

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Հայրապետյան Ն. Կ., Դավթյան Մ. Ա.

ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈՂԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ

Երևան

ԵՊՀ հրատարակչություն

2015

ՀՏԴ 577.1(07)

ԳՄԴ 28.072 ց7

Հ 300

*Հրատարակության է երաշխավորել
ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի
գիրական խորհուրդը*

Հայրապետյան Ն. Կ., Դավթյան Մ. Ա.

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

Մեթոդական ձեռնարկը նախատեսված է կենսաբանության ֆակուլտետի
ուսանողների լաբորատոր աշխատանքների իրականացման համար: Այն
նախատեսված է հիմնական կենսաժոլեկուլների որակական և քանակական վերլու-
ծությունը իրականացնելու մեթոդական ցուցումներ, մաս խնդիրներ՝ առարկա-
յի տիրապետման որակի հսկողության նպատակով:

ՀՏԴ 577.1(07)

ԳՄԴ 28.072 ց7

ISBN 978-5-8084-2013-7

© ԵՊՀ հրատ., 2015

© Հայրապետյան 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 պոլիհիդրօքսիալդեհիդներ և պոլիհիդրօքսիկետոններ 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 ստերեոիզոմների 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, մուկլեոտիդներ) բաղադրամաս են կամ ներգրավվում են բուսական բջիջների, միկրոօրգանիզմների կառուցվածքներում: Կենդանական բջիջներում ածխաջրերը հանդես են գալիս մաս սպիտակուցների հետ զուգորդված ձևով՝ որպես պրոտեոգլիկաններ, գլիկոպրոտեիններ:

Աշխատանք 1

Գլիկոզենի քանակական որոշումը առնետի լյարդում, մկաններում

Նորմալ սնուցման պայմաններում մարդու լյարդում առաջանում է գլիկոզենի դեպո (80-120 գ): Օրվա ընթացքում համարյա ամբողջ պաշարը ծախսվում է: Գլիկոզենի անջատումը իրականացվում է հյուսվածքի մեխանիկական քայքայմամբ և 5% ԵԲԶ-ով էքստրակցիայի միջոցով: Այսպիսի մշակումից սպիտակուցների հիմնական զանգվածը բնափոխվում է և ցեմտրիֆուգմամբ հեշտ հեռացվում: Գլիկոզենի քանակական որոշման համար ավելի հաճախ կիրառվում են քիմիական մեթոդներ անտրոնային ռեակտիվի կամ ֆենոլի և ծծմբական թթվի օգնությամբ: Երկու մեթոդն էլ թույլ են տալիս որոշել գլիկոզենը 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 $80-90^\circ\text{C}$), գլյուկոզի ստանդարտ լուծույթներ (50, 100, 200 մկգ գլյուկոզը լուծել 500 մլ բենզոաթթվի հազեցած լուծույթում), ֆիզիոլոգիական լուծույթ (0,9% NaCl), 5% ԵԲԶ:

Աշխատանքի ընթացքը

Անջատել քաղցած և կերակրված կենդանու լյարդը կամ կմախքային մկանները, մանրացնել: Գլիկոզենը ճեղքող ֆոսֆորիլազ ֆերմենտի ինակտիվացիայի նպատակով հյուսվածքները տեղափոխել NaCl-ի իզոտոնիկ լուծույթով (եռացող) բաժակի մեջ, տասը թուպե անց հանել լուծույթից: Քաղցած և կերակրված կենդանիների 0,5-ական գրամ հյուսվածքը տրորել հավանգում, ավելացնելով 3 մլ ԵԲԶ (10 թուպե): Էքստրակտներին ավելացնել 3-ական մլ H_2O , մուշները ցեմտրիֆուգել 5 թուպե 3000 պտ/ր արագությամբ: Վերնստվածքներում գլիկոզենի 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՝ արսցիսների առանցք - գլյուկոզի կոնցենտրացիա, օրդինատների առանցք - օպտիկական խտություն: Հետազոտվող նմուշներում գլյուկոզի քանակությունը հաշվարկել ստանդարտ կորով, որը կառուցվում է որոշման յուրաքանչյուր սերիայում: Գլիկոզենի քանակության որոշման համար գլյուկոզի ստացված քանակությունը բազմապատկել 0,9-ի (գլիկոզենում 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 (էտալոմային մմուշ) լցնել 0,02 մլ գլյուկոզի լուծույթ և 3 մլ աշխատանքային ռեակտիվ, երրորդ փորձանոթի մեջ (ստուգիչ մմուշ)՝ 0,02 մլ թորած ջուր և 3 մլ աշխատանքային ռեակտիվ: Խառնուրդները ինկուբացնել 15 րոպե, 37°C պայմաններում: Ինկուբացիայից 5-10 րոպե անց մմուշները ինտենսիվ քափահարել: Չափել փորձնական և էտալոմային մմուշների օպտիկական խտությունը ստուգիչ մմուշի դիմաց (ալիքի երկարությունը 470-540 նմ, կյովետի լայնությունը 0,5 սմ):

$$\text{Հաշվարկ՝ } C = 10 \times A / \Theta$$

A - փորձնական մմուշի օպտիկական խտությունը

Θ - էտալոմային մմուշի օպտիկական խտությունը

C – գլյուկոզի փորձնական մմուշի խտությունը (մմոլ/լ)

10 - գլյուկոզի ստանդարտ մմուշի 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):

$$C_x = E_x / E_{\text{ստ}} \times C_{\text{ստ}}$$

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

C_x - գլյուկոզի կոնցենտրացիան հետազոտվող լուծույթում (մգ/մլ)

E_x - հետազոտվող լուծույթի օպտիկական խտությունը

$E_{\text{ստ}}$ - 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 գլյուկոզաօքսիդազային եղանակով: Արյանը ավելացնել 1,5 միավոր կենդանու ինսուլին՝ 1 կգ կշռի հաշվարկով: Ինսուլինի 1մլ պրեպարատը պարունակում է 20-40 միավոր: Ինսուլինը նոսրացնել ֆիզիոլոգիական լուծույթով՝ 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 գլյուկոզի 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: Դագարին ներարկել աղբենալինի 0, 1% լուծույթ (0,3 մլ 1կգ մարմնի զանգվածին): Ներարկումից 30 րոպե անց նորից վերցնել արյուն և որոշել գլյուկոզի քանակությունը:

Աշխատանք 6

Ալյուրազի ակտիվության որոշումը արյան շիճուկում

Ալյուրազը բարձրասպեցիֆիկ ֆերմենտ է, տրոհում է ֆրուկտոզա-1,6-դիֆոսֆատը երկու ֆոսֆորիլոզների: 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% ԵԲԶ, 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 ԵԲԶ, 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, կյովետի լայնությունը 0,5 սմ): Ալբոլազի ակտիվությունը արտահայտվում է էքստինկցիայի արժեքներով՝

$$E \times (E_{\text{փ}} - E_{\text{ստ}}) \times 100:$$

Ստացված արժեքը անվանվում է ալբոլազի ակտիվության միավոր:

Նորմայում 0,5 մլ արյան շիճուկում պարունակվող ալբոլազի քանակությունը տրոհում է 1,6-ֆրոկտոզադիֆոսֆատի 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% ԵԶԶ, Կրեբս-Ռինգերի լուծույթ (2 մլ 0,6 M NaCl, 1 մլ 56mM MgCl₂, 1 մլ 20mM CaCl₂, 1 մլ 10mM Na₂HPO₄, 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°C

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

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

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 կալով ադսորբելով: Ենթաստամոքսային գեղձը անջատել ճարպային հյուսվածքից, մանրացնել, լուծել ացետոնով և թափահարել 2 ժամ, այնուհետև ֆիլտրել, նստվածքը մորից մշակել ացետոնով, հետո ացետոն-էթեր խառնուրդով (1:1) և վերջում միայն էթերով (էրկու 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 ($38^{\circ}C$): 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 բջջի թաղանթների կառուցվածքը, հանդիսանում են երգիայի 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՝ լիպոպրոտեինների 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, ագլիզիդներ), 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 արերոսկլերոզի, 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 ԵԶԶ-ով նստեցնելուց հետո:

Ռեակտիվներ՝ 10% ԵԶԶ, 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 ԵԶԶ (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, նրստվածքին 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-սկան 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 = $10 \times \text{Էփ/Էստ}$

Մնուլ-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, CdCl₂-ի սպիրտային լուծույթ, 10% HCl, 1% ամոնիումի մոլիբդատ, MgSO₄, KNO₃, Na₂CO₃

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°C): Էքստրակցիայի ավարտից հետո, հեղուկը ֆիլտրել և ֆիլտրատում կատարել իդենտիֆիկացիա:

2) 10 կաթիլ ֆոսֆատիդների սպիրտային լուծույթին ավելացնել 2-4 կաթիլ CdCl₂ հազեցած 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 սկրոլեին (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 փորձառոտում գունավորումը անհետանում է, քանի որ հիմքի ավելցուկը փոխազդում է լիպոլիզի հետևանքով առաջացած ճարպաթթուների հետ, երկրորդ փորձառոտում 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 փորձառոտում լցնել 10 մլ կաթ և նախապես ինակտիվացված (եռացնելով) 1մլ լիպազ, առաջին (փորձնական) մմուշի մեջ լցնել 10 մլ կաթ և 1մլ լիպազ, երկրորդի մեջ՝ 10 մլ կաթ, 1 մլ լիպազ և 1մլ լեղի: Ինկուբացիոն մնուշները խառնել, յուրաքանչյուր մմուշից 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 մնուշները դնել թերմոստատ ($38-40^{\circ}\text{C}$): 10, 20, 30, 40 րոպե պարբերականությամբ յուրաքանչյուր մմուշից վերցնել 2-ական մլ և NaOH-ի լուծույթով տիտրել: Տիտրման ժամանակը և ծախսված NaOH-ի քանակությունը ֆիքսել աղյուսակում: Երկրորդ և երրորդ մնուշների տիտրման արժեքից հանել առաջին մմուշի 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, ՈւՄ, 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 $50-60^{\circ}\text{C}$ 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 աստղիատներ, 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 ստեղծել, գունավորման փոփոխությունները գրանցել աղյուսակում:

	10% ալբու- մին (մլ)	10% CaCl_2 (մլ)	H_2O (մլ)	Ընդհա- նուր ծա- վալ (մլ)	Ալբումինի խտու- թյուն 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:

Երկրորդ շարքի փորձը	CaCl ₂ նախնական խտություն (%)	CaCl ₂ Լ-թի ծավալ (մլ)	CaCl ₂ Լ-թի խտություն (%)	Ալբումին (մլ)	H ₂ O (մլ)	Արդյունք
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 (հիպոքլորիդիա) հանդիպում է հիպոացիդային գաստրիտի, երբեմն նաև ստամոքսի խոցի դեպքում: Աքլորիդիային առաջանում է խրոնիկ գաստրիտի, ստամոքսի քաղցկեղի դեպքում: HCl-ի և պեպսինի (ախիլիա) բացակայությունը հաճախ վկայում է ստամոքսի չարորակ նորագոյացության մասին: Աքլորիդիային ուղեկցվում է ստամոքսում խմորման արգասիքների առաջացմամբ (կաթնաթթու, քաղցախաթթու): Ազատ HCl-ի և ընդհանուր թթվայնության աճը (հիպերքլորիդիա) ի հայտ է գալիս հիպերացիդային գաստրիտի, տասներկումատնյա աղիքի, ստամոքսի խոցի դեպքում:

Ընդհանուր թթվայնության, ազատ և կապված աղաթթվի որոշումը ստամոքսահյուսում

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

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

Աշխատանքի ընթացքը

Անոթի մեջ լցնել 5 մլ հետազոտվող ստամոքսահյուս, 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 ստամոքսահյուսի թթվային համարժեքի չեզոքացման համար:

Օրինակ. 5 մլ ստամոքսահյուսի 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՝ $(2 \times 100):5=40$ 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՝ $(3,18 \times 100):5=63,6$ 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% FeCl₃, 40% կաթնաթթու

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել երկաթի ֆենոլյատի լուծույթ՝ 2 մլ ֆենոլին ավելացնել 3 կաթիլ FeCl₃: 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 մինչև 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% CH₃COOH 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°C , 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% Na₂CO₃, 0,1N HCl, CH₃COOH
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 մասնականորեն 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 H₂O և 2 մլ նախապես եռացրած էքստրակտ, երրորդի մեջ՝ 5 մլ HCl և 2 մլ էքստրակտ: Փորձանոթները դնել թերմոստատ 38°C պայմաններում 5-10 րոպե: Հետևել ֆիբրինի թելիկների լուծմանը: Լուծվում է առաջին փորձանոթի ֆիբրինը, բանի 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 բափանցիկ, 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: Ջարգացման 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 օքսալատացետատ, 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): Վերնըստվածքը 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, պարոտոմստոզի դեպքում: Ca⁺⁺-ի որոշման կոմպլեքսոնոմետրիկ եղանակը հիմնված է կոմպլեքսոնի առաջացման վրա, կոմպլեքսոն է հանդիսանում ԷԴ-SU-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 կապտամանուշակագույնի):

Ռեակտիվներ՝ արյան շիճուկ, 9 M NaOH, մուրեքսիդ, 0,002 M ԷԴ-SU

Աշխատանքի ընթացքը.

Անոթի մեջ լցնել 25 մլ ջուր, ավելացնել 0,25 մլ NaOH-ի լուծույթ և շաատելով ավելացնել մուրեքսիդի բյուրեղներ: Ստացված լուծույթին ավելացնել 1 մլ հետազոտվող արյան շիճուկ: Տիտրել ԷԴ-SU-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- ԷԴ-SU-ի մոլ-նը

40.08- Ca⁺⁺-ի - ատամային զանգվածը

25 - մմոլ/լ անցնելու գործակից

1 - արյան շիճուկի ծավալը (մլ)

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

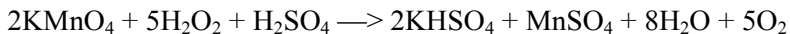
Աշխատանք 19

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:

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



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 1մլլ 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 մլլ 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:

$$կթ = (A-B) \times 1,7$$

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, վայծաղից, 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% ԵԲԶ, 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 1 ժամ
փորձնական (1)	5,0 մլ	0,5 մլ	$37^{\circ}C$
ստուգիչ (2)	5,0 մլ	0,5 մլ	սենյակ. t°

Պատրաստված նմուշները ինկուբացնել, փորձանոթներում ավելացնել 4,5 մլ 10% ԵԲԶ-ի լուծույթ, ցենտրիֆուգել 3000 պտ/վ արագությամբ 10 րոպե: 3-ական մլ վերնստվածք տեղափոխել մաքուր փորձանոթների մեջ, ավելացնել 1 մլ մոլիբդենային ռեակտիվ, 1 մլ ասկորբինաթթվային լուծույթ: Լուծույթները թափահարել, թողնել 15 րոպե մինչև գունավորման զարգացումը, կոլորիմետրել (կարմիր լուսափիլտր 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 BE (Բողանակու միավոր- BE), երեխաների մոտ՝ 5-15 BE:

Երկրորդ եղանակ

Սեթոդի սկզբունքը: Հիմնային ֆոսֆատազի սուբստրատ է միտրոֆենիլֆոսֆատի անգույն լուծույթը: Ռեակցիայի արդյունքում անջատվում է միտրոֆենոլ, որը հիմնային միջավայրում ստանում է դեղին գունավորում: Ռեակցիան դադարեցվում է 0,5 M NaOH-ով: Ռեակցիայի հետևանքով գունավորված միտրոֆենոլի 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 անբույլատրելի է:

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

Աշխատանքի ընթացքը

Փորձնական մմուշը պարունակում է 1մլ միտրոֆենիլֆոսֆատ, ստուգիչ մմուշը՝ 1մլ միտրոֆենիլֆոսֆատ և 0,05 մլ թորած ջուր: Նմուշները ինկուբացնել 5 րոպե, $37^{\circ}C$ պայմաններում: Փորձնական մմուշին ավելացնել 0,05 մլ արյան շիճուկ, ինկուբացնել ևս 5 րոպե ($37^{\circ}C$): Փորձանոթներում ավելացնել 1,5-ական մլ NaOH: Նմուշները կոլորիմետրել թորած H_2O դիմաց (ալիքի երկարությունը 405 մմ, կյովետի լայնությունը 0,5 սմ):

Հաշվարկ՝

$$E = V_1 \times 10^6 \times (D_{\text{վ}} - D_{\text{ստ}}) / V_2 \times 18,3 \times 10^3 \times l \times t$$

V_1 – մնուշի վերջնական ծավալը (մլ)

V_2 – արյան շիճուկի ծավալը (մլ)

l – կյուվետի լայնությունը (սմ)

t – մնուշի 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 ենթաստամոք-սային 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% էթա-նոլ, 1% քիմոլիտալեին, 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 մնուշին ավելացնել 0,1մլ արյան շիճուկ: Նմուշները թափահարել և դնել թերմոստատ 60 րոպե 37° C պայմաններում: Փորձանոթների մեջ ավելացնել 0,3-ա-կան մլ 95% էթիլ սպիրտ ֆերմենտի ազդեցությունը կանխելու նպա-տակով: Երկրորդ՝ ստուգիչ փորձանոթի մեջ ավելացնել 0,1մլ արյան շիճուկ: Փորձանոթների մեջ ավելացնել 1-ական կաթիլ քիմոլիտա-լեին, թափահարել, անջատված ճարպաթթուները տիտրել NaOH-ով մինչև բաց-երկնագույն գունավորումը:

Լիպազի ակտիվությունը հաշվարկել փորձնական և ստուգիչ մնուշների տիտրացիայի համար ծախսված NaOH-ի քանակի տար-բերությամբ, հետևյալ բանաձևով.

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

X - լիպագի 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% CaCl₂

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 վերնատվածքը՝ պլազման: Դեֆիբրինացված արյուն և շիճուկ ստանալու համար նոր վերցված արյունը խառնել ապակյա ձողիկով, ֆիբրինի թելիկները կանջատվեն ձողիկի վրա: Դեֆիբրինացված արյունը ֆիլտրել, ցենտրիֆուգել: Ստացված վերնստվածքը (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% CaCl₂: Փորձանոթները դնել թերմոստատի մեջ (37-38°C, 15-20 րոպե): Արյան մակարդումը դիտվում է միայն 2 և 5 փորձանոթներում:

Աշխատանք 23

Թրոմբինի ակտիվության որոշումը

Ռեակտիվներ՝ 1% NaCl, 28% MgSO₄

Որպես թրոմբինի լուծույթ օգտագործվում է արյան շիճուկը, որպես ֆիբրինոգենի լուծույթ՝ տաքացմամբ ինակտիվացված մագնեզիումային պլազման: Մագնեզիումային պլազման ստանալու նպատակով 3 մլ արյանը ավելացնել 1 մլ MgSO₄ լուծույթ և ցենտրիֆուգել: Թափանցիկ պլազման առանձնացնել, դնել թերմոստատի մեջ (50-60°C, 10 րոպե):

Աշխատանքի ընթացքը

Տաք փորձանոթներից իննի 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 1 մլ տեղափոխել երրորդ փորձանոթի մեջ: Երրորդ փորձանոթի պարունակությունը խառնել և խառնուրդից 1 մլ տեղափոխել չորրորդ փորձանոթի մեջ: Այսպես շարունակել մինչև վերջին փորձանոթը: Վերջին՝ տասներորդ փորձանոթի պարունակությունը ստանալուց հետո, փորձանոթից վերցնել 1 մլ: Այսպես կարելի է ստանալ թրոմբինի նոսրացված երկրաչափական շարք: Ստուգիչ փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ 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 մակարդեղիություն: Ստուգիչ փորձանոթում արյան մակարդում չի գրանցվում:

Թրոմբինի ակտիվությունը արտահայտել արյան շիճուկում 1 մլ չնոսրացված արյան շիճուկով մակարդված պլազմայի քանակությամբ (մլ): Օրինակ, եթե մակարդեղիություն գրանցվել է առաջին ութ փորձանոթներում, իսկ 9 և 10 փորձանոթներում արյունը չի մակարդվել, ապա 1 մլ 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: Նորմալում 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: Դեղքվում 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, լուծելիությամբ և 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 սկզբնաճյուղ 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 մակարդեղիությունը 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% էքսանոլում 1:2 հարաբերությամբ (1գ բուսական փոշի, 20 մլ էքսանոլ): 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% FeCl₃, 33% NaOH, FeSO₄, Ֆելինգի ռեակտիվ

Աշխատանքի ընթացքը

Արբուտինի հայտնաբերում՝ 0,2 գ (0,1 գ) մանրացված տերևները տեղափոխել անոթի մեջ, ավելացնել 10 մլ եռացրած H₂O, թափահարել 1-2 րոպե, ֆիլտրել և արագ սառեցնել:

1) 10 կաթիլ ֆիլտրատին ավելացնել 1 կաթիլ FeCl₃, լուծույթը ստանում է կապույտ գունավորում, ինչը պայմանավորված է երկաթի ֆենոլատի 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 քերմոստատի մեջ (15 րոպե, 40°C) 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 հիդրոլիզին օքսիդանա: Լուծույթի վերին շերտում առաջանում է մուգ գույնի օղակ (խին-հիդրոն՝ հիդրոլիզոնի և խինոնի միացություն):

Աշխատանք 25

Անտրազիկոզիդների բացահայտումը բույսերում

Որոշ դեղաբույսեր (հալվե) պարունակում են անտրազիկոզիդներ, որոնք անտրախինոնի ածանցյալներ են՝ անտրախիդրոլիզոն, դիտրիօքսիանտրախինոն: Անտրախիդրոլիզոնների 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 հալվելի փոշի, ավելացնել 5-10 կաթիլ NaOH : Լուծույթը կստանա վառ կարմիր գունավորում: Լուծույթի քթվայնացումը 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 ջրագրկումը, ինֆեկցիայի ներթափանցումը հյուսվածք:

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

Ռեակտիվներ` յոդի 1% լուծույթ, բուսական օբյեկտներ (հազարաթերթիկ, սզնի, արոհունդ)

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 նրստվածք:

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 հազեցած 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 հազեցած 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 կգարգանա վարդագույն, նարնջագույն կամ կարմիր գունավորում, ինչը պայմանավորված է անտոցիանիդինների առաջացմամբ: Ֆլավոնոլիդների 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):

Ֆլավանոլիդների 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 կատարողիզմի ռեակցիաների սխեման:

բ) Բացատրել գլյուկոզի կոնցենտրացիայի կայունության պատճառը:

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

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

բ) Գրանցել մմուշներում 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 կատարվում 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: Սկանային հյուսվածք պարունակող ինկուբացիոն միջավայր ադրենալին ներարկելուց հետո, բջիջներում g-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) Կարող են արդյոք այդ կենդանիները կատարել ինտենսիվ աշխատանք, օրինակ՝ փախչել վտանգի դեպքում:

10. Զննության 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՝ գլիկոզենի սինթեզ, թե՞ քայքայում: Ներկայացնել կատարվող պրոցեսի սխեման:

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

13. Անաէրոբ գլիկոլիզի ուսումնասիրման նպատակով ինկուբացվել է հետևյալ մուշը՝

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: Կվոլսվի 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 կալո-րիականությամբ սնունդ, մյուսը՝ ցածր կալորիականությամբ սնունդ: Նկարագրել հիվանդների մետաբոլիզմի տարբերությունը՝

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

բ) ո՞ր հիվանդի ագետիլ-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 փո-խանակության տարբերությունները, եթե մեկը ընթրել է և անցել հանգստի, մյուսը՝ ընթրիքը «փոխարինել» է վազքով.

ա) գրել համապատասխան մետաբոլիկ ուղիների սխեման,

բ) բացատրել ուղիներն ակտիվացնող հորմոնների ազդեցությու-նը:

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 աշ-խատանք չի կատարել: Սնվելուց 2 ժամ անց ո՞ր պրոցեսն է ակտի-վանում 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 ագետիլ- KoA է պետք օքսիդացնել մինչև ած-խաթթու գազ և ջուր 3 մոլեկուլ ստեարինաթթվի սինթեզի էներգետիկ ծախսը ապահովելու համար:

20. Ացետիլ-ՔոԱ-ի h°N_2 մինիմալ քանակություն է անհրաժեշտ ստեարինաթթուն մինչև ամխաթթու գազ և ջուր քայքայելու համար, եթե ստեարինաթթուն արդեն միտոքոնդրիումներում է:

21. Ացետիլ-ՔոԱ-ի մոլեկուլների h°N_2 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 պլազմիտինաթթվի աէրոբ օքսիդացման էներգետիկ էֆեկտը:

23. Խալիլի 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: Ինչո՞ւ 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. Գալակտոզմիայի երկու ձևերի կլինիկական ախտանշանները (մեկը պայմանավորված է գալակտոզիմազի 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 «կարձագանքեն» էրիթրոցիտները լակտատդեհիդրոգենազի ինհիբիտորների ներկայությամբ:

28. Երկարատև քաղցի ժամանակ լյարդում էներգիայի աղբյուր են դառնում ճարպաթթուները, որոնց օքսիդացման հետևանքով միտոքոնդրիումներում ավելանում է ացետիլ-ՔoA-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 գլիկոզենի 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 գիալորոնիդազ պարունակող քսուկներ: Ինչո՞վ են պայմանավորված դրանց բուժիչ հատկությունները:

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

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

ԿԵՆՍԱԲԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ
ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈՂԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ

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

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

Չափսը՝ 60x84 $\frac{1}{16}$: Տպ. մամուլը՝ 3,5:
Տպաքանակը՝ 100:

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