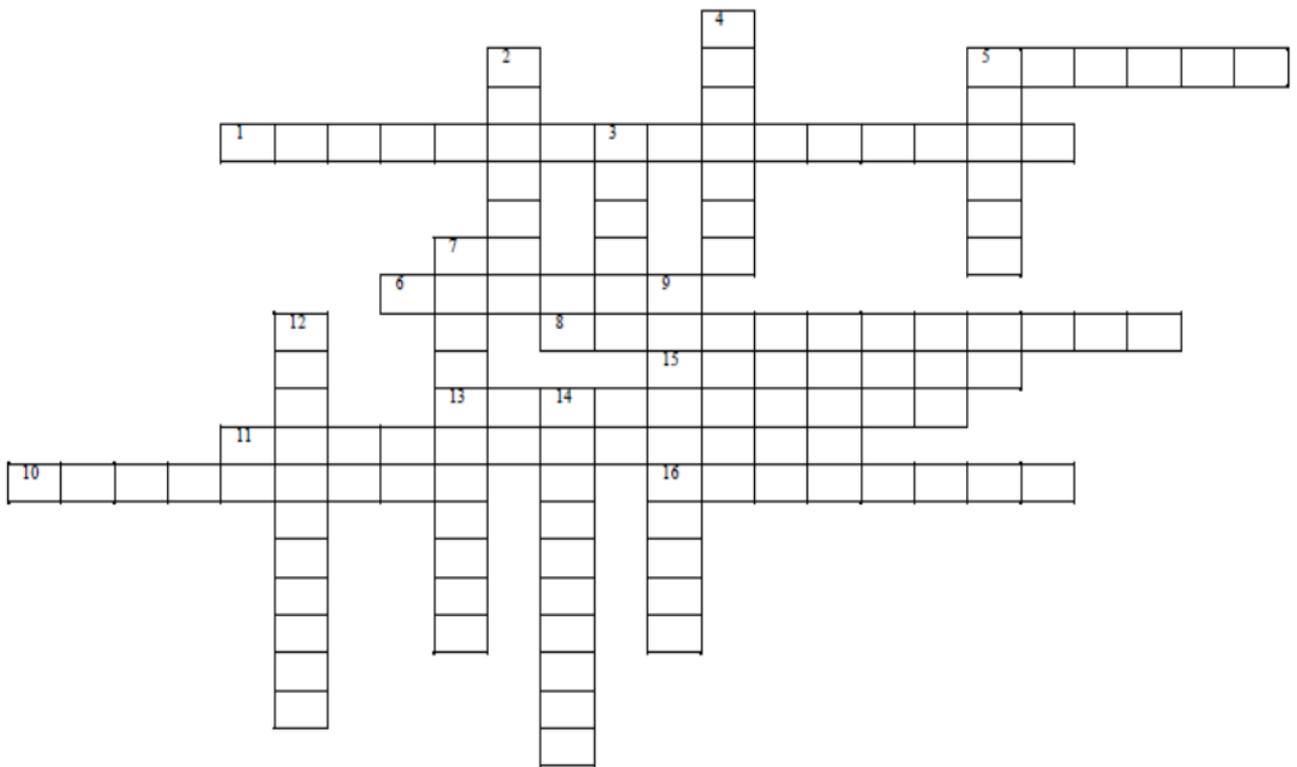
1. Заполните таблицу.

Строение и функция гормонов.

Место синтеза	Название гормона	Химическое строение	Механизм действия	Биологическая роль	Патология

1. Контрольные задачи

1- группа. Кроссворд для проверки усвоенных знаний.



По горизонтали:

1. Первая реакция распада глюкозы.
5. Кетонное тело.
6. Первый продукт цикла лимонной кислоты.
8. Заболевание, возникающие при нарушении обмена липопротеинов.
10. Аминспирт-предшественник большой группы липидов.
11. Процесс распада гликогенов до глюкозы.
13. Липопроеины, содержащие наибольшее количество ТАГ.

15. Высокотоксичное вещество, являющиеся ингибитором комплекса I дыхательной цепи.

16. Резервная форма глюкозы, синтезируемая в организме животных и человека.

По вертикали:

2. Продукт общего пути катаболизма.

3. Продукт анаэробного распада глюкозы.

4. Место протекания реакций катаболизма жирных кислот.

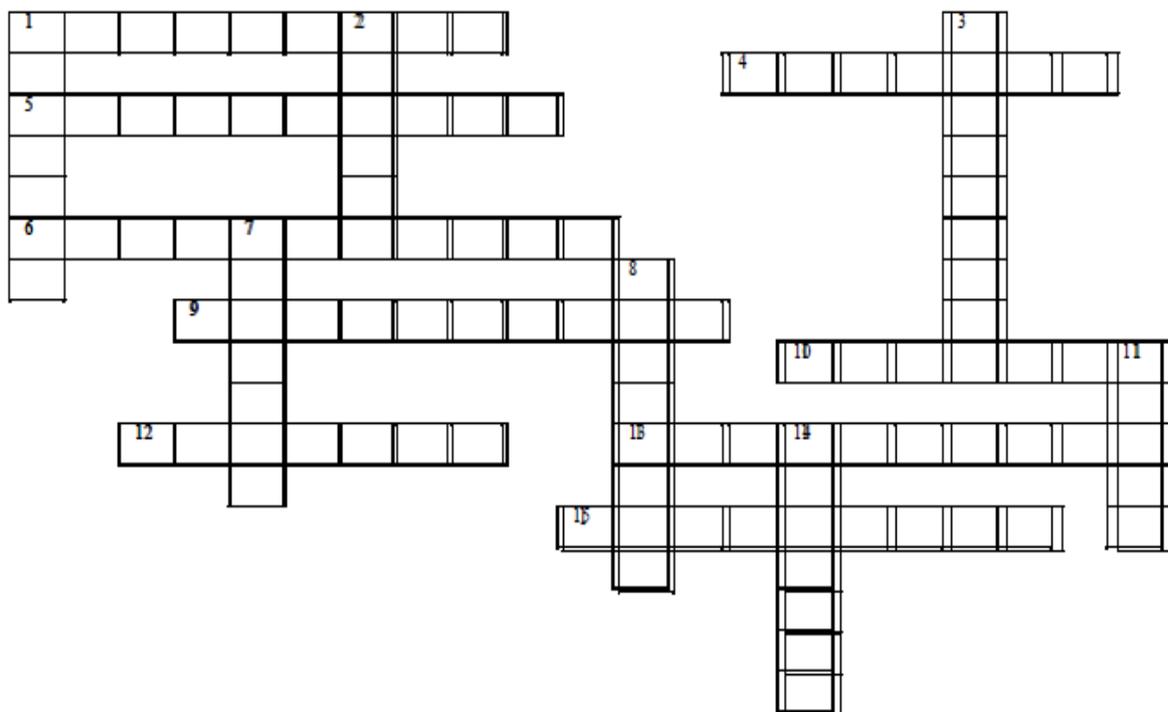
5. Барбитурат-ингибитор комплекса I дыхательной цепи.

7. Место образования аденозинтрифосфата в клетке.

12. Фракция крахмала.

14. Класс эйкозаноида.

2-группа. Кроссворд для проверки усвоенных знаний.



По горизонтали:

1. Особая форма эндоцитоза, при котором образуются большие эндоцитозные пузырьки.
4. Гормон поджелудочной железы, секретируется в ответ на повышение концентрации глюкозы в крови.
5. Витамин В2.
6. Функциональная часть кофермента НАД⁺ и НАДФ⁺.
9. Липопротеиды, транспортирующие липиды из клеток кишечника.
10. Продукт взаимодействия сфингозина и жирной кислоты.
12. Неразветвленная часть крахмала.
13. Распад сложных веществ до простых веществ.
15. Выделение кетоновых тел с мочой.

По вертикали.

1. Биологический катализатор.
2. Витамин В1.
3. Фермент, катализирующий распад фруктозо-1,6-бисфосфат на дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегидфосфат.
7. Протеолитический фермент тонкого кишечника.
8. Ион металла, в котором нуждается фермент для проявления полной каталитической активности.
11. Участок полипептидной цепи, который независимо от других участков цепи приобрел глобулярную структуру.
14. Известный специфический ингибитор М-холинорецепторов.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 16

Тема: Механизм действия и биологическая функция гормонов центральных и периферических желез.

Цель обучения: Сформировать знания о механизме действия и биологической функции гормонов. Гипо и гиперфункция эндокринных желез. Патология

гормонов. Количественное определение адреналина калориметрическим методом.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- производить сбор крови;
- приготовление сыворотки крови;
- приготовить раствор адреналина различной концентрации;
- проведение цветной реакции;
- определение оптической плотности на ФЭК;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы.

Основные этапы занятия: производство сбора крови и приготовление сыворотки крови. Приготовление раствора адреналина различной концентрации и определение оптической плотности стандарта и исследуемого раствора на ФЭК. Построение калибровочного графика. Определение концентрации адреналина в исследуемой сыворотке крови.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Какие вещества называются гормонами?
2. Какова химическая природа гормонов?
3. Какие гормоны вырабатываются щитовидной и паращитовидной железами?
4. Какие гормоны образуются в передней доле гипофиза?
5. Как называются гормоны задней доли гипофиза и каково их биологическое значение?
6. Химическая природа инсулина и его влияние на обмен веществ.
7. Строение и свойства адреналина и его роль в обмене веществ.
8. Каково отличие в химической структуре между мужскими и женскими половыми гормонами?
9. В чем сходство и отличие между гормонами и витаминами?
10. Каково отличие в химической структуре между прогестероном и гормонами коркового слоя надпочечников?

Ситуационные задачи:

1. Больной жалуется на сильную слабость, повышенную утомляемость. Часто бывают явления гипогликемии. Усилена пигментация кожи. Имеется анемия, лимфоцитоз, эозинофилия. Уменьшена реабсорбция натрия из мочи. О недостаточности каких гормонов можно думать?
2. О недостаточности каких гормонов может свидетельствовать обнаружение у больного устойчивого повышения экскреции с мочой ионов натрия и хлора?
3. Человек неадекватен в своём поведении, агрессивен, часто конфликтует в быту и на работе. Избыток какого гормона может способствовать формированию такого поведенческого статуса?
4. У больного резко повышено кровяное давление, основной обмен,

содержание сахара, уровень СЖК в крови, количество адреналина и норадреналина в плазме крови повышено в 500 раз, имеется глюкозурия. О патологии какого органа можно думать?

5. Фармацевтическая промышленность выпускает анаболические стероиды – синтетические производные андрогенов, почти лишенные андрогенных свойств, но стимулирующих процессы тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования, синтез белка. Некоторые спортсмены используют их для стимуляции развития мускулатуры. Целесообразно ли их применение?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Работа 24. Количественное определение адреналина по методу Фолина.

Метод основан на калориметрическом определении интенсивности синего окрашивания, которое образуется при взаимодействии адреналина с реактивом Фолина. Окраску исследуемого раствора сравнивают с окраской стандартного раствора адреналина, обработанного тем же способом.

Материал исследования: исследуемый раствор адреналина.

Реактивы: стандартный раствор адреналина, 10% раствор углекислого натрия, реактив Фолина.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Ход работы. В 2 чистые сухие пронумерованные мерные пробирки на 10 мл точно отмеривают пипеткой в первую – 1 мл стандартного раствора адреналина, во вторую – 1 мл исследуемого раствора. В каждую пробирку добавляют по 4 мл 10% свежеприготовленного раствора углекислого натрия и по 0,5 мл реактива Фолина. Содержимое пробирок встряхивают. Жидкость постепенно окрашивается в синий цвет, достигшей наибольшей интенсивности через 3-5 минут. По истечении этого срока объём жидкости в пробирках доводят до метки 10% раствором углекислого натрия. Содержимое пробирок перемешивают и окраску исследуемой жидкости сравнивают в калориметре с окраской стандартного раствора адреналина. Для приготовления стандартного раствора адреналина в мерную колбу ёмкость 25 мл отмеривают точно 1 мл продажного раствора адреналина 1:1000 и доводят до метки водой. 1 мл стандартного раствора содержит 0,04 мл адреналина.

Расчет. На основании данных колориметрии определяют процентное содержание адреналина в исследуемой жидкости, зная, что концентрация раствора обратно пропорциональна высоте столба жидкости:

$$C_1 = C \cdot h / h_1$$

C- стандартный раствор адреналина (0,04), h- экст. стандартного раствора
h₁- экст. исслед. раствора.

Работа 25. Реакция на фолликулин (эстрон) с концентрированной серной кислотой

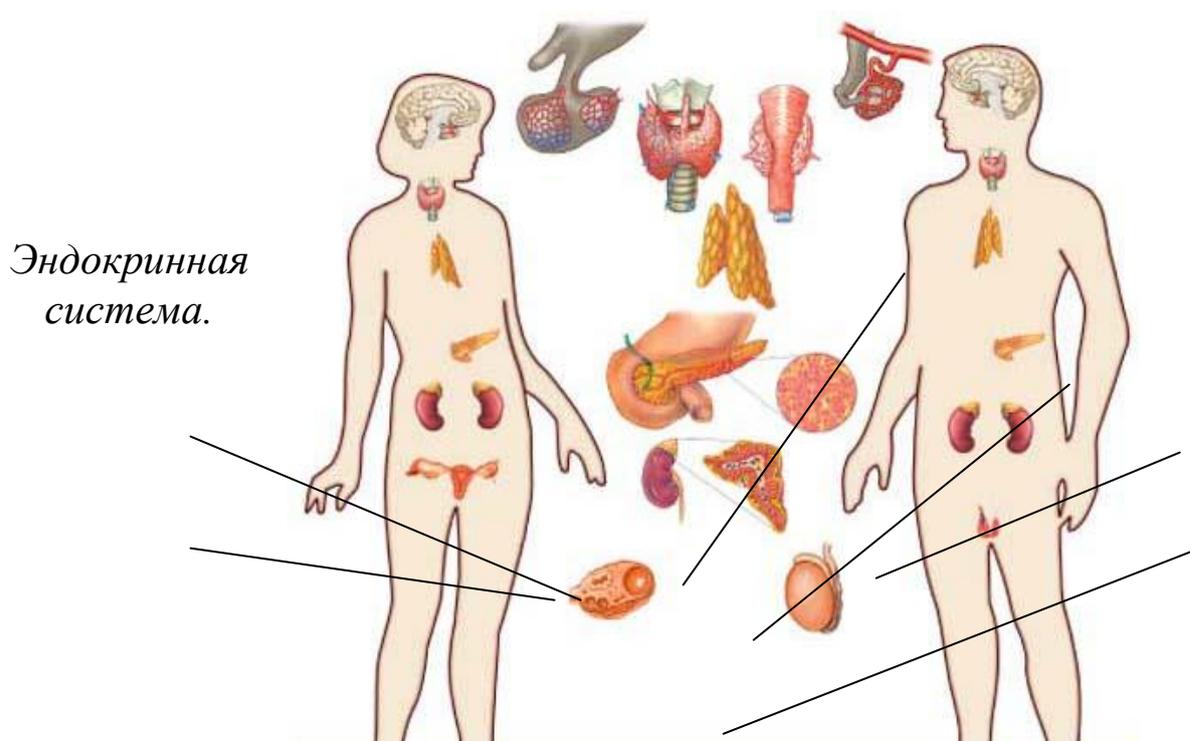
Ход работы. В пробирку наливают 20-30 капель спиртового раствора фолликулина и помещают ее в кипящую водяную баню на 5-10 минут для удаления спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 20 капель концентрированной серной кислоты и пробирку вновь помещают в кипящую водяную баню на 5-10 минут. Жидкость в пробирке окрашивается в соломенно-желтый цвет, переходящий при нагревании в оранжевый, и имеет зеленую флюоресценцию.

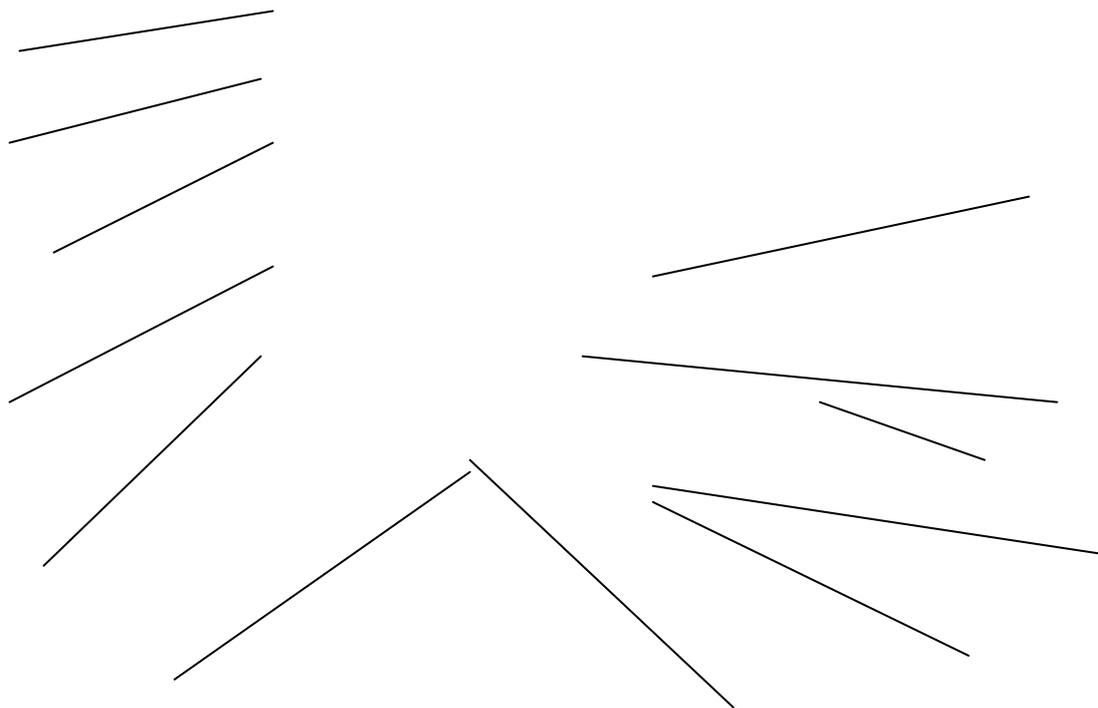
При изучении химической структуры и свойств гормонов результаты работы следует фиксировать в форме таблицы.

Качественные реакции на гормоны

<i>Название железы внутренней секреции</i>	<i>Название гормона</i>	<i>Химическое строение гормона</i>	<i>Употребляемые реактивы</i>	<i>Получаемое окрашивание и химизм реакции</i>

Выводы:





Примечание: На теле человека укажи название желез. На железах укажи, какие гормоны они вырабатывают.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 17

Тема: Метаболизм и биологическая функция водорастворимых витаминов.

Цель обучения: Сформировать знания о структуре водорастворимых витаминов. Метаболизм и биологические функции водорастворимых витаминов.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- проводить цветные реакции на витамины;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: Проведение качественных реакций на витамины.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Какой качественной реакцией можно открыть витамин В₁
2. Почему о недостатке тиамин можно судить по содержанию пириновинной кислоты в крови?

3. Как можно в растворе обнаружить рибофлавин?
4. Какие свойства рибофлавина лежат в основе его биологической активности?
5. Какую биологическую роль выполняет ниацин?

Ситуационные задачи:

1. К окулисту обратился больной, 55 лет, с жалобами на появление трудностей с управлением автомобилем в ночное время, на внезапные расстройства зрения при плохом освещении. В то же время дневное время остается нормальным. Питание не регулярное, в анамнезе – панкреатит. Какова предполагаемая причина описанных симптомов ?
2. Больному поставлен диагноз «Авитаминоз витамина А». Почему врач рекомендовал пациенту есть больше красномякотных овощей (моркови, томатов, перца), хотя витамина в них нет ?
3. К врачу обратился больной с патологией желчевыводящих путей и поджелудочной железы. Авитаминоз каких витаминов можно ожидать в этом случае? Почему?
4. К терапевту обратился больной с жалобами кровоточивость мелких сосудов, десен, выпадение волос. Врач рекомендовал ему длительный прием отвара шиповника. Обоснуйте назначение врача.
5. У пациента наблюдается конъюнктивит, длительно не заживающие трещины в углах рта, дерматит носогубной складки, выпадение волос. Питание вегетарианское. Каков предположительный диагноз и механизм возникших симптомов?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Витамины – разнообразные по химическому строению низкомолекулярные соединения, в организме человека не синтезируются и по этому признаку относятся к незаменимым пищевым факторам.

Все витамины по физико-химическим свойствам можно разделить на 2 группы: водорастворимые (витамины группы В,С,Р и тд) и жирорастворимые (витамины групп А,Д,Е,К). Роль водорастворимых витаминов в обмене веществ достаточно ясна – многие из них служат строительным материалом для биосинтеза коферментов. Биологическая роль жирорастворимых витаминов изучена значительно хуже.

При недостаточном поступлении того или иного витамина в организм, развивается специфическое заболевание, называемое авитаминозом. Потребность человека в витаминах зависит от пола, возраста, физиологического состояния, характера пищи и других факторов. Знание

биологической роли витаминов, клинической картины авитаминозов, умение предотвращать и лечить эти заболевания очень важны для врача.

Результаты работ оформить в виде таблицы:

Витамин	Химическая структура витамина	Кофермент, в состав которого входит витамин	Название реакции

Работа 26. Диазореакция на тиамин (Витамин В₁)

Недостаток тиамин в пище вызывает заболевание бери-бери, связанное с поражениями нервной системы, сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта.

Биологическая роль тиамин хорошо известна – в виде тиаминпирофосфата он выполняет коферментные функции в реакциях декарбоксилирования α -кетокислот и в транскетолазной реакции.

Материал исследования: Тиамин (порошок)

Реактивы: с, 1%-ый раствор; нитрит натрия, 5%-ый раствор; карбонат натрия, 10%-ый раствор.

Оборудование: штатив с пробирками.

Раствор тиамин при добавлении к нему диазореактива и щелочи окрашивается в оранжевый или красный цвет в следствии образования сложного соединения тиамин с диазобензосульфокислотой.

Ход работы: К 5 каплям 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 5 капель 5%-ного раствора нитрита натрия, получают диазореактив. К диазореактиву прибавляют небольшое количество порошка тиамин и 5-7 капель 10%-ного раствора карбоната натрия. Жидкость окрашивается в оранжевый или красный цвет.

Работа 27. Реакция восстановления рибофлавина (витамин В₂)

Рибофлавин обладает окислительно-восстановительными свойствами. Физиологическая роль витамин В₂ выяснилась, когда было установлено, что рибофлавин входит в состав коферментов ФАД и ФМН, являющихся простетической группой ряда ферментов, относящихся к классу оксидоредуктаз.

Реакция обусловлена восстановлением рибофлавина выделяющимся моноводородом сначала в родофлавин, а затем в бесцветную лейкоформу.

Материал исследования: 0,025%-ный раствор рибофлавина в воде

Реактивы: цинк металлический, гранулы, соляная кислота, концентрированная

Оборудование: штатив с пробирками

Ход работы: В пробирку наливают по 10 капель взвеси рибофлавина в воде, добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и опускают гранулу металлического цинка. Выделяющийся в ходе реакции водород

взаимодействует с рибофлавином: раствор приобретает постепенно розовую окраску, затем обесцвечивается.

Работа 28. Качественные реакции на ниацин (витамин РР, никотиновая кислота, никотинамид)

Биологическая функция ниацина заключается в том, что никотинамид служит активной частью коферментов НАД⁺ или НАДФ⁺, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях. РР-авитаминоз выражается в виде дерматита на симметричных участках тела, расстройствах деятельности ЖКТ, НС.

Материал исследования: никотинамид (порошок)

Реактивы: уксусная кислота, 10%-ный раствор; ацетат меди, 5%-ный раствор; гидроксид натрия, 0,1 моль/л раствор.

Оборудование: штатив с пробирками

Ход работы: 1. Качественная реакция ниацина с медью. Щепотку порошка (5-10 мг) витамина РР растворяют при нагревании в 10-20 каплях 10%-ного раствора уксусной кислоты. К нагретому раствору добавляют равный объем 5%-ного раствора ацетата меди. Жидкость становится мутной, при стоянии выпадает осадок синего цвета.

Качественная реакция обнаружения аминогруппы. Небольшое количество порошка витамина РР помещают в пробирку, прибавляют 2 мл 0,1 моль/л раствора гидроксида натрия и нагревают. Ощущают запах аммиака, который образуется при расщеплении амидной связи в молекуле ниацина.

Работа 29. Феррихлоридная проба на пиридоксин

При добавлении к раствору пиридоксина раствора хлорного железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа.

Ход работы. К 5 каплям 5% водного раствора пиридоксина прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа и встряхивают; жидкость приобретает красную окраску.

Работа 30. Восстановление аскорбиновой кислотой феррицианида калия, метиленовой сини, 2,6-дихлорфенолиндофенола и молекулярного йода

1. При добавлении вытяжки из шиповника, содержащей аскорбиновую кислоту, к смеси растворов железосинеродистого калия $K_3Fe^{+3}(CN)_6$ и хлорного железа $Fe^{+3}Cl_3$ бурая жидкость окрашивается в синий цвет.

Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты и восстановлением железосинеродистого калия $K_3Fe^{+3}(CN)_6$ в железистосинеродистый $K_4Fe^{+2}(CN)_6$ последний с хлорным железом образует берлинскую лазурь $Fe_4^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]_3$.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 1 капле 5% раствора железосинеродистого калия и по 1 капле 1% раствора хлорного железа. В первую пробирку к зеленовато-бурой жидкости добавляют 5-10 капель 1% вытяжки из шиповника; во вторую – столько же дистиллированной воды. Жидкость в первой пробирке приобретает зеленовато-синюю окраску и выпадает синий осадок берлинской лазури. При осторожном наливаании дистиллированной воды осадок на дне пробирки становится более отчетливым. Во второй пробирке зеленовато-бурая окраска жидкости остается без изменения.

2. При добавлении вытяжки из шиповника, содержащей аскорбиновую кислоту, к раствору метиленовой сини или к раствору 2,6-дихлорфенолиндофенола жидкость обесцвечивается.

Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановлением краски в лейко-соединение.

Ход работы. а) В 2 пробирки наливают по 1 капле 0,01% раствора метиленовой сини и по 1 капле 10% раствора соды. В одну из пробирок добавляют 5 капель 1% вытяжки из шиповника, в другую – столько же воды и одновременно нагревают над пламенем горелки. В пробирке с вытяжкой из шиповника жидкость обесцвечивается.

б) В 2 пробирки наливают по 10 капель 0,015% раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. В первую пробирку добавляют 1 каплю 2% раствора соляной кислоты. Жидкость принимает красную окраску. В обе пробирки к синей и красной жидкости добавляют по каплям вытяжку из шиповника (5-10 капель). В том и в другом случае жидкость обесцвечивается вследствие восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола за счет окисления аскорбиновой кислоты.

3. При добавлении вытяжки из шиповника, содержащей аскорбиновую кислоту, к раствору йода в йодистом калии раствор йода обесцвечивается. Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановлением молекулярного йода с образованием йодистоводородной кислоты.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1-2 капли 0,1% раствора йода. В одну пробирку прибавляют 10 капель дистиллированной воды, в другую – 10 капель вытяжки из шиповника. В пробирке с вытяжкой из шиповника раствор йода обесцвечивается.



ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 18

Тема: **Метаболизм и биологическая функция жирорастворимых витаминов.**

Цель обучения: Сформировать знания о структуре жирорастворимых витаминов. Метаболизм и биологические функции жирорастворимых витаминов.

Целевые задачи: к концу занятия студент должен уметь:

- проводить цветные реакции на витамины;
- оформлять протокол эксперимента, наблюдения, выводы;

Основные этапы занятия: Проведение качественных реакций на жирорастворимые витамины.

Вопросы для проверки исходного уровня знаний

1. Что такое витамины?
2. Когда и кем были открыты витамины?
3. Кто дал витаминам это название и по какому признаку?
4. Как классифицируются витамины?
5. Что такое авитаминоз и гиповитаминозы и каковы причины их появления?

6. Каковы специфические признаки авитаминоза, вызванных отсутствием в пище ретинола и кальциферола? Какова химическая природа этих витаминов, какие вещества являются их провитаминами?
7. Какова связь между ретинолом, зрительным пурпуром и куриной слепотой?
8. Чем обусловлены кровоизлияния при недостатке филлохинона и какова причина кровоизлияния при недостатке аскорбиновой кислоты и цитрина?
9. Какие витамины относятся к группе водорастворимых витаминов?
10. Каковы специфические признаки авитаминозов, вызванных отсутствием в пище тиамин, рибофлавина, никотинамида, пиридоксина? Какова химическая природа этих витаминов, в состав каких ферментов входит каждый из названных выше витаминов?

Работа 31. Реакция на ретинол с треххлористой сурьмой

Рыбий жир, содержащий ретинол, при добавлении хлороформного раствора треххлористой сурьмы приобретает синюю окраску. Химизм реакции неизвестен.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1 каплю свежего рыбьего жира и добавляют 4-5 капель 33% хлороформного раствора треххлористой сурьмы. При смешивании содержимое пробирки окрашивается в синий цвет. Реакцию с треххлористой сурьмой используют для количественного определения ретинола колориметрическим методом.

Работа 32. Реакция на ретинол с концентрированной серной кислотой

Хлороформный раствор рыбьего жира, содержащий ретинол, при добавлении концентрированной серной кислоты приобретает красное окрашивание, переходящее в красно-бурое.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1 каплю рыбьего жира и 5 капель хлороформа, перемешивают и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет.

Работа 33.

Бромхлороформная проба на кальциферолы

Рыбий жир, содержащий холекальциферол, при добавлении раствора брома в хлороформе приобретает зеленовато-голубоватое окрашивание.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1-3 капли рыбьего жира и 2-4 капли раствора брома в хлороформе (1:60). Жидкость постепенно приобретает зеленовато-голубое окрашивание.

Работа 34.

Анилиновая проба на кальциферол

При нагревании рыбьего жира, содержащего холекальциферол, со смесью анилина и концентрированной соляной кислоты раствор приобретает красную окраску.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1 каплю рыбьего жира и 5 капель хлороформа, перемешивают и добавляют 1 каплю анилинового реактива (15 частей анилина + 1 часть концентрированной соляной кислоты). При нагревании желтая эмульсия принимает красную окраску.

Работа 35.

Реакция на метинон и викасол

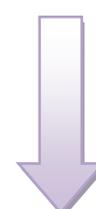
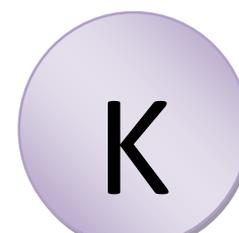
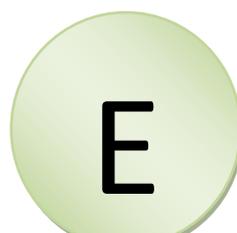
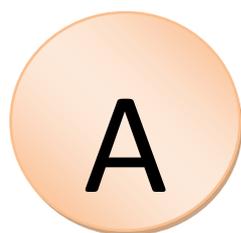
1. Спиртовой раствор метинона или викасола в присутствии анилина окрашивается в красный цвет.

Ход работы. К 5 каплям 0,25% спиртового раствора метинона или 0,05% раствора викасола добавляют 2 капли анилина и встряхивают. Жидкость окрашивается в красный цвет.

2. При добавлении к раствору викасола цистеина и щелочи жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет, переходящий при стоянии в оранжевый.

Ход работы. К 5 каплям 0,05% раствора цистеина и 1 каплю 10% раствора едкого натра. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет.

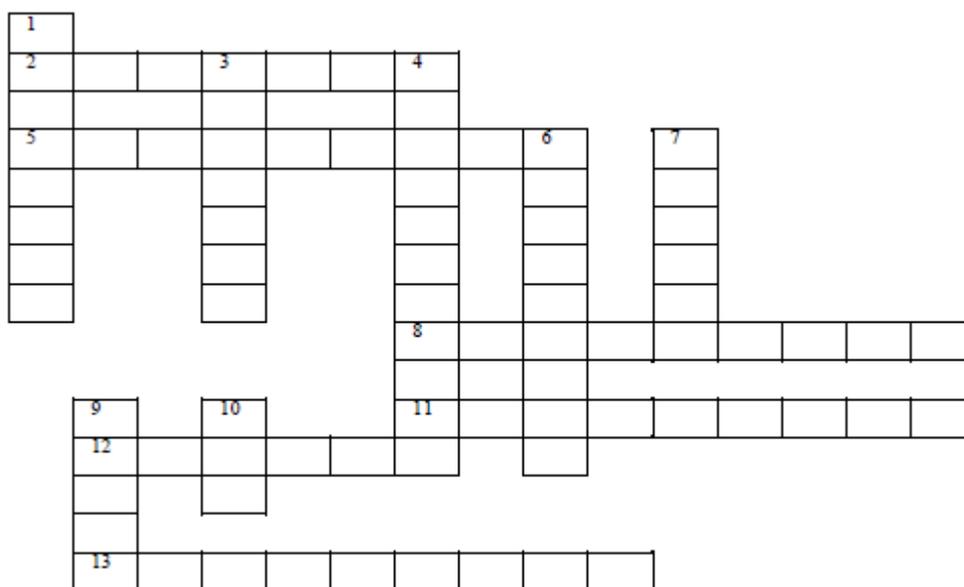
Название витамина	Химическое строение	Кофакторная форма	Участие в биохимических реакциях	Признаки авитаминоза



В каких продуктах содержится и какая функция?

Кроссворд для проверки полученных знаний.

1-группа



По горизонтали.

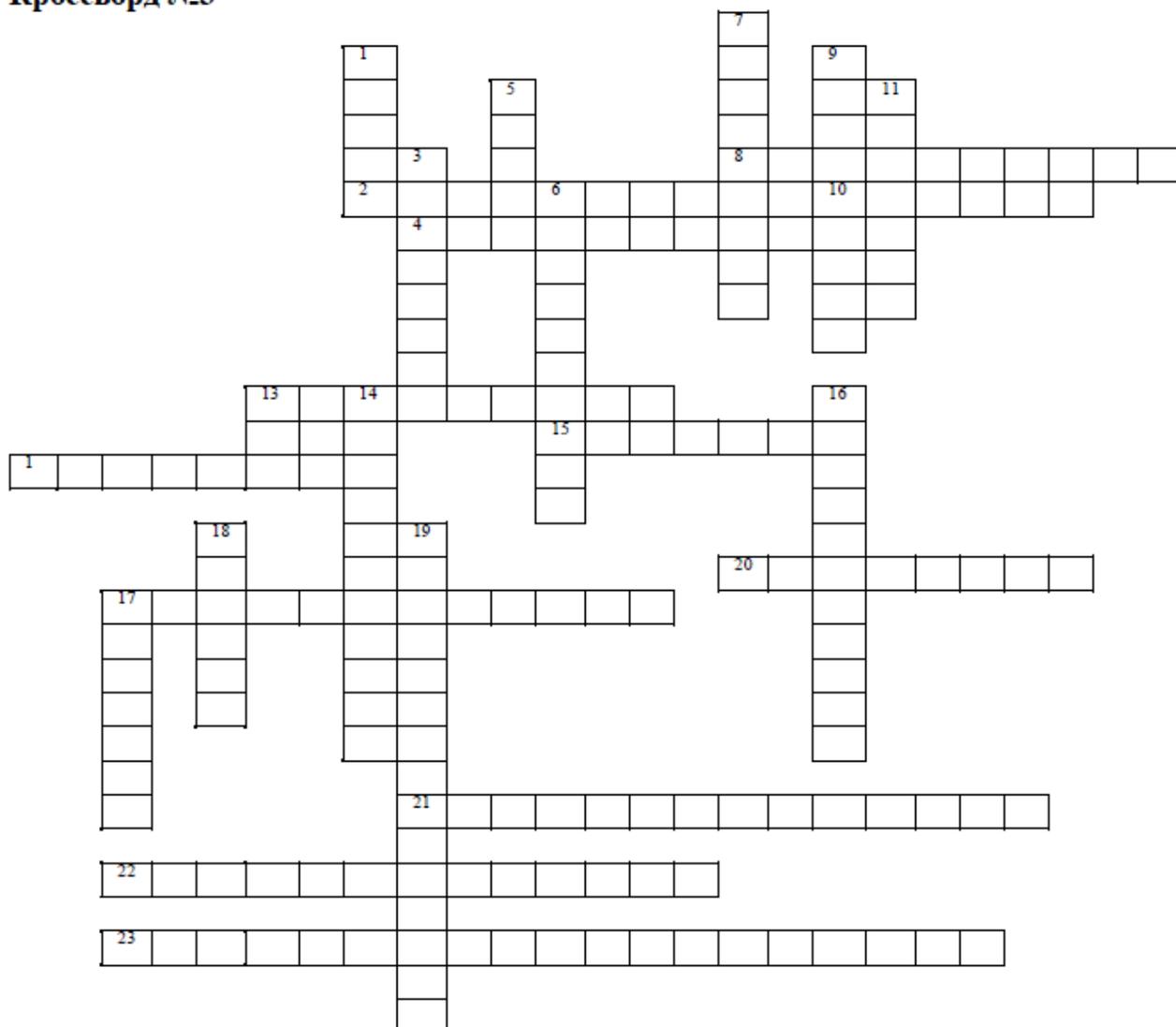
2. Дисахарид, содержащийся в молоке.
5. Низкомолекулярные органические соединения, в которых нуждаются некоторые ферменты для проявления каталитической активности.
8. Моноеновая жирная кислота из 18 углеродных атомов.
11. Ферменты, катализирующие внутримолекулярные превращения.
12. Соединение, образующееся только при высоких концентрациях кетоновых тел в крови.
13. Дисахарид, содержащийся в грибах.

По вертикали:

1. Гормон, вырабатываемый в ответ на понижение глюкозы в крови.
3. Аминокислота, содержащая гидроксильную группу.
4. Нейромедиатор.
6. Витамин E.
7. Соединение, участвующее в карбоксилировании ацетил-КоА.
9. Соединение, образующиеся при гидратации фумарата в цитратном цикле.
10. Небелковая часть миоглобина.

2-группа

Кроссворд №3



По горизонтали:

2. Низкомолекулярные соединения небелковой природы, входящие в белок.
4. Аминокислота.

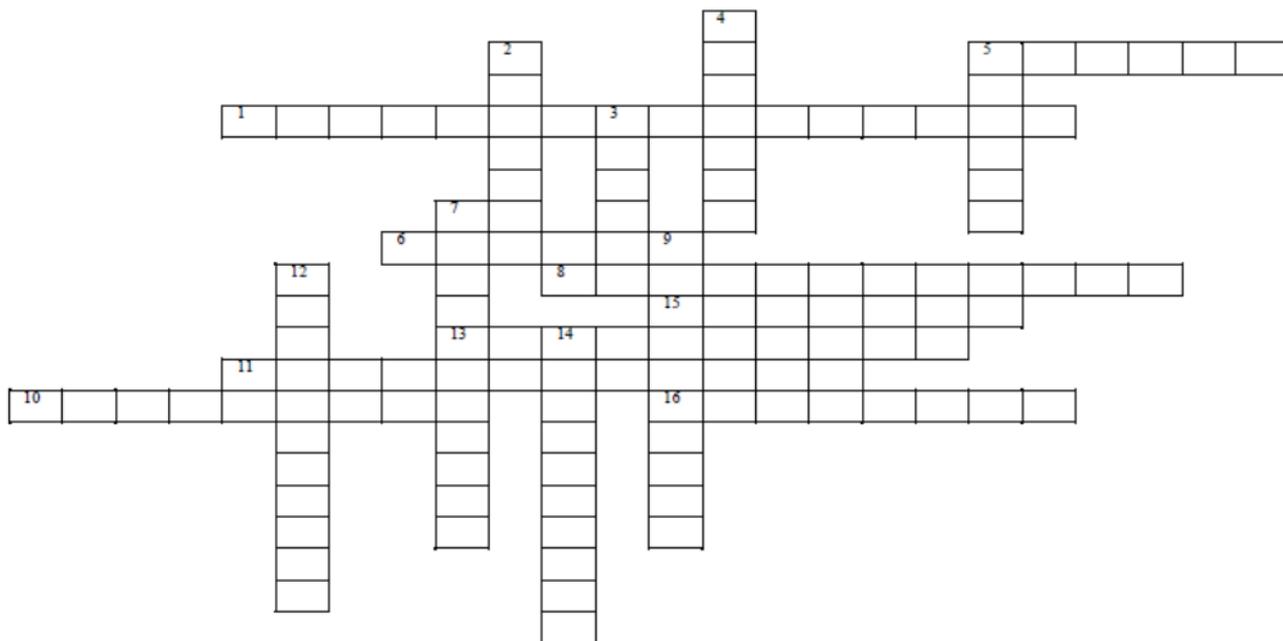
8. Пептид, содержащий до 10 аминокислот.
10. Кофермент-витамин.
12. Транспортный белок крови.
13. Ферменты, расщепляющие ковалентные связи с присоединением воды.
15. Незаменимый пищевой фактор.
17. Метод разделения белков.
20. Субъединица олигомерного белка.
21. Специфический белок, вырабатываемый организмом при попадании в него чужеродных структур.
22. Фермент, определяемый в крови при инфаркте миокарда.
23. Абсолютная специфичность фермента к одному из изомеров.

По вертикали:

1. Биополимер, мономерами которого являются α -(L)-аминокислоты.
3. Ион металла, необходимый ферменту для проявления его активности.
5. Участок полипептидной цепи, который приобрёл независимо от других участков той же цепи конформацию глобулы.
6. Витамин В2-предшественник кофермента.
7. Фермент, отщепляющий фосфорный остаток от субстрата.
9. Вещество, снижающее каталитическую активность фермента.
11. Аминокислота, содержащая NH₂-группу.
13. Небелковая часть гемоглобина.
14. Потеря конформации и специфической функции белка.
16. Наследственное заболевание, вызванное нарушением функционирования какого-либо фермента в клетке.
17. Фибриллярный белок.
18. Фермент с абсолютной субстратной специфичностью.
19. Конформационные изменения олигомерного белка, изменяющие сродство других протомеров к лигандам.

3-группа

Кроссворд №4.



По горизонтали:

1. Первая реакция распада глюкозы.
5. Кетонное тело.
6. Первый продукт цикла лимонной кислоты.
8. Заболевание, возникающее при нарушении обмена липопротеинов.
10. Аминоспирт-предшественник большой группы липидов.
11. Процесс распада гликогенов до глюкозы.
13. Липопротеины, содержащие наибольшее количество ТАГ.
15. Высокотоксичное вещество, являющееся ингибитором комплекса I дыхательной цепи.
16. Резервная форма глюкозы, синтезируемая в организме животных и человека.

По вертикали:

2. Продукт общего пути катаболизма.
3. Продукт анаэробного распада глюкозы.
4. Место протекания реакций катаболизма жирных кислот.
5. Барбитурат-ингибитор комплекса I дыхательной цепи.
7. Место образования аденозинтрифосфата в клетке.
12. Фракция крахмала.
14. Класс эйкозаноида.

Литература

1. Строев Е.А. « Биологическая химия » - М., « Высшая школа », 1986 г.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. «Биологическая химия» – М., «Медицина 1998
3. Методы клинических лабораторных исследований: учебник / под ред. В.С.Камышникова. – М.: МЕДпресс-информ, 2009
4. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. « Руководство к практическим занятиям по биологической химии » - М., « Высшая школа », 1988 г.
5. А.Я. Николаев “ Биологическая химия” – Высш. шк. 2004
6. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. – М.: Высш. шк. 1998, 479 с.;

7.Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функций клетки // М.: Мир, 1974, 956 с.;

8.Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии // Ростов-на Дону: Феникс, 1999,