

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Биохимия

Направление подготовки: Зоотехния

Профиль подготовки: Кормление животных и технология кормов. Диетология

Квалификация (степень) выпускника: бакалавр

Нормативный срок обучения: 4 года

Форма обучения: очная

СОДЕРЖАНИЕ

1	Конспект лекций.....	3
1.1	Лекция № 1 Химический состав организмов. Строение, состав и классификация белков	3
1.2	Лекция № 2 Биологически активные вещества: ферменты, витамины	7
1.3	Лекция №3 Основные системы регуляции метаболизма и межклеточной коммуникации	13
1.4	Лекция №4 Метаболизм глюкозы в клетке. Метаболизм гликогена	15
1.5	Лекция №5 Обмен липидов	18
1.6	Лекция №6 Функции крови. Метаболизм эритроцитов	20
1.7	Лекция №7 Биохимия мышечной ткани	22
2	Методические указания по выполнению лабораторных работ.....	26
2.1	Лабораторная работа № ЛР-1 Химический состав организма.....	26
2.2	Лабораторная работа № ЛР-2 Качественные реакции на белки и аминокислоты	28
2.3	Лабораторная работа № ЛР-3 Денатурация белков и поддержание их нативной конформации в условиях клетки	32
2.4	Лабораторная работа № ЛР-4 Особенности ферментов как белковых катализаторов	34
2.5	Лабораторная работа № ЛР-5 Активный центр: специфичность действия ферментов	35
2.6	Лабораторная работа № ЛР-6 Витамины. Качественные реакции.....	36
2.7	Лабораторная работа № ЛР-7 Роль гормонов в регуляции метаболизма. Иерархия регуляторных систем. Классификация и биологическое действие гормонов	39
2.8	Лабораторная работа № ЛР-8 Основные углеводы пищи. Переваривание углеводов.....	40
2.9	Лабораторная работа № ЛР-9 Хиломикроны. Окисление жирных кислот. Регуляция β-окисления	42
2.10	Лабораторная работа № ЛР-10 Белковое питание. Азотистый баланс. Переваривание белков	43
2.11	Лабораторная работа № ЛР-11 Обмен минеральных веществ.....	44
2.12	Лабораторная работа № ЛР-12 Синтез гема и его регуляция. Обмен железа...	45
2.13	Лабораторная работа № ЛР-13 Особенности метаболизма эритроцитов и фагоцитирующих лейкоцитов. Основные свойства белковых фракций крови и значение их определения для диагностики заболеваний.....	46
2.14	Лабораторная работа № ЛР-14 Биохимия мышечной ткани.....	48
2.15	Лабораторная работа № ЛР-15 Биохимия нервной ткани.....	49

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция № 1 (2 часа).

Тема: Химический состав организмов. Строение, состав и классификация белков

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Введение в биохимию.
2. Методы исследования в биохимии.
3. Химический состав живых организмов
4. Белки – полимеры, построенные из аминокислот.
5. Характеристика белковых аминокислот.
6. Структурная организация белков: первичная, вторичная, третичная, четвертичная.
7. Функции белков.
8. Классификация белков.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Введение в биохимию.

Биологическая химия, как это следует из самого названия (bios– жизнь) – это химия жизни, химия живой материи.

Биологическая химия – наука о химическом составе живой материи и о химических процессах, происходящих в живых организмах и лежащих в основе их жизнедеятельности.

Биохимия как наука сложилась в основном в конце XIX начале XX века. На современном этапе развития область, охватываемая классической биохимией, расширилась настолько, что граница между этой наукой и другими химическими и биологическими дисциплинами постепенно стирается. Объем информации с каждым годом расширяется и не исключено, что в биохимию войдут такие разделы, которые мы сейчас относим к химии и биологии.

Изучение проблем составляющих предмет современной биохимии, началось, по-видимому, около 200 лет назад. В течение второй половины 18 века и на протяжении 19 века неоднократно предпринимались попытки – и довольно успешные, – проникнуть в сущность процессов жизнедеятельности, уяснить себе их природу, как в структурном, так и в метаболическом аспекте.

Однако из-за сложности рассматриваемых проблем надеяться получить глубокие представления о веществах, участвующих в этих процессах, и о химических реакциях из которых этот процесс складывается, до тех пор, пока другие химические дисциплины, и в первую очередь аналитическая и органическая химии, не достигли должной ступени развития.

Успехи структурной биохимии с самого начала были неразрывно связаны с достижениями в области органической и аналитической химии.

2. Методы исследования в биохимии.

История развития методов биохимических исследований. Роль методического обеспечения в развитии биохимии. Классификация методов исследования в биохимии. Применение биохимических методов в медицине, биотехнологии, экологии и др. отраслях.

Особенности биологических макромолекул как объектов исследования: высокая молекулярная масса, денатурация, полиэлектролитная природа, низкая скорость диффузии.

Оборудование биохимической лаборатории, специальные материалы и реактивы. Отделение осадков и нерастворимых веществ. Центрифугирование. Ультрафильтрация. Некоторые приемы, используемые при работе с белковыми растворами. Диализ.

3. Химический состав живых организмов

Живые организмы состоят из огромного числа химических веществ, органических и неорганических, полимерных и низкомолекулярных. Среди неорганических веществ и компонентов основное место занимает – вода. Для поддержания ионной силы и pH-среды, при которых протекают процессы жизнедеятельности, необходимы определённые концентрации неорганических ионов. Основные элементы в живых организмах: - водород; -кислород; -сера; азот; -фосфор; -углерод. Неорганические соединения: -соли аммония; -карбонаты; -сульфаты; -фосфаты. Неметаллы: 1. Хлор (основной). В виде анионов участвует в создании солевой среды, иногда входит в состав некоторых органических веществ. 2. Йод и его соединения принимают участие в некоторых процессах жизнедеятельности органических соединений (живых организмов). Йод входит в состав гормонов щитовидной железы (тироксина). Тироксин 3. Производные селена. Селеноцестеин, входит в состав некоторых ферментов. 4. Кремний - входит в состав хрящей и связок, в виде эфиров ортокремневой кислоты, принимает участие в шивке полисахаридных цепей.

Большое число органических веществ входит в состав живых организмов: -уксусная кислота; -уксусный альдегид; -этанол (является продуктами и субстратами биохимических превращений). Много соединений в живых организмах представляют собой комплексы: - ГЕМ - это комплекс железа с плоской молекулой парафина; -коболамин. Для поддержания определённой ионной силы и соединения буферной среды необходимо участие однозарядных ионов: -аммония(NH_4^+); -натрия(Na^+); -калия (K^+).

4. Белки – полимеры, построенные из аминокислот.

Белки - высокомолекулярные азотистые органические вещества, построенные из аминокислот и играющие фундаментальную роль в структуре и жизнедеятельности организмов. Белки - основная и необходимая составная часть всех организмов. Именно Белки осуществляют обмен веществ и энергетические превращения, неразрывно связанные с активными биологическими функциями. Сухое вещество большинства органов и тканей человека и животных, а также большая часть микроорганизмов состоят главным образом из белков (40-50%), причем растительному миру свойственно отклонение от этой средней величины в сторону понижения, а животному - повышения. Микроорганизмы обычно богаче белком (некоторые же вирусы являются почти чистыми белками). Таким образом, в среднем можно принять, что 10% биомассы на Земле представлено белком, то есть его количество измеряется величиной порядка 10^{12} - 10^{13} тонн. Белковые вещества лежат в основе важнейших процессов жизнедеятельности. Так, например, процессы обмена веществ (пищеварение, дыхание, выделение, и другие) обеспечиваются деятельностью ферментов, являющихся по своей природе белками. К белкам относятся и сократительные структуры, лежащие в основе движения, например сократительный белок мышц (актомиозин), опорные ткани организма (коллаген костей, хрящей, сухожилий), покровы организма (кожа, волосы, ногти и т.п.), состоящие главным образом из коллагенов, эластинов, кератинов, а также токсины, антигены и антитела, многие гормоны и другие биологически важные вещества.

5. Характеристика белковых аминокислот.

Общая структурная особенность аминокислот - наличие amino- и карбоксильной групп, соединённых с одним и тем же углеродным атомом. R - радикал аминокислот - в простейшем случае представлен атомом водорода (глицин), но может иметь и более сложное строение.

В водных растворах при нейтральном значении pH аминокислоты существуют в виде биполярных ионов.

Таблица Классификация основных аминокислот белков по их химическому строению

Тривиальные названия аминокислот	Сокращённые названия		Строение радикалов
	русские	латинские	
I. Аминокислоты с алифатическими радикалами			
1. Глицин	Гли	Gly G	$\begin{array}{c} -\text{H} \\ -\text{CH}_3 \\ -\text{CH} < \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \\ -\text{CH}_2-\text{CH} < \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \\ -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
2. Аланин	Ала	Ala A	
3. Валин	Вал	Val V	
4. Лейцин	Лей	Leu L	
5. Изолейцин	Иле	Ile I	
II. Аминокислоты, содержащие в алифатическом радикале дополнительную функциональную группу			
Гидроксильную группу			
6. Серин	Сер	Ser S	$-\text{CH}_2-\text{OH}$
7. Треонин	Тре	Thr T	$-\text{CHOH}-\text{CH}_3$
Карбоксильную группу			
8. Аспарагиновая кислота	Асп	Asp D	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$
9. Глутаминовая кислота	Глу	Glu E	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
Амидную группу			
10. Аспарагин	Асп	Asn N	$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$
11. Глутамин	Гли	Gln Q	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$
Аминогруппу			
12. Лизин	Лиз	Lys K	$-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
Гуанидиновую группу			
13. Аргинин	Арг	Arg R	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{NH}}{\text{C}}}-\text{NH}_2$
Серу			
14. Цистеин	Цис	Cys C	$-\text{CH}_2-\text{SH}$
15. Метионин	Мет	Met M	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$
III. Аминокислоты, содержащие ароматический радикал			
16. Фенилаланин	Фен	Phe F	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$
17. Тирозин	Тир	Tyr Y	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$
IV. Аминокислоты с гетероциклическими радикалами			
18. Триптофан	Три	Trp W	$-\text{CH}_2-\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2$
19. Гистидин	Гис	His H	$-\text{CH}_2-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3$
V. Иминокислота			
20. Пролин	Про	Pro P	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$ Дана полная формула

6. Структурная организация белков: первичная, вторичная, третичная, четвертичная.

Уровни структуры белков: 1 — первичная, 2 — вторичная, 3 — третичная, 4 — четвертичная

- Первичная структура — последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Важными особенностями первичной структуры являются консервативные мотивы — сочетания аминокислот, играющих ключевую роль в функциях белка. Консервативные мотивы сохраняются в процессе эволюции видов, по ним часто удаётся предсказать функцию неизвестного белка.

- Вторичная структура — локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями. Ниже приведены самые распространённые типы вторичной структуры белков:

- Третичная структура — пространственное строение полипептидной цепи (набор пространственных координат составляющих белок атомов). Структурно состоит из элементов вторичной структуры, стабилизированных различными типами взаимодействий, в которых гидрофобные взаимодействия играют важнейшую роль. Четвертичная структура (или субъединичная, доменная) — взаимное расположение нескольких полипептидных цепей в составе единого белкового комплекса. Белковые молекулы, входящие в состав белка с четвертичной структурой, образуются на рибосомах по отдельности и лишь после окончания синтеза образуют общую надмолекулярную структуру. В состав белка с четвертичной структурой могут входить как идентичные, так и различающиеся полипептидные цепочки. В стабилизации четвертичной структуры принимают участие те же типы взаимодействий, что и в стабилизации третичной. Надмолекулярные белковые комплексы могут состоять из десятков молекул.

Формирование трёхмерной структуры белков - важнейший биологический процесс, так как от пространственной структуры белков зависит их биологическая функция.

Процесс сворачивания полипептидной цепи в правильную пространственную структуру получил название "фолдинг белков". Индивидуальные белки, продукты одного

гена, имеют идентичную аминокислотную последовательность и приобретают в одинаковых условиях клетки одинаковую конформацию и функцию. Это положение подтверждается способностью некоторых белков после денатурации (при которой происходит разрыв слабых связей, но не повреждается первичная структура белков) спонтанно восстанавливать свою уникальную конформацию и функцию.

Однако в клетке концентрация белков настолько высока, что существует большая вероятность взаимодействия белков с несформированной конформацией. На их поверхности располагаются гидрофобные радикалы, склонные к объединению. Поэтому для многих белков, имеющих высокую молекулярную массу и сложную пространственную структуру, фолдинг протекает при участии специальной группы белков, которые называют "шапероны" (от франц. *shaperon* - няня).

В стабилизации третичной структуры принимают участие:

- ковалентные связи (между двумя остатками цистеина — дисульфидные мостики);
- ионные связи между противоположно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков;
- водородные связи;
- гидрофильно-гидрофобные взаимодействия. При взаимодействии с окружающими молекулами воды белковая молекула «стремится» свернуться так, чтобы неполярные боковые группы аминокислот оказались изолированы от водного раствора; на поверхности молекулы оказываются полярные гидрофильные боковые группы.

7. Функции белков.

В организме человека содержится свыше 50 000 индивидуальных белков, отличающихся первичной структурой, конформацией, строением активного центра и функциями. Белки построены из 20 химически различных аминокислот, каждая из которых может занимать любое положение в полипептидной цепи. Кроме того, белки различаются количеством аминокислот, из которых они построены.

Однако большинство таких белков в среде должны принимать множество конформаций с приблизительно одинаковой энергией, но разными химическими свойствами и функциями. Поэтому в эволюции, по-видимому, была отобрана лишь небольшая часть возможных вариантов белков, которые способны принимать единственную стабильную конформацию.

Таким образом, первичная структура известных белков, отобранных эволюцией, обеспечивает исключительную стабильность одной из возможных конформаций, которая и определяет особенности функционирования данного белка.

Возникновение новых белков часто связано с незначительными изменениями в структуре уже имеющихся белков. Кроме того, благодаря генетическим механизмам, о которых будет сказано в разделе 4, белок с полезными свойствами или основная структурная часть этого белка могут входить в состав других белков. Такие белки, имеющие схожую последовательность аминокислот и родственные функции, объединяют в семейства родственных белков.

8. Классификация белков.

Из-за относительно больших размеров белковых молекул, сложности их строения и отсутствия достаточно точных данных о структуре большинства белков еще нет рациональной химической классификации белков. Существующая классификация в значительной мере условна и построена главным образом на основании физико-химических свойств белков, источников их получения, биологической активности и других, нередко случайных, признаков. Так, по физико-химическим свойствам белки делят на фибриллярные и глобулярные, на гидрофильные(растворимые) и гидрофобные (нерастворимые) и т.п. По источнику получения белки подразделяют на животные, растительные и бактериальные; на белки мышечные, нервной ткани, кровяной сыворотки и т.п.; по биологической активности - на белки-ферменты, белки-гормоны, структурные

белки, сократительные белки, антитела и т.д. Следует, однако, иметь в виду, что из-за несовершенства самой классификации, а также вследствие исключительного многообразия белков многие из отдельных белков не могут быть отнесены ни к одной из описываемых здесь групп.

Все белки принято делить на простые белки, или протеины, и сложные белки, или протеиды (комплексы белков с небелковыми соединениями). Простые белки являются полимерами только аминокислот; сложные, помимо остатков аминокислот, содержат также небелковые, так называемые простетические группы.

Протеины представляют собой простые белки, состоящие только из остатков аминокислот. Они широко распространены в животном и растительном мире.

Гистоны
Протамины
Глютелины
Проламины
Протеиноиды
Альбумины
Глобулины

Сложные белки делят на ряд классов в зависимости от характера простетической группы.

Фосфопротеины
Липопротеины
Металлопротеины
Гликопротеины
Хромопротеины
Нуклеопротеины

1. 2 Лекция № 2 (2 часа).

Тема: «Биологически активные вещества: ферменты, витамины»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Строение и функции ферментов.
2. Классификация ферментов.
3. Участие ферментов в биохимических процессах.
4. Кинетика ферментативных процессов
5. Понятие о витаминах. История открытия.
6. Номенклатура.
7. Классификация витаминов.
8. Характеристика жир- и водорастворимых витаминов.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Строение и функции ферментов.

Ферменты (энзимы) - это высокоспецифичные белки, выполняющие функции биологических катализаторов. Катализатор - это вещество, которое ускоряет химическую реакцию, но само в ходе этой реакции не расходуется.

Все ферменты по химической природе являются простыми или сложными белками с большой молекулярной массой (каталаза - 248000 Да, пируват- дегидрогеназа - 4500000 Да). При гидролизе образуют аминокислоты и, так же как и белки чувствительны к действию высоких температур, излучению, солям тяжелых металлов, концентрированных кислот и щелочей.

По строению ферменты могут быть однокомпонентными, простыми белками, состоящими только из аминокислот и двухкомпонентными, сложными белками. Во втором случае в составе фермента обнаруживается добавочная группа небелковой природы.



Чаще всего добавочную группу, прочно связанную, не отделяемую от белковой части (апофермента), называют простетической группой; в отличие от этого добавочную группу, легко отделяющуюся от апофермента и способную к самостоятельному существованию, обычно именуют коферментом.

Характерной особенностью двухкомпонентных ферментов является то, что ни белковая часть, ни добавочная группа в отдельности не обладают заметной каталитической активностью. Только их комплекс проявляет ферментативные свойства. При этом белок резко повышает каталитическую активность добавочной группы, присущую ей в свободном состоянии в очень малой степени; добавочная же группа стабилизирует белковую часть и делает ее менее уязвимой к денатурирующим агентам.

2. Классификация ферментов.

По типу катализируемых реакций ферменты подразделяются на 6 классов согласно иерархической классификации ферментов (КФ, ЕС — Enzyme Comission code). Классификация была предложена Международным союзом биохимии и молекулярной биологии (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Каждый класс содержит подклассы, так что фермент описывается совокупностью четырех чисел, разделённых точками. Например, пепсин имеет название ЕС 3.4.23.1. Первое число грубо описывает механизм реакции, катализируемой ферментом:

- **ЕС 1:** Оксидоредуктазы, катализирующие окисление или восстановление. Пример: каталаза, алкогольдегидрогеназа

- **ЕС 2:** Трансферазы, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую. Среди трансфераз особо выделяют киназы, переносящие фосфатную группу, как правило, с молекулы АТФ.

- **ЕС 3:** Гидролазы, катализирующие гидролиз химических связей. Пример: эстеразы, пепсин, трипсин, амилаза, липопротеинлипаза

- **ЕС 4:** Лиазы, катализирующие разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойной связи в одном из продуктов.

- **ЕС 5:** Изомеразы, катализирующие структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата.

- **ЕС 6:** Лигаза, катализирующие образование химических связей между субстратами за счет гидролиза АТФ. Пример: ДНК-полимераза

Будучи катализаторами, ферменты ускоряют как прямую, так и обратную реакции, поэтому, например, лиазы способны катализировать и обратную реакцию — присоединение по двойным связям.

Полная номенклатура отражена на сайте <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

3. Участие ферментов в биохимических процессах.

Субстрат – вещество, которое вступает в химическую реакцию.

Продукт – вещество, которое образуется в ходе химической реакции.

Энзимология– это раздел биохимии, изучающий ферменты и катализируемые ими реакции. **Медицинская энзимология**– это раздел биохимии, изучающий применение ферментов в медицине. В области медицинской энзимологии выделяют три основных направления исследований: энзимопатология, энзимодиагностика и энзимотерапия.

Энзимопатология— это частная медицинская энзимология, которая изучает молекулярные основы развития патологического процесса, вызванного нарушением механизмов регуляции активности или синтеза ферментов.

Метаболит- вещество, которое участвует в метаболических процессах.

В любой каталитической реакции, осуществляемой ферментами, различают три стадии. Образование фермент-субстратного комплекса. На этой стадии активный центр фермента, связывается с субстратами за счет слабых связей, обычно водородных. Особенностью этого этапа является полная обратимость, так как фермент-субстратный комплекс легко может распадаться на фермент и субстраты. На этой стадии возникает благоприятная ориентация молекул субстратов, что способствует ускорению их взаимодействия. Эта стадия проходит с участием каталитического участка активного центра. Сущность этого этапа состоит в снижении энергии активации и ускорении реакции между субстратами. Результатом этого этапа является образование нового продукта. На этой стадии происходит отделение готового продукта от активного центра с освобождением фермента, который вновь готов для осуществления своей функции. В клетке ферменты, катализирующие многостадийные процессы часто объединяются в комплексы, называемые мультиферментными системами. Чаще всего эти комплексы встроены в биомембраны или связаны с органоидами клеток. Такое объединение ферментов делает их работу более эффективной. В некоторых случаях белки-ферменты содержат небелковый компоненты, участвующие в катализе. Такие небелковые элементы называются коферментами. Большинство коферментов в своем составе содержат витамины. Важнейшим свойством ферментов является их высокая специфичность. В биохимии существует правило: одна реакция – один фермент. Различают два вида специфичности: специфичность действия и специфичность субстратная. Специфичность действия - это способность фермента катализировать только один определенный тип химической реакции. Если субстрат может вступать в различные реакции, то для каждой реакции нужен свой фермент. Субстратная специфичность – это способность фермента действовать только на определенные субстраты. Субстратная специфичность бывает абсолютная и относительная. При абсолютной специфичности фермент катализирует превращения только одного субстрата. При относительной - может быть группа похожих субстратов.

4. Кинетика ферментативных процессов

Ферментативная активность реакции зависит от:

концентрации фермента и субстрата, температуры, pH присутствия ингибиторов.

Температура

Коэффициент, указывающий, во сколько раз повышается скорость реакции при повышении температуры на каждые 10°C, называется температурным коэффициентом.

Для большинства биологических реакций при повышении температуры на 10°C скорость увеличивается в 2-4 раза.

Вследствие белковой природы фермента тепловая денатурация при повышении температуры будет снижать эффективную концентрацию фермента с соответствующим снижением скорости реакции.

Так, при температуре, не превышающей 45–50°C, скорость реакции увеличивается согласно теории химической кинетики.

pH

Умеренные изменения pH оказывают влияние на ионное состояние фермента и субстрата.

Как показывают измерения ферментативной активности при различных pH, оптимум активности для разных ферментов находится в широких пределах pH.

Концентрация фермента и субстрата

Одним из наиболее существенных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции, является концентрация субстрата (или субстратов) и продукта (продуктов).

При постоянной концентрации фермента скорость реакции постепенно увеличивается, достигая определенного максимума, когда дальнейшее увеличение количества субстрата практически не оказывает влияния на скорость ферментативной реакции.

В таких случаях принято считать, что субстрат находится в избытке, а фермент полностью насыщен, т.е. все молекулы фермента связаны с субстратом.

Ограничивающим скорость реакции фактором в последнем случае становится концентрация фермента.

5. Понятие о витаминах. История открытия.

Витамины – особая группа органических веществ, выполняющая важные биологические и биохимические функции в живых организмах. Эти органические соединения различной химической природы синтезируются главным образом растениями, а также микроорганизмами. Человеку и животному, в организме которого витамины не синтезируются, они требуются по сравнению с питательными веществами (белками, углеводами, жирами) в очень малых количествах.

Развитие учения о витаминах связано с именем отечественного врача-Н. И. Лунина. Он пришел к заключению, что, кроме белков, жиров, молочного сахара, солей и воды, животные нуждаются в каких – то еще неизвестных веществах, незаменимых для питания. В своей работе «О значении минеральных солей в питании животных» Лунин писал: «...представляет большой интерес исследовать эти вещества и изучить их значение для питания». В 1912 году был открыт первый витамин К. Функом. Он предложил называть эти неизвестные вещества витаминами.

Витамины (от лат. *Vita* – жизнь) - пищевые факторы, которые, присутствуя в небольших количествах в пище, обеспечивают нормальное протекание биохимических и физиологических процессов путем участия в регуляции обмена целостного организма.

Нарушение нормального процесса обмена часто связаны с недостаточным поступлением витаминов в организм, полным отсутствием их в потребляемой пище или нарушением их всасывания. Транспорта. В результате развиваются авитаминозы – болезни, возникающие на почве полного отсутствия в пище или полного нарушения усвоения какого-либо витамина, и гиповитаминозы, обусловленные недостаточным поступлением витаминов с пищей. Многие расстройства обмена при авитаминозах обусловлены нарушениями деятельности или активности ферментных систем. Поскольку многие витамины входят в состав простетических групп ферментов.

Профилактика витаминной недостаточности заключается в производстве пищевых продуктов, богатых витаминами, в достаточном потреблении овощей и фруктов, правильном хранении пищевых продуктов и рациональной технологической обработке. При недостатке витаминов – дополнительное обогащение питания витаминными препаратами, витаминизированными пищевыми продуктами массового потребления.

6. Номенклатура.

Исторически витамины обозначали латинскими буквами по порядку их научного описания. В дальнейшем оказалось, что ряд веществ, изначально отнесенных к витаминам, таковыми не являются. К примеру, флавоноиды ранее выделяли в группу витамина Р, а незаменимые жирные кислоты — в группу витамина F. С другой стороны, фракция, изначально обозначенная как витамин В, при более пристальном исследовании оказалась смесью веществ, которым пришлось присвоить индексы начиная с В₁. Более того, ряд витаминов оказался химически сходным с витаминами группы В — их перенесли в эту группу. Витамин, изначально названный РР (сокращение от **P**ellagra **P**reventing factor — фактор, предотвращающий пеллагру), теперь обозначают как витамин В₃.

На сегодняшний день в официально утвержденный список витаминов входят девять водорастворимых витаминов (витамин С и восемь витаминов группы В) и восемь жирорастворимых витаминов (витамины А, Е, К и пять витаминов группы D). В отечественных публикациях можно по-прежнему встретить такие названия, как витамины F, P или PP (публикации о растениях на этом сайте — не исключение), но эти обозначения не имеют официального статуса и сохранились исключительно по историческим причинам.

В научной литературе, а зачастую и в популярных публикациях, наряду с индексами используют тривиальные названия витаминов. Так, витамин С достаточно широко известен под названием «аскорбиновая кислота». Интересная история связана с вышеупомянутым витамином PP, ныне В₃. Химически это соединение представляет собой никотиновую кислоту — окисленное производное никотина. Чтобы избежать нежелательных ассоциаций в массовом сознании витамина В₃ с никотином (который витамином отнюдь не является!) был изобретен термин «ниацин» (niacin = **n**icotinic **a**cid + **v**itamin**i**n).

7. Классификация витаминов.

По химическому строению и физико-химическим свойствам (в частности, по растворимости) витамины делят на 2 группы.

А. Водорастворимые

- Витамин В₁ (тиамин);
- Витамин В₂ (рибофлавин);
- Витамин PP (никотиновая кислота, никотинамид, витамин В₃);
- Пантотеновая кислота (витамин В₅);
- Витамин В₆ (пиридоксин);
- Биотин (витамин Н);
- Фолиевая кислота (витамин В₉);
- Витамин В₁₂ (кобаламин);
- Витамин С (аскорбиновая кислота);
- Витамин Р (биофлавоноиды).

Б. Жирорастворимые

- Витамин А (ретинол);
- Витамин D (холекальциферол);
- Витамин Е (токоферол);
- Витамин К (филлохинон).

Водорастворимые витамины при их избыточном поступлении в организм, будучи хорошо растворимыми в воде, быстро выводятся из организма.

Жирорастворимые витамины хорошо растворимы в жирах и легко накапливаются в организме при их избыточном поступлении с пищей. Их накопление в организме может вызвать расстройство обмена веществ, называемое гипervитаминозом, и даже гибель организма.

8. Характеристика жиро- и водорастворимых витаминов.

Все виды витаминов оказывают разное действие на организм. Причем это действие не всегда положительное, поскольку передозировка некоторых витаминов может повлечь за собой серьезные недомогания

- **витамин А.** Он необходим для роста и регенерации тканей организма, в частности, для заживления их после воспалений или травм, участвует в росте хрящей и костей. Немаловажна роль витамина А в развитии эмбриона с плацентой у женщин и в образовании гормона тестостерона и функционировании половых желез у мужчин. Дефицит витамина А приводит к «куриной слепоте», кроме того, этот витамин не позволяет бактериям попадать в роговицу глаза. Витамин А является активным участником в регулировании иммунных процессов;

- **витамин Д** регулирует обмен фосфора и гомеостаз кальция, снижает уровень в крови человека щелочной фосфатазы;
- **витамин Е**. Это главный антиоксидант в организме человека, стабилизирует клеточные мембраны, тем самым предотвращает гемолиз. Витамин Е влияет на синтез белка, без него невозможны клеточное дыхание и обмен нуклеиновых кислот. Этот витамин предупреждает образование тромбов и воспалительных процессов, способствует окислению холестерина. Витамин обеспечивает нормальное протекание беременности и усиливает действие гормона эстрогена. Он предупреждает поражение сердечной мышцы, стимулирует выработку гормонов гипофиза, предотвращает некроз печени и ее жировую дистрофию, а также нефроз почек;
- **витамин К** нужен для синтеза некоторых белков плазмы крови, для укрепления костей, для красоты зубов, препятствует кровоизлияниям и снижает проницаемость сосудов. В печени витамин К способствует усиленному образованию желчи;
- **витамин В1 (тиамин)** нужен для нормальной работы нервной системы, нормального уровня сахара крови, повышает уровень холестерина. Тиамин необходим для повышения иммунитета и усиления сопротивляемости инфекциям, повышает артериальное давление. Также витамин В1 нужен для нормального функционирования органов пищеварения и эндокринной системы, предотвращая язвенную болезнь, хронический гастрит, хронический энтерит и энтероколит, нарушения функций печени (тяжелая степень), хронические гепатиты, печеночную недостаточность;
- **витамин В2 (рибофлавин)**: незаменим в метаболизме углеводов, белков и жиров, в выработке гормонов коры надпочечников, регулирует уровень сахара крови, повышает усвояемость белков. Рибофлавин снижает уровень билирубина при гепатите, участвует в образовании соляной кислоты, стимулирует работу печени. Витамин В2 регулирует работу нервной системы, улучшает зрение, снижает артериальное давление и уменьшает тахикардию, обладает антигистаминным действием и повышает устойчивость организма к различным инфекциям;
- **витамин РР (ниацин)** регулирует работу центральной нервной системы, снижает уровень сахара крови, очень важен для состояния кожи и для работы мышц. Ниацин обладает сосудорасширяющим действием на капилляры, ускоряет кровообращение в них, повышает венозное давление. Витамин РР повышает кислотность желудка и усиливает его моторику;
- **витамин В5 (пантотеновая кислота)** незаменим в процессах роста, нормализует обменные процессы в коже, слизистых оболочках, ускоряет заживление ран и рост волос;
- **витамин В6 (пиридоксин)** незаменим в аминокислотном обмене, снижает уровень глюкозы, уменьшает артериальное давление, противодействует депрессии. У женщин пиридоксин снижает болезненные симптомы ПМС;
- **витамин В12 (кобаламин)**: участвует в преобразовании фолиевой кислоты в форму, которая необходима для кроветворения, регулирует процесс обмена белков и нуклеиновых кислот. Этот витамин особенно необходим при лечении пониженной кислотности желудка, анемии, заболеваниях нижних отделов позвоночника, невралгиях и склерозе, болезнях печени, хроническом панкреатите;
- **витамин С (аскорбиновая кислота)**: незаменимый антиоксидант, эффективный восстановитель, незаменим в синтезе гемоглобина, улучшает усваивание железа, усиливает иммунитет. Применяется в лечении хронического алкоголизма и его профилактике, пневмонии, ревматизма, катаракты, геморрагических диатезов, кровоточивости десен и незаживающих ран;
- **витамин Н (биотин)**: важен для протекания процесса обмена белков, жиров и углеводов, синтеза глюкозы и аминокислот. Витамин необходим при таких заболеваниях, как цирроз, сахарный диабет, анемия, депрессия, бессонница;

- **витамин Р (рутин):** берет участие в образовании главного вещества соединительной ткани, способствует нормальному усвоению аскорбиновой кислоты, приводит в норму артериальное давление, не дает аллергии развиваться. Содержится в цитрусовых, шиповнике, черной смородине и болгарском перце (красном);
- **убихинон (коэнзим Q):** помогает тканям дышать, довольно эффективен, если применять для лечения дистрофии тканей и сердечной недостаточности. Содержится в грибах, микроорганизмах, живых клетках растений и животных.

1.3 Лекция № 3 (2 часа).

Тема: «Основные системы регуляции метаболизма и межклеточной коммуникации»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Системы регуляции метаболизма
2. Иерархия регуляторных систем
3. Роль гормонов в регуляции обмена веществ и функции
4. Классификация и номенклатура гормонов.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Системы регуляции метаболизма

Для нормального функционирования многоклеточного организма необходима взаимосвязь между отдельными клетками, тканями и органами. Эту взаимосвязь осуществляют 4 основные системы регуляции.

- Центральная и периферическая нервная системы через нервные импульсы и нейромедиаторы;
- Эндокринная система через эндокринные железы и гормоны, которые секретируются в кровь и влияют на метаболизм различных клеток-мишеней;
- Паракринная и аутокринная системы посредством различных соединений, которые секретируются в межклеточное пространство и взаимодействуют с рецепторами либо близлежащих клеток, либо той же клетки (простагландины, гормоны ЖКТ, гистамин и др.);
- Иммунная система через специфические белки (цитокины, антитела).

2. Иерархия регуляторных систем

Системы регуляции обмена веществ и функций организма образуют 3 иерархических уровня.

Первый уровень - ЦНС. Нервные клетки получают сигналы, поступающие из внешней и внутренней среды, преобразуют их в форму нервного импульса и передают через синапсы, используя химические сигналы - медиаторы. Медиаторы вызывают изменения метаболизма в эффекторных клетках.

Второй уровень - эндокринная система. Включает гипоталамус, гипофиз, периферические эндокринные железы (а также отдельные клетки), синтезирующие гормоны и высвобождающие их в кровь при действии соответствующего стимула.

Третий уровень - внутриклеточный. Его составляют изменения метаболизма в пределах клетки или отдельного метаболического пути

3. Роль гормонов в регуляции обмена веществ и функции

Интегрирующими регуляторами, связывающими различные регуляторные механизмы и метаболизм в разных органах, являются гормоны. Они функционируют как химические посредники, переносящие сигналы, возникающие в различных органах и ЦНС. Ответная реакция клетки на действие гормона очень разнообразна и определяется как химическим строением гормона, так и типом клетки, на которую направлено действие гормона.

В крови гормоны присутствуют в очень низкой концентрации. Для того чтобы передавать сигналы в клетки, гормоны должны распознаваться и связываться особыми белками клетки - рецепторами, обладающими высокой специфичностью.

Физиологический эффект гормона определяется разными факторами, например концентрацией гормона (которая определяется скоростью инактивации в результате распада гормонов, протекающего в основном в печени, и скоростью выведения гормонов и его метаболитов из организма), его сродством к белкам-переносчикам (стероидные и тиреоидные гормоны транспортируются по кровеносному руслу в комплексе с белками), количеством и типом рецепторов на поверхности клеток-мишеней.

Синтез и секреция гормонов стимулируются внешними и внутренними сигналами, поступающими в ЦНС.

Эти сигналы по нейронам поступают в гипоталамус, где стимулируют синтез пептидных релизинг-гормонов (от англ. release - освобождать) - либеринов и статинов, которые, соответственно, стимулируют или ингибируют синтез и секрецию гормонов передней доли гипофиза. Гормоны передней доли гипофиза, называемые тройными гормонами, стимулируют образование и секрецию гормонов периферических эндокринных желёз,

4. Классификация и номенклатура гормонов.

Все гормоны классифицируют по химическому строению, биологическим функциям и механизму действия.

1. Классификация гормонов по химическому строению

По химическому строению гормоны делят на 3 группы: пептидные (или белковые), стероидные и непептидные производные аминокислот.

2. Классификация гормонов по биологическим функциям

По биологическим функциям гормоны можно разделить на несколько групп. Эта классификация условна, поскольку одни и те же гормоны могут выполнять разные функции. Например, адреналин участвует в регуляции обмена жиров и углеводов и, кроме этого, регулирует частоту сердечных сокращений, АД, сокращение гладких мышц. Кортизол не только стимулирует глюконеогенез, но и вызывает задержку NaCl.

Классификация гормонов по химическому строению

Пептидные гормоны	Стероиды	Производные аминокислот
Адренокортикотропный гормон (кортикотропин, АКТГ)	Альдостерон	Адреналин
Гормон роста (соматотропин, ГР, СТГ)	Кортизол	Норадреналин
Тиреотропный гормон (тиреотропин, ТТГ)	Кальцитриол	Трийодтиронин (Т ₃)
Лактогенный гормон (пролактин, ЛТГ)	Тестостерон	Тироксин (Т ₄)
Лютеинизирующий гормон (лютропин, ЛГ)	Эстрадиол	
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	Прогестерон	
Меланоцитстимулирующий гормон (МСГ)		
Хорионический гонадотропин (ХГ)		
Антидиуретический гормон		

(вазопрессин, АДГ)		
Окситоцин		
Паратиреоидный гормон (паратгормон, ПТГ)		
Кальцитонин		
Инсулин		
Глюкагон		

Классификация гормонов по биологическим функциям

Регулируемые процессы	Гормоны
Обмен углеводов, липидов, аминокислот	Инсулин, глюкагон, адреналин, кортизол, тироксин, соматотропин
Водно-солевой обмен	Альдостерон, антидиуретический гормон
Обмен кальция и фосфатов	Паратгормон, кальцитонин, кальцитриол
Репродуктивная функция	Эстрадиол, тестостерон, прогестерон, гонадотропные гормоны
Синтез и секреция гормонов эндокринных желёз	Тропные гормоны гипофиза, либерины и статины гипоталамуса
Изменение метаболизма в клетках, синтезирующих гормон	Эйкозаноиды, гистамин, секретин, гастрин, соматостатин, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), цитокины

1. 4 Лекция № 4 (2 часа).

Тема: «Метаболизм глюкозы в клетке. Метаболизм гликогена»

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Фосфорилирование глюкозы и дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата
2. Метаболизм глюкозо-6-фосфата.
3. Строении и функции гликогена. Гликогеногенез. Гликогенолиз.
4. Биологическое значение обмена гликогена в печени и мышцах.
5. Регуляция метаболизма гликогена. Катаболизм глюкозы.

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Фосфорилирование глюкозы и дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата

После всасывания в кишечнике моносахариды поступают в воротную вену и далее преимущественно в печень. Поскольку в составе основных углеводов пищи преобладает глюкоза, её можно считать основным продуктом переваривания углеводов. Другие моносахариды, поступающие из кишечника в процессе метаболизма, могут превращаться в глюкозу или продукты её метаболизма. Часть глюкозы в печени депонируется в виде гликогена, а другая часть через общий кровоток доставляется и используется разными тканями и органами. В дальнейших превращениях в клетках глюкоза и другие моносахариды участвуют только в виде фосфорных эфиров. Фосфорилирование свободных моносахаридов - обязательная реакция на пути их использования, она приводит к образованию более реакционно-способных соединений и поэтому может рассматриваться как реакция активации.

Глюкоза, поступающая в клетки органов и тканей, сразу же подвергается фосфорилированию с использованием АТФ. Эту реакцию во многих тканях катализирует фермент гексокиназа, а в печени и поджелудочной железе - фермент глюкокиназа. Фосфорилирование глюкозы - практически необратимая реакция, так как она протекает с использованием значительного количества энергии. Образование глюкозо-6-фосфата в клетке - своеобразная "ловушка" для глюкозы, так как мембрана клетки непроницаема для фосфорилированной глюкозы (нет соответствующих транспортных белков). Кроме того, Фосфорилирование уменьшает концентрацию свободной глюкозы в цитоплазме. В результате создаются благоприятные условия для облегчённой диффузии глюкозы в клетки из крови.

2. Метаболизм глюкозо-6-фосфата.

Глюкозо-6-фосфат может использоваться в клетке в различных превращениях, основными из которых являются: синтез гликогена, катаболизм с образованием CO_2 и H_2O или лактата, синтез пентоз. Распад глюкозы до конечных продуктов служит источником энергии для организма. Вместе с тем в процессе метаболизма глюкозо-6-фосфата образуются промежуточные продукты, используемые в дальнейшем для синтеза аминокислот, нуклеотидов, глицерина и жирных кислот. Таким образом, глюкозо-6-фосфат - не только субстрат для окисления, но и строительный материал для синтеза новых соединений

3. Строение и функции гликогена. Гликогеногенез. Гликогенолиз.

Многие ткани синтезируют в качестве резервной формы глюкозы гликоген. Синтез и распад гликогена обеспечивают постоянство концентрации глюкозы в крови и создают депо для её использования тканями по мере необходимости. Гликоген - разветвлённый гомополимер глюкозы, в котором остатки глюкозы соединены в линейных участках α -1,4-гликозидной связью. В точках ветвления мономеры соединены α -1,6-гликозидными связями. Эти связи образуются примерно с каждым десятым остатком глюкозы. Следовательно, точки ветвления в гликогене встречаются примерно через каждые десять остатков глюкозы. Так возникает древообразная структура с молекулярной массой $>10^7$ Д, что соответствует приблизительно 50 000 остатков глюкозы. В клетках животных гликоген - основной резервный полисахарид. При полимеризации глюкозы снижается растворимость образующейся молекулы гликогена и, следовательно, её влияние на осмотическое давление в клетке. Это обстоятельство объясняет, почему в клетке депонируется гликоген, а не свободная глюкоза.

Гликоген хранится в цитозоле клетки в форме гранул диаметром 10-40 нм. С гранулами связаны и некоторые ферменты, участвующие в метаболизме гликогена, что облегчает их взаимодействие с субстратом. Разветвлённая структура гликогена обуславливает большое количество концевых мономеров, что способствует работе ферментов, отщепляющих или присоединяющих мономеры при распаде или синтезе гликогена, так как эти ферменты могут одновременно работать на нескольких ветвях молекулы. Гликоген депонируется главным образом в печени и скелетных мышцах.

После приёма пищи, богатой углеводами, запас гликогена в печени может составлять примерно 5% от её массы. В мышцах запасается около 1% гликогена, однако масса мышечной ткани значительно больше и поэтому общее количество гликогена в мышцах в 2 раза больше, чем в печени. Гликоген может синтезироваться во многих клетках, например в нейронах, макрофагах, клетках жировой ткани, но содержание его в этих тканях незначительно. В организме может содержаться до 450 г гликогена.

Распад гликогена печени служит в основном для поддержания уровня глюкозы в крови в постабсорбтивном периоде. Поэтому содержание гликогена в печени изменяется в зависимости от ритма питания. При длительном голодании оно снижается почти до нуля. Гликоген мышц служит резервом глюкозы - источника энергии при мышечном сокращении. Мышечный гликоген не используется для поддержания уровня глюкозы в

крови. Как уже упоминалось ранее, в клетках мышц нет фермента глюкозо-6-фосфатазы, и образование свободной глюкозы невозможно. Расход гликогена в мышцах зависит в основном от физической нагрузки

4. Биологическое значение обмена гликогена в печени и мышцах.

Сравнение схем синтеза и распада гликогена этих процессов позволяет сделать следующие выводы:

- синтез и распад гликогена протекают по разным метаболическими путям;
- печень запасает глюкозу в виде гликогена не столько для собственных нужд, сколько для поддержания постоянной концентрации глюкозы в крови, и, следовательно, обеспечивает поступление глюкозы в другие ткани. Присутствие в печени глюкозо-6-фосфатазы обуславливает эту главную функцию печени в обмене гликогена;
- функция мышечного гликогена заключается в освобождении глюкозо-6-фосфата, потребляемого в самой мышце для окисления и использования энергии;
- синтез гликогена - процесс эндергонический. Так на включение одного остатка глюкозы в полисахаридную цепь используется 1 моль АТФ и 1 моль УТФ;
- распад гликогена до глюкозо-6-фосфата не требует энергии;
- необратимость процессов синтеза и распада гликогена обеспечивается их регуляцией.

5. Регуляция метаболизма гликогена. Катаболизм глюкозы.

Процессы накопления глюкозы в виде гликогена и его распада должны быть согласованы с потребностями организма в глюкозе как источнике энергии. Одновременное протекание этих метаболических путей невозможно, так как в этом случае образуется "холостой" цикл, существование которого приводит только к бесполезной трате АТФ.

Изменение направления процессов в метаболизме гликогена обеспечивают регуляторные механизмы, в которых участвуют гормоны. Переключение процессов синтеза и мобилизации гликогена происходит при смене абсорбтивного периода на постабсорбтивный или состояния покоя организма на режим физической работы. В переключении этих метаболических путей в печени участвуют гормоны инсулин, глюкагон и адреналин, а в мышцах - инсулин и адреналин.

Характеристика гормонов, регулирующих обмен гликогена

Первичным сигналом для синтеза и секреции инсулина и глюкагона является изменение уровня глюкозы в крови. В норме концентрация глюкозы в крови соответствует 3,3-5,5 ммоль/л (60- 100 мг/дл).

Инсулин- белковый гормон, синтезируется и секретируется в кровь β -клетками островков Лангерханса поджелудочной железы, β -клетки чувствительны к изменениям содержания глюкозы в крови и секретируют инсулин в ответ на повышение её содержания после приёма пищи. Транспортный белок (ГЛЮТ-2), обеспечивающий поступление глюкозы в β -клетки, отличается низким сродством к ней. Следовательно, этот белок транспортирует глюкозу в клетку поджелудочной железы лишь после того, как её содержание в крови будет выше нормального уровня (более 5,5 ммоль/л).

В β -клетках глюкоза фосфорилируется глюкокиназой, имеющей также высокую K_m для глюкозы - 12 ммоль/л. Скорость фосфорилирования глюкозы глюкокиназой в β -клетках прямо пропорциональна её концентрации в крови.

Синтез инсулина регулируется глюкозой. Глюкоза (или её метаболиты), по-видимому, непосредственно участвуют в регуляции экспрессии гена инсулина. Секреция инсулина и глюкагона также регулируется глюкозой, которая стимулирует секрецию инсулина из β -клеток и подавляет секрецию глюкагона из α -клеток. Кроме того, сам инсулин снижает секрецию глюкагона

Глюкагон - "гормон голода", вырабатываемый α -клетками поджелудочной железы в ответ на снижение уровня глюкозы в крови. По химической природе глюкагон - пептид.

Адреналин выделяется из клеток мозгового вещества надпочечников в ответ на сигналы нервной системы, идущие из мозга при возникновении экстремальных ситуаций (например, бегство или борьба), требующих внезапной мышечной деятельности. Адреналин является сигналом "тревоги". Он должен мгновенно обеспечить мышцы и мозг источником энергии.

1. 5 Лекция № 5 (2 часа).

Тема: «Обмен липидов »

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Использование жиров в качестве источника энергии
2. Синтез и использование кетоновых тел
3. Метаболизм эйкозаноидов.
4. Обмен холестерина

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Использование жиров в качестве источника энергии

Жирные кислоты поступают с пищей или синтезируются в организме (кроме полиеновых кислот). Субстраты, необходимые для синтеза жирных кислот, образуются при катаболизме глюкозы и таким образом, часть глюкозы превращается сначала в жирные кислоты, а затем в жиры. Хотя специфический путь катаболизма жирных кислот заканчивается образованием ацетил-КоА, служащим исходным субстратом для синтеза жирных кислот, процессы синтеза и окисления жирных кислот необратимы. Они происходят в разных компартментах клеток (биосинтез протекает в цитозоле, а окисление - в митохондриях) и катализируются разными ферментами. Окисление жирных кислот как источников энергии увеличивается в постабсорбтивный период, при голодании и физической работе. В этих состояниях их концентрация в крови увеличивается в результате мобилизации из жировых депо, и они активно окисляются печенью, мышцами и другими тканями. При голодании часть жирных кислот в печени превращается в другие "топливные" молекулы - кетоновые тела. Они, в отличие от жирных кислот, могут использоваться нервной тканью как источник энергии. При голодании и длительной физической работе кетоновые тела служат источником энергии для мышц и некоторых других тканей.

2. Синтез и использование кетоновых тел

При голодании, длительной физической работе и в случаях, когда клетки не получают достаточного количества глюкозы, жирные кислоты используются многими тканями как основной источник энергии. В отличие от других тканей мозг и другие отделы нервной ткани практически не используют жирные кислоты в качестве источника энергии. В печени часть жирных кислот превращается в кетоновые тела, которые окисляются мозгом, нервной тканью, мышцами, обеспечивая достаточное количество энергии для синтеза АТФ и уменьшая потребление глюкозы. К кетоновым телам относят β -гидроксibuтират, ацетоацетат и ацетон. Первые две молекулы могут окисляться в тканях, обеспечивая синтез АТФ. Ацетон образуется только при высоких концентрациях кетоновых тел в крови и, выделяясь с мочой, выдыхаемым воздухом и потом, позволяет организму избавляться от избытка кетоновых тел.

3. Метаболизм эйкозаноидов.

Эйкозаноиды, включающие в себя простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и ряд других веществ, - высокоактивные регуляторы клеточных функций. Они имеют очень короткий $T_{1/2}$, поэтому оказывают эффекты как "гормоны местного действия", влияя на метаболизм продуцирующей их клетки по аутокринному механизму, и на окружающие клетки - по паракринному механизму. Эйкозаноиды участвуют во многих процессах: регулируют тонус ГМК и вследствие этого влияют на АД, состояние бронхов, кишечника, матки. Эйкозаноиды регулируют секрецию воды и натрия почками, влияют на образование тромбов. Разные типы эйкозаноидов участвуют в развитии воспалительного

процесса, происходящего после повреждения тканей или инфекции. Такие признаки воспаления, как боль, отёк, лихорадка, в значительной мере обусловлены действием эйкозаноидов. Избыточная секреция эйкозаноидов приводит к ряду заболеваний, например бронхиальной астме и аллергическим реакциям.

4. Обмен холестерина

Холестерол - стероид, характерный только для животных организмов. Он синтезируется во многих тканях, но основное место синтеза - печень. В печени синтезируется более 50% холестерина, в тонком кишечнике - 15- 20%, остальной холестерол синтезируется в коже, коре надпочечников, половых железах. Холестерол выполняет много функций: входит в состав всех мембран клеток и влияет на их свойства, служит исходным субстратом в синтезе жёлчных кислот и стероидных гормонов. Предшественники в метаболическом пути синтеза холестерола превращаются также в убинон - компонент дыхательной цепи и долихол, участвующий в синтезе гликопротеинов. Холестерол за счёт своей гидроксильной группы может образовывать эфиры с жирными кислотами. Этерифицированный холестерол преобладает в крови и запасается в небольших количествах в некоторых типах клеток, использующих его как субстрат для синтеза других веществ. Холестерол и его эфиры - гидрофобные молекулы, поэтому они транспортируются кровью только в составе разных типов ЛП. Обмен холестерола чрезвычайно сложен - только для его синтеза необходимо осуществление около 100 последовательных реакций. Всего в обмене холестерола участвует около 300 разных белков. Нарушения обмена холестерола приводят к одному из наиболее распространённых заболеваний - атеросклерозу. Смертность от последствий атеросклероза (инфаркт миокарда, инсульт) лидирует в общей структуре смертности населения. Атеросклероз - "полигенное заболевание", т.е. в его развитии участвуют многие факторы, важнейшие из которых наследственные. Накопление холестерола в организме приводит к развитию и другого распространённого заболевания - желчнокаменной болезни.

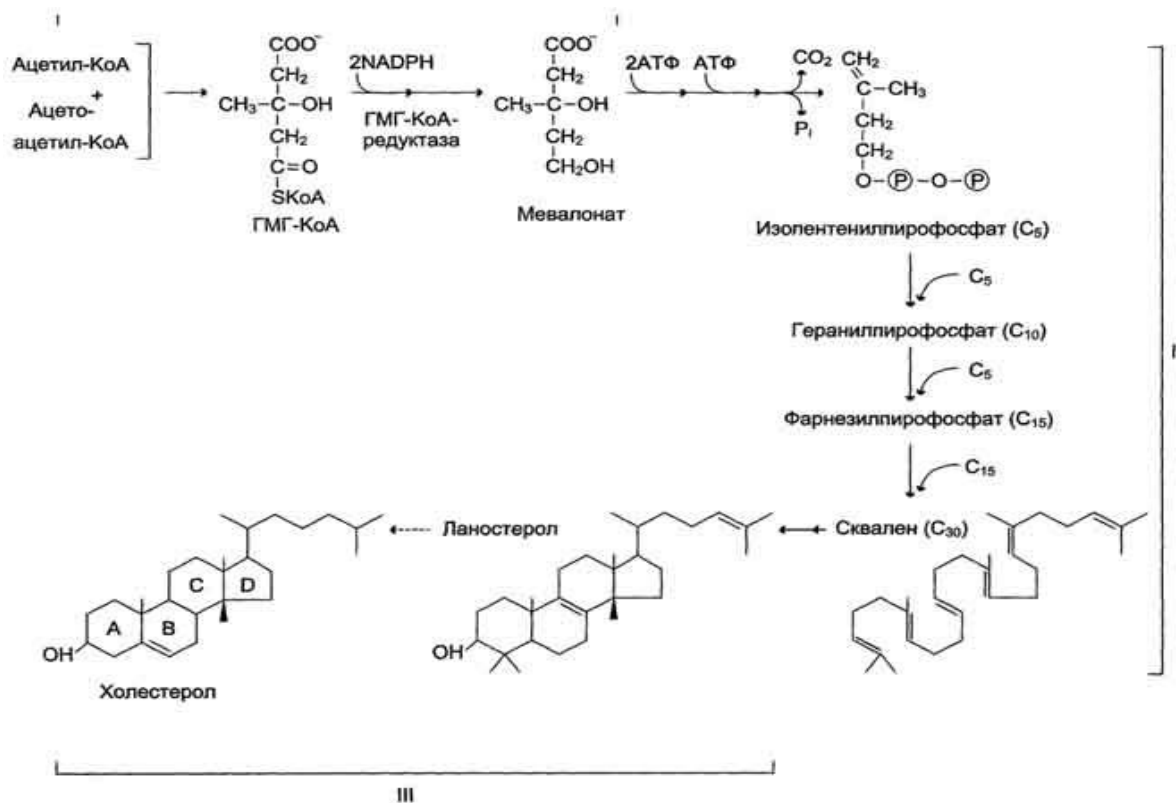


Рис. Синтез холестерола. C₅ - изопентенилпирофосфат; C₁₅ - Фарнезилпирофосфат. Все атомы углерода холестерола происходят из ацетил-КоА. Сквален - углеводород линейной структуры - превращается ферментом циклазой в ланостерол, содержащий 4

конденсированных кольца и гидроксильную группу. Ланостерол через ряд последовательных реакций превращается в холестерол (I, II, III - этапы синтеза).

1. 6 Лекция №6 (2 часа).

Тема: «Функции крови. Метаболизм эритроцитов»

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Общая характеристика крови как жидкой внутренней среды организма
2. Метаболизм эритроцитов
3. Особенности строения и дифференцировки эритроцитов
4. Метаболизм глюкозы в эритроцитах
5. Обезвреживание активных форм кислорода в эритроцитах

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Общая характеристика крови как жидкой внутренней среды организма

Кровь это часть жидкой внутренней среды организма, которая циркулирует по системе сосудов.

Кровь состоит из плазмы и форменных элементов (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты).

Все многочисленные **функции крови** можно разделить на 2 группы:

I. Транспортная функция

1. дыхательная - перенос газов (от легких к тканям кислород, от тканей к легким углекислый газ)
2. питательная или трофическая (перенос продуктов распада питательных веществ - аминокислоты, глюкоза, жирные кислоты - и минеральных веществ от кишечника к тканям)
3. выделительная или экскреторная (перенос продуктов обмена от тканей к органам выделения)
4. терморегуляторная (усредняет температуру сердцевин -внутренние органы, продуцирующие тепло- и оболочки -кожа, отдающая тепло)
5. гуморальная регуляция (переносит биологически активные вещества - гормоны, ферменты, витамины- от места продукции к органам мишеням)
6. поддержание pH внутренней среды (за счет работы буферных систем)
7. обеспечение водно-солевого баланса в организме (обмен обеспечивается за счет осмотического давления)
8. поддержание целостности тканей и их регенерации (перенос веществ, обеспечивающих креаторные связи, т.е. несущие генетическую информацию о строение ткани)

II. Защитная функция:

обеспечение иммунитета

клеточный иммунитет (нейтрофилы и лимфоциты)

гуморальный иммунитет (выработка лимфоцитами антител)

свертывание крови или гемостаз - образование тромбов в местах повреждения сосудов.

2. Метаболизм эритроцитов

Эритроциты - высокоспециализированные клетки, которые переносят кислород от лёгких к тканям и диоксид углерода, образующийся при метаболизме, из тканей к альвеолам лёгких. Транспорт O_2 и CO_2 в этих клетках осуществляет гемоглобин, составляющий 95% их сухого остатка. Организм взрослого человека содержит около 25×10^{12} эритроцитов, при этом каждые сутки обновляется примерно 1% этого количества клеток, т.е. в течение одной секунды в кровоток поступает около 2 млн эритроцитов.

3. Особенности строения и дифференцировки эритроцитов

Эритроциты - единственные клетки, которые имеют только клеточную мембрану и цитоплазму. Дифференцировка стволовых клеток в специализированные происходит в клетках костного мозга и заканчивается в кровотоке. Особенности строения эритроцитов соответствуют их функциям: большая площадь поверхности обеспечивает эффективность газообмена, эластичная клеточная мембрана облегчает движение по узким капиллярам, специальная ферментативная система защищает эти клетки от активных форм кислорода.

Дифференцировка эритроцитов. Эритроциты, так же как и другие клетки крови, образуются из полипотентных стволовых клеток костного мозга.

Размножение и превращение начальной клетки эритроидного ряда в унипотентную стимулирует ростовой фактор интерлейкин-3. Интерлейкин-3 синтезируется Т-лимфоцитами, а также клетками костного мозга. Это низкомолекулярный белок группы цитокинов - регуляторов роста и дифференцировки клеток.

Дальнейшую пролиферацию и дифференцировку унипотентной клетки эритроидного ряда регулирует синтезирующийся в почках гормон эритропоэтин. Скорость образования эритропоэтина в почках зависит от парциального давления кислорода. При недостатке кислорода скорость образования гормона повышается и, соответственно, количество эритроцитов тоже увеличивается. Хроническая почечная недостаточность сопровождается снижением образования эритропоэтина в почках, что приводит к развитию анемии.

В процессе дифференцировки на стадии эритроблеста происходят интенсивный синтез гемоглобина, конденсация хроматина, уменьшение размера ядра и его удаление. Образующийся ретикулоцит ещё содержит глобиновую мРНК и активно синтезирует гемоглобин. Циркулирующие в крови ретикулоциты лишаются рибосом, ЭР, митохондрий и в течение двух суток превращаются в эритроциты. Стволовая клетка превращается в эритроцит за две недели. Эритроциты не содержат ядра и поэтому не способны к самовоспроизведению и репарации возникающих в них повреждений. Эти клетки циркулируют в крови около 120 дней и потом разрушаются макрофагами в печени, селезёнке и костном мозге.

Строение эритроцитов. Двояковогнутая форма эритроцитов имеет большую площадь поверхности по сравнению с клетками сферической формы такого же размера. Это облегчает газообмен между клеткой и внеклеточной средой. Кроме того, такая форма, а также особенности строения мембраны и цитоскелета обеспечивают большую пластичность эритроцитов при прохождении ими мелких капилляров.

4. Метаболизм глюкозы в эритроцитах

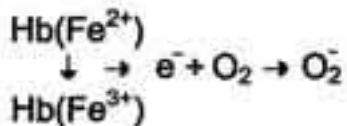
Эритроциты лишены митохондрий, поэтому в качестве энергетического материала они могут использовать только глюкозу. В эритроцитах катаболизм глюкозы обеспечивает сохранение структуры и функции гемоглобина, целостность мембран и образование энергии для работы ионных насосов. Глюкоза поступает в эритроциты путём облегчённой диффузии с помощью ГЛЮТ-2. Около 90% поступающей глюкозы используется в анаэробном гликолизе, а остальные 10% - в пентозофосфатном пути.

Конечный продукт анаэробного гликолиза лактат выходит в плазму крови и используется в других клетках, прежде всего гепатоцитах. АТФ, образующийся в анаэробном гликолизе, обеспечивает работу Na^+ , K^+ -АТФ-азы и поддержание самого гликолиза, требующего затраты АТФ в гексокиназной и фосфофруктокиназной реакциях. Важная особенность анаэробного гликолиза в эритроцитах по сравнению с другими клетками - присутствие в них фермента бисфосфоглицератмутаза. Бисфосфоглицератмутаза катализирует образование 2,3-бисфосфоглицерата из 1,3-бисфосфоглицерата. Образующийся только в эритроцитах 2,3-бисфосфоглицерат служит важным аллостерическим регулятором связывания кислорода гемоглобином.

Глюкоза в эритроцитах используется и в пентозофосфатном пути, окислительный этап которого обеспечивает образование кофермента NADPH, необходимого для восстановления глутатиона

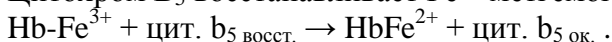
5. Обезвреживание активных форм кислорода в эритроцитах

Большое содержание кислорода в эритроцитах определяет высокую скорость образования супероксидного анион-радикала (O_2^-), пероксида водорода (H_2O_2) и гидроксил радикала (OH^\cdot). Эритроциты содержат ферментативную систему, предотвращающую токсическое действие активных форм кислорода и разрушение мембран эритроцитов. Постоянный источник активных форм кислорода в эритроцитах - неферментативное окисление гемоглобина в метгемоглобин:

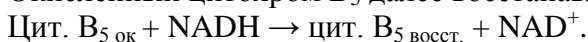


В течение суток до 3% гемоглобина может окисляться в метгемоглобин. Однако постоянно метгемоглобинредуктазная система восстанавливает метгемоглобин в гемоглобин. Метгемоглобинредуктазная система состоит из цитохрома B_5 и флавопротеина цитохром B_5 редуктазы, донором водорода для которой служит NADH, образующийся в глицеральдегиддегидрогеназной реакции гликолиза.

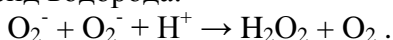
Цитохром B_5 восстанавливает Fe^{3+} метгемоглобина в Fe^{2+} :



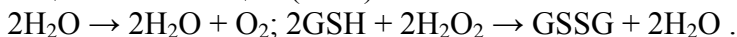
Окисленный цитохром B_5 далее восстанавливается цитохром B_5 редуктазой:



Супероксидный анион с помощью фермента супероксиддисмутазы превращается в пероксид водорода:



Пероксид водорода разрушается каталазой и содержащим селен ферментом глутатионпероксидазой. Донором водорода в этой реакции служит глутатион - трипептид глутамилцистеинилглицин (GSH)



Окисленный глутатион (GSSG) восстанавливается NADPH-зависимой глутатионредуктазой. Восстановление NADP для этой реакции обеспечивают окислительные реакции пентозофосфатного пути

1.7 Лекция № 7 (2 часа).

Тема: «Биохимия мышечной ткани»

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Краткая история развития изучения биохимии мышечной ткани
2. Превращение химической энергии в механическую в результате работы мышц
3. Саркомер – функциональная единица мышцы
4. Основные белки мышц: актин и миозин
5. Источники энергии для мышечного сокращения

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1. Краткая история развития изучения биохимии мышечной ткани

Исследования в области мышечного дыхания привели Сент-Джёрджи к вопросу о том, как движутся мышцы. Русские ученые ещё в 1939 году выяснили, что мышечный белок миозин способен взаимодействовать с АТФ и расщеплять её. Несмотря на то, что АТФ была открыта ещё в 1929 году, до сих пор было неизвестно, что она является источником энергии в клетках. Сент-Джёрджи предположил, что движение мышц можно объяснить взаимодействием миозина с АТФ. Для того, чтобы лучше разобраться, как

изменяется размер и форма мышечной ткани, и какие химические вещества участвуют в этом процессе, он выделил миозин из мышцы кролика, а затем при помощи подкожного шприца сформировал из него тонкие нити. Когда он добавил к ним АТФ, нити быстро сократились на треть, как при сокращении мышечного волокна. Позже Сент-Дьёрдьи говорил:

«Увидеть, как миозин быстро сокращается и как впервые вне организма воспроизводится наиболее древний и таинственный признак живого-движение... было самым волнующим моментом в моей работе»

Он со своей исследовательской группой в дальнейшем выяснили, что мышечная ткань содержит ещё один белок, актин, который объединяется с миозином с образованием связанных волокон, причем, чем выше содержание в мышце актина, тем сильнее она сокращается при добавлении АТФ. К 1944 году он окончательно выяснил механизм мышечных сокращений и роль АТФ в этом процессе. Был опубликован цикл статей «Исследования мышц в институте медицинской химии» с результатами пятилетней работы.

2. Превращение химической энергии в механическую в результате работы мышц

Основная функция мышц состоит в преобразовании химической энергии в механическую работу или силу. Главными биомеханическими показателями, характеризующими деятельность мышцы, являются:

а) сила, регистрируемая на ее конце (эту силу называют натяжением или силой тяги мышцы);

б) скорость изменения длины. Механические свойства мышц сложны и зависят от механических свойств элементов, образующих мышцу (мышечные волокна, соединительные образования и т.п.), и состояния мышцы (возбуждения, утомления и пр.).

Длину мышцы без нагрузки называют длиной покоя.

Сократимость - это способность мышцы сокращаться при возбуждении. В результате сокращения происходит укорочение мышцы, и возникает сила тяги.

Упругие свойства мышцы, т.е. ее способность восстанавливать первоначальную длину после устранения деформирующей силы.

Если мышцу растягивать повторно, через небольшие интервалы времени, то ее длина увеличится больше, чем при однократном воздействии. Это свойство мышц широко используется в практике при выполнении упражнений на гибкость (пружинистые движения, повторные махи и т.п.).

Прочность сухожилия в 150 раз больше прочности мышцы. Возникает вопрос: почему иногда рвется сухожилие, а мышца остается целой. По-видимому, это может происходить при очень быстрых движениях: мышца успевает амортизировать, а сухожилие - нет.

Релаксация - свойство мышцы, проявляющееся в постепенном уменьшении силы тяги при постоянной длине. Релаксация проявляется, например, при спрыгивании и последующем прыжке вверх, когда человек, глубоко подседая, делает паузу (чем пауза длительнее, тем сила отталкивания и высота выпрыгивания меньше).

Проявление активности мышцы определяется изменением ее длины, либо ее напряжения, либо того и другого одновременное.

Исходя из этого, мышцы, прикрепленные сухожилиями к костям, функционируют в двух режимах: изометрическом и анизометрическом.

При изометрическом (удерживающем) режиме длина возбужденной мышцы не изменяется (изо - равный, метр - длина /греческий/). Например, в режиме изометрического сокращения работают мышцы человека, который подтянулся и удерживает свое тело в этом положении.

При анизометрическом режиме длина мышцы укорачивается или удлиняется. В

анизометрическом режиме функционируют мышцы бегуна, пловца, велосипедиста и т.д.

У анизометрического режима две разновидности. В преодолевающем режиме мышца укорачивается в результате сокращения. А в уступающем режиме мышца растягивается внешней силой. Например, икроножная мышца спринтера функционирует в уступающем режиме при взаимодействии ноги с опорой в фазе амортизации, а в преодолевающем режиме - в фазе отталкивания.

Преодолевающая работа, при которой возрастание скорости сокращения мышцы вызывает уменьшение силы тяги. А в уступающем режиме наблюдается обратная картина: увеличение скорости растяжение мышцы сопровождается увеличением силы тяги. Это является причиной многочисленных травм у спортсменов (например, разрыва ахиллова сухожилия у спринтеров и прыгунов в длину).

Существуют два случая группового взаимодействия мышц: синергизм и антагонизм.

3. Саркомер – функциональная единица мышцы

Саркомер (sarcomere) [греч. sarx (sarkos) - мясо и meros - часть, доля] - повторяющийся участок (сократимая единица) миофибрилл поперечно-полосатых мышц; состоит из набора взаимодействующих друг с другом филаментов актина и миозина.

Функциональной единицей мышечного волокна является миофибрилла. . Миофибриллы занимают практически всю цитоплазму мышечного волокна, оттесняя ядра на периферию. Каждая миофибрилла имеет периодическое строение. Повторяющаяся структура в составе миофибриллы называется саркомером. Саркомеры соседних миофибрилл расположены друг против друга, отчего все мышечное волокно тоже приобретает периодическое строение.

Саркомер имеет длину около 2.5 мкм. Граница между двумя саркомерами имеет вид темной полосы на электронно-микроскопических фотографиях и носит название Z-диска . В Z-диске локализуется актин-связывающий белок альфа-актинин , который необходим для прикрепления актиновых филаментов к Z-диску. Колокализуются с альфа-актинином винкулин и интегрин

От Z-диска перпендикулярно ему отходят нити F-актина , ассоциированные с тропомиозином и тропонином . Актиновые филаменты , называемые также в данном случае тонкими нитями , имеют одинаковую длину около 1 мкм, таким образом, что тонкие нити, идущие от противоположных Z-дисков навстречу друг другу, не перекрываются. С тонкими нитями в скелетных мышцах ассоциирован гигантский белок небулин с молекулярной массой 500-800 кД.

В центральной части саркомера вдоль его оси расположены миозиновые биполярные филаменты , длиной около 1.6 мкм и толщиной около 15 нм. Они называются также толстыми филаментами . На поперечном срезе видно, что миозиновые филаменты располагаются на равном расстоянии друг от друга, образуя гексагональную решетку. Концы тонких и толстых филаментов перекрываются. При этом тонкие филаменты находятся в промежутках между толстыми, равномерно окружая их.

Кроме миозина природные толстые филаменты содержат или ассоциированы с С-белком , Н-белком (белок 86 кД), М-белком , миомезином , ММ-креатинкиназой , титином , АМФ-деаминазой , скелемином . С-белок с молекулярной массой 140 кД имеется в наибольшем количестве. Функция его неизвестна. По структуре он сходен с белками межклеточной адгезии серии N-CAM . Титин или коннектин образует очень тонкие эластичные филаменты, связывающие миозиновые филаменты с Z-пластинкой и ответственные за расположение миозиновых филаментов в центре саркомера. Титин - это самый большой из описанных к настоящему времени белков. Его молекулярная масса составляет порядка 2800 кД

4. Основные белки мышц: актин и миозин

Миозин является одним из основных сократительных белков мышц, составляющий около 55% от общего количества мышечных белков. Из него состоят толстые нити миофибрилл. Молекулярная масса этого белка – около 470 000. В молекуле миозина различают длинную фибриллярную часть и глобулярные структуры (головки). Фибриллярная часть молекулы миозина имеет двуспиральную структуру. В составе молекулы выделяют шесть субъединиц: две тяжёлые полипептидные цепи (молекулярная масса 200 000) и четыре лёгкие цепи (молекулярная масса 1500-2700), расположенные в глобулярной части. Основной функцией фибриллярной части молекулы миозина является способность образовывать хорошо упорядоченные пучки миозиновых филаментов или толстые протофибриллы. На головках молекулы миозина расположены активный центр АТФ-азы и актинсвязывающий центр, поэтому они обеспечивают гидролиз АТФ и взаимодействие с актиновыми филаментами.

Актин – второй сократительный белок мышц, который составляет основу тонких нитей. Известны две его формы – глобулярный G-актин и фибриллярный F-актин. Глобулярный актин – это шарообразный белок с молекулярной массой 42 000. На его долю приходится около 25% общей массы мышечного белка. В присутствии катионов магния, актин подвергается нековалентной полимеризации с образованием нерастворимого филамента в виде спирали, получившего название F-актин. Обе формы актина не обладают ферментативной активностью. Каждая молекула G-актина способна связывать один ион кальция, который играет важную роль в иницировании сокращения. Кроме того, молекула G-актина прочно связывает одну молекулу АТФ или АДФ. Связывание АТФ G-актином обычно сопровождается его полимеризацией с образованием F-актина и расщеплением АТФ до АДФ и фосфата. АДФ остаётся связанной с фибриллярным актином.

5. Источники энергии для мышечного сокращения

Источником энергии для сокращения мышечных волокон служит АТФ. С инаktivацией тропонина ионами кальция активируются каталитические центры для расщепления АТФ на головках миозина. Фермент миозиновая АТФ-аза гидролизует АТФ, расположенный на головке миозина, что обеспечивает энергией поперечные мостики. Освобождающиеся при гидролизе АТФ молекула АДФ и неорганический фосфат используются для последующего ресинтеза АТФ. На миозиновом поперечном мостике образуется новая молекула АТФ. При этом происходит разъединение поперечного мостика с нитью актина. Повторное прикрепление и отсоединение мостиков продолжается до тех пор, пока концентрация кальция внутри миофибрилл не снижается до подпороговой величины. Тогда мышечные волокна начинают расслабляться.

При однократном движении поперечных мостиков вдоль актиновых нитей (гребковых движениях) саркомер укорачивается примерно на 1% его длины. Следовательно, для полного изотонического сокращения мышцы необходимо совершить около 50 таких гребковых движений. Только ритмическое прикрепление и отсоединение головок миозина может втянуть нити актина вдоль миозиновых и совершить требуемое укорочение целой мышцы. Напряжение, развиваемое мышечным волокном, зависит от числа одновременно замкнутых поперечных мостиков. Скорость развития напряжения или укорочения волокна определяется частотой замыкания поперечных мостиков, образуемых в единицу времени, то есть скоростью их прикрепления к актиновым миофиламентам. С увеличением скорости укорочения мышцы число одновременно прикрепленных поперечных мостиков в каждый момент времени уменьшается. Этим и можно объяснить уменьшение силы сокращения мышцы с увеличением скорости ее укорочения.

При одиночном сокращении процесс укорочения мышечного волокна заканчивается через 15-50 мс, так как активирующие его ионы кальция возвращаются при

помощи кальциевого насоса в цистерны саркоплазматического ретикулума. Происходит расслабление мышцы.

Поскольку возврат ионов кальция в цистерны саркоплазматического ретикулума идет против диффузионного градиента, то этот процесс требует затрат энергии. Ее источником служит АТФ. Одна молекула АТФ затрачивается на возврат 2-х ионов кальция из межфбриллярного пространства в цистерны.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: Химический состав организма

2.1.1 Цель работы: изучить основные химические компоненты живого организма

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить принципы и основы тактики биохимических исследований
- 2..Рассмотреть основные задачи биохимии
3. Ознакомиться с основными правилами проведения клинико-биохимических исследований и с международной системой единиц измерения в исследованиях
4. Привить навыки работы химической посудой; привить навыки работы с литературой и умение формулировать выводы.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Биологические жидкости внутренних сред организма (цельная кровь, сыворотка и плазма крови, спино-мозговая жидкость, лимфа и др.), биологические выделения (экстракты) (моча, желчь, слюна, желудочный и кишечный соки, кал, пот и др.) емкости для сбора анализов, пробирки с коагулянтом, центрифуга, набор антикоагулянтов

2.1.4 Описание (ход) работы:

Материалом для биохимических исследований могут быть:

- Биологические жидкости внутренних сред организма - цельная кровь, сыворотка и плазма крови, спино-мозговая жидкость, лимфа и др.
- Биологические выделения (экстракты) – моча, желчь, слюна, желудочный и кишечный соки, кал, пот и др.

Для того, что бы получить данный биологический материал используют следующие методы забора:

1. Безинструментальный – так собирают мочу, кал, мокроту, слюну и т.д.
2. Пункционный – материал берут с помощью игл из вены, артерий, спинного мозга.
3. Прокол иглой – кровь из пальца.
4. Пункционная биопсия – пункция из внутренних органов.
5. Зондовый метод – берут желудочный сок, мочу и т.д.
6. Промывание легких, мочевого пузыря и т.д.
7. Мазки и соскобы из носовой полости, зева, слизистой матки.
8. Отпечатки с ран, свищей, эрозий.

Биологический материал имеет разный срок и условия хранения, например, моча храниться 4-6 часов при комнатной температуре, а сыворотка несколько дней.

Весь биологический материал является условно патогенными (инфицированными), поэтому при работе с ним следует соблюдать правила ТБ при работе с инфицированным материалом.

В основном в биохимической лаборатории работают с цельной кровью, сывороткой и плазмой крови. Их получение и способы хранения отражены в таблице.

Характеристика биоматериала.	Цельная кровь.	Плазма.	Сыворотка.
1.Подготовка посуды.	Обрабатывают антикоагулянтom.	Должна быть сухая, чистая.	Должна быть сухая, чистая.
2.Использование специальных веществ.	Антикоагулянты.	Физиологический раствор, антикоагулянты.	Нет.
3. Отстаивание.	Нет.	30 минут.	30-60 минут.
4.Центрифугирование.	Не используют.	5 минут при 2000 об/мин.	15 минут при 2000 об/мин.
5.Условия хранения.	Не хранят.	С–3-7 суток; °t0-4 С –1-3 месяца. °t-20	С– 3-7 суток; °t0-4 С –1-3 месяца °t-20.
6. Исследование.	В течение суток.	В зависимости от исслед-го вещества и условий хранения - до 3 месяцев.	В зависимости от исследуемого вещества и условий хранения - до 3 месяцев.
7.Отличительные особенности.	Можно исследовать все компоненты крови.	Отсутствуют форменные элементы крови.	Отсутствуют форменные элементы и факторы свертывания крови (фибриноген и др.).

В качестве антикоагулянтов могут быть использованы следующие вещества:

1. Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) – связывает и эффективно удаляет ионы кальция, защищает клетки крови от разрушения. Добавляют в кровь для выполнения гематологических исследований.
2. Гепарин (в виде натрий гепарина или калий гепарина) - ингибирует превращение протромбина в тромбин. Используют для получения плазмы крови для биохимических исследований.
3. Цитрат натрия– связывает и эффективно удаляет ионы кальция. Добавляют для получения плазмы необходимой для исследования процессов свертывания крови.
4. Оксалат натрия или оксалат аммония – связывает и эффективно удаляет ионы кальция. Добавляют (вместе с фторидом натрия) для получения крови и исследования в ней уровня глюкозы.
5. Фторид натрия – ферментный яд, который прекращает метаболизацию глюкозы в крови после её сбора, т.е. сохраняет её концентрацию.

Этапы лабораторных исследований.

При лабораторных исследованиях могут возникать случайные или систематические ошибки, которые могут влиять на постановку диагноза, на лечение больного и, в конечном счете, на здоровье человека, поэтому важно соблюдать меры по их предотвращению. Для этого на всех этапах анализа соблюдают следующие правила контроля качества лабораторных исследований:

1 этап клинико-биохимических исследований - преаналитический.

На данном этапе нужно соблюдать 3 условия:

1. Правильное составление запроса на анализ, в котором должно быть указано следующее:
 - Вид, пол и возраст животного.
 - Клинический диагноз (описание проблемы).
 - Требуемые анализы.
 - Тип анализируемого материала.
2. Строго соблюдать условия забора биологического материала:
 - Срок сбора, время взятия.
 - Подготовка обследуемого животного (или участка тела обследуемого).
 - Процедура взятия биоматериала.
 - Чистота посуды и материалов для забора (одноразовые шприцы).
 - Факторы внешней среды (особенно температура).
 - Наличие или отсутствие консервантов, антикоагулянтов.
 - Первичная обработка биоматериала.
3. Строго соблюдать условия транспортировки биоматериала (особенно при исследовании активности ферментов).

2 этап клинико-биохимических исследований - аналитический.

На этом этапе важно:

1. Правильно выбрать метод для исследования того или иного вещества. Важно чтобы метод был:
 - чувствительным (способность метода выявлять наименьшие различия между двумя концентрациями веществ);
 - специфичным (способность метода измерять лишь тот компонент, для определения которого он предназначен);
 - точным (степень приближения полученного значения к истинному содержанию вещества в биологической жидкости);
 - обладать воспроизводимостью (разброс показателей, полученных при анализе нескольких проб одного и того же образца биоматериала);
 - обладать диагностической ценностью (изменения данного вещества или ряда веществ в биоматериале, должно говорить о каком то определенном заболевании).
2. Правильно подготовить оборудование, посуду и реактивы в соответствии с методикой.
3. Точно выполнять исследование по методике.
4. Правильно проводить расчеты и интерпретировать полученные результаты.

3 этап клинико-биохимических исследований – постаналитический, на этом этапе необходимо обращать внимание на следующее:

1. Правильность оформления бланков анализа.
2. Лабораторно-клиническую интерпретацию результатов.
3. Доведение полученной информации до сведения лечащего врача.

2.1 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: Качественные реакции на белки и аминокислоты

2.1.1 Цель работы: изучить строение белков и методику выполнения цветных реакций на белки

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить некоторые физические и химические свойства аминокислот и белков, а также структуру белка.
2. Проследить при помощи хроматографии распределение аминокислот в соответствии с их растворимостью в органических растворителях.

3. Закрепить полученные знания и навыки на конкретных примерах исследования свойств аминокислот.

4. Ознакомить с побочными процессами, проходящими при проведении качественных реакций.

5. Привить навыки работы химической посудой; привить навыки работы с литературой и умение формулировать выводы.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Штатив с пробирками, спиртовка, спички, держатель для пробирок, кристаллики мочевины, 1%-ный раствор яичного белка, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди, 0,5%-ный водный раствор нингидрина, глицин, концентрированная азотная кислота, концентрированная серная кислота, 30%-ный раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор ацетата свинца, ледяная уксусная кислота, фенол, реактив миллона, раствор желатина, мед, 0,1% спиртовой раствор, 0,1г α -нафтола, 2%-ный раствор гипобромит натрия, 5%-ный раствор гидроксида натрия, лёд, раствор тирозина, раствор соды, диазореактив, раствор сахара, раствор тимола, 5%-ный раствор соляной кислоты, 20%-ный раствор сульфата меди, хроматографическая бумага, аланин, лейцин, глутаминовая кислота, чашка Петри, смеси бутанола, уксусной кислоты и воды, водонасыщенный раствор фенола, 0,1% спиртовой раствор нингидрина, 20%-ный раствор щелочи, 5%-ный раствор нитропруссид натрия, 15-ный раствор сульфаниловой кислоты, 0,5%-ный раствор нитрита натрия, 10%-ный раствор карбоната натрия, 0,1%-ный раствор гистидина.

2.1.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Биуретовая реакция (на обнаружение пептидных связей в белках)

Ход работы:

1. Помещают в сухую пробирку несколько кристалликов мочевины и нагревают на слабом огне. Мочевина сначала плавится. Когда сплавленная масса начнет твердеть, нагревание прекращают и дают пробирке остыть. В результате нагревания из мочевины образуется биурет, а аммиак улетучивается (об этом узнают по запаху).

2. К полученному в пробирке биурету прибавляют около 1 мл 20% раствора сульфата меди. При встряхивании получается характерное розовато-фиолетовое окрашивание. Необходимо избегать прибавления избытка раствора сульфата меди, так как голубая окраска получающегося гидроксида меди может маскировать реакцию.

3. Прodelьвают биуретовую реакцию с раствором белка. В пробирку вносят 5-10 капель 1%-ного раствора яичного белка, 3-6 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1-2 капли 1%-ного раствора сульфата меди и перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовое окрашивание.

Нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидроксида меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

Опыт 2. Нингидриновая реакция

Ход работы:

К 5-10 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5-10 капель 0,5%-ного водного раствора нингидрина и нагревают до кипения. Через 2-3 минуты развивается розовое или сине-фиолетовое окрашивание.

1. Прodelьвают реакцию с какой-нибудь аминокислотой, например с глицином. Наливают в пробирку около 1 мл раствора глицина, добавляют 5-6 капель слабого (0,1%) раствора нингидрина и нагревают. Появляется фиолетово-синее окрашивание

2. Так же производят нингидриновую реакцию с 1-2 мл раствора белка, взяв 0,3-0,5 мл раствора нингидрина. Получается фиолетовое (иногда фиолетово-розовое окрашивание). С течением времени раствор синеет.

Опыт 3. Ксантопротеиновая реакция

Ход работы:

К 5-10 каплям 1%-ного раствора яичного белка добавляют 3-6 капель концентрированной азотной кислоты и (**осторожно!!!**) нагревают. Появляется осадок желтого цвета.

После охлаждения в пробирку (желательно на осадок) добавляют 5-10 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия до появления оранжевого окрашивания (оно связано с образованием натриевой соли полученных нитросоединений).

Опыт 4. Реакция Миллона

Ход работы:

1. Сначала проводят реакцию с фенолом. Наливают в пробирку около 1-2 мл раствора фенола, прибавляют около 0,5 мл реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется розовое окрашивание.

2. Проводят миллонову реакцию с раствором белка. В пробирку наливают 1-2 мл раствора белка и прибавляют 5-6 капель реактива Миллона. Появляется осадок свернувшегося белка, так как реактив Миллона содержит соли ртути и азотную кислоту. Содержимое пробирки осторожно нагревают. Осадок окрашивается в кирпично-красный цвет.

Следует избегать прибавления избытка реактива Миллона, так как этот реактив содержит азотную кислоту, которая может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Миллона.

3. Проводят аналогичным образом миллонову реакцию с раствором желатина. Если желатин достаточно чистый, реакция не получается, так как в молекуле желатина остаток тирозина отсутствует.

4. Проводят миллонову реакцию с раствором меда, т.к. он содержит данную аминокислоту. Для реакции берут водный раствор меда в соотношении 1:2.

Опыт 5. Реакция Сакагучи

Ход работы:

К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия, 3 капли 0,1%-ного спиртового раствора α -нафтола и по каплям (всего 1-5 капель) 2%-ного раствора гипобромита натрия. Жидкость в пробирке приобретает красный цвет. Проводят данную реакцию с раствором меда, т.к. он содержит данную аминокислоту. Для реакции берут водный раствор меда в соотношении 1:2.

Опыт 6. Реакция Адамкевича (на триптофан)

Ход работы:

В пробирку вносят 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и 5 капель ледяной уксусной кислоты. Раствор вначале слегка нагревают, затем охлаждают и по стенкам пробирки (**осторожно!!!**), чтобы жидкости не смешивались, приливают 10 капель концентрированной серной кислоты. При стоянии на границе двух слоев наблюдается красно-фиолетовое окрашивание в виде кольца.

Опыт 7. Реакция Фоля

Ход работы:

К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 каплю 5%-ного раствора ацетата свинца. Через 1-2 мин после интенсивного кипячения появляется бурый или черный осадок.

Ион серы S^{2-} , образующийся из цистеина или цистина в сильнощелочной среде можно обнаружить с помощью нитропруссидной реакции. К 10 каплям 1%-ного раствора яичного белка добавляют 10 капель 20%-ного раствора щелочи, интенсивно кипятят, затем после охлаждения приливают 3-5 капель свежеприготовленного 5%-ного раствора нитропруссиды натрия, после чего появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Интенсивность окрашивания в данных реакциях зависит от количества аминокислот, содержащих серу, и от количества белка в растворе.

Опыт 8. Диазореакция

Ход работы:

1. Наливают в пробирку 1-2 мл раствора тирозина, 0,3-0,5 раствора соды и около 1 мл диазореактива. Появляется оранжево-красное окрашивание.
2. Пропредельывают ту же реакцию с раствором белка, беря его вместо раствора тирозина. Получается оранжево-красное окрашивание.

Опыт 9. Реакция на присутствие углеводных компонентов

Ход работы:

1. Наливают в 2 пробирки по 1-2 мл раствора сахара, добавляют в первую пробирку 5-6 капель раствора α -нафтола, а в другую пробирку - 5-6 капель раствора тимола.
2. Осторожно подслаивают в обе пробирки по 1-2 мл концентрированной серной кислоты. Наблюдают фиолетовое (в случае α -нафтола) и красное (в случае тимола) окрашивание на границе раздела серной кислоты и раствора сахара.
3. Пропредельывают те же реакции, взяв вместо раствора сахара раствор белка. Отмечают положительную реакцию, указывающую на наличие углеводных групп в белке.

Опыт 10. Реакция Паули (на гистидин и тирозин)

Ход работы:

К 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты (готовится на 5% растворе соляной кислоты) прибавляют 2 мл 0,5% раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают, добавляют 2 мл 1% раствора яичного белка и после перемешивания 6 мл 10% раствора карбоната натрия. После перемешивания смесь окрашивается в вишнево-красный цвет.

Пропредельвают эту реакцию с 0,1% раствором гистидина, сравнивают полученные результаты и делают вывод.

Опыт 11. Хроматографический метод определения аминокислот. Разделение смеси аминокислот с помощью радиальной хроматографии

Ход работы:

Бумажный диск хроматографической бумаги, диаметром 12 см делят простым карандашом на четыре части. В центре диска делают небольшой вырез (диаметром 0,5-1 см). В каждом секторе на расстоянии 3-4 мм от разреза в центре диска наносят карандашом точку (линия старта). Затем в отмеченную точку каждого сегмента наносят капилляром небольшую каплю растворов различных аминокислот (целесообразно использовать аланин, лейцин, глутаминовую кислоту и соответственно их смесь, так как коэффициенты распределения этих аминокислот сильно разнятся). Бумагу подсушивают. Из такой же бумаги делают небольшой фитилек и вставляют его в разрез в центре диска. Затем хроматограмму с фитильком помещают на чашку Петри, куда предварительно наливают 2-3 мл смеси бутанола, уксусной кислоты и воды (4:1:5) так, чтобы фитилек касался раствора. Чашку Петри накрывают крышкой и оставляют под вытяжкой при комнатной температуре на 1 час, т.е. до тех пор, пока фронт растворителя не дойдет до конца хроматограммы около 1 см. Затем, хроматограмму вынимают и высушивают в сушильном шкафу при 80-100⁰С для испарения растворителя и фиксации аминокислот. После чего хроматограмму проявляют, обрабатывая её 0,1% спиртовым раствором нингидрина с помощью пипетки или пульверизатора, и вновь высушивают при 100⁰С 5-8 минут. На проявленной хроматограмме в трех секторах будет по одному пятну и в четвертом три пятна, соответствующих аминокислотам в исследуемой смеси. Рассчитывают коэффициенты распределения отдельных аминокислот и аминокислот,

находящихся в смеси. Затем, сравнивая их, определяют, какие же аминокислоты входили в состав смеси.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: Денатурация белков и поддержание их нативной конформации в условиях клетки.

2.3.1 Цель работы: изучить денатурацию белков и их нативную конформацию в условиях клетки

3.2 Задачи работы:

1. Изучить процесс денатурации и роль молекулярных шаперонов в предотвращении денатурации белков.
2. Закрепить полученные знания и навыки на конкретных примерах исследования обратимого и необратимого осаждения белков.
3. Привить навыки работы с химической посудой.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1%-ный раствор яичного белка, 1%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор гидроксида натрия, концентрированные серная, соляная и азотная кислоты, 10%-ный раствор сульфосалициловой кислоты, 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, 10%-ный раствор сульфата меди, 5%-ный раствор ацетата свинца, 5%-ный раствор нитрата серебра, 10%-ный раствор пикриновой кислоты, 5%-ный раствор железисто-синеродистого калия, неразведенный яичный белок, насыщенный раствор сульфата аммония, фильтры, стеклянные палочки, спиртовка, спички, пробирки, штативы, электрическая плитка.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Осаждение белка кипячением

Ход работы:

В четыре пронумерованные пробирки приливают по 10 капель 1%-ного раствора яичного белка. Затем:

а) первую пробирку нагревают до кипения. Раствор белка мутнеет, но так как частицы денатурированного белка несут заряд, они в осадок не выпадают. Это связано с тем, что яичный белок имеет кислые свойства (изоэлектрическая точка его равна $pH\ 4,8$) и в нейтральной среде заряжен отрицательно.

б) во вторую пробирку добавляют 1 каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Выпадает осадок белка, так как белок приближается к изоэлектрической точке и белок теряет заряд.

в) в третью пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Осадка не образуется, так как в сильноокислой среде частицы белка приобретают положительный заряд (сохраняется один из факторов устойчивости белка в растворе).

г) в четвертую пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Осадка не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд частиц увеличивается.

Опыт 2. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Ход работы:

В три пробирки наливают по 5-10 капель концентрированных серной, соляной и азотной кислот. Затем, наклонив пробирку под углом 45° , осторожно по стенке пробирки (так, чтобы жидкости не смешивались) наслаивают такой же объем 1%-ного раствора яичного белка. На границе двух слоев жидкости появляется осадок белка в виде белого

кольца. Затем, осторожно, встряхивая пробирки, обнаруживают растворение белка в пробирках с соляной и серной кислотами, тогда как в пробирке с азотной кислотой растворения белка не происходит.

Опыт 3. Осаждение белков органическими кислотами

Ход работы:

В две пробирки приливают по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка, затем в одну из них вносят 1-2 капли 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты, а в другую – такое же количество 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. В пробирках выпадает осадок белка.

Опыт 4. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Ход работы:

В три пробирки вносят по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и прибавляют: в первую пробирку – 1 каплю 10%-ного раствора сульфата меди, во вторую – 1 каплю 5%-ного раствора ацетата свинца, в третью – такое же количество 5%-ного раствора нитрата серебра. Во всех пробирках выпадает осадок. Затем, в первую пробирку добавляют 10 капель 10%-ного раствора сульфата меди и наблюдают растворение осадка. В третью пробирку наливают 10 капель 5%-ного раствора нитрата серебра – растворение осадка не происходит.

Опыт 5. Осаждение белков органическими растворителями

Ход работы:

К 1 мл 1% раствора белка добавляют 2 мл органического растворителя (96% этанола, хлороформа, ацетона или эфира) и перемешивают. Образование осадка можно усилить добавлением нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия.

Опыт 6. Осаждение белков реактивами на алкалоиды

Ход работы:

В три пробирки наливают по 1 мл 1% раствора белка, по 4-5 капель 1% раствора уксусной кислоты и по 2-3 капли: в первую пробирку - 10% раствора пикриновой кислоты, во вторую - насыщенного раствора танина, в третью - 5% раствора железисто-синеродистого калия. Наблюдают выпадение осадка.

Обратимое осаждение белков

Опыт 7. Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка.

Ход работы:

В пробирку наливают 30 капель неразведенного яичного белка и добавляют равное количество насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое пробирки перемешивают. Получается полунасыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, и при этом глобулиновая фракция белка осаждается, а альбуминовая фракция остается в растворе. Через 5 минут осадок отфильтровывают. На фильтре остается глобулиновая фракция, а в фильтрате – альбумины. Осадок с фильтра снимают стеклянной палочкой и переносят в пробирку, куда добавляют 5 капель воды. Осадок растворяется. Наличие в растворе белка можно доказать с помощью биуретовой реакции.

В пробирку с фильтратом добавляют порошок сульфата аммония до полного насыщения раствора, т.е. до тех пор, пока не прекратится растворение соли. При этом выпадает осадок – альбумины. Его отфильтровывают, растворяют и проводят биуретовую реакцию.

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: Особенности ферментов как белковых катализаторов.

2.4.1 Цель работы: изучить особенность ферментов как белковых катализаторов

2.4.2 Задачи работы:

1. Ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере сахарозы, амилазы, холинэстеразы.
2. Исследовать влияние реакции среды, концентрации фермента и субстрата, температуры на ферментативные реакции.
3. Изучить процесс ингибирования холинэстеразы фосфорорганическими соединениями.
4. Закрепить представления об особенностях строения молекул ферментов.
5. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
6. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
7. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, держатель для пробирок, 1% раствора крахмала, вода, слюна, термостат или водяная баня, 1% раствор йодида калия, 5 % раствор сульфата меди, 10% раствор гидроксида натрия, образцы молока и кисломолочных продуктов, 1%-ный раствор H_2O_2 , 1%-ный раствор йодисто-калиевого крахмала.

2.4.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Гидролиз крахмала амилазой слюны

Ход работы:

В две пробирки наливают по 10 капель 1% раствора крахмала. В одну из них (пробирка №1) вносят 4 капли воды (контроль), а во вторую (№2) – 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и ставят термостат или водяную баню на 15 мин при 37 С. Затем из пробирки №1 отбирают по 4 капли исследуемого вещества, которые вносят в две различные пробирки.

а) **реакция на крахмал.** В одну из пробирок добавляет 1 каплю 1% раствора йодида калия (реакция с йодом). В присутствии крахмала появляется синее окрашивание.

б) **Реакция Троммера.** В другую – 3 капли 5 % раствора сульфата меди и 5 капель 10% раствора гидроксида натрия и осторожно нагревают до кипения (реакция Троммера). Появление красного окрашивания указывает на присутствие в растворе конечных продуктов гидролиза крахмала – глюкозы и мальтозы. Аналогичную процедуру сделать с содержимым пробирки №2. Результаты опыта записать в виде таблицы.

Таблица. Гидролиз крахмала амилазой слюны

№ Пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция	
			с йодом	Троммера
1	Крахмал	Вода (контроль)		
2	Крахмал	Амилаза		

Результат должен показать, что в присутствии воды гидролиза крахмала не происходит, и реакция с йодом должна быть положительной, а реакция Троммера – отрицательной, тогда как в присутствии амилазы слюны результаты должны быть противоположными, так как произошел гидролиз крахмала.

Опыт 2. Реакция на пероксидазу с йодисто-калиевым крахмалом

Ход работы:

В 3 пробирки вносят образцы молока и кисломолочных продуктов по 2-3 мл., добавляют 3-5 мл. воды, 5 капель 1% раствора H_2O_2 и 5 капель 1% раствора йодисто-калиевого крахмала. Появление синего окрашивания указывает на то, что кисломолочный продукт получен из не пастеризованного молока (сливок)

Появление окраски более чем через 2 мин не служит показателем наличия пероксидазы.

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: Активный центр: специфичность действия ферментов

2.5.1 Цель работы: изучить активный центр ферментов и их специфическое

действие

2.5.2 Задачи работы:

1.Ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере амилазы.

2.Исследовать влияние реакции среды, концентрации фермента и субстрата, температуры на ферментативные реакции; закрепить представления об особенностях строения молекул ферментов.

3.Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.

4.Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.

5.Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, спиртовка, спички, 1% раствор крахмала, раствор слюны, термостат или водяная баня, 1% раствор йода, 2%-ный раствор сахарозы, 5 % раствор сульфата меди, 10% раствор гидроокиси натрия, амилаза, дистиллированная вода, 0,2% раствор соляной кислоты, 1% раствор хлорида натрия, 1% раствор сульфата меди.

2.5.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Влияние температуры на активность ферментов

Ход работы:

В две пробирки прилить по 10 капель 1% раствора крахмала. Затем в одну из них добавить 5 капель раствора слюны, разведенной в 5 раз, а в другую – такое же количество предварительно прокипяченной в течение 10 мин слюны. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при $37^{\circ}C$, после чего с содержимым каждой пробирки проделать реакции с йодом, Троммера. В пробирке с прокипяченной слюной гидролиза крахмала не произойдет (почему?).

Опыт 2. Специфичность действия ферментов

Ход работы:

В две пробирки (№1) вносят 10 капель 1% раствора крахмала, в другую (№2) – 10 капель 2% раствора сахарозы. Затем в пробирки добавляют по 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и оставляют в термостате на 15 мин. при $37^{\circ}C$. После этого с содержимым всех четырех пробирок проделывают реакции с йодом, с реактивом Фелинга: к 5 каплям исследуемого раствора приливают 3 капли реактива, нагревают пробирку до кипения и кипятят в течение 1 мин. В случае положительной реакции на глюкозу наблюдается красное окрашивание вследствие образования оксида меди; результаты заносят в таблицу

Таблица. Определение специфичности действия ферментов

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция с йодом	Реакция Троммера
1	Крахмал	Амилаза		
2	Сахароза	Амилаза		

В выводах следует отметить, в какой пробирке и при каких условиях обнаружено действие ферментов и почему.

Приготовление реактива Фелинга: медный купорос х.ч. выкристаллизовывают из горячего раствора и высушивают на фильтровальной бумаге. Готовят отдельно два раствора: а) 200 г сегнетовой соли и 150 г едкого натра разводят в мерной колбе (1 л) и доводят водой до метки; б) 40г медного купороса разводят в колбе вместимостью 1 л и доводят водой до метки. Перед употреблением смешивают эти два раствора в равных пропорциях.

Опыт 3. Влияние pH среды на активность ферментов

Ход работы:

В 8 пробирках приливают по 1 мл дистиллированной воды, а затем в пробирку №1 вносят 1 мл 0,2% раствора соляной кислоты, перемешивают и отбирают из нее 1 мл смеси, которую переносят в пробирку №3 и так далее. Из пробирки №8 отбирают 1 мл и выливают. Таким образом, получают различные разведения соляной кислоты, которые соответствуют различным значениям pH среды. После этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны, разведенной 1:10. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при 37°C. Затем охладить и добавить во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия. Отметить, что полный гидролиз крахмала произошел в пробирках № 5 и 6, где pH среды раствора находится в пределах 6,8 – 7,2, т.е. оптимальных для действия амилазы.

Опыт 4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

Ход работы:

В пробирку №1 вносят 1 каплю 1% раствора хлорида натрия, в пробирку №2 – 1 каплю 1% раствора сульфата меди, а в пробирку №3 – 1 каплю воды. Затем во все пробирки добавляют по 10 капель слюны в разведении 1:5. Перемешивают и вносят в каждую пробирку по 5 капель 1% раствора крахмала и оставляют 1-3 мин при комнатной температуре. После чего вносят во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия. Результаты записывают в виде таблицы:

Таблица . Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

№ Пробы	Субстрат	Фермент	Окраска раствора после добавления йода в присутствии		
			воды	сульфата меди	хлорида натрия
1	Крахмал	Амилаза			
2	Крахмал	Амилаза			
3	Крахмал	Амилаза			

2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).

Тема: Витамины. Качественные реакции.

2.6.1 Цель работы: изучить витамины и ознакомиться с качественными реакциями на них

2.6.2 Задачи работы:

1. Научиться определять витамины.
2. Изучить их качественные реакции.
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
4. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, 1% раствор сульфаниловой кислоты, 5% раствор нитрата натрия, порошок тиамин, 10% раствор бикарбоната натрия, 0,025% раствор рибофлавина, концентрированная соляная кислота, металлический цинк, 0,01 г никотиновой кислоты, 10 % раствор уксусной кислоты, 5% раствор ацетата меди, 10% раствор тиомочевина, витамин В₁₂ беззольный фильтр, концентрированная серная кислота, пробка с обратным холодильником, штатив, дистиллированная вода, 5% раствор пиридоксина, 5% раствор хлорного железа, 1%-ная вытяжка шиповника, аскорбиновая кислота, 5% раствор феррицианида калия, концентрированная уксусная кислота, 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндифенол, 0,1 г чая, 10мл экстракта чая, индигокармин, 0,05 N. раствор перманганата калия, сок картофеля, сок капусты (клубни картофеля или часть кочана капусты натрите на терке из нержавеющей стали или пластика, растертую массу отожмите через марлю, сложенную в два слоя), 5 %-ый раствор гексацианоферрата (III) калия, 5%-ый раствор гидроксида калия, 10 %-ый раствор соляной кислот, 1,5 %-ый раствор хлорида железа (III), 5 %-ый раствор нитрата серебра (сохраняют в темном месте), 10 % -ый раствор аммиака, дистиллированная вода, терка из нержавеющей стали или пластика, пробирки, рыбий жир, хлороформ, анилиновый реактив, 0,1%-ный спиртовой раствор витамина Е, концентрированная азотная кислота.

2.6.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Водорастворимые витамины

а) Качественная реакция на тиамин (витамин В₁)

Ход работы:

В пробирку приливают по 5-10 капель 1% раствора сульфаниловой кислоты и 5% раствора нитрата натрия (состав диазореактива). Сюда же вносят на кончике ножа или стеклянной палочки небольшое количество порошка тиамин и по стенке пробирки осторожно добавляют 5-7 капель 10% раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Диазореакция

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

Ход работы:

К диазореактиву, содержащему 5 капель 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5%-ного раствора нитрата натрия, добавляют 1-2 капли 5%-ного раствора тиамин и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5-7 капель 10%-ного бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

б) Открытие рибофлавина (витамин В₂)

Ход работы:

В пробирку приливают 10 капель 0,025% раствора рибофлавина, 5 капель концентрированной соляной кислоты и зернышко металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с витамином, восстанавливая его, и раствор меняет окраску (из желтого на красную и розовую), а затем обесцвечивается.

в) Открытие никотиновой кислоты (витамина РР)

Ход работы:

В пробирку вносят 0,01 г никотиновой кислоты и 20 капель 10 % раствора уксусной кислоты. Нагревают до кипения и добавляют равный объем 5% раствора ацетата

меди. При постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок меди комплексной соли и никотиновой кислоты.

г) Открытие цианкобаламина (витамина В₁₂)

Ход работы:

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли 10% раствора тиомочевины и высушивают над сеткой газовой горелки. Затем на фильтр добавляют 1-2 капли минерализата витамина. Приготовление минерализата: в пробирку вносят содержимое одной ампулы витамина В₁₂ и 3-5 капель концентрированной серной кислоты, закрывают ее пробкой с обратным холодильником, закрепляют на штативе в несколько наклоненном положении и производят сжигание в вытяжном шкафу до обесцвечивания раствора. По окончании минерализации добавляют 1 мл дистиллированной воды небольшими порциями при постоянном перемешивании и вновь подсушивают. На фильтре (чаще по краям пятна) появляется зеленое окрашивание.

д) Открытие пиридоксина (витаминов В₆)

Ход работы:

В пробирке смешивают 5 капель 5% раствора пиридоксина и 1 каплю 5% раствора хлорного железа и встряхивают. Смесь окрашивается в красный цвет.

е) Открытие аскорбиновой кислоты в шиповнике

Ход работы:

В пробирку вносят по 2 капли 5% раствора феррицианида калия и 1 каплю раствора хлорного железа. Жидкость приобретает бурую окраску. Затем добавляют 5-10 капель 1% вытяжки из шиповника (приготовленной из экстракта) и цвет раствора переходит в зеленовато-синий, после чего выпадает осадок темно-синего цвета (берлинская лазурь), который при добавлении воды становится более отчетливым.

ж) Обнаружение аскорбиновой кислоты в соке картофеля или капусты

Ход работы:

Восстановление ионов железа (III)

В две пробирки налейте по 1 см³ сока картофеля и капусты, прибавьте по 2 капли раствора гидроксида калия и столько же раствора гексацианоферрата (III) калия.

Содержимое пробирок тщательно перемешайте, после чего в пробирки добавьте по 6-8 капель 10 %-го раствора соляной кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа (III). Выпадает синий или зеленовато-синий осадок берлинской лазури.

Восстановление ионов серебра

В пробирку налейте 1 см³ раствора нитрата серебра и добавьте по каплям раствор аммиака. Вначале образуется серый осадок, который растворяется в избытке аммиака.

Полученный аммиачный раствор оксида серебра разделите на две пробирки и добавьте в одну 1 см³ сока картофеля, а во вторую - 1 см³ сока капусты.

Пробирки поставьте в горячую (80 °С) воду на 5-10 минут. На стенках пробирок образуется зеркальный налет металлического серебра.

з) Количественное определение рутина (витамина Р)

Ход работы:

К 0,1 г чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и кипятят 5 мин. Отбирают 10 мл экстракта чая в коническую колбу, куда добавляют 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина в качестве индикатора. Титруют 0,05 N раствором перманганата калия до устойчивости желтой окраски. Расчет производят по формуле:

$$X = 3,2 \cdot A \cdot 50 \cdot 100 / 10 \cdot 0,1 \cdot 1000$$

где: X – количество рутина (мг%); 3,2 – стандартный пересчетный коэффициент титрования (1 мл 0,05 N раствора перманганата калия окисляет 3,2 мг рутина); A – количество миллилитра перманганата калия, прошедшего на титрование; 50 – количество

миллилитров воды, добавленное к чаю для экстракции; 100 – коэффициент для пересчета; 10 – количество миллилитров экстракта, взятое для титрования; 0,1 – количество сухого вещества в граммах, взятое для анализа; 1000 – коэффициент пересчета (1 мг= 1000 мкг).

После приведения формула имеет следующий вид :

$$X = A \cdot 16 \text{ мг}\%$$

Для определения рутина в граммах на 1 кг массы тела следует воспользоваться формулой:

$$X = *0,16\text{г/кг}A$$

Опыт 2. Жирорастворимые витамины

а) Открытие ретинола (витамина А) в рыбьем жире

Ход работы:

На сухом часовом стекле смешивают 1 каплю рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и 1 каплей концентрированной серной кислоты. Развивается фиолетово-красное окрашивание, быстро переходящее в бурое.

При отсутствии ретинола в пище у взрослых наблюдается потеря зрения в сумерках, у детей поражается роговая оболочка глаза и главным образом понижается сопротивляемость организма инфекционным заболеваниям.

б) Открытие холекальциферола (витамин D) в рыбьем жире

Ход работы:

На сухом часовом стекле смешивают 1 каплю рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и 1 каплей анилинового реактива (15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты). Эмульсия окрашивается в желтый цвет, который при нагревании приобретает красную окраску.

в) Открытие токоферола (витамин Е)

Ход работы:

В сухой пробирке смешивают при энергичном встряхивании 5 капель 0,1% спиртового раствора витамина Е и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Верхний масляный слой расслоившейся эмульсии окрашивается в красный цвет.

2.7. Лабораторная работа №7 (2 часа).

Тема: Роль гормонов в регуляции метаболизма. Иерархия регуляторных систем. Классификация и биологическое действие гормонов

2.7.1 Цель работы: изучить роль гормонов в регуляции метаболизма

2.7.2 Задачи работы:

1. Провести кислотный гидролиз пекарских дрожжей.
2. Изучить некоторые продукты гидролиза дрожжей.
3. Привить навыки работы химической посудой, реагентами.
4. Закрепить полученные знания по строению нуклеиновых кислот.
5. Ознакомить с качественными реакциями, подтверждающими состав продуктов гидролиза.
6. Привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

таблетки тиреоидина, 10%раствор бикарбоната натрия, 10% раствор серной кислоты, синяя лакмусовая бумага, 1% раствор крахмала, . 2% раствор йодата калия (KJO^3), 10% раствор углекислого натрия, 5 % раствор нитрата натрия, 1% раствор сульфаниловой

кислоты, концентрированный раствор аммиака, 1% раствора хлорида железа (II), раствор адреналина.

2.7.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Определение йода в гормонах щитовидной железы

а. Гидролиз тиреоидина

В ступку помещают 10 таблеток тиреоидина и тщательно их растирают. Растертую массу пересыпают в колбочку для гидролиза, добавляют 20мл 10% раствора бикарбоната натрия. Колбу с обратным холодильником помещают на асбестовую сетку и содержимое колбы кипятят точно 15 мин и обязательно при умеренном нагревании.

б. Обнаружение йода

В пробирку наливают 1 мл охлажденного гидролизата, прибавляют 10% раствора серной кислоты до кислой среды по лакмусовой бумаге, 3 капли 1% раствора и 1мл йодата калия. Выделившийся свободный йод дает синее окрашивание с крахмалом.

Опыт 2. Качественные реакции на адреналин

1. Реакция с хлорным железом

При добавлении к раствору адреналина хлорного железа жидкость окрашивается в зеленый цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа. Реакция характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина.

К 3 каплям раствора адреналина прибавляют 1 каплю 1% раствора хлорного железа. Жидкость приобретает изумрудно-зеленое окрашивание. При добавлении 1 капли концентрированного раствора аммиака окраска переходит в красную, а затем коричневую.

2. Диазореакция

В пробирку помещают 3 капли 1% раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5 % раствора нитрата натрия, 5 капель раствора адреналина и 3 капли 10% раствора карбоната натрия. Жидкость окрашивается в красный цвет.

2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Тема: Основные углеводы пищи. Переваривание углеводов

2.8.1 Цель работы: изучить основные углеводы пищи и процесс переваривания углеводов

2.8.2 Задачи работы:

1. Ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на углеводы.
2. Наглядно показать процессы, протекающие в организме при переваривании углеводов в пищеварительном тракте.
3. Закрепить представления об особенностях строения молекул углеводов.
4. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
5. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
6. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, спиртовка, спички, фильтровальная бумага, 1%-ный раствор крахмала, 1%-ный раствор йода, водный раствор меди, йод, кисломолочный продукт, 1%-ный раствор сахарозы, 1%-ный спиртовой раствор α -нафтола, 1%-ный спиртовой раствор тимола, 0,5 мл концентрированной серной кислоты, реактив Селиванова, 1%-ный раствор фруктозы, орциновый раствор, моча или раствор пентозы, 1%-ный раствор пентозы, анилин, ледяная уксусная кислота, 0,5 мл концентрированного аммиака, гидроксид

натрия, раствор толуидинового синего, 10%-ный раствор уксусной кислоты, 1%-ный раствор глюкозы, 5%-ный раствор сульфата меди, реактив Гайнеса, панкреатин.

2.8.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Открытие крахмала

Ход работы:

а) В пробирку вносят 10 капель 1% раствора крахмала и каплю 1% раствора йода в йодиде калия. Наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

б) 5 мл водного раствора меда в соотношении 1:2 нагревают в пробирке до кипения, охлаждают до комнатной температуры и прибавляют 3—5 капель йода. Появление синей окраски свидетельствует о присутствии в меде крахмала или муки.

в) В пробирку вносят 10 капель кисломолочного продукта и каплю 1% раствора йода в йодиде калия. Наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

Опыт 2. Реакция на обнаружение углеводов

Ход работы:

В две пробирки вносят по 10 капель 1% раствора сахарозы. Затем в одну из них добавляют 3 капли 1% спиртового раствора α -нафтола, а в другую – такое же количество 1% спиртового раствора тимоло. В обе пробирки осторожно наклоняют по 0,5 мл концентрированной серной кислоты и на границе двух жидкостей наблюдают фиолетовое окрашивание в пробирке с α -нафтолом и красное в пробирке с тимолом.

Опыт 3. Открытие фруктозы (реакция Селиванова)

Ход работы. В пробирку наливают 10 капель реактива Селиванова и 2 капли 1% раствора фруктозы и осторожно нагревают. Развивается красное окрашивание.

Опыт 4. Открытие пентоз

Ход работы:

а) реакция с орциновым реактивом.

В пробирку наливают 10 капель орцинового реактива, нагревают до кипения и быстро добавляют 2-3 капли мочи или раствора пентозы. Развивается сине-зеленое окрашивание.

б) реакция с анилином.

Пробирку с 10 каплями 1% раствора пентозы (рибоза, арабиноза, ксилоза) и 10 каплями концентрированной соляной кислоты осторожно нагревают до кипения, и после охлаждения вносят в нее 5 капель анилина и 5 капель ледяной уксусной кислоты. Раствор окрашивается в красный цвет.

Опыт 5. Открытие лактозы

Ход работы:

К 1 мл мочи добавляют 0,5 мл концентрированного аммиака и 3 капли 10% гидроксида натрия. Нагревают до кипения. Появляется ярко-желтое окрашивание, свидетельствующее о наличии в моче лактозы и галактозы.

Опыт 6. Открытие мукополисахаридов

Ход работы:

15 капель мочи наносят на фильтровальную бумагу и высушивают. Затем опускают в раствор толуидинового синего, после чего бумагу отмывают 10% раствором уксусной кислоты. Пурпурная окраска свидетельствует о наличии в моче мукополисахаридов.

Опыт 7. Реакции на восстанавливающие свойства сахаров

а) Реакция Троммера. Ход работы:

В 4 пробирки вносят по 10 капель последовательно в каждую 1% растворы глюкозы, мальтозы, сахарозы и крахмала, а затем добавляют по 10 капель 10% раствора гидроксида натрия и по 1 капле 5% раствора сульфата меди и осторожно нагревают до кипения. Выпадает красный осадок (Cu_2O) в пробирках №1 и №2.

б) Проба Гайнеса. Ход работы:

К 3-4 мл реактива Гайнеса прибавляют 8-12 капель мочи. Нагревают верхнюю часть смеси. Наблюдают переход бледно-голубого цвета в желтый, а затем в красный.

Опыт 8. Переваривание углеводов в пищеварительном тракте

Ход работы:

В три пробирки приготовьте инкубационные смеси, как указано в таблице.

Таблица 15. Приготовление растворов

№ пробы	Раствор крахмала, мл	Слюна, мл	Раствор крахмала, мл	Панкреатин, мл	Вода, мл
1	1	1	-	-	1
2	1	1	1	-	-
3	1	-	-	2	-

Пробирки встряхните и поставьте в термостат при температуре 37⁰С на 30 мин. После инкубации содержимое каждой пробирки проанализируйте на присутствие продуктов расщепления полисахарида с помощью реакции Троммера, для чего прибавьте к раствору реактив Фелинга и поместите пробирки на кипящую водяную баню на 10 мин.

Появление красного осадка оксида меди (I) указывает на положительную реакцию Троммера в присутствии глюкозы и мальтозы.

Запишите результаты опыта в протокол и сделайте выводы.

2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: Хиломикроны. Окисление жирных кислот. Регуляция β-окисления

2.9.1 Цель работы: изучить строение и свойства хиломикрон, окисление жирных кислот

2.9.2 Задачи работы:

1. Изучить обмен липидов.
2. Практически исследовать действие ферментов поджелудочной железы на липиды.
3. Провести качественные реакции на желчные кислоты, кетоновые тела.
4. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
5. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
6. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, сыворотка крови, гепариновый реактив, дистиллированная вода, ФЭК

2.9.4 Описание (ход) работы:**Опыт 1. Количественное определение липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в сыворотке крови****Ход работа:**

В пробирке смешивают 0.1 мл сыворотки крови и 5 мл гепаринового реактива, интенсивно встряхивают и оставляют стоять в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем снова встряхивают и измеряют оптическую плотность пробы (А) против дистиллированной воды на ФЭКе (длина волны 580-600 нм, кюветы с толщиной 1 см). Полученную величину умножают на калибровочный фактор F, равный 18.1, выведенный экспериментальным путем . Рассчитывают количество ЛНП:

$$F \cdot A = \text{ЛНП г/л.}$$

Где F – калибровочный фактор (18.1); А – оптическая плотность пробы.

Принцип метода и результат записывают в тетрадь.

2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Тема: Белковое питание. Азотистый баланс. Переваривание белков

2.10.1 Цель работы: изучить процесс переваривания белков

2.10.2 Задачи работы:

1. Провести переваривание белка пепсином
2. Изучить процесс переваривание белка трипсином
3. Привить навыки работы химической посудой, реагентами.
4. Закрепить полученные знания по белковому питанию.
5. Ознакомить с реакциями обнаружения аммонийных солей
6. Привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы.

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, фильтровальная бумага, термостат, 0,2%-ная соляная кислота, желудочный сок или раствор пепсина в соляной кислоте, лакмус сода, кусочек фибрина, водяная баня, раствор трипсина или панкреатина (щелочная среда), казеин, хлороформ, уксусная кислота, бромная вода, концентрированная серная кислота, раствор сернистой ртути, дистиллированная вода, моча, насыщенный раствор $\text{Ca}(\text{OH})_2$, лакмусовая бумага,

2.10.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Переваривание белка пепсином

Ход работы:

1. В одну пробирку наливают 3-4 мл 0,2% соляной кислоты; во вторую пробирку - 3-4 мл желудочного сока или раствора пепсина в соляной кислоте; в третью пробирку - 3-4 мл желудочного сока или раствора пепсина в соляной кислоте, предварительно нейтрализованного на лакмус содой; в четвертую пробирку - 3-4 мл предварительно прокипяченного и охлажденного желудочного сока или прокипяченного и охлажденного раствора пепсина и соляной кислоте.

2. Помещают в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины и все пробирки ставят одновременно, а водяную баню при 37-40°C.

3. Через полчаса или час вынимают пробирки из бани и наблюдают результаты исследования. В первой пробирке должно произойти лишь набухание фибрина под действием кислоты; во второй переваривание (растворение) фибрина; в третьей – фибрин остается без изменения, так как пепсин в нейтральной среде не активен; в четвертой – происходит набухание фибрина под действием соляной кислоты, но переваривание не имеет места, так как пепсин разрушен кипячением.

Опыт 2. Переваривание белка трипсином

а)Переваривание фибрина

Ход работы:

1. В одну пробирку наливают 3-4 мл раствора трипсина или панкреатина (щелочная среда); во вторую пробирку - 3-4 мл раствора трипсина или панкреатина, предварительно нейтрализованного соляной кислотой на лакмус; в третью пробирку - 3-4 мл подкисленного раствора трипсина или панкреатин.

2. Помещают в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины и одновременно ставят все пробирки в водяную баню при 37-40°C.

3. Через полчаса или час вынимают пробирки из бани и наблюдают результаты исследования. В первой пробирке должно иметь место переваривания (растворение) фибрина; во второй пробирке может быть лишь очень небольшое переваривание, так как в нейтральной среде трипсин слабо активен; в третьей пробирке наблюдается только набухание фибрина.

4. Отфильтровывают часть жидкости из каждой пробирки и проделывают с

фильтратом биуретовую реакцию. Положительная реакция указывает на присутствие в фильтрате продуктов переваривания белка.

б) Переваривание казеина

Ход работы:

1. В колбочку наливают 25-30 мл вытяжки трипсина или раствора панкреатита и помещают туда 3-5 г казеина
2. Перемешивают содержимое, добавляют около 5 мл хлороформа (для предотвращения гниения), закрывают колбочку ватой и ставят в термостат при 37-40°C на 4-5 суток (до следующего занятия).
3. На следующем занятии нагревают колбочку до кипения и добавляют по каплям уксусную кислоту до слабокислой реакции. При этом осаждаются не переваренные белки.
4. Охлаждают смесь, погрузив колбочку в холодную воду, и фильтруют для освобождения от белков.
5. Отливают порцию фильтрата (3-4 мл) в пробирку и добавляют по каплям бромную воду. Появление розово-фиолетового окрашивания, исчезающего от избытка реактива, указывает на присутствие свободного триптофана.
6. К другой порции фильтрата (около 2 мл) добавляют 8-10 капель концентрированной серной кислоты и 5-6 мл раствора сернокислой ртути в серной кислоте, перемешивают содержимое и оставляют стоять на 10-15 минут.
7. Образовавшийся желтый осадок ртутного соединения триптофана отфильтровывают, сохраняя фильтрат, и промывают на фильтре 4-5 маленькими порциями (по 1-2 мл) дистиллированной воды.
8. Небольшим количеством (около 0,5 мл) воды переносят осадок в пробирку. Делят осадок и фильтрат на три части и проделывают как с осадком, так и с фильтратом реакции Адамкевича, Милона и ксантопротеиновую (см. Цветные реакции на белки).
9. Отмечают положительные реакции Адамкевича в ксантопротеиновую и отрицательную реакцию Милона с осадком, что указывает на присутствие триптофана и отсутствие тирозина.

Положительная ксантопротеиновая и милонова реакции и отрицательная реакция Адамкевича с фильтратом указывают на наличие в фильтрате тирозина и отсутствие триптофана.

Окрашивание при проведении ксантопротеиновой реакции (в особенности с осадком) появляется медленно (обычно через 15-20 минут).

Опыт 3. Обнаружение аммонийных солей

Ход работы:

В пробирку наливают 2-3 мл мочи и 1-2 мл насыщенного раствора $\text{Ca}(\text{OH})_2$, перемешивают и подносят к отверстию пробирки, не прикасаясь к её стенкам, лакмусовую бумагу, смоченную водой. Через некоторое время бумага приобретает синий цвет, за счет поглощения выделяющегося аммиака.

2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: Обмен минеральных веществ

2.11.1 Цель работы: изучить процесс обмена минеральных веществ

2.11.2 Задачи работы:

1. Научиться определять минеральные вещества в моче на основе качественных реакций на катионы металлов и анионы кислот.
2. Изучить реакции с помощью которых возможно открытие хлоридов
3. Привить навыки работы химической посудой, реагентами.
4. Привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы.

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: штатив с пробирками, спиртовка, спички, моча, 1%-ного раствор нитрата серебра,

10%-ный раствор азотной кислоты, дистиллированная вода, индикатор, нитрат ртути, раствор хлора, 2 н. азотная кислоты, 10%-ный раствор соляной кислоты, 5%-ный раствор хлорида бария, молибденовый реактив.

2.11.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Открытие хлоридов

а) Открытие хлоридов в моче..

Ход работы:

К 10 каплям мочи добавляют 2 капли 1%-ного раствора нитрата серебра и 3 капли 10%-ного раствора азотной кислоты. Выпадает белый осадок.

б) Количественное определение хлоридов в моче.

Ход работы:

В сахарный стаканчик приливают 1,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл мочи, 4 капли индикатора, перемешивают и раствор титруют нитратом ртути до появления сине-фиолетового окрашивания. В качестве контроля используют стандартный раствор хлора, к 2 мл которого добавляют 4 капли индикатора и раствор оттитровывают нитратом ртути (2 г нитрата ртути растворяют в 200 мл дистиллированной воды и добавляют 20 мл 2н азотной кислоты, доводят общий объем до 1 л).

Расчет:

$$\text{хлор (мэкв / л)} = \frac{0,02 \times A \times 5 \times 1000}{B} = \frac{A \times 100}{B},$$

где 0,02 –миллиэквиваленты хлора в 2 мл стандартного раствора; 5х1000 – коэффициент пересчета на 1 л; А – количество раствора нитрата ртути, пошедшее на титрование опыта (мочи); В – количество миллилитров раствора нитрата ртути, пошедшее на титрование контроля (стандартный раствор хлора). В норме хлора в моче 170-210 мэкв/л.

Опыт 2. Открытие сульфатов

Ход работы:

К 10 каплям мочи добавляют 5 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 5 капель 5%-ного раствора хлорида бария. Выпадает белый осадок.

Опыт 3. Открытие фосфатов

Ход работы:

В пробирку наливают 20 капель молибденового реактива, нагревают почти до кипения и добавляют несколько капель мочи. Выпадает желтый кристаллический осадок фосфорных солей молибдата аммония.

2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).

Тема: Синтез гема и его регуляция. Обмен железа.

2.12.1 Цель работы: изучить процесс синтеза гема и его регуляции, а также обмен железа.

2.12.2 Задачи работы:

1. Провести бензидиновую пробу на кровь.
2. Изучить реакции, с помощью которых можно открыть билирубин.
3. Привить навыки работы с химической посудой, реагентами.
4. Закрепить полученные знания по строению гемоглобина.
5. Ознакомить с реакциями на желчные пигменты
6. Привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы.

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, пипетка, часовое стекло, кровь, палочка, 5%-ный раствор бензидина, 3%-ный раствор перекиси водорода, сыворотка крови, этиловый спирт, фильтр, диазореактив, фильтровальная бумага, концентрированный раствор хлорида бария, моча, 25%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, желчь, концентрированная азотная кислота, концентрированная серная кислота, серный эфир, концентрированная соляная кислота.

2.12.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Бензидиновая проба на кровь

Ход работы:

В пробирку наливают 10 капель разведенной крови, такое же количество 5%-ного раствора бензидина и 2 капли 3%-ного раствора перекиси водорода. Развивается синее или зеленое окрашивание.

Опыт 2. Открытие билирубина

а) Открытие свободного билирубина

Ход работы:

В пробирку отмеривают 1 мл сыворотки крови, 2 мл этилового спирта, перемешивают и фильтруют. К фильтрату добавляют 5 капель свежеприготовленного диазореактива. Развивается красно-розовое окрашивание.

Приготовление диазореактива: (а) раствор 1:5 г сульфаниловой кислоты растворяют при подогревании в 300-400 мл дистиллированной воды, прибавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой до 1 л; б) раствор 2: 0,5% раствор нитрата натрия. Перед употреблением смешивают 10 мл раствора а) с 0,3 мл раствора б).

б) Открытие связанного билирубина

Ход работы:

На часовое стекло наносят 1 каплю сыворотки крови и добавляют 3 капли диазореактива. Перемешивают палочкой. Образуется характерное для билирубина красное окрашивание.

в) Проба Гаррисона

Ход работы:

Полоску фильтровальной бумаги пропитывают концентрированным раствором хлорида бария и высушивают. Затем её помещают на 1 мин в мочу и снова высушивают, после чего наносят 3 капли 25%-ной трихлоруксусной кислоты. При наличии в моче билирубина развивается зеленое окрашивание.

Опыт 3. Реакции на желчные пигменты

а) Проба Розенбаха

Ход работы:

2 мл желчи в разведении 1:5 несколько раз профильтровывают через фильтр, после чего в конус фильтра вносят 1 каплю концентрированной азотной кислоты и наблюдают появление цветных колец.

б) Обнаружение уробилина в моче (проба Флоранса)

Ход работы:

К 4 мл исследуемой мочи добавляют 3 капли концентрированной серной кислоты и 1,5 мл серного эфира: содержимое пробирки осторожно перемешивают. Верхний слой (эфирную вытяжку) отсасывают пипеткой с грушей и переносят в другую пробирку с 10 мл концентрированной соляной кислоты. На границе жидкостей появляется розовое или красное кольцо, характерное для уробилина.

2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).

Тема: Особенности метаболизма эритроцитов и фагоцитирующих лейкоцитов. Основные свойства белковых фракций крови и значение их определения для диагностики заболеваний

2.13.1 Цель работы: изучить особенности метаболизма эритроцитов и фагоцитирующих лейкоцитов и основные свойства белковых фракций крови

2.13.2 Задачи работы:

1. Изучить метаболизм глюкозы в эритроцитах и свойства белковых фракций крови
2. Закрепить полученные знания при электрофоретическом разделении белковых фракций.

3. Привить навыки работы с химической посудой, с литературой и умение формулировать выводы.

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, полоски ацетата целлюлозы, буфер, электрофорез, рамка для поддержания полосок ацетата целлюлозы, капиллярная пипетка, линейка, ванночка с раствором пунцового С, 5%-ный раствор уксусной кислоты, фотоколориметр, элюирующий раствор

2.13.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Электрофоретическое разделение белковых фракций

Ход работы:

1. Сухие полоски ацетата целлюлозы осторожно положить на поверхность буфера таким образом, чтобы они всасывали жидкость только снизу с помощью капиллярных сил. (Нельзя сразу окунать сухие плёнки в буферный раствор, так как при быстром погружении в их порах может остаться воздух).

2. Затем полоски поместить в рамку, предназначенную для поддержания их в горизонтальном положении во время электрофореза. (Следует следить за тем, чтобы полоски находились в натянутом состоянии и не провисали).

3. При установке рамки убедитесь в том, что концы плёнок соприкасаются с буфером, а камера находится в строго горизонтальном положении (уровень буфера в обоих отсеках должен быть одинаковым).

4. Перед нанесением пробы в течение 5 минут провести префорез при рабочих значениях напряжений (180-200 В) и силы тока (0,4-0,5 мА)

5. Пробу наносить капиллярной пипеткой, проводя ею вдоль линейки. Количество нанесённой сыворотки определяется в первую очередь тем, каким методом планируется оценивать полученную электрофореграмму (фото-колориметрическим или с использованием денситометра). В первом случае требуется несколько большее количество сыворотки с целью получения более интенсивно окрашенных растворов после элюции. Проба должна быть нанесена в виде тонкой полосы, так как именно от этого во многом будет зависеть качество полученной электрофореграммы.

6. Электрофорез проводить при напряжении 180-200 В в течении 20-30 мин. В процессе электрофореза камера должна быть плотно закрыта во избежание явления реофореза, связанного с использованием буфера с поверхности ацетатцеллюлозных плёнок в результате их нагревания под действием электрического тока.

7. После проведения электрофореза плёнки изымаются из камеры и помещаются на 10 мин в ванночку с раствором пунцового С.

8. Отмывку фона произвести 5% раствором уксусной кислоты.

9. Полученную электрофореграмму оценить с помощью фотоколориметрического анализа в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 540 нм (зелёный светофильтр), для чего предварительно:

а) взять 6 пробирок;

б) в каждую из которых за исключением первой прилить по 2,5 мл элюирующего раствора, в 1 пробирку приливают 5 мл того же раствора;

в) полученную электрофореграмму разрезать на 5 фракций;

г) каждую из фракций поместить в соответствующую пробирку с элюирующим раствором: альбуминовую фракцию в 1-ю пробирку, а1-глобулиновую – во 2-ю, а2-глобулиновую – в 3-ю, в-глобулиновую – в 4-ю, у-глобулиновую – в 5-ю;

д) шестую пробирку используют в качестве раствора сравнения.

10. Произвести расчёт. Оптическую плотность всех пяти фракций складывают, причём оптическую плотность альбуминовой фракции следует предварительно умножить на 2. Полученную сумму принимают за 100%, после чего рассчитывают процентный вклад каждой фракции.

Референтные величины в протеинограмме:

- альбумины – 56-76%,
- α_1 -глобулины – 2-7%,
- α_2 – глобулины – 4-12%,
- γ - глобулины – 8-18%.

Диагностическое значение: нарушение процентного соотношения белковых фракций – диспротеинемии – встречаются при острых и хронических заболеваниях различной природы, снижение доли альбумина может быть связано как с нарушением белоксинтетической фракции печени, так и с увеличением синтеза белков, относящихся к глобулинам.

2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).

Тема: Биохимия мышечной ткани

2.14.1 Цель работы: изучить строение и свойства мышечной ткани

2.14.2 Задачи работы:

1. Изучить некоторые физические и химические свойства веществ мышечной ткани.
2. Ознакомиться с исследованиями, при помощи которых устанавливают свежесть мяса.
3. Закрепить полученные знания и навыки на конкретных примерах исследования определения величины рН, бензидиновую пробу на наличие пероксидазы, определение количества аминокислотного азота, и реакции на аммиак, сероводород и пробу с сульфатом меди.
4. Привить навыки работы химической посудой; привить навыки работы с литературой и умение формулировать выводы.

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

колба, штатив с пробирками, мясо, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, фенолфталеин, 0,1н раствор КОН, фарш мяса рыбы, 10%-ный раствор ацетата свинца, водяная баня

2.14.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Определение рН

Для определения рН готовят экстракт. Освобождают мясо от жира и соединительной ткани, отвешивают 25 г мяса, измельчают его и помещают в коническую колбу, добавляют туда 100 мл дистиллированной воды и экстрагируют в течение 15 мин, периодически встряхивая через каждые 5 мин. Затем вытяжку фильтруют через бумажный фильтр и фильтрат употребляют для исследования. Если определение рН производится электрометрическим методом, то используют потенциометр, добавляя небольшое количество хингидрона в фильтрат мясного экстракта.

Определение проводится согласно инструкциям, приложенным к приборам.

Опыт 2. Реакция на пероксидазу:

Для исследования берут 2 мл мясной вытяжки 1:4, добавляют 5 капель раствора бензидина и 3 капли 1 %-ного раствора перекиси водорода. Смесь в пробирке взбалтывают и наблюдают за изменением окраски. В случае положительной реакции вытяжка окрашивается в сине-зеленый цвет в течение 0,5—2 мин; при сомнительной — окрашивание появляется после 2 мин. В вытяжках из мяса, полученного от больных или павших животных, первоначальный цвет не изменяется. Такое мясо необходимо подвергнуть бактериологическому исследованию для установления возбудителя заболевания.

Опыт 3. Определение продуктов первичного распада белков в бульоне

20 г фарша, приготовленного из исследуемой пробы, помещают в коническую колбу емкостью 100 мл, заливают 60 мл воды, тщательно перемешивают, закрывают часовым стеклом, ставят в кипящую водяную баню и доводят до кипения. Горячий бульон фильтруют через плотный слой ваты толщиной не менее 0,5 см в пробирку, помещенную в химический стакан с холодной водой. Если после фильтрации в бульоне видны хлопья белка, то его дополнительно фильтруют через фильтровальную бумагу. В пробирку наливают 2 мл фильтрата и добавляют три капли 5%-ного раствора сульфата меди (II). Пробирку встряхивают 2—3 раза и ставят в штатив. Учет реакции проводят через 5 мин. Мясо и мясные субпродукты считают свежими, если при добавлении раствора сульфата меди (II) бульон остается прозрачным. Мясо и мясные субпродукты относят к категории сомнительной свежести, если при добавлении раствора сульфата меди (II) происходит помутнение бульона, а в бульоне из размороженного мяса — интенсивное помутнение с образованием хлопьев. Мясо и мясные субпродукты считают несвежими, если при добавлении раствора сульфата меди (II) наблюдается образование желеобразного осадка, а в бульоне из размороженного мяса — наличие крупных хлопьев.

Опыт 4. Определение amino-аммиачного азота

Ход работы:

1. Приготовление мясной вытяжки. Для приготовления мясной вытяжки в соотношении 1:4 отвешивают 20 г. мяса, мелко измельчают ножницами и содержимое переносят в колбу, наливают 80 мл. дистиллированной воды. Содержимое колбы встряхивают 3 минуты. Затем фильтруют через бумажный фильтр.

2. Выполнение анализа. В колбу наливают 10 мл. вытяжки. Затем приливают 40 мл. дистиллированной воды и 3 капли фенолфталенина. Далее титруют 0,1 н раствором КОН до слабо-розового окрашивания.

3. Расчет. Расчет содержания amino-аммиачного азота проводят по формуле:

$$X = 1,4 \cdot Y, \text{ где}$$

Y – количество мл. 0,1 н раствора КОН, пошедшего на титрование.

В доброкачественном мясе содержится 1,26 мг аминно-аммиачного азота. В мясе подозрительной свежести – от 1,27 до 1,68 мг., в несвежем – более 1,68 мг.

Опыт 5. Определение сероводорода с подогреванием пробы

Ход работы:

В широкую пробирку рыхло помещают 5-7 г фарша мяса рыбы. Под пробирку закрепляют полоску фильтровальной бумаги, смоченную 10%-ным щелочным раствором ацетата свинца диаметр должен быть не более 5 мм. Бумажка не должна прикасаться к мясу и стенкам пробирки. Контролем служит пробирка с фильтровальной бумагой, смоченной дистиллированной водой. Пробирки подогревают на водяной бане при температуре 48-52°C в течение 15 минут и после того немедленно проводят анализ реакции: рыба свежая - реакция отсутствует (бумага белая, как в контроле); рыба сомнительной свежести - на бумаге появляется слабо-бурые пятна (следы сероводорода); рыба несвежая - цвет на бумаге от бурого до темно-коричневого.

2.15 Лабораторная работа №15 (2 часа).

Тема: Биохимия нервной ткани

2.15.1 Цель работы: изучить строение и состав нервной ткани

2.15.2 Задачи работы:

1. Изучить особенности обмена липидов в нервной ткани.

2. Закрепить представления о медиаторах нервной системы на примере ацетилхолина.
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
4. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

штатив с пробирками, ацетилхолин, раствор Люголя, сыворотка, вода, бромтимоловый синий, раствор гидроксида натрия, водяная баня.

2.15.4 Описание (ход) работы:

Опыт 1. Качественная реакция на ацетилхолин

Ход работы:

1. В пробирку внести 5 капель ацетилхолин.
2. Добавить по каплям при встряхивании раствор Люголя.
3. Наблюдать появление осадка йодистой соли ацетилхолина, сначала растворяющегося при встряхивании, а затем стабильного.

Опыт 2. Обнаружение активности холинэстеразы

Ход работы:

1. Взять 3 пробирки. В первую внести 5 капель сыворотки, во вторую-5 капель воды (контроль).
2. В каждую пробирку добавить по капле бромтимолового синего.
3. Наблюдать в пробирке с сывороткой (рН-7,4) за появлением зеленого окрашивания, в пробирке с водой - окрашивание индикатора в желтый цвет.
4. В третьей пробирке приготовить субстратную смесь – внести 5 капель ацетилхолина и 1 каплю бромтимолового синего.
5. 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).
6. Содержимое третьей пробирки разлить поровну в первую и вторую пробирки.
7. Наблюдать появление синей окраски.
8. Обе пробирки поместить в водяную баню при 37
9. Наблюдать за постепенным изменением окраски индикатора в пробирке с сывороткой на зеленую, затем желто-зеленую. Содержимое контрольной пробирки остается синим.