

Электронная цифровая подпись



Утверждено 29 августа 2024 г.
протокол № 8
председатель Ученого Совета Прохоренко И.О.
ученый секретарь Ученого Совета Бунькова Е.Б.

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

Год поступления 2024

1. Перечень компетенций и оценка их формирования в процессе освоения дисциплины

В результате освоения ОПОП обучающийся должен овладеть следующими результатами обучения по дисциплине(модулю): «Биологическая химия-биохимия полости рта»

№ п/п	Контролируемые разделы (темы) дисциплины (этапы формирования компетенций)	Код и наименование компетенции /Код и наименование индикатора достижения компетенции	Содержание компетенции/ индикатора достижения компетенции	Вопросы темы, проверяющие освоение компетенции/ индикатора достижения компетенции	№ Теста, проверяющего освоение компетенции/ индикатора достижения компетенции	№ Задачи, проверяющей освоение компетенции/ индикатора достижения компетенции	Наименование оценочного средства	Шкала оценивания
1	Строение, свойства и функции белков и аминокислот	иОПК 8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	1.Белки – основа жизни. Биологические функции белков. 2.Особенности протеиногенных аминокислот и их классификация. Незаменимые аминокислоты. 3.Уровни пространственной организации белков. 4.Физико-химические свойства белков. 5.Факторы стабильности белковых растворов. Изoeлектрическое состояние белка. 6.Реакции осаждения белков. Высаливание – метод выделения белков, применение в медицине. 7.Денатурация. Механизм, денатурирующие факторы. Использование денатурации в медицинской практике. 8.Классификация белков по химическому составу. Состав сложных белков, играющих важную роль в организме. 9.Строение и функционирование гемоглобина. 10.Строение и функции иммуноглобулинов.	1-4	1	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2

2	Ферменты	иОПК 8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1.Общая характеристика ферментов. Сходства и отличия ферментов и неорганических катализаторов. Свойства ферментов.</p> <p>2.Строение ферментов. Кофакторы и коферменты. Активный и аллостерический центры ферментов, их характеристика. Теории, объясняющие специфичность действия ферментов.</p> <p>3.Классификация и номенклатура ферментов. Примеры.</p> <p>4.Механизм действия ферментов. Что такое энергия активации и пути ее снижения?</p> <p>5.Кинетика ферментативных реакций. Кинетические константы Михаэлиса-Ментен (K_m) и максимальная скорость реакции (V_{max}).</p> <p>6.Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, фермента. Единицы активности ферментов. Влияние температуры и pH среды на активность ферментов.</p> <p>7.Регуляция активности ферментов. Виды ингибирования. Использование ингибиторов ферментов в качестве лекарственных средств.</p> <p>8.Активация ферментов: фосфорилирование-дефосфорилирование, частичный протеолиз, ассоциация-диссоциация протомеров, аллостерическая регуляция.</p> <p>9.Изоферменты. Изоформы ЛДГ и определение их активности в плазме крови с диагностическими целями.</p> <p>10.Применение ферментов в медицине. Энзимопатология, энзимодиагностика, энзимотерапия (примеры).</p>	5-8	2	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2
---	----------	----------	---	---	-----	---	---	--------------------------

3	Витамины	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1.Что такое витамины? Какова роль витаминов в организме? Свойства витаминов.</p> <p>2.Номенклатура и классификация витаминов. Примеры.</p> <p>3.Что такое витаминоподобные вещества? Примеры.</p> <p>4.Виды дисбаланса витаминов в организме. Экзогенные и эндогенные причины витаминной недостаточности.</p> <p>5.Антивитамины. Какие антивитамины можно использовать в качестве лекарств? Приведите примеры.</p> <p>6.Что такое витаминеры? Примеры. Что такое провитамины? Примеры.</p> <p>7.Что такое коферментные формы витаминов? Какие коферменты образуют витамины В₁, В₂, пантотеновая кислота, никотиновая кислота (или РР), В₆, В₉ (фолиевая кислота), В₁₂,Н?</p> <p>8.Витамин А. Биологическая роль. Клиническая картина гипо- и гипервитаминоза.</p> <p>9.Витамин D. Биологическая роль. Клиническая картина гипо- и гипервитаминоза.</p> <p>10.Витамин С. Биологическая роль. Клиническая картина гипо- и гипервитаминоза.</p>	9-11	3	Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2
4	Углеводы и липиды: строение, свойства, функции.	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и	<p>1.Общая характеристика углеводов. Классификация углеводов. Биологическая роль углеводов.</p> <p>2.Химическое строение моноз, входящих в состав углеводно-белковых комплексов.</p> <p>3.Типы связей в олиго- и полисахаридах.</p> <p>4.Липиды: определение, функции.</p> <p>5.Классификация липидов.</p> <p>6.Особенности строения и свойств высших жирных кислот.</p> <p>7.Химическое строение, свойства и</p>	12-14	4	Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа,	В соответствии с п.4.2.2

			методы.	<p>функции триацилглицеролов.</p> <p>8.Химическое строение, свойства и функции глицерофосфолипидов.</p> <p>9.Химическое строение, свойства и функции сфинголипидов.</p> <p>10.Химическое строение, свойства и функции стероидов.</p>			составление глоссария.	
5	Биологическая мембрана. Строение и функции. Транспорт веществ через мембрану. Передача сигнала в клетку.	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1.Функции биологических мембран. Строение биологических мембран</p> <p>2.Химический состав мембран. Особенности липидов мембран, их функции.</p> <p>3.Белки мембран и их функции.</p> <p>4.Свойства биологических мембран (замкнутость, асимметричность, динамичность, избирательная проницаемость мембран).</p> <p>5.Механизмы мембранного транспорта. Пассивный транспорт (диффузия). Простая диффузия, облегченная диффузия.</p> <p>6.Активный (энергозависимый) транспорт. Первично-активный транспорт и вторично-активный транспорт (натрий-калиевый насос, кальциевый насос, H⁺-АТФ-азопротонный насос).</p> <p>7.Виды переноса веществ через мембрану (унипорт, симпорт, антипорт).</p> <p>8.Экзоцитоз и эндоцитоз.</p> <p>9.Мембранные рецепторы. Строение G-белков.</p> <p>10.Образование вторичных посредников. Метаболические изменения в ответ на сигнальные молекулы.</p>	15-18	-	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2
6	Введение в обмен веществ. Биоэнергетика. Биологическое окисление	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические	<p>1.Этапы обмена веществ. Поступление веществ в организм. Нутрициология. Основные питательные вещества. Заменяемые и незаменимые нутриенты.</p> <p>2.Второй этап обмена веществ – метаболизм. Катаболизм и анаболизм – два типа реакций внутриклеточного метаболизма.</p>	19-22	5	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая	В соответствии с п.4.2.2

			и естественнонаучные понятия и методы.	<p>3.Биоэнергетика. Превращение солнечной энергии в живых системах.</p> <p>4.Макроэргические соединения. Пути биосинтеза АТФ в живой природе.</p> <p>5.Биологическое окисление и его виды. Этапы энергетического биологического окисления. Специфические пути превращения веществ в организме человека.</p> <p>6.Общие пути катаболизма. Окислительное декарбоксилирование пирувата (ОДП).</p> <p>7.Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса). Биохимические функции цикла Кребса. Связь цикла с ЦПЭ.</p> <p>8.Дыхательная цепь митохондрий и ее важнейшие компоненты. Окислительное фосфорилирование.</p> <p>9.Свободное биологическое окисление. Микросомальное окисление, функции.</p> <p>10.Переокисное окисление липидов. Образование активных форм кислорода. Ферментативная и неферментативная системы антиоксидантной защиты.</p>			<p>работа, контрольная работа, составление глоссария.</p>	
7	Обмен углеводов	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1.Переваривание углеводов. Особенности переваривания углеводов в ротовой полости, в тонкой кишке. Пристеночное пищеварение.</p> <p>2.Содержание глюкозы в крови в норме, алиментарная гиперглюкоземия.</p> <p>3.Механизм поступления глюкозы из крови в ткани. Влияние инсулина на поступление глюкозы в мышечную и жировую ткани.</p> <p>4.Реакция фосфорилирования глюкозы в клетках, биологическая роль. Пути использования глюкозо-6-фосфата в клетках.</p> <p>5.Синтез и мобилизация гликогена. Гликогенозы, типы, примеры.</p> <p>6.Пути катаболизма глюкозы. Анаэробный гликолиз. Аэробный распад глюкозы до CO₂ и H₂O. Конечные продукты,</p>	23-25	6	<p>Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.</p>	В соответствии с п.4.2.2

				<p>локализация процессов, биологическая роль.</p> <p>7. Глюконеогенез как часть цикла Кори. Локализация, биологическая роль.</p> <p>8. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы. Локализация процесса, биологическая роль.</p> <p>9. Патология углеводного обмена: сахарный диабет.</p> <p>10. Гормональная регуляция уровня глюкозы в крови.</p>				
8	Обмен липидов	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1. Условия переваривания экзогенных жиров. Эмульгирование жира. Желчные кислоты, их функции.</p> <p>2. Переваривание липидов. Всасывание продуктов гидролиза. Энтерогепатическая циркуляция желчных кислот.</p> <p>3. Синтез жира, и других липидов в стенке кишечника.</p> <p>4. Формирование транспортных форм экзогенных липидов. Строение и состав липопротеинов плазмы крови. Атерогенные и антиатерогенные классы липопротеинов плазмы крови.</p> <p>5. Мобилизация жиров при физической нагрузке, стрессе и длительном голодании.</p> <p>6. β-окисление жирных кислот в митохондриях.</p> <p>7. Превращения глицерина в тканях.</p> <p>8. Обмен ацетилкоэнзима А. Синтез кетонных тел.</p> <p>9. Обмен холестерина. Строение холестерина, биологические функции холестерина.</p> <p>10. Нарушения обмена холестерина. Желчнокаменная болезнь, гиперхолестеролемиа. Механизм развития атеросклероза.</p>	26-29	1	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2

9	Обмен белков и аминокислот	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1. Норма белков в питании. Биологическая ценность белков. Азотистый баланс, его виды.</p> <p>2. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Гниение белков в кишечнике и образование ядовитых продуктов, их обезвреживание.</p> <p>3. Превращение аминокислот по α-аминогруппе. Трансаминирование и его биологическая роль.</p> <p>4. Деаминация аминокислот, его типы.</p> <p>5. Непрямое окислительное деаминация – основной путь деаминации α-аминокислот.</p> <p>6. Пути образования аммиака и его токсичность. Пути обезвреживания аммиака.</p> <p>7. Биосинтез мочевины. Локализация процесса, функции орнитинового цикла. Гипераммониемия.</p> <p>8. Превращение углеродных скелетов аминокислот в общих путях катаболизма (ОПК).</p> <p>9. Декарбоксилирование аминокислот. Биогенные амины. Синтез, биологическая роль.</p> <p>10. Обмен фенилаланина и тирозина. Нарушения их обмена.</p>	30-33	2	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2
10	Обмен нуклеотидов. Матричные биосинтезы	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1. Схема гидролиза нуклеиновых кислот, ферменты.</p> <p>2. Катаболизм пиримидиновых азотистых оснований.</p> <p>3. Превращения пуриновых азотистых оснований в мочевую кислоту. Нарушения метаболизма пуринов. Гиперурикемия, подагра, принципы лечения.</p> <p>4. Особенности структурно-функциональной организации нуклеиновых кислот.</p> <p>5. Репликация ДНК. Деграция и репарация ДНК.</p> <p>6. Транскрипция: промоторы, терминаторы.</p>	34-36	3	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2

				<p>7. ДНК-зависимая РНК-полимераза. Процессинг РНК. Малые ядерные РНК, их биологическая роль.</p> <p>8. Синтез белка (трансляция). Генетический код.</p> <p>9. Этапы синтеза белка (инициация, элонгация, терминация).</p> <p>10. Посттрансляционная модификация. Фолдинг. Ковалентные преобразования радикалов аминокислот.</p>				
11	Биохимия крови	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1. Функции крови. Химический состав крови.</p> <p>2. Белки плазмы крови и их функции. Фракционирование белков плазмы крови.</p> <p>3. Белки острой фазы воспаления.</p> <p>4. Ферменты плазмы (сыворотки) крови (секреторные, экскреторные, индикаторные).</p> <p>5. Небелковые органические и основные неорганические компоненты плазмы.</p> <p>6. Кислотно-основное состояние и буферные системы крови. Нарушения кислотно-основного состояния.</p> <p>7. Система гемостаза: сосудисто-тромбоцитарный, роль тромбоцитов в механизмах гемостаза, коагуляционный гемостаз (ферментный процесс)</p> <p>8. Противосвертывающие механизмы. Фибринолиз.</p> <p>9. Распад гемоглобина в тканях: образование и обезвреживание билирубина.</p> <p>10. Общие представления о желтухе и ее вариантах.</p>	37-40	4	Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2

12	Гормоны и гормональная регуляция метаболических процессов	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1.Общая характеристика. Биологические свойства гормонов. Номенклатура и классификация гормонов.</p> <p>2.Пути действия гормонов (классический – эндокринный, паракринный, аутокринный).</p> <p>3.Образование и созревание гормонов.</p> <p>4.Иерархия регуляторных систем организма. Схема взаимосвязи регуляторных систем организма.</p> <p>5.Биотрансформация гормонов в организме.</p> <p>6.Молекулярные механизмы действия гормонов. Транс-мембранный и цитозольный механизмы действия гормонов.</p> <p>7.Регуляция обмена углеводов, липидов и аминокислот.</p> <p>8.Регуляция метаболизма основных энергетических субстратов.</p> <p>9.Регуляция водно-солевого обмена, нарушения водно-солевого обмена.</p> <p>10.Регуляция обмена кальция и фосфатов.</p>	41-44	5	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2
13	Биохимия нервной и мышечной ткани	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1Химический состав нервной ткани.</p> <p>2.Энергетический обмен в нервной ткани.</p> <p>3.Биохимия возникновения и проведение нервного импульса.</p> <p>4.Медиаторы: ацетилхолин, катехоламины, серотонин, гамма-аминомасляная кислота, глутаминовая кислота, глицин, гистамин.</p> <p>5.Белки миофибрилл, молекулярная структура: миозин, актин, актомиозин, тропомиозин, тропонин.</p> <p>6.Биохимические механизмы мышечного сокращения и расслабления.</p> <p>7.Особенности энергетического обмена в мышцах; креатинфосфат.</p> <p>8.Биохимические изменения при мышечных дистрофиях и денервации мышц.</p> <p>9.Креатинурия.</p> <p>10.Особенности метаболизма</p>	45-48	6	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2

				ишемизированного миокарда.				
14	Биохимия соединительной ткани	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	1.Общая характеристика соединительной ткани. Функции соединительной ткани. 2.Состав основного вещества соединительной ткани. 3.Гликозаминогликаны. Особенности строения, структура и распределение в организме основных классов гликозаминогликанов. 4.Синтез и катаболизм гликозаминогликанов. 5.Протеогликаны, состав, строение. Отличия от гликопротеинов. 6.Гликопротеины, состав, строение, функции. 7.Фибриллярные белки внеклеточного матрикса. Коллаген: особенности строения, виды, свойства. 8.Синтез и деградация коллагена. 9.Эластин: особенности строения, свойства, синтез и деградация. 10.Адгезивные белки внеклеточного матрикса: фибронектин, ламинин, нидоген.	49-52	1,2	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2
15	Биохимия тканей полости рта. Биохимические механизмы патологии тканей полости рта. Механизмы защиты эмали	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	1.Минерализованные ткани зуба. Состав минерализованных тканей зуба. 2.Химический состав эмали зуба. Характеристика минеральной основы эмали зуба. Влияние состава апатитов на свойства эмали. 3. Фтор: биологическая роль, источники, потребность. 4 Органические вещества эмали. Белки эмали: содержание, особенности строения, локализация, роль в процессе минерализации эмали. 5. Особенности химического состава и роль дентина. 6. Особенности химического состава и строения цемента. Роль цемента зуба. 7. Поверхностные образования на зубах: кутикула, пелликула. Формирование	53-56	3,4	Устный ответ, стандартизованный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2

				<p>приобретенной пелликулы из гликопротеинов слюны.</p> <p>8. Состав зубного налета. Образование зубного налета. Зубной налет и развитие кариеса.</p> <p>9. Зубной камень. Механизм образования. Состав и виды зубного камня.</p> <p>10. Современные представления о возникновении и развитии кариеса. Меры профилактики кариеса в стоматологической практике.</p>				
16	Биохимия ротовой жидкости	иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы.	<p>1 Биохимия ротовой жидкости: состав, источники секрета, физико-химические параметры слюны. Функции смешанной слюны.</p> <p>2. Неорганические компоненты смешанной слюны. Кальций и фосфаты. Мицеллы слюны.</p> <p>3. pH ротовой жидкости, системы стабилизации Патогенетическое значение сдвига pH в формировании заболеваний зубочелюстной области. Причины ацидоза ротовой полости.</p> <p>4. Органические компоненты смешанной слюны Белки смешанной слюны. Полифункциональность белков слюны. Муцины слюны.</p> <p>5. Специфические слюнные белки: белки богатые пролином, гистатины, статхерины. Группоспецифические белки.</p> <p>6. Ферменты слюны (гликозидазы различного происхождения, протеазы, гиалуронидаза, кислая и щелочная фосфатазы).</p> <p>7. Защитные системы полости рта (лизоцим, пероксидаза, лактоферрин).</p> <p>8. Ферментативная защита тканей ротовой полости от повреждающего действия активных форм кислорода Иммуноглобулины слюны. Структура и</p>	57-60	5,6	Проведение круглого стола. Устный ответ, стандартизированный тестовый контроль, лабораторная работа/ практическая работа, контрольная работа, составление глоссария.	В соответствии с п.4.2.2

				<p>особенности секреторного иммуноглобулина А (SIgA).</p> <p>9.Биологически активные вещества слюны: фактор роста нервов (ФРН), фактор роста эпителия (ФРЭ), паротин, инсулиноподобный белок и др.</p> <p>10.Биохимия десневой жидкости: состав, функции.</p> <p>11.Саливадиагностика</p>				
--	--	--	--	---	--	--	--	--

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

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

- стандартизированный тестовый контроль по темам изучаемой дисциплины;

- выполнение лабораторной работы/ практической работы

-выполнение контрольной работы,

- составление глоссария

- иные формы контроля, определяемые преподавателем

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

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

2.1.1. Лабораторные работы (практические работы) по темам дисциплины

Тема 1. Строение, свойства и функции белков и аминокислот

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

Работа 1. **Цветные реакции на белки**

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

Цветные реакции можно разделить на два типа:

1. Универсальные – биуретовая (на все белки и пептиды) и нингидриновая (на все α-аминокислоты и белки);

2. Специфические – только на определённые аминокислоты в белках и растворах аминокислот (реакции ксантопротеиновая, Фоля, Адамкевича и др.)

А. Биуретовая реакция на пептидную группу (реакция Пиотровского)

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



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

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

Результат:

Вывод:

Б. Нингидриновая реакция

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



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



Ход работы.

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

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

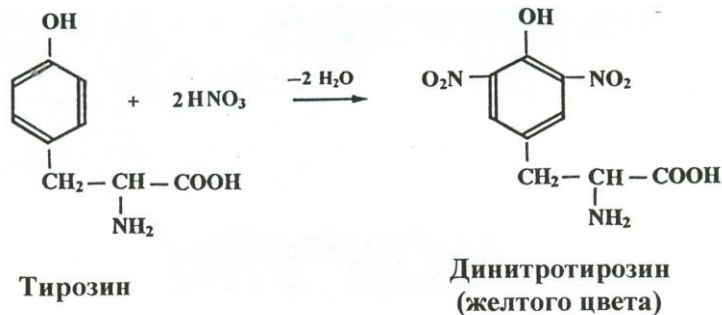
Результат:

Вывод

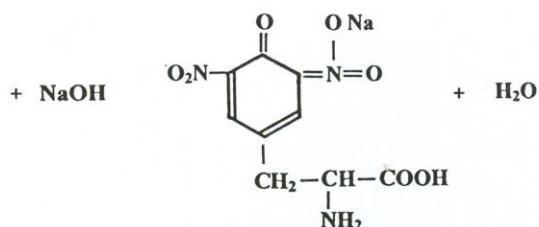
В. Ксантопротеиновая реакция (реакция Мульдера)

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

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



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



**Натриевая соль
динитротирозина
(оранжевого цвета)**

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

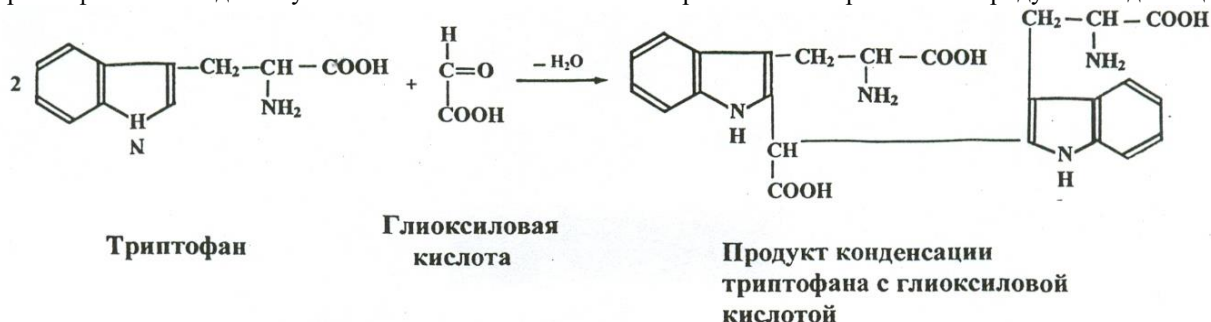
Результат:

Вывод:

Г. Реакция Адамкевича

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

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



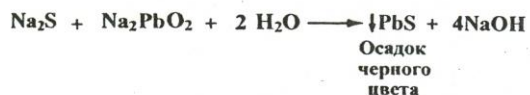
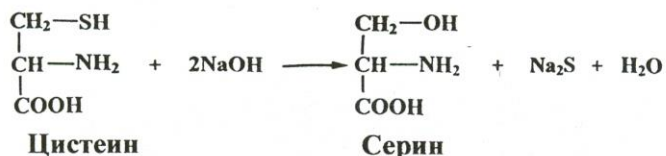
Ход работы. Наливают в пробирку несколько капель раствора белка, прибавляют 5 капель ледяной уксусной кислоты. Раствор сначала слегка нагреть, затем **охладить(!!!)** и **осторожно (!)** по стенке пробирки, чтобы жидкости не смешивались (подслаивание), прилить 10 капель концентрированной серной кислоты.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

Результат:

Вывод:

Д. Реакция Фоля

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



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

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

Результат:

Вывод:

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

Работа 2. Реакции осаждения белков

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

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

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

А. Высаливание белков сульфатом аммония

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

Ход работы. К 1 мл сыворотки крови добавляют 1 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают (получается полунасыщенный раствор сульфата аммония). Выпадает осадок глобулинов. Через 5 мин осадок отфильтровывают. В фильтрате остается другая фракция – альбумины. К фильтрату

добавляют тонко измельченный порошок сульфата аммония до полного насыщения, т.е. пока новая порция порошка остается нерастворенной. В осадок выпадают альбумины. Их отфильтровывают. Проверяют фильтрат на отсутствие белка с помощью биуретовой реакции.

Результат:

Вывод:

Б. Денатурация белков

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

Денатурирующие факторы делятся на химические, физические и биологические. Наиболее обширны группы химических факторов (концентрированные минеральные и органические кислоты, соли тяжёлых металлов, алкалоиды, поверхностно-активные вещества и т. д.) и физических факторов (высокая температура, различные виды ионизирующего излучения – УФ-, γ -, рентгеновские лучи, потоки α - и β -частиц, ускоренных электронов, протонов, продукты деления тяжёлых ядер ит.д., лазерные излучения, действие СВЧ – полей, ультразвук, вибрация, шум и т.д.). Биологическую денатурацию осуществляют протеолитические ферменты, которые разрушают высшие уровни организации молекулы белка перед тем, как гидролизовать пептидные связи.

1) Осаждение белков при нагревании

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

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

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

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

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

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

Реакция среды	Нейтральная	Слабокислая	Сильнокислая	Сильнокислая с электролитом	Щелочная
Результат					
Вывод					

2) Осаждение белков концентрированной азотной кислотой (проба Геллера)

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

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

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

На границе двух жидкостей образуется осадок в виде белого кольца.

Результат:

Вывод:

3) Осаждение белков органическими кислотами

Органические кислоты также вызывают необратимое осаждение белков. Практическое применение получили трихлоруксусная CCl_3COOH и сульфосалициловая $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{COOH})\text{SO}_3\text{H}$, кислоты. Сульфосалициловой кислотой пользуются в клинике при обнаружении малых количеств белка в моче, экссудатах и других биологических жидкостях, так как проба с этой кислотой является самой чувствительной (0,0015%) из всех «осадочных» реакций на белки. Трихлоруксусной кислотой пользуются для удаления белков из растворов перед определением в биологическом материале низкомолекулярных соединений. Эту кислоту можно также использовать для денатурации ферментов в целях прекращения ферментативной реакции.

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

Результат:

Вывод:

4) Осаждение белков солями тяжелых металлов

Принцип метода. Соли тяжелых металлов (свинца, меди серебра, ртути и др.) вызывают необратимое осаждение белков, т.е. денатурацию, при небольших концентрациях этих солей. При этом происходит связывание ионов тяжелых металлов с функциональными группами боковых радикалов аминокислот в молекуле белка, в результате чего разрушается ее пространственная структура и происходит осаждение денатурированного белка. При добавлении избытка солей тяжелых металлов (кроме AgNO_3 и HgCl_2) происходит растворение первоначально образующегося осадка из-за адсорбции иона металла и приобретения вследствие этого белковой молекулой положительного заряда.

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

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

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

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

Результат:

Вывод:

Тема 2. Ферменты

Работа 1. Зависимость скорости ферментативных реакций от температуры.

Влияние pH на активность ферментов. Специфичность действия ферментов.

Оснащение.

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

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

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

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

Работа 1А. Зависимость скорости реакции от температуры.

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

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

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

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

Фермент	Субстрат	Окрашивание с йодом	Температура

Вывод:

Работа 1Б. Зависимость скорости ферментативной реакции от pH среды.

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

Ход работы. В пять пробирок отмеривают по 10 капель растворов фосфатно-цитратного буфера со следующими значениями pH: 5,6; 6,4; 6,8; 7,2; 8,0. Прибавляют во все пробы по 5 капель разведенной в 10 раз слюны и по 10 капель раствора крахмала и ставят пробирки в водяную баню при 38°C . Через 10 мин пробирки вынимают и приливают по 1 капле раствора йода в иодиде калия. Сравнивают развивающуюся окраску.

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

Фермент	Субстрат	Окрашивание с йодом	pH среды

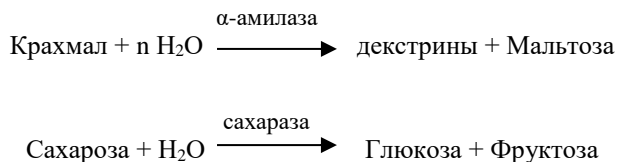
Вывод:

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

Работа 1В. Специфичность действия амилазы и сахаразы.

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

Ферменты катализируют реакции по схеме:



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

Для выявления специфичности сахаразы в одну пробирку наливают 10 капель раствора крахмала, а в другую – сахарозы и прибавляют к ним по 5 капель экстракта сахаразы дрожжей. Пробы перемешивают встряхиванием и помещают в водяную баню при 38°C на 10 мин, после чего с жидкостью обеих пробирок

проделявают пробу с реактивом Феллинга. Отмечают появление в одной из проб красного осадка оксида меди (I).

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

Фермент	Субстрат	Проба с реактивом Феллинга	Специфичность действия

Вывод:

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

Работа 2. Регуляция активности ферментов

Оснащение занятия

Реактивы:

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

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

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

Мышечная кашка, полученная после забоя животного.

Работа 2А. Активаторы и ингибиторы α -амилазы слюны

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

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

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

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

Фермент	Модификатор активности	Субстрат	Окрашивание с йодом

Вывод:

Работа 2Б. Действие конкурентного ингибитора на сукцинатдегидрогеназу мышечной ткани

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

Образующийся ФАД·Н₂ восстанавливает метиленовую синь (МС·Н₂), в результате чего происходит обесцвечивание раствора. Сравнивая визуально уменьшение интенсивности синего окрашивания с пробами, содержащими разные количества малоновой кислоты (НООС-СН₂-СООН), делают вывод о типе действия её на фермент.

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

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

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

Результат:

Вывод:

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

Работа 3. Количественное определение активности амилазы слюны по Вольгемуту

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

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

В норме амилазная активность слюны составляет 320-640 ед.

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

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

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

Оформление работы. Работу необходимо оформить в виде таблицы.

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

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

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

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

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

Следовательно, амилазная активность слюны равна 320 условным единицам

Результат:

Вывод:

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

Тема 3. Витамины

Работа . Водорастворимые витамины

Работа 1А. Обнаружение тиамин (витамина В₁)

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

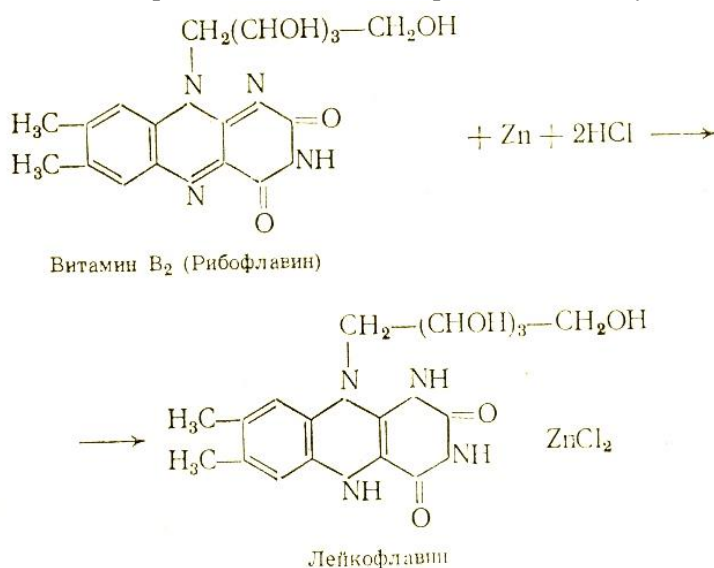
Ход работы. В пробирку вносят 5 капель раствора сульфаниловой кислоты и прибавляют 5 капель раствора нитрита натрия. К полученному диазореактиву добавляют на кончике скальпеля порошок тиамин и 5 капель раствора карбоната натрия. Встряхивают. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Результат:

Вывод:

Работа 1Б. Качественная реакция на рибофлавин (витамин В₂)

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



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

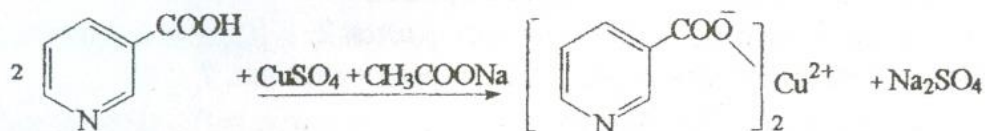
Результат:

Вывод:

Работа 1В. Качественные реакции на никотиновую кислоту (витамин РР, В₃)

а) реакция образования никотината меди (II)

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

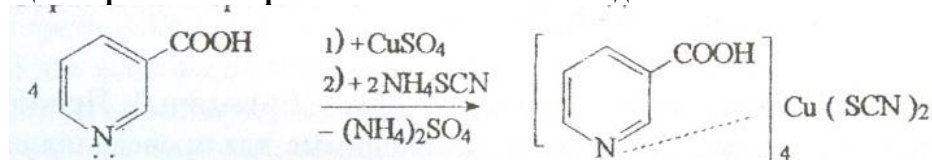


Ход работы. 0,02 г никотиновой кислоты растворяют в 2 – 3 мл горячей воды, добавляют 0,5 мл 10%-ного раствора ацетата натрия (CH₃COONa) и 0,5 мл 10%-ного раствора сульфата меди(II). При постепенном охлаждении раствора выпадает осадок сине-голубого цвета.

Результат:

Вывод:

б) реакция образования тройного комплексного соединения



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

Результат:

Вывод:

Работа 1Г. **Феррихлоридная проба на витамин пиридоксин (витамин В₆).**

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

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

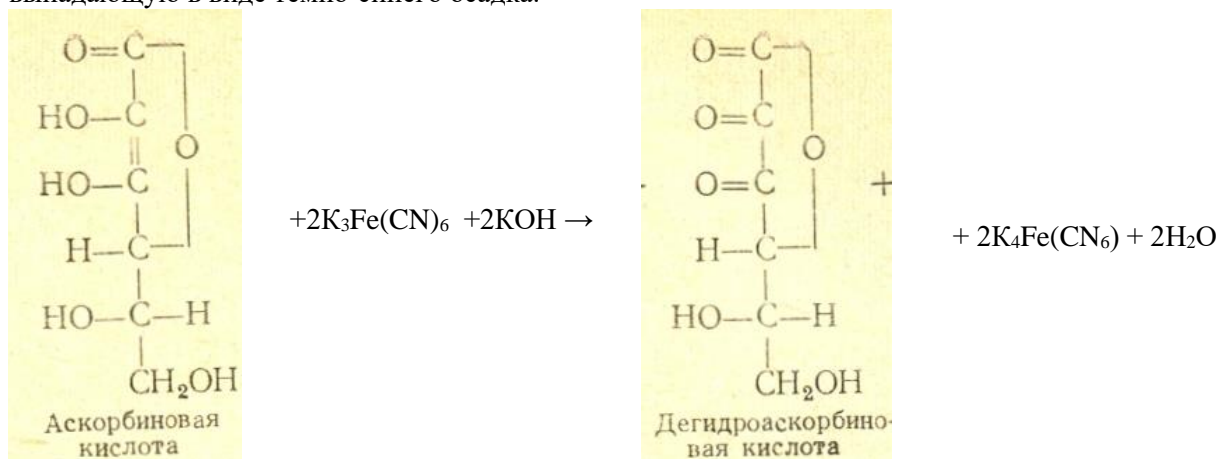
Результат:

Вывод:

Работа 1Д. **Качественные реакции на витамин С.**

а) Восстановление феррицианида калия витамином С.

Метод основан на способности аскорбиновой кислоты легко окисляться и восстанавливать железосинеродистый калий K₃Fe(CN)₆ в железистосинеродистый калий K₄Fe(CN)₆, который образует с хлоридом железа (III) плохо растворимую в воде соль – берлинскую лазурь, выпадающую в виде темно-синего осадка.



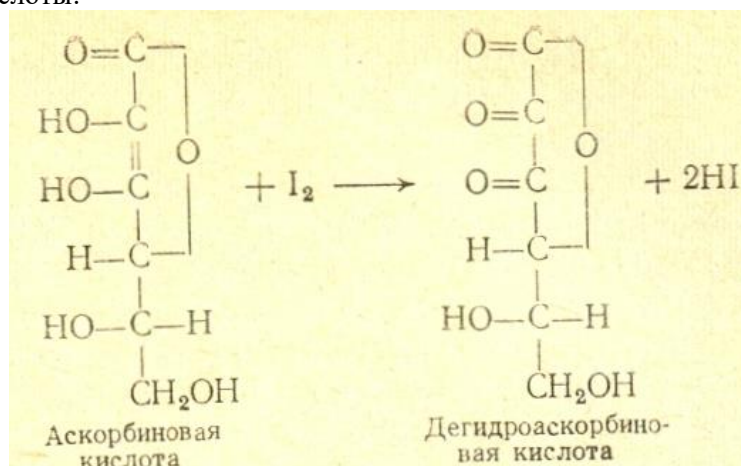
Ход определения. К 5 каплям 1%-ного раствора витамина С притлить 1 каплю 10%-ного раствора едкого натра и 1 каплю 5%-ного раствора железосинеродистого калия, перемешать и добавить 3 капли 10%-ного раствора соляной кислоты и 1 каплю 1%-ного раствора хлорида железа (III). Выпадает синий осадок берлинской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

Результат;

Вывод:

б) Йодная проба на витамин С.

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



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

Результат:

Вывод:

в) восстановление 2,6-дихлорфенолиндофенола витамином С

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

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

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

Результат:

Вывод:

Работа 1Е. Реакция на витамин Р (рутин).

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

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

Результат:

Вывод:

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

Работа 2. Жирорастворимые витамины

Работа 2А. Качественные реакции на ретинол (витамин А)

а) реакция с серной кислотой.

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

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

Результат:

Вывод:

б) реакция с хлоридом железа (III).

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

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

Результат:

Вывод:

Работа 2Б Качественные реакции на витамин D.

а) анилиновая проба на витамин D.

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

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

Результат:

Вывод:

б) реакция с серной кислотой.

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

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

Результат:

Вывод:

Работа 2В. Качественная реакция на токоферол (витамин E).

а) реакция с азотной кислотой

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

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

Результат:

Вывод:

б) реакция с хлорным железом

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

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

Результат:

Вывод:

Работа 2Г. Качественная реакция на нафтохинон (витамин K).

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

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

Результат:

Вывод:

Работа 5. Качественные реакции на метинон и викасол (искусственно синтезированные аналоги витамина K₁).

а) реакция на метинон.

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

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

Результат:

Вывод:**б) реакция на викасол.**

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

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

Результат:**Вывод:**

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

Тема 4. Углеводы и липиды: строение, свойства, функции**Работа 1. Эмульгирование жира**

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

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

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

Ход работы:

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

Результат:**Вывод:****Работа 2. Обнаружение желчных кислот**

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

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

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

Ход работы:

1. В первую пробирку налить 8-9 мл желчи, в другую – 0,5 мл желчи и 7-8 мл дистиллированной воды, в третью – только 8-9 мл воды.
2. Нанести на поверхность жидкости всех пробирок небольшое количество порошка серного цвета (или талька).

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

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

Результат:**Вывод:****Тема 6. Введение в обмен веществ. Биоэнергетика. Биологическое окисление.****Обнаружение ферментов биологического окисления
в некоторых биологических объектах.**

Оснащение занятия:

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

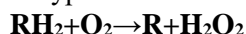
Оборудование. Ступка с пестиком; воронка для фильтрования; штатив с пробирками; пипетки на 1 мл; глазные пипетки; водяная баня; аптечные весы с разновесами; термостат.

Материал. Картофель, хрен, молоко, печень.

Работа 1. Обнаружение тирозиназы (оксидазы) в картофеле

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

Схематически реакция иллюстрируется уравнением:

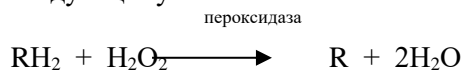


Ход работы. Мелкоизмельчённый картофель в количестве 0,5-1,0 г растирают в ступке с 3 мл дистиллированной воды и фильтруют. Фильтрат, содержащий фермент тирозиназу, наливают по 1 мл в две пробирки. Содержимое одной пробирки кипятят, а затем охлаждают (контроль). В обе пробирки наливают по 10 капель 0,1%-ного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

Результат:

Вывод:**Работа 2. Изучение свойств пероксидазы**

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

**А) Обнаружение пероксидазы в вытяжке из хрена**

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

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

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

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

Результат:

Вывод:**Б) Обнаружение пероксидазы молока пробой с йодистым калием**

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

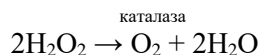
водорода с выделением активного кислорода, который окисляет йодистый калий. В результате образуется свободный йод, окрашивающий крахмал в синий цвет.

Результат:

Вывод:

Работа 3. Обнаружение каталазы в тканях печени

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



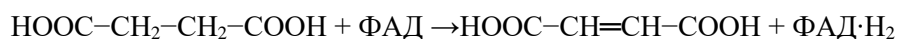
Ход работы. В пробирку помещают содержимое 0,3-0,5 г сырой печени, добавляют 10 мл воды и содержимое перемешивают. Затем быстро наливают раствор перекиси водорода до верха пробирки и быстро подносят к пробирке тлеющую лучинку. Разгорание лучинки указывает на выделение кислорода.

Результат:

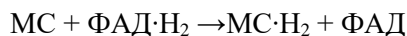
Вывод:

Работа 4. Обнаружение сукцинатдегидрогеназы в тканях печени (мышц)

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



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



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

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

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

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

Результат:

Вывод:

Тема 7. Обмен углеводов.

Работа 1. Определение концентрации глюкозы в биологических жидкостях

Методы определения глюкозы в биологических жидкостях:

1 группа - энзиматические методы, основанные на двух реакциях: глюкозооксидазной и гексокиназной. Являются наиболее специфичными и точными методами, позволяют определить только глюкозу;

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

3 группа - методы «сухой химии». Для этого используются специальные тест - полоски, на которые нанесены реагенты, по изменению окраски которых судят о степени глюкозурии.

Позволяют определить со-держание глюкозы в моче в домашних условиях и входят в систему

методов Home-diagnostic,

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

Определение концентрации глюкозы в крови глюкозооксидазным методом

Принцип метода

β -D-глюкоза + O_2 + H_2O глюкозооксидаза \rightarrow глюконовая кислота + H_2O_2

$2 H_2O_2$ + 4-ААР + фенол пероксидаза \rightarrow хинонимин + $4 H_2O$

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

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

Объект исследования и реагенты: цельная кровь, сыворотка или плазма крови, набор реагентов для определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях энзиматическим колориметрическим методом.

Состав набора:

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

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

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

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

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

Полученный рабочий реагент можно хранить при температуре ($+2-8^\circ C$) в посуде из темного стекла не более 5 дней при условии достаточной герметизации.

Ход работы:

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

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

2. Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 25 мин при комнатной температуре ($+18-25^\circ C$) или в течение 15 мин при температуре $+37^\circ C$.

3. После окончания инкубации измерить величину оптической плотности опытной и

калибровочной проб против контрольной (холостой) про-бы в кюветах с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 500 (490–540) нм.

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

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

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

C — концентрация глюкозы, ммоль/л;

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

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

10 — концентрация глюкозы в калибраторе, ммоль/л.

Референтные величины для сыворотки или плазмы крови:

- новорожденные – 1,7-3,3 ммоль/л;

- дети – 3,3-5,6 ммоль/л;

- взрослые – 4,1-5,9 ммоль/л.

Диагностическое значение: выявление эндокринных нарушений, заболеваний поджелудочной железы.

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

Результат:

Вывод:

Работа 2 Определение концентрации молочной кислоты

Принцип метода:

Молочная кислота + O₂ лактатоксидаза → пируват + 2 H₂O₂;

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

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

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

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

Состав набора:

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

Рiрес – 50 ммоль/л;

4-хлорфенол – 6 ммоль/л.

2. Раствор ферментов

аминокантипирин – 0,4 ммоль/л;

Лактатоксидаза > 200 МЕ/л;

Пероксидаза > 2 000 МЕ/л;

3. Калибратор – 3,34 ммоль/л.

Ход работы:

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

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

Внести в пробирки	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Холостая про-ба, мл
Рабочий реагент	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
Исследуемый образец	20 мкл	-	-
Калибратор	-	20 мкл	-
Дистиллированная вода	-	-	20 мкл

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

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

5. Произвести расчет по формуле:

а) в сыворотке (плазме) крови, ликворе –

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

б) в суточной моче–

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

V –объем суточной мочи

Референтные величины:

венозная кровь – 0,5-2,2 ммоль/л;

артериальная кровь – 0,5-1,6 ммоль/л;

моча суточная – 5,5-22,0 ммоль/сутки;

ликвор – 1,1-2,4 ммоль/л.

Диагностическое значение: отражение степени гипоксии тканей.

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

Результат:

Вывод:

Тема № 8 Обмен липидов

Работа 1. Определение липидограммы

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

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

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

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

Принцип метода:

Триглицериды — липаза → глицерин + жирные кислоты;

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

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

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

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

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

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

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

Состав набора:

Реагент 1:

PIPES – 50 ммоль/л;

4-хлорфенол – 5 ммоль/л;

MgSO₄ – 1 ммоль/л;

4-ААП – 0,5 ммоль/л.

Реагент 2:

Липаза – 1500 МЕ/л;

Глицерокиназа – 200 МЕ/л;

Пероксидаза – 250 МЕ/л

Калибратор: глицерин – 2,29 ммоль/л.

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

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

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

Ход работы:

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

Смешать и инкубировать 10 минут при t 37 °С или 15 минут при t 18-25 °С. По окончании инкубации измерить оптическую плотность пробы (Е пробы) и калибратора (Е калибратора) против контроля на

реактивы при $\lambda = 500$ (490-520) нм и d = 1 см. Окраска стабильна в течение 60 минут.

Произвести расчет по формуле:

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

Референтные величины:

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

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

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

Результат:

Вывод:

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

2. Определение коэффициента атерогенности

А. Определение концентрации общего холестерина в плазме крови

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

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

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

Состав набора:

Реагент №1. Буфер

Фосфатный буфер – 100 ммоль/л

Фенол – 10 ммоль/л

Детергенты, активаторы, стабилизаторы

Реагент №2. Лиофилизат

Холестеролэстераза – 400 ед/л

Холестеролоксидаза – 250 ед/л

Пероксидаза – 500 ед/л

4-аминоантипирин – 0,25 ммоль/л

Активаторы и стабилизаторы

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

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Содержимое флакона с реагентом №2, аккуратно перемешивая, растворить в буферном растворе (реагент №1). Выдержать при комнатной температуре в течение 20-30 минут. Реактив стабилен в течение 6 месяцев при 2-8 0С в темном месте.

Количественный анализ:

Длина волны – 500 нм.

Длина оптического пути – 1 см

Температура инкубации – комнатная 18-25 0С

Ход работы:

Внести в пробирки	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Образец	0,02 мл		
Калибратор	-	0,02 мл	-
Дистиллированная вода	-	-	0,02 мл
Рабочий реагент	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл

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

Окраска стабильна не менее часа после окончания инкубации при предохранении от прямого солнечного света.

Расчет концентрации холестерина проводят по формуле:

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

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

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

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

Референтные величины:

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

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

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

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

Результат:

Вывод:

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

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

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

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

Состав набора:

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

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

Все реагенты готовы к работе.

Ход работы:

1. Преципитация (осаждение)

Реагенты	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Контрольная проба, мл
Плазма	0,15	-	-
Вода	-	-	0,15
Осаждающий реагент	0,3	0,3	0,3

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

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

2. Определение концентрации ЛПВП

Реагенты	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Контрольная проба, мл
Супернатант	0,2	-	-
Вода + реагент № 1	-	-	0,2
Рабочий реагент для определения холестерина	2,0	2,0	2,0
Калибратор + реагент № 1	-	0,2	-

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

Расчет концентрации ЛПВП проводят по формуле:

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

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

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

Нормальные величины ЛПВП:

Мужчины ≥ 55 мг/100 мл (1,42 ммоль/л)

Женщины ≥ 65 мг/100 мл (1,68 ммоль/л)

Группа риска:

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

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

Патологическое нарушение липидного обмена:

Мужчины ≤ 35 мг/100 мл (0,9 ммоль/л)

Женщины ≤ 45 мг/100 мл (1,16 ммоль/л)

Расчет концентрации липопротеинов низкой плотности (ЛПНП):

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

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

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

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

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

Полученный результат умножить на 2.

В. Подсчет коэффициента атерогенности:

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

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

$X_{лпвп}$ – холестерин в составе ЛПВП

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

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

Работа 2. Качественные реакции на кетоновые тела

Оборудование: пробирки, пипетки, штативы.

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

1.Проба Легалья на ацетон.

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

Ход работы:

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

2. Проба Либена на ацетон.

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

Ход работы:

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

Заполнить таблицу:

	Проба Легала	Проба Либена	Выводы
Наличие кетоновых тел в моче (по окраске)			
Отсутствие кетоновых тел в моче (по окраске)			

Тема № 9. Обмен белков и аминокислот

Работа 1. Исследование кислотности желудочного сока

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

Определение общей кислотности производят при помощи индикатора фенолфталеина (в кислой среде он бесцветный, в щелочной – розовый) методом титрования с 0,1 н. раствором едкого натра (титр кислотности выражается количеством щелочи, израсходованной на титрование 100 мл желудочного сока).

Свободной соляной кислотой называют ту часть соляной кислоты, которая содержится в желудке в виде диссоциированных ионов водорода и хлора. Ее определяют с помощью индикатора парадиметиламиноазобензола. В присутствии свободной соляной кислоты парадиметиламиноазобензол становится ярко-красным, при ее отсутствии - желтым.

Связанной соляной кислотой называется часть соляной кислоты, которая находится в желудке в виде недиссоциированных молекул, будучи химически связана с белками.

Оборудование: стеклянные палочки, капельницы, бюретки на 10 - 20 мл, пипетки на 10 мл, штативы, химические стаканы на 50 – 100 мл.

Объект исследования и реагенты: желудочный сок с нормальной, повышенной и пониженной кислотностью, индикатор парадиметиламиноазобензол (0,5% раствор в спирте), индикатор фенолфталеин (0,05% раствор в спирте), натрия гидроксид (0,1н раствор).

Ход работы:

1. В химический стаканчик отмерить пипеткой 10 мл профильтрованного желудочного сока.
 2. Добавить 1-2 капли парадиметиламиноазобензола и 2 капли фенолфталеина.
 3. Жидкость титровать 0,1 н раствором гидроксида натрия до желто-ваато-красного окрашивания (первый пункт).
 4. Продолжить титрование до лимонно-желтого цвета (второй пункт).
 5. Продолжить титровать до появления розового окрашивания (третий пункт).
- Первый пункт соответствует свободной соляной кислоте. Среднее арифметическое между вторым и третьим пунктам – сумме свободной и связанной соляной кислоты и третий пункт – общей

кислотности желудочного сока.

6. Провести расчет.

Пример расчета:

Допустим, что на титрование желудочного сока затрачено 0,1 н раствора щелочи:

- до первого пункта (желтовато-красный цвет)..... 3,5 мл,

- до второго пункта (лимонно-желтый цвет).....4,6 мл,

- до третьего пункта (розовый цвет).....5,4 мл.

Среднее между вторым и третьим пунктом:

$$(4,6 + 5,4)/2=5,0$$

Следовательно:

свободная соляная кислота $3,5 \cdot 10 = 35$ (35 ммоль/л),

сумма свободной и связанной соляной кислоты... $5,0 \cdot 10 = 50$ (50 ммоль/л),

связанная соляная кислота $50 - 35 = 15$ (15 ммоль/л),

общая кислотность $5,4 \cdot 10 = 54$ (54 ммоль/л).

Нормальные величины:

- свободная соляная кислота - 20-40 ммоль/л,

- связанная соляная кислота - 8-16 ммоль/л,

- общая кислотность - 40-60 ммоль/л.

7. Сравнить полученные значения общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты с нормальными значениями. Сделать выводы о возможных заболеваниях.

Результат:

Вывод:

Работа 2. Определение содержания мочевины

Содержание мочевины в крови зависит от соотношения процессов мочевинообразования в печени и ее выведения почками. В клинике определение концентрации мочевины имеет наибольшее значение для диагностики заболеваний почек. При ухудшении функции почек именно повышение мочевины в крови является наиболее ранним лабораторным диагностическим тестом. Из фракций остаточного азота в наибольшей степени в крови повышается мочевина, которая может составлять до 90% фракции остаточного азота при патологии почек (в норме —50%).

Различают 3 группы причин, приводящих к увеличению содержания мочевины в крови: надпочечную азотемию, почечную и подпочечную. Надпочечная азотемия обусловлена повышением уровня мочевины в крови, наступающим вследствие сниженного поступления крови к почкам (циркулярная недостаточность в клубочках, шок, кровопотеря, дегидратация). Азотемия почечного происхождения бывает связана с острой или хронической почечной недостаточностью вследствие гломерулонефрита, пиелонефрита, артериосклероза, некроза кортикального слоя почек. Подпочечная азотемия бывает связана с облитерацией мочевыводящих путей (мочекаменная болезнь, опухоли мочевыводящих путей, предстательной железы и т.д.).

Повышение уровня мочевины в крови может быть и при усиленном распаде белков (синдром сдавливания, ожоги, лихорадка, перитонит), при обезвоживании организма.

Снижение уровня мочевины в крови бывает связано с отрицательным балансом азота в результате плохого питания, с печеночной недостаточностью или с гипергидратацией организма. Снижение концентрации мочевины в крови наблюдается также при вирусном гепатите, острой дистрофии печени.

Принцип метода: мочевина под действием уреазы гидролизуеться с образованием карбоната аммония. Ионы аммония реагируют с фенолом и гипохлоритом в присутствии нитропрусида, образуя окрашенный комплекс. Интенсивность окраски при длине волны 540 нм пропорциональна концентрации мочевины в пробе.

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

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

Состав набора:

Реагент №1 Раствор уреазы

Уреазы – 10 ед/мл

Фосфатный буфер – 50 ммоль/л, рН 7,0
 Калибратор
 Мочевина – 5 ммоль/л (30 мг/дл.)
 Реагент №3 Фенол/нитропруссидный реагент
 Фенол – 106 ммоль/л
 Нитропруссид натрия – 0,17 ммоль/л
 Реагент №4 Гипохлорит
 Гипохлорит натрия – 11 ммоль/л
 Натрий едкий – 125 ммоль/л

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

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

Перед проведением анализа разведите мочу в 100 раз дистиллированной водой.

Ход работы:

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

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

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

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

Расчеты

Концентрацию мочевины в сыворотке или плазме крови определить по формуле:

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

где Eоп – оптическая плотность опытной пробы;

Eкал – оптическая плотность калибровочной пробы;

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

В суточной моче:

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

где Eоп – оптическая плотность опытной пробы;

Eкал – оптическая плотность калибровочной пробы;

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

K – объем суточной мочи, л

Нормальные величины:

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

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

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

Результат:

Вывод:

Тема № 10 Матричные биосинтезы. Обмен нуклеотидов

Работа 1.Количественное определение ДНК колориметрическим методом

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

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

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

концентрированной серной кислоты), дистиллированная вода.

Ход работы:

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

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

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

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

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

Работа 2. Количественное определение РНК колориметрическим методом

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

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

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

Ход работы:

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

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

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

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

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

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

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

Состав набора:

Реагент №1 Буфер

Фосфат – 150 ммоль/л

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

Реагент №2 Лиофилизат

4-аминоантипирин – 0,25 ммоль/л

Уриказы – 300 ед/л

Аскорбатоксидаза – 250 ед/л

Пероксидаза – 250 ед/л

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

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Приготовление рабочего реагента: содержимое флакона с Реагентом №2, аккуратно перемешивая, растворить в буферном растворе (реагент №1). Для получения оптимальных результатов рекомендуется выдержать рабочий реагент при комнатной температуре 5-10 минут после полного растворения лиофилизата. Реагент стабилен не менее 30 дней при 2-8 0С.

Ход работы:

Пробы тщательно перемешать, инкубировать 7 минут при 18-25 0С или 5 минут при 37 0С.

Измерить оптическую плотность опытной (ЕОП) и калибровочной (ЕК) проб против контрольной пробы. Окраска стабильна не менее 40 минут после окончания инкубации.

Длина волны – 520 нм

Длина оптического пути – 1 см (5 мм)

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

Концентрацию моче́вой кислоты (С) определить по формуле:

В сыворотке или плазме крови:

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

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

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

357 мкмоль/л – концентрация моче́вой кислоты в калибраторе.

В суточной моче:

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

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

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

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

K – объем суточной мочи, л

Нормальные величины:

В сыворотке (плазме) крови:

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

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

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

Диагностическое значение. Причиной повышения содержания моче́вой кислоты в крови может быть прием пищи, богатой пуринами и усиленный распад пуринов, некоторые гематологические заболевания, клеточный цитолиз при лучевой терапии.

Определение содержания моче́вой кислоты в крови имеет большое значение в диагностике подагры и почечной недостаточности. Повышенный уровень моче́вой кислоты наблюдается при нарушении ее выделения из организма (заболевания почек, ацидоз, токсикоз беременности).

Особенно высокое содержание моче́вой кислоты бывает при сочетании подагры с недостаточностью функции почек.

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

Тема № 11. Биохимия крови

Работа 1. Количественное определение альбумина в сыворотке крови

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

нм.

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

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

Состав набора:

1. Реагент №1. Монореагент

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

БКЗ – 0,1 ммоль/л

2. Калибровочный раствор альбумина - 60 г/л

Ход работы:

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

Внести в пробирки	Опытная проба	Калибровочная проба	Холодная проба
Реагент №1	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
Сыворотка	0,01 мл	-	-
Калибратор	-	0,01мл	-
Дистиллированная вода	-	-	0,01 мл

2. Содержимое пробирок тщательно перемешать.

3. Инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре (18о-25оС).

4. Перенести содержимое пробирок в кюветы с толщиной слоя 1 см.

5. Произвести измерение оптической плотности опытной и калибровочной проб против холодной пробы на спектрофотометре при длине волны 628 нм.

6. Рассчитать концентрацию альбумина по формуле:

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

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

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

60 – концентрация альбумина в калибраторе в г/л

Референтные значения:

новорожденные - 28-44 г/л;

4 дня – 14 лет - 38-54 г/л;

14 - 18 лет - 32-45 г/л;

18 – 60 лет - 32-46 г/л;

60 – 90 лет - 29-45 г/л.

Диагностическое значение:

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

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

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

Работа 2. Определение содержания гемоглобина в крови гемиглобинцианидным методом

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

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

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

Состав набора:

- Трансформирующий реагент – сухая смесь (натрий углекислый кис-лый, 1,0 г; калий железосинеродистый, 200 мг) – 3 упаковки.

- Ацетонциангидрин, 0,5 мл – 3 ампулы;
- Калибровочный раствор гемоглобина (120 г/л) – 2 мл.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

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

Ход работы:

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

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

2. Перемешать.

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

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

5. Расчет содержания гемоглобина произвести по формуле:

$$C = (E_p/E_k) \times 120, \text{ где}$$

C – содержание гемоглобина в пробе, г/л;

E_p – оптическая плотность измеряемой пробы;

E_k – оптическая плотность с калибровочным раствором;

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

Референтные величины:

- мужчины 130-160 г/л,

- женщины 120-140 г/л.

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

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

Результат:

Вывод:

Тема № 12. Гормоны и гормональная регуляция метаболических процессов.

Реактивы: хлорид железа (III), 1%-ный раствор; уксусная кислота, 10%-ный раствор; йодат калия 10%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; гидроксид натрия, 20%-ный раствор; хлороформ; биуретовый реактив (содержит NaOH и ионы Cu²⁺); нингидрин, 0,5%-ный водный раствор; ацетат свинца, 5%-ный раствор;

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

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

Работа 1. Изучение химической природы адреналина

а) реакция с хлоридом железа(III)

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

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

Результат:

Вывод:

б) реакция с йодатом калия

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

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

Результат:

Вывод:

Работа 2. Доказательство белковой природы инсулина

а) Биуретовая реакция на пептидную группу (реакция Пиотровского)

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

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

Результат:

Вывод:

б) нингидриновая реакция на α -аминогруппу

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

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

Результат:

Вывод:

в) реакция Фояля

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

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

Результат:

Вывод:

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

Работа 3.Обнаружение йода в составе йодтиронинов

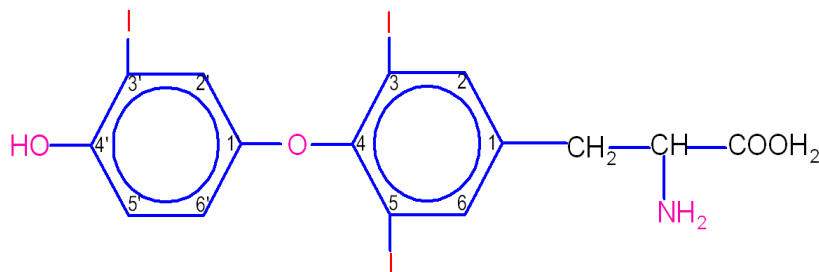
Принцип метода: при щелочном гидролизе тиреоидных гормонов (йодтиронинов) происходит отщепление иодистоводородной кислоты, при взаимодействии которой с йодатом калия выделяется свободный йод, обнаруживаемый с помощью крахмала.

Оборудование: фарфоровая ступка с пестиком, колба для гидролиза, асбестовая сетка, электроплита, пипетки, пробирки, дозаторы.

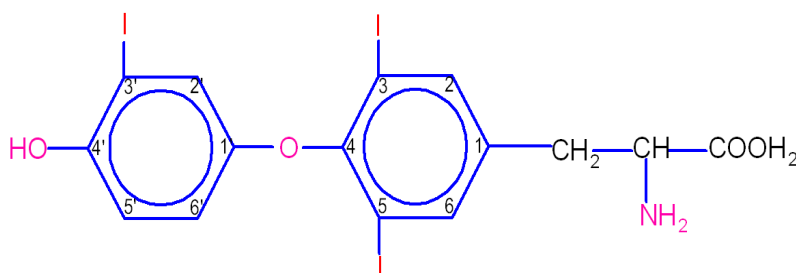
Объект исследования и реагенты: тиреоидин (таблетки), гидроксид натрия (10% раствор), крахмал (1% раствор), йодат калия (2% раствор).

Тиреоидные гормоны являются производными аминокислоты тирозина. Они образуются в фолликулах щитовидной железы из белка тиреоглобулина. Основными представителями тиреоидных гормонов являются трийодтиронин (T_3), обладающий основной биологической активностью и тетрайодтиронин (T_4 , тироксин), имеющий более низкую биологическую активность, чем T_3 , но являющийся своеобразным резервом для T_3 , т.к. в тканях организма происходит переход T_4 в T_3 . Тиреоидные гормоны имеют огромное физиологическое значение и влияют на все виды обмена веществ. T_3 и T_4 определяют морфологическое и функциональное развитие мозга и организма в целом в период внутриутробного развития и новорожденности. В

более зрелом возрасте тиреоидные гормоны стимулируют метаболические процессы, оказывают калориегенный эффект, в физиологических концентрациях обладают выраженным анаболическим эффектом, стимулируют липолиз, окисление высших жирных кислот, гликогенолиз, глюконеогенез, улучшают усвоение глюкозы мышечной и жировой тканью, оказывают положительный хроно- и инотропный эффект на миокард, расширяют артериолы кожи, усиливают процессы ремоделирования в костной ткани, влияют на обмен протеогликанов в соединительной ткани.



трийодтиронин (Т₃)



тетрайодтиронин (Т₄)

Ход работы:

Гидролиз тиреоидина:

1. В ступку поместить 5 таблеток тиреоидина и тщательно растереть.
2. Порошок пересыпать в колбочку для гидролиза, прибавить 5 мл 10% раствора гидроксида натрия и 5 мл дистиллированной воды.
3. Кипятить колбочку на асбестовой сетке 15 мин, после чего гидролизат охладить.

Обнаружение йода:

1. В пробирку налить 10-12 капель гидролизата.
2. Прибавить несколько капель раствора крахмала и 2 капли раствора йодата калия.
3. Наблюдать развитие окрашивания.
4. Сделать вывод.

Работа 4. Обнаружение 17-кетостероидов в моче

Принцип метода: метод основан на взаимодействии 17-кетостероидов с *m*-динитробензолом в щелочной среде с образованием продуктов конденсации розово-фиолетового цвета.

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

Объект исследования и реагенты: моча, 2% спиртовой раствор *m*-динитробензола, спиртовой раствор гидроксида натрия 8 моль/л.

Ход работы:

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

В норме содержание 17-кетостероидов в суточной моче составляет у мужчин 0,10-0,16 г, у женщин – 0,06-0,13 г. В состоянии стресса содержание кортикостероидов в крови повышается и увеличивается выделение их с мочой.

По итогам всех работ заполнить таблицу:

Гормон	Формулы	Качественная реакция	Окраска
Адреналин			
Йодтиронины			
17-кетостероиды			

Тема 13. Биохимия нервной и мышечной ткани.

I. Биохимия нервной ткани

Оснащение.

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

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

Материал. Сыворотка крови; моча нормальная и патологическая.

Работа 1. Качественная реакция на ацетилхолин

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

Ход работы.

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

Работа 2. Обнаружение активности холинэстеразы в сыворотке крови

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

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

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

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

Работа 3. Обнаружение фенилпировиноградной кислоты в моче

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

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

Ход работы.

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

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

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

II. Биохимия мышечной ткани

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

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

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

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

Оснащение.

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

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

Материал. Мышечная кашица

Работа 1. Подготовка материала для исследования

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

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

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

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

Работа 2. Исследование белков мышечной ткани

Ход работы.

А. Альбуминовая фракция

В 5 пробирок отмеривают по 10 капель водного экстракта мышечной ткани и проводят следующие реакции: биуретовую, реакцию осаждения с сульфосалициловой кислотой для

обнаружения белка; реакции Фоля, Миллона, Адамкевича - для изучения аминокислотного состава белка.

Результаты заносят в таблицу, делают выводы.

Б. Глобулиновая фракция

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

Результаты заносят в таблицу и делают выводы.

В. Белки стромы

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

Белки мышечной ткани

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

Работа 3. Обнаружение экстрактивных и минеральных веществ мышц

Ход работы.

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

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

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

Экстрактивные вещества мышц

Название работы	Исследуемый материал, реактивы	Наблюдаемые результаты	Выводы

Тема № 14. Биохимия соединительной ткани.

Оснащение занятия:

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

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

Материал. Костная ткань, моча нормальная и патологическая.

Работа 1. Изучение химического состава костной ткани

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

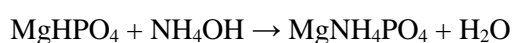
А. Обнаружение неорганических составных частей костной ткани

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

Ход работы.

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

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



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

Б. Изучение аминокислотного состава оссеина (оссеина)

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

Работа 2. Качественная проба на сульфатированные гликозаминогликаны в моче

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

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

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

Тема № 16. Биохимия ротовой жидкости

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

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

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

Оснащение. Диагностические полоски для определения рН или универсальная индикаторная бумага; уксусная кислота, 3%-ный раствор; азотная кислота, 30%-ный раствор; нитрат серебра, 1%-ный раствор; молибденовый реактив; оксалат аммония, 4%-ный раствор; сульфат меди(II), 2%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфосалициловая кислота, 20%-ный раствор; Реактив Феллинга; глюкозесты; фенол, 10%-ный раствор; хлорид железа (III), 1%-ный и 0,01%-ный растворы; уксусная кислота, концентрированная; α -нафтол, 1%-ный спиртовой раствор; серная кислота, концентрированная; сульфат аммония, насыщенный раствор; пероксид водорода, 1%-ный раствор; кислота хлористоводородная, 2%-ный раствор; фенол, 1%-ный раствор; молочная кислота, 0,1%-ный раствор; крахмал, 0,1%-ный раствор, свежеприготовленный; раствор Люголя: (в 100 мл дистиллированной воды растворяют 20 г йодида калия и 10 г йода; перед употреблением раствор разводят в 5 раз); 1%-ный раствор пероксида водорода.

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

Материал. Слюна и слюна, разведенная в 10 раз.

Работа 1. Определение рН слюны

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

Вывод:

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

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

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

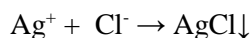
рН ротовой жидкости зависит от содержания аммиака NH_3 . Повышение его содержания в ротовой жидкости смещает рН в слабощелочную сторону, т.к. аммиак связывает ионы H^+ с образованием катиона аммония: $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$.

Работа 2. Определение минеральных компонентов слюны

А. Определение хлоридов.

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

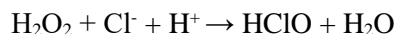
Ход работы. В пробирку вносят 10-15 капель слюны, добавляют 2-3 капли 30%-ного раствора азотной кислоты и 3-4 капли 1%-ного раствора нитрата серебра. Образуется творожистый осадок хлорида серебра:



Результат:

Вывод:

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

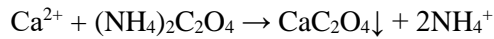


Это сильный окислитель, одна из активных форм кислорода, повреждающий клеточные оболочки микроорганизмов.

Б. Обнаружение ионов Ca^{2+} .

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

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



Результат:

Вывод:

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

В. Обнаружение фосфатов.

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

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



Результат:

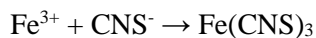
Вывод:

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

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

Г. Обнаружение роданидов.

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



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

Результат:

Вывод:

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

Работа 3. **Открытие органических компонентов слюны**

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

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

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

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

Результат:

Вывод:

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

Б. Открытие каталазы в слюне

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



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

Результат:

Вывод:

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

В. Пробы на глюкозу в слюне.

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

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

Результат:

Вывод:

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

Г. Реакция на молочную кислоту.

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

Ход определения. К 15 мл раствора фенола добавить несколько капель хлорида

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

Результаты:

Вывод:

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

2.2. Проведение круглого стола по теме: Биохимия в решении профессиональных задач.

Код и наименование компетенции/ Код и наименование индикатора достижения компетенции	Содержание компетенции/ индикатора достижения компетенции	Вопросы круглого стола
иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы	Необходимость использования основных физико-химических, математических и естественнонаучных понятий и методов для решения профессиональных задач

2.3. Итоговый контроль

Тесты, проверяющие освоение компетенции/ индикатора достижения компетенции

1. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Аминокислоты в молекуле белка соединены между собой _____ связями (ОПК-8.1Тема 1).

(Ответ: пептидными)

2. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Ферменты, незначительно различающиеся первичной структурой, но катализирующие одну и ту же реакцию, существующие в одном организме, но, как правило, в разных его клетках, тканях или органах, называются _____ (ОПК-8.1Тема 3).

(Ответ: изоферментами)

3. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Нуклеопротеидные структуры в ядре клетки, в которых сосредоточена большая часть наследственной информации и которые предназначены для её хранения, реализации и передачи называются _____ (ОПК-8.1Тема 9).

(Ответ: хромосомы)

4. Вставьте два пропущенных слова с маленькой буквы

Укажите название витамина, в результате снижения содержания которого в организме человека развивается цинга _____ (ОПК-8.1Тема 2).

(Ответ: витамин С)

5. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Гормон, выделяемый поджелудочной железой, повышающий уровень глюкозы в крови, это _____ (ОПК-8.1Тема 13).

(Ответ: глюкагон)

6. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Углевод, из которого могут образовываться все другие моносахариды (галактоза и фруктоза), это _____ (ОПК-8.1Тема 6).

(Ответ: глюкоза)

7. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Вещество, которое является предшественником жёлчных кислот, витамина D, некоторых видов гормонов и входит в состав всех мембран, придавая им жёсткость, это _____ (ОПК-8.1Тема 4).

(Ответ: холестерол)

8. Выберите один правильный ответ.

Вещество, неспособное выполнить функцию субстрата для ферментов организма человека (ОПК-8.1Тема 3):

- 1) глюкоза
- 2) сахароза
- 3) высшая жирная кислота
- 4) гликоген
- 5) азотная кислота

Ответ: 5

9. Выберите один правильный ответ.

Катион металла, неспособный выполнить функцию кофактора ферментов организма человека, поскольку является для него ядом (ОПК-8.1Тема 3):

- 1) K^+
- 2) Fe^{2+}
- 3) Ca^{2+}
- 4) Mo^{2+}
- 5) Hg^{2+}

Ответ: 5

10. Выберите один правильный ответ.

Для гидроксирования пролина и лизина в коллагене необходим витамин (ОПК-8.1Тема 14):

1. Пиридоксин
2. Пантотеновая кислота
3. Аскорбиновая кислота
4. Тиамин
5. Рибофлавин

Ответ: 3

11. Выберите одно правильное утверждение, характеризующее основную роль витаминов в организме человека (ОПК-8.1Тема 2):

- 1) структурная
- 2) энергетическая
- 3) транспортная
- 4) регуляторная

Ответ: 4

12. Выберите одно правильное утверждение. Для оптимального расщепления липидов в кишечнике необходимы... (ОПК-8.1Тема 7)

- 1) коагулянты – соли жирных кислот
- 2) эмульгаторы – жёлчные кислоты
- 3) эмульгаторы - производные глицерина
- 4) стабилизаторы - производные нуклеотида

Ответ: 2

13. Выберите одно правильное утверждение. Универсальным макроэргическим соединением является (ОПК-8.1Тема 5):

- 1) ацетил-КоА
- 2) сукцинил-КоА
- 3) аденозинтрифосфат
- 4) фосфоенолпируват

Ответ: 3

14. Назовите одно наследственное заболевание, которое выражается в склонности к кровотечению в результате несвертывания крови (ОПК-8.1Тема 12):

1. Гематурия
2. Гемоглобиноз

3. Гемофилия
4. Альбуминемия

Ответ: 3

15. Выберите один правильный ответ. Структурными единицами мышечного волокна являются (ОПК-8.1Тема 15):

- 1) полисахариды
- 2) миофибриллы
- 3) липопротеины
- 4) биологические мембраны

Ответ: 2

16. Выберите четыре правильных ответа.

Для белков характерны следующие функции (ОПК-8.1Тема 1):

1. Каталитическая
2. Матричная
3. Структурная
4. Защитная
5. Регуляторная.

Ответ: 1,3,4,5

17. Выберите два правильных ответа.

Гиповитаминоз D3 приводит к развитию (ОПК-8.1Тема 2):

- 1)сахарного диабета
- 2)рахита
- 3)остеопороза
- 4)бери-бери
- 5)пеллагры

Ответ: 2,3

18. Выберите два правильных ответа.

Функции триацилглицеролов в организме (ОПК-8.1Тема 4):

1. источник эндогенной воды
2. запасная форма энергии
3. структурные компоненты мембран
4. антиоксиданты

Ответ: 1,2

19. Выберите четыре правильных ответа.

Для генетического кода характерны следующие свойства (ОПК-8.1Тема 9):

1. триплетность
2. толерантность
3. вырожденность
4. линейность записи информации
5. универсальность

Ответ: 1,3,4,5

20. Выберите четыре правильных ответа.

Инсулину соответствуют следующие характеристики (ОПК-8.1Тема 13):

1. Синтезируется в α -клетках островков Лангерганса
2. Состоит из двух полипептидных цепей
3. Синтезируется в виде неактивного предшественника
4. Секретируется в кровь вместе с С-пептидом
5. Превращается в активный гормон путем частичного протеолиза

Ответ: 2,3,4,5

21. Выберите два правильных ответа.

Для непрямого билирубина характерно (ОПК-8.1Тема 10):

- 1) образуется в печени из прямого билирубина

- 2) плохо растворим в воде и не проникает через почечный барьер
- 3) с диазореактивом Эрлиха дает прямую реакцию
- 4) образуется в печени и селезенке при распаде эритроцитов

Ответ: 2,4

22. Выберите два правильных ответа.

Нуклеиновые кислоты расщепляются ферментами (ОПК-8.1Тема 9):

1. пептидазами
2. липазами
3. дезоксирибонуклеазами
4. гликозидазами
5. рибонуклеазами

Ответ: 3,5

23. Выберите два правильных ответа.

Для диагностики повреждений миокарда важное значение имеет исследование в сыворотке крови активности (ОПК-8.1Тема 3):

1. щелочной фосфатазы
2. кислой фосфатазы
3. изоферментов ЛДГ1 и ЛДГ2
4. изоферментов ЛДГ4 и ЛДГ5
5. изофермента креатинкиназы –МВ.

Ответ: 3,5

24. Установите соответствие (ОПК-8.1Тема 6):

Патологическое состояние	Причина:
1. Гипонатриемия	1. Сахарный диабет
2. Гипергликемия	2. Голодание
3. Гипогликемия	3. Избыточное потребление воды
4. Алкалоз	4. Частое глубокое дыхание

Ответ: 1-3; 2-1; 3-2; 4-4

25. Установите соответствие (ОПК-8.1Тема 3):

Определяемый субстрат	Фермент для определения субстрата
1) триацилглицерины	1) ксантиноксидаза
2) мочевины	2) холестеролоксидаза
3) холестерин	3) липаза
4) мочевиная кислота	4) лактатдегидрогеназа
5) молочная кислота	5) уреазы

Ответ: 1-3, 2-5, 3-2, 4-1, 5-4

26. Установите соответствие (ОПК-8.1Тема 12):

Форменные элементы крови	Выполняемые функции
1) Тромбоциты	1) Защитная
2) Лейкоциты	2) Участвуют в свертывании крови
3) Эритроциты	3) Участвуют в газообмене

Ответ: 1-2, 2-1, 3-3

27. Установите соответствие (ОПК-8.1Тема 2):

Витамин	Активная форма витамина
---------	-------------------------

1) никотиновая кислота	1) ФАД
2) пантотеновая кислота	2) НАДФ ⁺
3) пиридоксин	3) КоASH
4) рибофлавин	4) пиридоксальфосфат
5) тиамин	5) тиаминдифосфат

Ответ: 1-2, 2-3, 3-4, 4-1, 5-5

28. Расположите в правильной последовательности этапы реализации генетической информации в клетке (ОПК-8.1Тема 9):

1. Трансляция
2. Репликация
3. Транскрипция
4. Посттрансляционная модификация белка

(Ответ: 2, 3, 1, 4)

29. Расположите события в правильной последовательности (ОПК-8.1Тема 13):

1. Тяжелый физический труд, стрессовое состояние
2. Выброс адреналина из надпочечников в кровь
3. Расщепление гликогена в клетках печени под воздействием адреналина
4. Стимулирование адреналином рецепторов на клетках печени
5. Повышение уровня глюкозы в крови

(Ответ: 1, 2, 4, 3, 5)

30. Установите верную последовательность этапов глюкозо-лактатного цикла (Кори)

(ОПК-8.1Тема 6):

1. Мышцы
2. Лактат
3. Глюкоза
4. Печень
5. Мышцы

Ответ: 1, 2, 4, 3, 5

31. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Производные карбоновых кислот, у которых один водородный атом у α -углерода замещен на аминогруппу, входящие в состав всех белков, называются _____ . (ОПК-8.1Тема 1).

(Ответ: аминокислотами)

32. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Высокоспециализированный класс веществ белковой природы, используемый живыми организмами для осуществления с высокой скоростью многих тысяч взаимосвязанных химических реакций, включая синтез, распад и взаимопревращение огромного множества разнообразных химических соединений, представляют собой _____. (ОПК-8.1Тема 3)

(Ответ: ферменты)

33. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Продуктами полимеризации мононуклеотидов, число и последовательность расположения которых в цепях этих соединений определяются в строгом соответствии с программой, заложенной в молекуле матрицы, являются _____ (ОПК-8.1, Тема 9).

(Ответ: нуклеиновые кислоты)

34. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Пищевые незаменимые факторы, которые, присутствуя в небольших количествах в пище, обеспечивают нормальное развитие организма животных и человека и адекватную скорость протекания биохимических и физиологических процессов. Нарушения регуляции процессов обмена и развитие патологии часто связаны с недостаточным поступлением этих веществ в организм, полным отсутствием их в потребляемой пище либо нарушениями их всасывания, являются _____ (ОПК-8.1Тема 2).

(Ответ: витамины)

35. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Гормон, снижающий уровень глюкозы в крови, а также влияющий на другие виды обмена веществ, это _____ (ОПК-8.1Тема 13).

(Ответ: инсулин)

36. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Основной полимерной формой запасаения глюкозы в печени человека является _____ (ОПК-8.1, Тема 6).

(Ответ: гликоген)

37. Вставьте пропущенное слово с маленькой буквы

Основными структурными компонентами всех биомембран являются амфифильные соединения _____ (ОПК-8.1Тема 4).

(Ответ: фосфолипиды)

38. Выберите один правильный ответ.

Простые ферменты состоят из (ОПК-8.1Тема 3):

- 1) аминокислот
- 2) углеводов
- 3) аминокислот и углеводов
- 4) аминокислот и небелковых компонентов

Ответ: 1

39. Выберите один правильный ответ.

Депонирование энергетического материала после приема углеводистой пищи стимулирует (ОПК-8.1Тема 6):

1. Глюкагон
2. Альдостерон
3. Адреналин
4. Инсулин
5. Кортизол

Ответ: 4

40. Выберите одно правильное утверждение.

Гиалуроновая кислота (ОПК-8.1Тема 14):

1. Является протеогликаном
2. Представляет собой разветвленный гомополисахарид
3. Может связывать большое количество воды, а также Ca^{2+} и Na^{+}
4. Локализована в основном в базальных мембранах
5. Имеет суммарный положительный заряд

Ответ: 3

41. Выберите одно правильное утверждение, объясняющее причину желтухи новорожденных (ОПК-8.1Тема 10):

1. Повышенный распад эритроцитов
2. Блокада поступления желчи в кишечник
3. Нарушение выделения билирубина в желчь
4. Нарушение захвата билирубина гепатоцитами из крови
5. Глюкуроновая кислота не присоединяется к билирубину

Ответ: 1

42. Выберите одно правильное утверждение. Липиды растворяются в эфире, но не растворяются в воде, так как они... (ОПК-8.1Тема 4)

- 1) являются полимерами
- 2) состоят из мономеров
- 3) гидрофобны
- 4) гидрофильны

Ответ: 3

43. Выберите одно правильное утверждение. Чаще всего макроэргические соединения являются производными неорганической кислоты... (ОПК-8.1Тема 5)

- 1)соляной
- 2)серной
- 3)азотной
- 4)фосфорной

Ответ: 4

44.Выберите одно правильное утверждение. Растворенный в плазме белок, необходимый для свертывания крови и в процессе свертывания образующий тромб (ОПК-8.1Тема 12)

1. Вазопрессин
2. Фибриноген
3. Тромбопластин
4. Альбумин

Ответ: 2

45.Выберите одно правильный ответ. Ведущую роль в мышечном сокращении играют катионы (ОПК-8.1Тема 14):

- 1) магния
- 2) натрия
- 3) калия
- 4) железа
- 5) кальция.

Ответ: 5

46.Выберите четыре правильных ответа.

Липолиз активируется (ОПК-8.1Тема 4):

1. Инсулином
2. Адреналином
3. АКТГ
4. Глюкагоном
5. Кортизолом

Ответ: 2,3,4,5

47.Выберите четыре правильных ответа.

Альбумину сыворотки крови соответствуют следующие характеристики (ОПК-8.1Тема 12):

1. Содержится в крови в концентрации 40-50 г/л
2. Относится к белкам острой фазы
3. Синтезируется в печени
4. Содержится в межклеточной жидкости
5. Поддерживает коллоидно-осмотическое давление

Ответ: 1,3,4,5

48.Выберите два правильных ответа.

Причиной кетонемии и кетонурии могут стать следующие состояния (ОПК-8.1Тема 7):

- 1)атеросклерозе
- 2)жёлчно-каменной болезни
- 3)сахарном диабете
- 4)длительном голодании
- 5)желтухе

Ответ: 3,4

49.Выберите четыре правильных ответа.

Кортизолу соответствуют следующие характеристики (ОПК-8.1Тема 13):

1. Синтезируется в коре надпочечников
2. Предшественником является холестерол

3. Синтез и секреция регулируются адренкортикотропным гормоном
4. Хорошо растворим в крови
5. Изменяет количество ключевых ферментов метаболизма

Ответ: 1,2,3,5

50. Выберите три правильных ответа.

От уровня инсулина не зависит скорость поступления глюкозы в клетки (ОПК-8.1Тема 6):

1. мышечной ткани
2. печени
3. мозга
4. жировой ткани
5. эритроциты

Ответ: 2,3,5

51. Выберите два правильных ответа.

Для прямого билирубина характерно (ОПК-8.1Тема 10):

- 1) высокая токсичность
- 2) хорошая растворимость в воде
- 3) прямая реакция с диазореактивом Эрлиха
- 4) содержание в составе атома железа

Ответ: 2,3

52. Выберите два правильных ответа.

Функции триацилглицеролов в организме (ОПК-8.1Тема 4):

1. источник эндогенной воды
2. запасная форма энергии
3. структурные компоненты мембран
4. антиоксиданты

Ответ: 1,2

53. Выберите три правильных ответа.

Что из перечисленного относится к креатинурии (ОПК-8.1Тема 14):

1. усиленное выведение креатина с мочой
2. наблюдается при миопатиях, так как креатин не накапливается и нарушается его фосфорилирование
3. сопровождается резким повышением в моче креатининового показателя – креатин/креатинин
4. наблюдается при голодании
5. наблюдается при сахарном диабете

Ответ: 1,2,3

54. Установите соответствие (ОПК-8.1Тема 2):

Патология:	Дефицит витамина:
1. Куриная слепота	1. Витамин К
2. Цинга	2. Витамин С
3. Мегалобластная анемия	3. Витамин А
4. Ухудшение свертывающей способности крови	4. Витамин В ₁₂

Ответ: 1-3; 2-2; 3-4; 4-1

55. Установите соответствие (ОПК-8.1тема 3):

Определяемый субстрат	Фермент для определения субстрата
1) мочевины	1) аспарагиназа
2) глюкоза	2) алкогольдегидрогеназа
3) этанол	3) глюкозооксидаза
4) лактат	4) лактатдегидрогеназа
5) аспарагин	5) уреазы

Ответ: 1-5, 2-3, 3-2, 4-4, 5-1

56. Установите соответствие (ОПК-8.1Тема 12):

Форменные элементы крови	Продолжительность жизни
1) Тромбоциты	1) Живут около 120 суток
2) Лейкоциты	2) Живут 8-11 суток
3) Эритроциты	3) Живут от нескольких суток до нескольких лет

Ответ: 1-2, 2-3, 3-1

57. Установите соответствие (ОПК-8.1Тема 4):

Функция мембран	Определение
1. разделительная	1) участие в химических превращениях различных веществ
2. метаболическая	2) поддержание разности электрических потенциалов
3. рецепторная	3) разделение внутри- и внеклеточного пространства
4. электрическая	4) перенос веществ между различными компартментами и внеклеточной средой
5. транспортная	5) участие в восприятии внешних стимулов

Ответ: 1-3, 2-1, 3-5, 4-2, 5-4

58. Расположите в правильной последовательности этапы преобразования непрямого билирубина в прямой билирубин (ОПК-8.1Тема 10):

1. Присоединение остатков глюкуроновой кислоты к билирубину в печени.
2. Прямой билирубин в составе желчи транспортируется в кишечник.
3. Распад гема и образование непрямого билирубина в ретикулоэндотелиальной системе.
4. Транспортировка непрямого билирубина альбуминами в печень

(Ответ: 3, 4, 1, 2)

59. Расположите события в правильной последовательности (ОПК-8.1Тема 13):

1. Выброс инсулина из поджелудочной железы в кровь
2. Прием пищи и увеличение концентрации глюкозы в крови
3. Снижение уровня глюкозы в крови
4. Связывание инсулина с рецепторами на поверхности жировой и мышечной тканей

(Ответ: 2, 1, 4, 3)

60. Установите верную последовательность этапов катаболизма глюкозы (ОПК-8.1Тема 6):

1. Глюкоза
2. Цикл Кребса
3. АТФ
4. Гликолиз
5. Дыхательная цепь ферментов

Ответ: 1, 4, 2, 5, 3

Эталон ответов

Вопрос	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ответ	пептидным и	изо ферментами	хромосомами	витаминами С	глюкозой	глюкозой	холестерол	5	5	3

Вопрос	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ответ	4	2	3	3	2	1,3,4,5	2,3	1,2	1,3,4,5	2,3,4,5
Вопрос	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ответ	2,4	3,5	3,5	1-3; 2-1; 3-2; 4-4	1-3, 2-5, 3-2, 4-1, 5-4	1-2, 2-1, 3-3	1-3, 2-5, 3-2, 4-1, 5-4	1-3, 2-5, 3-2, 4-1, 5-4	1, 2, 4, 3, 5	1, 2, 4, 3, 5
Вопрос	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Ответ	амин окисл отами	фер мент ы	нукле инов ые кисло ты	витами ны	инсулин	глико ген	фосфо липид ы	1	4	3
Вопрос	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Ответ	1	3	4	2	5	2,3,4,5	1,3,4,5	3,4	1,2,3,5	2,3,5
Вопрос	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Ответ	2,3	1,2	1,2,3	1-3; 2-2; 3-4; 4-1	1-5, 2-3, 3-2, 4-4, 5-1	1-2, 2-3, 3-1	-3, 2-1, 3-5, 4-2, 5-4	3, 4, 1, 2	2, 1, 4, 3	1, 4, 2, 5, 3

Ситуационные задачи, проверяющие освоение компетенции/ индикатора достижения компетенции

Задача №1

У некоторых людей прием молока вызывает расстройство кишечника (понос), а прием кисломолочных продуктов - нет. Почему это происходит? Выберите один правильный ответ (ОПК-8.1Тема 3).

1. Отсутствует фермент липаза
2. Отсутствует фермент лактаза.
3. Наследственная энзимопатия сахарозы и мальтазы.

Ответ: 2

Задача №2

У пациента в крови и моче резко повышено содержание ацетоацетата и β -гидроксибутирата (кетоновые тела). Что может быть причиной этого повышения? Выберите один правильный ответ (ОПК-8.1Тема 7).

1. Избыточное количество глюкозы в пище.
2. Сахарный диабет
3. Гиподинамия

Ответ: 2

Задача №3

У больного наблюдается резкое снижение веса тела, повышенная раздражительность, небольшое повышение температуры по вечерам, экзофтальм. Избыток какого гормона может вызвать данные симптомы? Выберите один правильный ответ (ОПК-8.1 Тема 13).

1. Тироксин
2. Инсулин
3. Кортизол.

Ответ: 1

Задача № 4

У больного отмечаются резкие боли в большом пальце стопы («нога в капкане»). При обращении к врачу был выставлен диагноз подагры. Какой биохимический показатель будет повышен в крови и моче пациента. Выберите один правильный ответ (ОПК-8.1 Тема 9).

1. Билирубин
2. Мочевая кислота
3. Креатинин
4. Глюкоза

Ответ: 2.

Задача № 5

В клинику поступил пациент с высоким содержанием непрямого билирубина в крови. О каком типе желтухи идет речь? Выберите один ответ (ОПК-8.1 Тема 10):

1. Гемолитическая желтуха.
2. Печеночная желтуха на фоне гепатита В.
3. Обтурационная желтуха.
4. Желтуха на фоне опухоли печени

Ответ: 1

Задача № 6

В клинику поступил пациент со спутанным сознанием, рвотой, низким содержанием мочевины в крови и высоким содержанием аммиака. Какое из перечисленных ниже питательных веществ нужно ограничить в рационе пациента? Выберите один правильный ответ (ОПК-8.1 Тема 8).

1. Углеводы.
2. Жиры.
3. Белки
4. Соли.

Ответ: 3

3. Промежуточная аттестация по дисциплине (модулю) включает в себя решение тестовых и ситуационных задач.

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

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

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

Формируемая компетенция/ индикатор	Содержание компетенции/ индикатора	Планируемые результаты обучения (показатели достижения заданного уровня освоения компетенций)	Критерии оценивания результатов обучения (дескрипторы) по пятибалльной шкале				
			1	2	3	4	5
ОПК-8	Способен использовать основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы при решении профессиональных задач	Знать: Основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы, используемые для решения профессиональных задач					
		Уметь: Применять знания основных физико-химических, математических и естественнонаучных понятий и методов для решения профессиональных задач в рамках изучаемой дисциплины					
		Владеть: Способами применения знаний об основных физико-химических, математических и естественнонаучных					

		понятиях и методах для решения профессиональных задач в рамках изучаемой дисциплины					
иОПК-8.1	Использует при решении профессиональных задач основные физико-химические, математические и естественнонаучные понятия и методы	Знать: Принципы использования основных физико-химических, математических и естественнонаучных понятий и методов при решении задач в области стоматологии	отсутствия знаний основных понятий и определений дисциплины обучающийся показывает затруднения при ответе на предложенные основные и дополнительные вопросы	отсутствия знаний значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, неуверенно, с затруднениями излагает материал.	имеет знания только основного материала, но не усвоил его деталей, допускает неточности, недостаточно правильные формулировки, нарушения логической последовательности в изложении программного материала	показывает хорошие знания изученного учебного материала; самостоятельно, логично и последовательно излагает и интерпретирует материалы учебного курса; но не полностью раскрывает смысл предлагаемого вопроса	показывает отличные знания изученного учебного материала; самостоятельно, логично и последовательно излагает и интерпретирует материалы учебного курса; раскрывает весь смысл предлагаемого вопроса
		Уметь: Использовать знания физико-химических, математических и естественнонаучных понятий и методов при решении задач в области стоматологии	Обучающийся не может использовать теоретические знания по дисциплине для решения практических профессиональных задач в рамках РП	Обучающийся не может использовать теоретические знания части программного материала, допускает существенные ошибки	Обучающийся может использовать теоретические знания материала, но не усвоил его деталей, допускает неточности, нарушения логической последовательности	Обучающийся может использовать теоретические знания материала самостоятельно, логично и последовательно интерпретирует материалы учебного курса, но допускает существенные неточности	Обучающийся использует теоретические знания материала самостоятельно, логично и последовательно интерпретирует материалы учебного курса

		<p>Владеть: Навыками применения основных физико-химических, математических и естественнонаучных понятий и методов в своей профессиональной сфере</p>	<p>Не владеет навыками в соответствии с требованиями РП дисциплины</p>	<p>Не владеет навыками части программного материала, допускает существенные ошибки</p>	<p>Владеет частью навыков в соответствии с требованиями РП дисциплины</p>	<p>Владеет большей частью навыков в соответствии с требованиями РП дисциплины и может реализовать их в своей профессиональной деятельности</p>	<p>Владеет всеми навыками в соответствии с требованиями РП дисциплин и может реализовать их в своей профессиональной деятельности</p>
--	--	--	--	--	---	--	---

4.2. Шкала, и процедура оценивания

4.2.1. Процедуры оценивания компетенций (результатов)

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

4.2.2. Шкалы оценивания компетенций (результатов освоения)

Для устного ответа:

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

Для стандартизированного тестового контроля:

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

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

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

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

Примечание:

Оценивание результатов освоения дисциплины в рамках тестовых заданий с множеством выборов правильных ответов или тестовых заданий на установление соответствия осуществляется по следующей методике:

Для тестов с множественностью правильных ответов.

Каждому ответу определяются правильные и неправильные варианты ответов.

Каждому правильному варианту ответа назначается определенный вес.

Устанавливается общий балл за вопрос, равный 1 (или 100 %).

В результате ответа на вопрос суммируются веса выбранных студентом ответов. Полученная сумма сравнивается с максимально возможным баллом. Итоговый балл рассчитывается как процент от максимального.

Пример:

Текст вопроса: «Какие из следующих симптомов характерны для острого аппендицита? (Выберите все подходящие варианты)»

Варианты ответов и их веса:

А) Боль в правой нижней части живота (+25%)

В) Тошнота и/или рвота (+25%)

С) Повышение температуры тела (+25%)

D) Потеря аппетита (+25%)

E) Головная боль

F) Боль в левой нижней части живота

Например, выбор двух правильных симптомов дает 0.5 балла, трех - 0.75 балла, и так далее.

Для тестов **на установление соответствия**:

Каждому правильному ответу назначается определенный вес.

Устанавливается общий балл за вопрос, равный 1 (или 100 %).

В результате ответа на вопрос суммируются веса выбранных студентом ответов. Полученная сумма сравнивается с максимально возможным баллом. Итоговый балл рассчитывается как процент от максимального.

Пример:

Вопрос: "Сопоставьте медицинские термины с их определениями."

Общий балл за вопрос: 1 балл

Элементы для сопоставления:

Анемия

Гипертония

Диабет

Остеопороз

Варианты ответов:

A) Повышенное кровяное давление

B) Снижение плотности костной ткани

C) Недостаток эритроцитов или гемоглобина в крови

D) Нарушение обмена глюкозы

Правильные сопоставления:

1 - C

2 - A

3 - D

4 - B

Оценивание:

Каждое правильное сопоставление стоит 0.25 балла (1 балл / 4 элемента).

При полном правильном соответствии оценка равна 1 баллу (0,25 x 4).

При частичном соответствии оценка равна произведению веса ответа на количество правильных ответов.

Например, при правильном сопоставлении 3 ответов оценка равна 0,75 (0,25x3) и т.д.

Выполнение контрольной работы:

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

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

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

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

Лабораторная работа

«Зачтено» - выставляется при условии, если студент показывает хорошие практические навыки при проведении лабораторной работы; самостоятельно проводит опыты и интерпретирует полученные результаты; грамотно оформляет протокол исследования. «Не зачтено» - выставляется при наличии серьезных недостатков в проведении опытов; в случае отсутствия протокола лабораторной работы с интерпретацией полученных результатов.

Для оценки глоссария: Оценка «отлично» выставляется, если глоссарий-словарь специализированных терминов составлен из слов, полностью и наиболее оптимально

соответствующих заданному разделу, определения точны, содержат подробные комментарии и правильные примеры.

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

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

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

Для проведения круглого стола:

Отлично: все компетенции, предусмотренные в рамках дисциплины (в объеме, знаний, умений и владений) освоены полностью. Уровень освоения компетенции – повышенный. Обучающийся активно решает поставленные задачи, демонстрируя свободное владение предусмотренными навыками и умениями на основе использования полученных знаний.

Хорошо: все компетенции, предусмотренные в рамках дисциплины (в объеме, знаний, умений и владений) освоены полностью. Уровень освоения компетенции – достаточный. Обучающийся решает поставленные задачи, иногда допуская ошибки, не принципиального характера, легко исправляет их самостоятельно при наводящих вопросах преподавателя; демонстрирует владение предусмотренными навыками и умениями на основе использования полученных знаний.

Удовлетворительно: все компетенции, предусмотренные в рамках дисциплины (в объеме, знаний, умений и владений) освоены полностью. Уровень освоения компетенции – пороговый. Обучающийся при решении поставленных задачи, часто допускает ошибки, не принципиального характера, исправляет их при наличии большого количества наводящих вопросов со стороны преподавателя; не всегда полученные знания может в полном объеме применить при демонстрации предусмотренных программой дисциплины навыками и умениями.

Неудовлетворительно: все компетенции, предусмотренные в рамках дисциплины (в объеме, знаний, умений и владений) не освоены или освоены частично. Уровень освоения компетенции – подпороговый. Обучающийся при решении поставленных задачи, допускает ошибки принципиального характера, не может их исправить даже при наличии большого количества наводящих вопросов со стороны преподавателя; знания по дисциплине фрагментарны и обучающийся не может в полном объеме применить их при демонстрации предусмотренных программой дисциплины навыками и умениями.

4.3. Шкала и процедура оценивания промежуточной аттестации

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

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

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

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

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