

Электронная цифровая подпись



Утверждено 30 мая 2019 г.
протокол № 5

председатель Ученого Совета Лысов Н.А.

ученый секретарь Ученого Совета Бунькова Е.Б.

**ОЦЕНОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ
ПРОВЕДЕНИЯ ТЕКУЩЕГО КОНТРОЛЯ И ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ
по дисциплине «БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ-БИОХИМИЯ ПОЛОСТИ РТА»
Специальность 31.05.03 Стоматология
(уровень специалитета)
Направленность Стоматология
Форма обучения: очная
Квалификация (степень) выпускника: Врач-стоматолог
Срок обучения: 5 лет**

1. Перечень компетенций с указанием этапов их формирования в процессе освоения образовательной программы

| № п/п | Контролируемые темы дисциплины (этапы формирования компетенций) | Код контролируемой компетенции (или её части) / и ее формулировка – по желанию | Наименование оценочного средства | Шкала оценивания |
|-------|---|--|--|-------------------------------|
| 1. | Строение, свойства и функции белков и аминокислот | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы | Пятибалльная шкала оценивания |
| 2. | Ферменты | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы | |
| 3. | Витамины | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы | |
| 4. | Углеводы и липиды: строение, свойства, функции. | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы | |
| 5. | Биологические мембраны. Строение и функции. Транспорт веществ через мембрану. Передача сигнала в клетку | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы | |
| 6. | Введение в обмен веществ. Биологическое окисление | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы | |
| 7. | Обмен углеводов | ОПК-7 | Устный ответ, | |

| | | | |
|-----|---|-------|--|
| | | | стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |
| 8. | Обмен липидов | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |
| 9. | Обмен белков и аминокислот | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |
| 10. | Обмен нуклеотидов. Матричные биосинтезы. | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |
| 11. | Биохимия крови | ОПК-7 | Устный ответ. стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |
| 12. | Гормоны и гормональная регуляция метаболических процессов | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |
| 13. | Биохимия нервной и мышечной ткани | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |

| | | | |
|-----|--|-------|--|
| 14. | Биохимия соединительной ткани. | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |
| 15. | Биохимия тканей полости рта. Биохимические механизмы патологии тканей полости рта. Механизмы защиты эмали зуба | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |
| 16. | Биохимия ротовой жидкости | ОПК-7 | Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа составление глоссария, выполнение контрольной работы |

2. Текущий контроль успеваемости на занятиях семинарского типа(семинары, практические занятия, клинические практические занятия, практикумы, лабораторные работы), **включая задания самостоятельной работы обучающихся проводится в формах:**

- устный ответ (в соответствии с темой занятия в рабочей программе дисциплины и перечнем вопросов для самоконтроля при изучении тем дисциплины –п.п. 4.2, 5.2 рабочей программы дисциплины);

- стандартизированный тестовый контроль по темам изучаемой дисциплины;
- выполнение лабораторной работы/ практической работы
- выполнение контрольной работы,
- составление глоссария
- иные формы контроля, определяемые преподавателем

Выбор формы текущего контроля на каждом занятии осуществляет преподаватель. Формы текущего контроля на одном занятии у разных обучающихся могут быть различными. Конкретную форму текущего контроля у каждого обучающегося определяет преподаватель. Количество форм текущего контроля на каждом занятии может быть различным и определяется преподавателем в зависимости от целей и задач занятия.

2.1 Типовые контрольные задания или иные материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций в процессе освоения образовательной программы

2.1.1. Для стандартизированного тестового контроля (по темам)

Тема 1. Строение, свойства и функции белков и аминокислот.

1. Выберите один правильный ответ:

В молекуле белка наиболее прочные связи:

- | | | |
|-----------------|---------------|----------------|
| 1. пептидные | 3. водородные | 5. гидрофобные |
| 2. дисульфидные | 4. ионные | |

2. Выберите один правильный ответ:

К простым белкам относится:

- | | | |
|-----------------------------|----------------------|------------------|
| 1. фетальный гемоглобин F | 3. муцин слюны | 5. казеин молока |
| 2. альбумин сыворотки крови | 4. цитохром <i>b</i> | |

3. Выберите правильные ответы:

Денатурация белка всегда сопровождается:

1. нарушением его третичной структуры
2. гидролизом пептидных связей
3. образованием функциональных комплексов с другими белками
4. появлением окраски
5. потерей нативных биологических свойств

4. Выберите один правильный ответ:

Активный центр белка

1. формируется на уровне третичной структуры
2. является простетической небелковой группой
3. формируется на уровне вторичной структуры
4. это фрагмент пептидного остова
5. может присоединять регуляторные молекулы

5. Выберите один правильный ответ:

В изоэлектрической точке заряд белка

1. отрицательный
2. не зависит от концентрации OH^-
3. равен 0
4. положительный
5. не зависит от концентрации H^+ (рН)

6. Выберите правильные ответы:

К незаменимым аминокислотам относятся:

1. триптофан
2. серин
3. аланин
4. лизин
5. глицин

7. Выберите один правильный ответ:

Заряд белковой молекулы зависит от:

1. молекулярной массы
2. наличия радикалов ионогенных аминокислот
3. формы белковой молекулы
4. температуры
5. уровня структурной организации

8. Выберите один правильный ответ:

Донором метильной группы является аминокислота:

1. валин
2. лейцин
3. метионин
4. аргинин
5. треонин

9. Выберите один правильный ответ:

Олигомерные белки отличаются от других белков наличием

1. неупорядоченной структуры
2. вторичной структуры
3. третичной структуры
4. четвертичной структуры
5. доменного строения.

10. Выберите правильные ответы:

Факторы устойчивости белковых молекул в биологических жидкостях:

1. наличие простетической небелковой группы
2. наличие гидратной оболочки
3. наличие заряда
4. наличие пептидного остова
5. отсутствие заряда

Эталоны ответов к тестовым заданиям темы 1.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|-----|---|---|-----|---|---|---|-----|
| 1 | 2 | 1,5 | 1 | 3 | 1,4 | 2 | 3 | 4 | 2,3 |

Тема 2. Ферменты

1. Выберите один правильный ответ:

Класс ферментов указывает на:

1. конформацию фермента
2. тип кофермента
3. тип химической реакции, катализируемой данным ферментом
4. строение активного центра фермента

2. Выберите один правильный ответ:

Ферменты осуществляют каталитическое действие, так как:

1. увеличивают частоту столкновений молекул субстрата
2. снижают энергию активации
3. устраняют действие ингибиторов на субстрат
4. увеличивают константу Михаэлиса
5. изменяют порядок реакции

3. Выберите один правильный ответ:

Конкурентный ингибитор может связываться с

1. субстратом реакции
2. продуктом реакции
3. активным центром фермента
4. аллостерическим эффектором
5. коферментом

4. Выберите один правильный ответ:

Изоферменты – это формы ферментов, которые:

1. катализируют как прямую, так и обратную реакцию
2. катализируют превращение близких по
3. активным центром фермента
4. принадлежат к классу изомераз
5. катализируют одну и ту же химическую реакцию, но отличаются электрофоретической

строению субстратов подвижностью и органной локализацией

3. принадлежат одному и тому же классу

5. Выберите один правильный ответ:

С точки зрения строения ферментов специфичность их действия объясняется:

1. комплементарностью субстрата и активного центра
2. несоответствием субстрата и активного центра
3. соответствием аллостерического центра и субстрата
4. комплементарностью субстрата и регуляторного центра.

6. Выберите один правильный ответ:

Проферменты пептидаз превращаются в ферменты

1. путем фосфорилирования с участием протеинкиназ
2. путем дефосфорилирования с участием протеинфосфатаз
3. путем диссоциации протомеров
4. путем ассоциации протомеров
5. путем частичного протеолиза

7. Установить соответствие:

Наследственная энзимопатия

1. фенилкетонурия
2. галактоземия
3. гликогеноз Гирке
4. печеночная желтуха

недостаточность фермента:

- А) глюкозо-6-фосфатаза
- Б) УДФ-глюкурозилтрансфераза
- В) фенилаланин-4-гидроксилаза
- Г) галактокиназа

8. Выберите один правильный ответ:

Каталаза, способная разрушать только структуру пероксида водорода, обладает типом специфичности:

1. стереохимическим
2. абсолютным
3. относительным
4. классическим.

9. Выберите один правильный ответ:

При инфаркте миокарда диагностическое значение имеет определение в крови активности фермента:

1. альдолазы
2. лактатдегидрогеназы
3. каталазы
4. алкогольдегидрогеназы
5. α-амилазы

10. Выберите правильные ответы:

Скорость ферментативных реакций зависит от:

1. температуры
2. количества фермента
3. концентрации субстрата
4. pH среды
5. присутствия ингибиторов

Эталоны ответов к тестовым заданиям темы 2.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|------|---|---|-----|
| 3 | 2 | 3 | 5 | 1 | 5 | ВГАБ | 2 | 2 | 1-5 |

Тема 3. Витамины

1. Выберите один правильный ответ:

К группе жирорастворимых витаминов относится:

1. эргокальциферол
2. аскорбиновая кислота
3. никотинамид
4. рибофлавин
5. тиамин

2. Выберите один правильный ответ:

В биосинтезе коллагена принимает участие витамин:

1. филлохинон
2. никотиновая кислота
3. токоферол
4. аскорбиновая кислота
5. биотин

3. Выберите один правильный ответ:

Одним из наиболее эффективных природных антиоксидантов является:

1. филлохинон
2. викасол
3. холекальциферол
4. пантотеновая кислота
5. токоферол

4. Выберите один правильный ответ:

К водорастворимым витаминам относится

1. ретинол
2. аскорбиновая кислота
3. холекальциферол
4. токоферол
5. витамин F

5. Выберите один правильный ответ:

Гиповитаминоз D₃ в детском возрасте приводит к развитию:

1. ксерофтальмии
2. рахитизма
3. гемералопии
4. гипопаратиреоза
5. пеллагры

2. рахита

4. дерматита

6. Установить соответствие:

витамины

- 1. водорастворимые
- 2. авитамины
- 3. витаминоподобные вещества

особенности

- А) действуют как антикоферменты
- Б) частично синтезируются в организме
- В) превращаются в организме в коферменты

7. Установить соответствие:

витамин

- 1. тиамин
- 2. биотин
- 3. аскорбиновая кислота
- 4. никотинамид
- 5. фолиевая кислота

патология

- А) себорея
- Б) пеллагра
- В) анемия
- Г) бери-бери
- Д) цинга

8. Выберите один правильный ответ:

Гиповитаминоз – это

- 1. избыточное накопление витамина в организме
- 2. частичный недостаток витамина в организме
- 3. абсолютный дефицит витамина
- 4. недостаток нескольких витаминов в организме.

9. Выберите один правильный ответ:

Витамером холекальциферола является:

- 1. ретинол
- 2. токоферол
- 3. эргокальциферол
- 4. филлохинон
- 5. аскорбиновая кислота

10. Выберите один правильный ответ:

В процессе свертывания крови участвует витамин:

- 1. А
- 2. D
- 3. E
- 4. K
- 5. PP

Эталоны ответов к тестовым заданиям темы 3.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|-----|-------|---|---|----|
| 1 | 4 | 5 | 2 | 2 | ВАБ | ГАДБВ | 2 | 3 | 4 |

Тема 4. Углеводы и липиды: строение, свойства, функции.

1. Выберите один правильный ответ:

Липиды растворимы:

- 1. в воде
- 2. в хлороформе
- 3. в кислоте
- 4. в щелочном растворе
- 5. в солевом растворе

2. Выберите один правильный ответ:

Способность молекул фосфолипидов самопроизвольно формировать бислои в водных растворах обусловлена их:

- 1. гидрофобными свойствами
- 2. гидрофильными свойствами
- 3. амфифильными свойствами
- 4. липофильными свойствами
- 5. липотропными свойствами

3. Выберите один правильный ответ:

К гомополисахаридам относятся:

- 1. крахмал, гликоген, целлюлоза
- 2. гликоген, гепарин, крахмал
- 3. гиалуроновая кислота, гликоген, гепарин
- 4. целлюлоза, гликоген, дерматансульфат
- 5. крахмал, хондроитинсульфат, целлюлоза

4. Выберите правильные ответы:

Из холестерина в организме человека образуются:

- 1. андрогены и эстрогены
- 2. желчные кислоты
- 3. желчные пигменты
- 4. кортикостероиды
- 5. катехоламины

5. Выберите один правильный ответ:

Незаменимая жирная кислота

- 1. пальмитиновая
- 2. масляная
- 3. стеариновая
- 4. линоленовая
- 5. олеиновая

6. Выберите один правильный ответ:

Нейтральные жиры – это

- 1. триацилглицерины (ТАГ)
- 2. диацилглицерины (ДАГ)
- 3. моноацилглицерины (МАГ)
- 4. фосфоглицерины
- 5. простые эфиры глицерина

7. Выберите правильные ответы:

2.тироксин 4.этанол

9. Выберите правильные ответы:

Экзо- и эндоцитоз:

1. происходит с частью плазматической мембраны
2. характерен для большинства эукариотических клеток
3. характерен для специализированных клеток
4. не требует участия лизосом
5. является АТФ-зависимым процессом

10. Выберите один правильный ответ:

Для приготовления липосом используются:

1. нейтральные жиры
2. свободные жирные кислоты
3. фосфолипиды
4. эфиры холестерина
5. сфингозин

Эталоны ответов к тестовым заданиям темы 5.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|-----|---|-------|-----|---|-------|----|
| 3 | 4 | 5 | 2,4 | 3 | ВАДБГ | 1,3 | 5 | 1,2,5 | 3 |

Тема 6. Введение в обмен веществ. Биоэнергетика. Биологическое окисление.

1. Выберите один правильный ответ:

Универсальным макроэргическим соединением является:

1. ацетил-КоА
2. сукцинил-КоА
3. аденозинтрифосфат
4. фосфоенолпируват
5. 1,3-дифосфоглицерат

2. Выберите один правильный ответ:

Синтез АТФ за счет энергии, выделяющейся при переносе электронов от окисляемого субстрата к молекулярному кислороду, называют:

1. субстратным фосфорилированием
2. окислительным фосфорилированием
3. фотофосфорилированием
4. дефосфорилированием
5. фосфорилированием

3. Выберите один правильный ответ:

Синтез АТФ за счет энергии макроэргических связей некоторых соединений независимо от присутствия кислорода называется:

1. фосфорилированием
2. дефосфорилированием
3. субстратным фосфорилированием
4. фотофосфорилированием
5. окислительным фосфорилированием

4. Выберите один правильный ответ:

Цикл трикарбоновых кислот в процессах катаболизма выполняет роль:

1. специфического пути окисления аминокислот
2. специфического пути окисления липидов
3. общего пути катаболизма
4. специфического пути окисления углеводов
5. специфического пути окисления белков

5. Выберите один правильный ответ:

Поглощаемый митохондриями кислород включается в состав:

1. восстановленных коферментов
2. метаболической воды
3. АТФ
4. убихинола
5. H_3PO_4 .

6. Выберите один правильный ответ:

Причинами гипоэнергетических состояний могут быть:

1. голодание
2. гиповитаминозы B_1 , B_2
3. гипоксия
4. гиповитаминоз РР
5. все перечисленное

7. Выберите правильные ответы:

Виды свободного биологического окисления:

1. перекисное окисление липидов
2. пероксисомальное окисление
3. сопряженное энергетическое окисление
4. митохондриальное окисление
5. микросомальное окисление

8. Выберите один правильный ответ:

Объектом перекисного окисления липидов являются:

1. насыщенные жирные кислоты
2. ненасыщенные жирные кислоты
3. заменимые аминокислоты
4. незаменимые аминокислоты

9. Выберите один правильный ответ:

Ферменты, обезвреживающие активные формы кислорода:

1. каталаза
4. глутатионредуктаза

2. пероксидаза
3. содержащая селен глутатионпероксидаза

5. все перечисленные ферменты

10. Выберите правильные ответы:

Функциональная роль микросомального окисления состоит:

1. в использовании энергии окисления для синтеза АТФ
2. в образовании кислородсодержащих органических соединений с «пластическими» целями
3. в гидрокселировании гидрофобных соединений с «детоксифицирующими» целями

Эталонные ответы к тестовым заданиям темы 6.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|-------|---|---|-----|
| 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1,2,5 | 2 | 5 | 2,3 |

Тема 7. Обмен углеводов.

1. Выберите один правильный ответ:

В пределах физиологической нормы находится показатель концентрации глюкозы в крови:

1. 1,5ммоль/л 2. 4,5ммоль/л 3. 7,5ммоль/л 4. 9,5ммоль/л 5. 10,5ммоль/л

2. Выберите один правильный ответ:

Конечный продукт анаэробного гликолиза – это

1. пируват 2. лактат 3. оксалоацетат 4. этанол 5. ацетил-КоА

3. Выберите один правильный ответ:

На экзамене у студента содержание глюкозы в крови – 7 ммоль/л. Это может быть вызвано:

1. действием гормона инсулина на печень 4. мобилизацией гликогена в печени.
2. мобилизацией гликогена в мышцах 5. действием гормона глюкагона на
3. повышением скорости синтеза жировую ткань
гликогена в печени и мышцах

4. Выберите один правильный ответ:

Синтез глюкозы из неуглеводных компонентов называется:

1. гликолизом 3. протеолизом 5. гидролизом
2. глюконеогенезом 4. гликогенолизом

5. Выберите один правильный ответ:

Основное назначение пентозофосфатного пути окисления глюкозы:

1. окисление глюкозы с целью получения АТФ 4. синтез НАДН·Н⁺
2. снабжение субстратом процесса 5. образование НАДФ·Н⁺, синтез
глюконеогенеза пентозофосфатов
3. образование лактата

6. Выберите правильные ответы:

Гипергликемию вызывают гормоны:

1. адреналин 2. инсулин 3. тестостерон 4. кальцитриол 5. глюкагон

7. Установить соответствие:

нарушение углеводного обмена

характеризуется:

1. сахарный диабет А) нарушением обмена гликогена
2. гипогликемия Б) резким снижением сахара в крови
3. глюкозурия В) повышением концентрации глюкозы в крови
4. гликогенозы Г) присутствием глюкозы в моче

8. Установить соответствие:

гипергликемия

причины

1. алиментарная А) понижение утилизации глюкозы клетками вследствие дефицита инсулина (ИЗСД)
2. стрессовая Б) поступление с пищей большого количества углеводов
3. патологическая В) усиление распада гликогена (гиперсекреция адреналина, вызванная экстремальной ситуацией)

9. Установить соответствие:

основной путь окисления глюкозы

органы, ткани, клетки

1. анаэробный А) мозг
2. аэробный Б) эритроциты

| | | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------|----------|-----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 2 | 1 | 4,5 | 4 | 4 | 2 | 5 | 1-Б,В, 2-А,Г | 4 | 1 |

Тема 9. Обмен белков и аминокислот.

1. Выберите один правильный ответ:

Трипсин и пепсин:

1. вырабатываются в поджелудочной железе
2. активируются путем белок-белковой регуляции
3. синтезируются клетками желудка
4. являются экзопептидазами
5. участвуют в переваривании белков.

2. Выберите один правильный ответ:

Основной путь дезаминирования аминокислот в организме млекопитающих:

1. восстановительный
2. окислительный
3. гидролитический
4. внутримолекулярный
5. синтетический

3. Выберите один правильный ответ:

Трансаминирование – процесс межмолекулярного переноса аминогруппы от:

1. α -аминокислоты на α -кетокислоту
2. α -аминокислоты на α -гидроксикислоту
3. амина на α -сульфо-кислоту
4. амина на α -гидроксикислоту

4. Установить соответствие:

азотистый баланс

1. положительный
2. отрицательный
3. азотистое равновесие

физиологическое состояние человека

- А) тяжелое заболевание
- Б) беременность
- В) старение
- Г) взрослый человек, полноценная диета
- Д) растущий организм

5. Выберите один правильный ответ:

Биогенные амины образуются из аминокислот в результате реакции:

1. ω -декарбоксилирования
2. α -декарбоксилирования
3. декарбоксилирования, сочетанного с реакцией трансаминирования
4. декарбоксилирования, сочетанного с реакцией конденсации

6. Установить соответствие:

продукт превращения фенилаланина

1. меланины
2. йодтиронины
3. адреналин
4. гомогентизиновая кислота
5. дофамин

органы и ткани

- А) печень
- Б) надпочечники
- В) щитовидная железа
- Г) меланоциты
- Д) нервная ткань

7. Выберите один правильный ответ:

Аммиак в клетках мозга обезвреживается путем

1. синтеза мочевины
2. образования солей аммония
3. превращения глутамата в глутамин
4. образования аланина
5. синтеза креатина

8. Установить соответствие:

биогенный амин

1. серотонин
2. таурин
3. γ -аминомасляная кислота
4. гистамин

физиологические функции

- А) тормозной медиатор
- Б) в составе парных желчных кислот участвует в переваривании жиров
- В) регулирует артериальное давление
- Г) медиатор аллергических реакций

9. Выберите один правильный ответ:

Активность аспаратаминотрансферазы (АСТ или АсАТ) в сыворотке крови резко повышается:

1. при заболеваниях почек
2. при панкреатитах
3. при простатитах
4. при нефритах
5. при инфаркте миокарда.

10. Выберите один правильный ответ:

Основной кофермент обмена аминокислот – это

1. КоА
2. ТДФ
3. НАД⁺
4. бицитин
5. ПФ

Эталоны ответов к тестовым заданиям темы 9.

| | | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---------------|---|-------|---|---------|---|---|
| 5 | 2 | 1 | 1-БД;2-АВ;3-Г | 2 | ГВБАД | 3 | В,Б,А,Г | 5 | 5 |
|---|---|---|---------------|---|-------|---|---------|---|---|

Тема 10. Матричные биосинтезы. Обмен нуклеотидов.

- Выберите один правильный ответ:**
В состав нуклеотида входит
 - азотистое основание
 - азотистое основание и пентоза
 - азотистое основание, пентоза и остаток фосфорной кислоты
 - аминокислоты
 - высшие жирные кислоты
- Выберите один правильный ответ:**
Молекула РНК:
 - состоит из двух полинуклеотидных цепей
 - имеет одинаковое строение 5' и 3'-концов
 - не имеет спирализованных участков
 - построена из рибонуклеозидмонофосфатов
 - синтезируется в ходе репликации.
- Выберите один правильный ответ:**
Формирование вторичной структуры ДНК происходит за счет:
 - водородных связей
 - ионных связей
 - сложноэфирных связей
 - дисульфидных связей
 - ковалентных связей
- Выберите один правильный ответ:**
Конечными продуктами катаболизма пиримидиновых оснований являются:
 - мочевая кислота, мочевины
 - ксантин, гипоксантин
 - NH₃, CO₂, β-аланин
 - глиоксиловая кислота, гомогентизиновая кислота
 - дигидротимин, дигидроурацил
- Выберите один правильный ответ:**
Конечным продуктом обмена пуриновых азотистых оснований у человека является:
 - гипоксантин
 - ксантин
 - мочевая кислота
 - гомогентизиновая кислота
 - глиоксиловая кислота
- Выберите один правильный ответ:**
Гиперурикемию наблюдают при:
 - подагре
 - гликогенозах
 - фенилкетонурии
 - бери-бери
 - цинге
- Выберите один правильный ответ:**
Синтез белка усиливает
 - глюкоза
 - адреналин
 - оротат калия
 - тестостерон
 - жирные кислоты
- Выберите один правильный ответ:**
Матрицей в синтезе белка является
 - мРНК
 - ДНК
 - тРНК
 - рРНК
- Выберите один правильный ответ:**
Репликация:
 - начинается после перехода клетки в фазу покоя
 - предполагает образование транскрипционной вилки
 - осуществляет образование копии ДНК перед каждым клеточным делением
 - обеспечивает многократное удвоение генома в течение S фазы
 - завершается образованием РНК, комплементарной матричной цепи.
- Выберите один правильный ответ:**
Субъединицы рибосом характеризуются:
 - массой в граммах
 - размерами в сантиметрах
 - осевым коэффициентом
 - скоростью седиментации в центрифужном поле в единицах Сведберга

Эталоны ответов к тестовым заданиям темы 10.

| | | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 3 | 4 | 1 | 3 | 3 | 1 | 4 | 1 | 3 | 4 |

Тема 11. Биохимия крови.

- Выберите один правильный ответ:**
Содержание общего белка в плазме крови взрослого здорового человека составляет:
 - 25-45 г/л
 - 45-65 г/л
 - 65-85 г/л
 - 85-105 г/л
 - 105-125г/л.
- Выберите один правильный ответ:**

4. Выберите один правильный ответ:
Основной путь утилизации глюкозы в головном мозге:
 1. пентозофосфатное окисление 3. анаэробный гликолиз 5. гликогенез
 2. липолиз 4. аэробный гликолиз
5. Выберите один правильный ответ:
Наиболее интенсивно в нервной ткани протекает обмен аминокислоты:
 1. серина 2. аланина 3. аргинина 4. валина 5. глутамата
6. Выберите один правильный ответ:
Фермент, участвующий в синтезе ацетилхолина:
 1. холинацетилтрансфераза 4. 5-гидрокситриптофандекарбоксилаза
 2. тирозингидроксилаза 5. глутаматдекарбоксилаза
 3. дофамин-β-гидроксилаза
7. Выберите один правильный ответ:
Энкефалины по структуре являются
 1. углеводами 3. нуклеотидами 5. липидами
 2. пентапептидами 4. полипептидами
8. Выберите один правильный ответ:
По химическому составу миелиновое вещество относится к
 1. гликопротеинам 4. фосфолипидам
 2. гликолипидам 5. нуклеопротеинам
 3. сложным белково-липидным комплексам
9. Выберите один правильный ответ:
Опиоидный пептид, имеющий выраженную обезболивающую активность
 1. дофамин 2. серотонин 3. норадреналин 4. ацетилхолин 5. эндорфин
10. Выберите один правильный ответ:
Главным энергоемким субстратом сердечной мышцы является
 1. фруктоза 2. жирные кислоты 3. аминокислоты 4. гликоген 5. лактоза

Эталоны ответов к тестовым заданиям темы 13

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 2 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 5 | 2 |

Тема 14. Биохимия соединительной ткани.

1. Выберите один правильный ответ:
К фибриллярным белкам соединительной ткани относится:
 1. альбумин 2. коллаген 3. миозин 4. миоглобин 5. гемоглобин
2. Выберите один правильный ответ:
Межклеточное вещество соединительной ткани содержит:
 1. гликоген 3. гиалуроновую кислоту 5. мочевины
 2. липиды 4. минеральные соли
3. Выберите правильные ответы:
К неколлагеновым белкам внеклеточного матрикса можно отнести:
 1. ламинин 2. альбумин 3. гемоглобин 4. фибронектин 5. глобулин
4. Выберите один правильный ответ:
Фермент, способствующий разрушению соединительной ткани:
 1. коллагеназа 3. щелочная фосфатаза 5. энтерокиназа
 2. креатинкиназа 4. кислая фосфатаза
5. Выберите один правильный ответ:
Фибриллярный резиноподобный белок, способный к обратимому растяжению в длину в несколько раз:
 1. эластин 2. коллаген 3. миозин 4. актин 5. ламинин
6. Выберите один правильный ответ:
Аминокислотные остатки коллагена, преобразующиеся в ходе посттрансляционной модификации:
 1. серин, метионин 3. триптофан, валин 5. глутамат, аспарат
 2. пролин, лизин 4. глицин, аланин
7. Выберите один правильный ответ:
Эластин может растягиваться в двух направлениях благодаря:

1. десмозину 2. пролину 3. лизину 4. метионину 5. коллагену

8. Выберите один правильный ответ:

Характерные особенности фибронектина:

1. является гликопротеином
2. имеет несколько центров связывания с различными молекулами и клетками
3. способствует адгезии клеток
4. состоит из двух субъединиц, свернутых в глобулярные домены
5. все перечисленное верно.

9. Выберите правильные ответы:

Обязательными участниками гидроксилирования пролина и лизина в про-α-цепях коллагена являются:

1. кислород O₂
2. витамин B₆
3. витамин C
4. железо в ферро-форме(Fe²⁺)
5. α-кетоглутаровая кислота

10. Выберите один правильный ответ:

К коллагенозам относят:

1. ревматизм
2. сахарный диабет
3. инфаркт миокарда
4. атеросклероз
5. гепатит.

Эталоны ответов к тестовым заданиям темы 14.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|-----|---|---|---|---|---|---------|----|
| 2 | 5 | 1,4 | 1 | 1 | 2 | 1 | 5 | 1,3,4,5 | 1 |

Тема 15. Биохимия тканей полости рта. Биохимические механизмы патологии тканей полости рта. Механизмы защиты эмали зуба.

1. Выберите один правильный ответ:

Самая минерализованная ткань зуба:

1. дентин
2. эмаль
3. цемент
4. пульпа

2. Выберите один правильный ответ:

Основным минеральным компонентом зубной эмали является:

1. гидроксиапатит – Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂
2. фторапатит – Ca₁₀(PO₄)₆F₂
3. стронциевый апатит – Ca₉Sr(PO₄)₆(OH)₂
4. карбонатапатит – Ca₁₀(PO₄)₄(CO₃)₃(OH)₂
5. хлорапатит – Ca₁₀(PO₄)₆Cl₂

3. Выберите один правильный ответ:

Около 90% белков эмали составляют:

1. энамелины
2. тафтелины
3. кальций-связывающие белки
4. амелогенины
5. коллаген I типа

4. Выберите один правильный ответ:

Свойства эмали улучшаются при включении в ее состав ионов:

1. Mg²⁺
2. Sr²⁺
3. F⁻
4. HCO₃⁻
5. H⁺

5. Выберите правильные ответы:

Ионы фтора:

1. участвуют в изоморфных замещениях
2. повышают устойчивость эмали к кариесу
3. образуют фторапатиты
4. повышают устойчивость эмали к изменениям pH среды.
5. все перечисленное верно

6. Выберите один правильный ответ:

Флюороз:

1. наблюдается при образовании стронциевых апатитов
2. развивается вследствие накопления зубного налета
3. развивается вследствие образования зубного камня
4. повышает кариесрезистентность эмали
5. развивается при избыточном поступлении фтора в организм человека

7. Выберите один правильный ответ:

Основным метаболитом который разрушает структуру эмали является кислота:

1. пальмитиновая
2. молочная
3. пальмитолеиновая
4. α-кетоглутаровая
5. янтарная

8. Выберите один правильный ответ:

Роль накопителя кальция в дентине выполняет:

1. глутамат 2. аспарат 3. цитрат 4. малат 5. сукцинат.
- 9. Выберите один правильный ответ:**
Мягкий зубной налет вызывает:
 1. пародонтит 2. гингивит 3. пародонтоз 4. стоматит 5. глоссит

10. Выберите правильные ответы:

Пелликула:

1. образуется в результате спонтанной адсорбции и агрегации муцинов слюны
 2. последний секреторный продукт амелобластов
 3. процесс образования ускоряется при снижении pH ротовой жидкости
 4. процесс образования ускоряется при повышении pH ротовой жидкости
 5. регулирует диффузию различных ионов из слюны в эмаль или из эмали в слюну.

Эталонные ответы к тестовым заданиям темы 15.

| | | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 2 | 1 | 4 | 3 | 5 | 5 | 2 | 3 | 2 | 1,3,5 |

Тема 16. Биохимия ротовой жидкости.

1. Выберите один правильный ответ:

Гликопротеины, придающие слюне вязкость и тягучесть, защищающие слизистые оболочки от химических, механических и термических воздействий:

1. муцины 2. цистатины 3. гистатины 4. статхерины 5. кинины

2. Выберите один правильный ответ:

pH смешанной слюны:

1. 5,5 - 6,0 2. 6,0 – 6,7 3. 6,5 – 7,5 4. 7,4 -7,8 5. 7,8 – 8,2

3. Выберите правильные ответы:

Буферные системы смешанной слюны:

1. ацетатная 2. фосфатная 3. гемоглобиновая 4. белковая 5. бикарбонатная

4. Выберите один правильный ответ:

Минерализующая функция слюны зависит от содержания в ней:

1. ионов K^+ и Na^+ 3. ионов тяжелых металлов Ag^+ , Hg^{2+} , 5. ионов I^- и Cl^-
 2. ионов Ca^{2+} и фосфатов Pb^{2+}
 4. бикарбонатов HCO_3^- и тиоцианатов SCN^-

5. Выберите один правильный ответ:

При понижении pH минерализующая функция слюны:

1. остается без изменения 3. снижается 4. имеет разнонаправленный характер
 2. повышается 5. ни один ответ не верен

6. Выберите один правильный ответ:

Повреждающим действием на микробные клетки обладают присутствующие в слюне:

1. лизоцим 4. пероксид водорода
 2. супероксидный анион-радикал кислорода 5. все перечисленное верно
 3. гипотиоцианаты

7. Выберите правильные ответы:

К причинам развития кариеса можно отнести:

1. избыточное потребление рафинированных углеводов
 2. нарушение свойств и состава ротовой жидкости
 3. избыточное накопление зубного налета
 4. питьевая вода с нормальным содержанием фтора
 5. присутствие в слюне микроорганизмов, использующие в качестве питательных веществ белки и аминокислоты.

8. Выберите один правильный ответ:

Особенности аминокислотного состава гистатинов:

1. содержат большое количество гистидина 4. содержат большое количество серина
 2. содержат большое количество пролина 5. содержат большое количество
 3. содержат большое количество тирозина аргинина

9. Выберите один правильный ответ:

К защитным системам полости рта можно отнести:

1. фермент лизоцим
2. секреторные иммуноглобулины
3. буферную систему $[\text{HCO}_3^-]/[\text{H}_2\text{CO}_3]$
4. α -амилазу
5. все перечисленное

10. Выберите правильные ответы:

В диагностических целях слюну используют:

1. при определении группы крови
2. для исследования скорости метаболизма лекарств
3. в диагностике опухолей и заболеваний слюнных желез
4. в диагностике рака или предрака желудка

Эталоны ответов к тестовым заданиям темы 16

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|-------|---|---|---|-------|---|---|-----|
| 1 | 3 | 2,4,5 | 2 | 3 | 5 | 1,2,3 | 1 | 5 | 1-4 |

2.2. Лабораторные работы (практические работы) по темам дисциплины

Тема 1. Строение, свойства и функции белков и аминокислот

Присутствие веществ белковой природы в биологическом материале и лекарственных препаратах можно обнаружить с помощью ряда качественных реакций. Для обнаружения белков существуют две группы реакций: цветные реакции и реакции осаждения.

Работа 1. Цветные реакции на белки

При взаимодействии белка с различными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции. Образование их обусловлено присутствием в молекуле белка той или иной аминокислоты, имеющей в своем составе определенную химическую группировку. Значение цветных реакций состоит в том, что они дают возможность установить белковую природу вещества и доказать присутствие определенных аминокислот в различных природных белках. На основании некоторых цветных реакций разработаны методы количественного определения белков и аминокислот.

Цветные реакции можно разделить на два типа:

1. Универсальные – биуретовая (на все белки и пептиды) и нингидриновая (на все α -аминокислоты и белки);
2. Специфические – только на определённые аминокислоты в белках и растворах аминокислот (реакции ксантопротеиновая, Фоля, Адамкевича и др.)

А. Биуретовая реакция на пептидную группу (реакция Пиотровского)

Принцип метода. Все белки при обработке солями меди в щелочной среде образуют хелатный (клатшевидный) комплекс фиолетового цвета с красным или синим оттенком (в зависимости от числа пептидных связей в белке), что является универсальной качественной реакцией на белки, которая называется **биуретовой** реакцией. Своё название эта реакция получила от производного мочевины **биурета** (лат. bi – двух-, двух + urea мочевина; синоним карбамоилмочевина $\text{H}_2\text{N} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2$), который даёт такую же реакцию. Положительную биуретовую реакцию дают органические соединения, имеющие не менее двух пептидных связей, т.е. начиная с трипептидов все олигопептиды, полипептиды и белки. Полагают, что образование окрашенных комплексов с ионами меди происходит вследствие того, что пептидные связи подвергаются в щелочной среде кетоенольной таутомеризации:



Водород енольной группы при этом легко отщепляется, в результате чего медь присоединяется к атому кислорода. Кроме того, ион меди образует комплекс с четырьмя атомами азота, входящими в пептидные связи и имеющими свободные электронные пары, образуя с НИИ координационные связи.

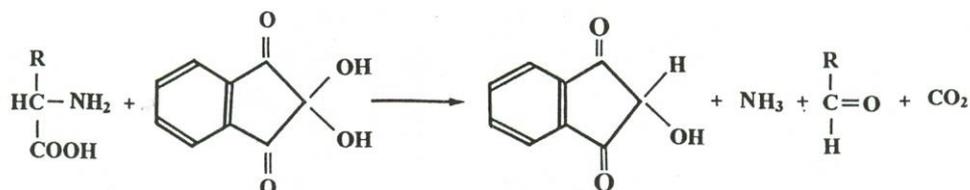
Ход работы. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка, 1-2 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1-2 капли раствора сульфата меди(II). При взбалтывании постепенно развивается **фиолетовое** окрашивание.

Результат:

Вывод:

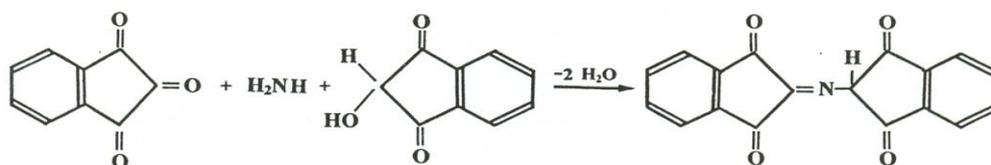
Б. Нингидриновая реакция

Принцип метода. Все белки, полипептиды, олигопептиды и свободные аминокислоты дают характерное синее или фиолетовое окрашивание с **нингидрином** (гидрата 1,2,3-индантрионом) при нагревании. Реакция обусловлена взаимодействием нингидрина с α -аминогруппой. При нагревании в присутствии нингидрина происходит окислительное дезаминирование α -аминогрупп аминокислот, а молекула нингидрина при этом восстанавливается:



α – Аминокислота Окисленный нингидрин Восстановленный нингидрин Альдегид

Восстановленный нингидрин реагирует с аммиаком и другой молекулой окисленного нингидрина, в результате образуется продукт конденсации, окрашенный в синий или фиолетовый цвет (т.н. пурпур Руэмана):



Трикетогидринден Восстановленный нингидрин Пурпур Руэмана

Ход работы.

1. Прodelьвают реакцию с какой-либо аминокислотой, например с глицином. Наливают в пробирку около 1 мл раствора глицина, добавляют 5-6 капель раствора нингидрина и нагревают. Появляется сине-фиолетовое окрашивание.

2. Такую же реакцию проводят с 1-2 мл раствора белка, взяв 0.3-0,5 мл раствора нингидрина. Появляется сине-фиолетовое (иногда розово-фиолетовое) окрашивание. С течением времени раствор синее.

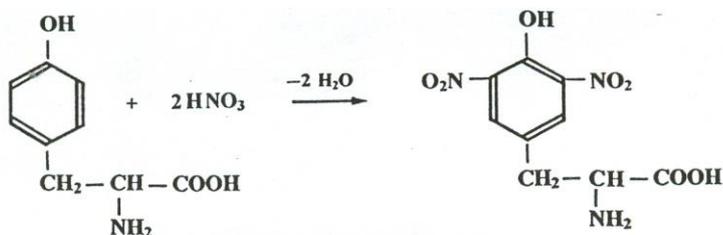
Результат:

Вывод

В. Ксантопротеиновая реакция (реакция Мульдера)

Принцип метода. Ксантопротеиновая реакция открывает в белках наличие циклических аминокислот – триптофана, фенилаланина, тирозина, содержащих в своем составе бензольное кольцо.

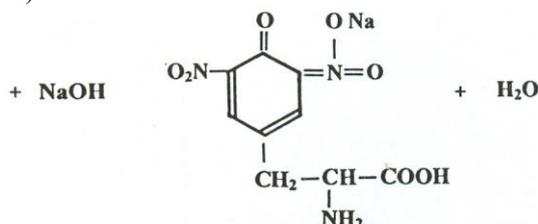
Большинство белков при нагревании с концентрированной азотной кислотой даёт жёлтое окрашивание, переходящее в оранжевое при подщелачивании. Реакция обусловлена нитрованием бензольного кольца с образованием динитропроизводных соединений жёлтого цвета. Отсюда её название (греч. xanthos жёлтый).



Тирозин

Динитротирозин
(желтого цвета)

Добавление гидроксида натрия приводит к образованию натриевой соли хиноидной структуры – динитротирозина (оранжевого цвета):



Натриевая соль
динитротирозина
(оранжевого цвета)

Ход работы. Наливают в пробирку около 1 мл раствора белка и прибавляют 5-6 капель концентрированной азотной кислоты. Появляется осадок денатурированного белка, который окрашивается при нагревании (осторожно!) в жёлтый цвет. Дают пробирке охладиться и осторожно прибавляют 10%-ный раствор гидроксида натрия, пока не начнётся переход жёлтой окраски в оранжевую.

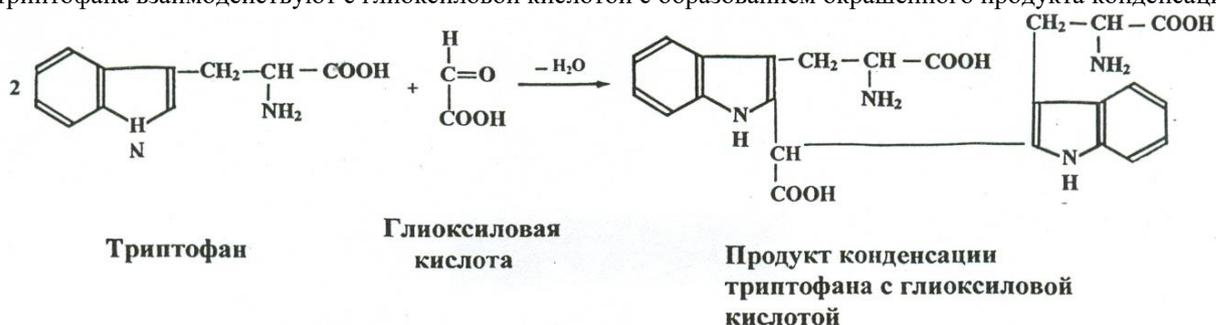
Результат:

Вывод:

Г. Реакция Адамкевича

Принцип метода. При прибавлении к белку небольшого количества глиоксиловой кислоты на границе с концентрированной серной кислотой появляется красно-фиолетовое окрашивание. Эта реакция обусловлена присутствием в молекуле белка **триптофана**.

Реакция основана на способности триптофана в кислой среде реагировать с глиоксиловой кислотой с образованием соединения, окрашенного в красно-фиолетовый цвет. При нагревании две молекулы триптофана взаимодействуют с глиоксиловой кислотой с образованием окрашенного продукта конденсации:



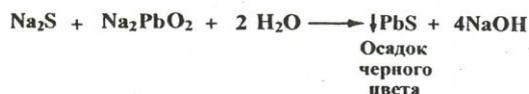
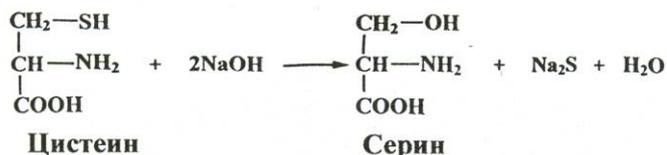
Ход работы. Наливают в пробирку несколько капель раствора белка, прибавляют 5 капель ледяной уксусной кислоты. Раствор сначала слегка нагреть, затем **охладить(!!!)** и **осторожно (!)** по стенке пробирки, чтобы жидкости не смешивались (подслаивание), прилить 10 капель концентрированной серной кислоты. При стоянии на границе двух слоев жидкости появляется красно-фиолетовое кольцо. Появление окраски можно ускорить, поместив пробирку в кипящую водяную баню.

Результат:

Вывод:

Д. Реакция Фоля

Принцип метода. Реакция Фоля указывает на присутствие в белке аминокислот, содержащих слабосвязанную серу – **цистеина**. Метионин, хотя и является содержащей серу аминокислотой, данной реакции не даёт, поскольку сера в нем связана прочно метильной группой. Реакция состоит в том, что при кипячении белка со щёлочью аминокислоты (цистеин и цистин) легко отщепляют серу в виде сероводорода, который с плумбитом натрия даёт чёрный или бурый осадок сульфида свинца:



Интенсивность окраски зависит от количества в белке цистеина и цистина, содержащих слабосвязанную серу, и от концентрации белка в растворе.

Ход работы. Наливают в пробирку около 1 мл раствора ацетата свинца и понемногу прибавляют 10%-ный раствор гидроксида натрия до растворения образовавшегося гидроксида свинца. Приливают несколько капель неразбавленного белка куриного яйца и смесь осторожно нагревают. Раствор начинает темнеть и выпадает осадок чёрного или бурого цвета.

Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Качественные реакции (или цветные реакции) используются в клинико-биохимических лабораториях, фармацевтической практике и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных средств, препаратов гидролизатов белков и аминокислот, а также для выявления расположения аминокислот, пептидов и белков на хроматограммах и электрофореграммах. Многие качественные реакции положены в основу методов количественного определения белков.

Работа 2. Реакции осаждения белков

Стабильность растворов белков определяется наличием у белковых молекул двух основных факторов устойчивости – заряда и гидратной оболочки. Одноимённый электрический заряд (в большинстве случаев отрицательный) обуславливает взаимное отталкивание белковых молекул. Водная (гидратная оболочка) также не даёт белковым частицам объединяться (агрегировать), способствуя удержанию их во взвешенном состоянии и предотвращая выпадение их в осадок (седиментацию).

В ходе научных исследований, а также при различных клинических анализах часто приходится освобождать биологические жидкости или различные экстракты (например, из мозга, печени, мышц ит.п.) от белков. Для этого применяют разные способы осаждения. Для осаждения белка необходимо устранить факторы его устойчивости в растворе – разрушить защитную водную оболочку и снять (или свести к минимуму) заряд белковой молекулы. Полное и быстрое осаждение белков происходит при достижении изоэлектрической точки.

Реакции осаждения белков весьма разнообразны, однако их можно разделить на две основные группы: реакции обратимого осаждения (*высаливания*) и реакции необратимого осаждения (*денатурации*).

А. Высаливание белков сульфатом аммония

Принцип метода. Высаливание – процесс осаждения белков солями щелочных и щелочно-земельных металлов, который является обратимым и сохраняет нативные свойства белков. Высаливание можно проводить не только солями активных металлов (Na_2SO_4 , NaCl , KCl , MgSO_4 , MgCl_2 и др.), но и солями аммония, например $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Все вещества этого типа нейтрализуют заряд белковых частиц и вызывают их дегидратацию, что ведёт к осаждению белка. Механизм этого процесса может быть представлен следующим образом. Ионы соли притягивают поляризованные молекулы воды, уменьшая тем самым количество воды, взаимодействующей с белком, поскольку при высоких концентрациях солей количество ионов соли огромно по сравнению с числом заряженных групп белков. Перемещение молекул воды к ионам соли сопровождается одновременным разрушением защитных гидратных оболочек вокруг молекул белков и ведет к снижению их растворимости. Белки осаждаются также из водных растворов неполярными растворителями, смешивающимися с водой. С этой целью обычно используют в качестве водоотнимающих средств этанол, метанол и ацетон. Фактически это – то же высаливание. Высаливание широко используют для фракционирования и очистки белков, поскольку многие белки различаются по размеру гидратной оболочки и величине электрического заряда. Для каждого из них имеется своя зона высаливания, т.е. концентрация соли, позволяющая дегидратировать данный белок и осадить его.

Ход работы. К 1 мл сыворотки крови добавляют 1 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают (получается полунасыщенный раствор сульфата аммония). Выпадает осадок глобулинов. Через 5 мин осадок отфильтровывают. В фильтрате остается другая фракция – альбумины. К фильтрату добавляют тонко измельченный порошок сульфата аммония до полного насыщения, т.е. пока новая порция порошка остается нерастворенной. В осадок выпадают альбумины. Их отфильтровывают. Проверяют фильтрат на отсутствие белка с помощью биуретовой реакции.

Результат:

Вывод:

Б. Денатурация белков

Денатурацией (лат. de – избавление от чего-либо + natura – природа, природные свойства) называется разрушение природной (нативной) конформации макромолекулы белка под влиянием различных внешних воздействий. В процессе денатурации белка свойственная ему трёхмерная организация нарушается. При этом полипептидная цепь развёртывается и принимает беспорядочную, нерегулярную и подверженную изменениям пространственную конформацию. Одновременно белок теряет гидратную оболочку и выпадает в осадок. Денатурация обычно сопровождается потерей биологической активности – ферментативной, гормональной и др.; может быть полной и частичной, обратимой (*ренатурацией*) и необратимой. Денатурация не нарушает прочных ковалентных связей. Но благодаря развёртыванию полипептидной цепи делает доступными для растворителей и химических реагентов радикалы, находившиеся ранее внутри молекулы. В частности, денатурация облегчает действие протеолитических ферментов, открывая им доступ ко всем частям молекулы белка.

Денатурирующие факторы делятся на химические, физические и биологические. Наиболее обширны группы химических факторов (концентрированные минеральные и органические кислоты, соли тяжёлых металлов, алкалоиды, поверхностно-активные вещества и т. д.) и физических факторов (высокая температура, различные виды ионизирующего излучения – УФ-, γ -, рентгеновские лучи, потоки α - и β -

частиц, ускоренных электронов, протонов, продукты деления тяжёлых ядер ит.д., лазерные излучения, действие СВЧ – полей, ультразвук, вибрация, шум и т.д.). Биологическую денатурацию осуществляют протеолитические ферменты, которые разрушают высшие уровни организации молекулы белка перед тем, как гидролизовать пептидные связи.

1) Осаждение белков при нагревании

Принцип метода. Присутствие белков обнаруживается кипячением, так как почти все белки денатурируют при нагревании в нейтральной или слабокислой среде. Наиболее полное и быстрое осаждение белка происходит в среде, pH которой соответствует изоэлектрической точке этого белка. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой реакции (pH – около 5,0). В сильнокислых и сильнощелочных средах растворы белков при кипячении не коагулируют и могут дать осадок лишь при добавлении какой-нибудь нейтральной соли (NaCl). В этих случаях устойчивость белка в растворе зависит от приобретения положительного заряда в сильнокислой среде и отрицательного заряда в щелочной среде.

Ход работы. В 5 пробирок налить по 0.5 мл раствора белка. В 3-ю пробирку добавить 10 капель 1%-ного раствора уксусной кислоты для создания кислой среды.

В 4-ю пробирку добавить 10 капель 1%-ного раствора уксусной кислоты и 5 капель насыщенного раствора хлорида натрия.

В 5-ю пробирку добавить 5 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия.

Все пробирки прокипятить. После кипячения во 2-ю пробирку добавить 1-2 капли 1%-ного раствора уксусной кислоты.

Оформление работы. Записать в таблицу результаты осаждения белка при нагревании. Отметить появление осадка плюсом, а отсутствие – минусом и указать в каждом случае причины появления или отсутствия осадка белка.

| Реакция среды | Нейтральная | Слабокислая | Сильнокислая | Сильнокислая с электролитом | Щелочная |
|---------------|-------------|-------------|--------------|-----------------------------|----------|
| Результат | | | | | |
| Вывод | | | | | |

2) Осаждение белков концентрированной азотной кислотой (проба Геллера)

Принцип метода. Выпадение белка в осадок при действии некоторых минеральных кислот связано с дегидратацией белковых частиц и образованием комплексных солей белка с кислотами.

В избытке всех минеральных кислот за исключением азотной, выпавший осадок белка растворяется. Реакция осаждения белков азотной кислотой поэтому используется в качестве пробы на присутствие белка при клинических исследованиях мочи (проба Геллера). Эта проба («кольцевая проба») считается положительной, если на границе соприкосновения двух жидкостей – концентрированной азотной кислоты и анализируемого образца появляется белое кольцо денатурированного белка. Проба дает положительный результат при содержании белка в анализируемом образце выше 0,0033%. Ниже этой концентрации проба отрицательна. Йоган Флориан Геллер (1813-1871) – австрийский врач, впервые использовавший химические методы при анализе мочи у больных людей, по праву считается основоположником клинической химии.

Ход работы. К 1мл концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки, наклонив ее под углом 45° так, чтобы обе жидкости не смешивались, наложить равный объем раствора белка.

На границе двух жидкостей образуется осадок в виде белого кольца.

Результат:

Вывод:

3) Осаждение белков органическими кислотами

Органические кислоты также вызывают необратимое осаждение белков. Практическое применение получили трихлоруксусная CCl_3COOH и сульфосалициловая $C_6H_3(OH)(COOH)SO_3H$ кислоты. Сульфосалициловой кислотой пользуются в клинике при обнаружении малых количеств белка в моче, экссудатах и других биологических жидкостях, так как проба с этой кислотой является самой чувствительной (0,0015%) из всех «осадочных» реакций на белки. Трихлоруксусной кислотой пользуются для удаления белков из растворов перед определением в биологическом материале низкомолекулярных соединений. Эту кислоту можно также использовать для денатурации ферментов в целях прекращения ферментативной реакции.

Ход работы. В две пробирки наливают по 1-2 мл раствора яичного белка и добавляют в одну пробирку равный объем 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты, а в другую – столько же 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Отметить выпадение белого осадка.

Результат:

Вывод:

4) Осаждение белков солями тяжёлых металлов

Принцип метода. Соли тяжёлых металлов (свинца, меди серебра, ртути и др.) вызывают необратимое осаждение белков, т.е. денатурацию, при небольших концентрациях этих солей. При этом происходит

связывание ионов тяжелых металлов с функциональными группами боковых радикалов аминокислот в молекуле белка, в результате чего разрушается ее пространственная структура и происходит осаждение денатурированного белка. При добавлении избытка солей тяжелых металлов (кроме AgNO_3 и HgCl_2) происходит растворение первоначально образующегося осадка из-за адсорбции иона металла и приобретения вследствие этого белковой молекулой положительного заряда.

Способность белка прочно связывать ионы тяжелого металла в виде нерастворимых в воде осадков используется при отравлении солями меди, ртути, свинца и др., пока они не успели всосаться. В качестве противоудия применяют белки яиц, молока и молочных продуктов.

Значительное количество антисептиков представлено солями тяжелых металлов. Их антимикробное действие связано с тем, что уже в довольно низких концентрациях они взаимодействуют с белками микроорганизмов, блокируют их SH-группы и изменяют их конформацию. Из-за высокой токсичности большинство лекарств содержащих соли тяжелых металлов, применяются в качестве поверхностных антисептиков. Так высокой антимикробной активностью обладает сулема (HgCl_2), применяемая для обработки рук и дезинфекции помещений, препараты серебра, такие как ляпис (AgNO_3), колларгол (серебро коллоидальное), применяемые для обработки слизистых оболочек при инфекционных заболеваниях.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 1-2 мл раствора яичного белка. Прибавляют по каплям в 1-ю пробирку раствор ацетата свинца, а во 2-ю – раствор сульфата меди. В обеих пробирках наблюдается образование осадков белка.

В каждую из пробирок прибавляют по несколько капель (избыток) соответствующего осадителя и наблюдают за растворением осадка.

Результат:

Вывод:

Тема 2. Ферменты

I. Зависимость скорости ферментативных реакций от температуры.

Влияние pH на активность ферментов. Специфичность действия ферментов.

Оснащение.

Реактивы: крахмал, 1%-ный раствор, свежеприготовленный; раствор йода в иодиде калия, фосфатно-цитратный буфер, 0,1 М с pH 5,6; 6,4; 6,8; 7,2 и 8,0; сахароза, 2% раствор; реактив Феллинга.

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня; лабораторный термометр; глазные пипетки; пипетки вместимостью 1 и 5 мл; бюретка вместимостью 25 мл; химические стаканы (для льда или снега).

Материал. Разбавленная слюна. Для её получения промывают рот водой от остатков пищи. Набирают в рот порцию дистиллированной воды около 20 мл и держат ее примерно 2 мин, смешивая языком со слюной. Жидкость со слюной выпускают в стаканчик и профильтровывают через вату в пробирку. Фильтрат используют для работы.

Экстракт дрожжей, содержащий сахаразу. 0,5г дрожжей тщательно растирают в фарфоровой ступке для разрушения дрожжевых клеток. Затем добавляют 3 мл воды и растирают дрожжи с водой; при этом сахараза переходит в раствор.

Работа 1. Зависимость скорости реакции от температуры.

Принцип метода. Метод основан на определении скорости гидролиза α -амилазой слюны крахмала в зависимости от температуры.

Ход работы. В пробирку помещают 5 капель слюны, доводят до кипения и остужают. В две другие помещают по 5 капель некипяченой слюны.

Вносят во все пробы по 10 капель раствора 1% раствора крахмала и ставят первую и вторую пробирки в водяную баню при 38°C на 10 минут, а третью – в воду со льдом или снегом на 10 мин. Затем прибавляют в каждую пробирку по 1 капле раствора йода в иодиде калия и сравнивают развивающуюся окраску.

Оформление работы. Данные оформляют в виде таблицы, делают вывод о зависимости ферментативной реакции от температуры и причинах этой зависимости.

| Фермент | Субстрат | Окрашивание с йодом | Температура |
|---------|----------|---------------------|-------------|
| | | | |
| | | | |

Вывод:

Работа 2. Зависимость скорости ферментативной реакции от pH среды.

Принцип метода. Метод основан на сравнении скорости гидролиза крахмала, определяемого пробой с йодом, под действием α -амилазы слюны при разных значениях pH среды. В результате устанавливается оптимум pH действия α -амилазы.

Ход работы. В пять пробирок отмеривают по 10 капель растворов фосфатно-цитратного буфера со следующими значениями pH: 5,6; 6,4; 6,8; 7,2; 8,0. Прибавляют во все пробы по 5 капель разведенной в 10

раз слюны и по 10 капель раствора крахмала и ставят пробирки в водяную баню при 38°C. Через 10 мин пробирки вынимают и приливают по 1 капле раствора йода в иодиде калия. Сравнивают развивающуюся окраску.

Оформление работы. Данные оформить в виде таблицы. Сделать вывод об оптимуме pH действия α-амилазы слюны.

| Фермент | Субстрат | Окрашивание с йодом | pH среды |
|---------|----------|---------------------|----------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

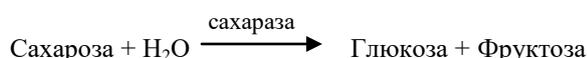
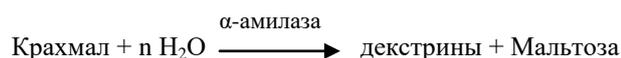
Вывод:

Практическое значение работ 1 и 2. Кинетические свойства ферментов изучаются для подбора оптимальных условий (концентрация субстрата, оптимум pH среды и температуры, ионный состав среды), определения активности ферментов в научных и клинических исследованиях, а также при стандартизации ферментных препаратов. Неверно подобранные стандартные условия определения активности конкретного фермента приводят к ошибкам в диагностике заболеваний и контроле качества ферментных препаратов.

Работа 3. Специфичность действия амилазы и сахаразы.

Принцип метода. Метод основан на сравнительном изучении гидролиза α-амилазой и сахаразой разных субстратов, содержащих гликозидные связи: крахмала и сахарозы. Гидролиз крахмала и сахарозы оценивают пробой Феллинга на восстанавливающие сахара (мальтоза, глюкоза).

Ферменты катализируют реакции по схеме:



Ход работы. В одну пробирку вносят 10 капель раствора крахмала, в другую – такой же объём раствора сахарозы. Для выявления специфичности α-амилазы в обе пробы добавляют по 5 капель разбавленной слюны, перемешивают встряхиванием и ставят в водяную баню при 38°C на 10 мин. Затем с жидкостью в обеих пробирках проделывают пробу с реактивом Феллинга (к 3 мл из каждой пробирки добавляют по 1 мл реактива Феллинга и нагревают верхний слой смеси до кипения). Отмечают появление в одной из проб красного осадка оксида меди (I).

Для выявления специфичности сахаразы в одну пробирку наливают 10 капель раствора крахмала, а в другую – сахарозы и прибавляют к ним по 5 капель экстракта сахаразы дрожжей. Пробы перемешивают встряхиванием и помещают в водяную баню при 38°C на 10 мин, после чего с жидкостью обеих пробирок проделывают пробу с реактивом Феллинга. Отмечают появление в одной из проб красного осадка оксида меди (I).

Оформление работы. Данные занести в таблицу, сделать вывод о специфичности изученных ферментов и обозначить, к какому типу специфичности они относятся.

| Фермент | Субстрат | Проба с реактивом Феллинга | Специфичность действия |
|---------|----------|----------------------------|------------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Вывод:

Практическое значение работы. Ферменты с абсолютной и относительной групповой субстратной специфичностью, обладающие меньшей избирательностью действия на субстраты, участвуют, как правило, в гидролизе питательных веществ или превращении чужеродных соединений. В частности, α-амилаза и сахараза проявляют специфичность не к структуре субстрата в целом, а к типу связей, находящихся в соответствующих углеводах.

II. Регуляция активности ферментов

Оснащение занятия

Реактивы:

крахмал, 0,5%-ный раствор свежеприготовленный;
раствор йода в иодиде калия;
хлорид натрия, 1%-ный раствор;
сульфат меди(II), 1%-ный раствор;
фенилтиомочевина, 0,02%-ный раствор;
малоновая кислота, 1%-ный раствор;
сукцинат натрия, 1%-ный раствор;
вазелиновое масло.

Оборудование: штатив с пробирками; колбы, емкостью 50-100 мл водяная баня; лабораторный термометр; пипетка Мора; пипетки вместимостью 1мл, 5мл; микропипетка вместимостью 0,02 мл; глазные пипетки; часы.

Материал. Разбавленная слюна. Для её получения промывают рот водой от остатков пищи. Набирают в рот порцию дистиллированной воды около 20 мл и держат ее примерно 2 мин, смешивая языком со слюной. Жидкость со слюной выпускают в стаканчик и профильтровывают через вату в пробирку. Фильтрат разводят водой в 10 раз.

Мышечная каша, полученная после забоя животного.

Работа 1. Активаторы и ингибиторы α -амилазы слюны

Принцип метода. Метод основан на сравнении скорости гидролиза крахмала (продукт гидролиза крахмала обнаруживают пробой с йодом) под действием α -амилазы слюны до и после добавления фенилтиомочевины, ионов Cl^- и Cu^{2+} .

Ход определения. Берут 4 пробирки и наливают по 10 капель: в первую – дистиллированной воды, во вторую – раствора хлорида натрия, в третью – раствора сульфата меди, в четвертую – раствора фенилтиомочевины, а затем по 20 капель раствора крахмала и по 1 капле разведённой слюны. Содержимое перемешивают встряхиванием, помещают пробирки в водяную баню при 38°C на 10 минут.

Пробирки вынимают и добавляют 1 каплю раствора йода в иодиде калия. Сравнивают окраску растворов, развивающейся при проведении реакции с йодом.

Оформление работы. Результаты занести в таблицу, сделать вывод о действии изученных веществ и предполагаемом типе ингибиторов.

| Фермент | Модификатор активности | Субстрат | Окрашивание с йодом |
|---------|------------------------|----------|---------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Вывод:

Работа 2. Действие конкурентного ингибитора на сукцинатдегидрогеназу мышечной ткани

Принцип метода. Метод основан на сравнительном определении активности сукцинатдегидрогеназы по обесцвечиванию в ходе реакции метиленовой сини (МС) как акцептора водорода в присутствии и в отсутствие малоновой кислоты

Образующийся $\text{ФАД}\cdot\text{H}_2$ восстанавливает метиленовую синь ($\text{MC}\cdot\text{H}_2$), в результате чего происходит обесцвечивание раствора. Сравнивая визуально уменьшение интенсивности синего окрашивания с пробами, содержащими разные количества малоновой кислоты ($\text{HOOC}\text{-CH}_2\text{-COOH}$), делают вывод о типе действия её на фермент.

Ход определения. В 3 пробирки помещают по 3-4 грамма мышечной кашицы и добавляют в первую пробирку 0,8 мл воды, во вторую – 0,2 мл раствора малоновой кислоты и 0,6 мл воды, а в третью – 0,8 мл раствора малоновой кислоты.

Во все пробирки приливают по 1 мл раствора сукцината натрия, по 1 капле раствора метиленового синего и после перемешивания по 3-4 капли вазелинового масла. Пробирки ставят в водяную баню при 37°C . Через 3-5 мин наблюдают обесцвечивание раствора.

Оформление работы. Сравнить интенсивность голубого окрашивания в трёх пробирках и сделать вывод о механизме действия малоновой кислоты на активность сукцинатдегидрогеназы.

Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Конкурентные ингибиторы различных ферментов широко применяются в биохимических исследованиях и в практической медицине как лекарственные препараты. В частности, малоновая кислота как конкурентный ингибитор сукцинатдегидрогеназы используется в экспериментах на животных для того, чтобы изучить изменения в обмене веществ в тканях при блокаде этого фермента, а также для исследования самого механизма конкурентного торможения.

III. Количественное определение активности амилазы слюны по Вольгемуту

Амилаза (α -амилаза, КФ 3.2.1.1, диастаза) – фермент, осуществляющий гидролитическое расщепление полисахаридов до декстринов и мальтозы. Конечные продукты действия амилазы не дают цветной реакции с йодом. Наиболее богаты амилазой слюнные и поджелудочная железы. Амилаза содержится также и в крови, куда попадает, главным образом, из поджелудочной железы. α -амилаза помимо выполнения пищеварительной функции может связываться с плазматической мембраной ряда бактерий и вовлекаться в антисептические процессы.

Принцип метода. Метод основан на том, что слюну разводят в определенной последовательности, после чего приливают одно и то же количество раствора крахмала и находят наименьшее содержание фермента, которое полностью расщепляет все количество добавленного крахмала. Затем производят перерасчет активности фермента на 1 мл слюны. Амилазная активность слюны выражается количеством 0,1%-ного раствора крахмала в миллилитрах, которое может расщепляться 1 мл слюны при температуре 37°С в течение 30 минут.

В норме амилазная активность слюны составляет 320-640 ед.

Ход работы. В 10 пронумерованных пробирок наливают из бюретки по 1 мл воды. В 1-ю пробирку добавляют 1мл слюны, разведенной в 10 раз. Содержимое пробирки перемешивают и 1мл раствора переносят из первой пробирки во вторую, перемешивают и из второй – таким же образом в 3-ю и т.д. до 10-й пробирки. Из десятой пробирки 1 мл смеси выливают. Таким образом, получается ряд разведенной слюны, в котором в каждой последующей пробирке содержится фермента вдвое меньше, чем в предыдущей пробирке.

Во все пробирки добавляют по 1мл воды и по 2 мл 0,1%-ного раствора крахмала, перемешивают и помещают пробирки в водяную баню на 30 минут при температуре 37°С.

Через 30 минут пробирки вынимают, охлаждают, добавляют по 1-2 капли 1%-ного раствора йода и перемешивают. Жидкость в пробирках может окрашиваться в желтый, красный и фиолетовый цвет. Раствор желтого цвета свидетельствует о расщеплении крахмала, фиолетовый – что крахмал в растворе еще сохранился.

Оформление работы. Работу необходимо оформить в виде таблицы.

| №№ пробирок | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Разведение слюны | | | | | | | | | | |
| Количество мл.0,1%-ного раствора крахмала | | | | | | | | | | |
| Окрашивание йодом | | | | | | | | | | |
| Амилазная активность слюны | | | | | | | | | | |

Расчет: Для расчета берется количество слюны в последней пробирке желтой окраской. Если это 4-я пробирка, то разведение в ней слюны в 160 раз. Составляется пропорция:

1/160 мл слюны расщепляет 2 мл 0, 1%-ного раствора крахмала

1 мл слюны расщепляет X мл 0,1%-ного раствора крахмала

$X=2 \times 160=320$ мл 0,1%-ного раствора крахмала.

Следовательно, амилазная активность слюны равна 320 условным единицам

Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Изучение химической структуры α -амилазы слюны показало ее схожесть со структурой панкреатической α -амилазы. Известно также, что при панкреатитах активность амилазы слюны иногда повышается в 20-30 раз. Очевидно, нарушение внешнесекреторной функции поджелудочной железы сопровождается гиперплазией околоушных слюнных желез, которые компенсаторно увеличивают продукцию амилазы слюны, и определение активности амилазы в слюне больных панкреатитом может быть объективным тестом, характеризующим интенсивность патологического процесса. Выявление амилазы, благодаря ее высокой активности в слюне, позволяет идентифицировать слюну в судебно-медицинской практике на одежде и предметах по гидролизу крахмала.

Тема 3. Витамины

I. Водорастворимые витамины

Работа 1. Обнаружение тиамина (витамина В₁)

Принцип метода. Метод основан на способности тиамина образовывать с диазофенилсульфоновой кислотой комплекс оранжево-красного цвета в щелочной среде.

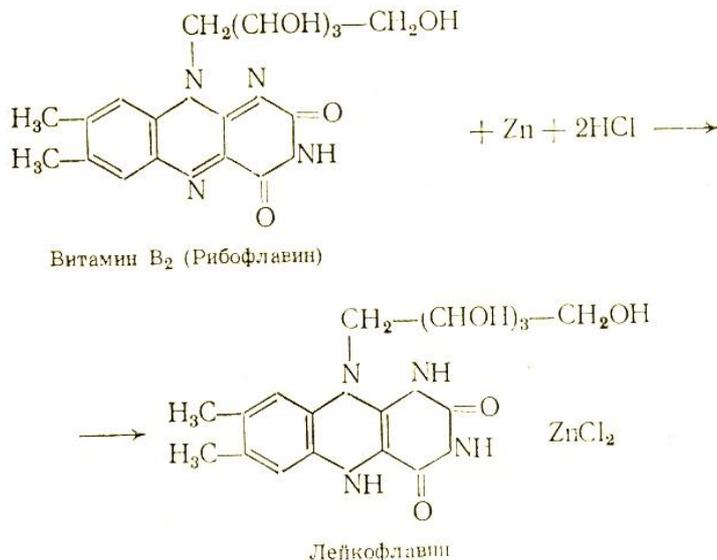
Ход работы. В пробирку вносят 5 капель раствора сульфаниловой кислоты и прибавляют 5 капель раствора нитрита натрия. К полученному диазореактиву добавляют на кончике скальпеля порошок тиамин и 5 капель раствора карбоната натрия. Встряхивают. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Результат:

Вывод:

Работа 2. **Качественная реакция на рибофлавин (витамин В₂)**

Принцип метода. Метод основан на способности изоаллоксазинового кольца рибофлавина восстанавливаться. Окрашенный в желтый цвет рибофлавин при восстановлении приобретает розовый цвет, а затем обесцвечивается, так как восстановленная форма рибофлавина бесцветна. Основной механизм реакции может быть представлен следующим уравнением:



Ход работы. 10 капель взвеси рибофлавина в воде (0,025%) наливают в пробирку, добавляя туда же 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином и раствор изменяет окраску из желтой в красную и розовую, а затем обесцвечивается.

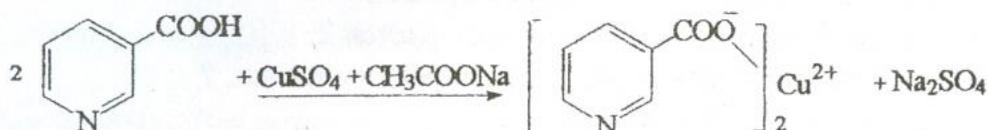
Результат:

Вывод:

Работа 3. **Качественные реакции на никотиновую кислоту (витамин РР, В₅).**

а) реакция образования никотината меди (II)

Метод основан на том, что никотиновая кислота при нагревании с раствором ацетата меди (II) образует синий осадок плохо растворимой медной соли:

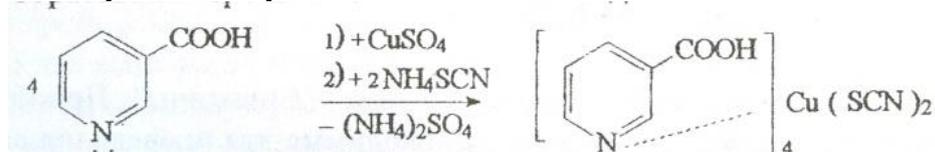


Ход работы. 0,02 г никотиновой кислоты растворяют в 2 – 3 мл горячей воды, добавляют 0,5 мл 10%-ного раствора ацетата натрия (CH₃COONa) и 0,5 мл 10%-ного раствора сульфата меди(II). При постепенном охлаждении раствора выпадает осадок сине-голубого цвета.

Результат:

Вывод:

б) реакция образования тройного комплексного соединения



Ход работы. 0,02 г никотиновой кислоты растворяют в 0,5 - 1 мл воды, прибавляют 2-3 капли 10%-ного раствора сульфата меди (II), перемешивают и наблюдают окраску. Затем добавляют 2-3 капли 5%-ного раствора роданида аммония (тиоцианата – NH₄CNS), при этом образуется ярко-зелёная окраска раствора.

Результат:

Вывод:

Работа 4. **Феррихлоридная проба на витамин пиридоксин (витамин В₆).**

Метод основан на способности витамина В₆ приобретать красную окраску в присутствии хлорида железа (III); реакция обусловлена образованием комплексной соли типа фенолята железа (III) красного цвета.

Ход определения. К 5 каплям 1%-ного раствора витамина В₆ прибавляют 5 капель 1%-ного раствора хлорида железа (III) и встряхивают пробирку. Развивается красное окрашивание.

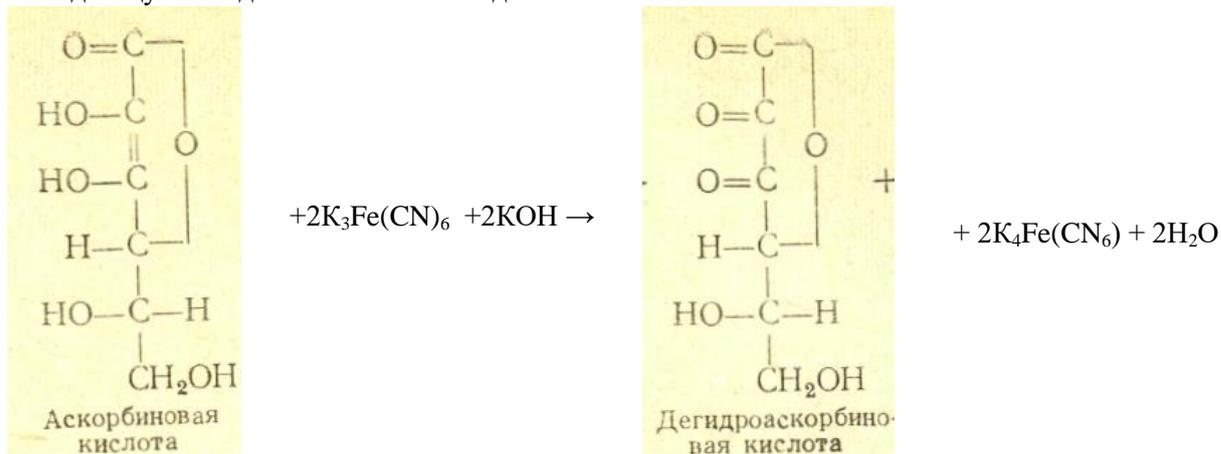
Результат:

Вывод:

Работа 5. **Качественные реакции на витамин С.**

а) Восстановление феррицианида калия витамином С.

Метод основан на способности аскорбиновой кислоты легко окисляться и восстанавливать железосинеродистый калий $K_3Fe(CN)_6$ в железистосинеродистый калий $K_4Fe(CN)_6$, который образует с хлоридом железа (III) плохо растворимую в воде соль – берлинскую лазурь, выпадающую в виде темно-синего осадка.



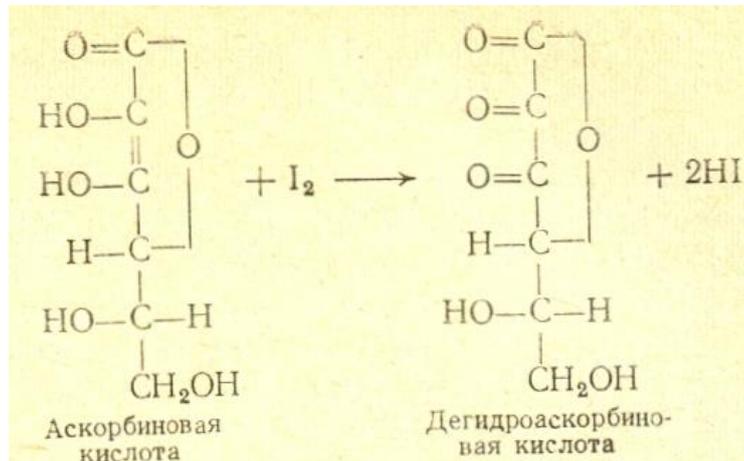
Ход определения. К 5 каплям 1%-ного раствора витамина С прилить 1 каплю 10%-ного раствора едкого натра и 1 каплю 5%-ного раствора железосинеродистого калия, перемешать и добавить 3 капли 10%-ного раствора соляной кислоты и 1 каплю 1%-ного раствора хлорида железа (III). Выпадает синий осадок берлинской лазури.

Результат;

Вывод:

б) Йодная проба на витамин С.

Метод основан на способности витамина С восстанавливать молекулярный йод до йодистоводородной кислоты:



Ход работы. К 5 каплям 1%-ного раствора витамина С добавить 1-2 капли раствора йода в растворе йодида калия. Раствор йода обесцвечивается.

Результат:

Вывод:

в) восстановление 2,6-дихлорфенолаиндофенола витамином С

Аскорбиновая кислота восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, а при восстановлении – обесцвечивается.

Ход работы. В 2 пробирки налить по 10 капель исследуемого раствора. В одну пробирку добавить несколько капель пероксида водорода, прокипятить (витамин С разрушается). Добавить в обе пробирки по 1-2 капли 2% раствора соляной кислоты и раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола.

В присутствии витамина С раствор индикатора обесцвечивается. При разрушении витамина С обесцвечивания не происходит, появляется розовое окрашивание.

Результат:

Вывод:

Работа 6. **Реакция на витамин Р (рутин).**

Метод основан на взаимодействии рутина с хлоридом железа (III) с образованием комплексного соединения зеленого цвета.

Ход работы. В пробирку налить около 10 капель насыщенного раствора рутина и добавить 3 капли 3%-ного раствора хлорида железа (III). Отметить появление зеленого окрашивания.

Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Качественные реакции на витамины позволяют обнаружить их наличие в лекарственных препаратах и после экстракции в пищевых продуктах и лекарственных растениях. Принцип, положенный в основу качественных реакций на витамины, используется при разработке количественного определения их в различных природных объектах и лекарствах.

II. Жирорастворимые витамины

Работа 1. **Качественные реакции на ретинол (витамин А)**

а) реакция с серной кислотой.

Метод основан на способности концентрированной серной кислоты отнимать воду у ретинола с образованием окрашенных продуктов.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1-2 капли рыбьего жира, 15 капель хлороформа. Перемешивают и добавляют 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Отмечают появление фиолетово-красного окрашивания, переходящего в бурое.

Результат:

Вывод:

б) реакция с хлоридом железа (III).

Витамин А взаимодействует с хлоридом железа (III) с образованием окрашенных продуктов.

Ход работы. В сухую пробирку налить 1-2 капли рыбьего жира, 10-15 капель хлороформа. Перемешать и добавить 5 капель 1%-ного раствора хлорида железа(III). Отметить появление ярко-зеленого окрашивания.

Результат:

Вывод:

Работа 2. **Качественные реакции на витамин D.**

а) анилиновая проба на витамин D.

Метод основан на взаимодействии кальциферола с гидрохлоридом анилина с образованием окрашенных продуктов.

Ход работы. В сухую пробирку налить 5 капель рыбьего жира, 15 капель хлороформа и 5 капель анилинового реактива (15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты). Осторожно нагреть на спиртовке и отметить появление красного окрашивания.

Результат:

Вывод:

б) реакция с серной кислотой.

Метод основан на взаимодействии кальциферола с серной кислотой с образованием окрашенных продуктов.

Ход работы. В пробирку поместить 1 каплю масляного раствора витамина D, 4 капли хлороформа, перемешать и добавить 2 капли концентрированной серной кислоты. Встряхнуть и отметить появление ярко-желтого окрашивания, переходящего в буро-красное.

Результат:

Вывод:

Работа 3. **Качественная реакция на токоферол (витамин E).**

а) реакция с азотной кислотой

Метод основан на образовании соединений хиноидной структуры, окрашивающихся в красный цвет, при действии сильных окислителей (концентрированной азотной кислоты) на токоферол.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора токоферола и добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты. Встряхивают. Наблюдают за развитием красного окрашивания.

Результат:

Вывод:

б) реакция с хлорным железом

Витамин Е при взаимодействии с хлоридом железа (III) образует окрашенные продукты.

Ход работы. К 5-10 каплям раствора витамина Е прибавить 5 капель раствора хлорного железа (FeCl_3). Наблюдают за развитием красного окрашивания.

Результат:

Вывод:

Работа 4. Качественная реакция на нафтохинон (витамин К).

Метод основан на взаимодействии диэтилдитиокарбамата с витамином К в щелочной среде с образованием комплекса голубого цвета.

Ход работы. В пробирку вносят 4 капли спиртового раствора витамина К, добавляют 8 капель раствора диэтилдитиокарбамата натрия и 4 капли раствора гидроксида натрия. Встряхивают и наблюдают за развитием окраски.

Результат:

Вывод:

Работа 5. Качественные реакции на метинон и викасол (искусственно синтезированные аналоги витамина K_1).

а) реакция на метинон.

Метод основан на взаимодействии метинона с анилином с образованием окрашенного соединения 2-метил-3-фениламино-1,4-нафтохинона: стр 121 зелен практикум.

Ход работы. В пробирке смешивают 5 капель 0,25%-ного спиртового раствора метинона с 2 каплями анилина. Смесь окрашивается в красный цвет.

Результат:

Вывод:

б) реакция на викасол.

Метод основан на способности выкрасила взаимодействовать в щелочной среде с цистеином с образованием окрашенных соединений.

Ход работы. В пробирке смешивают по 5 капель 0,05%-ного раствора викасола и 0,025%-ного раствора цистеина и добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия. Смесь окрашивается в желто-оранжевый цвет.

Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Качественные реакции на витамины проводятся с целью их обнаружения в продуктах питания, лекарственных растениях и других биологических жидкостях. Они имеют важное значение для анализа витаминных лекарственных препаратов после истечения срока их хранения и подтверждения доброкачественности. Принцип, положенный в основу качественных реакций на витамины, используется при разработке количественного определения их в различных природных объектах и лекарствах.

Тема 4. Углеводы и липиды: строение, свойства, функции

Работа 1. Эмульгирование жира

Принцип метода: образование эмульсии обусловлено поверхностно-активными свойствами эмульгаторов, препятствующих слиянию частиц.

Оборудование: дозаторы, пробирки, пипетки, штативы для пробирок и пипеток.

Объект исследования и реагенты: масло растительное, желчь, белок (1% раствор); бикарбонат натрия (1% раствор), гидроксид натрия (1% раствор), раствор мыла, дистиллированная вода.

Ход работы:

1. Налить в 6 пробирок по 2-3 мл воды и по 2-3 капли растительного жира.
2. Добавить в первую пробирку несколько капель раствора белка, во вторую – раствора соды, в третью – раствора щелочи, в четвертую – раствора мыла, в пятую – желчи, шестая служит контролем.
3. Тщательно встряхнуть содержимое всех пробирок и оставить на 20 минут.
4. Оценить стойкость эмульсии во всех пробирках. Сделать вывод об эмульгирующих способностях всех использованных в опытах веществ.

Работа 2. Обнаружение желчных кислот

Принцип метода: за счет поверхностно активных свойств желчных кислот снижается поверхностное натяжение. Добавленный на поверхность жидкости порошок серного цвета быстро опускается на дно.

Оборудование: пробирки, пипетки, штативы для пробирок и пипеток.

Объект исследования и реагенты: желчь, дистиллированная вода, порошок серного цвета (или аналог, например, тальк).

Ход работы:

1. В первую пробирку налить 8-9 мл желчи, в другую – 0,5 мл желчи и 7-8 мл дистиллированной воды, в

третью – только 8-9 мл воды.

2. Нанести на поверхность жидкости всех пробирок небольшое количество порошка серного цвета (или талька).

В первой пробирке с неразведенной желчью порошок быстро опускается на дно, во второй – опускается медленнее, в пробирке с водой остается на поверхности.

3. Сделать выводы о свойствах желчи, необходимых для эмульгирования жиров в организме.

Тема 6. Введение в обмен веществ. Биоэнергетика. Биологическое окисление.

Обнаружение ферментов биологического окисления в некоторых биологических объектах.

Оснащение занятия:

Реактивы. 0,1%-ный раствор тирозина; пирогаллол 2%-ный раствор; перекись водорода 3%-ный раствор; перекись водорода 0,5%-ный раствор; 1%-ный раствор крахмала; 10%-ный раствор иодида калия

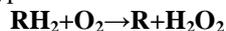
Оборудование. Ступка с пестиком; воронка для фильтрования; штатив с пробирками; пипетки на 1 мл; глазные пипетки; водяная баня; аптечные весы с разновесами; термостат.

Материал. Картофель, хрен, молоко, печень.

Работа 1. Обнаружение тирозиназы (оксидазы) в картофеле

Оксидазы относятся к дегидрогеназам. В отличие от дегидрогеназ они передают водород от субстрата непосредственно на кислород с образованием пероксида водорода.

Схематически реакция иллюстрируется уравнением:



Ход работы. Мелкоизмельченный картофель в количестве 0,5-1,0 г растирают в ступке с 3 мл дистиллированной воды и фильтруют. Фильтрат, содержащий фермент тирозиназу, наливают по 1 мл в две пробирки. Содержимое одной пробирки кипятят, а затем охлаждают (контроль). В обе пробирки наливают по 10 капель 0,1%-ного раствора тирозина, перемешивают и ставят в водяную баню при температуре 37-40°. Каждые 5 минут пробы вынимают и встряхивают. Жидкость в пробирке с активной вытяжкой постепенно принимает розовую, затем бурую и черную окраску. В контрольной пробе цвет не изменяется. Реакция обусловлена окислением тирозина кислородом воздуха. В процессе окисления тирозина образуется красный пигмент галахром и затем черный пигмент – меланин.

Результат:

Вывод:

Работа 2. Изучение свойств пероксидазы

Пероксидазами называются ферменты, которые катализируют окисление субстратов (преимущественно фенолов и ароматических аминов) с помощью перекиси водорода или органических перекисей. Они широко распространены в растительных и животных тканях. Механизм их действия сводится к следующему:



А) Обнаружение пероксидазы в вытяжке из хрена

Ход работы. В четыре пробирки наливают указанные в таблице количества реактивов (мл) и встряхнув пробирки, оставляют их в штативе при комнатной температуре.

Постепенно содержимое пробирки окрашивается и выпадает осадок красного цвета, в остальных пробирках цвет не изменяется.

| Реактивы | № пробирки | | | |
|----------------------------------|------------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Пирогаллол 2%-ный раствор | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Перекись водорода 3%-ный раствор | 0,5 | 0,5 | 0,5 | - |
| Вытяжка из хрена | 0,5 | - | - | 0,5 |
| Прокипяченная вытяжка | - | 0,5 | - | - |
| Вода | - | - | 0,5 | 0,5 |

В присутствии перекиси водорода под влиянием пероксидазы, содержащейся в вытяжке из хрена, происходит окисление пирогаллола с образованием пурпургаллина, имеющего красную окраску.

Результат:

Вывод:

Б) Обнаружение пероксидазы молока пробой с йодистым калием

Ход работы. В две пробирки наливают по 1-2 мл свежего молока. Во второй пробирке молоко нагревают до закипания и охлаждают. Затем в обе пробирки добавляют по 10 капель 1%-ного раствора крахмала, по 2 капли 10%-ного раствора йодистого калия и по 5 капель 0,5%-ного раствора перекиси водорода. После встряхивания в первой пробирке появляется синее окрашивание. Это объясняется тем, что

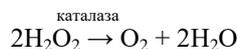
содержащаяся в молоке пероксидаза разлагает перекись водорода с выделением активного кислорода, который окисляет йодистый калий. В результате образуется свободный йод, окрашивающий крахмал в синий цвет.

Результат:

Вывод:

Работа 3. **Обнаружение каталазы в тканях печени**

Каталазой называется фермент, разлагающий перекись водорода. Она содержится в животных тканях, особенно много её в эритроцитах. Каталаза разлагает перекись водорода на молекулярный кислород и воду.



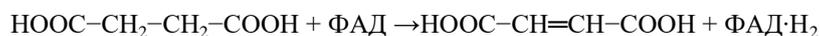
Ход работы. В пробирку помещают содержимое 0,3-0,5 г сырой печени, добавляют 10 мл воды и содержимое перемешивают. Затем быстро наливают раствор перекиси водорода до верха пробирки и быстро подносят к пробирке тлеющую лучинку. Разгорание лучинки указывает на выделение кислорода.

Результат:

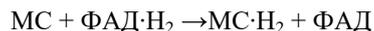
Вывод:

Работа 4. **Обнаружение сукцинатдегидрогеназы в тканях печени (мышц)**

Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1) очень распространена в тканях животных, растений и микроорганизмов, катализирует дегидрирование янтарной кислоты, при котором последняя превращается в фумаровую кислоту:



При добавлении в среду окисленной формы метиленовой синей восстановленная сукцинатдегидрогеназа передает водород на метиленовую синюю, образуя бесцветное лейкосоединение:



Ход работы. В две пробирки (опытную и контрольную) помещают 2мл гомогената печени или мышц. Содержимое контрольной пробирки кипятят и охлаждают.

В обе пробирки наливают по 1мл фосфатного буфера рН 6,8, по 2мл 0,01н. нейтрализованного раствора янтарной кислоты и по 2 капли 0,05% раствора метиленовой синей. В обе пробирки добавляют вазелиновое масло (для предотвращения взаимодействия с кислородом воздуха).

Пробирки помещают в термостат при 37°C. Опыт считают законченным, когда в опытной пробирке жидкость будет почти бесцветной. В контрольной пробирке жидкость не изменяет окраску, поскольку фермент денатурирует при нагревании.

Критерием активности сукцинатдегидрогеназы является время обесцвечивания метиленовой сини в присутствии янтарной кислоты в анаэробных условиях.

Результат:

Вывод:

Тема 7. Обмен углеводов.

Работа 1. Определение концентрации глюкозы в биологических жидкостях

Методы определения глюкозы в биологических жидкостях:

1 группа - энзиматические методы, основанные на двух реакциях: глюкозооксидазной и гексокиназной.

Являются наиболее специфичными и точными методами, позволяют определить только глюкозу;

2 группа - колориметрические методы, основанные на определении окрашенного продукта взаимодействия глюкозы с антроновым реактивом и ортотолуидином,

3 группа - методы «сухой химии». Для этого используются специальные тест - полоски, на которые нанесены реагенты, по изменению окраски которых судят о степени глюкозурии. Позволяют определить содержание глюкозы в моче в домашних условиях и входят в систему методов Home-diagnostic,

4 группа – определение гликозилированного гемоглобина. Глюкоза вступает в неферментативное взаимодействие с белками крови, в том числе и с гемоглобином. Степень гликозилирования гемоглобина отражает среднюю концентрацию глюкозы в период от 4 недель до 3 месяцев до выполнения исследования.

Определение концентрации глюкозы в крови глюкозооксидазным методом

Принцип метода



Концентрация окрашенного комплекса, определенная фотометрически при $\lambda = 500 \text{ нм}$, пропорциональна концентрации $\beta\text{-D-глюкозы}$ в исследуемом образце.

Оборудование: фотоэлектроколориметр, центрифуга, кюветы $l=1,0 \text{ см}$, водяная баня, термометр, химический стакан, пробирки, дозаторы, штативы для пробирок и пипеток.

Объект исследования и реагенты: цельная кровь, сыворотка или плазма крови, набор реагентов для

определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях энзиматическим колориметрическим методом.

Состав набора:

Буфер-субстрат: калиевые или аммониевые соли фосфорной кислоты (0,1 ммоль/л), 4-АПП (50 ммоль/л), 8-оксихинолин (0,75 ммоль/л) — 2 таблетки.

Ферменты: Глюкозооксидаза (2500 ед.), Пероксидаза (500 ед.) — 1 таблетка.

Калибратор: калибровочный раствор глюкозы, 10 ммоль/л в 0,15% бензойной кислоты — 1 флакон (5,0 мл).

Антикоагулянт: натрий хлористый (9 г/л), натрий оксалат (0,02 ммоль/л) — 2 таблетки.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Буфер-субстрат содержит токсичные компоненты. При работе с ним следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые. В случае попадания следует промыть пораженное место большим количеством проточной воды.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови или плазма крови, цельная кровь. Сыворотку и плазму крови получают обычным образом. Для определения глюкозы в цельной крови 2 таблетки антикоагулянта растворить в 100 мл дистиллированной воды. Полученный раствор хранить при температуре +2–8° С. В центрифужную пробирку внести 0,1 мл цельной крови, добавить 0,9 мл раствора антикоагулянта, тщательно перемешать и центрифугировать при 2000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (+18–25° С). Надосадочную жидкость использовать для анализа.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Приготовление рабочего реагента: 2 таблетки Буфер-субстрата поместить в мерную колбу вместимостью 200 мл, добавить 150 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать до полного растворения таблеток; таблетку «Ферменты» растворить в 5,0 мл дистиллированной воды, количественно перенести в колбу с раствором буферно-субстратной смеси, довести дистиллированной водой до метки и тщательно перемешать. Перенести рабочий реагент в посуду из темного стекла.

Полученный рабочий реагент можно хранить при температуре (+2–8° С) в посуде из темного стекла не более 5 дней при условии достаточной герметизации.

Ход работы:

1. В пробирки внести реактивы в соответствии с указанными объемами:

| Внести в пробирки | Опытная проба, мл | Калибровочная проба, мл | Холостая про-ба, мл |
|-----------------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| Рабочий реагент | 2,0 мл | 2,0 мл | 2,0 мл |
| Сыворотка или плазма | 0,025 мл | - | - |
| Калибратор | - | 0,025 мл | - |
| Дистиллированная вода | - | - | 0,025 мл |

2. Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 25 мин при комнатной температуре (+18–25° С) или в течение 15 мин при температуре +37° С.

3. После окончания инкубации измерить величину оптической плотности опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) про-бы в кюветах с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 500 (490–540) нм.

Окраска проб стабильна в течение 2 ч после окончания инкубации при условии предохранения от прямого воздействия солнечных лучей.

4. Расчет концентрации глюкозы в анализируемых пробах провести по формуле:

$$C = (E_0/E_k) \times 10, \text{ где}$$

C — концентрация глюкозы, ммоль/л;

E₀ — оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

E_k — оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

10 — концентрация глюкозы в калибраторе, ммоль/л.

Референтные величины для сыворотки или плазмы крови:

- новорожденные – 1,7-3,3 ммоль/л;

- дети – 3,3-5,6 ммоль/л;

- взрослые – 4,1-5,9 ммоль/л.

Диагностическое значение: выявление эндокринных нарушений, за-болеваний поджелудочной железы.

В выводе указать полученное значение содержания глюкозы в крови и сравнить с нормальным содержанием глюкозы. При отклонении от нормы указать на возможные заболевания.

Работа 2 Определение концентрации молочной кислоты

Принцип метода:

Молочная кислота + O₂ лактатоксидаза → пируват + 2 H₂O₂;

H₂O₂ + аминокантипирин + 4-хлорфенол → пероксидазахинонимин + 4 H₂O

Концентрация окрашенного комплекса, определенная фотометрически при λ = 500 нм, пропорциональна концентрации молочной кислоты в исследуемом образце.

Оборудование: фотоэлектроколориметр, центрифуга, кюветы l=1,0 см, водяная баня, термометр, химический стакан, пробирки, дозаторы, штатив для пробирок.

Объект исследования и реагенты: сыворотка или плазма крови, су-точная моча, наборы реагентов для определения концентрации молочной кислоты в биологических жидкостях энзиматическими колориметрически-ми методами.

Состав набора:

1. Буфер, рН 6,8 (конечные концентрации в тесте):

Рiрes – 50 ммоль/л;

4-хлорфенол – 6 ммоль/л.

2. Раствор ферментов

аминоантипирин – 0,4 ммоль/л;

Лактатоксидаза > 200 МЕ/л;

Пероксидаза > 2 000 МЕ/л;

3. Калибратор – 3,34 ммоль/л.

Ход работы:

1. Приготовить рабочий реагент, смешав буфер и раствор ферментов в соотношении 9:1.

2. В пробирки внести реактивы в соответствии с указанными объемами:

| Внести в пробирки: | Опытная | Холостая | Калибровочная |
|-----------------------|---------|----------|---------------|
| Рабочий реагент т | 2 мл | 2 мл | 2 мл |
| Исследуемый образец | 20 мкл | - | - |
| Калибратор | - | - | 20 мкл |
| Вода дистиллированная | - | 20 мкл | - |

3. Смешать и инкубировать 5 минут при температуре 37 0С или 10 минут при температуре 18-25 0С.

4. Измерить оптическую плотность пробы (Е пробы) и калибратора (Е калибратора) против холостой пробы.

5. Произвести расчет по формуле:

а) в сыворотке (плазме) крови, ликворе –

$$C=3,34x(E_{\text{пр}}/E_{\text{кал}}) \text{ ммоль/л}$$

б) в суточной моче–

$$C=3,34x(E_{\text{пр}}/E_{\text{кал}}) \text{ ммоль/л, где}$$

V –объем суточной мочи

Референтные величины:

венозная кровь – 0,5-2,2 ммоль/л;

артериальная кровь – 0,5-1,6 ммоль/л;

моча суточная – 5,5-22,0 ммоль/сутки;

ликвор – 1,1-2,4 ммоль/л.

Диагностическое значение: отражение степени гипоксии тканей.

В выводе указать полученное значение содержания молочной кислоты в крови (моче, ликворе) и сравнить с нормальным содержанием. При отклонении от нормы указать на возможные заболевания.

Тема 8. ОБМЕН ЛИПИДОВ.

Работа 1. Определение липидограммы

Липидограмма — комплексное исследование, позволяющее выявить нарушение липидного обмена в организме и оценить риск развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

Исследование включает в себя определение в сыворотке (плазме) крови таких показателей, как:

- общий холестерин,
- липопротеины высокой плотности (холестерол-ЛПВП),
- липопротеины низкой плотности (холестерол-ЛПНП),
- триглицериды (ТГ),
- коэффициент атерогенности (КА).

1. Определение концентрации триглицеридов в сыворотке или плазме крови энзиматическим колориметрическим методом

Принцип метода:

Триглицериды — липаза → глицерин + жирные кислоты;

Глицерин + АТФ — глицерокиназа → глицерил-3-фосфат + АДФ;

глицерол-3-фосфат + O₂ — глицерофосфатоксидаза → диоксиацетонфосфат + 2H₂O₂;

H₂O₂ + 4-ААР + 4-хлорфенол — пероксидаза → хинонимин + 4H₂O.

Концентрация хинонимина, определенная фотометрически при λ = 500 нм, пропорциональна концентрации триглицеридов в исследуемом образце.

Оборудование: фотоэлектроколориметр, кюветы l=1,0 см, водяная баня, термометр, химический стакан, пробирки, дозаторы, штатив для пробирок.

Объект исследования и реагенты: сыворотка или плазма крови, суточная моча, наборы реагентов для определения концентрации триглицеридов в биологических жидкостях энзиматическими колориметрическими методами

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка (плазма) крови после 12 часового голодания. Гемолиз недопустим. Образцы стабильны при t 2-8 °С в течение 7 суток или до трех месяцев при t -20 °С. Избегать повторного замораживания и оттаивания образца.

Состав набора:

Реагент 1:

PIPES – 50 ммоль/л;

4-хлорфенол – 5 ммоль/л;

MgSO₄ – 1 ммоль/л;

4-ААП – 0,5 ммоль/л.

Реагент 2:

Липаза – 1500 МЕ/л;

Глицерокиназа – 200 МЕ/л;

Пероксидаза – 250 МЕ/л

Калибратор: глицерин – 2,29 ммоль/л.

Реагенты готовы к использованию и стабильны в течение 12 месяцев при t 2-8 °С в темноте.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Смешать Реагент 1 и Реагент 2 в соотношении 9 : 1. Рабочий реагент стабилен не менее 14 дней при температуре 2-8 °С в герметично закрытом флаконе.

Ход работы:

| Внести в пробирку | Опытная проба | Калибратор | Контроль на реактивы |
|---------------------------|---------------|------------|----------------------|
| Рабочий реагент, мл | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Исследуемый образец, мл | 0,02 | - | - |
| Калибратор, мл | - | 0,02 | - |
| Вода дистиллированная, мл | - | - | 0,02 |

Смешать и инкубировать 10 минут при t 37 °С или 15 минут при t 18-25 °С. По окончании инкубации измерить оптическую плотность пробы (Е пробы) и калибратора (Е калибратора) против контроля на реактивы при λ = 500 (490-520) нм и d = 1 см. Окраска стабильна в течение 60 минут.

Произвести расчет по формуле:

$$C=2,29 \times E_{\text{пробы}} / E_{\text{калибратора}} \text{ (ммоль/л)}$$

Референтные величины:

1. Норма триглицеридов в крови у женщин колеблется в пределах 0,40-2,71 ммоль/л.

2. Норма триглицеридов в крови у мужчин – 0,5-3,7 ммоль/л. Норма для мужчин старшего возраста (после 65) ниже – 0,62-2,9 ммоль/л.

3. Норма для детей – 0,34-1,5 ммоль/л.

Диагностическое значение: для диагностики врожденных и приобретенных нарушений липидного обмена.

2. Определение коэффициента атерогенности

А. Определение концентрации общего холестерина в плазме крови

Принцип метода: при гидролизе эфиров холестерина холестеролэстеразой образуется свободный холестерин. Образовавшийся и имеющийся в пробе холестерин окисляется кислородом воздуха под действием холестеролоксидазы с образованием перекиси водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски при длине волны 500 нм прямо пропорциональна концентрации общего холестерина в пробе.

Оборудование: фотоэлектроколориметр, кюветы l=1,0 см, водяная баня (термостат), термометр, химический стакан, пробирки, дозаторы, штатив для пробирок.

Объект исследования и реагенты: сыворотка или плазма крови, су-точная моча, наборы реагентов для определения концентрации общего холестерина в биологических жидкостях энзиматическими колориметрическими методами.

Состав набора:

Реагент №1. Буфер

Фосфатный буфер – 100 ммоль/л

Фенол – 10 ммоль/л

Детергенты, активаторы, стабилизаторы

Реагент №2. Лиофилизат

Холестеролэстераза – 400 ед/л

Холестеролоксидаза – 250 ед/л

Пероксидаза – 500 ед/л

4-аминоантипирин – 0,25 ммоль/л

Активаторы и стабилизаторы

Калибратор - холестерин – 5,17 ммоль/л (200 мг/дл)

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Содержимое флакона с реагентом №2, аккуратно перемешивая, растворить в буферном растворе (реагент

№1). Выдержать при комнатной температуре в течение 20-30 минут. Реактив стабилен в течение 6 месяцев при 2-8 0С в темном месте.

Количественный анализ:

Длина волны – 500 нм.

Длина оптического пути – 1 см

Температура инкубации – комнатная 18-25 0С

Ход работы:

| Внести в про-бирки | Опытная проба | Калибровочная проба | Холостая проба |
|--------------------|---------------|---------------------|----------------|
|--------------------|---------------|---------------------|----------------|

| | | | |
|---------|---------|---|---|
| Образец | 0,02 мл | - | - |
|---------|---------|---|---|

| | | | |
|------------|---|---------|---|
| Калибратор | - | 0,02 мл | - |
|------------|---|---------|---|

| | | | |
|------------|---|---|---------|
| Дист. вода | - | - | 0,02 мл |
|------------|---|---|---------|

| | | | |
|-----------------|--------|--------|--------|
| Рабочий реагент | 2,0 мл | 2,0 мл | 2,0 мл |
|-----------------|--------|--------|--------|

Пробы тщательно перемешать и инкубировать 5 минут при 18-25 0С. Из-мерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против хо-лостой пробы.

Окраска стабильна не менее часа после окончания инкубации при предо-хранении от прямого солнечного света.

Расчет концентрации холестерина проводят по формуле:

$C = E_{оп}/E_{к} \times 5,17$ ммоль/л (200 мг/дл), где

$E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.;

$E_{к}$ – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

5,17 ммоль/л (200 мг/дл) – концентрация холестерина в калибраторе.

Референтные величины:

Нормальное содержание: < 5,17 ммоль/л (200 мг/дл).

Пограничное содержание: 5,2-6,5 ммоль/л (201-250 мг/дл).

Патологическое содержание: > 6,5 ммоль/л (251 мг/дл).

По итогам работы сравнить полученный результат с нормальными показателями и сделать вывод о содержании общего холестерина в крови исследованного пациента.

Б . Определение концентрации липопротеинов высокой плотности в сыворотке (плазме) крови

Принцип метода: хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности и липопротеины низкой плотности осаждаются при добавлении к образцу фосфорновольфрамовой кислоты и Mg^{2+} . После центрифугирования в супернатанте остаются только ЛПВП, концентрация которых определяется спектрофотометрически также, как концентрация общего холестерина.

Оборудование: фотоэлектроколориметр, кюветы $l=1,0$ см, водяная баня, термометр, химический стакан, пробирки, дозаторы, штативы для пробирок и пипеток.

Объект исследования и реагенты: сыворотка или плазма крови, су-точная моча, наборы реагентов для определения концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности в биологических жидкостях энзиматическими колориметрическими методами.

Состав набора:

Реагент №1 Осаждающий реагент – фосфорновольфрамовая кислота (0,55 ммоль/л), магния хлорид (25 ммоль/л)

Калибратор – холестерин 1,29 ммоль/л (50 мг/100 мл)

Все реагенты готовы к работе.

Ход работы:

1. Преципитация (осаждение)

| Реагенты | Опытная проба, мл | Калибровочная проба, мл | Контрольная проба, мл |
|----------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
|----------|-------------------|-------------------------|-----------------------|

| | | | |
|--------|------|---|---|
| Плазма | 0,15 | - | - |
|--------|------|---|---|

| | | | |
|------|---|---|------|
| Вода | - | - | 0,15 |
|------|---|---|------|

| | | | |
|--------------------|-----|-----|-----|
| Осаждающий реагент | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
|--------------------|-----|-----|-----|

| | | | |
|------------|---|------|---|
| Калибратор | - | 0,15 | - |
|------------|---|------|---|

Хорошо перемешать и оставить на 10 минут при комнатной температуре. Опытные пробы отцентрифугировать в течение 10 минут при 4000 g. Прозрачный супернатант используют для определения концентрации ЛПВП. Калибровочную и контрольную пробы центрифугировать не нужно. Опре-делить холестерин во всех пробах в течение часа.

2. Определение концентрации ЛПВП

| Реагенты | Опытная проба, мл | Калибровочная проба, мл | Контрольная проба, мл |
|----------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
|----------|-------------------|-------------------------|-----------------------|

| | | | |
|-------------|-----|---|---|
| Супернатант | 0,2 | - | - |
|-------------|-----|---|---|

| | | | |
|-------------------|---|---|-----|
| Вода + реагент №1 | - | - | 0,2 |
|-------------------|---|---|-----|

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Рабочий реагент для определения холестерина | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
|---|-----|-----|-----|

| | | | |
|-------------------------|---|-----|---|
| Калибратор + реагент №1 | - | 0,2 | - |
|-------------------------|---|-----|---|

Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют не менее 10 минут при комнатной температуре (18-25 0С) или 5 минут при 37 0С, и измеряют оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы в кюветах с толщиной поглощающего слоя 5 мм (1 см) при длине волны 500 нм (ФЭК – 490 нм). Окраска стабильна не менее 2 ча-сов после окончания инкубации при предохранении от

прямого солнечного света.

Расчет концентрации ЛПВП проводят по формуле:

$$C = E_{оп}/E_{кал} \times 1,29 \text{ [ммоль/л]} \text{ или}$$

$$C = E_{оп}/E_{кал} \times 50 \text{ [мг/100 мл]},$$

где $E_{оп}$ и $E_{кал}$ - оптические плотности опытной и калибровочной проб, измеренные относительно контрольной пробы.

Нормальные величины ЛПВП:

Мужчины ≥ 55 мг/100 мл (1,42 ммоль/л)

Женщины ≥ 65 мг/100 мл (1,68 ммоль/л)

Группа риска:

Мужчины 35 – 55 мг/100 мл (0,9 - 1,42 ммоль/л)

Женщины 45 – 65 мг/100 мл (1,16 - 1,68 ммоль/л)

Патологическое нарушение липидного обмена:

Мужчины ≤ 35 мг/100 мл (0,9 ммоль/л)

Женщины ≤ 45 мг/100 мл (1,16 ммоль/л)

Расчет концентрации липопротеинов низкой плотности (ЛПНП):

$$C = [\text{общий холестерин}] - [\text{ЛПВП}] - [\text{триглицериды}/5] \text{ мг/100 мл}$$

$$C = [\text{общий холестерин}] - [\text{ЛПВП}] - [\text{триглицериды}/2,2] \text{ ммоль/л}$$

Группа риска: ≥ 150 мг/100 мл (3,9 ммоль/л)

Патология: ≥ 190 мг/100 мл (4,9 ммоль/л)

Внимание: Для анализа использовать только прозрачный супернатант. В случае мутного супернатанта (неполное осаждение) или при содержании триглицеридов в пробе более 4,0 ммоль/л следует провести повторное осаждение, увеличив объем осаждающего реагента в 2 раза. Полученный результат умножить на 2.

В. Подсчет коэффициента атерогенности:

$$K = (X_{общ} - X_{лпвп}) / X_{лпвп},$$

где $X_{общ}$ – общий холестерол крови;

$X_{лпвп}$ – холестерин в составе ЛПВП

Для здорового человека примерно 30 лет коэффициент равен 3,0-3,5. У больных этот показатель возрастает до 5,0 или выше.

После проведенных расчетов, сделать выводы, исходя из показателей липидограммы, о возможных заболеваниях обследованного.

Работа 2. Качественные реакции на кетоновые тела

Оборудование: пробирки, пипетки, штативы.

Объект исследования и реагенты: моча; натрия гидроксид (10% раствор), нитропруссид натрия (10% раствор), ледяная уксусная кислота, раствора йода в йодиде калия.

1. Проба Легалья на ацетон.

Принцип метода: при взаимодействии ацетона и ацетоуксусной кислоты в щелочной среде с нитропруссидом натрия развивается оранжево-красное окрашивание. После подкисления ледяной уксусной кислотой образуется соединение вишневого цвета.

Ход работы:

1. К 5—6 мл мочи прибавляют несколько капель водного раствора нитропруссид натрия и 0,5 мл раствора едкого натра. Получается красное окрашивание.
2. Добавляют 0,5—1 мл ледяной уксусной кислоты. Если красный цвет исчезает, проба отрицательная, если сохраняется — положительная. Если получается слабо розовая окраска, то проба считается также положительной.

2. Проба Либена на ацетон.

Принцип метода: при взаимодействии ацетона в присутствии гидроксида натрия с раствором йода в йодиде калия появляется желтоватый осадок, имеющий характерный запах йодоформа.

Ход работы:

1. Прибавить к 1 мл мочи 0,5-1 мл гидроксида натрия и 5-6 капель раствора йода в йодиде калия.
2. Перемешать. В присутствии ацетона появляется желтоватый осадок, имеющий характерный запах йодоформа.

Заполнить таблицу:

| | Проба Легалья | Проба Либена | Выводы |
|--|---------------|--------------|--------|
| Наличие кетоновых тел в моче (по окраске) | | | |
| Отсутствие кетоновых тел в моче (по окраске) | | | |

Тема 9. ОБМЕН БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ.

Работа 1. Исследование кислотности желудочного сока

Принцип метода: в это исследование включается определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты. Под общей кислотностью понимают суммарную кислотность всех кислореагирующих веществ, которые могут находиться в желудочном содержимом в нормальных и патологических условиях (свободная, связанная соляная кислота, кислые фосфаты, органические кислоты: молочная, масляная,

плохого питания, с печеночной недостаточностью или с гипергидратацией организма. Снижение концентрации мочевины в крови наблюдается также при вирусном гепатите, острой дистрофии печени.
Принцип метода: мочевины под действием уреазы гидролизуются с образованием карбоната аммония. Ионы аммония реагируют с фенолом и гипохлоритом в присутствии нитропруссидов, образуя окрашенный комплекс. Интенсивность окраски при длине волны 540 нм пропорциональна концентрации мочевины в пробе.

Оборудование: фотоэлектроколориметр, кипящая водяная баня, кювета $l=1,0$ см дозаторы, пробирки, пипетки, штативы для пробирок и пипеток, химические стаканы на 50 – 100 мл, стеклянные палочки, мерные колбы на 50-100 мл.

Объект исследования и реагенты: сыворотка крови (плазма), моча, наборы реагентов для определения мочевины.

Состав набора:

Реагент №1 Раствор уреазы

Уреаза – 10 ед/мл

Фосфатный буфер – 50 ммоль/л, рН 7,0

Калибратор

Мочевина – 5 ммоль/л (30 мг/дл.)

Реагент №3 Фенол/нитропруссидный реагент

Фенол – 106 ммоль/л

Нитропруссид натрия – 0,17 ммоль/л

Реагент №4 Гипохлорит

Гипохлорит натрия – 11 ммоль/л

Натрий едкий – 125 ммоль/л

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Приготовление рабочего реагента: смешать реагент №1 с реагентом №3 в соотношении 1:9, аккуратно перемешать. Хранится 7 дней при 2-8 0С, в темноте.

Перед проведением анализа разведите мочу в 100 раз дистиллированной водой.

Ход работы:

| | Опытная проба | Калибровочная проба | Холостая проба |
|-------------------|---------------|---------------------|----------------|
| Внести в пробирки | | | |
| Рабочий реагент | 1,0 мл | 1,0 мл | 1,0 мл |
| Образец | 10 мкл | - | - |
| Калибратор | - | 10 мкл | - |

Пробы тщательно перемешать и инкубировать 5 минут при 20-25 0С.

| | Опытная проба | Калибровочная проба | Холостая проба |
|---------------------|---------------|---------------------|----------------|
| Добавить в пробирки | | | |
| Реагент №4 | 1,0 мл | 1,0 мл | 1,0 мл |

Тщательно перемешать и инкубировать 15 минут при 37 0С. Пробы охладить и измерить оптическую плотность опытной (Еоп) и калибровочной проб (Екал) против холостой пробы. Длина волны 540 нм. Кюветы 1 см. Окраска стабильна 5-8 часов после окончания инкубации при предохранении от прямого солнечного света.

Концентрацию мочевины в сыворотке или плазме крови определить по формуле:

$$C = E_{оп}/E_{кал} \times 5,0 \text{ ммоль/л,}$$

где Еоп – оптическая плотность опытной пробы;

Екал – оптическая плотность калибровочной пробы;

5,0 – концентрация мочевины в калибраторе, ммоль/л

В суточной моче:

$$C = E_{оп}/E_{кал} \times 500 \times K \text{ ммоль/л,}$$

где Еоп – оптическая плотность опытной пробы;

Екал – оптическая плотность калибровочной пробы;

500 – концентрация мочевины в калибраторе с учетом разведения мочи, ммоль/л;

К – объем суточной мочи, л

Нормальные величины:

В сыворотке (плазме) крови: 1,7 – 8,3 ммоль/л (10-50 мг/дл)

В моче: 333-583 ммоль/сутки (20-35 г/сутки)

Сделать выводы о возможных заболеваниях в случае повышенного или пониженного содержания мочевины в сыворотке (плазме) крови или моче.

Тема 10 МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ. ОБМЕН НУКЛЕОТИДОВ.

Работа 1. Количественное определение ДНК колориметрическим методом

Принцип метода: метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, давать синее окрашивание с дифениламинным реактивом. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации ДНК.

Оборудование: пробирки, пипетки, штативы для пробирок и пипеток, ФЭК (кюветы с толщиной слоя 0,5 см).

Объект исследования и реагенты: водный раствор ДНК, дифенил-аминовый реактив (1 г дифениламина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты), дист. вода.

Ход работы:

1. Готовят 2 пробирки. В опытную пробирку наливают 1 мл водного раствора ДНК и 2 мл дифениламинового реактива, в контрольную — 1 мл дистиллированной воды и 2 мл дифениламинового реактива.

Обе пробирки помещают на кипящую водяную баню на 10 мин. Затем пробы охлаждают и измеряют интенсивность окраски на ФЭКе против контроля (длина волны 630—690 нм) в кюветах с толщиной слоя 0,5 см.

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

2. Построение калибровочного графика. В 3 пробирки наливают по 1 мл раствора ДНК различной концентрации (50, 100, 200 мкг/мл) и по 2 мл дифениламинового реактива. Помещают пробирки на 10 минут на кипящую водяную баню, затем измеряют оптическую плотность каждого из растворов. Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс концентрацию использованных растворов ДНК, а на оси ординат — соответствующие им значения оптической плотности.

Записывают принцип метода, результаты колориметрии, строят калибровочный график, по которому находят содержание ДНК в исследуемом растворе.

Работа 2. Количественное определение РНК колориметрическим методом

Принцип метода: метод основан на цветной реакции орцинового реактива с пентозой, входящей в состав РНК. Интенсивность окраски определяют колориметрически.

Оборудование: пробирки, пипетки, штативы для пробирок и пипеток, ФЭК (кюветы с толщиной слоя 0,5 см).

Объект исследования и реагенты: водный раствор РНК, орциновый реактив (готовят 0,1 % раствор $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ в концентрированной соляной кислоте), дист. вода.

Ход работы:

1. В опытную пробирку наливают 1 мл раствора РНК и 1 мл орцинового реактива, в контрольную — 1 мл дистиллированной воды и 1 мл орцинового реактива. Обе пробирки помещают на кипящую водяную баню на 20 мин. После охлаждения измеряют интенсивность окраски на ФЭКе (красный светофильтр, длина волны 630—690 нм) против контроля в кюветах с толщиной слоя 0,3 см. Измерив оптическую плотность раствора в опытной пробирке, по калибровочному графику находят концентрацию РНК в данной пробе.

2. Построение калибровочного графика. В 3 пробирки наливают по 1 мл раствора РНК известной концентрации (50, 100 и 200 мкг/мл) и по 1 мл орцинового реактива. Пробы помещают на кипящую водяную баню на 20 мин и после охлаждения измеряют оптическую плотность каждого из растворов. Затем строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию РНК, а на оси ординат — соответствующее им значение оптической плотности.

Записывают принцип метода, результаты колориметрии, строят калибровочный график, по которому находят содержание РНК в исследуемом растворе.

Работа 3. Определение содержания мочевой кислоты в биологических жидкостях уриказным методом

Принцип метода: содержащаяся в пробе мочевая кислота окисляется под действием фермента уриказы с образованием перекиси водорода. В присутствии пероксидазы перекись водорода окисляет хромогены с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации мочевой кислоты в пробе.

Оборудование: пробирки, пипетки, штативы для пробирок и пипеток, ФЭК (кюветы с толщиной слоя 1 см).

Объект исследования и реагенты: плазма крови, набор для исследования содержания мочевой кислоты в биологических жидкостях колориметрическим методом.

Состав набора:

Реагент №1 Буфер

Фосфат – 150 ммоль/л

3,5 – дихлоро – 2- фенолсульфонат – 2,5 ммоль/л

Реагент №2 Лиофилизат

4-аминоантипирин – 0,25 ммоль/л

Уриказы – 300 ед/л

Аскорбатоксидаза – 250 ед/л

Пероксидаза – 250 ед/л

Калибратор - мочевая кислота – 357 мкмоль/л (6 мг/дл)

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Свежая сыворотка (плазма) крови или суточная моча. Мочу следует разбавить в 10 раз физраствором.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Приготовление рабочего реагента: содержимое флакона с Реагентом №2, аккуратно перемешивая,

растворить в буферном растворе (реагент №1). Для получения оптимальных результатов рекомендуется выдержать рабочий реагент при комнатной температуре 5-10 минут после полного растворения лиофилизата. Реагент стабилен не менее 30 дней при 2-8 0С.

Ход работы:

Пробы тщательно перемешать, инкубировать 7 минут при 18-25 0С или 5 минут при 37 0С. Измерить оптическую плотность опытной (ЕОП) и калибровочной (ЕК) проб против контрольной пробы. Окраска стабильна не менее 40 минут после окончания инкубации.

Длина волны – 520 нм

Длина оптического пути – 1 см (5 мм)

| Внести в пробирки: | Опытная проба | Калибровочная проба | Контрольная проба |
|-----------------------|---------------|---------------------|-------------------|
| Рабочий реагент | 2,0 мл | 2,0 мл | 2,0 мл |
| Образец | 0,05 мл | - | - |
| Калибратор | - | 0,05 мл | - |
| Вода дистиллированная | - | - | 0,05 мл |

Концентрацию мочевого кислоты (С) определить по формуле:

В сыворотке или плазме крови:

$C = \text{ЕОП} / \text{ЕК} \times 357 \text{ мкмоль/л (6,0 мг/дл)}$, где:

ЕОП – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотности;

ЕК – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотности;

357 мкмоль/л – концентрация мочевого кислоты в калибраторе.

В суточной моче:

$C = \text{ЕОП} / \text{ЕК} \times 3,57 \text{ ммоль/л (600 мг/л)} \times K$, где:

ЕОП – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотности;

ЕК – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотности;

3,57 ммоль/л – концентрация мочевого кислоты в калибраторе с учетом разведения мочи;

K – объем суточной мочи, л

Нормальные величины:

В сыворотке (плазме) крови:

Мужчины: 202–416 мкмоль/л (3,4–7,0 мг/100 мл),

Женщины: 142–339 мкмоль/л (2,4–5,7 мг/100 мл).

В моче: 1,49–4,46 ммоль/сутки (250–750 мг/сутки).

Диагностическое значение. Причиной повышения содержания моче-вой кислоты в крови может быть прием пищи, богатой пуринами и уси-ленный распад пуринов, некоторые гематологические заболевания, кле-точный цитоллиз при лучевой терапии.

Определение содержания мочевого кислоты в крови имеет большое значение в диагностике подагры и почечной недостаточности. Повышенный уровень мочевого кислоты наблюдается при нарушении ее выделения из организма (заболевания почек, ацидоз, токсикоз беременности). Особенно высокое содержание мочевого кислоты бывает при сочетании подагры с недостаточностью функции почек.

Сделать выводы о возможных заболеваниях в случае повышенного или пониженного содержания мочевого кислоты в сыворотке (плазме) крови или моче.

Тема 11. Биохимия крови

Работа 1. Количественное определение альбумина в сыворотке крови

Принцип метода. При взаимодействии альбумина в слабокислой среде с бромкрезоловым зеленым (БКЗ) образуется окрашенный комплекс, име-ющий максимум поглощения при длине волны 628 нм.

Оборудование: фотоэлектроколориметр, кюветы с толщиной слоя 1 см; дозаторы, пробирки, пипетки, штативы, мерные колбы.

Объект исследования и реагенты: цельная кровь, сыворотка крови; набор реактивов для определения альбумина.

Состав набора:

1. Реагент №1. Монореагент

Ацетатный буфер, pH = 4,2 – 50,0 ммоль/л

БКЗ – 0,1 ммоль/л

2. Калибровочный раствор альбумина - 60 г/л

Ход работы:

1. В пробирки внести реагенты в соответствии с указанными объемами:

| | Опытная проба | Калибров. проба | Холостая проба |
|---------------------------------|---------------|-----------------|----------------|
| Реагент №1 | 2,0 мл | 2,0 мл | 2,0 мл |
| Сыворотка | 0,01 мл | - | - |
| Калибровочный раствор альбумина | - | 0,01 мл | - |
| Дистиллированная вода | - | - | 0,01 мл |

2. Содержимое пробирок тщательно перемешать.
3. Инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре (18о-25оС).
4. Перенести содержимое пробирок в кюветы с толщиной слоя 1 см.
5. Произвести измерение оптической плотности опытной и калибровочной проб против холостой пробы на спектрофотометре при длине волны 628 нм.
6. Рассчитать концентрацию альбумина по формуле:

$$C=60x(E_{\text{пр}}/E_{\text{кал}}) \text{ г/л, где}$$

$E_{\text{пр}}$ – оптическая плотность опытной пробы,

$E_{\text{кал}}$ – оптическая плотность калибратора,

60 – концентрация альбумина в калибраторе в г/л

Референтные значения:

| | |
|------------------|------------|
| новорожденные - | 28-44 г/л; |
| 4 дня – 14 лет - | 38-54 г/л; |
| 14 - 18 лет - | 32-45 г/л; |
| 18 – 60 лет - | 32-46 г/л; |
| 60 – 90 лет - | 29-45 г/л. |

Диагностическое значение:

Гиперальбуминемия. Любая ситуация, приводящая к потере воды в плазме, повышает концентрацию всех белков в плазме, включая альбумин.

Гипоальбуминемия. Отражает нарушение переваривания, всасывания белков, белоксинтетической функции печени, встречается при остром и хроническом воспалении, отравлениях, эндогенной интоксикации.

Полученные во время работы результаты необходимо сравнить с нормальными значениями и сделать выводы в случае отклонений.

Работа 2. Определение содержания гемоглобина в крови гемиглобинцианидным методом

Принцип метода: гемоглобин крови при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в метгемоглобин (гемиглобин), образующий с ацетонциангидрином гемиглобинцианид (цианметгемоглобин), интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации гемоглобина в крови и измеряется фотометрически при длине волны 540 нм.

Оборудование: фотоэлектроколориметр, кюветы с толщиной слоя 1 см; пробирки, пипетки, штативы, дозаторы, мерные колбы.

Объект исследования и реагенты: цельная кровь, набор реактивов для определения гемоглобина в крови.

Состав набора:

- Трансформирующий реагент – сухая смесь (натрий углекислый кис-лый, 1,0 г; калий железосинеродистый, 200 мг) – 3 упаковки.
- Ацетонциангидрин, 0,5 мл – 3 ампулы;
- Калибровочный раствор гемоглобина (120 г/л) – 2 мл.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Трансформирующий раствор. Один пакет трансформирующего реагента и одну ампулу ацетонциангидрина количественно перенести в мерную колбу вместимостью 1,0 л, растворить в небольшом количестве дистиллированной воды и довести объем дистиллированной водой до метки.

Ход работы:

1. В кюветы внести реактивы в соответствии с указанными в таблице объемами:

| Реагенты | Опытная проба | Калибровочная проба | Холостая проба |
|--------------------------|---------------|---------------------|----------------|
| Трансформирующий реактив | 5,0 мл | 5,0 мл | 5,0 мл |
| Калибровочный раствор | - | 0,02 мл | - |
| Цельная кровь | 0,02 мл | - | - |

2. Перемешать.

3. Выдержать при комнатной температуре (18-25оС) в течение 20 мин для развития устойчивой окраски.

4. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против холостой пробы в кювете с толщиной слоя 1 см на фотоколориметре при длине волны 540 нм.

5. Расчет содержания гемоглобина произвести по формуле:

$$C = (E_{\text{п}}/E_{\text{к}})x 120, \text{ где}$$

C – содержание гемоглобина в пробе, г/л;

$E_{\text{п}}$ – оптическая плотность измеряемой пробы;

$E_{\text{к}}$ – оптическая плотность с калибровочным раствором;

120 – концентрация гемоглобина в калибровочном растворе, г/л.

Референтные величины:

- мужчины 130-160 г/л,
- женщины 120-140 г/л.

Диагностическое значение: снижение уровня гемоглобина в крови встречается при анемиях различной этиологии, повышение – при сгущении крови или эритромии.

Полученные во время работы результаты необходимо сравнить с нормальными значениями и сделать

выводы в случае отклонений.

Тема 12. Гормоны и гормональная регуляция метаболических процессов.

Качественные реакции на гормоны (адреналин, инсулин)

Реактивы: хлорид железа (III), 1%-ный раствор; уксусная кислота, 10%-ный раствор; йодат калия 10%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; гидроксид натрия, 20%-ный раствор; хлороформ; биуретовый реактив (содержит NaOH и ионы Cu^{2+}); нингидрин, 0,5%-ный водный раствор; ацетат свинца, 5%-ный раствор;

Оборудование: штатив с пробирками; спиртовка; водяная баня; глазные пипетки; пипетки вместимостью 1 мл.

Материалы: адреналин, 0,1%-ный раствор в ампулах; инсулин для инъекций.

Работа 1. Качественные реакции на адреналин

а) реакция с хлоридом железа(III)

Принцип метода. Метод основан на способности пирокатехиновой группировки адреналина образовывать с хлоридом железа(III) комплексное соединение изумрудно-зеленого цвета.

Ход работы. К 3 каплям раствора адреналина прибавляют каплю 1%-ного раствора хлорида железа (III). Появляется зеленая окраска. После добавления 1 капли 10%-ного раствора NaOH окрашивание становится вишнево-красным.

б) реакция с йодатом калия

Принцип метода. Метод основан на способности адреналина легко окисляться с образованием окрашенного в красный цвет адренохрома:

Ход работы. В пробирку вносят 3 капли раствора адреналина(1:1000), добавляют по 2 капли 10%-ного раствора KIO_3 и 10%-ного раствора уксусной кислоты и слегка нагревают. Жидкость окрашивается в красно-фиолетовый цвет.

Работа 2. Качественные реакции на инсулин

а) Биуретовая реакция на пептидную группу (реакция Пиотровского)

Принцип метода. Метод основан на способности пептидной группы белков и полипептидов образовывать в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей в белке.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель препарата инсулина из ампулы, добавляют 2 капли биуретового реактива, слегка взбалтывают и наблюдают за появлением окрашивания.

б) нингидриновая реакция на α -аминогруппу

Принцип метода. Метод основан на взаимодействии нингидрина с α -аминогруппой аминокислот, пептидов и белков с образованием окрашенного комплекса синего или сине-фиолетового цвета.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель препарата инсулина, добавляют 2 капли раствора нингидрина, нагревают до кипения и через 1-3 мин наблюдают появление окрашивания.

в) реакция Фоля

Принцип метода. Метод основан на способности белков, в состав которых входят серосодержащие аминокислоты (цистеин, цистин), в щелочной среде при нагревании образовывать сульфид натрия, который с плумбитом натрия дает чёрный или бурый осадок сульфида свинца:

Ход работы. В пробирку наливают 10 капель 5%-ного раствора ацетата свинца и по каплям прибавляют 20%-ный раствор гидроксида натрия до растворения первоначально образующегося осадка. Затем добавляют 5 капель препарата инсулина из ампулы. Смесь кипятят 1-2 мин и наблюдают за изменением цвета и выпадением осадка.

Практическое значение работы. Специфические реакции на гормоны разной структуры используются для их определения в биологических жидкостях, а также для контроля качества гормональных препаратов.

Тема 13. Биохимия нервной и мышечной ткани.

I. Биохимия нервной ткани

Оснащение.

Реактивы. Ацетилхолин, 1%-ный раствор; раствор Люголя; гидроксид натрия, 0,4%-ный раствор; бромтимоловый синий, 0,05%-ный раствор; хлорид железа (III), 10%-ный раствор.

Оборудование. Штатив с пробирками; глазные пипетки; пипетки вместимостью 2 мл; водяная баня или термостат.

Материал. Сыворотка крови; моча нормальная и патологическая.

Работа 1. Качественная реакция на ацетилхолин

Принцип реакции. Остаток холина придает молекуле ацетилхолина основные свойства, поэтому ацетилхолин способен реагировать с кислотами, выступая как основание.

Ход работы.

В пробирку внести 5 капель ацетилхолина и добавить по каплям при встряхивании реактив Люголя. Появляется осадок иодида ацетилхолина, сначала растворяющийся при встряхивании, а затем стабильный.

Работа 2. Обнаружение активности холинэстеразы в сыворотке крови

Принцип метода. Под действием фермента ацетилхолин распадается на уксусную кислоту и холин. Образование уксусной кислоты изменяет реакцию среды, что можно обнаружить с помощью индикатора.

Ход работы. Берут три пробирки. В первую пробирку внести 5 капель сыворотки, во вторую – 5 капель воды (контроль). В каждую пробирку добавить по капле бромтимолового синего. В пробирке с сывороткой возникает зеленое окрашивание (рН сыворотки – 7,4) в пробирке с водой индикатор окрашивается в желтый цвет.

В третьей пробирке приготовить субстратную смесь: внести 5 капель ацетилхолина и 1 каплю бромтимолового синего. Если ацетилхолин не содержит свободной уксусной кислоты, раствор в пробирке имеет синюю окраску. Обычно из-за примеси кислоты окраска желтая, в этом случае по каплям добавить раствор гидроксида натрия до синей окраски (избегать избытка щелочи). Содержимое третьей пробирки разлить примерно поровну в первую и вторую пробирки. При этом в них окраска становится синей.

Обе пробирки поместить в водяную баню при температуре 37°C. Постепенно окраска индикатора в пробирке с сывороткой становится зеленой, а затем желто-зеленой. Содержимое контрольной пробирки остается синим.

Работа 3. Обнаружение фенилпировиноградной кислоты в моче

В основе фенилкетонурии лежит врожденная недостаточность фенилаланингидроксилазы, фермента, катализирующего превращение фенилаланина в тирозин. Вследствие этого наблюдается повышение выделения с мочой таких продуктов превращения фенилаланина как фенилпировиноградная, фенилмолочная и другие кислоты. Тогда как в норме моча практически не содержит фенилпировиноградную кислоту, при фенилкетонурии количество ее может достигнуть 0,3-2,0 г в сутки.

Принцип реакции. Лабораторная диагностика фенилкетонурии основывается, главным образом, на реакции взаимодействия енольной формы фенилпировиноградной кислоты с хлоридом железа (III) с образованием комплексного соединения сине-зеленого цвета.

Ход работы.

Проба Феллинга. К 2 мл мочи прибавляют 6-10 капель 10%-ного раствора хлорида железа (III). Появляется сине-зеленое окрашивание, которое бледнеет через 5-10 минут в зависимости от концентрации фенилпировиноградной кислоты.

Проба на пеленке. На пеленку, мокрую от мочи или уже высохшую, наносят каплю 10%-ного раствора хлорида железа (III). Проба положительная, если появляется зеленая окраска.

Проба на фильтровальной бумаге. На кусок фильтровальной бумаги наносят каплю исследуемой мочи. Затем на пятно наносят каплю 10%-ного раствора хлорида железа (III). При положительной пробе наблюдается появление сине-зеленой окраски.

II. Биохимия мышечной ткани

На мышечную ткань приходится около 40-42% от массы тела. Различают поперечно-полосатую и гладкую мускулатуру. Их состав несколько отличается друг от друга, главным образом количественно.

Структурной единицей скелетной мышцы является многоядерное мышечное волокно, состоящее из саркоплазмы и миофибрилл, белковый состав которых неодинаков. Белки, входящие в состав саркоплазмы, растворимы в воде, относятся к альбуминам и составляют так называемую миогенную фракцию, куда входят миоальбумин, ферменты и др. Миофибрилярные белки относятся, главным образом, к глобулинам, так как они растворимы в 0,5-0,6 М растворе хлорида калия или хлорида натрия. К ним относятся миозин, актин и актомиозин, тропомиозин.

Кроме белков. В состав мышц входят экстрактивные азотистые и безазотистые вещества, а также вода и минеральные соли.

Достаточные представления о химическом составе и обмене мышечной ткани в норме и при патологических состояниях необходимы для диагностики, проведения лечения и профилактики, основанных на знании молекулярных механизмов заболевания.

Оснащение.

Реактивы. Хлорид аммония, 8%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди (II), 1%-ный раствор; сульфосалициловая кислота, 20%-ный раствор; серная кислота, концентрированная; уксусная кислота, концентрированная; сульфат аммония, насыщенный раствор; пикриновая кислота, насыщенный раствор; реактив Уффельмана; реактив Фоля; реактив Миллона; молибденовый реактив (3,75%-ный раствор молибдата аммония в 16%-ном растворе азотной кислоты); нитрат серебра, 1%-ный раствор; хлорид бария, 1%-ный раствор; уксусная кислота, 10%-ный раствор.

Оборудование. Фарфоровые ступки с пестиками, фарфоровые чашки, воронки, штатив с пробирками; глазные пипетки; пипетки вместимостью 1 и 5 мл; бюретка вместимостью 25 мл; химические стаканы, колбочки, карандаш по стеклу, фильтры бумажные, фильтры из марли, сложенной втрое.

Материал. Мышечная кашица

Работа 1. Подготовка материала для исследования

Ход работы. 6-8 г мышечной ткани поместить в фарфоровую ступку, залить 30 мл дистиллированной воды, растереть и профильтровать полученную жидкость через двойной или тройной слой марли в колбочку. Так получают фракцию мышечных белков (альбуминовую), содержащую водорастворимые белки саркоплазмы.

Оставшуюся на фильтре мышечную кашицу перенести снова в ступку, залить 4-5 мл раствора хлорида калия или 8%-ным раствором хлорида аммония, растереть в течение 2-3 минут и профильтровать через бумажный фильтр во вторую колбу. Таким образом, получают вторую фракцию белков мышц – глобулиновую.

Оставшуюся после второго фильтрования мышечную кашицу перенести в фарфоровую чашечку, залить тройным объемом воды и кипятить в течение 30 минут. При этом оставшийся в мышечной ткани белок сарколеммы коллаген переходит в желатин. Горячий раствор профильтровать через бумажный фильтр, охладить. Это третья фракция белков мышц – белки сарколеммы.

С целью получения безбелкового фильтрата для открытия экстрактивных и минеральных веществ к 15 мл водного экстракта (первая фракция) добавить 5 капель 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагреть до кипения. Охладить и профильтровать.

Работа 2. Исследование белков мышечной ткани

Ход работы.

А. Альбуминовая фракция

В 5 пробирок отмеривают по 10 капель водного экстракта мышечной ткани и проделывают следующие реакции: биуретовую, реакцию осаждения с сульфосалициловой кислотой для обнаружения белка; реакции Фоля, Миллона, Адамкевича - для изучения аминокислотного состава белка.

Результаты заносят в таблицу, делают выводы.

Б. Глобулиновая фракция

Для обнаружения белков этой фракции используют биуретовую реакцию и осадочные реакции, характерные для глобулинов. Аминокислотный состав изучают с помощью цветных реакций. В шесть пробирок отмеривают по 10 капель солевого экстракта и проделывают биуретовую реакцию, реакцию Фоля, Миллона, Адамкевича, осадочные реакции: 1) к экстракту добавляют по каплям дистиллированную воду до появления муты или осадка не растворимых в воде глобулинов; 2) к экстракту добавляют равный объём насыщенного раствора сульфата аммония – при полунасыщении этой солью глобулины выпадают в осадок.

Результаты заносят в таблицу и делают выводы.

В. Белки стромы

С раствором желатина проделывают для обнаружения его биуретовую реакцию и осадочную реакцию с сульфосалициловой кислотой. Затем изучают аминокислотный состав с помощью реакций Фоля, Миллона, Адамкевича. Результаты заносят в таблицу и делают выводы.

Белки мышечной ткани

| Название фракции | Осадочные реакции | Цветные реакции | | | | Выводы |
|------------------------------------|-------------------|-----------------|------|---------|------------|--------|
| | | биуретовая | Фоля | Миллона | Адамкевича | |
| 1. Альбуминовая (водная) | | | | | | |
| 2. Глобулиновая (солевой экстракт) | | | | | | |
| 3. Нерастворимая (белки стромы) | | | | | | |

Работа 3. Обнаружение экстрактивных и минеральных веществ мышц

Ход работы.

А. Открытие креатинина. В пробирку налить 10 капель безбелкового фильтрата. Добавить 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и 5-8 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты. Отметить цвет появляющегося окрашивания. Объяснить, какое вещество дает наблюдаемое окрашивание с пикриновой кислотой.

Б. Открытие молочной кислоты. В пробирку налить 10 капель реактива Уффельмана и прибавлять по каплям безбелковый фильтрат. Отметить цвет появляющегося окрашивания. На что оно указывает?

В. Обнаружение минеральных веществ. В три пробирки налить по 10 капель безбелкового фильтрата. В первую пробирку добавить 1-2 капли нитрата серебра. Во вторую – несколько капель молибденового реактива, в третью – несколько капель хлорида бария. Результаты занести в таблицу и сделать выводы.

Экстрактивные вещества мышц

| Название работы | Исследуемый материал, реактивы | Наблюдаемые результаты | Выводы |
|-----------------|--------------------------------|------------------------|--------|
| | | | |

Тема 14. Биохимия соединительной ткани.

Оснащение занятия:

Реактивы. Аммоний щавелевокислый, насыщенный раствор; молибденовый реактив; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди, 1%-ный раствор; сульфосалициловая кислота, 20%-ный раствор; реактив Фоля; реактив Милона; серная кислота, концентрированная; серная кислота, 0,5%-ный раствор; уксусная кислота, концентрированная; риванол, 0,1%-ный раствор; ацетатный буфер, 1 н (рН=5,5).

Оборудование. Колбы, пробирки, пипетки, фарфоровые чашки, бумажные фильтры, мерные цилиндры на 25 мл.

Материал. Костная ткань, моча нормальная и патологическая.

Работа 1. Изучение химического состава костной ткани

Костная ткань состоит из минеральных веществ (50-60% ее массы), органического вещества (30%) и воды (10-20%). Скелет – главное депо фосфора и кальция. У взрослого человека в скелете сосредоточено около 1200 г кальция, 530 г фосфора, 11 г магния. Органическое вещество на 95% состоит из коллагена.

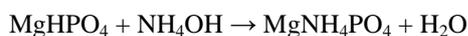
А. Обнаружение неорганических составных частей костной ткани

Неорганические вещества извлекают из костной ткани раствором серной кислоты. С этой целью в колбу помещают 5 г костной ткани. 25 мл 0,5%-ного раствора серной кислоты и оставляют стоять на 24 часа.

Ход работы.

Открытие солей кальция. К 1 мл сернокислотной вытяжки прибавить 1-2 капли насыщенного раствора щавелевокислого аммония. Выпадает нерастворимый осадок щавелевокислого кальция.

Открытие солей магния. Жидкость, полученную при проведении предыдущей работы, профильтровать и к фильтрату добавить 2-3 капли концентрированного раствора аммиака. Выпадает нерастворимый осадок фосфорнокислой аммиакмагнезии:



Открытие солей фосфорной кислоты. В пробирку налить 10 капель молибденового реактива, добавить равный объем сернокислотной вытяжки и кипятить до появления лимонно-желтого окрашивания. При охлаждении выпадает желтый осадок фосфорно - молибденовокислого аммония $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$.

Б. Изучение аминокислотного состава оссеина (оссеина)

Оставшуюся после обработки серной кислотой органическую часть костной ткани кипятить в течение 15 минут с 20 мл дистиллированной воды. С полученным раствором после фильтрования выполнить реакции для обнаружения белка (биуретовая, реакция с сульфосалициловой кислотой) и для изучения его аминокислотного состава (реакции Фоля, Миллона, Адамкевича).

Работа 2. Качественная проба на сульфатированные гликозаминогликаны в моче

Здоровый человек за сутки с мочой выделяет 10 мг гликозаминогликанов. Величина экскреции этих биополимеров может повышаться при ревматизме, полиартритах, хирургических травмах, а также при наследственной патологии – мукополисахаридозах. При некоторых формах мукополисахаридозов у детей в сутки с мочой выделяется до 500 мг и выше сульфатированных гликозаминогликанов.

Принцип метода. Сульфатированные гликозаминогликаны при рН 5,5-6,5 способны количественно взаимодействовать с риванолом, что сопровождается помутнением раствора.

Ход работы. В две пробирки внести по 1-1,5 мл профильтрованной мочи (или раствора хондроитинсульфата) и по 5 капель ацетатного буфера. В одну из пробирок (опыт) добавить 5-6 капель раствора риванола. Пробирки сравнить на темном фоне. Моча, содержащая сульфатированные гликозаминогликаны выше нормы, мутнеет (положительная проба).

Тема 16. Биохимия ротовой жидкости

Жидкая среда полости рта образована сложной смесью секретов всех слюнных желез и десневой жидкостью, детритом полости рта, микрофлорой, содержимым десневых карманов, продуктами жизнедеятельности микрофлоры мягкого зубного налета, биологически активными веществами, продуцируемые лейкоцитами, продуктами их распада, остатками пищи и т.п.

Изменения качественного и количественного состава ротовой жидкости имеют большое значение для возникновения и развития кариеса зубов. Главными факторами физико-химической стабильности зуба являются рН ротовой жидкости и концентрация в ней кальция, фосфатов и фтористых соединений. Поэтому изучение качественного и количественного состава ротовой жидкости для выяснения возможных механизмов развития локальных патологических изменений в полости рта представляется очень важным для врача-стоматолога

В последние годы проводятся целенаправленные исследования по возможности использования смешанной слюны как биологической жидкости, получаемой неинвазивным методом для характеристики некоторых биохимических показателей, традиционно определяемых в плазме и сыворотке крови, т.е. с применением инвазивного подхода.

Оснащение. Диагностические полоски для определения рН или универсальная индикаторная бумага; уксусная кислота, 3%-ный раствор; азотная кислота, 30%-ный раствор; нитрат серебра, 1%-ный раствор; молибденовый реактив; оксалат аммония, 4%-ный раствор; сульфат меди(II), 2%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфосалициловая кислота, 20%-ный раствор; Реактив Феллинга; глюкотесты;

фенол, 10%-ный раствор; хлорид железа (III), 1%-ный и 0,01%-ный растворы; уксусная кислота, концентрированная; α -нафтол, 1%-ный спиртовой раствор; серная кислота, концентрированная; сульфат аммония, насыщенный раствор; пероксид водорода, 1%-ный раствор; кислота хлористоводородная, 2%-ный раствор; фенол, 1%-ный раствор; молочная кислота, 0,1%-ный раствор; крахмал, 0,1%-ный раствор, свежеприготовленный; раствор Люголя: (в 100 мл дистиллированной воды растворяют 20 г йодида калия и 10 г йода; перед употреблением раствор разводят в 5 раз); 1%-ный раствор пероксида водорода.

Оборудование: стаканчики на 50 мл; бюретки на 10 и 20 мл, пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл; капельницы; фильтры; воронки; стеклянные палочки, водяная баня с термостатом; штатив с пробирками; вытяжной шкаф.

Материал. Слюна и слюна, разведенная в 10 раз.

Работа 1. Определение pH слюны

Ход работы. На диагностическую полоску бумаги или на полоску универсальной индикаторной бумаги наносят каплю слюны и тотчас сравнивают с эталонной шкалой. **Результат:**

Вывод:

Практическое значение работы. pH полости рта определяет защитные функции слюны, т.е. *нейтрализующие и минерализующие* свойства, активность ротовой микрофлоры, градиент и скорость ионообменных процессов.

Смешанная слюна имеет значение pH, близкое к нейтральному, **6,5-7,5**. pH зависит от скорости слюноотделения, поэтому pH днем выше, чем ночью, а также от гигиенического состояния полости рта и состава пищи.

В поддержании оптимального значения pH основную роль играют буферные системы, которые определяют буферную емкость слюны – способность нейтрализовать кислоты и щелочи. Сохранение pH в полости рта осуществляется 3 буферными системами: *бикарбонатной, фосфатной и белковой*.

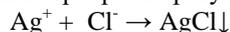
pH ротовой жидкости зависит от содержания аммиака NH_3 . Повышение его содержания в ротовой жидкости смещает pH в слабощелочную сторону, т.к. аммиак связывает ионы H^+ с образованием катиона аммония: $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$.

Работа 2. Определение минеральных компонентов слюны

А. Определение хлоридов.

Принцип метода. Ионы хлора в присутствии ионов серебра образуют белый осадок, не растворимый в азотной кислоте.

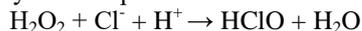
Ход работы. В пробирку вносят 10-15 капель слюны, добавляют 2-3 капли 30%-ного раствора азотной кислоты и 3-4 капли 1%-ного раствора нитрата серебра. Образуется творожистый осадок хлорида серебра:



Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Основными поставщиками ионов хлора в слюну являются околоушные слюнные железы. Их концентрация в слюне меньше, чем в плазме крови. С возрастом содержание ионов хлора в слюне уменьшается, что способствует образованию разного рода отложений на зубах (зубной налет, зубной камень). Под действием фермента *миелопероксидазы*, поступающей в слюну из нейтрофилов, из ионов хлора и перекиси водорода образуется хлорноватистая кислота HClO :

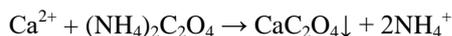


Это сильный окислитель, одна из активных форм кислорода, повреждающий клеточные оболочки микроорганизмов.

Б. Обнаружение ионов Ca^{2+} .

Принцип метода. Ионы кальция образуют с оксалат-ионами осадок, не растворимый в уксусной кислоте.

Ход работы. К 1 мл слюны добавить 1-2 капли 3%-ного раствора уксусной кислоты и 1-2 капли 4%-ного раствора оксалата аммония. Выпадает осадок щавелевокислого кальция:



Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Содержание кальция в смешанной слюне незначительно отличается от такового в плазме. В течение жизни человека количество этих ионов в слюне увеличивается, достигая максимального значения в среднем возрасте. В слюне присутствует 50% ионизированного кальция, около 15% приходится на кальций, связанный с белками, остальная часть находится в составе солей цитрата и фосфата. Основными поставщиками кальция в слюну являются поднижнечелюстные железы, которые выделяют примерно 75% всего кальция смешанной слюны. Концентрация кальция в первичном секрете невысокая, но затем она увеличивается до 2,1-2,3 ммоль/л за счет реабсорбции воды в слюнных протоках. Такая концентрация кальция необходима для поддержания постоянства тканей зуба (наряду с фосфатами).

В. Обнаружение фосфатов.

Принцип метода. При взаимодействии молибденовокислого аммония с фосфорной кислотой в присутствии азотной кислоты появляется кристаллический лимонно-жёлтый осадок фосорномолибденовокислого аммония.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл молибденового реактива, нагревают почти до кипения. После этого добавляют 10-15 капель слюны. При стоянии выпадает желтый осадок фосорномолибденовокислого аммония, не растворимый в азотной кислоте:



Результат:

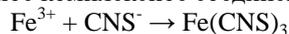
Вывод:

Практическое значение работы. Общего фосфата в слюне в 2-3 раза больше, чем в плазме, его концентрация составляет 7 ммоль/л, из них от 70 до 95% приходится на неорганический фосфат, который представлен ионами HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- и PO_4^{3-} . Небольшое количество фосфата входит в состав фосфопротеинов слюны.

Минерализующая функция слюны во многом обусловлена присутствием в ней ионов кальция и фосфатов. Смешанная слюна пересыщена ионами фосфата и кальция, однако в нормальных условиях это не приводит к отложению минеральных компонентов на поверхности зубов. Этому препятствуют *мицеллярное* строение слюны, а также присутствующие в ротовой жидкости специфические белки, которые предотвращают спонтанную преципитацию (осаждение) из растворов, пересыщенных кальцием и фосфатами.

Г. Обнаружение роданидов.

Принцип метода. Роданиды обнаруживаются по появлению красного окрашивания при добавлении к слюне хлорида железа (III). Образуется красное комплексное соединение, содержащее железо и роданид:



Ход работы. В маленькую пробирку вносят 5 капель слюны (только что взятой), 2 капли 2%-ного раствора хлористоводородной кислоты и 2 капли раствора хлорида железа (III). Появляется красное окрашивание, интенсивность которого зависит от содержания в слюне роданидов. Особенно яркое окрашивание наблюдается у курильщиков. Сравните!

Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Тиоцианаты (роданиды – SCN^-) секретируются в слюну из плазмы крови или образуются бактериальными ферментами. В печени тиоцианаты образуются в процессе обезвреживания цианидов (солей синильной кислоты) с участием фермента роданазы. Источником цианидов являются пищевые продукты растительного происхождения, в основном горький миндаль, косточки абрикос, вишни. Количество тиоцианатов в слюне увеличивается при воспалении тканей пародонта, а также в 4-10 раз превышает норму у курильщиков. Количество тиоцианатов зависит от скорости слюноотделения и снижается при увеличении секреции слюны.

Работа 3. Открытие органических компонентов слюны

А. Выделение муцинов слюны и определение в них углеводного компонента.

Принцип метода. Муцины осаждаются концентрированной уксусной кислотой. Углеводный компонент обнаруживается реакцией с α -нафтолом (реакция Молиша). Реакция Молиша основана на дегидратации пентоз и образовании фурфурола при действии концентрированной H_2SO_4 . Образовавшийся фурфурол в присутствии H_2SO_4 дает с α -нафтолом продукт конденсации розово-фиолетового цвета.

Ход работы. В пробирку собирают около 2 мл слюны и прибавляют по каплям концентрированную уксусную кислоту (4-5 капель, избегать избытка кислоты). Выпадает осадок муцина. Сгусток вынимают стеклянной палочкой, помещают в другую пробирку и продельвают реакцию Молиша: к сгустку добавляют 4-5 капель спиртового раствора α -нафтола, перемешивают и по стенке наслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух слоев жидкости постепенно появляется фиолетово-красное кольцо.

Оставшийся в первой пробирке после удаления сгустка муцина раствор, содержащий все белки, кроме муцина, фильтруют. Фильтрат делят на две части. С одной продельвают биуретовую реакцию, а к другой прибавляют 1/3 объёма насыщенного раствора сульфата аммония и кипятят. Выпадает осадок белка.

Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Муцины (от англ. mucus - слизь) относятся к гликопротеинам, т.е. сложным белкам, имеющим в составе углеводы и липидный компонент. Углеводный компонент представлен олигосахаридами из 8-10 моносахаридных остатков (фукоза, галактоза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, сиаловая кислота). Благодаря способности связывать большое количество воды муцины придают слюне большую вязкость, поэтому формируется скользкий пищевой комок, который легко проглатывается и продвигается по пищеводу. Муцины защищают поверхность ротовой полости от бактериального и вирусного загрязнения, от химических и механических повреждений, от термических воздействий, фосфат кальция от растворения.

Б. Открытие каталазы в слюне

Принцип метода. Каталаза (КФ 1.11.1.6) осуществляет разрушение пероксида водорода с образованием молекулярного кислорода и воды:



Ход работы. К 1 мл слюны добавляют 1 мл 1%-ного раствора пероксида водорода. Наблюдают медленное выделение пузырьков кислорода.

Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Каталаза – один из участников ферментативной антиоксидантной защиты клеток тканей ротовой полости от повреждающего действия АФК (активных форм кислорода).

В. Пробы на глюкозу в слюне.

Принцип метода. Диагностическая полоска содержит зону индикации – бумагу, пропитанную системой реактивов: глюкозооксидаза, пероксидаза, ортотолидин. Окрашивание зоны индикации после ее погружения в испытуемый раствор в зеленый или синий цвет свидетельствует о наличии глюкозы.

Ход работы. На диагностическую полоску наносят каплю слюны и сравнивают с эталонной шкалой. Можно проделать реакцию Феллинга. 1 мл слюны собрать в пробирку, добавить 0,5 мл реактива Феллинга и довести до кипения. При наличии глюкозы в слюне образуется красный осадок оксида меди (I).

Результат:

Вывод:

Практическое значение работы. Качественные реакции на глюкозу в слюне как правило отрицательны. Но при заболеваниях, сопровождающихся гипергликемией (сахарный диабет, тиреотоксикоз, при избытке в организме глюкокортикоидов, при стрессовых состояниях) или после приема пищи, богатой углеводами, пробы на глюкозу могут быть положительными.

Г. Реакция на молочную кислоту.

Принцип метода. При добавлении молочной кислоты к свежеприготовленному раствору фенолята железа аметистового цвета образуется лактат железа желто-зеленого цвета.

Ход определения. К 15 мл раствора фенола добавить несколько капель хлорида железа (III). Перемешать. Получившийся реактив аметистового цвета разбавить водой до слабой окраски. В 3 пробирки налить по 15 капель полученного реактива. В первую пробирку добавить по каплям раствор молочной кислоты. Во вторую - 1 мл свежеснятой слюны, а в третью – слюну с добавлением раствора молочной кислоты.

Результаты:

Вывод:

Практическое значение работы. При некоторых заболеваниях полости рта в смешанной слюне может содержаться в повышенном количестве молочная кислота, что является фактором риска развития кариеса. Лактат является продуктом жизнедеятельности анаэробных микроорганизмов зубного налета.

2.3. Подготовка к контрольной работе по теме «Строение, свойства и функции белков и аминокислот»

Вопросы для подготовки к контрольной работе:

1. Белки – основа жизни. Биологические функции белков. Уровни структурной организации белковой молекулы.
2. Особенности протеиногенных аминокислот. Классификация аминокислот по полярности радикалов. Незаменимые аминокислоты.
3. Образование пептидной связи. N- и C- концы полипептидной цепи на примере трипептида. Особенности пептидной связи. Напишите формулу трипептида Тир-Тре-Три. Определите его заряд при $\text{pH}=7,0$. Дайте название.
4. Первичная структура белка. Какая связь ее формирует? Что обуславливает первичная структура белка?
5. Вторичная структура белковой молекулы. Какие связи ее образуют, как они формируются и чем они отличаются? Типы вторичной структуры, их краткая характеристика.
6. Третичная структура белковой молекулы. Охарактеризуйте типы химических связей, участвующих в ее формировании. За что ответственна третичная структура белка? Какие формы белковой молекулы возможны?
7. Центр связывания белка (активный центр), его формирование. Принцип взаимодействия лиганда с активным центром белка. Что такое домены?
8. Четвертичная структура и биологическая активность белков. Протомеры (субъединицы), олигомеры, мультимеры. Связи, участвующие в стабилизации четвертичной структуры белков. Что понимают под термином «конформация белка»?

9. Белки как типичные представители природных ВМС. Физико-химические свойства белков: молекулярная масса, размеры и форма молекулы, амфотерность, растворимость белков (от чего зависит растворимость белков?). Сходства растворов белков и коллоидных систем.
10. Отличие растворов белков от коллоидных систем. Факторы стабильности белковых растворов. От чего зависит заряд белковой молекулы? Изоэлектрическое состояние белка и изоэлектрическая точка.
11. Реакции осаждения белков. Обратимое и необратимое осаждение. Механизм высаливания, высаливающие агенты, применение.
12. Денатурация белков. Механизм денатурации. Факторы, вызывающие денатурацию белков. Примеры использования в медицинской практике.
13. Основные методы разделения и очистки белков. Высаливание и диализ. На чем основаны методы электрофореза, гель-фильтрации, аффинной и ионообменной хроматографии. Применение.
14. Цветные реакции на белки и аминокислоты.
15. Классификация белков по химическому составу. Состав сложных белков, играющих важную роль в организме.

Билеты для проведения контрольной работы по теме «Строение, свойства и функции белков и аминокислот».

Билет № 1

1. Что такое белки? Дайте определение. Основные функции белков.
2. Высаливание как способ осаждения нативных белков. Механизм высаливания. Высаливающие агенты. Практическое использование высаливания.
3. Напишите формулами трипептид Ала-Глу-Гис. Укажите N- и C- концы пептида, переменные группы, пептидный остов. Определите суммарный заряд, объясните, при каком значении pH (7,0, <7,0, >7,0) растворимость пептида будет снижаться и он выпадет в осадок.

Билет № 2

1. Что такое первичная структура белковой молекулы? Какая связь её формирует? Что обуславливает первичная структура белка?
2. Что такое диализ? На чем основан диализ? Практическое применение.
3. Напишите формулами трипептид Гли-Цис-Вал. Назовите его. Укажите N- и C-концы. Определите суммарный заряд пептида при pH 7,0, укажите, в какой среде лежит его изоэлектрическая точка. Какие типы связей способны образовывать радикалы написанных аминокислот, какой структурный уровень они стабилизируют?

Билет № 3

1. Вторичная структура белковой молекулы, её типы. Какими связями она образуется, чем отличаются эти связи, как они формируются?
2. Факторы, влияющие на заряд белковой молекулы. Что такое изоэлектрическая точка белка? В какой среде белки сыворотки крови приобретают отрицательный заряд?
3. Напишите формулами трипептид Иле-Асп-Тир. Назовите его. Укажите N-и C-концы. Определите суммарный заряд пептида при pH 7,0, укажите в какой среде лежит его изоэлектрическая точка. При каком значении pH (7,0, <7,0, >7,0) растворимость пептида будет снижаться и он выпадет в осадок?

Билет № 4

1. Третичная структура белковой молекулы. Охарактеризуйте типы химических связей, участвующие в её формировании. За что ответственна третичная структура белковой молекулы?
2. Разделение белков методом гель-фильтрации. Принцип метода, применение.
3. Напишите формулами трипептид Лиз-Арг-Фен, назовите его. Укажите N- и C- концы. Определите суммарный заряд трипептида при pH 7,0, какую среду (кислую, нейтральную или щелочную) будет иметь его водный раствор?

Билет № 5

1. Центр связывания белка (активный центр), его формирование. Принцип взаимодействия лиганда с активным центром белка. Что такое домены?
2. Электрофорез. На чем основан метод, применение в медицинской практике.

3. Напишите формулами трипептид Тре-Тир-Три, назовите его. Укажите N- и C- концы, переменные группы, пептидный остов. Определите суммарный заряд пептида, при каком значении pH (7,0, <7,0, .7,0) его растворимость в воде будет снижаться?

Билет № 6

1. Четвертичная структура белков. Протомеры (субъединицы) и олигомеры. Связи, участвующие в стабилизации четвертичной структуры белков. Что понимают под термином «конформация белка»?
2. Ионообменная хроматография, принцип метода, применение.
3. Напишите формулами трипептид Ала-Про-Гли, назовите его. Укажите N-и C-концы. Какой вид вторичной структуры может образовать белковая молекула, состоящая из многократно повторяющегося трипептида данного состава? Почему?

Билет № 7

1. Растворимость белков в растворе, от чего она зависит. Факторы устойчивости белков в растворе.
2. Аффинная хроматография. Принцип метода, преимущества перед другими способами разделения смеси белков.
3. Напишите формулами трипептид Глу-Цис-Гли, назовите его. Укажите N- и C-концы. Этот трипептид входит в активный центр глутатионпероксидазы, участвует в окислительно-восстановительных реакциях. Радикал, какой аминокислоты играет главную роль в этом процессе?

Билет № 8

1. Общие свойства растворов белков и коллоидных систем. Почему растворы белков нельзя полностью отнести к коллоидным системам?
2. Биологические функции белков. Примеры.
3. Напишите формулами трипептид Глу-Три-Асп, назовите его. Укажите N- и C-концы, определите его заряд при pH 7,0. Как поведет себя трипептид в поле постоянного электрического поля при pH 7,0.

Билет № 9

1. Классификация белков по химическому составу. Какие группы простых белков входят в состав сыворотки крови? Что такое белковый коэффициент? Каким образом он определяется, его нормальные значения?
2. Цветные реакции на белки. Как обнаружить пептидную связь в молекуле белка, α -аминокислоты?
3. Напишите формулами трипептид Гис-Лиз-Фен, назовите его. Укажите N-и C-концы, определите его заряд при pH 7,0. Какой заряд приобретет молекула трипептида в сильнокислой среде?

Билет № 10

1. Сложные белки, их состав. Что лежит в основе их классификации? Состав сложных белков, играющих важную роль в организме.
2. Денатурация белков. Механизм денатурации. Факторы, вызывающие денатурацию белков. Примеры использования в медицине.
3. Напишите формулами трипептид Глу-Арг-Сер, назовите его. Укажите N-и C- концы, определите его заряд при pH 7,0. Как поведет себя трипептид в поле постоянного электрического тока при pH 7,0?

Билет № 11

1. Особенности аминокислот, входящих в состав белков. Представьте схему образования пептидной связи, что для нее характерно?
2. Что применяют в качестве противоядия при отравлении солями свинца, меди ртути, серебра? На чем основано это применение?
3. Смесь лизина, аспарагиновой кислоты, лейцина и валина разделили методом электрофореза на бумаге при pH 7,0. Проанализируйте, какие соединения двигались к аноду, какие – к катоду, а какие остались на старте.

Билет № 12

1. Что такое белки? Дайте определение. Основные функции белков.
2. Высаливание как способ осаждения нативных белков. Механизм высаливания. Высаливающие агенты. Практическое использование высаливания.

3. Напишите формулами трипептид Ала-Глу-Гис. Укажите N- и C- концы пептида, переменные группы, пептидный остов. Определите суммарный заряд, объясните, при каких значениях pH (7,0, <7,0, >7,0) растворимость пептида будет снижаться и он выпадет в осадок.

Билет № 13

1. Что такое первичная структура белковой молекулы? Какая связь её формирует? Что обуславливает первичная структура белка?
2. Что такое диализ? На чем основан диализ? Практическое применение.
3. Напишите формулами трипептид Гли-Цис-Вал. Назовите его. Укажите N- и C-концы. Определите суммарный заряд пептида при pH 7,0, укажите, в какой среде лежит его изоэлектрическая точка. Какие типы связей способны образовывать радикалы написанных аминокислот, какой структурный уровень они стабилизируют?

Билет № 14

1. Вторичная структура белковой молекулы, её типы. Какими связями она образуется, чем отличаются эти связи, как они формируются?
2. Факторы, влияющие на заряд белковой молекулы. Что такое изоэлектрическая точка белка? В какой среде белки сыворотки крови приобретают отрицательный заряд?
3. Напишите формулами трипептид Иле-Асп-Тир. Назовите его. Укажите N-и C-концы. Определите суммарный заряд пептида при pH 7,0, укажите в какой среде лежит его изоэлектрическая точка. При каком значении pH (7,0, <7,0, >7,0) растворимость пептида будет снижаться и он выпадет в осадок?

Билет № 15

1. Третичная структура белковой молекулы. Охарактеризуйте типы химических связей, участвующие в её формировании. За что ответственна третичная структура белковой молекулы?
2. Разделение белков методом гель-фильтрации. Принцип метода, применение.
3. Напишите формулами трипептид Лиз-Арг-Фен, назовите его. Укажите N- и C- концы. Определите суммарный заряд трипептида при pH 7,0, какую среду (кислую, нейтральную или щелочную) будет иметь его водный раствор?

Билет № 16

1. Центр связывания белка (активный центр), его формирование. Принцип взаимодействия лиганда с активным центром белка. Что такое домены?
2. Электрофорез. На чем основан метод, применение в медицинской практике.
3. Напишите формулами трипептид Тре-Тир-Три, назовите его. Укажите N- и C- концы, переменные группы, пептидный остов. Определите суммарный заряд пептида, при каких значениях pH (7,0, <7,0, .7,0) его растворимость в воде будет снижаться?

Билет № 17

1. Четвертичная структура белков. Протомеры (субъединицы) и олигомеры. Связи, участвующие в стабилизации четвертичной структуры белков. Что понимают под термином «конформация белка»?
2. Ионообменная хроматография, принцип метода, применение.
3. Напишите формулами трипептид Ала-Про-Гли, назовите его. Укажите N-и C-концы. Какой вид вторичной структуры может образовать белковая молекула, состоящая из многократно повторяющегося трипептида данного состава? Почему?

Билет № 18

1. Растворимость белков в растворе, от чего она зависит. Факторы устойчивости белков в растворе.
 2. Аффинная хроматография. Принцип метода, преимущества перед другими способами разделения смеси белков.
 3. Напишите формулами трипептид Глу-Цис-Гли, назовите его. Укажите N- и C-концы. Этот трипептид входит в активный центр глутатионпероксидазы, участвует в окислительно-восстановительных реакциях. Радикал, какой аминокислоты играет главную роль в этом процессе?
- 2.4. Проведение круглого стола по теме: Биохимия в решении профессиональных задач.**
- 3. Промежуточная аттестация по дисциплине (модулю) включает в себя экзамен**
- 3.1. Форма промежуточной аттестации – экзамен**
- Вопросы к экзамену (ОПК-7):**

1. Белки – основа жизни. Уровни пространственной организации белков. Связи, стабилизирующие структуры белков. Понятие об активном центре белков. Многообразие белков, связь их структуры с функцией.
2. Физико-химические свойства белков: растворимость, факторы устойчивости белковых молекул в растворе, ионизация, гидратация, осаждение.
3. Строение и особенности функционирования гемоглобина как олигомерного белка.
4. Структурная организация нуклеиновых кислот. Первичная, вторичная, третичная структура ДНК. Функции ДНК.
5. Структура и функции рибонуклеиновых кислот. Типы РНК: особенности строения, разнообразие молекул, локализация в клетке, функции. Строение рибосом.
6. Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Классификация и номенклатура ферментов. Свойства ферментов. Специфичность действия ферментов. Структурная организация ферментов. Кофакторы и коферменты. Активный и аллостерический центры ферментов.
7. Механизм действия ферментов. Кинетика ферментативных реакций. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры, рН среды, количества фермента и субстрата. Единицы активности ферментов. Константа Михаэлиса (K_M).
8. Ингибирование активности ферментов: обратимое, необратимое, конкурентное, неконкурентное. Использование ингибиторов ферментов в качестве лекарственных препаратов.
9. Регуляция активности ферментов: частичный (ограниченный) протеолиз, фосфорилирование-дефосфорилирование, ассоциация–диссоциация протомеров. Аллостерическая регуляция.
10. Изоферменты. Различия ферментного состава органов и тканей. Органоспецифические ферменты. Компарментализация ферментов.
11. Применение ферментов в медицине. Энзимопатология. Энзимодиагностика (определение активности ферментов, изоферментов и применение ферментов как аналитических реагентов). Энзимотерапия.
12. Общая характеристика витаминов. Классификация и номенклатура витаминов. Дисбаланс витаминов в организме и его виды. Основные причины развития гипо- и авитаминозов у человека. Гипервитаминозы. Биологическая роль водорастворимых и жирорастворимых витаминов.
13. Липиды: определение, биологическая роль и классификация. Строение, физико-химические свойства и функции триацилглицеролов, фосфолипидов, гликолипидов, стероидов.
14. Строение, свойства и функции биологических мембран. Транспорт веществ через мембрану.
15. Этапы обмена веществ. Поступление, переваривание и всасывание основных пищевых веществ. Понятие о метаболических путях: единство процессов катаболизма и анаболизма.
16. Биоэнергетика. Превращение солнечной энергии в живых системах. Экзергонические и эндергонические реакции. Макроэргические соединения. Пути биосинтеза АТФ в живой природе.
17. Биологическое окисление и его виды. Краткая характеристика основных этапов энергетического биологического окисления. Специфические и общие пути катаболизма.
18. Окислительное декарбоксилирование пирувата (ОДП): характеристика пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) (ферменты и коферменты), локализация в клетке, суммарное уравнение процесса, роль витамина B_1 в работе ПДК.
19. Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса): последовательность реакций, ферменты, связь с цепью переноса электронов. Функции цикла Кребса.
20. Дыхательная цепь (цепь переноса электронов - ЦПЭ), ее важнейшие компоненты, локализация, биологическая роль.
21. Окислительное фосфорилирование АДФ как основной путь образования АТФ в организме, коэффициент Р/О. Дыхательный контроль. Ингибиторы ферментов ЦПЭ и разобщители окислительного фосфорилирования. Гипоэнергетические состояния.
22. Микросомальное окисление: локализация монооксигеназной системы, ключевой фермент – цитохром P_{450} , биологические функции.

23. Активные формы кислорода: образование, токсическое действие. Роль свободно-радикальных процессов в норме. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) и вызываемое им повреждение биологических мембран. Ферментативные и неферментативные системы антиоксидантной защиты
24. Углеводы пищи. Переваривание углеводов и транспорт глюкозы в клетки. Влияние инсулина на поступление глюкозы в мышечную и жировую ткани.
25. Метаболизм глюкозы в клетках. Ключевая реакция метаболизма глюкозы в клетках. Особенности реакции, ферменты. Пути использования глюкозо-6-фосфата в организме.
26. Строение, свойства и биологическая роль гликогена. Синтез гликогена. Мобилизация гликогена. Роль мобилизации гликогена в печени, отличие от мобилизации гликогена в мышцах.
27. Пути катаболизма глюкозы. Анаэробный гликолиз. Схема процесса, ключевые ферменты, энергетический выход, локализация и физиологическое значение процесса.
28. Аэробный гликолиз и аэробный распад глюкозы до CO_2 и H_2O . Схема процессов, энергетический выход, локализация и физиологическое значение.
29. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы. Реакции окислительного этапа. Локализация процесса, биологическая роль.
30. Цикл Кори (глюкозолактатный цикл). Глюконеогенез – важная составная часть цикла Кори. Обходные реакции гликолиза, ферменты их осуществляющие. Локализация процесса, биологическая роль.
31. Глюкоза («сахар») крови. Регуляция уровня глюкозы в крови. Роль инсулина, глюкагона, АКТГ (адренокортикотропного гормона), глюкокортикоидов.
32. Патология углеводного обмена: сахарный диабет, гликогенозы, галактоземия.
33. Роль липидов в питании. Переваривание и всасывание липидов. Особенности строения желчных кислот, их функции. Энтерогепатическая циркуляция желчных кислот.
34. Ресинтез липидов в энтероцитах. Транспортные формы ресинтезированных липидов в стенках кишечника и других тканях. Липопротеиновые комплексы: хиломикроны, липопротеины различной плотности (ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП), биологические функции.
35. Окисление высших жирных кислот. Транспорт жирных кислот в митохондрии, последовательность реакций β -окисления, баланс энергии, физиологическое значение.
36. Метаболизм ацетил-КоА. Биосинтез и использование кетонных тел в качестве источников энергии в тканях. Гиперкетонемия, кетонурия и ацидоз при сахарном диабете и голодании.
37. Обмен холестерина. Фонд холестерина в организме. Общая характеристика основных этапов синтеза холестерина в печени. Нарушения обмена холестерина. Желчнокаменная болезнь, гиперхолестеролемиа. Механизм развития атеросклероза.
38. Норма белков в питании. Биологическая ценность белков. Незаменимые аминокислоты. Азотистый баланс, его виды.
39. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Свойства пептидгидролаз, их активация.
40. Трансаминирование аминокислот. Биологический смысл, ферменты и коферменты трансаминирования. Диагностическое значение определения активности аминотрансфераз в крови.
41. Дезаминирование аминокислот и его виды. Непрямое окислительное дезаминирование (трансдезаминирование): этапы, биологическая роль.
42. Основные источники аммиака в организме и его токсичность. Пути обезвреживания аммиака. Биосинтез мочевины: схема, локализация и биологическое значение процесса.
43. Декарбоксилирование аминокислот. Биогенные амины: происхождение, представители, функции, механизмы инактивации.
44. Особенности обмена фенилаланина и тирозина. Фенилкетонурия: биохимический дефект, проявления болезни, диагностика и лечение. Алкаптонурия, альбинизм.
45. Катаболизм нуклеопротеинов. Представление о путях распада и синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Нарушение обмена нуклеотидов: подагра, гиперурикемия, ксантинурия.
46. Катаболизм хромопротеинов. Билирубин: образование и обезвреживание. Нарушение обмена билирубина. Виды желтух.

47. Биологические свойства гормонов. Классификация гормонов. Иерархия и схема взаимосвязи регуляторных систем организма. Роль гормонов в системе регуляции метаболизма и функций органов. Молекулярные механизмы действия гормонов.
48. Роль кальция и фосфатов в обмене веществ. Регуляция обмена кальция и фосфатов гормонами: паратгормоном, кальцитриолом и кальцитонином. Гипо- и гиперкальциемия. Осложнения и изменения зубочелюстной системы.
49. Физико-химические свойства воды, биологическая роль воды, распределение воды в организме. Классификация и распространенность химических элементов в организме. Регуляция и нарушения водно-солевого обмена.
50. Биологические функции крови, состав, основные физико-химические параметры. Белки плазмы крови.
51. Остаточный азот и ферменты крови. Клиническое значение биохимического анализа крови.
52. Гемостаз. Общая характеристика отдельных этапов. Классификация и номенклатура факторов свертывания крови. Превращение фибриногена в фибрин, образование тромба. Роль витамина К в свертывании крови.
53. Фибринолиз. Активаторы пламиногена и протеолитические ферменты как тромболитические лекарственные препараты.
54. Коллаген: функции, свойства, особенности структуры, биосинтез. Роль витамина С в синтезе коллагена, проявления витаминной недостаточности. Катаболизм коллагена.
55. Эластин: особенности строения, свойства. Синтез. Катаболизм эластина.
56. Химический состав эмали зуба. Характеристика минеральной основы эмали зуба. Влияние состава апатитов на свойства эмали. Фтор: биологическая роль, источники, потребность.
57. Органические вещества эмали. Белки эмали: содержание, особенности строения, локализация, роль в процессе минерализации эмали.
58. Особенности химического состава и роль дентина.
59. Особенности химического состава и строения цемента. Роль цемента зуба.
60. Пульпа зуба. Функции, клетки и внеклеточный матрикс пульпы.
61. Поверхностные образования на зубах: кутикула, пелликула. Формирование приобретенной пелликулы из гликопротеинов слюны.
62. Зубной налет. Формирование зубного налета. Химический состав зубного налета. Патохимия кариеса и его профилактика.
63. Зубной камень: химический состав, образование. Зубной камень и воспаление тканей пародонта.
64. Биохимия ротовой жидкости: состав, источники секрета, скорость секреции, суточный объем и физико-химические параметры слюны. Функции смешанной слюны.
65. Неорганические компоненты ротовой жидкости. Соединения фосфора и кальция: формы нахождения в слюне, мицеллы слюны, роль в процессах минерализации твердых тканей зуба.
66. pH ротовой жидкости, системы стабилизации (бикарбонатная, фосфатная, белковая буферные системы, содержание аммиака). Патогенетическое значение сдвига pH в формировании заболеваний зубочелюстной области. Причины ацидоза ротовой полости.
67. Органические вещества слюны. Белки смешанной слюны, их полифункциональность. Муцины: химическая природа, свойства, биологические функции.
68. Специфические слюнные белки (белки богатые пролином, гистатины, статхерины). Группоспецифические вещества слюны.
69. Ферменты слюны (гликозидазы различного происхождения, протеазы, гиалуронидаза, кислая и щелочная фосфатазы).
70. Защитные системы полости рта (лизоцим, пероксидаза, лактоферрин).
71. Ферментативная защита тканей ротовой полости от повреждающего действия активных форм кислорода (супероксиддисмутаза, каталаза). Иммуноглобулины слюны. Структура и особенности секреторного иммуноглобулина А (SIgA).
72. Биологически активные вещества слюны (ФРН - фактор роста нервов, ФРЭ - фактор роста эпителия, паротин, инсулиноподобный белок, калликреин, ренин). Механизм действия, биологическая функция.
73. Биохимия десневой жидкости: состав, функции.
74. Камнеобразование в слюнных железах. Химический состав слюнного камня.

75. Ротовая жидкость как альтернативная биосреда для неинвазивного исследования.

Саливадиагностика.

3.2. Вопросы базового минимума по дисциплине

1. Белки. Физико-химические свойства белков.
2. Биологические функции белков.
3. Сложные белки, их классификация. Углеводно-белковые комплексы.
4. Строение, состав и функции биологических мембран.
5. Ферменты. Свойства и структурная организация ферментов.
6. Витамины, классификация и номенклатура. Виды дисбаланса витаминов в организме.
7. Общие свойства гормонов. Классификации гормонов.
8. Образование активных форм кислорода (АФК). Перекисное окисление липидов (ПОЛ) и вызываемое им повреждение биологических мембран. Ферментативная и неферментативная системы антиоксидантной защиты.
9. Обмен белков. Белковое питание. Незаменимые аминокислоты. Азотистый баланс.
10. Катаболизм хромопротеинов. Распад гемоглобина. Образование и обезвреживание билирубина.
11. Нарушение обмена билирубина. Виды желтух.
12. Метаболизм глюкозы в клетках. Пути катаболизма глюкозы в тканях. Анаэробное и аэробное окисление глюкозы.
13. Регуляция уровня глюкозы в крови. Патология углеводного обмена: сахарный диабет.
14. Транспортные формы липидов. Состав атерогенных и антиатерогенных липопротеинов.
15. Биохимия крови. Белки плазмы крови. Биологическая роль.
16. Гемостаз. Общая характеристика отдельных этапов. Роль витамина К в процессах свертывания крови.
17. Фибринолиз. Активаторы пламиногена и протеолитические ферменты как тромболитические лекарственные средства
18. Химический состав эмали зуба. Характеристика минеральной основы эмали. Фтор: биологическая роль, источники, потребность. Органические вещества эмали.
19. Регуляция обмена кальция и фосфатов.
20. Особенности химического состава и строения дентина.
21. Особенности химического состава и строения цемента.
22. Пульпа зуба.
23. Поверхностные образования на зубах: кутикула, пелликула.
24. Биохимия смешанной слюны. Функции смешанной слюны. Состав смешанной слюны. Макроэлементы слюны, роль в процессах минерализации твердых тканей зуба.
25. Биохимия десневой жидкости.
26. pH ротовой жидкости, системы стабилизации. Патогенетическое значение сдвига pH в формировании заболеваний зубочелюстной области.
27. Защитные системы полости рта. Неспецифические и специфические факторы защиты полости рта от кариесогенных и других бактерий.
28. Образование зубного налета и развитие кариеса.
29. Зубной камень, состав. Механизм формирования зубного камня.
30. Камни в слюнных железах. Химический состав слюнного камня.

4. Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций.

Основными этапами формирования указанных компетенций при изучении обучающимися дисциплины являются последовательное изучение содержательно связанных между собой разделов (тем) учебных занятий. Изучение каждого раздела (темы) предполагает овладение обучающимися необходимыми компетенциями. Результат аттестации обучающихся на различных этапах формирования компетенций показывает уровень освоения компетенций обучающимися.

4.1. Перечень компетенций, планируемых результатов обучения и критериев оценивания освоения компетенций

| Формируемая компетенция | Содержание компетенции | Планируемые результаты обучения (показатели достижения заданного уровня освоения компетенций) | Критерии оценивания результатов обучения (дескрипторы) по пятибалльной шкале | | | | |
|-------------------------|--|--|--|---|--|---|--|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| ОПК-7 | готовность к использованию основных физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач | Знать: Основные физико-химические, математические и иные естественнонаучные понятия и методы, которые могут использоваться при освоении дисциплины | Отсутствие знаний основных физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов, которые могут использоваться при освоении дисциплины | Фрагментарные знания основных физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов, которые могут использоваться при освоении дисциплины | Общие, но не структурированные знания основных физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов, которые могут использоваться при освоении дисциплины | В целом сформированные, но содержащие отдельные пробелы знания основных физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов, которые могут использоваться при освоении дисциплины | Сформированные систематические знания основных физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов, которые могут использоваться при освоении дисциплины |
| | | Уметь: решать прикладные задачи в области профессиональной деятельности с | Отсутствие умений решать прикладные задачи в области профессиональной | Частично освоенные умения решать прикладные задачи в области | В целом успешно, но не систематически осущест- | В целом успешно, но содержащие отдельные пробелы | Сформированное умение решать прикладные задачи в области профессионально |

| | | | | | | | |
|--|--|---|--|--|--|--|---|
| | | <p>привлечением физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний</p> | <p>ой деятельности с привлечением физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний</p> | <p>профессиональной деятельности с привлечением физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний</p> | <p>вляемые умения решать прикладные задачи в области профессиональной деятельности с привлечением физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний</p> | <p>умения решать прикладные задачи в области профессиональной деятельности с привлечением физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний</p> | <p>й деятельности с привлечением физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний</p> |
| | | <p>Владеть: Методологией использования физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач в различных отраслях</p> | <p>Отсутствие навыков владения методологией использования физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при</p> | <p>Фрагментарное применение навыков владения методологией использования физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и</p> | <p>В целом успешное, но не систематическое и проявляемое владение методологией использования физико-химических, математических и иных</p> | <p>В целом успешные, но содержащие отдельные пробелы навыки владения методологией использования физико-</p> | <p>Успешное и систематически применяемые навыки владения методологией использования физико-химических, математических и иных естественнонаучных понятий и</p> |

| | | | | | | | |
|--|--|---|---|---|--|--|---|
| | | <p>медицинских знаний в рамках изучаемой дисциплины</p> | <p>решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний в рамках изучаемой дисциплины</p> | <p>методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний в рамках изучаемой дисциплины</p> | <p>естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний в рамках изучаемой дисциплины</p> | <p>химических, математических и иных естественнонаучных понятий и методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний в рамках изучаемой дисциплины</p> | <p>методов при решении профессиональных задач в различных отраслях медицинских знаний в рамках изучаемой дисциплины</p> |
|--|--|---|---|---|--|--|---|

4.2. Шкала, и процедура оценивания

4.2.1. Процедуры оценивания компетенций (результатов)

| № | Компоненты контроля | Характеристика |
|----|-------------------------------|--|
| 1. | Способ организации | традиционный; |
| 2. | Этапы учебной деятельности | Текущий контроль успеваемости, промежуточная аттестация |
| 3. | Лицо, осуществляющее контроль | преподаватель |
| 4. | Массовость охвата | Групповой, индивидуальный; |
| 5. | Метод контроля | Устный ответ. стандартизированный тестовый контроль, контрольная работа, лабораторная работа/ практическая работа, составление глоссария, проведение круглого стола |

4.2.2. Шкалы оценивания компетенций (результатов освоения)

Для устного ответа:

- Оценка "отлично" выставляется студенту, если он глубоко и прочно усвоил программный материал, исчерпывающе, последовательно, четко и логически стройно его излагает, умеет тесно увязывать теорию с практикой, причем не затрудняется с ответом при видоизменении вопроса, использует в ответе материал монографической литературы, правильно обосновывает принятое решение, владеет разносторонними навыками и приемами обоснования своего ответа.
- Оценка "хорошо" выставляется студенту, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, не допуская существенных неточностей в ответе на вопрос, владеет необходимыми навыками и приемами обоснования своего ответа.
- Оценка "удовлетворительно" выставляется студенту, если он имеет знания только основного материала, но не усвоил его деталей, допускает неточности, недостаточно правильные формулировки, нарушения логической последовательности в изложении программного материала.
- Оценка "неудовлетворительно" выставляется студенту, который не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, неуверенно, с большими затруднениями излагает материал.
- Как правило, оценка "неудовлетворительно" ставится студентам, которые не могут изложить без ошибок, носящих принципиальный характер материал, изложенный в обязательной литературе.

Для стандартизированного тестового контроля:

Оценка «отлично» выставляется при выполнении без ошибок более 90 % заданий.

Оценка «хорошо» выставляется при выполнении без ошибок более 70 % заданий.

Оценка «удовлетворительно» выставляется при выполнении без ошибок более 50 % заданий.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется при выполнении без ошибок менее 50 % заданий.

Выполнение контрольной работы:

«отлично» студент получает оценку, если в работе присутствуют все структурные элементы, вопросы раскрыты полно, изложение материала логично, выводы аргументированы, использована актуальная литература, работа правильно оформлена.

«хорошо» ставится, если в работе есть 2-3 незначительные ошибки, изложенный материал не противоречит выводам, в списке источников достаточное количество позиций, нет грубых ошибок в оформлении.

«удовлетворительно» работа оценивается, если один из вопросов раскрыт не полностью, присутствуют логические и фактические ошибки, плохо прослеживается связь между ответом и выводами, в списке литературы много устаревших источников, допущены существенные ошибки в оформлении.

«неудовлетворительно» студент получает, если количество ошибок превышает допустимую норму, в работе отсутствуют выводы или не хватает других структурных элементов, в списке литературы недостаточно источников, работа оформлена не по требованиям.

Лабораторная работа

«Зачтено» - выставляется при условии, если студент показывает хорошие практические навыки при проведении лабораторной работы; самостоятельно проводит опыты и интерпретирует

полученные результаты; грамотно оформляет протокол исследования. «Не зачтено» - выставляется при наличии серьезных недостатков в проведении опытов; в случае отсутствия протокола лабораторной работы с интерпретацией полученных результатов.

Для оценки глоссария: Оценка «отлично» выставляется, если глоссарий-словарь специализированных терминов составлен из слов, полностью и наиболее оптимально соответствующих заданному разделу, определения точны, содержат подробные комментарии и правильные примеры.

Оценка «хорошо» выставляется, если глоссарий содержит не все термины, относящиеся к теме задания, определения имеют не принципиальные неточности, отсутствуют в некоторых случаях комментарии или примеры.

Оценка «удовлетворительно» выставляется, если не все включенные в глоссарий слова относятся к теме задания, определения имеют не принципиальные неточности, отсутствуют комментарии или примеры.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется, если глоссарий не составлен или все слова не соответствуют теме или даны неправильные определения терминов.

4.3. Шкала и процедура оценивания промежуточной аттестации

Критерии оценки экзамена (в соответствии с п.4.1.):

Оценка «отлично» выставляется, если при ответе на все вопросы билета студент демонстрирует полную сформированность заявленных компетенций, отвечает грамотно, полно, используя знания основной и дополнительной литературы.

Оценка «хорошо» выставляется, если при ответе на вопросы билета студент демонстрирует сформированность заявленных компетенций, грамотно отвечает в рамках обязательной литературы, возможны мелкие единичные неточности в толковании отдельных, не ключевых моментов.

Оценка «удовлетворительно» выставляется, если при ответе на вопросы билета студент демонстрирует частичную сформированность заявленных компетенций, нуждается в дополнительных вопросах, допускает ошибки в освещении принципиальных, ключевых вопросов.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется, если при ответе на вопросы билета у студента отсутствуют признаки сформированности компетенций, не проявляются даже поверхностные знания по существу поставленного вопроса, плохо ориентируется в обязательной литературе.