


Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

1. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

Цель освоения дисциплины - научить студента применять при изучении последующих дисциплин и при профессиональной деятельности сведения о химическом составе и молекулярных процессах в живых системах как о характеристиках нормы и о признаках патологических состояний.

- сформировать комплекс знаний, которые необходимы студентам при рассмотрении биохимической сущности и механизмов процессов, происходящих в живых системах на молекулярном и клеточном уровнях.

- формирование биохимического подхода при оценке параметров этих процессов, что позволит более глубоко понять взаимодействие всех систем организма в норме и при патологии, а также его отношение с окружающей средой.

Задачи освоения дисциплины:

– изучение основных концепций, закономерностей, гипотез, методов биологической химии, необходимых при решении практических медицинских проблем.

– - детальное рассмотрение ведущих идей, теорий, научных фактов, составляющих основу для практической подготовки студентов, формирования их естественнонаучного мировоззрения.

2. МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ В СТРУКТУРЕ ОПОП:

Дисциплина Б1.В.1.04 «Основы биохимии» относится к вариативной части Блока 1 (Дисциплины (Модули)). Для изучения дисциплины необходимы знания вопросов предшествующих изучаемых дисциплин:

- Регенеративная медицина,
- Систематика животных,
- Систематика растений,
- Ознакомительная практика (систематика растений и животных),
- Проектная деятельность.


Данная дисциплина изучается на 3 курсе в 5 семестре.

Дисциплина является предшествующей для изучения следующих дисциплин и практик:

- Радиохимия,
- Синтетическая химия,
- Основы клинической лабораторной диагностики,
- Лабораторные методы исследования в биологии,
- Молекулярная генетика и цитогенетика,
- Энзимология,
- Научно-исследовательская работа,
- Практика по профилю профессиональной деятельности,
- Преддипломная практика, в том числе научно-исследовательская работа,
- Подготовка к процедуре защиты и защита выпускной квалификационной работы.

Параллельно с дисциплиной «Основы биохимии» компетенция ПК-3 осваивается при изучении дисциплин и практик:

- Фармацевтическая химия,
- Токсикологическая химия.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

3. ПЕРЕЧЕНЬ ПЛАНИРУЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ОБУЧЕНИЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ (МОДУЛЮ), СООТНЕСЕННЫХ С ПЛАНИРУЕМЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ ОСВОЕНИЯ ОПОП

Код и наименование реализуемой компетенции	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю), соотнесенных с индикаторами достижения компетенций
ПК-3 готовностью применять на производстве базовые общепрофессиональные знания теории и методов современной биологии	<p>Знать:</p> <ul style="list-style-type: none"> - особенности протекания биохимических процессов в клетке; - принципы регуляции обмена веществ в живых системах; - пути обмена веществом и энергией с окружающей средой; - методы биохимического анализа; <p>Уметь:</p> <ul style="list-style-type: none"> - оценивать ход биохимических процессов в живых системах, опираясь на теоретические положения; - проводить биохимические исследования; <p>Владеть:</p> <p>навыками безопасной работы в биохимической лаборатории и обращения с химической посудой, реактивами, работы с газовыми горелками и необходимыми электрическими приборами и аналитическими системами.</p>

4. ОБЩАЯ ТРУДОЕМКОСТЬ ДИСЦИПЛИНЫ


4.1. Объем дисциплины в зачетных единицах (всего): 5 ЗЕ.

4.2. по видам учебной работы (в часах): 180.

Вид учебной работы	Количество часов 180 (форма обучения <u>очная</u>)	
	Всего по плану	в т.ч. по семестрам
		5
1	2	3
Контактная работа обучающихся с преподавателем	54	54
Аудиторные занятия:	54	54
Лекции	18/18*	18/18*
Практические и семинарские занятия	-	-
Лабораторные работы (лабораторный практикум)	36	36
Самостоятельная работа	90	90
Текущий контроль (количество и вид: контрольная работа, коллоквиум, реферат)	Тестирование, устный опрос	Тестирование, устный опрос
Курсовая работа	-	-
Виды промежуточной аттестации (экзамен, зачет)	экзамен /36	экзамен /36
Всего часов по дисциплине	180	180

*Интерактивные формы занятий

**В случае необходимости использования в учебном процессе частично/исключительно дистанционных образовательных технологий в таблице через слеш указывается количество часов работы ППС с обучающимися для проведения занятий в дистанционном формате с применением электронного обучения.


Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

4.3. Содержание дисциплины.

Распределение часов по темам и видам учебной работы

Форма обучения _____ очная _____.

Название разделов и тем	Всего	Виды учебных занятий				Самостоятельная работа	Форма текущего контроля знаний
		Аудиторные занятия			в т.ч. занятия в интерактивной форме		
		лекции	Практические занятия, семинары	лабораторные работы			
Энергетические процессы в живом организме	14	2	–	2	2	10	Тестирование, устный опрос
Промежуточный обмен	14	2	–	2	2	10	Тестирование, устный опрос
Метаболизм углеводов (1 часть)	16	2	–	4	2	10	Тестирование, устный опрос
Метаболизм углеводов (2 часть)	16	2	–	4	2	10	Тестирование, устный опрос
Метаболизм липидов	14	2	–	2	2	10	Тестирование, устный опрос
Метаболизм белков	24	2	–	12	2	10	Тестирование, устный опрос
Строение и функции клеточной мембраны	14	2	–	2	2	10	Тестирование, устный опрос
Нуклеиновые кислоты	14	2	–	2	2	10	Тестирование, устный опрос
Интеграция клеточного обмена	18	2	–	6	2	10	Тестирование, устный опрос
Подготовка к экзамену	36		–				Тестирование, устный опрос
ИТОГО	180	18	–	36	18	90	

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

5. СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ (МОДУЛЯ)

Тема 1. Энергетические процессы в живом организме.

Классификация клеток по поступлению энергии. Строение и характеристика макроэргических соединений на примере АТФ. Субстратное фосфорилирование. Теории биологического окисления. Окислительное фосфорилирование. Дыхательная цепь. Разобщение дыхания и фосфорилирования. Дыхательный контроль.

Тема 2. Промежуточный обмен

Окислительное декарбоксилирование пирувата: последовательность реакций, строение пируватдегидрогеназного комплекса. Медицинское значение процесса (ингибиторы пируватдегидрогеназного комплекса - соли тяжелых металлов, алкоголь и др.) Регуляция процесса. Цикл лимонной кислоты: последовательность реакций, характеристика и локализация ферментов. Связь между общим путем катаболизма и цепью переноса электронов и протонов. Аллостерические механизмы регуляции цитратного цикла.

Тема 3, 4. Метаболизм углеводов.

Основные углеводы пищи. Переваривание углеводов. Глюкоза как важнейший метаболит углеводного обмена: общая схема источников и путей расходования глюкозы в организме. Катаболизм глюкозы. Распад в аэробных условиях - основной путь катаболизма глюкозы у человека. Последовательность реакций до образования пирувата (гликолиз) как специфический для глюкозы путь катаболизма. Регуляция процесса, лимитирующие реакции. Челночные механизмы. Распространение и физиологическое значение распада глюкозы. Распад глюкозы в анаэробных условиях. Распределение и физиологическое значение анаэробного распада глюкозы в анаэробных условиях. Биосинтез глюкозы (глюконеогенез) из молочной кислоты.


Тема 5. Метаболизм липидов.

Обмен жирных кислот. β - Окисление жирных кислот. Энергетика процесса. Синтез кетонных тел. Биосинтез жирных кислот из ацетил-КоА и использование ацетоуксусной кислоты. Физиологическое значение этого процесса. Обмен жиров. Пищевые жиры и их переваривание. Всасывание продуктов переваривания. Транспортные липопротеины, их специфичность и взаимопревращения. Резервирование и мобилизация жиров в жировой ткани: регуляция синтеза и мобилизации жиров. Роль инсулина, глюкагона и адреналина. Транспорт жирных кислот альбуминами крови. Физиологическая роль резервирования и мобилизации жиров в жировой ткани. Нарушение этих процессов при ожирении.

Тема 6. Метаболизм белков.

Переваривание белков. Протеиназы - пепсин, трипсин, химотрипсин; проферменты протеиназ и механизмы их превращения в ферменты; субстратная специфичность протеиназ. Экзопептидазы: карбоксипептидаза, аминопептидазы, дипептидазы. Всасывание аминокислот. Аминокислоты, участвующие в трансаминировании; особая роль глутаминовой кислоты. Биологическое значение реакций трансаминирования. Окислительное дезаминирование аминокислот; глутатдегидрогеназа. Непрямое дезаминирование аминокислот. Декарбоксилирование аминокислот, модификация боковой цепи. Конечные продукты азотистого обмена: соли аммония и мочевины. Основные источники аммиака в организме. Роль глутамин в обезвреживании и транспорте аммиака. Биосинтез мочевины и его регуляция. Биогенные амины.

Тема 7. Строение и функции клеточной мембраны.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Жидкостно-мозаичная модель мембраны. Липидный состав мембран и строение липидного бислоя. Белки мембран. Гликолипиды и гликопротеины мембран. Общие свойства мембран: текучесть, поперечная асимметрия, избирательная проницаемость. Механизмы переноса веществ через мембраны. Пассивный транспорт (простая и облегченная диффузия). Транспортные белковые системы пассивного транспорта. Первично активный транспорт, транспортные АТФазы, вторично активный транспорт углеводов и аминокислот. Симпорт, антипорт и унипорт. Разнообразие мембранных структур и функций мембран. Образование, строение, функции лизосом. Аутолиз тканей. Роль повреждения лизосом при воспалении и других патологических процессах. Мембранные белки- рецепторы; трансмембранная передача сигналов в клетку.

Тема 8. Нуклеиновые кислоты.

История открытия и изучения нуклеиновых кислот. Нуклеотиды: строение и номенклатура. Первичная структура нуклеиновых кислот. Комплементарные и некомплементарные полинуклеотидные цепи. Вторичная структура РНК. Двойная спираль ДНК. Денатурация и ренатурация (ренативация) ДНК. Гибридизация ДНК – ДНК и ДНК – РНК; видовые различия первичной структуры нуклеиновых кислот. Рибосомы и рибосомные РНК. Полирибосомы и матричные РНК. Строение хроматина. Транспортные РНК.

Тема 9. Интеграция клеточного обмена. Взаимосвязь обмена углеводов, липидов и белков: наличие общих промежуточных продуктов, общих путей превращений ключевых метаболитов, взаимопревращения различных классов соединений. Центральная роль ацетилкофермента А в превращениях углеводов, липидов, белков.

Связь превращений углеводов, липидов, белков с обменом воды, минеральных соединений, витаминов.

Скорость химических реакций как основной регулируемый фактор. Важнейшие регуляторные системы организма: система клеточной авторегуляции, эндокринная система, нервная система, система дифференцировки клеток.


Пути осуществления регулирующих воздействий на уровне клетки. Регуляция по закону действующих масс. Регуляция скорости реакций за счет изменения доступности субстратов и кофакторов. Участие клеточных мембран и внутриклеточных структур в регуляции обмена веществ. Регуляция ферментативной активности. Понятие о регуляторных ферментах. Регуляция количества ферментов в клетке: индукция и репрессия синтеза ферментов.

6. ТЕМЫ ПРАКТИЧЕСКИХ И СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ


Данный вид работы не предусмотрен УП.

7. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ (ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ)

№ п/п	Часы	Тема, содержание лабораторных занятий	Деятельность студента
1.	1	Особенности работы в биохимической лаборатории	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов
2.	1	Анализ аминокислотного состава. Цветные реакции на	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

		белки	протокола
3.	1	Выделение казеина из молока.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
4.	1	Реакции осаждения и денатурации белков	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
5.	1	Определение активности α -амилазы в сыворотке крови и моче	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
6.	1	Влияние рН на активность амилазы слюны.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
7.	1	Количественное определение активности ферментов	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
8.	1	Кинетические свойства ферментов	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
9.	1	Специфические свойства ферментов	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
10.	1	Качественные реакции на пероксидазу и каталазу	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
11.	1	Обнаружение дегидрогеназы янтарной кислоты в мышцах	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
12.	1	Количественное определение витамина Р в чае	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
13.	2	Определение состава биополимера по результатам качественных реакций на продукты его гидролиза.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
14.	1	Качественные реакции на витамины В ₁ и С.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
15.	1	Качественные реакции на витамин В ₂ .	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
16.	1	Количественное определение глюкозы в сыворотке крови.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
17.	1	Качественное определение органических веществ в моче.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
18.	1	Количественное определение пирувата в биологических жидкостях	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

19.	1	Определение содержания белка в моче.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
20.	1	Определение содержания минеральных веществ в моче	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
21.	2	Биохимия крови	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
22.	2	Определение содержания сиаловых кислот в сыворотке крови.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
23.	1	Определение содержания общих липидов в сыворотке крови.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
24.	2	Определение перекиси липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
25.	2	Диацетилмонооксимный метод определения мочевины	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
26.	2	Определение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови фосфорновольфрамовым методом	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
27.	2	Определение хлоридов в сыворотке крови по методу Рушняка	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
28.	2	Определение кальция в сыворотке крови.	Выполнение экспериментальной части, анализ результатов, оформление и защита протокола
	36		


Лабораторная работа 1. Особенности работы в биохимической лаборатории

Мотивация: Знание оборудования биохимической лаборатории необходимо для получения достоверных и воспроизводимых результатов; знание правил поведения в биохимической лаборатории необходимо для обеспечения личной безопасности.

Цель занятия: Ознакомиться с предметом и задачами биохимии, с оборудованием биохимической лаборатории и инструкциями по технике безопасности. Научиться работать на фотоэлектроколориметре, строить калибровочный график.

Студент должен:

Знать	Уметь
1. Порядок работы, правила техники безопасности в биохимической лаборатории, меры медицинской помощи при несчастных случаях.	1. Оказать медицинскую помощь при несчастных случаях (ожог кислотный или щелочной, термический ожог и др.).
2. Оборудование биохимической лаборатории (химическая посуда, приборы, биологические	2. Работать на центрифуге, фотоэлектроколориметре.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

<p>объекты и др.).</p> <p>3. Принцип колориметрии и правила работы на КФК. Принцип построения калибровочного графика.</p> <p>4. Принцип центрифугирования и области его применения.</p>	<p>3. Построить калибровочный график и применить его для определения концентраций окрашенного раствора.</p>
---	---

Вопросы и задания для самоподготовки:


1. Ознакомьтесь с предметом и задачами биологической химии, ее разделами.
2. Изучите и перепишите в протокол инструкцию по технике безопасности при работе в биохимической лаборатории и памятку «Первая помощь при несчастных случаях».
3. Ознакомьтесь с имеющейся в лаборатории химической посудой. Потренируйтесь отмеривать точные объемы воды (10, 5, 2, 1 и 0,1 мл) с помощью бюретки, цилиндра и пипеток.
4. Ознакомьтесь с имеющейся в лаборатории аппаратурой.
5. Изучите принцип работы фотоэлектрокolorиметра.

Содержание обучения

Направления биохимии	Статическая	Динамическая	Функциональная
Предмет изучения	Химический состав организмов	Превращения веществ в организме (метаболизм)	Химические процессы, лежащие в основе жизнедеятельности
Объект исследования	Человек и животные	Растения	Микроорганизмы
Задачи биохимии	<ul style="list-style-type: none"> – исследование химической структуры и функций биомолекул клетки; – изучение путей метаболизма важнейших органических молекул и неорганических веществ, а также механизмов регуляции этих процессов; – исследование проблем биоэнергетики организма; – выяснение молекулярных основ формирования патологии, включая наследственные заболевания; – создание методов и средств биохимической диагностики и контроля проводимого лечения; – изучение механизмов действия лекарств; – разработка методов генной инженерии с целью получения лекарственных препаратов и определения путей коррекции наследственной патологии. 		
Задачи обучения	<ul style="list-style-type: none"> – научиться применять сведения об особенностях химического состава организма человека и молекулярных основах функционирования различных органов и тканей при изучении последующих медицинских дисциплин и в профессиональной деятельности. 		
Прикладные разделы биохимии	Медицинская биохимия Биохимия питания	Молекулярная генетика Биохимия спорта	Биохимическая фармакология Биотехнология

Проверка качества усвоения знаний (конечный уровень)

1. Перечислите проблемы, изучаемые различными разделами биохимии.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

2. Какой биологический материал используется в биохимической лаборатории? Назовите правила работы с ним.
3. Каковы меры первой помощи:
 - при ожогах кожи кислотами и щелочами;
 - случайном попадании кислот или щелочей в рот; случайном попадании кислот или щелочей в желудочно-кишечный тракт;
 - ожогах глаз кислотами или щелочами; термических ожогах.
4. Назовите правила центрифугирования.
5. Поясните применение метода фотометрии в биохимических исследованиях.
6. Укажите принцип и общие приемы работы на фотоэлектроколориметре.
7. Поясните назначение и принцип построения калибровочного графика.
8. Поясните применение стандартных растворов в биохимических исследованиях.
9. Укажите роль биохимических исследований для практической медицины.
10. Поясните значение биохимии в формировании врача.

Лабораторная работа 2. Выделение казеина из молока

Сложные белки состоят из апопротеинов (простых белков) и небелковых компонентов или простетических групп (фосфорная кислота, углеводы, липиды, окрашенные соединения, производные витаминов, нуклеиновые кислоты, ионы металлов и др.). Исследование сложных белков заключается в определении в их составе простых белков и специфических небелковых соединений.

Фосфопротеины – сложные белки, содержащие в качестве простетической части остатки фосфорной кислоты. Фосфорная кислота связана с гидроксильной группой серина или треонина сложной эфирной связью. К фосфопротеинам относятся казеин молока, вителлин яичного желтка, ихтулин икры рыб и другие белки.

80% всех белков молока приходится на долю казеина. Этот белок обладает кислыми свойствами и находится в молоке в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении достигается изоэлектрическая точка, и казеиноген выпадает в осадок в свободном виде. Избыток кислоты мешает осаждению, т.к. при pH ниже изоэлектрической точки (pH=4,7) молекулы белка перезаряжаются, и казеиноген вновь переходит в раствор.

Цель работы

Доказать, что молоко содержит сложный белок.

Принцип метода

Для определения фосфорной кислоты в составе фосфопротеина казеина необходимо осуществить его гидролиз и проделать реакцию с молибденовым реактивом.


Реактивы: 1% HCl, H₂O дист., 10% NaOH, конц. HNO₃, лакмусовая бумага, молибденовый реактив, 1% CuSO₄.

Оборудование: химические стаканы емкостью 50 мл, мерные цилиндры на 10 мл, стеклянные палочки, воронки, бюретки, бумажные фильтры, штативы с пробирками.

Исследуемый материал: молоко.

Выполнение работы

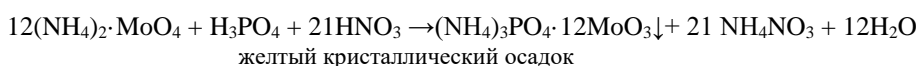
1. Для выделения казеина из молока в стакан к 30 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды.
2. Казеин осаждают, добавляя по каплям при перемешивании 1% раствор соляной кислоты или 0,1% раствор уксусной кислоты. Необходимо избегать избытка кислоты, так как казеин в ней растворяется.
3. Выпавший осадок казеина отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой.
4. Для удаления кислоты в стакан приливают 10 мл дист. воды, перемешивают и оставляют еще на 5 минут. Надосадочную жидкость аккуратно сливают. К осадку еще раз приливают 10 мл

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

дист. воды. С помощью этой процедуры удаляют большую часть кислоты. Осторожно перемешивают содержимое стакана и через 5 минут фильтруют через бумажный фильтр.

5. После отстаивания жидкость фильтруют и с фильтратом проделывают биуретовую реакцию и молибденовую пробу на фосфорную кислоту.

- Биуретовая реакция:** к 5 каплям гидролизата прибавляют 10%-ный раствор гидроксида натрия и 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Наблюдается фиолетовое окрашивание.
- Молибденовая проба:** к 10 каплям молибденового реактива добавляют 5-7 капель гидролизата и кипятят несколько минут. При охлаждении выпадает кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония (лимонно-желтого цвета):



По результатам проведенных качественных проб на простетические группы сложных белков заполните следующую таблицу:

Сложный белок	Простетическая группа	Реакция, характерная для простетической группы	Результат	Чем обусловлена реакция

Содержание отчета:

- Тема, цель, принципы.
- Заполненные таблицы.
- Выводы по проделанной работе.

Лабораторная работа 3. Реакции осаждения и денатурации белков

Цель работы: провести реакции осаждения и денатурации белков, используя различные воздействия.

Существуют белки растворимые и нерастворимые в воде. Коллоидные растворы белков относительно устойчивы. Эта устойчивость обусловлена тем, что белковые молекулы имеют одинаковый электрический заряд и упакованы так, что на их поверхности находится большое количество гидрофильных полярных групп. Вследствие этого вокруг белковой молекулы формируется плотная многослойная водная оболочка, называемая *гидратной оболочкой*.

Гидрофобные радикалы аминокислот упрятаны внутрь глобулы.

Изменение зарядов белковых молекул и/или снятие гидратной оболочки приводит к агрегации белковых молекул и выпадению их в осадок. При нагревании молекулы белков денатурируют, теряют свою нативную структуру, разворачиваются, но остаются во взвешенном состоянии, что проявляется в помутнении разбавленного белкового раствора.


Вещества, нарушающие структурную организацию белковой молекулы (т.е. четвертичную, третичную и даже вторичную структуры), приводят к изменению физико-химических и биологических свойств белка. Это явление называется *денатурацией*.

Денатурирующие факторы делятся на химические, физические и биологические. Наиболее обширны группы химических факторов (кислоты, тяжелые металлы, алкалоиды, поверхностно-активные вещества и т.д.) и физических факторов (температура, ионизирующая радиация, ультразвук и т.д.). Биологическую денатурацию могут вызвать протеолитические ферменты (например, трипсин), которые разрушают высшие уровни организации молекулы белка перед тем, как гидролизовать ее пептидные связи.

Денатурация изменяет физико-химические свойства белка, в частности, его растворимость. При этом белок становится менее гидрофильным и легко осаждается. Денатурация чаще всего необратима, но в ряде случаев удаление денатурирующих агентов приводит к восстановлению исходной конформации молекулы белка и его природных свойств – *ренатурация*.

Принципы действия факторов денатурации:

- нагревание* вызывает денатурацию белка, сопровождающуюся помутнением раствора
- минеральные и органические кислоты* нейтрализуют заряд молекулы белка и разрушают ее пространственную структуру, что приводит к денатурации и осаждению белка.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

- 3) *ионы тяжелых металлов* связываются с функциональными группами боковых радикалов аминокислот в молекуле белка, в результате чего разрушается ее пространственная структура и происходит осаждение денатурированного белка. При добавлении избытка солей тяжелых металлов (кроме AgNO_3 и HgCl_2) происходит растворение первоначально образующегося осадка из-за адсорбции иона металла и приобретения вследствие этого белковой молекулой положительного заряда.
- 4) *органические растворители* снимают гидратную оболочку и понижают устойчивость белка в растворе. Но осадок выпадает только в нейтральных и слабокислых растворах. Длительное действие органического растворителя вызывает денатурацию белка.

Принцип метода: Для осаждения белка нужно лишить его стабилизирующих факторов: снять заряд, удалить гидратную оболочку или разрушить третичную структуру (денатурировать), используя различные химические реагенты или нагревание.

Реактивы: Азотная кислота, конц.; сульфат меди, 5%-ный раствор; трихлоруксусная кислота, 10%-ный раствор; хлорная кислота, 10%-ный раствор; этиловый спирт, 96%-ный; ацетон.

Оборудование: Штатив с простыми пробирками; пипетки; водяная баня.

Исследуемый материал: Белок куриного яйца.

Получение раствора овальбумина:

1. Чтобы отделить белок от желтка, осторожно проделывают отверстие в скорлупе с двух концов и выливают белок в стакан на 500 мл. В тот же стакан приливают 250 мл дистиллированной воды и содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой.


2. Затем раствор переносят в мерный цилиндр и объем раствора доводят до 300 мл добавлением дистиллированной водой. Раствор оставляют на 30 мин при комнатной температуре для образования хлопьевидного осадка глобулинов, затем разливают в пробирки по 20 мл.

3. 15 мл полученной суспензии дважды фильтруют через фильтр. Фильтрат, содержащий яичный альбумин используют для дальнейших работ.

Опыты с раствором овальбумина:

№	Реакции осаждения	Ход работы*	Наблюдения	Чем обусловлена реакция
1	Нагреванием	В пробирку вносят 10 капель раствора белка. Нагревают.		
2	Концентрированными минеральными кислотами	В пробирку вносят 10 капель конц. HNO_3 . Наклоняют пробирку под углом 45° и осторожно по стенке наслаивают на кислоту 5 капель белка. Смотрят на просвет. Перемешивают.		
3	Органическими кислотами	В пробирку вносят 10 капель раствора белка. Добавляют 2 капли 10% раствора ТХУ. Перемешивают.		
4	Солями тяжелых металлов: меди	В пробирку вносят 10 капель раствора белка. Прибавляют 1-2 капли 7% раствора CuSO_4 . Перемешивают. Добавляют еще несколько капель CuSO_4 .		
5	Солями тяжелых металлов: серебра	В пробирку вносят 5 капель раствора белка. Прибавляют 2 капли 1% раствора AgNO_3 . Перемешивают.		
6	Органическими растворителями: ацетон, спирт	В пробирку вносят 10 капель раствора белка. Прибавляют 10 капель ацетона. Перемешивают.		

* На предметных стеклышках все реактивы наносят по 1 капле и перемешивают стеклянной палочкой

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Практическое значение работы. Явление денатурации белков используется в клинике, фармации и биохимических исследованиях:

- а) для осаждения белка в изучаемом биологическом материале с целью дальнейшего определения в нем низкомолекулярных субстратов;
- б) для выявления присутствия белка в различных биологических экстрактах и жидкостях и количественного его анализа (в частности, качественное и количественное определение белка в моче основано на реакции денатурации белка азотной кислотой);
- в) для получения безбелковых растворов (например, при выделении ДНК из животных тканей), при разделении белковых фракций в процессе выделения и очистки белков;
- г) для связывания солей тяжелых металлов белком при лечении отравлений или их профилактике на производстве;
- д) для обеззараживания отходов в санитарной практике;
- е) для дезинфекции кожи и слизистых покровов.

Содержание отчета:

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Заполненная таблица.
3. Выводы по проделанной работе. В выводах отметить причину денатурации белка.

Лабораторная работа 4. Определение активности амилазы слюны

Принцип метода. Метод Вольгемута (J. Wohlgemuth, нем. врач, род. в 1874 г.) — определение активности фермента α -амилазы (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, К.Ф. 3.2.1.1.) в крови и моче. Метод основан на нахождении максимального разведения жидкости, содержащей амилазу (слюна, сыворотка крови и др.), при котором в стандартных условиях происходит полное расщепление определенного количества крахмала.

Данный метод является «пороговым», т.к. определяется минимальное «пороговое» количество фермента, способного расщепить 1 мл 0,1%-го раствора крахмала за 30 мин при температуре 38°C. Минимальное количество фермента принимают за единицу амилазной активности.


Амилазная активность слюны A_{30}^{38} (амилокластическая сила слюны или амилазное число) выражается количеством мл 0,1%-го раствора крахмала, которое расщепляется 1-им мл неразведенной слюны при температуре 38°C в течение 30 мин:

$$A_{30}^{38} = \frac{V_{\text{крахмала}}}{V_{\text{слюны}}}$$

В норме амилазная активность слюны (A_{30}^{38}) составляет **160-320** ЕД.

Порядок работы:

1. В штатив устанавливают и нумеруют 10 пробирок и в каждую вносят по 1 мл воды.
2. Затем в пробирку 1 добавляют 1 мл слюны, разведенной в 10 раз, и тщательно перемешивают, 3 раза втягивая в пипетку и выпуская.
3. 1 мл раствора из пробирки 1 переносят в пробирку 2, повторяя те же операции, затем 1 мл раствора из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т.д. Из последней пробирки 1 мл раствора после перемешивания выливают. Таким образом, получается ряд разведений, в котором концентрация амилазы в каждой следующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей.
4. После этого в каждую пробирку вносят по 2 мл раствора крахмала и содержимое перемешивают встряхиванием. Все пробирки помещают в термостат при 37-38°C на 30 мин.
5. По окончании инкубации в каждую пробирку добавляют по 1-2 капли 1% раствора йода и перемешивают. Раствор желтого цвета свидетельствует о полном расщеплении крахмала, фиолетовый – о том, что крахмал в растворе еще сохранился.
6. Отмечают, в каких пробирках произошел полный гидролиз крахмала (желтое окрашивание с йодом) и по последней из них рассчитывают активность амилазы.
7. Результат опыта вносят в таблицу, обозначая окраску первыми буквами образовавшегося цвета раствора.
8. Полученное значение амилазной активности сравнивают с амилазной активностью в норме,

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

делают выводы.

Расчет:

Формула для расчета: $A_{30}^{38} = V_{кр} \cdot P$,

где A_{30}^{38} - амилазная активность исследуемой слюны, ЕД; P - максимальное разведение слюны, при котором начинается гидролиз; $V_{кр}$ - объем 0,1%-го раствора крахмала, $V_{кр} = 2$ мл.

Пример расчета: Допустим, полный гидролиз взятого для опыта крахмала произошел в 1, 2, 3 и 4 пробирках, следовательно, активность амилазы нужно считать по пробирке 4, в которой доля амилазы составляет 1/160 мл. Тогда $P=160$, $V_{кр}=2$, следовательно $A_{30}^{38}=2 \cdot 160=320$ ЕД. Это означает, что 1 мл неразбавленной слюны в таких условиях может расщепить 320 мл раствора с массовой долей крахмала 0,1.

Таблица. Исследование активности амилазы слюны

Разведение слюны	№ пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
Кол-во 0,1% крахмала, мл										
Окрашивание йодом										
Амилазная активность										

Клинико-диагностическое значение

Определение активности амилазы в сыворотке крови и мочи в КДЛ, проводится с целью дифференциальной диагностики острого и хронического панкреатита.

Амилаза попадает в кровь из поджелудочной железы (40%, панкреатическая α -амилаза, P-тип) и слюнных желез (60%, слюнная α -амилаза, S-тип). Амилазная активность крови в норме составляет 25-125 ЕД/л. Повышение активности фермента в крови и моче более чем в 10 раз происходит при остром панкреатите (в 10-30 раз), в 5-10 раз - при перитоните, остром аппендиците, непроходимости кишечника, менее чем в 5 раз - при хроническом панкреатите, эпидемическом паротите (воспаление слюнных желез). Уменьшение активности фермента в крови наблюдается при нарушениях функции печени, при некрозе поджелудочной железы, при нефрите, сахарном диабете, токсикозе у беременных, обширных ожогах. Снижение активности амилазы вызывают некоторые лекарства (кортикостероиды, салицилаты, тетрациклин, фуросемид, гистамин), а также алкоголь.

Клинико-диагностическое значение


Амилаза имеет небольшую молекулярную массу (45 кДа), поэтому легко проходит почечный фильтр и попадает в мочу. В моче до 70% активности приходится на панкреатическую α -амилазу. По сравнению с амилазой слюны моча здоровых людей обладает низкой амилазной активностью. В связи с меньшей инвазивностью определение амилазной активности мочи (*диастазный тест*) широко используется в клинике для диагностики состояния поджелудочной железы. В 1-е сутки заболевания амилазная активность увеличивается в десятки раз, а затем постепенно возвращается к норме. При почечной недостаточности амилаза в моче отсутствует. В детском возрасте увеличение активности амилазы наблюдается при эпидемическом паротите, что указывает на одновременное поражение поджелудочной железы вирусом паротита. Вирус гриппа также поражает поджелудочную железу, но реже.

Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Заполненные таблицы, расчеты.
3. Выводы по проделанной работе.

Лабораторная работа 5. Количественное определение активности ферментов

Цель занятия - количественно определить активность амилазы.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Задачи:

1. проделать необходимые реакции;
 2. проанализировать полученные результаты, произвести расчеты и сформулировать выводы.
- Амилаза* - фермент, осуществляющий гидролитическое расщепление полисахаридов до декстринов и мальтозы. Молекулы декстринов, имеющие 30 гексозных остатков, дают с йодом синюю окраску, молекулы, имеющие 8-10 остатков - красную, молекулы, состоящие из 4-5 остатков, окраски не дают. Наиболее богаты амилазой слюнные и поджелудочная железы.

Материал: раствор амилазы слюны (1:10).

Реактивы: 1% раствор I_2 в KI (раствор Люголя), 0,1% раствор крахмала (суспендируют 1 г растворимого крахмала в 10 мл холодной воды, затем при помешивании добавляют 90 мл кипящей воды и кипятят 1 мин, охлаждают, доливают водой до 100 мл и перемешивают), $H_2O_{дист}$, 0,9% NaCl.

Приборы и оборудование: термостат, пробирки, пипетки.

Лабораторная работа 6. Кинетические свойства ферментов

Цель занятия – изучить некоторые кинетические закономерности протекания ферментативной реакции.

Задачи:

- 1) проделать необходимые реакции;
- 2) проанализировать полученные результаты, произвести расчеты и сформулировать выводы.

Принцип метода: образование окрашенного комплекса крахмала с йодом.

Материал: раствор амилазы слюны (1:10).

Реактивы: 1% раствор I_2 в KI (раствор Люголя), 1% раствор крахмала, $H_2O_{дист}$, 10% NaOH, 1% $CuSO_4$.

Приборы и оборудование: термостат (40°C), водяная баня и баня со льдом, предметные стекла, пробирки, пипетки.

А. Зависимость скорости реакции от количества фермента

Порядок выполнения работы


1. Разводят исходную разбавленную слюну водой в пробирках в 20, 40, 80 и 160 раз.
2. Берут 4 пробирки и вносят в каждую 1 мл одного из полученных разведений слюны.
3. В пробирки из бюретки добавляют по 4 мл раствора крахмала, быстро помещают их в термостат при 38°C и засекают время начала реакции.
4. Через каждые 1-2 мин отбирают по 2 капли жидкости из каждой пробы и приливают к ним по 1 капле раствора йода. Вначале пробы дают синее, затем красно-фиолетовое и, наконец, красное окрашивание.
5. Отмечают с точностью до 0,5 мин время от начала опыта до появления в каждой из четырех пробирок красного окрашивания – стадия образования эритродекстринов из крахмала.
6. Полученный результат изобразить графически, откладывая по оси ординат v – скорость реакции (величина, обратная времени образования эритродекстринов), а по оси абсцисс $[C]$ – относительную концентрацию амилазы (разведение).
7. Сделать вывод о зависимости скорости реакции от концентрации фермента и сравнить с той же зависимостью для небиологических катализаторов.

Б. Определение термолабильности амилазы слюны

Большинство ферментов термолабильны - при нагревании до 60-80° утрачивают каталитическую активность. Степень инактивирования зависит от длительности теплового воздействия. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются, но скорость ферментативного катализа снижается. В термолабильности ферментов можно убедиться на примере действия ферментов слюны: амилазы и мальтазы.

Порядок выполнения работы

1. В чистую пробирку отливают небольшое количество разведенной слюны (2-3мл) и кипятят ее в течение 5-8 минут, после чего охлаждают

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

- В 3 пронумерованные пробирки наливают по 10 капель 1% раствора крахмала.
- В 1 пробирку добавляют 10 капель слюны, разведенной в 10 раз, во 2-ю - 10 капель прокипяченной слюны, в 3-ю - 10 капель воды (качестве контроля).
- Все пробирки помещают в термостат или водяную баню при температуре 38° на 10 минут.
- После этого проделывают качественные реакции на крахмал и реакцию Троммера на продукты расщепления.
- Полученный результат занести в таблицу:

Реагенты, условия опыта	Количество реагента, капель		
	Опыт 1	Опыт 2	Контроль
Слюна, 1:10	10	-	-
Кипяченая слюна (кипятить 2 мл разведенной слюны 5-8 мин, охладить)	-	10	-
H ₂ O	-	-	10
Крахмал, 1%	10	10	10
<i>Термостат, 38°C, 10 мин</i>			
Реакция с йодом (5 капель раствора из пробирки + 1 капля I ₂ в KI), окраска			
Реакция Троммера (5 капель раствора из пробирки + 5 капель 10% NaOH + 3 капли 1% CuSO ₄ , кипятить 1 мин), окраска			
Вывод:			


В. Определение оптимальной температуры для действия амилазы

При увеличении температуры скорость ферментативных реакций возрастает также, как и скорость всех химических реакций: с повышением температуры на 10°C скорость реакции увеличивается в 2-4 раза. В отличие от неферментативных процессов такое увеличение скорости ферментативных реакций наблюдается в узком интервале температур. Температура, при которой на графике зависимости скорости реакции от температуры наблюдается наибольшая скорость реакции, называется температурным оптимумом и обозначается $t_{\text{опт}}$ и для ферментов теплокровных животных чаще всего лежит в пределах 37-40°C. При более высоком значении температуры становится заметным влияние на фермент термической инактивации (тепловая денатурация белковой части - апофермента). Существенное падение скорости большинства ферментативных процессов наблюдается после достижения 42-50°C. При температурах ниже нуля скорость ферментативных реакций значительно понижается, но сами ферменты не разрушаются и при осторожном оттаивании восстанавливают свою активность.

Порядок выполнения работы

- Наливают в 4 пробирки по 0,5 мл раствора крахмала. В другие 4 пробирки наливают по 0,5 мл разбавленной (1:10) слюны.
- Затем берут одну пробирку с ферментом и другую с крахмалом и помещают:
1-ю *пару* - в баню со льдом;
2-ю *пару* - при комнатной температуре;
3-ю *пару* - в термостат (40°C);
4-ю *пару* - в кипящую водяную баню.
- Через 10 мин. пробирки попарно сливают, тщательно перемешивают и оставляют стоять еще 10 минут в тех же условиях.
- Из третьей пробирки отбирают 3 капли жидкости и проделывают реакцию с каплей йода на стекле. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще 10 мин. и после этого повторяют реакцию с йодом на стекле.

Реагенты, условия опытов	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	Опыт 4
Температура, °C	0	20	40	100
Крахмал, 1%, капли	20	20	20	20
Слюна, 1:10, капли	20	20	20	20
<i>Инкубировать 10 мин и затем добавить по 1-2 капли I₂ в KI</i>				
<i>Зарегистрировать окрашивание</i>				

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Практическое значение работы

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

Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Заполненная таблица.
3. Выводы по проделанной работе с указанием практического значения.

Практическая работа 7. Специфичность действия ферментов

Цель занятия – изучить специфичность действия ферментов амилазы и сахаразы.

Задачи:

1. проделать необходимые реакции;
2. проанализировать полученные результаты, сформулировать выводы.

Ферменты в отличие от неорганических катализаторов обладают чрезвычайной специфичностью действия по отношению к их субстратам. Специфичность ферментов проявляется по-разному. Различают специфичность по отношению к типу химической реакции, катализируемой ферментом, и специфичность по отношению к субстрату. Эти два вида специфичности присутствуют у каждого фермента. Субстратная специфичность выражается в способности фермента катализировать превращение субстрата только определенного химического строения.

Фермент **амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюкангидролаза; КФ 3.2.1.1.)** расщепляет в крахмале α (1-4)-гликозидные связи с образованием конечного продукта - дисахарида мальтозы (1,4-глюкозидоглюкозы). Амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов (таких как крахмал, гликоген) до мальтозы, но не оказывает действие на дисахариды.

Фермент **сахараза (β -D-фруктофуранозид-фруктогидролаза; КФ 3.2.1.26)** катализирует гидролитическое расщепление в дисахариде - сахарозе α (1-2)-гликозидной связи с образованием глюкозы и фруктозы, т.е. получается инвертный сахар. Сахароза не расщепляет другие дисахариды и полисахарид крахмал.

Материал: раствор амилазы слюны (1:10), сахаразы, извлеченная из дрожжей.

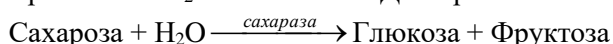
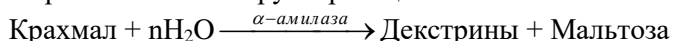
Сахароза, извлеченная из дрожжей: Для получения сахаразы из дрожжей 2 г дрожжей размять в ступке, растереть, добавив 10-12 мл дистиллированной воды. Содержимое из ступки перенести в пробирку и поставить в термостат при 37°C на 10-15 мин. Отцентрифугировать смесь при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость, которая содержит фермент сахаразу, слить и использовать в работе.

Реактивы: 1% раствор I_2 в KI (раствор Люголя), 1% раствор крахмала, $H_2O_{дист}$, 2% раствор сахарозы; 10% раствор NaOH, 1% раствор $CuSO_4$.

Приборы и оборудование: термостат (38°C), предметные стекла, пробирки, пипетки.

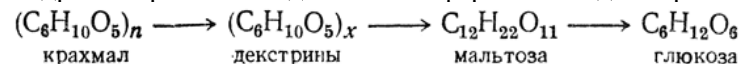
Принцип метода: Метод основан на сравнительном изучении гидролиза α -амилазой и сахаразой разных субстратов, содержащих гликозидные связи: крахмала и сахарозы.


Ферменты катализируют реакции по схеме:



Сахароза не имеет свободной альдегидной или кетонной группы, поэтому не дает реакции Троммера. Реакция Троммера может быть положительной только в том случае, если сахароза расщепится на свои составные части – глюкозу и фруктозу.

Гидролиз крахмала под влиянием ферментов идет через стадию образования декстринов:



Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Крахмал дает с йодом синее окрашивание, амилодекстрины - фиолетовое, эритро- и ахродекстрины (олигосахариды с меньшей молекулярной массой) – соответственно красно-бурое и желтое (цвет йода в воде). Конечные продукты гидролиза – мальтоза и глюкоза – имеют свободные альдегидные группы и дают реакцию Троммера, которая основана на способности углеводов при нагревании восстанавливать гидрат окиси меди (голубого цвета) в гидрат закиси (желтого цвета). При дальнейшем нагревании гидрата закиси переходит в красную закись меди.

Порядок выполнения работы

Выявление специфичности α -амилазы:

1. В две пробирки наливают по 5 капель разведенной слюны.
2. В 1-ю пробирку добавляют 10 капель раствора крахмала, во 2-ю - 10 капель раствора сахарозы.
3. Обе пробирки прогревают 10 мин. при температуре 38°C, после чего охлаждают.
4. Содержимое пробирок делят на 2 части, с одной проделывают реакцию на крахмал, с другой - реакцию Троммера.

Реакция Троммера: К 5 каплям исследуемой жидкости прибавляют 5 капель 10% NaOH и 5 капель раствора CuSO₄ и нагревают. В присутствии глюкозы и мальтозы выпадает желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

Выявление специфичности сахаразы из дрожжей:

1. В одну пробирку наливают 10 капель раствора крахмала, в другую – сахарозы.
2. В обе пробирки прибавляют по 5 капель экстракта сахаразы дрожжей.
3. Пробы перемешивают встряхиванием и помещают в термостат при 38°C на 10 мин, после чего с жидкостью обеих пробирок проделывают реакцию с йодом и реакцию Троммера. Сравнивают окраску.
4. Полученный результат занести в таблицу.

№ п/п	Фермент	Субстрат	Реакция с йодом	Реакция Троммера	Выводы
1.	Амилаза	Крахмал			
2.		Сахароза			
3.	Сахараза	Крахмал			
4.		Сахароза			


5. Сделать вывод о субстратной специфичности фермента. Указать на практическое значение работы.

Практическое значение работы

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

Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Заполненная таблица.
3. Выводы по проделанной работе с учетом практического значения
4. В таблицу показателей нормы основных клинико-биохимических исследований выписать и выучить следующие из них: плазма крови - α -амилаза, моча - α -амилаза.
5. Оценить данные биохимического анализа крови и мочи, сделать вывод об активности фермента, указать возможные причины патологии:
 - а) анализы пациента А: активность α -амилазы в сыворотке крови 620 г/(ч·л), в моче - 950 г/(ч·л);
 - б) анализы пациента Б: активность α -амилазы в сыворотке крови 450 г/(ч·л), в моче - 75 г/(ч·л);
 - в) анализы пациента В: активность α -амилазы в сыворотке крови 35 г/(ч·л), в моче - 92 г/(ч·л).

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Лабораторная работа 8. Качественные реакции на пероксидазу и каталазу

Цель занятия – изучить качественные реакции ферментов и практическое значение их применения.

Задачи:

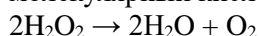
1. проделать необходимые реакции;
2. проанализировать полученные результаты, сформулировать выводы.

В реакциях, катализируемых оксидоредуктазами, окисляемый субстрат рассматривается как донор водорода или электронов, а акцептором могут быть природные вещества (коферменты – НАД, НАДФ, ФМН, ФАД, КоQ, кислород, органические соединения, цитохромы и др.) и ксенобиотики. Для большинства ферментов этого класса рекомендуются названия: дегидрогеназы и редуктазы. В тех случаях, когда акцептором служит O_2 , используется термин оксидаза, а если кислород в ходе реакции включается в состав субстрата, то фермент называется оксигеназа. Пероксидаза является ферментом, использующим H_2O_2 в качестве акцептора, а каталаза – ферментом, катализирующим реакции, где донорно-акцепторную пару составляют две молекулы H_2O_2 .

Работа 1. Качественная реакция на каталазу

($H_2O_2:H_2O_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6)

КАТАЛАЗА - фермент, катализирующий реакцию разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород:



Биологическая роль состоит в разрушении перекиси водорода, образующейся в клетках в результате действия ряда флавопротеиновых оксидаз (ксантиноксидазы, глюкозооксидазы, моноаминоксидазы и др.). Присутствие каталазы обеспечивает эффективную защиту клеточных структур от деградации под действием перекиси водорода. Генетически обусловленная недостаточность каталазы является одной из причин наследственного заболевания у человека.

Каталаза широко распространена в тканях животных и растений и в микроорганизмах.

Содержание каталазы в печени и эритроцитах млекопитающих составляет 0,1—0,2%, в отдельных штаммах микроорганизмов — до 5% сухого веса. Фермент полностью отсутствует у некоторых анаэробных микроорганизмов. В растениях каталаза присутствует в небольших количествах.

Каталаза является гемопротеидом, его простетической группой служит феррипротопорфирин IX, содержащий трехвалентный ион железа. Молекула каталазы состоит из четырех, вероятно, идентичных субъединиц и имеет соответственно четыре простетические группы.

Феррипротопорфириновые группы прочно связаны с апоферментом и не отделяются от него при диализе.

Каталаза разлагает перекись водорода с исключительно высокой скоростью. При pH 7,0 и $t=20^\circ$ одна молекула каталазы разлагает в секунду до 10^5 молекул H_2O_2 . Оптимальное значение pH для каталазы лежит в интервале 6,0—8,0.

Активность каталазы ингибируется цианидом, фторидом, азидом, сульфидом, ацетатом, 3-амино-1,2,3-триазолом и его аналогами. Каталаза быстро инактивируется в растворе при pH больше 10,0 и меньше 4,0 и в присутствии высоких концентраций мочевины или других вызывающих разрыв водородных связей агентов. Инактивация фермента связана с образованием каталитически неактивных субъединиц.


Реактивы: перекись водорода, 3%-ный свежеприготовленный раствор.

Оборудование: штатив с пробирками; термостат; стакан с водой; лучинка или кусок пробки на проволочке.

Материал: свежерастертая печень; картофельный сок (сырой картофель натирают на терке и отжимают через два слоя марли); свежее коровье молоко.

Порядок работы:

1. В пробирку № 1 помещают 0,3-0,5 г растертой печени, добавляют около 10 мл воды и перемешивают содержимое.
2. Быстро наливают раствор перекиси водорода до верха пробирки и сейчас же, закрыв пробирку пальцем, опрокидывают ее в стакан с водой, не выливая жидкости. Наблюдают выделение газа в пробирке и вытеснение им жидкости в стакан.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

3. Закрыв пробирку пальцем, осторожно вынимают ее из воды, переворачивают и быстро вносят в пробирку тлеющую лучинку или тлеющую пробку на проволочке. Разгорание лучинки (или пробки) указывает на то, что выделившийся газ является кислородом.
1. В пробирки № 2 и № 3 наливают по 5 капель перекиси водорода.
2. В пробирку № 2 добавляют 5 капель сырого молока, в пробирку № 3 – 5 капель кипяченого.
3. В пробирке № 2 наблюдают выделение газа, который испытывают тлеющей лучинкой. Вместо молока можно взять кусочки сырого и вареного мяса или сырого и вареного картофеля.
4. Результаты занести в таблицу и отметить характерное окрашивание индикатора реакции.
5. В выводах указать на присутствие в биологическом материале изучаемых ферментов и практическое значение работы.

Материал	Выявленный фермент	Индикатор реакции	Результат
Печень			
Сырое молоко			
Кипяченое молоко			
Сырое мясо			
Вареное мясо			

Практическое значение

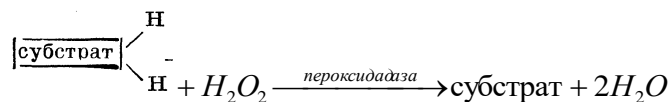
При наследственной недостаточности каталазы, наследуемой по рецессивному типу, развивается заболевание, носящее название *акаталазия* и заключающееся в отсутствии активности каталазы или сильно пониженной ее активности в сыворотке крови. Это заболевание характеризуется изъязвлением слизистой оболочки носа и рта, иногда с выраженными гангренозными изменениями.

Активность каталазы в эритроцитах остается неизменной при ряде заболеваний, только при злокачественной анемии и других макроцитарных анемиях увеличивается т.н. *каталазный индекс* (каталазная активность определенного объема крови, деленная на количество эритроцитов в этом объеме в млн.). При злокачественных новообразованиях отмечается уменьшение активности каталазы в печени и в почках, причем существует зависимость между величиной и скоростью роста опухоли и степенью уменьшения активности каталазы в печени. Из некоторых опухолей выделены фракции, которые при введении экспериментальным животным вызывали у них снижение активности каталазы в печени. Эти фракции были названы *токсогормонами*.

Работа 2. Качественная реакция на пероксидазу

(донор: H_2O_2 оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.7)

ПЕРОКСИДАЗЫ — группа окислительно-восстановительных ферментов (КФ 1.11.1.1 — 1.11.1.10), использующих в качестве акцептора электронов перекись водорода (H_2O_2); катализируют реакцию:




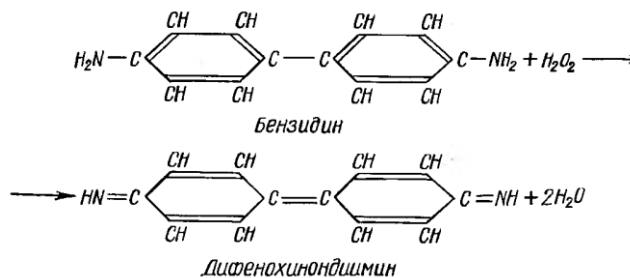
Пероксидаза выполняет две функции: собственно пероксидазную, т.е. окисляет вещества с участием пероксида водорода, и оксидазную, т.е. катализирует окисление субстратов за счет молекулярного кислорода без участия пероксида водорода. Этот фермент проявляет пероксидазную активность в отношении практически всех фенолов (пирокатехин, пирогаллол, галловая кислота, гваякол и др.), ароматических аминов (бензидин, п-фенилендиамин и др.), аскорбиновой кислоты, нитритов и т.д.

В то же время пероксидаза, обладая оксидазной функцией, способна участвовать в окислении НАД·Н₂, НАДФ·Н₂, оксалата, фенилпирувата и т.д.

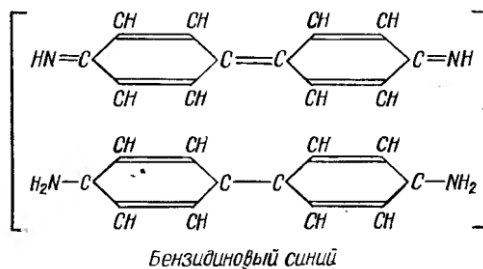
Пероксидазы содержатся как в растительных, так и в животных организмах.

Принцип метода. Пероксидаза катализирует реакцию окисления бензидина в дифенохинондиимин:

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		



Молекула дифенохинондиимина конденсируется с молекулой бензидина с образованием окрашенного соединения (бензидинового синего):



Белок мышечной ткани миоглобин обладает пероксидазной активностью. Для свежего мяса характерна положительная реакция на пероксидазу, в несвежем мясе она не проявляется или запаздывает.

Реактивы: перекись водорода, 3%-ный свежеприготовленный раствор; бензидин, 0,25%-ный спиртовой раствор.

Оборудование: штатив с пробирками; термостат; пипетки вместимостью 1 и 5 мл.

Материал: картофельный сок (сырой картофель натирают на терке и отжимают через два слоя марли); свежее коровье молоко; вытяжка из мяса (10 г свежего мяса заливают 40 мл дистиллированной воды, настаивают 10 мин. и фильтруют).


Порядок работы:

1. В пробирки № 1 и № 2 наливают по 1 мл соответственно сырого молока и картофельного сока, в пробирку № 3 помещают 2-3 мл вытяжки из мяса.
2. Во все пробирки добавляют по 5 капель спиртового раствора бензидина и по 2-3 капли раствора перекиси водорода.
3. Отмечают характерное окрашивание. Если мясо свежее, содержимое пробирки № 3 тотчас же принимает зеленовато-синее окрашивание.
4. Результаты занести в таблицу и отметить характерное окрашивание индикатора реакции.
5. В выводах указать на присутствие в биологическом материале изучаемых ферментов и практическое значение работы.

Материал	Выявленный фермент	Субстрат (донор)	Акцептор	Индикатор реакции	Результат
Молоко					
Картофельный сок					
Мясная вытяжка					

Практическое значение

Пероксидазы в присутствии H_2O_2 катализируют окисление адреналина, гистамина, жирных кислот, нуклеотидов, йодида. Образующийся в результате пероксидазного окисления йодид-иона йод используется в процессе синтеза гормона щитовидной железы — тироксина. Пероксидазы щитовидной железы, кроме окисления йодида, катализируют также ковалентное связывание дийодотирозиновых остатков, приводящее к образованию тироксина. Лактопероксидаза и пероксидаза лейкоцитов катализируют перекисное окисление липидов в присутствии H_2O_2 . Такие системы придают антимикробную активность молоку, слюне и полиморфно-ядерным лейкоцитам. Степень активности пероксидазы в лейкоцитах служит дополнительным тестом при диагностике

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

острого миелобластного лейкоза. Пероксидаза слюны играют определенную роль в патогенезе пародонтоза. Определение активности пероксидазы в слюне используют в качестве вспомогательного теста при диагностике пародонтоза и для контроля эффективности его терапии. В тканях животных содержится активная глутатионпероксидаза. В печени с действием этого фермента связано разрушение H_2O_2 , которая образуется в результате деятельности различных оксидаз. Реакция, катализируемая глутатионпероксидазой, связана с окислением глюкозо-6-фосфата и одновременным восстановлением окисленного глутатиона, образующегося при восстановлении H_2O_2 в пероксидазной реакции. Описано окисление восстановленной формы пиридиновых нуклеотидов системой O_2-Mn^{2+} —Пероксидаза.

Пероксидаза используют для клинико-биохимического анализа в качестве одного из компонентов реакционной смеси при определении содержания глюкозы в биологических жидкостях глюкозооксидазным методом.

Пероксидаза, выделенная из хрена, широко используется как аналитический реагент при проведении клинико-биохимических исследований. Поэтому метод измерения активности фермента необходим для контроля качества продажного препарата фермента.

Работа 3. Определение активности каталазы в слюне

Каталаза содержится во всех тканях и жидкостях организма, но особенно много ее в строме эритроцитов и печени. В процессе окисления некоторых веществ образуется пероксид водорода, ядовитый для организма. Каталаза расщепляет пероксид водорода на молекулярный кислород и воду.

Принцип метода. Метод основан на титрометрическом определении количества пероксида водорода, оставшегося в пробе после действия фермента. Пероксид водорода оттитровывают 0,1н раствором $KMnO_4$.

Реактивы: перекись водорода, 3%-ный свежеприготовленный раствор; $NaCl$, 0,9% раствор; раствор H_2SO_4 , 10% раствор; $KMnO_4$, 0,1н раствор.

Оборудование: штатив с пробирками; термостат; пипетки; коническая мерная пробирка; химический стакан на 100 мл.

Материал: неразведенная слюна.

Порядок работы:

1. В две пробирки (контрольная и опытная) вносят по 1 мл 0,9% раствора $NaCl$, 0,3 мл 1,5% раствора H_2O_2 и 0,5 мл неразведенной слюны.
2. Опытную пробу оставляют на 15 мин при комнатной температуре, а в контрольную пробу сразу же после добавления слюны приливают 3 мл 10% H_2SO_4 и титруют 0,1 н раствором $KMnO_4$ до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей 30 сек.
3. В опытную пробу через 15 мин инкубации тоже добавляют 3 мл 10% раствора H_2SO_4 и титруют так же, как контрольную.
4. Расчет активности каталазы проводят по формуле:

$$X = (K - O) \times 0,3$$

где X – активность каталазы (мг H_2O_2 /мл в минуту),

K – количество $KMnO_4$, пошедшее на титрование контроля,

O – количество $KMnO_4$, пошедшее на титрование опыта,


0,3 – коэффициент, учитывающий титр H_2O_2 , количество слюны в пробе и время инкубации.

Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Заполненная таблица.
3. Выводы по проделанной работе с учетом практического значения

Лабораторная работа 9. Качественное определение органических веществ в моче

В состав мочи входят вода, органические и минеральные соли, всего около 150 веществ. В клинико-биохимических лабораториях проводят общий и специальный анализ мочи. Общий

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

анализ включает исследование физико-химических свойств мочи и определение в ней ряда патологических компонентов: белок, сахар, кетоновые (ацетоновые) тела, гемоглобин, пигменты и индикан. При необходимости подсчитывают также количество эритроцитов и лейкоцитов в моче. Общий анализ обязателен при первичном обследовании пациента и диспансерном наблюдении. Специальный анализ, т.е. определение прочих компонентов мочи (метаболиты, ферменты, отдельные минеральные вещества и т.д.) проводится при подозрении на поражение конкретного звена обмена или определенного органа.

Цель занятия – уметь применять знания о физиологических и патологических компонентах мочи для решения вопросов диагностики, профилактики и прогноза заболеваний, связанных с почечной и внепочечной патологией.

Задачи:

1. провести все опыты;
2. проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Материал исследования: моча, нормальная и патологическая.

Реактивы: FeCl_3 , 10% NaOH , 7% CuSO_4 , реактив Феллинга, 1% KMnO_4 (или 1% FeCl_3), концентрированная HCl , хлороформ, 1% спиртовой раствор йода, концентрированная HNO_3 , 20% сульфосалициловая кислота.

Приборы и оборудование: пробирки, пипетки, штатив, спиртовки.

Экспериментальная часть

Работа 1. Определение кетоновых тел в моче

Ацетоновые или кетоновые тела – это продукты неполного окисления жирных кислот. К кетоновым (ацетоновым) телам относятся ацетоуксусная, β -оксимасляная кислоты, ацетон. В норме у здоровых людей кетоновые тела обнаруживаются после длительного голодания, после длительного приема жирной пищи, лишенной углеводов. В патологии – при сахарном диабете, при токсикозах беременных, при лихорадке, при поносе и рвоте у детей.

1.1 Проба Герхарда на ацетоуксусную кислоту мочи

Метод основан на взаимодействии железа с енольной формой ацетоуксусной кислоты с образованием комплекса красно-фиолетового цвета.

Ход работы.

1. В одну пробирку вносят 20 капель нормальной, а в другую – 20 капель патологической мочи
2. Прибавляют по 5 капель раствора хлорида железа (III) в обе пробы.
3. Развивается красно-фиолетовое окрашивание.

Работа 2. Качественное определение глюкозы в моче

В моче здорового человека сахар не содержится, он появляется в моче при нарушениях углеводного обмена, некоторых физиологических состояниях. Этот тест включен в общий анализ мочи.

2.1. Реакция Троммера.


В щелочной среде в присутствии глюкозы при добавлении CuSO_4 образуется желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

В присутствии глюкозы $\text{Cu}(\text{OH})_2$ растворяется с образованием алкоголята меди синего цвета. Муть появляется при небольшом избытке $\text{Cu}(\text{OH})_2$.

Следует иметь в виду, что в моче содержится много органических веществ (мочевая кислота, креатинин и др.), также способных восстанавливать в щелочной среде соли тяжелых металлов при длительном кипячении. В противоположность этому реакция восстановления тяжелых металлов в присутствии сахара происходит до начала кипячения.

Ход работы.

1. К 10 каплям мочи прибавляют 3-5 капель 10% раствора едкого натрия

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

2. Затем по каплям прибавляют 7% раствор сернокислой меди до появления не исчезающей голубой мути.
3. Жидкость нагревают до начала кипения. В присутствии глюкозы выпадает желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

Избыток сернокислой меди мешает реакции, т.к. гидрат окиси меди $\text{Cu}(\text{OH})_2$ - голубого цвета, но при нагревании переходит в окись меди - осадок черного цвета и может затемнить образование красного осадка закиси меди Cu_2O или желтого осадка гидрата закиси меди CuOH .

2.2. Реакция Феллинга.

Проба основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Преимущество этой реакции заключается в том, что сегнетова соль в составе реактива Феллинга связывает избыток гидрата окиси меди, из которого при нагревании образуется окись меди черного цвета, мешающая реакции.

Ход работы.

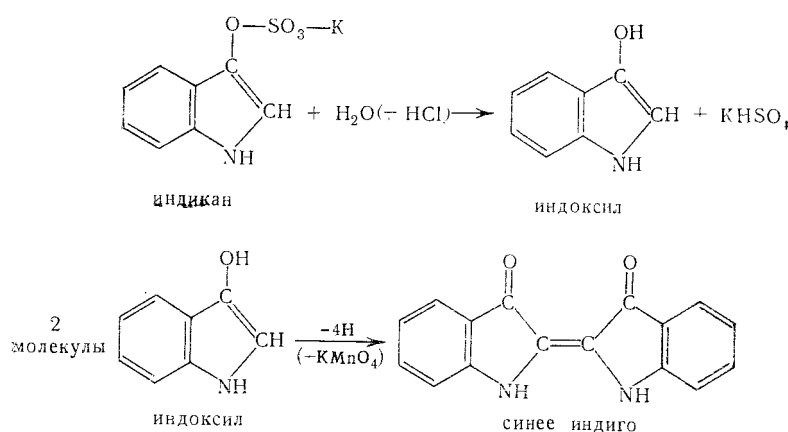
1. К 5-6 каплям исследуемой мочи приливают равный объем реактива Феллинга.
2. Жидкость перемешивают и нагревают до начала кипения.
3. В присутствии глюкозы выпадает желтый осадок гидрата меди или красный осадок закиси меди.

Работа 3. Качественное определение индикана в моче

Индикан представляет собой калиевую или натриевую соль индоксил серной кислоты, образующейся в печени при обезвреживании индола. Индол, в свою очередь, образуется в кишечнике из триптофана при гниении белков.

В моче здорового человека индикан содержится в незначительных количествах (около 0,01 г в суточной порции мочи), особенно при мясной диете, и обычными лабораторными тестами не определяется. Повышенное содержание индикана наблюдается при опорожнении кишечника (запор), при непроходимости кишок, брюшном тифе и ряде других заболеваний.

При добавлении к моче концентрированной соляной кислоты, марганцовокислого калия и хлороформа в присутствии индикана нижний хлороформный слой окрашивается в синий цвет. Реакция обусловлена гидролитическим расщеплением индикана в присутствии концентрированной соляной кислоты на индоксил и кислый сернокислый калий, окислением индоксила в синее индиго и растворением синего индиго в хлороформе.




3.1 Проба Яффе

Принцип метода.

В результате гидролиза эфирной связи сильной неорганической кислотой индикан превращается в индоксил, который, окисляясь перманганатом калия, превращается в синее индиго.

Ход определения.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

1. К 20 каплям мочи добавляют равный объем концентрированной соляной кислоты, 1-2 капли 1% раствора марганцовокислого калия (можно заменить 1% раствором хлорного железа) и 2-3 капли хлороформа.
2. Пробирку закрывают и в течение 1-2 минут осторожно опрокидывают.
3. В присутствии индикана нижний хлороформный слой окрашивается в голубой или синий цвет. Интенсивность окраски хлороформного раствора зависит от количества индикана в моче.

Оценка результатов.

При наличии индикана в моче хлороформ окрашивается в фиолетовый или синий цвет. При недостаточном добавлении перманганата калия (слабое окисление), приеме больными препаратов йода слой хлороформа окрашивается в розово-красные оттенки. Дифференцируют окраску, обусловленную приемом лекарственных средств, с помощью тиосульфатной пробы: при добавлении к пробе кристаллов тиосульфата натрия розовато-красный оттенок исчезает, окраска, зависящая от индиго, остается.

В некоторых случаях и у здоровых лиц хлороформ может окраситься в бледно-голубой цвет, что также принимают за норму.

Работа 4. Проба Труссо-Розина на желчные пигменты в моче

Моча здоровых людей содержит минимальные количества билирубина, которые не обнаруживаются качественными пробами, применяемыми в практике.

Большинство из них основано на превращении билирубина под действием окислителей в зеленый биливердин или пурпурно-красные билипуррины, которые в смеси с биливердином дают синее окрашивание.

Принцип метода

Под действием йода происходит окисление желто-коричневого билирубина в биливердин зеленого цвета

Реактив. 1% спиртовой раствор йода (или р-р Люголя).

Ход определения.

1. В пробирку наливают 4-5 мл мочи
2. Осторожно по стенке наслаивают на мочу раствор йода.
3. При положительной реакции на границе жидкостей появляется устойчивое зеленое кольцо.

Работа 5. Качественное определение белка в моче

В норме в моче определяются следы белка, которые не обнаруживаются обычными качественными реакциями. Верхняя граница нормы белка в моче – 0,033 г/л. Если содержание белка выше этого значения, то качественные пробы на белок становятся положительными.

5.1 Проба Геллера

При наслаивании мочи, содержащей белок, на концентрированную азотную кислоту образуется мутное белое кольцо денатурированного белка. Экспериментально установлено, что растворы, содержащие 0,033 г/л белка, дают это кольцо между 2-й и 3-й минутами после наслаивания.


Ход работы.

1. В пробирку осторожно наливают около 1 мл концентрированной HNO_3
2. Осторожно сверху из пипетки наслаивают 1 мл мочи.
3. Если в моче содержится белок, то через 2-4 мин образуется белая муть в виде кольца.

5.2 Осаждение белка сульфосалициловой кислотой

Эта проба является самой чувствительной реакцией на белок.

Принцип метода

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Белок под действием неорганических кислот коагулирует (становится видимым). Степень помутнения зависит от количества белка.

Ход работы.

1. В 2 пробирки одинакового диаметра наливают по 20 капель мочи. 1 пробирка – контроль, 2 – опыт. В опытную пробирку добавляют 4 капли 20% сульфосалициловой кислоты.
2. Результат отмечают на темном фоне.
3. При наличии белка, моча в опытной пробирке мутнеет.

Порядок работы

1. Получить у преподавателя задание.
2. Выполнить работу согласно методическим рекомендациям.
3. Оформить отчет.
4. Вылить отработанные растворы, посуду вымыть. Сдать рабочее место.

Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Наблюдения.
3. Выводы по проделанной работе.

Лабораторная работа 10. Количественное определение белка в моче

Цель занятия – уметь применять знания о физиологических и патологических компонентах мочи для решения вопросов диагностики, профилактики и прогноза заболеваний, связанных с почечной и внепочечной патологией.

Задачи:

провести все опыты;
проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Материал исследования: моча, нормальная и патологическая.

Реактивы: концентрированная HNO_3 , 3% раствор сульфосалициловой кислоты; 0,9% NaCl . ацетат свинца $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}]$, 100 г/л раствора; концентрированная соляная кислота с относительной плотностью 1,19; хлорид железа ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$); реактив Обермейера (0,4 г $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл концентрированной соляной кислоты); хлороформ; тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$), 200 г/л раствора;

1) 2% раствор перманганата калия (KMnO_4): 2 г перманганата растворяют в 98 мл дистиллированной воды; 2) концентрированная соляная кислота; 3) хлороформ (CHCl_3); 4) тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$) кристаллический.

Приборы и оборудование: пробирки, пипетки, штатив, спиртовки.

Экспериментальная часть

Работа 1. Обнаружение белка в моче по методу Робертса–Стольникова


Принцип метода:

Белок под действием неорганических кислот коагулирует (становится видимым). Степень помутнения зависит от количества белка (т.е. кольцевая проба Геллера). При концентрации белка в моче 0,033 г/л к концу 3 минуты после наслаивания мочи появляется тонкое нитевидное белое кольцо.

Реактивы: 50% р-р азотной кислоты или реактив Робертса (98 частей насыщенного раствора поваренной соли и 2 части концентрированной соляной кислоты) или реактив Ларионовой (98 частей насыщенного р-ра поваренной соли и 2 части концентрированной азотной кислоты).

Оборудование: темный фон.

Ход работы.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

1. Требования к моче: моча должна быть кислой (или слабокислой) рН, должна быть прозрачной, для этого мочу центрифугируют. Щелочную мочу подкисляют до слабокислой реакции среды, используя для контроля индикаторную бумагу.
2. В пробирку наливают 2 мл 50% р-ра азотной кислоты или один из реактивов, затем осторожно по стенке пробирки с помощью пипетки насливают такой же объем подготовленной мочи
3. Пробу оставляют на 3 минуты
4. Через 3 минуты отчитывают результат. Результат отмечают на темном фоне в проходящем свете. Если кольцо широкое, компактное, то мочу разводят дистиллированной водой и вновь насливают на реактив.

Работа 2. Количественное определение белка в моче по методу Бранденберга-Робертса-Стольников

Ход работы.

В пять пробирок наливают по 2 мл дистиллированной воды. В первую вносят 2 мл мочи, перемешивают и отбирают 2 мл смеси и переносят во вторую и т.д. Из последней пробирки 2 мл набранной жидкости отбрасывают. Получается моча, разведенная в 2, 4, 8, 16 и 32 раза. В другие пять пробирок отмеривают по 2 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно с помощью пипетки насливают на кислоту соответствующую пробу разведенной мочи. Отмечают максимальное разведение мочи, при котором появляется мутное колечко между второй и третьей минутами. Рассчитать содержание белка в патологической моче и указать на использование метода в практике.

Расчет.

Расчет содержания белка в моче производят по формуле:

$$C = 0,033 \text{ г/л} \times \text{степень разведения.}$$

Например, кольцо денатурированного белка образовалось в четвертой пробирке, где разведение равно 16.

Следовательно, содержание белка в исследуемой моче $0,033 \cdot 16 = 0,528$ г/л.

Работа 3. Колориметрическое определение белка в моче

Принцип метода.


Метод основан на способности сульфосалициловой кислоты реагировать с белком, вызывая помутнение, интенсивность которого пропорциональна содержанию белка в моче.

Ход работы.

К 1 мл прозрачной мочи добавляют 3 мл 3%-ного раствора сульфосалициловой кислоты, смесь перемешивают и через 5 мин измеряют оптическую плотность содержимого пробирки на ФЭК при красном светофильтре (длина волны 630–650 нм) в кювете шириной 10 мм против контрольной пробы (контрольная проба: к 1 мл мочи добавляют 3 мл изотонического раствора NaCl).

Расчет производят по калибровочному графику.

Расчет суточных потерь белка проводят с учетом диуреза (1200–1500 мл).

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

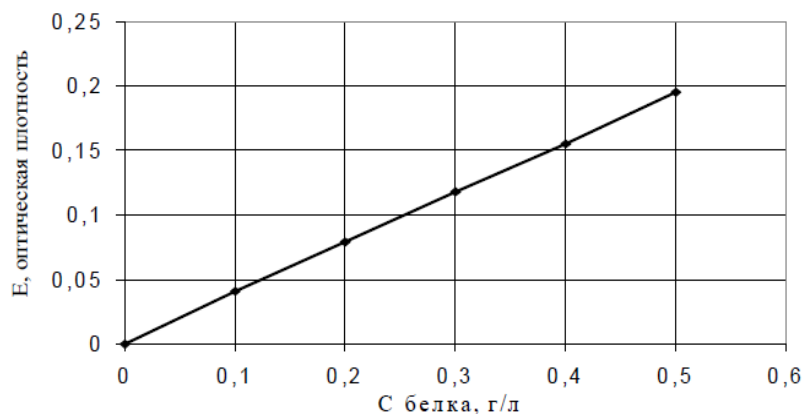


Рис. Калибровочный график для определения содержания общего белка в моче

Работа 3. Количественное определение сахара в моче

3.1. Колориметрическое определение сахара в моче по шкале Альтгаузена.

Реактивы: 10% р-р едкого натра (гидроксида натрия)

Ход работы.

- 1) К 4 мл мочи в пробирке добавить 1 мл 10% р-р едкого натра
- 2) Кипятят на водяной бане 1 минуту.
- 3) При наличии сахара в моче образуется окрашивание (от желтого до бурого).
- 4) Окраску раствора сравнивают с цветом стандартной шкалы
- 5) Результат отмечают в % по шкале.

Порядок работы

1. Получить у преподавателя задание.
2. Выполнить работу согласно методическим рекомендациям.
3. Оформить отчет.
4. Вылить отработанные растворы, посуду вымыть. Сдать рабочее место.


Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Наблюдения.
3. Выводы по проделанной работе.

Лабораторная работа 11. Определение содержания минеральных веществ в моче

В состав мочи входят вода, органические и минеральные соли, всего около 150 веществ. В клиничко-биохимических лабораториях проводят общий и специальный анализ мочи. Общий анализ включает исследование физико-химических свойств мочи и определение в ней ряда патологических компонентов: белок, сахар, кетоновые (ацетоновые) тела, гемоглобин, пигменты и индикан. При необходимости подсчитывают также количество эритроцитов и лейкоцитов в моче. Общий анализ обязателен при первичном обследовании пациента и диспансерном наблюдении. Специальный анализ, т.е. определение прочих компонентов мочи (метаболиты, ферменты, отдельные минеральные вещества и т.д.) проводится при подозрении на поражение конкретного звена обмена или определенного органа.

Взрослый человек выделяет в сутки в среднем 1200-1500 мл мочи. Количество мочи увеличивается при обильном введении жидкости и при низкой внешней температуре, уменьшается при обильном потоотделении. При некоторых заболеваниях (понос, лихорадочное состояние, острое воспаление почек) количество мочи снижается (олигурия), а иногда, например, при закупорке мочевыводящих путей, выделение мочи прекращается (анурия). Полиурия, т.е.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

выделение повышенного количества мочи, наблюдается при сахарном и несахарном мочеизнурении.

Цель занятия – уметь применять знания о физиологических и патологических компонентах мочи для решения вопросов диагностики, профилактики и прогноза заболеваний, связанных с почечной и внепочечной патологией.

Задачи:

1. провести все опыты;
2. проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Материал исследования: моча.

Реактивы: 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина, щавелевокислый натрий, 0,1н NaOH, 1% AgNO₃, 10% HNO₃, 10% NH₄OH, 10% HCl, 5% BaCl₂, 10% уксусная кислота, 5% щавелевокислый аммоний, молибденовый реактив, насыщенный раствор Ca(OH)₂.

Приборы и оборудование: цилиндр, урометр, пробирки, пипетки, штатив, индикаторная бумага, колбы для титрования, микробюретки, пробки, воронки, спиртовки.

Экспериментальная часть

Работа 1. Определение относительной плотности

У здоровых людей в обычных условиях относительная плотность (ОПл) мочи колеблется от 1,010 до 1,025 и зависит от концентрации растворенных в ней веществ (белка, глюкозы, мочевины, солей и т. д.). Определяют плотность мочи при помощи ареометра (урометра) с диапазоном шкалы от 1,001 до 1,050.

При различных патологических состояниях плотность мочи может изменяться. Несоответствие между плотностью и количеством мочи наблюдается при сахарном мочеизнурении, когда, несмотря на большое количество мочи, удельный вес ее остается высоким.

Ход работы.

В цилиндр наливают мочу и осторожно погружают в нее урометр. Отсчет ведется по делению шкалы урометра, соответствующему нижнему мениску жидкости.

Температура исследуемой мочи должна быть 15±3°C. При малом количестве мочи ее предварительно разводят в 2–3 раза дистиллированной водой. Полученное значение относительной плотности затем умножают на степень разведения.

Повышение температуры исследуемой мочи на каждые 3°C снижает ОПл на 0,001, а наличие белка до 4 г/л повышает на 0,001. Однако при значительном содержании белка рекомендуется в величину ОПл вносить следующие поправки: при содержании белка 4–7 г/л вычитать 0,001; при 8–11 г/л — 0,002; при 12–15 г/л — 0,003; при 16–20 г/л — 0,004; свыше 20 г/л — 0,005.

Работа 2. Определение pH


В норме pH мочи у здоровых людей при обычном питании колеблется от 5,0 до 7,0.

Колебания pH мочи зависят от состава принимаемой пищи: употребление мяса обуславливает кислую реакцию, растительных продуктов — щелочную реакцию мочи. Причины, влияющие на реакцию мочи, представлены в таблице.

Причины, влияющие на pH мочи

Реакция мочи	Причины, комментарии
Кислая моча	Кетоз — диабет, голодание, лихорадочные состояния. Системный ацидоз. Респираторный или метаболический ацидоз вызывают повышенную кислотность мочи
Щелочная моча	Системный алкалоз. Обильная рвота, избыток щелочной пищи, гипервентиляция. Почечный ацидоз. Ощелачивающая терапия. Хронические инфекции мочевыводящих путей

Кислая реакция мочи обусловлена преобладанием в ней однозамещенных фосфорнокислых солей (NaH₂PO₄) над двузамещенными (Na₂HPO₄). Патологические сдвиги в сторону более кислой реакции среды наблюдаются при диабете, голодании, почечной недостаточности и других заболеваниях, а в сторону более щелочной - при употреблении с пищей гидрокарбонатов, щелочных минеральных вод, молочно-растительных продуктов, воспалении слизистой мочевого

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

пузыря, при заражении мочевыводящих путей микробами, вызывающими аммиачное брожение мочи, и после длительной рвоты.

Если моча сильно окрашена, ее предварительно разводят дистиллированной водой в 3 раза. При разведении рН мочи не изменяется.

Ход работы.

На лакмусовую бумажку наносят каплю мочи и определяют ее реакцию:

- 1) синяя лакмусовая бумага краснеет, красная не изменяет цвета — кислая реакция;
- 2) красная бумага синееет, синяя не изменяет цвета — щелочная реакция;
- 3) обе бумаги не изменяют своего цвета — нейтральная реакция.

Можно использовать и другие индикаторные бумаги.

Работа 3. Определение общей титруемой кислотности

Ход работы.

В колбочку отмеривают 1 мл мочи, прибавляют 0,5 г щавелевокислого калия и 1-2 капли 0,5% спиртового раствора фенолфталеина, взбалтывают и титруют из микробюретки 0,01 н раствором едкого натра до слабого розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 секунд.

Щавелевокислый натрий прибавляют для удаления из раствора ионов кальция, т.к. во время титрования осадок фосфорнокислого кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ может затемнять конец реакции.

Щавелевокислый калий должен быть нейтральным.

Кислотность мочи выражают количеством миллилитров 0,1 н раствора едкого натра, пошедшего на нейтрализацию суточного количества мочи. В норме кислотность мочи варьирует от 200 до 500.

Работа 4. Обнаружение хлоридов

Хлориды выделяются с мочой в виде хлористых солей калия, натрия, аммония, кальция и магния. Из общего количества 15-20 г неорганических составных частей мочи на долю хлоридов приходится 8-15 г/сутки. Количество хлоридов в моче у здорового человека приблизительно соответствует содержанию поваренной соли в пище. При бессолевой диете выделение хлоридов с мочой резко снижается и может дойти до 1 г в сутки. Бессолевую диету назначают при некоторых заболеваниях, чаще всего связанных с заболеванием почек. Определение хлоридов моче может служить контролем за течением болезни. Количество хлоридов в моче уменьшается в случае частой рвоты.

Принцип метода.

При добавлении азотнокислого серебра к моче, подкисленной азотной кислотой, выпадает белый осадок хлористого серебра, темнеющий на свету, нерастворимый в азотной кислоте и растворяющийся в аммиаке.


1. $\text{NaCl} + \text{AgNO}_3 \rightarrow \text{AgCl} + \text{NaNO}_3$
2. $\text{AgCl} + \text{NH}_4\text{OH} \rightarrow \text{Ag}(\text{NH}_3)\text{Cl} + \text{H}_2\text{O}$

Ход работы.

К 1 мл мочи (20 капель) добавляют 2 капли 1% раствора AgNO_3 и 2 капли 10% раствора HNO_3 . Выпадает белый творожистый осадок AgCl темнеющий на свету. Содержимое пробирки перемешивают, часть мутной жидкости переливают в другую пробирку и прибавляют 1-2 капли 10% раствора аммиака. Творожистый осадок хлористого серебра растворяется. К другой части мутной жидкости добавляют по каплям 10% раствор азотной кислоты. Растворения осадка не происходит.

Работа 5. Обнаружение сульфатов и эфиросерных кислот

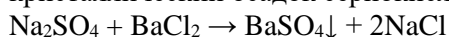
Все серусодержащие вещества мочи образуются в результате превращения белков в тканях и, в частности, превращения серусодержащих аминокислот (цистина, цистеина, метионина). Сера выделяется с мочой в форме неорганических сульфатов, солей эфиросерных кислот и так

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

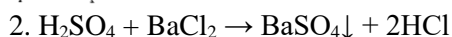
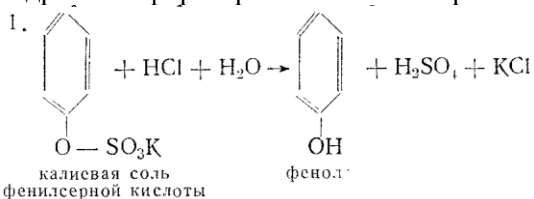
называемой нейтральной серы. Количество выделяемых сульфатов зависит главным образом от содержания в пище белков и колеблется параллельно с изменением количества азотистых составных частей мочи. В среднем за сутки выделяется около 2,5 г серы в виде сульфатов. Количество солей эфиросерных кислот увеличивается при усилении гнилостных процессов в кишечнике в связи с образованием фенола, крезола, индола, скатола, а также при отравлениях фенолами, бензином и др. Все эти ядовитые вещества обезвреживаются в печени путем превращения в эфиросерные кислоты. Эфиросерные кислоты менее ядовиты, чем свободные фенолы. В сутки в среднем выделяется около 0,3 г серы в форме эфиросерных кислот. К фракции «нейтральной» серы относятся различные соединения, построенные по типу сульфоновых кислот, в которых сера связана непосредственно с углеродом (а не через кислород, как у сульфатов и эфиросерных кислот). К таким соединениям относятся цистин, роданистые соли и другие вещества. Содержание этих веществ в моче очень незначительно и увеличивается при цистинурии.

Принцип метода.

При добавлении к моче, подкисленной соляной кислотой (нейтральная сера реагирует с хлористым барием только после окисления в сульфаты), хлористого бария образуется белый кристаллический осадок сернокислого бария, нерастворимый в кислотах и в щелочах.



Если осадок сернокислого бария отфильтровать и фильтрат прокипятить с соляной кислотой, жидкость в пробирке мутнеет. Появление мути обусловлено освобождением серной кислоты при гидролизе эфиросерных кислот и образованием новой порции сернокислого бария.



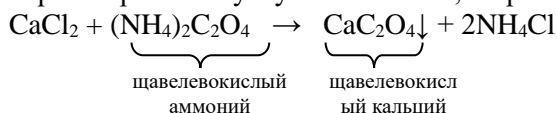
Ход работы.

К 20 каплям мочи добавляют 5 капель 10% раствора соляной кислоты и по каплям, медленно, добавляют 5% раствор BaCl_2 до полноты осаждения, т. е. до тех пор, пока новая капля хлористого бария не будет вызывать образование мути. Жидкость фильтруют и кислый фильтрат помещают в кипящую водяную баню на 5—10 минут или нагревают на спиртовке. Содержимое пробирки становится мутным от выделения новой порции сернокислого бария из эфиросерных кислот и приобретает слегка розоватую окраску вследствие образования продуктов окисления фенола.

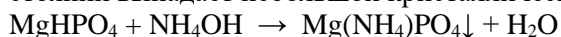
Работа 6. Обнаружение кальция (проба Сулковича)

Принцип метода.

Ионы кальция при реакции со щавелевой кислотой образуют нерастворимую щавелевую соль, нерастворимый в уксусной кислоте, но растворяющийся в минеральных кислотах.




Если осадок щавелевокислого кальция отфильтровать и фильтрат подщелочить аммиаком, то при стоянии выпадает небольшой кристаллический осадок фосфорнокислой аммиак-магнезии.



Ход работы.

К 20 каплям (1 мл) мочи добавляют 1—2 капли 10% раствора уксусной кислоты и 2—3 капли 5% раствора щавелевокислого аммония. Выпадает кристаллический осадок щавелевокислого кальция (рис.). Жидкость фильтруют и к фильтрату прибавляют 4 капли 10% раствора аммиака (до

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

щелочной реакции на лакмус). Через некоторое время выпадает осадок фосфорнокислой аммиак-магнезии, нерастворимой в аммиаке, но растворяющейся в органических и минеральных кислотах.

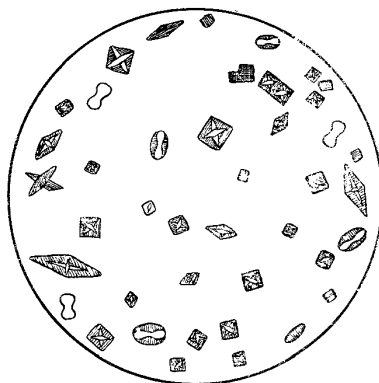


Рис. Кристаллы щавелевокислого кальция.

Реактивы: 1) щавелевая кислота (HOOC–COOH); 2) оксалат аммония (NH₄)₂C₂O₄ × H₂O; 3) ледяная уксусная кислота (CH₃COOH); 4) реактив Сулковича: в 50 мл дистиллированной воды растворяют по 2,5 г щавелевой кислоты и оксалата аммония, добавляют 5 мл уксусной кислоты и доводят объем до 150 мл дистиллированной водой.

Ход определения.

Смешивают в пробирке по 0,5 мл мочи и реактива Сулковича. Сразу же или через несколько секунд появляется молочно-белое помутнение. Через 1–2 мин оценивают степень помутнения пробы.

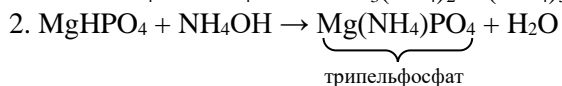
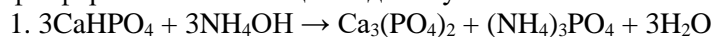
Оценка результатов.

Степень помутнения оценивают визуально (условно в баллах или количеством +): отсутствие помутнения — 0; слабое помутнение — 1; умеренное — 2; значительное — 3; резко выраженное — 4. О повышенном содержании кальция в моче свидетельствуют 3-я и 4-я степени помутнения.

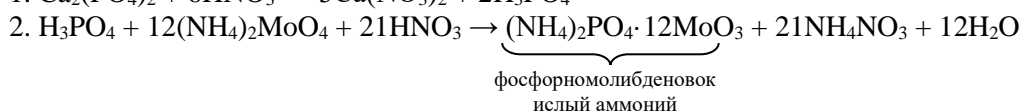
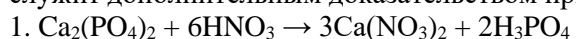
Работа 7. Обнаружение фосфатов

Принцип метода.

При добавлении к моче аммиака или едкой щелочи выделяется белый аморфный осадок, растворяющийся при подкислении. Образование осадка обусловлено присутствием в моче однозамещенных и двухзамещенных фосфорнокислых солей кальция и магния, которые в щелочной среде превращаются в нерастворимые в воде соединения: в трехзамещенный фосфорнокислый кальций и двойную аммонийно-магниевую соль (трипельфосфат).




При нагревании полученных осадков с раствором молибденовокислого аммония образуется желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония. Молибденовая реакция служит дополнительным доказательством присутствия в осадке солей фосфорной кислоты.



Ход работы.

К 20 каплям мочи добавляют 2–3 капли 10% раствора аммиака. Образуется осадок фосфорнокислых солей кальция и магния. Осадок отделяют фильтрованием и растворяют на фильтре в 2–3 каплях 10% раствора азотной кислоты. К полученному раствору добавляют 10–15 капель молибденового реактива и кипятят. При нагревании жидкость окрашивается в желтый

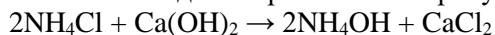
Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

цвет, а при охлаждении, выпадает желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

Работа 8. Обнаружение аммиака, калия и натрия

Принцип метода.

Если в пробирку с мочой добавить раствор слабой щелочи, то жидкость приобретает запах аммиака вследствие разложения присутствующих в моче аммонийных солей.



Слабые щелочи типа гидроокиси кальция не разлагают азотсодержащих органических веществ (мочевину, креатинин и др.) и разрушают только аммонийные соли.

Для обнаружения ионов калия и натрия моча должна быть обуглена или озолена. В водной вытяжке после озоления натрий можно обнаружить пиросульфатом калием, а калий — винно-каменной кислотой.

Ход работы.

В пробирку наливают через воронку 1—2 мл мочи и столько же известкового молока [насыщенный раствор $\text{Ca}(\text{OH})_2$]. Закрывают пробирку пробкой (можно заменить кусочком ваты) с укрепленной внутри пробирки влажной красной лакмусовой бумажкой. Через некоторое время бумажка синее.

Порядок работы

1. Получить у преподавателя задание.
2. Выполнить работу согласно методическим рекомендациям.
3. Оформить отчет.
4. Вылить отработанные растворы, посуду вымыть. Сдать рабочее место.

Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Наблюдения.
3. Выводы о характерных изменениях с указанием причин.

Лабораторная работа 12. Биохимия крови

Цель занятия – освоить метод количественного определения кальция в сыворотке крови титрометрическим методом, уметь применить тест с диагностической целью

Задачи:

3. определить содержание ПВК в крови и моче;
4. проанализировать полученные результаты и сделать выводы.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

0,01 М раствор AgNO_3 , HNO_3 (конц.), индикатор – раствор сульфата железа(III)-аммония.

Приборы и оборудование: колбы для титрования, бюретки, пробирки, пипетки, штатив, ФЭК.

Экспериментальная часть

Работа 1. Буферные свойства сыворотки крови

В сыворотке крови функционируют бикарбонатная, белковая и фосфатная буферные системы.


Принцип метода.

Титруют 0,1 н раствором HCl 1 мл сыворотки крови (1-я пробирка) 1 мл воды (2-я пробирка) по индикатору бромфеноловому синему (по 1 капле в каждую пробирку) до желтой окраски.

Сравнивают результаты титрования.

Результат:

Всыв. =

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

$V_{H_2O} =$

Работа 2. Титриметрический метод определения щелочного запаса крови

Количество всех оснований крови, в том числе связанных с гемоглобином, обозначается щелочным запасом цельной крови. Эта величина не соответствует резервной щелочности крови, т. е. количеству химически связанной плазмой углекислоты при 40 мм ее напряжения, а всегда значительно превышает ее.

Принцип метода.

К цельной крови добавляют заведомо большее количество HCl, которая нейтрализует все щелочные компоненты. Избыток кислоты оттитровывают щелочью, заканчивая титрование в точке эквивалентности при $pH = 5,0$. Это значение pH соответствует изоэлектрическим точкам основных белков крови — альбумина, глобулина и глобина. В среде, близкой к изоэлектрической точке, белки неустойчивы и легко выпадают в осадок. Поэтому о конце титрования судят по помутнению раствора и выпадению хлопьев белка. Обычно окончание реакции (помутнение) происходит резко с добавлением одной капли щелочи. Щелочной запас крови выражают в миллиэквивалентах щелочи и соответствует количеству связанной основаниями крови HCl в пересчете на один литр крови. Физиологические пределы колебаний щелочного запаса крови — 100–115 мэкв/л.

Ход работы.

1. К 10 мл 0,01н HCl добавляют 0,2 мл крови и тщательно перемешивают.
2. Прозрачный бурый раствор титруют из микробюретки 0,1н NaOH до резко наступающего помутнения. Отмечают количество щелочи, пошедшее на титрование.
3. Рассчитать щелочной запас крови по формуле:

$$X (\text{мэкв/л}) = (1 - V_T) \cdot 0,1 \cdot 1000 / 0,2,$$

где 1 — количество HCl, взятой для анализа и выраженной в 0,1 н концентрации, мл;

V_T — объем щелочи, израсходованный на титрование, мл;

0,1 — количество мэкв в 1 мл щелочи;

0,2 — количество крови, взятое для анализа, мл;

1000 — 1 литр крови.

Записать результат:

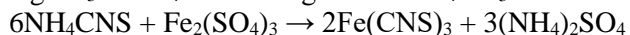
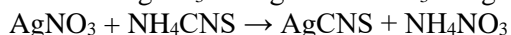
Результат: $V_T(\text{мл}) =$

Работа 3. Определение хлоридов в крови

Хлор находится в организме в основном в ионизированной форме. Хлорид-ион — главный внеклеточный анион. Анионы хлора — наиболее важные осмотически активные компоненты крови, лимфы, спинномозговой жидкости. Содержание хлора (хлорид-ионов) в сыворотке крови практически здоровых взрослых людей составляет 95–105 ммоль/л. В плазме и сыворотке крови грудных детей концентрация хлорид-ионов в норме равна 80–140 ммоль/л.

Принцип метода


В безбелковом фильтрате ионы хлора взаимодействуют с нитратом серебра, избыток которого оттитровывают роданидом аммония в присутствии индикатора (железо-аммоний сульфата).



Окончание реакции определяют по появлению розового окрашивания, образованного $\text{Fe}(\text{CNS})_3$.

Ход работы

1. В две колбочки (опытную 1 и контрольную 2) наливают по 5 мл дистиллированной воды.
2. В опытную вносят 0,2 мл сыворотки крови.
3. В обе колбочки отмеривают по 3 мл 0,01 М раствора нитрата серебра, по 8 капель концентрированной азотной кислоты и по 4-5 капель раствора сульфата железа(III)-аммония.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

4. Титруют 0,01 М раствором роданида аммония до слабо розового окрашивания (табл.).
5. Титрование проводят 3 раза, для расчета содержания хлоридов берут среднее значение объема 0,01 М раствора роданида аммония, пошедшего на титрование.

Таблица.

Реактивы и этапы	Колба 1	Колба 2
Сыворотка крови, мл	0,2	-
Дистиллированная вода, мл	5	5
0,01 М раствор AgNO ₃ , мл	3	3
HNO ₃ (конц.), капли	8	8
Индикатор - раствор сульфата железа(III)-аммония, капли	4-5	4-5
Титруют 0,01 М раствором роданида аммония до слабо розового окрашивания, мл		
Среднее значение объема 0,01 М раствора роданида аммония, пошедшего на титрование, мл (А)		
Содержание хлоридов в сыворотке крови, мМоль/л (Х)		

Расчет

$$X = \frac{(a-b) \cdot 0,01 \cdot 1000}{0,2} = (a-b) \cdot 50 \text{ мМоль/л,}$$

где X - содержание хлоридов в сыворотке крови, мМоль/л

a - результат титрования в контроле;

b – результат титрования в опыте;

0,01 – эквивалентность раствора нитрата серебра;

1000 – перерасчет на мг – эквивалент;

0,2 – объем сыворотки крови, мл.

Работа 4. Определение содержания кальция в сыворотке крови

Кальций играет важную роль в осуществлении процессов жизнедеятельности. Он влияет на проницаемость биологических мембран, возбудимость нервов и мышц, участвует в нервно-мышечной проводимости, сокращении и расслаблении мускулатуры (в том числе мышцы сердца), секреторных процессах, формировании кости и хряща; воздействует на обмен веществ в клетках, является важным фактором гемостаза и посредником действия гормонов в клетке.

Количественное определение кальция в плазме крови имеет важное значение для диагностики ряда заболеваний и при наблюдении за ходом лечения.

В норме концентрация общего кальция в плазме крови — 2,2–2,7 ммоль/л.


Реактивы: 30%-ный раствор NaOH, трилон Б - 0,05 моль/л раствор, индикатор - смесь мурексида с хлоридом натрия в соотношении 1:100.

Приборы и оборудование: плоскодонные колбы для титрования, цилиндры мерные, пробирки, бюретки, пипетки.

Принцип метода.

Метод основан на способности органических соединений – комплексонов – взаимодействовать с ионами кальция. В качестве комплексона используется трилон Б (ЭДТА). Трилоном Б титруют ионы кальция, предварительно связанные с индикатором – мурексидом. Момент полного связывания кальция с трилоном Б определяется по изменению цвета мурексида (в комплексе с ионами кальция мурексид красно-оранжевого цвета, свободный от кальция мурексид окрашивается в сине-фиолетовый цвет). Комплекс кальция с трилоном Б более прочен, чем комплекс с мурексидом. Зная концентрацию и объем раствора трилона Б, пошедшего на титрование, находят содержание кальция.

Принцип метода основан на способности индикатора мурексида образовывать с ионами кальция в щелочной среде комплексное соединение, окрашенное в красно-фиолетовый или бледно-розовый цвет (в зависимости от концентрации). При титровании раствором более сильного комплексобразователя этот комплекс разрушается, и связанный мурексид освобождается, что приводит к появлению его исходной окраски (фиолетовой или бледно-сиреневой).

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Ход работы

1. **Готовят раствор мурексида для всей группы студентов.** Для этого в колбу вносят 1 мл раствора NaOH и 100 мл воды, перемешивают. В полученный раствор добавляют смесь мурексида до появления ярко-фиолетовой окраски.
2. Бюретку заполняют раствором трилона Б.
3. В 4 колбы (3 опытных и 1 контрольная) наливают по 5 мл раствора мурексида.
4. В опытные колбы вносят по 0,2 мл исследуемой сыворотки крови (раствор становится розовым).
5. Титруют (без промедления!) из бюретки 0,05 М раствором трилона Б до исчезновения розовой окраски и восстановления фиолетового цвета (сравнить с окраской контроля, титрование лучше делать при дневном освещении).
6. Титрование проводят 3 раза, для расчета содержания кальция берут среднее значение объема раствора трилона Б, пошедшего на титрование (табл.).

Таблица 11.

Этапы выполнения работы

Реактивы и этапы	Колба 1	Колба 2	Колба 3	Колба 4 (контроль)
Раствор мурексида, мл	5	5	5	5
Сыворотка крови, мл	0,2	0,2	0,2	-
Титруют 0,05 М раствором трилона Б до до исчезновения розовой окраски и восстановления фиолетового цвета (сравнить с окраской контроля), мл				-
Среднее значение объема 0,05 М раствора трилона Б, пошедшего на титрование, мл (А)				
Содержание кальция в исследуемой сыворотке крови, мг/дл (Х)	-			

Расчет. Исходя из того, что 1 мл 0,05 моль/л раствора трилона Б эквивалентен 0,06 мг Са, рассчитывают содержание кальция в сыворотке крови (в мг/дл):

$$X = A \times 0,06 \times 100 \times 5,$$

где А – объем трилона Б, пошедший на титрование опытной пробы, мл.

Проведите расчеты и заполните таблицу 5.

Порядок работы

1. Получить у преподавателя задание.
2. Выполнить работу согласно методическим рекомендациям.
3. Оформить отчет.
4. Вылить отработанные растворы, посуду вымыть. Сдать рабочее место.

Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Наблюдения.
3. Расчет содержания кальция в сыворотке крови (в ммоль/л), сравнение с нормой
4. Выводы по проделанной работе.

Лабораторная работа 13. Качественные реакции на белково-пептидные гормоны. Расчет СДИ


Цель занятия – познакомиться с некоторыми химическими свойствами готовых препаратов гормонов.

Задачи:

5. проделать перечисленные ниже химические реакции;
6. проанализировать полученные результаты и сделать вывод.

Актуальность темы

В клиничко-биохимических лабораториях и фармации используются методы качественного и количественного анализа для определения гормонов, включая и гормоноиды, и медиаторов в

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

биологическом материале и лекарствах. В то же время отклонения в содержании гормонально-медиаторных соединений регистрируют по нарушению регулируемых ими звеньев в обмене веществ.

Экспериментальная часть

Работа 1. Качественные реакции на белково-пептидные гормоны

Материал исследования: инсулин для инъекций, окситоцин для инъекций.

Реактивы: HNO_3 (конц.), 10% раствора NaOH, 1% раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, реактив Фоля (к 5% раствору $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ прибавляют равный объем 30% раствора NaOH до растворения образовавшегося осадка).

Приборы и оборудование: пробирки, пипетки, спиртовки.

А) Реакция Геллера

- К 10 каплям концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки прилить равный объем (10 капель) раствора гормона.
- Пробирку наклонить под углом 45° так, чтобы жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей образуется белый аморфный осадок в виде небольшого кольца.

Б) Биуретовая реакция

К 10 каплям гормона добавить 5 капель 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1% раствора сернистой меди. Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

В) Реакция Фоля

К 5 каплям раствора гормона прилить 5 капель реактива Фоля и нагреть до кипения. Через 1-2 минуты при сгорании появляется бурый или черный осадок сернистого свинца.

Результаты опытов записать в таблицу.

Таблица 1. Результаты опытов с гормонами - производными аминокислот

Препарат гормона	Название реакции	Окраска	О чем свидетельствует окраска реакции?

В выводах отметить присутствие соответствующих групп и аминокислот в исследуемых гормональных препаратах.

Работа 2. Расчет суточной дозы инсулина для больных с впервые выявленным сахарным диабетом

Принцип метода

Больным с впервые выявленным сахарным диабетом часто возникает необходимость назначить для лечения инсулин. Расчет первой суточной дозы инсулина (СДИ) простого кристаллического, который действует в организме в течение 6-8 ч, производится исходя из суточной дозы глюкозурии или по уровню сахара (глюкозы) в крови.

При декомпенсации диабета исходим из того, что 1 ед. инсулина способствует метаболизму 3 г (1,65 ммоль) глюкозы.


Отсюда:

$$а) СДИ = \frac{Гл \cdot Д \cdot 10}{3}$$

где Гл – глюкоза в суточной моче, %; Д – суточный диурез, л
или

$$б) СДИ = \frac{Гл \cdot Д}{1,65}$$

где Гл – глюкоза в суточной моче, ммоль; Д – суточный диурез, л

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Например, больной за сутки выделил 4 л мочи, в которой содержится 3% глюкозы (16,5 ммоль/л). Тогда суточная доза инсулина составит:

$$\text{а) } СДИ = \frac{3 \cdot 4 \cdot 10}{3} = 40 \text{ед.}$$

$$\text{б) } СДИ = \frac{16,5 \cdot 4}{1,65} = 40 \text{ед.}$$

Инсулин распределяется на три инъекции в соотношении 3:2:1 или 50%, 35%, 15%.

Следовательно, 40 ед. инсулина распределяются следующим образом: 20 - перед завтраком, 14 - перед обедом и 6 - перед ужином.

При высоком уровне глюкозы в крови у больных инсулин необходимо вводить немедленно (1 ед. инсулина способствует снижению уровня глюкозы в крови на 0,3 ммоль/л). Во избежание гипогликемии уровень глюкозы в крови не должен быть ниже 8,3 ммоль/л. Отсюда

$$СДИ = \frac{Гл - 8,3}{0,3}$$

где Гл – глюкоза в крови, ммоль/л.

Так, при концентрации глюкозы в крови 20,3 ммоль/л

$$СДИ = \frac{20,3 - 8,3}{0,3} = 40 \text{ед.}$$

Распределение в течение суток такое же (3:2:1).

Исследуемый материал: моча (суточный диурез обозначен).

Реактивы: ортотолуидиновый реактив; раствор ТХУ – 30 г/л; стандартный раствор глюкозы (контроль) – 16,65 ммоль/л.

Пробы мочи и стандартного раствора обрабатывают одновременно (инкубируют в кипящей водяной бане ровно 8 мин).

Приборы и оборудование: пробирки, пипетки, водяная баня, центрифуга, спектрофотометр.

Ход определения.

1. Мочу разбавляют в 10 раз.
2. Берут 2 центрифужные пробирки. В одну наливают 0,1 мл мочи и добавляют 1,0 мл раствора ТХУ, а в другую – 0,1 мл стандартного раствора глюкозы (концентрация 1,0 г/л) и 1,0 мл раствора ТХУ.
3. Хорошо перемешивают содержимое и центрифугируют 5 мин при 1500 об./мин.
4. Для цветной реакции берут по 0,5 мл надосадочной жидкости из каждой центрифужной пробирки, добавляют 4,5 мл ортотолуидина
5. Обе пробирки нагревают точно 8 мин в хорошо кипящей водяной бане. Пробирки необходимо покрывать фольгой и строго соблюдать временной и температурный режим.
6. Пробирки вынимают, охлаждают под водопроводной водой до комнатной температуры (18-22°C) и фотометрируют окрашенный раствор опытной пробы по отношению к дистиллированной воде (длина волны 590-650 нм с оранжевым или красным светофильтром) и толщине слоя 1 см не позже, чем через 20 мин после обработки.
7. Снимают показания оптической плотности.
8. Расчет ведут по формуле:


$$C_{\text{он}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot E_{\text{он}}}{E_{\text{ст}}},$$

где $C_{\text{он}}$ – концентрация глюкозы в пробе в ммоль/л; $C_{\text{ст}}$ – концентрация глюкозы в стандартном растворе в ммоль/л; $E_{\text{он}}$ – оптическая плотность опытной пробы; $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандартной пробы.

Полученный результат умножают на степень разведения.

Пример: $E_{\text{он}}=0,6$. $E_{\text{ст}}=0,3$. $C_{\text{ст}}=5,5$ ммоль/л. $C_{\text{он}}=0,6:0,3 \times 5,5 = 11,0$ ммоль/л.

Коэффициенты пересчета: % глюкозы в моче $\times 55,5 =$ ммоль/л; мг% глюкозы в моче $\times 0,0555 =$ ммоль/л.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Для определения глюкозы мочу собирают за 24 ч и измеряют ее объем. Определяют содержание глюкозы вышеописанным способом. Например, содержание глюкозы составляет 4,1 ммоль/л, суточный диурез 1,5 л, следовательно, в суточном количестве мочи концентрация глюкозы равна $4,1 \text{ ммоль/л} \times 1,5 = 6,15 \text{ ммоль/л}$.


Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Таблицы, наблюдения, расчеты.
3. Выводы по проделанной работе.


8. ТЕМАТИКА КУРСОВЫХ РАБОТ не предусмотрены рабочим планом

9. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЭКЗАМЕНУ


1. Предмет, задачи, методы и место биохимии среди других биологических дисциплин.
2. Роль белков в жизнедеятельности организма. Современные представления о структуре белков
3. Уровни структурной организации белков. Медико - биологическое значение видовой специфичности первичной структуры (инсулин и гемоглобин). Стабилизация полипептидной цепи внутримолекулярными взаимодействиями при образовании вторичной и третичной структуры белков
4. Третичная структура белка. Глобулярные и фибриллярные белки. Связи, стабилизирующие третичную структуру белков. Примеры организации третичной структуры фибриллярных белков
5. Принципы организации четвертичной структуры белков. Кооперативные изменения конформации субъединиц. Параллельная и последовательная схема действия аллостерических ферментов как пример реализации кооперативных эффектов
6. Денатурация и ренатурация белков. Денатурирующие факторы
7. Методы выделения и очистки белков
8. Физико-химические свойства белков: масса, размеры и форма молекул; растворимость, ионизация, гидратация. Методы исследования белков (качественные и количественные).
9. Общие принципы ферментативного катализа. Отличия ферментов от неорганических катализаторов. Механизм односубстратной и двусубстратной ферментативной реакции
10. Общая характеристика биологических функций белков (каталитическая, регуляторная, рецепторная, транспортная, структурная, сократительная, генно-регуляторная, трофическая, иммунологическая и др.).
11. Структурные компоненты и биологические функции сложных белков (хромопротеины, гемопротеины, флавопротеины, металлопротеины).
12. Причины и следствия различного белкового состава органов и тканей. Изменение белкового состава организма при старении и заболеваниях.
13. Полиморфизм белков. Типы гемоглобина, ЛДГ и т.д. Группоспецифические полиморфные системы крови
14. Структурные компоненты нуклеиновых кислот. Биологическое значение и функции нуклеиновых кислот. История изучения нуклеиновых кислот.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		


15. Строение и уровни организации нуклеиновых кислот. Первичная структура нуклеиновых кислот. Видовые различия первичной структуры нуклеиновых кислот
16. Вторичная и третичная структура ДНК. Строение и организация хроматина.
17. Вторичная и третичная структура РНК. Типы РНК и их функции.
18. Физико-химические свойства нуклеиновых кислот. Денатурация и ренатурация. Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот.
19. Биологическая роль нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты, как компоненты пищи. Переваривание нуклеиновых кислот в ЖКТ, всасывание и транспорт их компонентов.
20. Понятие о ферментах. Структурно-функциональная организация ферментов. Отличие ферментативного катализа от неорганического.
21. Кофакторы и коферменты, их значение для деятельности ферментов. Коферментные функции витаминов.
22. Классификация и номенклатура ферментов.
23. Механизм действия ферментов. Специфичность действия ферментов (стереохимическая, абсолютная, групповая). Структура и роль каталитического центра.
24. Кинетика ферментативных реакций. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата, фермента, факторов среды (рН, температуры). Уравнение Михаэлиса-Ментен.
25. Ингибирование активности ферментов: обратимое и необратимое; конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное. Лекарственные препараты - ингибиторы ферментов
26. Регуляция активности ферментов. Ковалентная модификация. Аллостерическая регуляция, каталитические и регуляторные центры. Понятие об иммобилизованных ферментах и их применение в медицине.
27. Методы определения и единицы активности и количества фермента. Понятие об энзимопатологии (наследственные энзимопатии), энзимодиагностике и энзимотерапии.
28. Изоферменты. Значение органоспецифичности ферментного состава и изоферментного спектра для диагностики заболеваний. Изменчивость изоферментов в онтогенезе (на примере ЛДГ).
29. Понятие о гормонах, их биологическое значение, механизмы действия. Классификация гормонов.
30. Гормоны гипоталамо-гипофизарной системы, их биологическое действие. Характеристика состояний, связанных с нарушением функции гипофиза (карликовость, акромегалия). Применение лекарственных препаратов, созданных на основе гормонов гипофиза в медицине.
31. Гормоны щитовидной и паращитовидной желез, их физиологическое действие. Характеристика патологических состояний, связанных с нарушением функции этих желез.
32. Инсулин и глюкагон, их влияние на обменные процессы. Характеристика состояний, связанных с нарушением их продукции, применение в медицине.
33. Гормоны надпочечников, их биологическое действие, характеристика состояний, связанных с нарушением функции надпочечников. Применение гормонов надпочечников в медицине
34. Половые гормоны: биосинтез, физиологическое действие, применение в медицине.
35. Роль гормонов в обеспечении межклеточной сигнализации. Трансмембранная

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		


- передача сигналов в клетку. Мембранные и внутриклеточные рецепторы. Механизмы действия гормонов различных классов.
36. Структура, функции и механизм действия стероидных гормонов, их роль в регуляции полового цикла
 37. Репликация ДНК как один из видов матричных синтезов. Проблемы, возникающие при репликации и способы их преодоления. Этапы репликации. Особенности процесса в эукариотических клетках.
 38. Регуляция биосинтеза белка на уровне репликации и транскрипции. Регуляция биосинтеза белка на этапе трансляции и посттрансляционной модификации
 39. Посттрансляционная модификация белков
 40. Этапы трансляции. Состав трансляционного аппарата клетки. Строение и механизм функционирования рибосом. Роль РНК в процессе трансляции. Участие белковых комплексов инициации, элонгации и терминации в биосинтезе полипептидной цепи.
 41. Принципы кодирования информации в прокариотических и эукариотических клетках. Основной постулат молекулярной биологии. Генетический код и его характерные черты. Акцепторная роль тРНК. Синтез аминокислот - тРНК как регуляторный механизм трансляции.
 42. Биосинтез РНК (транскрипция). Строение РНК - полимеразы. Зависимость локализации считываемого участка и направления считывания от структуры промотора. Этапы транскрипции. Посттранскрипционная модификация РНК. Процессинг и сплайсинг
 43. Аккумуляция и пути утилизации энергии в клетках. Вещества, влияющие на продукцию энергии - активаторы и ингибиторы
 44. Способы и механизмы трансмембранного транспорта веществ (диффузия обычная и облегченная, активный транспорт, экзо- и эндоцитоз, транспорт белков). Виды переносчиков.
 45. Молекулярные механизмы генетической изменчивости. Виды и причины мутаций, связь между мутагенными факторами и типом мутации. Частота мутаций. Роль хромосомных и геномных мутаций в формировании генотипа и фенотипа в ходе биологической эволюции. Генотипическая гетерогенность в популяции человека
 46. Система репарации и принципы ее деятельности. Нерепарируемые мутации и способы их коррекции, существующие в клетке.
 47. Наследственные болезни. Генетические и биохимические механизмы возникновения и развития наследственных болезней
 48. Особенности репликации вирусного генома. Повреждения и репарация ДНК. Интерфероны, их биологическое действие и применение в медицине
 49. Иммуитет и его виды. Компоненты иммунной системы. Роль лимфоцитов. Индукция разнообразия антител.
 50. Строение и функции антител, их роль в иммунитете. Трансплантационная несовместимость и пути снижения иммунологической толерантности
 51. Понятие об антивитаминах. Механизм действия лекарственных препаратов, созданных на их основе
 52. Общая характеристика и биологическое значение водорастворимых витаминов и витаминоподобных веществ
 53. Общая характеристика жирорастворимых витаминов и витаминоподобных веществ, их биологическое значение
 54. Структурная организация и свойства биологических мембран. Роль компонентов мембраны в обеспечении ее функций

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		


55. Характерные черты и категории метаболизма. Компартиментализация как способ организации живых систем. Уровни и принципы регуляции метаболизма
56. Биохимические основы сбалансированного питания. Основные компоненты пищи, их значение. Дистрофия и ожирение. Причины, проявления
57. Общие принципы организации и контроля метаболизма на клеточном и организменном уровне. Энергетика биохимических реакций, перенос энергии в клетках
58. Челночные механизмы и их роль в обеспечении бесперебойного функционирования и регуляции метаболических процессов. Важность существования пулов ключевых метаболитов и носителей энергии, их участие в запуске и контроле обмена веществ
59. Структура и функции дыхательной цепи. Роль дыхательной цепи в создании и поддержании протонного электрохимического градиента. Градиент как носитель энергии
60. Цикл Кребса: последовательность реакций, биохимическое значение, регуляция. Восстановительные эквиваленты как носитель энергии. Типы дегидрогеназ
61. Анаэробные реакции как способ регуляции скорости ЦТК и его сопряжения с другими метаболическими блоками
62. Взаимоотношение анаэробных и аэробных путей продукции энергии и его изменения в зависимости от степени обеспеченности тканей кислородом (эффект Пастера). Энергетическая ценность анаэробного и аэробного расщепления углеводов
63. Механизмы окислительного фосфорилирования, локализация пунктов фосфорилирования в дыхательной цепи, сопряжение и разобщение дыхания и фосфорилирования. Роль разобщения в холодной адаптации. Дыхательный контроль и коэффициент фосфорилирования
64. Механизмы анаэробного образования энергии из углеводов. Реакции гликогенолиза и гликолиза. Энергетический баланс и биологическое значение гликолиза
65. Гликолиз: последовательность реакций, регуляция. Общий путь катаболизма
66. Основные пути распада углеводов в тканях. Пентозофосфатный путь: реакции, взаимосвязь с гликолизом, биологические функции
67. Биосинтез углеводов в тканях. Реакции глюконеогенеза и гликогеногенеза, углеводные и неуглеводные источники для глюконеогенеза, взаимоотношение процессов синтеза и распада гликогена
68. Регуляция обмена углеводов в организме. Роль инсулина и контринсулярных гормонов (глюкагона, адреналина, тироксина, глюкокортикостероидов) в регуляции обмена углеводов. Гипо- и гипергликемия.
69. Гликогенозы, причины, сущность, проявления заболевания. Значение нарушений активности глюкозо-6-фосфатазы, кислой альфа-глюкозидазы, фосфорилазы, фосфоглюкомутаза, фосфофруктокиназы. Болезнь Гирке
70. Галактоземия, причины, сущность, проявления заболевания
71. Сахарный диабет: причины, типы, сущность нарушений углеводного, липидного, белкового обменов, принципы диагностики и лечения, осложнения
72. Общие принципы регуляции обмена аминокислот. Причины и проявления белковой недостаточности (квашиноркор).
73. Синтез, роль и функции биогенных аминов и медиаторов (серотонина, гистамина, адреналина, гамма-аминомасляной кислоты)

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

74. Биосинтез аминокислот: общие пути, индивидуальные различия
75. Катаболизм аминокислот: возможные пути расщепления углеродного скелета, утилизация аминного азота, радикалов
76. Обмен фенилаланина и тирозина. Фенилкетонурия: причины и сущность болезни
77. Пути обезвреживания аммиака в организме. Цикл мочевины
78. Общие пути обмена аминокислот. Значение реакции дезаминирования, трансаминирования и декарбоксилирования. Судьба альфа-кетокислот. Диагностическое значение активности трансаминаз в сыворотке крови
79. Факторы, определяющие состояние белкового обмена. Азотистый баланс. Парентеральное питание при нарушении обмена белков
80. Основные пути обмена белков, переваривание белков и всасывание продуктов их распада, биологическая ценность белков
81. Биосинтез и распад пуриновых нуклеотидов. Подагра, причины и сущность заболевания, принципы лечения
82. Биосинтез и распад пиримидиновых нуклеотидов: этапы, регуляция
83. Обмен одноуглеродных групп как способ изменения углеродного скелета при биосинтезе аминокислот и нуклеотидов
84. Классификация липидов, их химические свойства и биологические функции
85. Переваривание и всасывание липидов в ЖКТ, транспорт в кровотоке и через мембраны клеток. Депонирование и мобилизация триацилглицеролов в жировой ткани
86. Переваривание, всасывание и транспорт липидов. Классы липопротеинов, их состав и функции в транспорте липидов
87. Метаболизм сложных липидов. Наследственные болезни, связанные с нарушением катаболизма сложных липидов.
88. Биосинтез жирных кислот. Особенности синтеза ненасыщенных жирных кислот. Незаменимые жирные кислоты. Синтез длинноцепочечных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот.
89. окисление жирных кислот. Окисление ненасыщенных жирных кислот с четным и нечетным числом углеродных атомов. Наследственные болезни, связанные с нарушением окисления жирных кислот
90. Гормональная регуляция обмена липидов. Роль инсулина, глюкагона, адреналина
91. Причины и типы и гипо- и гиперлипидопроteinемий. Атеросклероз, этапы атерогенеза. Функции холестерина в организме человека. Основные направления в терапии атеросклероза. Профилактика атеросклероза
92. Синтез кетонных тел. Роль кетонных тел. Пути утилизации кетонных тел в периферических тканях. Биосинтез холестерина и его производных. Роль холестерина в организме
93. Роль кальция в процессах жизнедеятельности (участие в мышечном сокращении, передаче нервного импульса, в регуляции активности ферментов). Регуляция обмена кальция и фосфатов
94. Микросомальное (монооксигеназное) окисление: механизм, эндогенные и экзогенные субстраты окисления, роль в обеспечении обезвреживающей функции печени, индукторы и ингибиторы
95. Регуляция свободнорадикального окисления в клетках (естественные антиоксиданты), роль этих процессов в развитии заболеваний, применение антиоксидантов в медицине
96. Простагландины: биосинтез, влияние на обменные процессы и

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		


- физиологическую функцию внутренних органов, применение в медицине
97. Кровь: составные компоненты, основные функции (транспортная, осморегулирующая, буферная, иммунологическая, регуляторная, гемостатическая) и их характеристика
 98. Биохимические особенности клеток крови, обеспечивающие их специфические функции
 99. Характеристика белковых фракций крови. Причины гипер-, гипо- и диспротеинемий. Диагностическое значение изменений уровня специфических белков в плазме крови (трансферрина, церулоплазмينا и др.)
 100. Биосинтез и распад гемоглобина в организме. Причины и проявления гипохромных анемий. Патология обмена желчных пигментов (паренхиматозная, гемолитическая, и обтурационная желтуха)
 101. Буферные системы крови, нарушения кислотно-основного состояния (ацидоз и алкалоз), причины и проявления
 102. Механизмы, обеспечивающие кислородтранспортную функцию крови, и их нарушения при гемической гипоксии (отравление окисью углерода, метгемоглобинообразователями), генетические аномалии гемоглобина
 103. Современные представления о механизмах свертывания крови и фибринолиза. Причины и проявления гемофилий и тромбозов, принципы лечения
 104. Причины и следствия биохимических изменений соединительной ткани при старении и заболеваниях (коллагенозах).
 105. Строение и функции основных компонентов межклеточного матрикса (коллаген, эластин, гликозаминогликаны, протеогликаны, фибронектин). Принципы организации межклеточного матрикса
 106. Почка как инкреторный орган. Роль почек в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы и кроветворения
 107. Роль почек в поддержании осмотического давления, водно-электролитного баланса и кислотно-основного равновесия
 108. Общие свойства мочи (количество, цвет, плотность, реакция), изменения при патологии. Основные химические компоненты мочи, их возможные изменения при заболеваниях. Факторы, способствующие образованию мочевых камней
 109. Биохимические процессы, обеспечивающие мочеобразование. Регуляция мочеобразовательной функции. Нарушения мочеобразования, причины, проявления
 110. Характеристика основных функций почек (мочеобразовательная, регуляторно-гемостатическая, обезвреживающая, внутрисекреторная).
 111. Характеристика биохимических функций печени (регуляторно-гемостатическая, мочевинообразовательная, желчеобразовательная, экскреторная, обезвреживающая), принципы диагностики их нарушений
 112. Желчь, механизмы образования, основные компоненты. Причины образования желчных камней. Диагностические критерии обтурационной желтухи
 113. Биохимические механизмы обезвреживания лекарственных и токсических веществ в печени. Синтетические и несинтетические реакции. Роль процессов микросомального окисления
 114. Особенности метаболизма мышечной ткани
 115. Особенности химического состава мышечной ткани. Строение сократительных элементов (миозин, актин) и регуляторных белков (тропонин, тропомиозин).
 116. Современные представления о механизме мышечного сокращения
 117. Источники энергии для мышечного сокращения. Энергообеспечение мышечной работы при физических нагрузках различной интенсивности

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		


118. Особенности метаболизма нервной ткани (дыхания, энергетического обмена, обмена липидов, углеводов, белков и аминокислот). Биохимическая основа заболеваний нервной системы.
119. Особенности строения и химического состава нервной ткани (нейронов, нейроглии, микроглии, миелина).
120. Биохимические основы генерации и проведения нервных импульсов. Характеристика нейромедиаторного процесса и веществ, обладающих нейромедиаторными свойствами (синтез, депонирование, выброс в синаптическую щель, деградация, обратный захват нейромедиаторов)

10. САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Название разделов и тем	Вид самостоятельной работы	Объем в часах	Форма контроля
Энергетические процессы в живом организме	Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины. Подготовка к сдаче экзамена	10	включение вопросов на семинарах, тестировании, экзамене
Промежуточный обмен	Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины. Подготовка к сдаче экзамена	10	включение вопросов на семинарах, тестировании, экзамене
Метаболизм углеводов (1 часть)	Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины. Подготовка к сдаче экзамена	10	включение вопросов на семинарах, тестировании, экзамене
Метаболизм углеводов (2 часть)	Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины. Подготовка к сдаче экзамена	10	включение вопросов на семинарах, тестировании, экзамене

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Метаболизм липидов	Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины. Подготовка к сдаче экзамена	10	включение вопросов на семинарах, тестировании, экзамене
Метаболизм белков	Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины. Подготовка к сдаче экзамена	10	включение вопросов на семинарах, тестировании, экзамене
Строение и функции клеточной мембраны	Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины. Подготовка к сдаче экзамена	10	включение вопросов на семинарах, тестировании, экзамене
Нуклеиновые кислоты	Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины. Подготовка к сдаче экзамена	10	включение вопросов на семинарах, тестировании, экзамене
Интеграция клеточного обмена	Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины.	10	включение вопросов на семинарах, тестировании, экзамене

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

11. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

а) Список рекомендуемой литературы

Основная:

- Северин, Е. С. Биохимия: учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 768 с. - ISBN 978-5-9704-3762-9. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970437629.html>
- Комов, В. П. Биохимия : учебник для вузов / В. П. Комов, В. Н. Шведова ; под общей редакцией В. П. Комова. — 4-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2021. — 684 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-13939-6. — Текст : электронный // Образовательная платформа Юрайт [сайт]. — URL: <https://urait.ru/bcode/477904> .

Дополнительная

- Глухова, А. И. Биохимия с упражнениями и задачами : учебник / под ред. А. И. Глухова, Е. С. Северина - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2019. - 384 с. - ISBN 978-5-9704-5008-6. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970450086.html>
- Ершов, Ю. А. Биохимия : учебник и практикум для вузов / Ю. А. Ершов, Н. И. Зайцева ; под редакцией С. И. Щукина. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2021. — 323 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-07505-2. — Текст : электронный // Образовательная платформа Юрайт [сайт]. — URL: <https://urait.ru/bcode/469840> .
- Дрюк, В. Г. Биологическая химия : учебное пособие для вузов / В. Г. Дрюк, С. И. Скляр, В. Г. Карцев. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2021. — 292 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-12077-6. — Текст : электронный // Образовательная платформа Юрайт [сайт]. — URL: <https://urait.ru/bcode/474423>
- Еникеев, Э. Ш. Биологическая химия : учебное пособие / Э. Ш. Еникеев, М. А. Февралева; УлГУ, ИМЭиФК, Экол. фак. - Ульяновск : УлГУ, 2019. - Загл. с экрана. - Электрон. текстовые дан. (1 файл : 1,43 МБ). - Текст : электронный. <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Download/MObject/1385>

учебно-методическая


- Пантелеев, С. В. **Основы биохимии**: учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных и практических работ, а также самостоятельной работы студентов 3 курса экологического факультета направления подготовки бакалавриата 06.03.01 – Биология / С. В. Пантелеев; УлГУ, Экол. фак. - Ульяновск : УлГУ, 2019. - Неопубликованный ресурс; Загл. с экрана. - Электрон. текстовые дан. (1 файл : 1,97 МБ). - Текст : электронный. <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Download/MObject/7982>

Согласовано:

____ Специалист ведущий ____ / Мажукина С.Н. ____ / _____
 Должность сотрудника научной библиотеки ФИО подпись дата

б) программное обеспечение

- ОС MicrosoftWindows
- MicrosoftOffice 2016

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

3. «МойОфис Стандартный»

в) Профессиональные базы данных, информационно-справочные системы

1. Электронно-библиотечные системы:

1.1. Цифровой образовательный ресурс IPRsmart : электронно-библиотечная система : сайт / ООО Компания «Ай Пи Ар Медиа». - Саратов, [2024]. – URL: <http://www.iprbookshop.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

1.2. Образовательная платформа ЮРАЙТ : образовательный ресурс, электронная библиотека : сайт / ООО Электронное издательство «ЮРАЙТ». – Москва, [2024]. - URL: <https://urait.ru> . – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

1.3. База данных «Электронная библиотека технического ВУЗа (ЭБС «Консультант студента») : электронно-библиотечная система : сайт / ООО «Политехресурс». – Москва, [2024]. – URL: <https://www.studentlibrary.ru/cgi-bin/mb4x>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.4. Консультант врача. Электронная медицинская библиотека : база данных : сайт / ООО «Высшая школа организации и управления здравоохранением-Комплексный медицинский консалтинг». – Москва, [2024]. – URL: <https://www.rosmedlib.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.5. Большая медицинская библиотека : электронно-библиотечная система : сайт / ООО «Букап». – Томск, [2024]. – URL: <https://www.books-up.ru/ru/library/> . – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.6. ЭБС Лань : электронно-библиотечная система : сайт / ООО ЭБС «Лань». – Санкт-Петербург, [2024]. – URL: <https://e.lanbook.com>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.7. ЭБС Znanium.com : электронно-библиотечная система : сайт / ООО «Знаниум». - Москва, [2024]. - URL: <http://znanium.com> . – Режим доступа : для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

2. **КонсультантПлюс** [Электронный ресурс]: справочная правовая система. / ООО «Консультант Плюс» - Электрон. дан. - Москва : КонсультантПлюс, [2024].

3. **eLIBRARY.RU**: научная электронная библиотека : сайт / ООО «Научная Электронная Библиотека». – Москва, [2024]. – URL: <http://elibrary.ru>. – Режим доступа : для авториз. пользователей. – Текст : электронный

4. **Федеральная государственная информационная система «Национальная электронная библиотека»** : электронная библиотека : сайт / ФГБУ РГБ. – Москва, [2024]. – URL: <https://нэб.рф>. – Режим доступа : для пользователей научной библиотеки. – Текст : электронный.

5. **Российское образование** : федеральный портал / учредитель ФГАУ «ФИЦТО». – URL: <http://www.edu.ru>. – Текст : электронный.


6. **Электронная библиотечная система УлГУ** : модуль «Электронная библиотека» АБИС Мега-ПРО / ООО «Дата Экспресс». – URL: <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Web>. – Режим доступа : для пользователей научной библиотеки. – Текст : электронный.

Инженер ведущий



Щуренко Ю.В.

2024

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

12. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Учебная аудитория 340 для проведения практических занятий, групповых и индивидуальных консультаций, текущего контроля и промежуточной аттестации (с набором демонстрационного оборудования для обеспечения тематических иллюстраций в соответствии с рабочей программой дисциплины). Помещение укомплектовано специализированной мебелью на 18 посадочных мест и техническими средствами: экран настенный, доска аудиторная. Рабочее место преподавателя, WI-FI, интернет. Площадь 42,93 кв.м.

Учебная аудитория для самостоятельной работы студентов 230 с доступом к ЭБС. для самостоятельной работы студентов, Wi-Fi с доступом к ЭИОС, ЭБС. Компьютерный класс укомплектованный специализированной мебелью на 32 посадочных мест и техническими средствами обучения (16 персональных компьютеров) с доступом к сети «Интернет», ЭИОС, ЭБС. Площадь 93,51 кв.м.

Читальный зал научной библиотеки (аудитория 237) с зоной для самостоятельной работы, Wi-Fi с доступом к ЭИОС, ЭБС. Аудитория укомплектована специализированной мебелью на 80 посадочных мест и оснащена компьютерной техникой с доступом к сети «Интернет», ЭИОС, ЭБС, экраном и проектором. Площадь 220,39 кв.м.


13. СПЕЦИАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ С ОГРАНИЧЕННЫМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ ЗДОРОВЬЯ (ОВЗ) И ИНВАЛИДОВ

Обучающиеся с ОВЗ и инвалиды проходят практику совместно с другими обучающимися (в учебной группе) или индивидуально (по личному заявлению обучающегося).

Определение мест прохождения практики для обучающихся с ОВЗ и инвалидов осуществляется с учетом состояния здоровья и требований к их доступности для данной категории обучающихся. При определении мест и условий (с учётом нозологической группы и группы инвалидности обучающегося) прохождения учебной и производственной практик для данной категории лиц учитываются индивидуальные особенности обучающихся, а также рекомендации медико-социальной экспертизы, отраженные в индивидуальной программе реабилитации, относительно рекомендованных условий и видов труда.

При определении места практики для обучающихся с ОВЗ и инвалидов особое внимание уделяется безопасности труда и оснащению (оборудованию) рабочего места. Рабочие места на практику предоставляются профильной организацией в соответствии со следующими требованиями:

- для обучающихся с ОВЗ и инвалидов по зрению - слабовидящих: оснащение специального рабочего места общим и местным освещением, обеспечивающим беспрепятственное нахождение указанным лицом своего рабочего места и выполнение индивидуального задания; наличие видеувеличителей, луп;
- для обучающихся с ОВЗ и инвалидов по зрению - слепых: оснащение специального рабочего места тифлотехническими ориентирами и устройствами, с возможностью использования крупного рельефно-контрастного шрифта и шрифта Брайля, акустическими навигационными средствами, обеспечивающими беспрепятственное нахождение указанным лицом своего рабочего места и выполнение индивидуального задания;

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

– для обучающихся с **ОВЗ и инвалидов по слуху - слабослышащих**: оснащение (оборудование) специального рабочего места звукоусиливающей аппаратурой, телефонами для слабослышащих;

– для обучающихся с **ОВЗ и инвалидов по слуху - глухих**: оснащение специального рабочего места визуальными индикаторами, преобразующими звуковые сигналы в световые, речевые сигналы в текстовую бегущую строку, для беспрепятственного нахождения указанным лицом своего рабочего места и выполнения индивидуального задания;

– для обучающихся с **ОВЗ и инвалидов с нарушением функций опорно-двигательного аппарата**: оборудование, обеспечивающее реализацию эргономических принципов (максимально удобное для инвалида расположение элементов, составляющих рабочее место); механизмы и устройства, позволяющие изменять высоту и наклон рабочей поверхности, положение сиденья рабочего стула по высоте и наклону, угол наклона спинки рабочего стула; оснащение специальным сиденьем, обеспечивающим компенсацию усилия при вставании, специальными приспособлениями для управления и обслуживания этого оборудования.

Условия организации и прохождения практики, подготовки отчетных материалов, проведения текущего контроля и промежуточной аттестации по практике обеспечиваются в соответствии со следующими требованиями:

– Объем, темп, формы выполнения индивидуального задания на период практики устанавливаются индивидуально для каждого обучающегося указанных категорий. В зависимости от нозологии максимально снижаются противопоказанные (зрительные, звуковые, мышечные и др.) нагрузки.

– Учебные и учебно-методические материалы по практике представляются в различных формах так, чтобы обучающиеся с ОВЗ и инвалиды с нарушениями слуха получали информацию визуально (документация по практике печатается увеличенным шрифтом; предоставляются видеоматериалы и наглядные материалы по содержанию практики), с нарушениями зрения – аудиально (например, с использованием программ-синтезаторов речи) или с помощью тифлоинформационных устройств.

– Форма проведения текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации для обучающихся с ОВЗ и инвалидов устанавливается с учетом индивидуальных психофизических особенностей (устно, письменно, при помощи компьютера, в форме тестирования и т.п.). При необходимости обучающемуся предоставляется дополнительное время для подготовки ответа и (или) защиты отчета.

– в случае необходимости использования в учебном процессе частично/исключительно дистанционных образовательных технологий, организация работы ППС с обучающимися с ОВЗ и инвалидами предусматривается в электронной информационно-образовательной среде с учетом их индивидуальных психофизических особенностей.

Разработчик:



доцент О.Ю. Шроль