Ն.Կ. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ
Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

Կենսաքիմիայի լաբորատոր աշխատանքներ

[ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ]

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Հայրապետյան Ն. Կ., Դավթյան Մ. Ա.

ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ

Երևան
ԵՊՀ հրատարակչություն
2015

ՀՏԴ 577.1(07)
ԳՄԴ 28.072 g7
Հ 300

Հրատարակության է երաշխավորել
ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի
գիտական խորհուրդը

Հայրապետյան Ն. Կ., Դավթյան Մ. Ա.
Հ 300 Կենսաքիմիայի լաբորատոր աշխատանքներ/Ուսումնամեթոդական ձեռնարկ (Հայրապետյան Ն. Կ., Դավթյան Մ. Ա.): -Եր.: ԵՊՀ հրատ., 2015, 56 էջ:

Մեթոդական ձեռնարկը նախատեսված է կենսաբանության ֆակուլտետի ուսանողների լաբորատոր աշխատանքների իրականացման համար: Այն ներառում է հիմնական կենսամոլեկուլների որակական և քանակական վերլուծությունը իրականացնելու մեթոդական ցուցումներ, նաև խնդիրներ՝ առարկայի տիրապետման որակի հսկողության նպատակով:

ՀՏԴ 577.1(07)
ԳՄԴ 28.072 g7

ISBN 978-5-8084-2013-7

© ԵՊՀ հրատ., 2015
© Հ այրապետյան Ն. Կ.,
Դավթյան Մ. Ա., 2015

Ներածություն

Տվյալ ձեռնարկը կենսաբանական քիմիայի ուսումնամեթոդական կոմպլեքսի մաս է: Ձեռնարկում ներկայացված են կենսաքիմիայի հիմնական բաժինների՝ սպիտակուցների, ածխաջրերի, լիպիդների, ֆերմենտների, հորմոնների քանակական և որակական ուսումնասիրությունների լաբորատոր մեթոդներ: Լաբորատոր աշխատանքների ձևաչափը ուսանողներին հնարավորություն կտա ինքնուրույն կատարել աշխատանքը, կնպաստի կենսաքիմիայի փորձարարական մեթոդների հիմունքների յուրացմանը: Ձեռնարկի նպատակն է գործնական հմտությունների ձևավորման ճանապարհով ամրապնդել ստատիկ, դինամիկ և ֆունկցիոնալ կենսաքիմիայի տեսական գիտելիքները:

Աշխատանքներում հետազոտություններն իրականացվում են հյուսվածքների հոմոգենատների, կենսաբանական հեղուկների մակարդակով: Ձեռնարկում բերված է տիպային լաբորատոր աշխատանքների սկզբունքը, ռեակտիվների ցանկը, աշխատանքի ընթացքը: Յուրաքանչյուր թեմայից առաջ տրված է ներածական մաս:

Բաժին 1

Ածխաջրեր

Ածխաջրերը իրենցից ներկայացնում են պոլիհիդրոքսիալդեհիդներ և պոլիհիդրոքսիկետոններ ու դրանց ածանցյալներ: Ածխաջրերը բաժանվում են խմբերի՝ մոնոսախարիդներ, մոնոսախարիդների ածանցյալներ, օլիգոսախարիդներ և պոլիսախարիդներ: Ածխաջրերի զգալի մասը պարունակում է մեծ թվով ասիմետրիկ ածխածնի ատոմներ և նույն մոլեկուլային բանաձևի տակ կարող է ներկայանալ մի քանի ստերեոիզոմերի տեսքով: Միևնույն մոնոսախարիդներից կազմված պոլիսախարիդը կոչվում է հոմոպոլիսախարիդ, տարբեր տիպի մոնոսախարիդներից և այլ բնույթի նյութերից կազմված պոլիսախարիդը՝ հետերոպոլիսախարիդ:

Ածխաջրերը հանդիպում են բոլոր բուսական և կենդանական օրգանիզմներում և իրականացնում են տարբեր ֆունկցիաներ: Դրանց մեջ կան ցածրամոլեկուլյար, բարձրամոլեկուլյար, բյուրեղային և ամորֆ, ջրում լուծելի և անլուծելի, հիդրոլիզվող և չհիդրոլիզվող, հեշտ օքսիդացվող և օքսիդիչների նկատմամբ համեմատաբար կայուն ածխաջրեր: Որոշ ածխաջրեր նյութափոխանակության ընթացքում օգտագործվում են որպես էներգիայի աղբյուր, մյուսները՝ կարևոր միացությունների (կոֆերմենտներ, նուկլեոտիդներ) բաղադրամաս են կամ ներգրավվում են բուսական բջիջների, միկրոօրգանիզմների կառուցվածքներում: Կենդանական բջիջներում ածխաջրերը հանդես են գալիս նաև սպիտակուցների հետ զուգորդված ձևով՝ որպես պրոտեոգլիկաններ, գլիկոպրոտեիններ:

Աշխատանք 1
Գլիկոգենի քանակական որոշումը առնետի լյարդում, մկաններում

Նորմալ սնուցման պայմաններում մարդու լյարդում առաջանում է գլիկոգենի դեպո (80-120 գ): Օրվա ընթացքում համարյա ամբողջ պաշարը ծախսվում է: Գլիկոգենի անջատումը իրականացվում է հյուսվածքի մեխանիկական քայքայմամբ և 5% ԵՔՔ-ով էքստրակցիայի միջոցով: Այսպիսի մշակումից սպիտակուցների հիմնական զանգվածը բնափոխվում է և ցենտրիֆուգմամբ հեշտ հեռացվում: Գլիկոգենի քանակական որոշման համար ավելի հաճախ կիրառվում են քիմիական մեթոդներ անտրոնային ռեակտիվի կամ ֆենոլի և ծծմբական թթվի օգնությամբ: Երկու մեթոդն էլ թույլ են տալիս որոշել գլիկոգենը առանց այն հիդրոլիզի ենթարկելու:

Ռեակտիվներ՝ 66% H_2SO_4, անտրոնային ռեակտիվ (100 մլ H_2SO_4, 1 գ թիոմիզանյութ, 50 գ անտրոն, խառնուրդը տաքացնել ջրային բաղնիքում, մինչև 80-90˚C), գլյուկոզի ստանդարտ լուծույթներ (50, 100, 200 մկգ գլյուկոզը լուծել 500 մլ բենզոաթթվի հագեցած լուծույթում), ֆիզիոլոգիական լուծույթ (0,9% NaCl), 5% ԵՔՔ:

Աշխատանքի ընթացքը

Անջատել քաղցած և կերակրված կենդանու լյարդը կամ կմախքային մկանները, մանրացնել: Գլիկոգենը ճեղքող ֆոսֆորիլազ ֆերմենտի ինակտիվացիայի նպատակով հյուսվածքները տեղափոխել NaCl-ի իզոտոնիկ լուծույթով (եռացող) բաժակի մեջ, տասը րոպե անց հանել լուծույթից: Քաղցած և կերակրված կենդանիների 0,5-ական գրամ հյուսվածքը տրորել հավանգում, ավելացնելով՝ 3 մլ ԵՔՔ (10 րոպե): Էքստրակտներին ավելացնել 3-ական մլ H_2O, նմուշները ցենտրիֆուգել 5 րոպե 3000 պտ/ր արագությամբ: Վերնստվածքներում գլիկոգենի պարունակությունը որոշելու նպատակով կառուցել տրամաչափական կոր: Երեք փորձանոթների մեջ լցնել 50, 100, 200 մկգ գլյուկոզ (0,5-ական մլ), չորրորդի մեջ՝ 0,5 մլ էքստրակտ, ստուգիչ փորձանոթի մեջ՝ 0,5 մլ H_2O: Բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 5-

ական մլ անտրոնային ռեակտիվ: Ռեակտիվը ավելացնել արագ, խառնել, թողնել սենյակային ջերմաստիճանում 10-15 րոպե, հետո տեղափոխել ջրային բաղնիք, 15 րոպե (հետևել, որ փորձանոթների մեջ ջուր չլցվի): Փորձանոթները արագ սառեցնել և թողնել մութ պայմաններում 30 րոպե: Ստացված լուծույթները կոլորիմետրել (ալիքի երկարությունը 620 նմ, կյուվետի լայնությունը 0,5 սմ): Ստացված տվյալների հիման վրա կառուցել կոր՝ աբսցիսների առանցք - գլյուկոզի կոնցենտրացիա, օրդինատների առանցք - օպտիկական խտություն: Հետազոտվող նմուշներում գլյուկոզի քանակությունը հաշվարկել ստանդարտ կորով, որը կառուցվում է որոշման յուրաքանչյուր սերիայում: Գլիկոգենի քանակության որոշման համար գլյուկոզի ստացված քանակությունը բազմապատկել 0,9-ի (գլիկոգենում գլյուկոզի մնացորդի մոլեկուլային զանգվածը 162,1 է, գլյուկոզի մոլեկուլային զանգվածը 180,1 է. 162,1:180,1=0,9):

Աշխատանք 2
Գլյուկոզի քանակական որոշումը էնզիմատիկ եղանակով

Մեթոդի հիմքում է գլյուկոզի օքսիդացումը գլյուկոզաօքսիդազով: Այս մեթոդը թույլ է տալիս տարբեր վերականգնող միացությունների ներկայությամբ որոշել արյան մեջ գլյուկոզի քանակությունը:

Ռեակտիվներ՝ գլյուկոզի էտալոնային լուծույթ (10 մմոլ/լ), սուբստրատ-ֆերմենտային խառնուրդ՝ աշխատանքային ռեակտիվ (գլյուկոզաօքսիդազ, պերօքսիդազ, 4-խլոր 3-մեթիլֆենոլ 4-ամինաֆենազոն)

Աշխատանքի ընթացքը

2 մլ ճագարի արյունը (արյան մակարդուկի առաջացման նպատակով, արյունը թողնել 5 րոպե) ցենտրիֆուգել 10 րոպե, 3000 պտ/ր արագությամբ: Առաջացած շիճուկում որոշել գլյուկոզի քանակությունը: Առաջին փորձանոթի մեջ (փորձնական նմուշ) լցնել 0,02 մլ արյան շիճուկ, 3 մլ աշխատանքային ռեակտիվ, երկրորդ փորձանո-

թի մեջ (էտալոնային նմուշ) լցնել 0,02 մլ գլյուկոզի լուծույթ և 3 մլ աշխատանքային ռեակտիվ, երրորդ փորձանոթի մեջ (ստուգիչ նմուշ)՝ 0,02 մլ թորած ջուր և 3 մլ աշխատանքային ռեակտիվ: Խառնուրդները ինկուբացնել 15 րոպե, 37˚C պայմաններում: Ինկուբացիայից 5-10 րոպե անց նմուշները ինտենսիվ թափահարել: Չափել փորձնական և էտալոնային նմուշների օպտիկական խտությունը ստուգիչ նմուշի դիմաց (ալիքի երկարությունը 470-540 նմ, կյուվետի լայնությունը 0,5 սմ):

Հաշվարկ՝ C =10 x A/Э

A - փորձնական նմուշի օպտիկական խտությունը

Э - էտալոնային նմուշի օպտիկական խտությունը

C – գլյուկոզի փորձնական նմուշի խտությունը (մմոլ/լ)

10 - գլյուկոզի ստանդարտ նմուշի խտությունը (մմոլ/լ)

Նորմայում մարդու արյան շիճուկում գլյուկոզի քանակությունը 3,6-6,4 մմոլ/լ է:

Աշխատանք 3
Գլյուկոզի քանակական որոշումը օրտոտոլուիդինային եղանակով

Ռեակտիվներ՝ օրտոտոլուիդինային ռեակտիվ, գլյուկոզի ստանդարտ լուծույթ (1մգ/մլ):

Աշխատանքի ընթացքը

Գլյուկոզը օրտոտոլուիդինային ռեակտիվի հետ տաքացնելիս առաջացնում է կանաչ գունավորում:

Գլյուկոզի ստանդարտ լուծույթին (0,2 մլ) և գլյուկոզի անհայտ կոնցենտրացիայով լուծույթին (0,2 մլ) ավելացնել 2-ական մլ օրտոտոլուիդինային ռեակտիվ: Նմուշները տեղադրել եռացող ջրային բաղնիք (8 րոպե), սառեցնելուց հետո գունաչափել (ալիքի երկարությունը 590-650 նմ):

$$C_x = E_x/E_{ստ} \times C_{ստ}$$

$C_{ստ}$ - գլյուկոզի կոնցենտրացիան ստանդարտ լուծույթում (մգ/մլ)

C_x - գլյուկոզի կոնցենտրացիան հետազոտվող լուծույթում (մգ/մլ)
E_x - հետազոտվող լուծույթի օպտիկական խտությունը
$E_{ստ}$ - ստանդարտ լուծույթի օպտիկական խտությունը

Աշխատանք 4
Ինսուլինի ազդեցությունը գլյուկոզի քանակության վրա

Ռեակտիվներ՝ ինսուլին, հեպարին, ֆիզիոլոգիական լուծույթ (0,9% NaCl), 40% գլյուկոզի լուծույթ, էթիլ սպիրտ, գլյուկոզի խտության որոշման ռեակտիվներ:

Աշխատանքի ընթացքը

Որոշել ճագարի արյան գլյուկոզի քանակությունը գլյուկոզաոքսիդազային եղանակով: Արյանը ավելացնել 1,5 միավոր կենդանու ինսուլին՝ 1 կգ կշռի հաշվարկով: Ինսուլինի 1մլ պրեպարատը պարունակում է 20-40 միավոր: Ինսուլինը նոսրացնել ֆիզլուծույթով՝ ծավալը հասցնելով 3 մլ-ի: Ճագարին ներարկել 2 մլ ինսուլին: 1 ժամ անց նորից վերցնել արյուն և որոշել գլյուկոզի քանակությունը:

Աշխատանք 5
Ադրենալինի ազդեցությունը գլյուկոզի քանակության վրա

Ադրենալինի ազդեցությունը արտահայտվում է նույնիսկ չնչին քանակությունների դեպքում՝ 0,0001 մլ 1 կգ զանգվածի համար: Ադրենալինի ենթամաշկային ներարկման դեպքում գլուկոզի քանակությունը արյան մեջ բարձրանում է (հիպերգլիկեմիա): Եթե գլյուկոզի մակարդակը 8,88 մմոլ/լ-ից բարձր է, գլյուկոզը արտազատվում է մեզով (գլյուկոզուրիա):

Ռեակտիվներ՝ ադրենալին, հեպարին, ֆիզիոլոգիական լուծույթ (0,9% NaCl), 40% գլյուկոզի լուծույթ, գլյուկոզի քանակական որոշման ռեակտիվներ:

Աշխատանքի ընթացքը

Որոշել ճագարի արյան գլյուկոզի քանակությունը գլյուկոզաօքսիդազային եղանակով: Ճագարին ներարկել ադրենալինի 0, 1% լուծույթ (0,3 մլ 1կգ մարմնի զանգվածին): Ներարկումից 30 րոպե անց նորից վերցնել արյուն և որոշել գլյուկոզի քանակությունը:

Աշխատանք 6
Ալդոլազի ակտիվության որոշումը արյան շիճուկում

Ալդոլազը բարձրասպեցիֆիկ ֆերմենտ է, տրոհում է ֆրուկտոզա-1,6-դիֆոսֆատը երկու ֆոսֆոտրիոզների: Այն ներկա է մարդու և կենդանիների գրեթե բոլոր օրգաններում և հյուսվածքներում: Որոշ հիվանդությունների դեպքում ակտիվությունը աճում է (ցիրոզ, հեպատիտ, խոլեցիստիտ), ակտիվության զգալի աճ գրանցվում է վիրուսային հեպատիտի դեպքում (հատկապես ախտահարման առաջին օրերին):

Ռեակտիվներ՝ 0,5% $NaHCO_3$, 0,56 M հիդրազինսուլֆատ, 0,002 M CH_2ICOOH, 0,06 M 1,6-ֆրուկտոզադիֆոսֆատ, 10% ԵԴԴ, 3% NaOH, 0,1% դինիտրոֆենիլհիդրազին:

Աշխատանքի ընթացքը

Փորձնական նմուշը պարունակում է 0,5 մլ արյան շիճուկ, 0,5 մլ $NaHCO_3$, 0,12 մլ հիդրազինսուլֆատ, 0,12 մլ CH_2ICOOH, 0,12 մլ ջուր, 0,12 մլ 1,6-ֆրուկտոզադիֆոսֆատ: Ստուգիչ նմուշը պարունակում է նույն լուծույթները՝ բացառությամբ 1,6-ֆրուկտոզադիֆոսֆատի: Փորձանոթները ինկուբացնել 1 ժամ, 37˚C պայմաններում: Ինկուբացիայից հետո ստուգիչ փորձանոթի մեջ ավելացնել 0,12 մլ 1,6-ֆրուկտոզադիֆոսֆատ: Երկու փորձանոթների մեջ ավելացնել 1,5–ական մլ ԵԴԴ, լավ խառնել, լուծույթները ֆիլտրել կամ ցենտրիֆուգել: 0,5-ական մլ ֆիլտրատների վրա ավելացնել 0,5–ական մլ NaOH և թողնել 10 րոպե (սենյակային ջերմաստիճան): Ավելացնել 0,5-ական մլ 2,4-դինիտրոֆենիլհիդրազին, լուծույթները տաքացնել 10 րոպե

(37°C), ավելացնել 3-ական մլ NaOH, թողնել ևս 10-20 րոպե, մինչև գունավորման զարգացումը: Ստացված նմուշների օպտիկական խտությունը որոշել ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով (կանաչ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0,5 սմ): Ալդոլազի ակտիվությունը արտահայտվում է էքստինկցիայի արժեքներով՝

E x (Eփ-Eստ) x 100:

Ստացված արժեքը անվանվում է ալդոլազի ակտիվության միավոր:

Նորմայում 0,5 մլ արյան շիճուկում պարունակվող ալդոլազի քանակությունը տրոհում է 1,6-ֆրուկտոզադիֆոսֆատի այնպիսի քանակություն, որը համապատասխանում է ֆերմենտի ակտիվության 3-8 միավորի:

Աշխատանք 7
Էրիթրոցիտների գլիկոլիտիկ ակտիվության որոշում

Ռեակտիվներ՝ գլյուկոզի էտալոնային լուծույթ (10 մմոլ/լ), գլյուկոզի քանակական որոշման ռեակտիվներ, 5% ԵՔՔ, Կրեբս-Ռինգերի լուծույթ (2 մլ 0,6 M NaCl, 1 մլ 56mM $MgCl_2$, 1 մլ 20mM $CaCl_2$, 1 մլ 10mM Na_2HPO_4, 4մլ 60mM տրիս HCl-բուֆեր, pH=7,4):

Աշխատանքի ընթացքը

Ճագարի հեպարինացված արյունը ցենտրիֆուգել, հեռացնել պլազմայի շերտը՝ լեյկոցիտար սպիտակ թաղանթը, էրիթրոցիտար զանգվածը առանձնացնել, որոշել հեմատոկրիտը՝ օգտագործելով հեմատոկրիտ կապիլյարներ: Հեմատոկրիտի արժեքը որոշվում է էրիթրոցիտար սյան երկարության և կապիլյարի երկարության հարաբերությամբ (արտահայտված %-ով): Պատրաստել ինկուբացիոն նմուշ՝ 1 մլ էրիթրոցիտներ հայտնի խտությամբ, 2 մլ Կրեբս-Ռինգերի լուծույթ, գլյուկոզ (10 mM): Ինկուբացիոն նմուշը բաժանել երկու մասի: Մեկ փորձանոթը (ստուգիչ նմուշ) թողնել սառը պայմաններում: Երկրորդ փորձանոթը (փորձնական նմուշ) ինկուբացնել 1ժամ, 37^0C

պայմաններում: Նմուշներին ավելացնել 1,5-ական մլ ԵՔՔ (սպիտակուցները նստեցնելու և ռեակցիան կանգնեցնելու նպատակով), 5 րոպե անց նմուշները ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000 պտ/ր արագությամբ: Գլյուկոզաօքսիդազային մեթոդով որոշել գլյուկոզի կոնցետրացիան վերնստվածքում: Հաշվարկել գլիկոլիտիկ ակտիվությունը.

$$A=100K\ (a-b)\ x\ Ht:$$

A-էրիթրոցիտների գլիկոլիտիկ ակտիվություն, 1մլ էրիթրոցիտներում 1 ժամ ինկուբացիայի ընթացքում ծախսված գլյուկոզը (մկմոլ)

a-գլյուկոզի խտությունը ստուգիչ նմուշներում (մկմոլ/մլ)

b-գլյուկոզի խտությունը փորձնական նմուշում (մկմոլ/մլ)

K-նոսրացման գործակից (6)

Ht-հեմատոկրիտ (%)

100-հեմատոկրիտի վերահաշվարկի գործակից (%)

Աշխատանք 8
Պանկրեատիկ ամիլազ

Պանկրեատիկ ամիլազ պարունակող պրեպարատը անջատվում է ենթաստամոքսային գեղձից ջրային գլիցերինով: Ամիլազից բացի պրեպարատը պարունակում է լիպազներ և պրոտեազներ: Վերջիններից կարելի է ազատվել լուծույթը սպիտակ կավով աղտորբելով: Ենթաստամոքսային գեղձը անջատել ճարպային հյուսվածքից, մանրացնել, լուծել ացետոնով և թափահարել 2 ժամ, այնուհետև ֆիլտրել, նստվածքը նորից մշակել ացետոնով, հետո ացետոն-եթեր խառնուրդով (1:1) և վերջում միայն եթերով (երկու անգամ, կրկնակի ծավալով):

Նստվածքը չորացնել ֆիլտրի թղթի վրա, մանրացնել, մաղել (ստացվում է բաց գույնի փոշի): Պրեպարատը 30˚C պայմաններում մշակել 10 մաս 85% ջրային գլիցերինով կամ 50 մաս ջրով (անջատվում է թափանցիկ լուծույթ, որը պարունակում է տրիպսին, լիպազ, պանկրեատիկ ամիլազ):

Ռեակտիվներ՝ 85% ջրային գլիցերին, 0,25% օսլա, 0,1% NaCl, 0,1N HCl:

Աշխատանքի ընթացքը

Վերցնել 3-ական մլ օսլայի լուծույթով 4 փորձանոթ: Առաջին 2 փորձանոթի մեջ ավելացնել 1-ական մլ H_2O, երրորդի մեջ՝ 1 մլ HCl, չորրորդի մեջ՝ 1մլ NaCl: Հնարավորության դեպքում միաժամանակ 1, 3 և 4 փորձանոթներում ավելացնել 1մլ ամիլազ, 2 փորձանոթում՝ 1մլ եռացրած և սառեցված էքստրակտ: Բոլոր փորձանոթները դնել թերմոստատ (38˚C): Ժամանակ առ ժամանակ փորձանոթներից վերցնել մեկ կաթիլ հեղուկ և հետևել օսլայի ճեղքման արագությանը: Երկրորդ փորձանոթում օսլան չի ճեղքվում, քանի որ ֆերմենտը ինակտիվացված է, երրորդում՝ ճեղքումը դանդաղ է ընթանում, բարձր թթվայնության պատճառով (ամիլազը ակտիվ է pH=6,8 պայմաններում):

Բաժին 2

Լիպիդներ

Լիպիդները բնութագրվում են ջրում չլուծվելու հատկությամբ, լուծվում են օրգանական լուծիչներում (քլորոֆորմ, եթեր, էթանոլ, բենզոլ): Բջջի կենսագործունեության մեջ լիպիդները իրականացնում են տարբեր ֆունկցիաներ՝ ձևավորում են բջիջների թաղանթների կառուցվածքը, հանդիսանում էներգիայի աղբյուր, լինելով վատ ջերմահաղորդիչ՝ օրգանիզմը պաշտպանում են ցրտից և տաքից, որոշ լիպիդներ իրականացնում են կարևոր ֆիզիոլոգիական ֆունկցիաներ (էյկոզանոիդներ, ստերոիդային հորմոններ): Քանի որ լիպիդների մեծ մասը ջրում չլուծվող է, դրանց փոխադրումը արյան մեջ ընթանում է հատուկ ձևով: Լիպիդները փոխադրվում են սպիտակուցի հետ միացած՝ լիպոպրոտեիների ձևով: Այդ կոմպլեքսները առաջանում են աղիքների լորձաթաղանթում և լյարդում:

Բոլոր լիպիդները կարելի է բաժանել երկու մեծ խմբի՝ օճառացվող և չօճառացվող: Չօճառացվող խմբին են դասվում ստերոիդները՝ խոլեստերոլ և խոլեստերոլի ածանցյալներ (ստերոիդ հորմոններ, ստերոիդ վիտամիններ, լեղաթթուներ): Օճառացվող լիպիդներն են պարզ լիպիդները, որոնք բաղկացած են սպիրտից և ճարպաթթուներից (մոմեր, ացիլգլիցերիդներ), և բարդ լիպիդները, որոնք բացի սպիրտից և ճարպաթթուներից պարունակում են նաև այլ միացություններ (գլիկոլիպիդներ, սֆինգոլիպիդներ, ֆոսֆոլիպիդներ):

Աշխատանք 9
Ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների որոշումը արյան շիճուկում

Ֆոսֆոլիպիդների քանակության աճ գրանցվում է շաքարային դիաբետի ծանր ձևերի, էսենցիալ հիպերլիպեմիայի, երիկամային կոմայի դեպքում: Ֆոսֆոլիպիդների քանակության նվազում դիտվում է աթերոսկլերոզի, սակավարյունության, ալիմենտար դիստրոֆիայի ժամանակ: Նորմայում ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների պարունակությունը արյան շիճուկում 1,52-3,62գ/լ է (152-362 մգ%): Ֆոսֆոլիպիդների խտությունը որոշում են լիպիդային ֆոսֆորի քանակությամբ. ֆոսֆորը կազմում է լիպիդների մոլեկուլյար զանգվածի 4%: Բազմապատկելով լիպիդային ֆոսֆորի ստացված քանակությունը 25-ի՝ կարելի է հաշվարկել ֆոսֆոլիպիդների ընդհանուր քանակությունը: Լիպիդային ֆոսֆատը որոշում են կա՛մ լիպիդային էքստրակտում, կա՛մ արյան շիճուկում՝ սպիտակուցները ԵՔՔ-ով նստեցնելուց հետո:

Ռեակտիվներ՝ 10% ԵՔՔ, 42% $HClO_4$, 2,5% ամոնիումի մոլիբդատ, KH_2PO_4 -ի ստանդարտ լուծույթ (1մգ/մլ), KH_2PO_4- ի աշխատանքային լուծույթ (ստանդարտ լուծույթը նոսրացնել 100 անգամ. 1մլ աշխատանքային լուծույթը կպարունակի 10 մկգ ֆոսֆոր), 1% ասկորբինաթթու պատրաստված 0,1N HCl-ում (պահել սառնարանում):

Աշխատանքի ընթացքը

Փորձանոթի մեջ լցնել 3 մլ ջուր և 0,2 մլ արյան պլազմա կամ շիճուկ, ավելացնել 3 մլ ԵՔՔ (առաջին 1,5 մլ ավելացնել կաթիլներով, մյուս 1,5 մլ՝ ավելի արագ): Խառնուրդը թողնել 2 րոպե, ցենտրիֆուգել 3000 պտ/ր արագությամբ 5 րոպե: Վերնստվածքը դատարկել, նըստվածքին ավելացնել 1 մլ $HClO_4$: Փորձանոթը տաքացնել 20 րոպե եռացող ջրային բաղնիքում մինչև լուծույթի անգունացումը: Փորձանոթը սառեցնելուց հետո լուծույթին ավելացնել 5 մլ H_2O: Պատրաստել մեկ ստանդարտ և մեկ ստուգիչ նմուշներ: Երկու փորձանոթների մեջ լցնել 0,8-ական մլ $HClO_4$, ստանդարտ նմուշին ավելացնել 2 մլ

ֆոսֆատի աշխատանքային լուծույթ, փորձանոթների ծավալը ջրով հասցնել 6 մլ-ի: Բոլոր երեք փորձանոթների մեջ ավելացնել 1-ական մլ ամոնիումի մոլիբդատ, 0,5 մլ ասկորբինաթթու, ծավալը հասցնել 10 մլ, լուծույթները խառնել, թողնել 5 րոպե (սենյակային ջերմաստիճան): Նմուշները կոլորիմետրել ստուգիչի դիմաց (կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1,0 սմ):

Հաշվարկ՝

Արյան պլազմայի կամ շիճուկի լիպիդային ֆոսֆատը = 10 x Եփ/Eստ

Մմոլ-ի անցնելու համար ստացված արժեքը բազմապատկել 0,3229 գործակցով, արդյունքը բազմատկել 25-ի, ստանալ ֆոսֆոլիպիդների պարունակությունը:

Առողջ մարդու լիպիդային ֆոսֆատի քանակությունը 1,97-4,68 մմոլ է:

Աշխատանք 10
Ուղեղի լեցիտինների անջատում, իդենտիֆիկացիա

Ռեակտիվներ՝ 10% NaOH, $CdCl_2$-ի սպիրտային լուծույթ, 10% HCl, 1% ամոնիումի մոլիբդատ, $MgSO_4$, KNO_3, Na_2CO_3

Աշխատանքի ընթացքը

1) լեցիտինների անջատումը ուղեղից. 0,5-1գ ուղեղի հյուսվածքին ավելացնել 3-5 մլ տաք սպիրտ, դնել ջրային բաղնիք 10-15 րոպե (50-60^{0}C): Էքստրակցիայի ավարտից հետո, հեղուկը ֆիլտրել և ֆիլտրատում կատարել իդենտիֆիկացիա:

2) 10 կաթիլ ֆոսֆատիդների սպիրտային լուծույթին ավելացնել 2-4 կաթիլ $CdCl_2$ հագեցած սպիրտային լուծույթ, առաջանում է կադմիական լեցիտինի սպիտակ նստվածք: Եթե ջրով փորձանոթի մեջ ավելացնել ֆոսֆատիդների լուծույթից 5-7 կաթիլ, կառաջանա լեցիտինի սպիտակ էմուլսիա:

3) Լեցիտինների հիդրոլիզ՝ լեցիտինների ֆիլտրատի մեծ մասը ջրազրկել փորձանոթում, ավելացնել 2-3 մլ 10% NaOH-ի լուծույթ, եռացնել 5-10 րոպե: Տեղի է ունենում լեցիտինի հիդրոլիտիկ քայքայում՝ անջատվում է խոլին, գլիցերին, ֆոսֆորական թթու:

Հիդրոլիզատում բացահայտել ճարպաթթուները, գլիցերինը, ֆոսֆորական թթուն: Հիդրոլիզատը թթվայնեցնել 10% HCl-ի լուծույթով, առաջանում է ազատ ճարպաթթուների նստվածք: Նստվածքը ֆիլտրել, ֆիլտրատը չեզոքացնել 10% հիմքի լուծույթով և ջրազրկել ջրային բաղնիքում: Գլիցերինի բացահայտման նպատակով չոր նստվածքի մի մասին ավելացնել $MgSO_4$-ի բյուրեղներ և տաքացնել, առաջանում է ակրոլեին (յուրահատուկ գրգռիչ հոտ): Չոր նստվածքի մյուս մասին ավելացնել 2 մլ խիտ HCl, տաքացնել 2 մլ մոլիբդենաթթվային ամոնիումի առկայությամբ: Առաջանում է ֆոսֆոմոլիբդենաթթվային ամոնիում (դեղին նստվածք), ինչը հաստատում է ֆոսֆորական թթվի առկայությունը:

Աշխատանք 11
Պանկրեատիկ լիպազ

Ճարպերի կամ եռացիլգլիցերինների հիդրոլիզը ընթանում է բարակ աղիներում, կատալիզվում է ենթաստամոքսային գեղձում արտադրվող լիպոլիտիկ ֆերմենտներով՝ պանկրեատիկ լիպազներով: Պանկրեատիկ լիպազը արագացնում է ճարպերում բարդ եթերային կապերի հիդրոլիզը:

Ռեակտիվներ՝ 1% Na_2CO_3, ֆենոլֆտալեին, գլիցերին

Աշխատանքի ընթացքը

Երկու փորձանոթների մեջ լցնել 5-ական մլ եռացրած և սառեցրած կաթ, ավելացնել 1 կաթիլ ֆենոլֆտալեինի լուծույթ և զգուշորեն (կաթիլներով) Na_2CO_3 լուծույթ մինչև վարդագույն գունավորում ստանալը: Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել 1մլ գլիցերինային էքստրակտ, երկրորդի մեջ՝ 1մլ նույն էքստրակտից, բայց եռացրած: Փոր-

ձանոթները դնել թերմոստատ 37˚C պայմաններում (20-25 րոպե): Առաջին փորձանոթում գունավորումը անհետանում է, քանի որ հիմքի ավելցուկը փոխազդում է լիպոլիզի հետևանքով առաջացած ճարպաթթուների հետ, երկրորդ փորձանոթում գունավորման փոփոխություն չի նկատվում, քանի որ լիպազը ինակտիվացված է տաքացմամբ:

Ռեակտիվներ՝ ֆենոլֆտալեինի սպիրտային լուծույթ, 0,01M NaOH, լիպազ պարունակող պանկրեատին, կաթ (նոսրացված 1:10):

Աշխատանքի ընթացքը

Ստուգիչ փորձանոթում լցնել 10 մլ կաթ և նախապես ինակտիվացված (եռացնելով) 1մլ լիպազ, առաջին (փորձնական) նմուշի մեջ լցնել 10 մլ կաթ և 1մլ լիպազ, երկրորդի մեջ՝ 10 մլ կաթ, 1 մլ լիպազ և 1մլ լեղի: Ինկուբացիոն նմուշները խառնել, յուրաքանչյուր նմուշից 2-ական մլ տեղափոխել տիտրման բաժակի մեջ, ավելացնել 2-ական կաթիլ ֆենոլֆտալեին, տիտրել NaOH-ով մինչև թույլ վարդագույն գունավորում: Առաջին տիտրումից չեզոքացվում են օրգանական թթուները՝ կաթնային և այլ: Մնացած նմուշները դնել թերմոստատ (38-40˚C): 10, 20, 30, 40 րոպե պարբերականությամբ յուրաքանչյուր նմուշից վերցնել 2-ական մլ և NaOH-ի լուծույթով տիտրել: Տիտրման ժամանակը և ծախսված NaOH-ի քանակությունը ֆիքսել աղյուսակում: Երկրորդ և երրորդ նմուշների տիտրման արժեքից հանել առաջին նմուշի տիտրման արժեքը (մինչև լիպազի ազդեցությունը): Ստացված տվյալների հիման վրա կառուցել կոր: Աբսցիսների առանցքին նշել ժամանակը (րոպե), օրդինատների առանցքին՝ լիպազի ակտիվությունը՝ արտահայտված տվյալ ժամանակահատվածում առաջացած ճարպաթթուների չեզոքացման համար ծախսված NaOH-ի ծավալով (մլ):

Բաժին 3

Սպիտակուցներ

Սպիտակուցները ամինաթթուներից կազմված, բարձրամոլեկուլային զանգված ունեցող օրգանական պոլիմեր միացություններ են՝ օժտված բազմաթիվ կենսաբանական ֆունկցիաներով: Սպիտակուցները իրականացնում են կյանքի դրսևորման բազմազանությունը՝ արգելակում, դրդում, աճ, բազմացում, ժառանգականություն: Բջջի կենսագործունեությունը ապահովող պրոցեսները իրականացվում են սպիտակուցային բնույթ ունեցող միացությունների՝ ֆերմենտների օգնությամբ: Ֆերմենտները ամենաբազմազան և բարձր մասնագիտացված սպիտակուցներն են:

Սպիտակուցների կառուցվածքային միավորներ են ամինաթթուները: Սպիտակուցներում ամինաթթուները միացած են պեպտիդային կապերով: Այս ձևով կառուցված պոլիմերները կոչվում են պեպտիդներ: Պոլիպեպտիդային շղթաները տարածության մեջ ունեն յուրահատուկ կառուցվածքներ, որոնք հայտնի են որպես կոնֆորմացիաներ (համաձևություններ): Սպիտակուցները կարող են ձևափոխվել տարածության մեջ՝ կենսաբանական ֆունկցիաների իրականացման ժամանակ: Դրանց կենսաբանական ֆունկցիաների յուրահատկությունը կախված է կոնֆորմացիայից, որի խախտումը կարող է հանգեցնել սպիտակուցի կենսաբանական ակտիվության կորստի: Սպիտակուցները կարելի է դասակարգել երկու հիմնական սկզբունքով՝ ըստ իրենց ֆիզիկաքիմիական հատկությունների և կենսաբանական ֆունկցիաների:

Աշխատանք 12
Ալբումինի նատիվ ու բնափոխված ձևերի և Ca^{2++} իոնների փոխազդեցությունը

Տարբեր ֆիզիկական գործոնների (ջերմաստիճան, ՈՒՃ, γ-ճառագայթում), քիմիական գործոնների (թթուներ, հիմքեր, սպիրտներ) և այլ գործոնների ազդեցությամբ սպիտակուցները կորցնում են իրենց նատիվ կառուցվածքը: Սպիտակուցի դենատուրացված ձևերը ձեռք են բերում այլ էլեկտրոֆորետիկ շարժունակություն, լուծելիություն և այլն: Շատ սպիտակուցներ դենատուրացվում են 50-60^{0}C պայմաններում: Այս ջերմաստիճանի դեպքում տեղի է ունենում երրորդային կառուցվածքի քայքայում, սպիտակուցային գլոբուլան ապապարուրվում է, ավելանում է ազատ COOH և SH-խմբերի քանակությունը: Պոլիպեպտիդային շղթաները առաջացնում են խառը չկարգավորված կառուցվածքներ՝ ծավալուն ասոցիատներ, ինչը նվազեցնում է սպիտակուցների լուծելիությունը (առաջանում են նստվածքներ): Այդ պրոցեսը կարող է միջավայրի ջերմաստիճանի իջեցման հետևանքով ավելի արագ ընթանալ Ca^{++}-ի իոնների ներկայությամբ: Ca^{++} իոնները կարող են առաջացնել կապեր պոլիպեպտիդային շղթայի ամինաթթվային մնացորդների լիցքավորված ֆունկցիոնալ խմբերի հետ, իսկ ջերմաստիճանի իջեցումը կնպաստի ձևավորված ասոցիատների շարժունակության նվազեցմանը կոլոիդ լուծույթում: Ռեակտիվներ՝ 10% ալբումին, $CaCl_2$ (10,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,01% ջրային լուծույթներ):

Ca^{++} իոնների և նատիվ ալբումինի կոմպլեքսառաջացումը. երկու փորձանոթների մեջ լցնել 1,5 մլ 10% ալբումին: Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել 0,5 մլ 10% $CaCl_2$, երկու փորձանոթների ծավալը հասցնել 5 մլ և գրանցել լուծույթների գունային փոփոխությունը:

Ca^{++} իոնների կոմպլեքսառաջացումը բնափոխված ալբումինի հետ. նախորդ փորձի փորձանոթները դնել եռացող ջրային բաղնիք և

հետևել լուծույթների գույնի փոփոխությանը՝ կախված ժամանակի և ջերմաստիճանի փոփոխությունից:

Տարբեր խտության ալբումինի կոմպլեքսառաջացումը Ca^{++} իոնների հետ. տասը փորձանոթներ տեղադրել երկու շարքով, երկու շարքերի փորձանոթների մեջ լցնել 2,5; 1,0; 0,5; 0,25 և 0,1-ական մլ 10% ալբումին: Առաջին շարքի փորձանոթների մեջ ավելացնել 0,5-ական մլ 10% $CaCl_2$: Բոլոր փորձանոթների ծավալները հասցնել 5 մլ և դնել եռացող ջրային բաղնիք, 10 րոպե անց սառեցնել, գունավորման փոփոխությունները գրանցել աղյուսակում:

	10% ալբումին (մլ)	**10% $CaCl_2$ (մլ)**	**H_2O (մլ)**	**Ընդհանուր ծավալ (մլ)**	**Ալբումինի խտություն փորձում (%)**	**Արդյունք**
1	2,5	0,5	2,0	5,0	5,0	
2	1,0	0,5	3,5	5,0	2,5	
3	0,5	0,5	4,0	5,0	1,0	
4	0,25	0,5	4,25	5,0	0,5	
5	0,1	0,5	4,4	5,0	0,1	
6	2,5	–	2,5	5,0	5,0	
7	1,0	–	4,0	5,0	2,5	
8	0,5	–	4,5	5,0	1,0	
9	0,25	–	4,75	5,0	0,5	
10	0,1	–	4,9	5,0	0,1	

Տարբեր խտության Ca^{++} իոնների կոմպլեքսառաջացումը բնափոխված ալբումինի հետ. շտատիվի վրա տեղադրել 11 փորձանոթ երկու շարքով, առաջին շարքի 5 փորձանոթների մեջ լցնել 5-ական մլ $CaCl_2$ 10,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,01% լուծույթներ: Առաջին շարքի փորձանոթներից վերցնել 0,5-ական մլ $CaCl_2$ և համապատասխանաբար լցնել երկրորդ շարքի համապատասխան փորձանոթների մեջ, որից հետո երկրորդ շարքի փորձանոթների մեջ ավելացնել 1,5-ական մլ 10% ալբումին: Բոլոր փորձանոթների ծավալը ջրով հասցնել 5 մլ:

Ստուգիչ փորձանոթի մեջ լցնել 1,5 մլ ալբումին և 3,5 մլ թորած ջուր: Երկրորդ շարքի 6 փորձանոթները դնել ջրային բաղնիք (10 րոպե): Տեղի ունեցած գունային փոփոխությունները գրանցել աղյուսակում: Համեմատել տաքացումից հետո առաջացած փոփոխությունները փորձնական և ստուգիչ նմուշներում:

Երկ-րորդ շարքի փորձ	**$CaCl_2$ նախ-նական խտություն (%)**	**$CaCl_2$ լ-թի ծավալ (մլ)**	**$CaCl_2$ լ-թի խտու-թյուն (%)**	**Ալբումին (մլ)**	**H_2O (մլ)**	**Արդ-յունք**
1	10,0	0,5	1,0	1,5	3,0	
2	1,0	0,5	0,1	1,5	3,0	
3	0,5	0,5	0,05	1,5	3,0	
4	0,1	0,5	0,01	1,5	3,0	
5	0,01	0,5	0,001	1,5	3,0	
Ստ.	–	–	–	1,5	3,5	

Աշխատանք 13
Պարզ սպիտակուցների մարսումը աղեստամոքսային ուղիներում

Ստամոքսահյութի թթվայնության որոշումը կարևորվում է որոշ հիվանդությունների ախտորոշման ժամանակ: Ցածր թթվայնություն (հիպոքլորհիդրիա) հանդիպում է հիպոացիդային գաստրիտի, երբեմն նաև ստամոքսի խոցի դեպքում: Աքլորհիդրիան առաջանում է խրոնիկ գաստրիտի, ստամոքսի քաղցկեղի դեպքում: HCl-ի և պեպսինի (ախիլիա) բացակայությունը հաճախ վկայում է ստամոքսի չարորակ նորագոյացության մասին: Աքլորհիդրիան ուղեկցվում է ստամոքսում խմորման արգասիքների առաջացմամբ (կաթնաթթու, քացախաթթու): Ազատ HCl-ի և ընդհանուր թթվայնության աճը (հիպերքլորհիդրիա) ի հայտ է գալիս հիպերացիդային գաստրիտի, տասներկումատնյա աղիքի, ստամոքսի խոցի դեպքում:

Ընդհանուր թթվայնության, ազատ և կապված աղաթթվի որոշումը ստամոքսահյութում

Դիմեթիլամինաազոբենզոլի գունավորման փոփոխությամբ (կարմիրից նարնջագույնի) որոշվում են ազատ աղաթթուները, ֆենոլֆտալեինի գունավորման փոփոխությամբ (անգույնից վարդագույնի) որոշվում է ստամոքսահյութի ընդհանուր թթվայնությունը:

Ռեակտիվներ՝ 0,1N NaOH, ֆենոլֆտալեինի 1% սպիրտային լուծույթ, դիմեթիլամինաազոբենզոլի 0,5% սպիրտային լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը

Անոթի մեջ լցնել 5 մլ հետազոտվող ստամոքսասահյութ, ավելացնել 2 կաթիլ դիմեթիլամինաազոբենզոլ և ֆենոլֆտալեին: Ազատ HCl-ի ներկայությամբ դիտվում է կարմիր գունավորում, թթվի բացակայությամբ լուծույթը դեղին է: Տիտրել 0,1N NaOH-ի լուծույթով մինչև կարմրա-նարնջագույն գունավորման առաջացումը և նշել ազատ HCl-ի տիտրման վրա ծախսված հիմքի ծավալը (մլ) - տիտրման I նիշ: Տիտրումը շարունակել մինչև դեղնավուն գունավորում և նորից ֆիքսել տիտրման սկզբից ծախսված հիմքի ծավալը (II նիշ): Տիտրումը շարունակել մինչև վարդագույն գունավորումը և որոշել տիտրման սկզբից ծախսված հիմքի ծավալը (III նիշ):

Հաշվարկ՝

Որպես թթվայնության միավոր ընդունվում է 0,1N NaOH-ի ծավալը, որն անհրաժեշտ է 100 մլ ստամոքսահյութի թթվային համարժեքի չեզոքացման համար:

Օրինակ. 5 մլ ստամոքսահյութի տիտրմանը մինչև I նիշ ծախսվել է 2 մլ NaOH, մինչև II նիշ՝ 2,22 մլ, մինչև III նիշ՝ 3,18 մլ:

ա) ազատ HCl պարունակությունը՝ (2x100):5=40 մմոլ/լ

բ) ընդհանուր HCl-ի պարունակությունը հաշվարկվում է ինչպես միջին թվաբանականը տիտրման II և III նիշերի միջև:

$$(2,22+3,18): 2 \times (100:5)=54 \text{ մմոլ/լ}$$

գ) կապված HCl-ի քանակությունը կկազմի 54-40=14 մմոլ/լ

դ) ընդհանուր թթվայնությունը՝ (3,18 x 100):5=63,6 մմոլ/լ
նորմալ արժեքներ՝ ազատ HCl- 20-40 մմոլ/լ
կապված HCl- 10-20 մմոլ/լ
ընդհանուր թթվայնություն- 40-60 մմոլ/լ:

Կաթնաթթվի բացահայտումը ստամոքսահյութում (Ուֆելմանի ռեակցիա)

Ռեակտիվներ՝ 1% ֆենոլ, 1% $FeCL_3$, 40% կաթնաթթու

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել երկաթի ֆենոլյատի լուծույթ՝ 2 մլ ֆենոլին ավելացնել 3 կաթիլ $FeCl_3$: Ստացված խառնուրդը տեղափոխել երեք փորձանոթի մեջ:

Առաջին փորձանոթում ավելացնել կաթիլներով կաթնաթթու, երկրորդում՝ նորմալ ստամոքսահյութ, երրորդում՝ պաթոլոգիկ ստամոքսահյութ: Առաջին փորձանոթում մանուշակագույն երանգավորումը փոխվում է դեղնականաչավունի, կաթնաթթվի բացակայությամբ հեղուկը անգունանում է:

Աշխատանք 14
Սպիտակուցների թթվային հիդրոլիզ, ֆորմոլային տիտրում

Սպիտակուցների առաջնային կառուցվածքի բացահայտման առումով կարևոր մեթոդ է լաբորատոր պայմաններում իրականացվող թթվային հիդրոլիզը, որի արդյունքում սպիտակուցը տրոհվում է ցածրամոլեկուլյար պեպտիդների, դիպեպտիդների, ամինաթթուների: Պեպտիդային կապերի քայքայումից առաջացած COOH–խմբերի քանակության որոշման համար կիրառվում է ֆորմոլային տիտրում: Սակայն ջրային լուծույթում ամինաթթուները առաջացնում են ներմոլեկուլային աղեր, հետևաբար առանց նախապես ֆորմալդեհիդով ամինախմբերի չեզոքացման հնարավոր չէ հիմքով տիտրել COOH-խմբերը: Ռեակցիայի ընթացքում ֆորմալդեհիդը ամինախմբի

հետ առաջացնում է մեթիլենային միացություն, որը տիտրվում է հիմքով:

Ռեակտիվներ՝ խիտ HCl, 1% և 10% NaOH, 1% CH3COOH, 20% ֆորմալին, ֆենոլֆտալեին (0,25 գ ֆենոլֆտալեինը լուծել 25 մլ էթանոլում, ավելացնել 25 մլ ջուր), 0,05N NaOH, ձվի սպիտակուց (մեկ ձվի սպիտակուցը լուծել 500 մլ ջրում, ֆիլտրել):

Աշխատանքի ընթացքը

1) Սպիտակուցի լուծույթում COOH–խմբերի տիտրումը մինչ հիդրոլիզը. սպիտակուցի 1մլ լուծույթին ավելացնել 5 կաթիլ ֆորմալինի լուծույթ և 3 կաթիլ 0,5% ֆենոլֆտալեինի լուծույթ, 0,05N NaOH -ի լուծույթով տիտրել մինչև բաց վարդագույն գունավորում: Ծախսված հիմքի քանակը ֆիքսել:

2) Սպիտակուցի թթվային հիդրոլիզ. սպիտակուցի 20 մլ լուծույթին ավելացնել 5 մլ խիտ HCl, անոթը փակել խցանով, եռացնել 45 րոպե:

3) COOH–խմբերի տիտրումը սպիտակուցի հիդրոլիզից հետո. հիդրոլիզատը սառեցնել, լցնել գլանի մեջ, ծավալը հասցնել 25 մլ և ֆիլտրել: 1,25 մլ հիդրոլիզատին ավելացնել 3 կաթիլ ֆենոլֆտալեինի լուծույթ և չեզոքացնել 10% NaOH-ով մինչև բաց-վարդագույն երանգավորում (այստեղ NaOH-ը ծառայում է HCl-ի չեզոքացմանը և քանակությունը չի կարևորվում): Եթե չեզոքացման ընթացքում լուծույթը ստանում է վառ կարմիր գունավորում, ավելացնել 1% CH_3COOH կաթիլներով մինչև գունազրկումը (ավելցուկը չեզոքացնել 1%NaOH մինչև բաց վարդագույն գունավորում): Ավելացնել 5 կաթիլ 20% ֆորմալինի լուծույթ, գունազրկված լուծույթը տիտրել 0,05% NaOH-ով մինչև բաց վարդագույն գունավորում, նշել ծախսված հիմքի ճշգրիտ քանակությունը:

Ամինախմբերի ազոտի հաշվարկը կատարում են ծախսված հիմքի քանակով ըստ նորմալության:

1մլ 0,05N NaOH լուծույթին համապատասխանում է 0,07 գ N: Ամինախմբերի քանակությամբ դատում են COOH–խմբերի քանակության մասին:

4) Հիդրոլիզատում սպիտակուցների քայքայման միջանկյալ արգասիքների բացահայտումը բիուրետի ռեակտիվով. փորձանոթների մեջ լցնել 5 մլ սպիտակուցի հիդրոլիզատ և չեզոքացնել 10% NaOH (լակմուսով): Չեզոքացումից հետո կատարել բիուրետի ռեակցիա՝ ավելացնելով 2 կաթիլ $CuSO_4$: Արդյունքում առաջանում է մանուշակագույն գունավորում: Սպիտակուցների լիարժեք հիդրոլիզից (2,5 ժամ) հետո հիդրոլիզատում բիուրետի ռեակցիան բացասական է:

Աշխատանք 15
Պեպսին

Ռեակտիվներ՝0,2% HCl, 0,1N NaOH, ֆենոլֆտալեին

Աշխատանքի ընթացքը

Չորս փորձանոթների մեջ լցնել ֆիբրինի թելիկներ (արյունը խառնել ապակյա ձողիկով, ֆիբրինի թելիկները կանջատվեն ձողիկի վրա): Առաջինի մեջ ավելացնել 5 մլ պեպսին 0,2% HCl-ում, երկրորդի մեջ՝ 5 մլ նույն լուծույթից (նախապես չեզոքացված 0,1N NaOH, ըստ ֆենոլֆտալեինի), երրորդի մեջ՝ 5 մլ նախապես եռացված պեպսինի լուծույթ, չորրորդի մեջ՝ 5 մլ 0,2% HCl:

Բոլոր փորձանոթները միաժամանակ դնել թերմոստատ (38^0C, 20-25 րոպե): Միայն առաջին փորձանոթում կկատարվի պրոտեոլիտիկ ճեղքում, ֆիբրինի թելիկները կլուծվեն, երկրորդ փորձանոթում չեզոք միջավայր է և պեպսինը լիարժեք ակտիվություն չի ցուցաբերում, երրորդում և չորրորդում՝ ռեակցիա չի ընթանում:

Աշխատանք 16
Տրիպսին

Ռեակտիվներ՝ գլիցերին, 0,4% Na_2CO_3, 0,1N HCl, CH_3COOH

Աշխատանքի ընթացքը

Տրիպսին պարունակող պրեպարատ ստանալու համար ենթաստամոքսային գեղձը անջատել ճարպից և շարակցական հյուսվածքից, մանրացնել, թողնել 5-10 ժամ: Ավելացնել ջրային գլիցերին (1գ գեղձին ավելացնել 4-5 մլ քացախաթթվով թթվայնեցված 50% գլիցերին), խառնել և թողնել 2 ժամ: Մեկ օր անց ցենտրիֆուգել, անջատել գլիցերինային էքստրակտը, որը բացի տրիպսինից պարունակում է նաև պանկրեատիկ լիպազ և ամիլազ: Օգտագործելուց առաջ էքստրակտը նոսրացնել՝ ավելացնելով հավասար ծավալով ջուր:

Երեք փորձանոթների մեջ լցնել մեկ-երկու թելիկ ֆիբրին: Առաջին փորձանոթի մեջ լցնել 5 մլ սոդայի լուծույթ և 2 մլ էքստրակտ, երկրորդի մեջ՝ 5 մլ H_2O և 2 մլ նախապես եռացրած էքստրակտ, երրորդի մեջ՝ 5 մլ HCl և 2 մլ էքստրակտ: Փորձանոթները դնել թերմոստատ 38^0C պայմաններում 5-10 րոպե: Հետևել ֆիբրինի թելիկների լուծմանը: Լուծվում է առաջին փորձանոթի ֆիբրինը, քանի որ ֆերմենտը ինակտիվացված չէ և միջավայրի ռեակցիան թույլ հիմնային է:

Բաժին 4

Արյան կենսաքիմիական ցուցանիշներ

Արյունը մասնակցում է օրգանիզմում կատարվող բազմաթիվ կենսական պրոցեսների՝ փոխադրող, պաշտպանողական, ջերմակարգավորման, հումորալ կարգավորման: Արյունը կազմված է պլազմայից և արյան բջիջներից: Արյան ծավալը հարաբերական հաստատուն մեծություն է և չափահաս մարդու մոտ կազմում է մարմնի զանգվածի 7-8 %-ը: Արյան պլազման թափանցիկ, դեղնավուն հեղուկ է: Դրա շուրջ 90-92 %-ը ջուր է, որի մեջ լուծված են օրգանական և անօրգանական նյութեր: Այդ նյութերի 7-8 %-ը սպիտակուցներ են, 0,5-1 %-ը՝ ճարպեր, 0,08-0,12 %-ը՝ ածխաջրեր, 0,9 %-ը՝ անօրգանական աղեր: Արյան բջիջների հիմնական զանգվածը կազմում են էրիթրոցիտները (36-48%), որոնց հիմնական սպիտակուցը հեմոգլոբինն է: Զարգացման ընթացքում էրիթրոցիտները կորցնում են կորիզը և միտոքոնդրիումները ու պահպանում միայն մեմբրանների կառուցվածքները վերականգնող և հակաօքսիդանտային համակարգերը: Էրիթրոցիտների հակաօքսիդանտային համակարգերը շատ կարևոր են, քանի որ այս բջիջները հաճախ ենթարկվում են թթվածնի բացասական ազդեցությանը: Էրիթրոցիտների մետաբոլիզմը իրականացնող ֆերմենտները սինթեզվում են էրիթրոցիտների հասունացման ընթացքում: Էրիթրոցիտներում էներգիայի միակ աղբյուրը գլյուկոզի անաէրոբ օքսիդացումն է մինչև կաթնաթթու:

Աշխատանք 17
Ca^{++}-ի քանակական որոշումը արյան շիճուկում

Արյան շիճուկում Ca^{++}-ի քանակության փոփոխությունը վիտամինների (օրինակ, վիտամին D) անբավարարությամբ պայմանավորված էնդոկրին և նյարդաբանական հիվանդությունների դիագնոստիկ թեստ է:

Ռեակտիվներ՝ 4% ամոնիումի օքսալատ, 2% NH_4OH լուծույթ, 1N H_2SO_4 լուծույթ, 0,01N $KMnO_4$:

Աշխատանքի ընթացքը

Փորձնական նմուշը պարունակում է 1 մլ արյան շիճուկ, ստուգիչ նմուշը՝ 1 մլ H_2O: Երկու փորձանոթների մեջ ավելացնել 1-ական մլ ամոնիումի օքսալաացետատ, թողնել 30 րոպե (սենյակային ջերմաստիճան), ցենտրիֆուգել 3000 պտ/ր արագությամբ 10 րոպե: Վերնըստվածքը հեռացնել, փորձանոթների մեջ ավելացնել 4-ական մլ NH_4OH, խառնել ձողիկով, նմուշները նորից ցենտրիֆուգել (10 րոպե): Վերնստվածքը դատարկել, փորձանոթների մեջ ավելացնել 2-ական մլ H_2SO_4, նորից խառնել ձողիկով մինչև նստվածքի լուծվելը:

Ստացված լուծույթը տիտրել 0,01N $KMnO_4$ լուծույթով մինչև բաց վարդագույն գունավորումը:

Ca^{++}-ի քանակությունը արյան շիճուկում հաշվարկել հետևյալ բանաձևով՝

$$X = 0,2 \times (a-b) \times 100$$

X - Ca^{++}-ի քանակությունը արյան շիճուկում (մգ/%)

a - 0,01N $KMnO_4$ լուծույթի քանակությունը, որը ծախսվել է փորձնական նմուշի տիտրման համար

b - 0,01N $KMnO_4$ լուծույթի քանակությունը, որը ծախսվել է ստուգիչ նմուշի տիտրման համար

0,2 - Ca^{++}-ի քանակությունը (մգ), որը համարժեք է $KMnO_4$ քանակությանը դրա 0,01N լուծույթի 1 մլ-ում:

Նորմայում Ca^{++}-ի քանակությունը մարդու արյան շիճուկում կազմում է 9-11 մգ%:

Աշխատանք 18
Ca^{++}-ի քանակական որոշումը արյան շիճուկում (կոմպլեքսոնոմետրիկ եղանակ)

Ca^{++}-ի քանակությունը արյան շիճուկում նվազում է ռախիտի, հարվահանաձև գեղձի հիպոֆունկցիայի դեպքում, աճում է օստեոմիելիտի, պարոդոնտոզի դեպքում: Ca^{++}-ի որոշման կոմպլեքսոնոմետրիկ եղանակը հիմնված է կոմպլեքսոնի առաջացման վրա, կոմպլեքսոն է հանդիսանում ԷԴՏԱ-ի Na-ական աղը: Ca^{++}-ի քանակական որոշման առավել մատչելի ինդիկատոր է մուրեքսիդը, որը Ca^{++}-ի իոնների ներկայությամբ ստանում է նարնջագույն գունավորում (տիտրման հետևանքով գունավորումը վերածվում է կապտա-մանուշակագույնի):

Ռեակտիվներ՝ արյան շիճուկ, 9 M NaOH, մուրեքսիդ, 0,002 M ԷԴՏԱ

Աշխատանքի ընթացքը.

Անոթի մեջ լցնել 25 մլ ջուր, ավելացնել 0,25 մլ NaOH-ի լուծույթ և շպատելով ավելացնել մուրեքսիդի բյուրեղներ: Ստացված լուծույթին ավելացնել 1 մլ հետազոտվող արյան շիճուկ: Տիտրել ԷԴՏԱ-ի լուծույթով մինչև կապտա-մանուշակագույն երանգը:

Ca^{++}-ի քանակությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$X= 0,002 \times 40,08 \times 25 \times a/ 1=8,16 \text{մմոլ/լ}$$

0,002- ԷԴՏԱ-ի մոլ-ը

40.08- Ca^{++}-ի - ատոմային զանգվածը

25 - մմոլ/լ անցնելու գործակից

1 - արյան շիճուկի ծավալը (մլ)

a - տիտրացիայի համար ծախսված ԷԴՏԱ-ի լուծույթի ծավալը (մլ):

Աշխատանք 19
Արյան կատալազի ակտիվության որոշումը

Արյան մեջ կատալազի պարունակությունը նվազում է անեմիայի, տուբերկուլյոզի և որոշ այլ հիվանդությունների ժամանակ:

Կատալազ ֆերմենտը օքսիդոռեդուկտազ է, մեծ քանակությամբ պարունակվում է էրիթրոցիտներում: Արյան մեջ կատալազի ակտիվության որոշման նպատակով, պարզում են ջրածնի գերօքսիդի քանակությունը, որը ճեղքվել է կատալազով, կամ թթվածնի քանակությունը, որը առաջացել է կատալազային ռեակցիայի ընթացքում: Կատալազի ակտիվությունը արտահայտվում է կատալազային թվով և կատալազային ցուցիչով:

1մկլ արյան մեջ կատալազով ճեղքված H_2O_2 քանակությունը (մգ) անվանում են կատալազային թիվ:

$$2KMnO_4 + 5H_2O_2 + H_2SO_4 \longrightarrow 2KHSO_4 + MnSO_4 + 8H_2O + 5O_2$$

Ճեղքված ջրածնի գերօքսիդի քանակության մասին դատում են կատալազի ազդեցությունից առաջ և հետո իրականացված տիտրացիայի հետևանքով ծախսված $KMnO_4$ քանակության տարբերությամբ:

Կատալազային ցուցիչը կոտորակ է, որտեղ համարիչում կատալազային թիվն է, հայտարարում՝ էրիթրոցիտների քանակությունը 1մկլ հետազոտվող արյան մեջ:

Ռեակտիվներ՝ արյան շիճուկ, 1% H_2O_2 լուծույթ, 10% H_2SO_4 լուծույթ, 0,1N $KMnO_4$ լուծույթ

Աշխատանքի ընթացքը

Արյան լուծույթի պատրաստում՝ չափիչ անոթի մեջ (100 մլ) լցնել 10 մլ H_2O և 0,1մլ արյան շիճուկ, ծավալը հասցնել 100 մլ (արյունը նոսրացվում է 1000 անգամ. 1 մլ լուծույթը պարունակում է 1 մկլ արյուն): Լուծույթում որոշել կատալազային թիվը:

Երկու փորձանոթների մեջ (ստուգիչ և փորձնական) լցնել 7-ական մլ H_2O և 1-ական մլ արյան լուծույթ: Ստուգիչ նմուշին ավելացնել 5 մլ H_2SO_4, փորձնական նմուշին՝ 2 մլ H_2O_2-ի լուծույթ: Փորձանոթները թողնել 30 րոպե սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում (ժամանակ առ ժամանակ թափահարել): Ինկուբացիայից հետո փորձնական նմուշին ավելացնել 5 մլ H_2SO_4, իսկ ստուգիչ նմուշին՝ 2 մլ H_2O_2: Ստուգիչ նմուշում կատալազը չի գործում (H_2O_2 չի ճեղքվում), քանի որ թթվային միջավայրում ֆերմենտը ինակտիվանում է (օպտիմում pH=7,4): Նմուշները տիտրել 0,1N $KMnO_4$ լուծույթով մինչև վարդագույն երանգավորումը:

$$\text{կթ} = (A-B) \times 1,7$$

A - 0,1N $KMnO_4$ լ-թի քանակությունը, որը ծախսվել է ստուգիչ նմուշի տիտրման համար (մլ)

B - 0,1N $KMnO_4$ լ-թի քանակությունը, որը ծախսվել է փորձնական նմուշի տիտրման համար (մլ)

1,7 - գործակից, որը ցույց է տալիս քանի մգ H_2O_2 է պարունակում 1մլ 0,1N H_2O_2:

Նորմայում մեծահասակների կատալազային թիվը 10-15 միավոր է, երեխաներինը՝ 7,5-9,9 միավոր:

Աշխատանք 20
Հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվության որոշումը արյան շիճուկում

Առաջին եղանակ

Հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվությունը աճում է ծանր ռախիտների, լյարդի հիվանդությունների (մեխանիկական դեղնախտ, սուր հեպատիտ), ոսկրային համակարգի տարբեր հիվանդությունների դեպքում և նվազում է խրոնիկ գլոմերուլոնեֆրիտի, հիպոտիրեոզի դեպքում: Նորմայում ֆերմենտը թափանցում է արյուն լյարդից, ոսկրային հյուսվածքից, փայծաղից, երիկամներից, բարակ աղիներից:

Ֆերմենտը հիդրոլիզում է ֆոսֆորական թթվի եթերները: Տարբերում են հիմնային և թթվային ֆոսֆատազներ՝ հիմնային ֆոսֆատազը առավել ակտիվ է pH=8,6-10 պայմաններում, իսկ թթվային ֆոսֆատազը՝ pH=4,4-6,2 պայմաններում: Հիմնային ֆոսֆատազի սուբստրատ կարող է ծառայել գլիցերոֆոսֆատը, որից ֆերմենտի ազդեցությամբ հիդրոլիտիկ ճանապարհով անջատվում է ֆոսֆորական թթվի մնացորդ: Հիդրոլիզի հետևանքով առաջացած անօրգանական ֆոսֆորի քանակությամբ կարելի է որոշել ֆերմենտի ակտիվությունը:

Ռեակտիվներ՝ 10% ԵԴՔ, գլիցերաֆոսֆատային բուֆեր (pH=8,92), մոլիբդենային ռեակտիվ, 1% ասկորբինաթթու:

Աշխատանքի ընթացքը

Երկու փորձանոթների մեջ պատրաստել խառնուրդներ՝ ըստ աղյուսակի: Առաջին նմուշում որոշվում է գումարային անօրգանական ֆոսֆատը, ներառված հիմնային ֆոսֆատազով հիդրոլիզված ֆոսֆորը, երկրորդ նմուշում՝ արյան շիճուկի չհիդրոլիզված անօրգանական ֆոսֆատի քանակությունը:

Նմուշ	**Գլիցերաֆոսֆատային բուֆեր, pH=8,92**	**Արյան շիճուկ**	**Ինկուբացիա 1ժամ**
փորձնական (1)	5,0 մլ	0,5 մլ	37˚C
ստուգիչ (2)	5,0 մլ	0,5 մլ	սենյակ. t˚

Պատրաստված նմուշները ինկուբացնել, փորձանոթներում ավելացնել 4,5 մլ 10% ԵԴՔ-ի լուծույթ, ցենտրիֆուգել 3000 պտ/վ արագությամբ 10 րոպե: 3-ական մլ վերնստվածք տեղափոխել մաքուր փորձանոթների մեջ, ավելացնել 1մլ մոլիբդենային ռեակտիվ, 1մլ ասկորբինաթթվային լուծույթ: Լուծույթները թափահարել, թողնել 15 րոպե մինչև գունավորման զարգացումը, կոլորիմետրել (կարմիր լուսաֆիլտր 670նմ, կյուվետի լայնությունը 0,5 սմ):

Կիրառելով էքստինկցիայի տարբերությունը (D_1-D_2)՝ տրամաչափական կորի օգնությամբ որոշել հիմնային ֆոսֆատազի ազդեցու-

թյամբ անջատված ֆոսֆորի քանակությունը (մգ): Ստացված արժեքը բազմապատկել 200-ի: Որպես հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվության միավոր ընդունվում է 1մլ արյան շիճուկում 1մգ ֆոսֆատի պարունակությունը:

Նորմայում հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվությունը մեծահասակների մոտ կազմում է 2-5 ԲԵ (Բոդանսկու միավոր- ԲԵ), երեխաների մոտ՝ 5-15 ԲԵ:

Երկրորդ եղանակ

Մեթոդի սկզբունքը: Հիմնային ֆոսֆատազի սուբստրատ է նիտրոֆենիլֆոսֆատի անգույն լուծույթը: Ռեակցիայի արդյունքում անջատվում է նիտրոֆենոլ, որը հիմնային միջավայրում ստանում է դեղին գունավորում: Ռեակցիան դադարեցվում է 0,5 M NaOH-ով: Ռեակցիայի հետևանքով գունավորված նիտրոֆենոլի առաջացման արագությունը ուղիղ համեմատական է հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվությանը: Քանի որ ֆերմենտի ակտիվությունը կախված է ինչպես սուբստրատից, այնպես էլ բուֆերային համակարգից, տարբեր բուֆերային համակարգերում ստացված արդյունքները համեմատելն անթույլատրելի է:

Ռեակտիվներ՝ 5mM n-նիտրոֆենիլֆոսֆատ, 0,5M NaOH, բուֆեր (1M դիէթանոլամինի լուծույթ 0,5mM $MgCl_2$-ում)

Աշխատանքի ընթացքը

Փորձնական նմուշը պարունակում է 1մլ նիտրոֆենիլֆոսֆատ, ստուգիչ նմուշը՝ 1մլ նիտրոֆենիլֆոսֆատ և 0,05 մլ թորած ջուր: Նմուշները ինկուբացնել 5 րոպե, 37^0C պայմաններում: Փորձնական նմուշին ավելացնել 0,05 մլ արյան շիճուկ, ինկուբացնել ևս 5 րոպե (37^0C): Փորձանոթներում ավելացնել 1,5-ական մլ NaOH: Նմուշները կոլորիմետրել թորած H_2O դիմաց (ալիքի երկարությունը 405 նմ, կյուվետի լայնությունը 0,5 սմ):

Հաշվարկ՝

$$E= V_1 \times 10^6 \times (Dփ-Dստ) / V_2 \times 18,3 \times 10^3 \times l \times t$$

V_1– նմուշի վերջնական ծավալը (մլ)

V_2– արյան շիճուկի ծավալը (մլ)

l – կյուվետի լայնությունը (սմ)

t – նմուշի ինկուբացիայի ժամանակը (րոպե)

$18,3 \times 10^3$ – նիտրոֆենոլի մոլյար էքստինկցիայի գործակից:

Աշխատանք 21
Լիպազի ակտիվության որոշումը արյան շիճուկում

Արյան շիճուկի լիպազի ակտիվությունը աճում է ենթաստամոքսային գեղձի բորբոքային պրոցեսների, ենթաստամոքսային գեղձի ուռուցքների դեպքում:

Առողջ մարդու արյան լիպազի քանակությունը 0,5-1,5 միավոր է:

Ռեակտիվներ՝ արյան շիճուկ, տրիս-բուֆեր (pH=8,0), 95% էթանոլ, 1% թիմոլֆտալեին, 0,05N NaOH:

Աշխատանքի ընթացքը

Երկու փորձանոթների մեջ լցնել 0,25-ական մլ ջուր, 0,3-ական մլ յուղ, 0,1-ական մլ տրիս-բուֆեր: Փորձնական նմուշին ավելացնել 0,1մլ արյան շիճուկ: Նմուշները թափահարել և դնել թերմոստատ 60 րոպե 37˚C պայմաններում: Փորձանոթների մեջ ավելացնել 0,3-ական մլ 95% էթիլ սպիրտ ֆերմենտի ազդեցությունը կանխելու նպատակով: Երկրորդ՝ ստուգիչ փորձանոթի մեջ ավելացնել 0,1մլ արյան շիճուկ: Փորձանոթների մեջ ավելացնել 1-ական կաթիլ թիմոլֆտալեին, թափահարել, անջատված ճարպաթթուները տիտրել NaOH-ով մինչև բաց-երկնագույն գունավորումը:

Լիպազի ակտիվությունը հաշվարկել փորձնական և ստուգիչ նմուշների տիտրացիայի համար ծախսված NaOH-ի քանակի տարբերությամբ, հետևյալ բանաձևով.

$$X = A-B / 0,1:$$

X - լիպազի ակտիվության միավորը 1մլ արյան շիճուկում

A - փորձնական նմուշի տիտրացիայի համար ծախսված NaOH-ի քանակությունը (մլ)

B - ստուգիչ նմուշի տիտրացիայի համար ծախսված NaOH-ի քանակությունը (մլ)

0,1- արյան շիճուկ (մլ)

Աշխատանք 22
Արյան մակարդումը թրոմբինի ազդեցությամբ

Ռեակտիվներ՝ 10% ամոնիումի օքսալատ, 3% $CaCl_2$

Աշխատանքի ընթացքը

Փորձանոթի մեջ լցնել արյուն, ամեն 100 մլ ավելացնել 1մլ ամոնիումի օքսալատ (արյունը պետք է պարունակի 0,1-0,2% օքսալատ): Փորձանոթի պարունակությունը զգուշությամբ խառնել այնպես, որ ամբողջ Ca^{2++} անջատվի Ca-օքսալատի տեսքով և արյունը կորցնի մակարդելիությունը: Օքսալատային արյունը ցենտրիֆուգել և անջատել վերնստվածքը՝ պլազման: Դեֆիբրինացված արյուն և շիճուկ ստանալու համար նոր վերցված արյունը խառնել ապակյա ձողիկով, ֆիբրինի թելիկները կանջատվեն ձողիկի վրա: Դեֆիբրինացված արյունը ֆիլտրել, ցենտրիֆուգել: Ստացված վերնստավածքը (շիճուկ) թափանցիկ է, ձևավոր տարրերը նստվածքում են:

Մակարդմանը հետևելու համար վերցնել 5 փորձանոթ: Առաջին 2 փորձանոթների մեջ լցնել 3-ական մլ օքսալատային պլազմա, երրորդի մեջ լցնել 3 մլ դեֆիբրինացված արյուն, չորրորդի մեջ՝ 3 մլ արյան շիճուկ, հինգերորդի մեջ՝ 3 մլ օքսալատային արյուն: Բոլոր փորձանոթներում, բացի առաջինից ավելացնել 0,3-ական մլ 3% $CaCl_2$: Փորձանոթները դնել թերմոստատի մեջ (37-38˚C, 15-20 րոպե): Արյան մակարդում դիտվում է միայն 2 և 5 փորձանոթներում:

Աշխատանք 23
Թրոմբինի ակտիվության որոշումը

Ռեակտիվներ՝ 1% NaCL, 28% $MgSO_4$

Որպես թրոմբինի լուծույթ օգտագործվում է արյան շիճուկը, որպես ֆիբրինոգենի լուծույթ՝ տաքացմամբ ինակտիվացված մագնեզիումային պլազման: Մագնեզիումային պլազման ստանալու նպատակով 3 մլ արյանը ավելացնել 1մլ $MgSO_4$ լուծույթ և ցենտրիֆուգել: Թափանցիկ պլազման առանձնացնել, դնել թերմոստատի մեջ (50-60˚C, 10 րոպե):

Աշխատանքի ընթացքը

Տասը փորձանոթներից ինների մեջ լցնել 1-ական մլ NaCl: Առաջին և երկրորդ փորձանոթների մեջ ավելացնել 1-ական մլ չնոսրացված արյան շիճուկ (թրոմբինի լուծույթ): Երկրորդ փորձանոթի պարունակությունը խառնել և խարնուրդից 1մլ տեղափոխել երրորդ փորձանոթի մեջ: Երրորդ փորձանոթի պարունակությունը խառնել և խառնուրդից 1մլ տեղափոխել չորրորդ փորձանոթի մեջ: Այսպես շարունակել մինչև վերջին փորձանոթը: Վերջին՝ տասներորդ փորձանոթի պարունակությունը ստանալուց հետո, փորձանոթից վերցնել 1մլ: Այսպես կարելի է ստանալ թրոմբինի նոսրացված երկրաչափական շարք: Ստուգիչ փորձանոթի մեջ լցնել 1մլ NaCl: Բոլոր 11 փորձանոթների մեջ ավելացնել 1-ական մլ պլազմա (ֆիբրինոգենի լուծույթ) և դնել սառնարան (+5˚C, 24 ժ): Փորձի ավարտից հետո որոշել թրոմբինի այն մինիմալ խտությունը, որի դեպքում դեռ նկատվում է արյան նվազագույն մակարդելիություն: Ստուգիչ փորձանոթում արյան մակարդում չի գրանցվում:

Թրոմբինի ակտիվությունը արտահայտել արյան շիճուկում 1մլ չնոսրացված արյան շիճուկով մակարդված պլազմայի քանակությամբ (մլ): Օրինակ, եթե մակարդելիություն գրանցվել է առաջին ութ փորձանոթներում, իսկ 9 և 10 փորձանոթներում արյունը չի մակարդվել, ապա 1մլ պլազմայում եղած ֆիբրինոգենի քանակությունը մա-

կարդել է 128 անգամ նոսրացված 1մլ արյան շիճուկը: Հետևաբար, 1մլ չնոսրացված արյան շիճուկը մակարդում է 128 մլ պլազմա, այսինքն թրոմբինի ակտիվությունը հավասար է 128 միավորի: Նորմայում արյան շիճուկի թրոմբինի ակտիվությունը կազմում է 64-256 միավոր:

Բաժին 5

Նյութափոխանակությունը բույսերում
Կենսաբանական ակտիվ միացություններ

Կենսաբանական ակտիվ միացությունները քիմիական միացություններ են, որոնք նույնիսկ ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում օժտված են բարձր ֆիզիոլոգիական ակտիվությամբ և պայմանավորում են որոշ բույսերի թերապևտիկ ազդեցությունը:

Գլիկոզիդներ և ալկալոիդներ

Գլիկոզիդները բարդ եթերանման միացություններ են, սինթեզվում են ածխաջրերից և հեշտ հիդրոլիզվում ածխաջրի և ոչ ածխաջրային կոմպոնենտի՝ ագլիկոնի: Ճեղքվում են սպեցիֆիկ ֆերմենտներով: Գլիկոզիդներից են ֆենոլգլիկոզիդը, որը պարունակում է հիդրոխինոն (արբուտին), անտրագլիկոզիդը, որը պարունակում է անտրախինոն: Գլիկոզիդները հայտնաբերվել են բույսերի սերմերում, պտուղներում, տերևներում, արմատներում: Միջավայրի պայմաններից կախված՝ դրանց քանակությունը կարող է փոփոխվել. անձրևային եղանակին գլիկոզիդների քանակը նվազում է, իսկ երաշտի, ցրտահարման պայմաններում միջատներից վնասվելու հետևանքով քանակը աճում է: Գլիկոզիդները օժտված են ուժեղ կենսաբանական ազդեցությամբ, և շատերը կիրառվում են որպես դեղամիջոց: Ազդեցությունը պայմանավորված է ագլիկոնի կառուցվածքով, լուծելիությունն ապահովվում է ածխաջրերի առկայությամբ:

Ալկալոիդները ազոտ պարունակող հետերոցիկլիկ միացություններ են՝ օժտված հիմնային հատկություններով, ունեն արտահայտված ֆիզիոլոգիական ազդեցություն: Ալկալոիդները հանդիպում են միայն որոշակի բույսերում, ունեն դառը համ: Ներկայումս հայտնի են մոտ 10000 ալկալոիդներ: Բույսերում ներկայացված են 1-2%-ով, բջջանյութում առկա են լուծված վիճակում, ծերացած հյուսվածքներում՝ պինդ վիճակում: Մեծ քանակությամբ ալկալոիդներ հայտնա-

բերված են կակաչում՝ մոտ 20%: Բույսերում ալկալոիդները հանդիպում են հիմնականում օրգանական թթուների (կիտրոնաթթու, մալաթ) աղերի ձևով, երբեմն հանքային թթուների (ֆոսֆորական, ծծմբական) աղերի ձևով: Ալկալոիդային աղերը լուծվում են ջրում, իսկ ալկալոիդները ջրալուծ չեն, սակայն լուծվում են օրգանական լուծիչներում (եթեր, սպիրտ, քլորոֆորմ): Ալկալոիդների առաջացման սկզբնանյութ են սպիտակուցների քայքայման արգասիքները: Ալկալոիդների ֆիզիոլոգիական դերը դեռ լիովին ուսումնասիրված չէ. դրանք դիտարկվում են որպես նյութափոխանակության վերջնական արգասիքներ, բույսերի պաշտպանողական միջոց, պաշարային նյութեր: Ալկալոիդները կարող են նստեցվել ալկալոիդային ռեակտիվներով (ֆոսֆոմոլիբդենային ռեակտիվ, տանին, պիկրինաթթու, յոդի լուծույթ, ֆերրիցիանիդ):

Ֆենոլային միացություններ

Ֆենոլային միացությունները բնորոշ են յուրաքանչյուր բույսի, ունեն ունիվերսալ տարածվածություն բուսական աշխարհում: Այդ միացությունները կազմում են բույսերի օրգանական նյութերի զանգվածի 2-3%: Ֆենոլային միացությունների սինթեզը ընթանում է բույսերում, կենդանիները այդ միացությունները ստանում են պատրաստի վիճակում: Ֆենոլային միացությունները մասնակցում են շատ մետաբոլիկ պրոցեսների՝ շնչառություն, ֆոտոսինթեզ, ֆոսֆորիլացում, գլիկոլիզ, նաև բույսերի աճի, զարգացման, ռեպրոդուկցիայի կարգավորիչ են: Բոլոր ֆենոլային միացությունները բույսերում առաջանում են ածխաջրերից: Ֆենոլային միացությունների հիմքով պատրաստված դեղամիջոցները լայն կիրառում են ստացել որպես արյան մակարդելիությունը կարգավորող, հակաբորբոքային, հիպոտենզիվ, լեղամուղ, դիուրետիկ միջոցներ:

Կենսաբանական ակտիվ միացությունների էքստրակցիա բուսական հյուսվածքներից

Բույսերի օրգանները (տերև, ցողուն, արմատ) մանրացնել մեխանիկական աղացում, մինչև փոշիացումը: Պատրաստել մզվածք 50% էթանոլում 1:2 հարաբերությամբ (1գ բուսական փոշի, 20 մլ էթանոլ): Էքստրակցիայի տևողությունը 24 ժամ, 4˚C պայմաններում: Չքայքայված մասնիկները անջատել ֆիլտրացիայի կամ ցենտրիֆուգման եղանակով: Ստացված լուծույթը (ֆիլտրատ կամ վերնըստվածք) կարելի է ենթարկել քիմիական ուսումնասիրության:

Աշխատանք 24
Արբուտինի և արբուտազի բացահայտումը

Արջախաղողի տերևներում հայտնաբերված է արբուտին գլիկոզիդը, որը ենթարկվում է հիդրոլիզի արբուտազ ֆերմենտով: Բույսի տերևների էքստրակցիայի հետևանքով արբուտինը և արբուտազը անցնում են լուծույթ և արբուտազ ֆերմենտը ճեղքում է արբուտինը գլյուկոզի և հիդրոխինոնի:

Էքստրակցիայի արգասիքները կարելի է բացահայտել որոշակի ռեակցիաներով:

Ռեակտիվներ՝ 1% $FeCl_3$, 33% NaOH, $FeSO_4$, Ֆելինգի ռեակտիվ

Աշխատանքի ընթացքը

Արբուտինի հայտնաբերում՝ 0,2 գ (0,1 գ) մանրացված տերևները տեղափոխել անոթի մեջ, ավելացնել 10 մլ եռացրած H_2O, թափահարել 1-2 րոպե, ֆիլտրել և արագ սառեցնել:

1) 10 կաթիլ ֆիլտրատին ավելացնել 1 կաթիլ $FeCl_3$, լուծույթը ստանում է կապույտ գունավորում, ինչը պայմանավորված է երկաթի ֆենոլյատի առաջացմամբ (հիդրոխինոնի ազատ ֆենոլային խմբի հաշվին):

2) 10 կաթիլ ֆիլտրատին ավելացնել $FeSO_4$-ի բյուրեղ, առաջանում է կարմիր գունավորում, որը արագ վերածվում է մանուշակագույնի:

Արբուտազի հայտնաբերում՝ 0,1 գ չոր տերևները մանրացնել, ավելացնելով 10 մլ ջուր: Դրանից 2-3 մլ վերցնել, ֆիլտրել և ֆիլտրատում կատարել արբուտազ բացահայտող ռեակցիա: Լուծույթի մյուս մասը տեղափոխել բաժակի մեջ և դնել թերմոստատի մեջ (15 րոպե, 40^0C) ֆերմենտատիվ հիդրոլիզի համար: Ինկուբացիայից հետո լուծույթը ֆիլտրել, ավելացնել 1 կաթիլ NaOH և բաժանել 2 մասի: Մեկում կատարել գլյուկոզի բացահայտում Ֆելինգի ռեակտիվով, լուծույթի մյուս մասը թողնել որոշ ժամանակ, որ հիդրոխինոնը օքսիդանա: Լուծույթի վերին շերտում առաջանում է մուգ գույնի օղակ (խինհիդրոն՝ հիդրոխինոնի և խինոնի միացություն):

Աշխատանք 25
Անտրագլիկոզիդների բացահայտումը բույսերում

Որոշ դեղաբույսեր (հալվե) պարունակում են անտրագլիկոզիդներ, որոնք անտրախինոնի ածանցյալներ են՝ անտրահիդրոխինոն, դիտրիօքսիանտրախինոն: Անտրահիդրոխինոնների ազատ ձևերը շագանակագույն գունավորում ունեն, լավ լուծվում են հիմքերում՝ առաջացնելով վառ կարմիր գույնի միացություններ:

Ռեակտիվներ՝10% NaOH, 10% HCl

Աշխատանքի ընթացքը

Փորձանոթի մեջ լցնել 50-100 մգ հալվեի փոշի, ավելացնել 5-10 կաթիլ NaOH: Լուծույթը կստանա վառ կարմիր գունավորում: Լուծույթի թթվայնացումը HCl–ով կվերածի գունավորումը դեղինի:

Աշխատանք 26
Ալկալոիդների բացահայտումը

Ալկալոիդները կիրառվում են այրվածքների բուժման ժամանակ: Ախտահարված հատվածների մշակումը ալկալոիդներով առաջացնում է պաշտպանիչ շերտ (սպիտակուցների բնափոխման հետևանքով), ինչը կանխում է հյուսվածքների ջրազրկումը, ինֆեկցիայի ներթափանցումը հյուսվածք:

Բույսի ջրային լուծույթին յոդի լուծույթ ավելացնելիս առաջանում է շագանակագույն նստվածք: Ռեակցիան պայմանավորված է ալկալոիդների առկայությամբ, որոնք յոդի լուծույթի հետ առաջացնում են անլուծելի միացություններ:

Ռեակտիվներ՝ յոդի 1% լուծույթ, բուսական օբյեկտներ (հազարաթերթիկ, սգնի, սրոհունդ)

Աշխատանքի ընթացքը

0,2 գ չոր նյութը ջարդել հավանգում (փոշիացնել), ավելացնել 5 մլ ջուր (կաթիլներով) և ստացված հեղուկը ֆիլտրել: Թափանցիկ ֆիլտրատը օգտագործել ալկալոիդների բացահայտման ռեակցիաներում: Որպես ստուգիչ՝ պատրաստել մզվածք ոչ ալկալոիդային բույսից (օրինակ՝ սոխ):

Փորձանոթների մեջ լցնել 10 կաթիլ ստուգիչ լուծույթ, 10 կաթիլ փորձնական լուծույթ: Երկու փորձանոթների մեջ ավելացնել 2-ական կաթիլ յոդի լուծույթ: Փորձնական նմուշում կառաջանա գորշ նստվածք:

Աշխատանք 27
Սպիտակուցների նստեցումը ալկալոիդային ռեակտիվներով

Սպիտակուցների նստեցումը «ալկալոիդային» ռեակտիվներով պայմանավորված է սպիտակուցներում ազոտային հետերոցիկլիկ խմբերի առկայությամբ: Այս խմբերը ալկալոիդների մոլեկուլներում

առկա խմբերի անալոգներն են (պիրոլային, ինդոլային, իմիդազոլային): Սպիտակուցների լիարժեք նստեցում դիտվում է, երբ սպիտակուցի մոլեկուլը վերալիցքավորվում է, ստանում դրական լիցք, ինչը հեշտացնում է սպիտակուցի փոխազդեցությունը ալկալոիդի բացասական լիցք ունեցող իոնների հետ:

Ռեակտիվներ՝ ձվի սպիտակուցի 1% լուծույթ, 1% քացախաթթու, 10% պիկրինաթթու, տանինի հագեցած լուծույթ, 5% $K_4Fe(CN)_6$, յոդի 1% լուծույթ

Աշխատանքի ընթացքը

Չորս փորձանոթների մեջ լցնել 5-ական կաթիլ սպիտակուցի լուծույթ, 1-ական կաթիլ քացախաթթվի լուծույթ: Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել 2-3 կաթիլ պիկրինաթթու, երկրորդի մեջ՝ 2-3 կաթիլ տանինի հագեցած լուծույթ, երրորդ փորձանոթի մեջ ավելացնել 2-3 կաթիլ $K_4Fe(CN)_6$, չորրորդի մեջ՝ յոդի լուծույթ: Բոլոր փորձանոթներում առաջանում է նստվածք՝ առաջին փորձանոթում՝ դեղին, երկրորդում՝ մոխրագույն:

Աշխատանք 28
Ֆենոլային միացություններ

Ֆլավոնոիդների հայտնաբերումը և քանակական որոշումը

Ռեակտիվներ՝ 70% էթանոլ, խիտ HCl, 5% NaOH, 5% ամոնիակի լուծույթ, բուսական հումք

Աշխատանքի ընթացքը

0,5 գ մանրացրած հումքը լցնել կոլբայի մեջ, ավելացնել 15 մլ էթանոլ, տաքացնել եռացող ջրային բաղնիքում 10 րոպե: Լուծույթը սառեցնել, ֆիլտրել, կատարել որակական ռեակցիաներ:

1) Երեք փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ ֆիլտրատ: Փորձանոթներից մեկի մեջ ավելացնել մագնեզիումի փոշի, երկրորդի մեջ՝ ցինկի փոշի, երրորդի մեջ՝ միայն ֆիլտրատ: Բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 5-7 կաթիլ խիտ HCl: Ֆլավոնոիդների զգալի քանա-

կության դեպքում առաջին երկու փորձանոթներում անմիջապես կզարգանա վարդագույն, նարնջագույն կամ կարմիր գունավորում, ինչը պայմանավորված է անտոցիանիդինների առաջացմամբ: Ֆլավոնոիդների քիչ քանակության դեպքում գունավորման զարգացման համար անհրաժեշտ է լուծույթը տաքացնել ջրային բաղնիքում 10 րոպե: Երրորդ՝ ստուգիչ փորձանոթում վարդագույն կամ կարմիր գունավորման առաջացումը վկայում է ուսումնասիրվող օբյեկտում անտոցիանային պիգմենտների առկայության մասին (խիտ HCl-ի ներկայությամբ օքսոնային աղերի հաշվին դրանք ստանում են կարմիր երանգավորում):

2) 1մլ ֆիլտրատին ավելացնել 3-5 կաթիլ ամոնիակի, հիմքի կամ նատրիումի հիդրոկարբոնատի լուծույթ:

Ֆլավոնների, ֆլավոնոլների, ֆլավանոնների առկայության դեպքում առաջանում է դեղին գունավորում, որը տաքացման հետևանքով փոխվում է նարնջագույնի կամ կարմիրի, անտոցիանները լուծույթին կապույտ կամ մանուշակագույն գունավորում են հաղորդում:

Քանակական որոշում

Ռեակտիվներ՝ 70% սպիրտ, բուսական հումք, HCl, 2% ալյումինիումի քլորիդ

Աշխատանքի ընթացքը

0,5 գ բուսական նմուշը մանրացնել, տեղափոխել 100 մլ անոթի մեջ, ավելացնել 30 մլ սպիրտ, անոթը միացնել հետադարձ սառնարանին և տաքացնել ջրային բաղնիքում 30 րոպե: Լուծույթը սառեցնել, ֆիլտրել, տեղափոխել 50 մլ անոթի մեջ: Ֆիլտրը լվանալ 70% սպիրտով, ֆիլտրատի ծավալը հասցնել նիշին (լուծույթ I): Լուծույթից 4 մլ լցնել 25 մլ անոթի մեջ, ավելացնել 1 կաթիլ նոսրացված HCl, 2 մլ ալյումինիումի քլորիդ (95% սպիրտում) և 95% սպիրտով ծավալը հասցնել համապատասխան նիշի: Ստուգիչ նմուշ՝ 4 մլ լուծույթ I լցնել 25 մլ անոթի մեջ, ավելացնել 1 կաթիլ նոսրացված HCl, ծավալը 95% սպիրտով հասցնել անոթի նիշին: 20 րոպե անց չափել օպտիկա-

կան խտությունը (ալիքի երկարությունը 410 նմ, կյուվետի լայնությունը 10 մմ):

Ֆլավանոիդների գումարային պարունակության հաշվարկ (%)՝

$$X=(D \times 50 \times 100 \times 25)/(330 \times m \times (100-W))$$

D - հետազոտվող լուծույթի օպտիկական խտությունը

m - հումքի զանգված (գ)

W - զանգվածի կորուստը հումքի չորացումից (%):

Բաժին 6

Խնդիրներ

1. Պեպսինի pH-ի օպտիմալ արժեքն է 1,5-2,0, ենթաստամոքսային հյութի տրիպսինի pH-ի օպտիմալ արժեքն է 7,8: Պատկերել այդ ֆերմենտների համար ռեակցիայի արագության կախվածությունը միջավայրի pH-ից և բացատրել՝

ա) ինչո՞ւ է pH-ի փոփոխությունը նվազեցնում ֆերմենտի ակտիվությունը,

բ) ի՞նչ նշանակություն ունի մարդու օրգանիզմում այդ ֆերմենտների pH օպտիմումների տարբերությունը:

2. Վեց ամսական երեխան կաթով կերակրվելուց հետո դիարեայով տեղափոխվել է հիվանդանոց: Ախտորոշում կատարելու նպատակով արվել է լակտոզի նկատմամբ տոլերանտության թեստ՝ անոթի հիվանդին տրվել է 50 գ ջրում լուծված լակտոզ: 30, 60, 90 րոպե անց ստուգվել է գլյուկոզի քանակությունը արյան մեջ: Գլյուկոզի քանակությունը չի ավելացել: Բացատրել ստացված արդյունքները:

ա) Գրանցել լակտոզի կատաբոլիզմի ռեակցիաների սխեման:

բ) Բացատրել գլյուկոզի կոնցենտրացիայի կայունության պատճառը:

3. Սախարոզի, լակտոզի, օսլայի լուծույթներով նմուշին ավելացնել առողջ մարդու պանկրեատիկ հյութ: Նույն լուծույթը պարունակող նմուշին ավելացնել ծանր պանկրեատիտով հիվանդի պանկրեատիկ հյութ: Նմուշները ինկուբացնել:

ա) Ո՞ր նմուշում մարսված սննդանյութի պարունակությունը ավելի շատ կլինի:

բ) Գրանցել նմուշներում տեղի ունեցած ռեակցիաները:

4. Նշել երկու եղբայրների ածխաջրային փոխանակության տարբերությունները, եթե մեկը երեք օր չի սնվում, որ նիհարի, երկրորդը՝ կարճատև մարզումից և ընթրիքից հետո հանգստանում է:

Ներկայացնել եղբայրների գերակշռող մետաբոլիկ ուղիների սխեմաները:

5. Նկարագրել երկու ուսանողների ածխաջրային փոխանակության տարբերությունները, եթե մեկը ընթրիքից հետո հանգստանում է, մյուսը՝ ընթրիքի փոխարեն 20 րոպե վազում:

ա) Ներկայացնել մետաբոլիկ ուղիների սխեմաները:

բ) Ո՞ր հորմոններն են ակտիվացնում այդ պրոցեսները:

6. Ինտենսիվ ֆիզիկական աշխատանքի ժամանակ լյարդում և կմախքային մկաններում ինչ ռեակցիա է կատալիզում լակտատդեհիդրոգենազը: Ո՞րն է այդ պրոցեսի ֆիզիոլոգիական նշանակությունը:

7. Ո՞րն է լակտատդեհիդրոգենազի դերը էրիթրոցիտներում, ի՞նչ է տեղի ունենում էրիթրոցիտներում լակտատդեհիդրոգենազի ինհիբիտորի ներկայությամբ: Ո՞րն է այդ պրոցեսի ֆիզիոլոգիական նշանակությունը էրիթրոցիտների համար:

8. Գլիկոգենը և ճարպերը էներգիայի պահեստային ձևեր են: Ներկայացնել գլիկոգենի և ճարպերի տարբերությունը և նմանությունը՝ որպես օրգանիզմի էներգիայի աղբյուր:

ա) Գրել գլիկոգենի և ճարպերի կատաբոլիզմի սխեման:

բ) Համեմատել պրոցեսների էներգետիկ էֆեկտը:

գ) Նկարագրել, թե որ իրավիճակում է տեղի ունենում այդ միացությունների կատաբոլիզմը, որ հորմոններն են մասնակցում այդ պրոցեսների կարգավորմանը:

9. Մուտանտային շարքի մկների մկանային հյուսվածքի պրեպարատներում ուսումնասիրվել է ադրենալինի ազդեցությունը գլիկոգենի փոխանակության վրա: Մկանային հյուսվածք պարունակող ինկուբացիոն միջավայր ադրենալին ներարկելուց հետո, բջիջներում ց-ԱՄՖ-ի կոնցենտրացիան աճել է, բայց միջավայրի ֆոսֆորիլազը առկա է եղել միայն դեֆոսֆորիլացված՝ ոչ ակտիվ ձևով:

ա) Ո՞ր ֆերմենտների դեֆեկտն է ավելի հավանական մկանային հյուսվածքում:

բ) Կարո՞ղ են արդյոք այդ կենդանիները կատարել ինտենսիվ աշխատանք, օրինակ՝ փախչել վտանգի դեպքում:

10. Քննության ժամանակ ուսանողի արյան գլյուկոզի պարունակությունը 7մմոլ/լ է: Բացատրել արդյունքը:

ա) Ո՞ր հորմոնի քանակությունն է ավելանում այս դեպքում: Նկարագրեք հորմոնի ազդեցության մեխանիզմը:

բ) Ներկայացնել պրոցեսը, որի արագության աճը առաջացնում է գլյուկոզի կոնցենտրացիայի փոփոխություն:

11. Ի՞նչ է տեղի ունենում հիմնականում ածխաջրեր պարունակող սնունդ ընդունելուց 30 րոպե անց ֆիզիկական աշխատանք կատարող մարդու կմախքային մկաններում՝ գլիկոգենի սինթեզ, թե՞ քայքայում: Ներկայացնել կատարվող պրոցեսի սխեման:

12. Հաշվի առնելով, որ գլիկոգենի սինթեզի համար ԱԵՖ-ի հիմնական աղբյուրն է գլյուկոզի աէրոբ ճեղքումը՝ որոշել օրգանիզմում գլյուկոզից գլիկոգենի պահեստավորման արժեքը: Հաշվարկել քանի մոլ գլյուկոզ է անհրաժեշտ օքսիդացնել 35 գ գլիկոգեն սինթեզելու համար (35 գ գլիկոգենը համապատասխանում է մոտ 200 մոլ գլյուկոզի մնացորդի): ՈւԵՖ-ի էներգիան համարել համարժեք ԱԵՖ-ի էներգիային:

13. Անաէրոբ գլիկոլիզի ուսումնասիրման նպատակով ինկուբացվել է հետևյալ նմուշը՝

1մմոլ գլիցերալդեհիդֆոսֆատ, 5 մմոլ անօրգանական ֆոսֆատ, 0,01մմոլ NAD^+ և գլիցերալդեհիդֆոսֆատդեհիդրոգենազ: Ռեակցիան սկսվել է, բայց շատ արագ հասել հավասարակշռության: Բացատրել, թե ինչու՞ է առաջացել հավասարակշռություն: Կփոխվի արդյոք ռեակցիայի հավասարակշռությունը, եթե ինկուբացիոն խառնուրդին ավելացվի 5 մմոլ պիրուվատ և լակտատդեհիդրոգենազ:

14. Մկանային հյուսվածքի հոմոգենատին ԱԵՖ ավելացնելիս գլիկոլիզի արագությունը նվազում է, գլյուկոզա-6-ֆոսֆատի և ֆրուկտոզա-6-ֆոսֆատի կոնցենտրացիաները աճում են, իսկ գլիկոլիզի

մյուս մետաբոլիտների կոնցենտրացիաները ցածր են: Ո՞ր ֆերմենտի ակտիվությունն է ճնշվում ԱԵՖ-ի ավելացմամբ:

15. Հիվանդներից մեկը մի քանի օր ստանում է բարձր կալորիականությամբ սնունդ, մյուսը՝ ցածր կալորիականությամբ սնունդ: Նկարագրել հիվանդների մետաբոլիզմի տարբերությունը՝

ա) ո՞ր հիվանդի ինսուլին/գլյուկագոն հարաբերակցությունն է բարձր օրվա ընթացքում,

բ) ո՞ր հիվանդի ացետիլ-KoA-կարբոքսիլազի ակտիվությունն է ավելի բարձր և ինչու՞,

գ) գրել ածխաջրերից ճարպերի սինթեզի սխեման, նշել ֆերմենտի դերը այդ պրոցեսում:

16. Բացատրել երկու տարբեր օրգանիզմներում ճարպերի փոխանակության տարբերությունները, եթե մեկը ընթրել է և անցել հանգստի, մյուսը՝ ընթրիքը «փոխարինել» է վազքով.

ա) գրել համապատասխան մետաբոլիկ ուղիների սխեման,

բ) բացատրել ուղիներն ակտիվացնող հորմոնների ազդեցությունը:

17. Նույն սննդակարգի պայմաններում մեկը կարող է գիրանալ ավելի արագ, քան մյուսը.

ա) նշել գիրացման հնարավոր պատճառները,

բ) գրել ածխաջրերից ճարպերի սինթեզի սխեման:

18. Մարդն ընդունել է 250 գ ածխաջուր և 2 ժամ ֆիզիկական աշխատանք չի կատարել: Սնվելուց 2 ժամ անց ո՞ր պրոցեսն է ակտիվանում լյարդում՝ ճարպաթթուների սինթեզը, թե քայքայումը.

ա) գրել ընտրված մետաբոլիկ ուղու սխեման,

բ) ո՞ր հորմոնն է խթանում այդ ուղին և ինչպե՞ս:

19. Քանի մոլեկուլ ացետիլ- KoA է պետք օքսիդացնել մինչև ածխաթթու գազ և ջուր 3 մոլեկուլ ստեարինաթթվի սինթեզի էներգետիկ ծախսը ապահովելու համար:

20. Ացետիլ-KoA-ի ի՞նչ մինիմալ քանակություն է անհրաժեշտ ստեարինաթթուն մինչև ածխաթթու գազ և ջուր քայքայելու համար, եթե ստեարինաթթուն արդեն միտոքոնդրիումներում է:

21. Ացետիլ-KoA-ի մոլեկուլների ի՞նչ մինիմալ քանակություն է պետք 100 մոլեկուլ β-կետոբուտիրատ սինթեզելու համար: Ինչպե՞ս է այդ պրոցեսը ապահովվում էներգիայով:

22. Ապացուցված է, որ սրտամկանի բնական էներգետիկ վառելիքը ճարպաթթուներն են: Հաշվարկել և համեմատել գլիկոլիզի ու պալմիտինաթթվի աերոբ օքսիդացման էներգետիկ էֆեկտը:

23. Խպիպի պատճառով վիրահատված երեխայի արյան Ca^{2+}-ի քանակությունը 1, 25 մլ, երեխան ունենում է ջղաձգումներ: Ո՞րն է արյան մեջ Ca^{2+}-ի քանակության նվազման և ջղաձգումների առաջացման հավանական պատճառը: Ի՞նչ ֆունկցիաներ են ապահովում Ca^{2+}-ի իոնները: Ինչքա՞ն է նորմայում այդ իոնների կոնցենտրացիան երեխաների և մեծահասակների արյան մեջ:

24. Մի մարզիկը վազել է 100 մ, մյուսը՝ 5000 մ: Ինչպե՞ս կփոխվի կաթնաթթվի պարունակությունը մարզիկների արյան մեջ: Ինչու՞ է լակտատի քանակությունը կախված դիստանցիայի երկարությունից:

25. Նորմայում առողջ մարդկանց արյան ամիլազի ակտիվությունը ցածր է: Բացատրել, թե ինչո՞ւ է աճում ֆերմենտի ակտիվությունը սուր պանկրեատիտների և ենթաստամոքսային գեղձի խրոնիկ բորբոքման սրացման դեպքում: Ի՞նչ մեթոդով են բացահայտում ամիլազը արյան մեջ: Նկարագրել կենսաբանական հեղուկներում և հյուսվածքներում ֆերմենտների որոշման սկզբունքը:

26. Գալակտոզեմիայի երկու ձևերի կլինիկական ախտանիշները (մեկը պայմանավորված է գալակտոկինազի անբավարարությամբ, մյուսը՝ գալակտոզոա-1-ֆոսֆատուրիդիլտրանսֆերազի անբավարարությամբ) ծանրությամբ զգալի տարբերվում են: Երկու դեպքում էլ կաթը հիվանդների մոտ առաջացնում է աղիքային խանգարումներ, սակայն գալակտոզոա-1-ֆոսֆատուրիդիլտրանսֆերազի անբավարարության դեպքում խանգարվում են լյարդի, երիկամների, ուղեղի,

փայծախի ֆունկցիաները, ինչը բերում է մահվան: Այդ ֆերմենտների անբավարարության հետևանքով ի՞նչ միացություններ են կուտակվում արյան մեջ և հյուսվածքներում:

27. Էրիթրոցիտներում գլիկոլիզը ԱԵՖ-ի միակ աղբյուրն է: Ո՞րն է լակտատդեհիդրոգենազի կարևորությունը այդ պրոցեսում, ինչպե՞ս «կարճագանքեն» էրիթրոցիտները լակտատդեհիդրոգենազի ինհիբիտորների ներկայությանը:

28. Երկարատև քաղցի ժամանակ լյարդում էներգիայի աղբյուր են դառնում ճարպաթթուները, որոնց օքսիդացման հետևանքով միտոքոնդրիումներում ավելանում է ացետիլ-KoA-ի կոնցենտրացիան: Ինչպե՞ս է այդ դեպքում փոփոխվում պիրուվատի և գլյուկոզի օքսիդացման արագությունը: Ո՞րն է այդ երևույթների կենսաբանական նշանակությունը:

29. Հիվանդը ունի պիրուվատկարբոքսիլազի գենետիկական դեֆեկտ: Ի՞նչ հետևանքների դա կհանգեցնի:

30. Գրել ցիտրատից գլյուկոզի առաջացման սխեման: Քանի՞ մոլեկուլ ցիտրատ և ԱԵՖ կծախսվի պրոցեսի ընթացքում:

31. 24 ժամյա քաղցից հետո լյարդում գլիկոգենի պաշարը սպառվում է: Բացատրել քաղցի ժամանակ գլյուկոնեոգենեզի կենսաքիմիական նպատակահարմարությունը՝ հաշվի առնելով օրգանիզմում առկա ճարպի բավարար պաշարները:

32. Մարդու օրգանիզմում շրջանառվում է մոտ 4 գ լեղաթթու: Օրվա ընթացքում լեղաթթուները միջինում աղեստամոքսային տրակտի և լյարդի միջև կատարում են 6 պտույտ: Ամեն պտույտի ընթացքում ռեաբսորբվում է լեղաթթուների 96%-ը: Քանի՞ գրամ լեղաթթու է սինթեզվում օրվա ընթացքում:

33. Հեպատոցիտներում խախտված է սպիտակուցների և ֆոսֆոլիպիդների սինթեզը: Ինչպե՞ս դա կանդրադառնա հեպատոցիտներում եռացիլգլիցերիդների պարունակության վրա: Նկարագրել գլյուկոզի օգտագործման ուղիները լյարդում, հիդրոֆոբ միացությունների տրանսպորտը լյարդից մյուս հյուսվածքներ:

34. Ca^{2+} իոնների բացակայության պայմաններում արյունը չի մակարդվում: Ո՞րն է Ca^{2+} -ի դերը արյան մակարդելիության մեջ:

35. Եթե հեպատոցիտներում Կրեբսի ցիկլը և շնչառական շղթան ընկճված են, արդյոք այդ պայմաններում կընթանա՞ գլյուկոնեոգենեզ: Գրել գլյուկոնեոգենեզի սխեման: Պրոցեսի ո՞ր ռեակցիաների արագությունը կնվազի և ինչու:

36. Հիվանդի մեզի և արյան մեջ բարձր է կետոնային մարմինների քանակությունը: Ի՞նչ տվյալներ են անհրաժեշտ կետոնային մարմինների պարունակության աճի պատճառը պարզաբանելու համար:

37. Երկար ժամանակ չապաքինվող վերքերի բուժման նպատակով օգտագործում են տրիպսին և գիալուրոնիդազ պարունակող քսուկներ: Ինչո՞վ են պայմանավորված դրանց բուժիչ հատկությունները:

38. Կկուտակվի՞ արդյոք օքսալաացետատ, եթե Կրեբսի ցիկլի ֆերմենտներ և կոֆերմենտներ պարունակող էքստրակտին ավելացվի ացետիլ-KoA:

Գրականություն

1 **Березовская В. А.,** Лаб. практикум для студентов напр. 552400 и 271000, Учебное пособие Камчат. ГТУ, 2005.

2 **Бокуть С. Б., Сяхович В. Э.,** Практикум по общей и экологической биохимии, Часть IV, Минск, 2004.

3 **Вистовская В. П., Иркитова А. Н. и др.,** Практикум по биохимии, АлтГУ, 2013.

4 **Кожакин П. А.,** Лабораторный практикум, БГТИ, 2013.

5 **Петров О. А., Пуховская С. Г.,** Практикум по биохимии, Ивановский Гос. Хим-техн. университет, 2006.

6 **Саловарова В. П. и др.,** Биохимия, Лабораторный практикум, 2000.

7 **Северин Е. С.,** Биохимия, Тесты и задачи, Учебное пособие для студентов мед. вузов, М., 2005.

8 **Титова Н. М. и др.,** Биохимия и молекулярная биология, 2008.

9 **Филиппович Ю. Б. и др.,** Практикум по общей биохимии, М., Просвещение, 1982.

Բովանդակություն

Ներածություն 3
Բաժին 1 Ածխաջրեր 4
Բաժին 2 Լիպիդներ.....13
Բաժին 3 Սպիտակուցներ 18
Բաժին 4 Արյան կենսաքիմիական ցուցանիշներ 27
Բաժին 5 Նյութափոխանակությունը բույսերում
Կենսաբանական ակտիվ միացություններ.....38
Բաժին 6 Խնդիրներ 46
Գրականություն.....53

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Հայրապետյան Նարինե Կոլյայի,
Դավթյան Միսակ Արշամի

ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Պատվականյանի
Հրատ. սրբագրումը՝ Վ. Դերձյանի

Տպագրված է «Վարդան Մկրտչյան» ԱՁ տպագրատանը:
Երվանդ Քոչար 7-62

Չափսը՝ 60x84 $^{1}/_{16}$: Տպ. մամուլը՝ 3,5:
Տպաքանակը՝ 100:

ԵՊՀ հրատարակչություն,
ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1

ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆ 2015