

PROGRAM CWICZEŃ Z BIOCHEMII DLA STUDENTÓW JEDNOLITYCH STUDIÓW STACJONARNYCH KIERUNEK FIZJOTERAPIA

Ćwicz.1 Repetytorium wybranych zagadnień z chemii nieorganicznej Badanie kwasowości wskazanych roztworów. Bufory krwi.

Dysocjacja elektrolityczna, stopień dysocjacji, stała dysocjacji, iloczyn jonowy wody. Elektrolity mocne i słabe. Dysocjacja kwasów, zasad i soli, pH. Bufory, mechanizm działania buforów. Jony obojętne. Roztwory właściwe, koloidalne i zawiesiny.

Węglowodory nasycone, nienasycone i aromatyczne. Grupy funkcyjne w związkach organicznych. Alkohole, fenole, aldehydy, ketony, kwasy organiczne (hydroksykwas, ketokwas, kwasy wielokarboksylowe, bezwodniki kwasowe). Właściwości chemiczne wymienionych związków. Reakcje utleniania i redukcji w chemii organicznej. Reakcje dekarboksylacji. Estry kwasów organicznych i nieorganicznych. Tioestry: Aminy, amidy i aminokwasy.

Ćwicz.2 Metabolizm białek i podstawy enzymologii.

Jony obojętne aminokwasów. Punkt izoelektryczny. Wiązanie peptydowe. Peptydy, białka. Struktura przestrzenna białek. Przemiany amonokwasów: dekarboksylacja, transaminacja, oksydacyjna dezaminacja aminokwasów. Cykl mocznikowy - bilans energetyczny cyklu i lokalizacja komórkowa.

Równowaga chemiczna, stała równowagi. Szybkość reakcji chemicznej. Kataliza i katalizatory. Reakcje utleniania i redukcji. Enzymy jako biokatalizatory. Wpływ enzymów na energię aktywacji i stałą równowagi reakcji. Mechanizm oddziaływania enzymu z substratem. Równanie reakcji enzymatycznej. Kinetyka reakcji enzymatycznej Michaelisa-Menten. Wpływ stężenia enzymu, temperatury i pH na szybkość reakcji enzymatycznej. Enzymy regulatorowe (allosteryczne). Klasyfikacja enzymów. Witaminy jako koenzymy.

Ćwicz. 3 Metabolizm cukrów

Izomeria cukrów, ketozy–aldozy (przykład), struktury cykliczne (piranozy, furanozy), izomeria (α – β). Wiązanie glikozydowe. Polisacharydy zapasowe (skrobia, glikogen, ich budowa). Enzymy rozkładające wiązanie glikozydowe. Dwa tory rozkładu glikogenu (trawienny i endogenny). Glikoliza beztlenowa - lokalizacja w komórce. Fosforylacja na poziomie substratu w glikolizie. Przemiana pirogronianu - tlenowa, beztlenowa. Bilans energetyczny glikolizy beztlenowej i tlenowej. Cykl Cori. Cykl pentozofosforanów, jego lokalizacja komórkowa i znaczenie. Glukoneogeneza, lokalizacja komórkowa cyklu. Cykl Krebsa (substraty, ilość CO₂, bilans energetyczny. Fosforylacja na poziomie substratu w cyklu Krebsa, łańcuch oddechowy, lokalizacja komórkowa cyklu, zasady organizacji przemian w łańcuchu oddechowym, fosforylacja oksydacyjna.

Ćwicz. 4 Tłuszcze i ich metabolizm.

Trawienie tłuszczu. Enzymy lipolityczne. Lipoproteiny. Mobilizacja tłuszczów z komórek tłuszczowych. β -oksydacja, etapy cyklu, koenzymy. Bilans energetyczny β oksydacji (jeden obrót cyklu oraz pełny bilans degradacji kwasu palmitynowego C16, stearynowego C18, mirystynowego C14, arachidonowego C20). Różnice pomiędzy β -oksydacją a biosyntezą (lokalizacja, enzymy, koenzymy). Ciała ketonowe.

Ćwicz. 5 Integracja metabolizmu

ATP jako nośnik energii. Fosforany wysokoenergetyczne. Fosfageny. Energetyka skurczu mięśnia. Reakcja kinazy adenylowej. Mechanizm resyntezy ATP. Losy pirogronianu w mięśniu. Substraty energetyczne wykorzystywane do produkcji energii w mięśniu szkieletowym w zależności od intensywności pracy mięśniowej. Zmiany strukturalne i metaboliczne wywołane pod wpływem treningu (szybkościowego lub wytrzymałościowego).

Ćwicz. 6 Sprawdzian pisemny

Ćwicz. 7 Poprawa sprawdzianu pisemnego

ĆWICZENIE nr 1

**REPETYTORIUM Z ZAKRESU PODSTAWOWYCH WIADOMOŚCI
Z CHEMII NIEORGANICZNEJ**

1. Podstawowe pojęcia

Dysocjacja elektrolityczna, stopień dysocjacji, stała dysocjacji, iloczyn jonowy wody. Elektrolity mocne i słabe. Dysocjacja kwasów, zasad i soli, pH. Bufory, mechanizm działania buforów. Reakcje utleniania i redukcji. Roztwory właściwe, koloidalne i zawiesiny.

Węglowodory nasycone, nienasycone i aromatyczne. Grupy funkcyjne. Alkohole, fenole, aldehydy, ketony, kwasy organiczne (hydroksykwas, ketokwas, kwasy wielokarboksylowe, bezwodniki kwasowe). Własności chemiczne wymienionych związków. Estry kwasów organicznych i nieorganicznych. Tioestry: Aminy, amidy i aminokwasy.

1. BADANIE KWASOWOŚCI WSKAZANYCH ROZTWORÓW

Oznaczyć przy użyciu pehametru odczyn:
wody destylowanej
buforu fosforanowego

Porównanie własności buforujących wody destylowanej, buforu fosforanowego

Do zlewki z wodą destylowaną dodawać kroplami 1N roztwór HCl, a następnie 1N NaOH-obsługując przy tym zmiany pH.

Powtórzyć pomiar z buforu fosforanowym zamiast wody destylowanej

BUFORY KRWI

1) Węglanowy

NaHCO_3 dysocjuje w środowisku wodnym $\text{NaHCO}_3 \rightleftharpoons \text{Na}^+ + \text{HCO}_3^-$

H_2CO_3 dysocjuje wg schematu $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$

Jony H^+ powstałe w procesach metabolicznych reagują z jonami HCO_3^- pochodzącymi z

dysocjacji soli: $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$
powstaje słabo zdysocjowany kwas do płuc

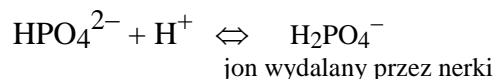
Jeżeli w ustroju pojawiają się jony OH^- to reagują z protonami H^+ pochodzącymi z dysocjacji kwasu węglowego: $\text{H}^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$ (woda jest w bardzo małym stopniu zdysocjowana)

2) Fosforanowy

KH_2PO_4 w środowisku wodnym $\text{KH}_2\text{PO}_4 \rightleftharpoons \text{K}^+ + \text{H}_2\text{PO}_4^-$

Na_2HPO_4 dysocjują całkowicie $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightleftharpoons 2 \text{Na}^+ + \text{HPO}_4^{2-}$

Jony H^+ powstałe w organizmie reagują z HPO_4^{2-} :

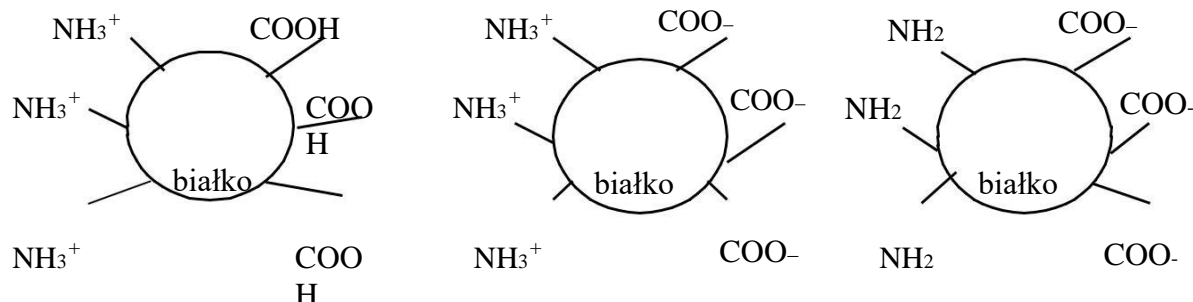


Jony OH^- reagują z H_2PO_4^- :



3) Białczanowy (białko/białczany.)

Białko w zależności od pH środowiska może występować w różnych postaciach: jako jon dodatni (kation przy $\text{pH} < \text{pH}$ punktu izoelek.), ujemny (anion przy $\text{pH} > \text{pH}_i$) i obojętny (obojętny przy $\text{pH} = \text{pH}_i$)



Gdy wzrasta stężenie jonów H^+ , to reagują one z grupami COO^- i NH_2 wiążąc wolny H^+
 Gdy wzrasta stężenie jonów OH^- , to reagują one z grupami COOH i NH_3^+ , które oddając jon H^+ tworzą cząsteczkę wody.

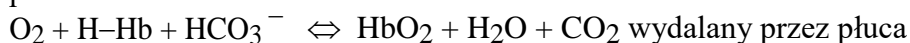
4) Hemoglobinowy

Hemoglobina jest najważniejszym układem buforującym wśród białek - wynika to z faktu, że stanowi ona prawie 3/4 całkowitego białka krwi. Hemoglobina ma charakter kwaśny z powodu przewagi grup kwasowych hemu nad grupami zasadowymi globiny - stąd hemoglobina posiada zdolność wiązania zasad.

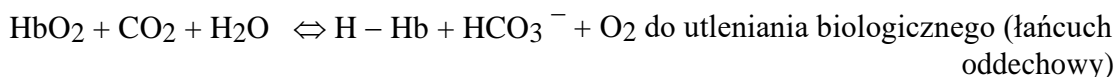
Kwaśność hemoglobiny zależy od stopnia utlenowania. Oksyhemoglobina (hemoglobina utlenowana) jest mocniejszym kwasem niż hemoglobina odtlenowana. Wynika to z porównania stałych dysocjacji, które wynoszą dla HbO_2 $2,4 \times 10^{-7}$ ($\text{pK}_a=6,95$) a $6,6 \times 10^{-9}$ dla hemoglobiny wolnej ($\text{pK}_a=8,25$). Wynika stąd, że Hb utlenowana (HbO_2) jest 40-70 razy silniejszym kwasem od Hb. Zatem hemoglobina utlenowana niechętnie będzie przyjmowała jony H^+ , natomiast po oddaniu tlenu tkankom reaguje z H^+ wytwarzanymi w tych tkankach.

Połączenie się grupy hemowej Hb z O_2 sprzyja dysocjacji protonów z części globinowej, zaś wiązanie H^+ przez globinę sprzyja oddawaniu tlenu przez grupę hemową. Ta właściwość hemoglobiny ma podstawowe znaczenie dla transportu tlenu z płuc do tkanek i dwutlenku węgla z tkanek do płuc.

płuca:



tkanki:



W układzie otwartym (ciągły dopływ CO_2 z tkanek i stałe wydalenie CO_2 przez płuca) pojemność buforowa krwi wynosi 76,8 mmoli na jedną jednostkę pH, z czego 55,2 mmoli przypada na bufor wodorowęglanowy (~72% ogólnej pojemności buforującej w układzie otwartym). Przez wzmożenie wentylacji płuc pojemność buforująca krwi może zwiększyć się o dalsze 41,6 mmoli na jedną jednostkę pH [F. Kokot "Gospodarka wodno-elektrolitowa i kwasowo-zasadowa w stanach fizjologii i patologii"]

Ogólnoustrojowa pojemność buforująca wynosi średnio 14 mmoli/jednostkę pH/kg m.c. W tym 10% uwarunkowane jest układami buforującymi krwi, 51% - układami buforującymi tkanek, a 39% - wentylacją płuc.

ĆWICZENIE nr 2

AMINOKWASY I BIAŁKA ENZYMY

Część teoretyczna:

Jony obojętne aminokwasów. Punkt izoelektryczny. Wiązanie peptydowe. Peptydy, białka. Struktura przestrzenna białek. Przemiany aminokwasów: dekarboksylacja, transaminacja, oksydacyjna dezaminacja aminokwasów. Cykl mocznikowy - bilans energetyczny cyklu i lokalizacja komórkowa.

Równowaga chemiczna, stała równowagi. Szybkość reakcji chemicznej. Enzymy jako biokatalizatory. Wpływ enzymów na energię aktywacji i stałą równowagi reakcji. Mechanizm oddziaływania enzymu z substratem. Równanie reakcji enzymatycznej. Kinetyka reakcji enzymatycznej Michaelisa-Menten. Wpływ stężenia enzymu, temperatury i pH na szybkość reakcji enzymatycznej. Enzymy regulatorowe (allosteryczne). Klasyfikacja enzymów. Witaminy jako koenzymy.

Część praktyczna

BIAŁKA I AMINOKWASY

1) Wykrywanie aminokwasów - REAKCJA NINHYDRYNOWA

Wszystkie aminokwasy charakteryzują się obecnością dwóch zdolnych do reagowania grup funkcyjnych: - grupy karboksylowej ($-\text{COOH}$) i pierwszorzędowej grupy aminowej ($-\text{NH}_2$). Aminokwasy ulegają pod wpływem ninhydryny dekarboksylacji i utlenieniu, przy czym wydziela się amoniak i dwutlenek węgla, zaś ninhydryna ulega redukcji. Następnie zredukowana cząsteczka ninhydryny tworzy z drugą niezredukowaną cząstką ninhydryny i dwiema cząsteczkami amoniaku barwne, fioletowo-niebieskie połączenie. Prolina i hydroksypolina dają produkty o barwie żółtej. Roztwory białek barwią się również z ninhydryną, jednak intensywność barwy jest mała.

Wykonanie:

- odmierzyć do jednej probówki około 1 ml roztworu glicyny, do drugiej 1 ml roztworu proliny
- do obu próbek dodać kilka kropel roztworu ninhydryny
- ogrzewać probówki przez trzy minuty w łaźni wodnej
- zaobserwować powstałe zabarwienie

2) Wykrywanie białek - REAKCJA BIURETOWA

Jest to reakcja charakterystyczna dla związków posiadających wiązanie peptydowe: peptydów i białek. Nazwa reakcji wywodzi się od najprostszego dającego ją związku: biuretu posiadającego ugrupowanie $-\text{CO}-\text{NH}-$, powstałego z mocznika.

Z wiązaniami tego typu jony miedziowe (Cu^{2+}) tworzą w środowisku zasadowym kompleksy o barwie fioletowej. Jony miedziowe tworzą również barwne kompleksy z wolnymi aminokwasami, jednakże ich barwa ma inny odcień (niebieski) i jest znacznie mniej intensywna. Reakcję tę wykorzystuje się do ilościowego oznaczenia białka.

Wykonanie:

- odmierzyć do jednej probówki 1 ml roztworu białka, do drugiej 1 ml roztworu biuretu (uzyskanego w wyniku stopienia kilku kryształków mocznika i rozpuszczeniu go w wodzie i do trzeciej 1 ml 0,9% NaCl)
- dodać do wszystkich prób po około 2 ml odczynnika biuretowego
- zaobserwować powstałe zabarwienie

3) DENATURACJA BIAŁEK

Denaturacja występuje wówczas, gdy pod wpływem czynników fizycznych lub chemicznych zdeformowaniu lub zniszczeniu ulega struktura drugo-, trzecio- lub czwartorzędowa. Denaturację białek można spowodować przez ogrzanie roztworu do wrzenia (koagulacja cieplna), działanie jonami metali ciężkich (na przykład ołowiu, srebra, rtęci), działaniem kwasami nieorganicznymi (np. kwasem nadchlorowym) lub organicznymi (np. kwasem trójchlorooctowym, sulfosalicylowym, pikrynowym). Rozpuszczalniki organiczne działające odwadniająco (np. etanol czy aceton) oraz sole nieorganiczne (np. siarczan amonu czy magnezu) będą powodowały wytrącanie się białek. Zjawisko to wykorzystuje się do frakcjonowania białek z roztworów zawierających mieszaninę różnych białek.

Wykonanie:

- odmierzyć do trzech próbek po 1 ml roztworu białka
- dodać do pierwszej próbki: 1 ml etanolu
do drugiej: 1 ml 10% kwasu trójchlorooctowego (TCA)
- następnie do każdej z próbek dodać po około 10 ml wody destylowanej
- zaobserwować zachowanie się białka pod wpływem dodanych odczynników i pod wpływem dodanej wody.

4) Wyznaczanie punktu izoelektrycznego białek (demonstracja)

Przygotować 8 suchych próbek. Po 1-szej odmierzyć 3,2 ml 1 M roztworu kwasu octowego i 6,8 ml wody destylowanej, do następnych 7-miu - po 5 ml wody. Po dokładnym wymieszaniu zawartości w próbce 1-szej, przenieść z niej 5 ml do drugiej, a z tej z kolei, też po wymieszaniu - 5 ml do trzeciej itd. Do każdej próbki dodać po 1 ml roztworu kazeiny (5 g/l białka w 0,1 M roztworze octanu sodowego) i wymieszać. Obserwować roztwory natychmiast po zmieszaniu i po 15 minutach inkubacji. Wynik wpisać do tabelki:

Nr próbki	1	2	3	4	5	6	7	8
ilość ml 1M kw. octow.	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025	0.012
pH roztworu	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0	5.3	5.6
Zmętnienie								
Osad								

ENZYMY

A. Hydroliza enzymatyczna skrobi przez amylazę ślinową.

Amylaza należy do enzymów hydrolitycznych (hydrolaz) biorących udział w trawieniu skrobi poprzez rozkład wiązań glikozydowych typu α 1–4. Pod wpływem tego enzymu skrobia hydrolizuje stopniowo, poprzez kolejne dekstryny, do maltozy.

Wykonanie:

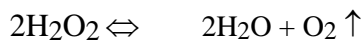
- umieścić w zagłębieniach dwóch płytek porcelanowych po 2-3 krople płynu Lugola (roztwór jodu w jodku potasu)
- wypłukać dokładnie usta około 10 ml ciepłej wody destylowanej i wypłuć do czystej zlewki.

Roztwór zawierający enzym podzielić na dwie porcje - jedną z tych porcji zagotować.

- odmierzyć do dwóch probówek po 5 ml 1% świeżo sporządzonego roztworu skrobi
- do pierwszej probówki dodać 2 ml roztworu śliny a do drugiej 2 ml ugotowanego roztworu śliny, obie probówki umieścić w łaźni wodnej o temperaturze 37°C
- natychmiast po rozpoczęciu inkubacji, a następnie w odstępach dwuminutowych pobierać po jednej kropli mieszaniny inkubacyjnej, którą należy umieścić w kolejnych zagłębieniach płytek porcelanowych z płynem Lugola
- obserwować zmianę barwy kompleksu skrobi z jodem w miarę postępu hydrolizy
- wyjaśnić przyczyny obserwowanych różnic w przebiegu reakcji.

B. Oksydoreduktazy - katalaza.

Jest jednym z najbardziej aktywnych enzymów w organizmie. Występuje w wątrobie, krwinkach czerwonych i białych, w nerkach, nie występuje natomiast w surowicy krwi. Pod wpływem tego enzymu następuje rozkład nadtlenu wodoru do tlenu i wody:



Wykonanie:

Do probówki zawierającej około 5 ml wody destylowanej dodać 2-3 krople krwi. Po całkowitym zhemolizowaniu dodać kilka kropel wody utlenionej i obserwować reakcję.

ĆWICZENIE nr 3

CUKRY

Część teoretyczna

Izomeria cukrów, ketozy–aldozy (przykład), struktury cykliczne (piranozy, furanozy), izomeria (α – β). Wiązanie glikozydowe. Polisacharydy zapasowe (skrobia, glikogen, ich budowa). Enzymy rozkładające wiązanie glikozydowe. Dwa tory rozkładu glikogenu (trawienny i endogenny). Glikoliza beztlenowa – lokalizacja w komórce. Fosforylacja na poziomie substratu w glikolizie. Przemiana pirogronianu – tlenowa, beztlenowa. Bilans energetyczny glikolizy beztlenowej i tlenowej. Cykl Cori. Cykl pentozofosforanów, jego lokalizacja komórkowa i znaczenie. Glukoneogeneza, lokalizacja komórkowa cyklu. Cykl Krebsa (substraty, ilość CO_2 , Bilans energetyczny. Fosforylacja na poziomie substratu w cyklu Krebsa, łańcuch oddechowy, lokalizacja komórkowa cyklu, zasady organizacji przemian w łańcuchu oddechowym.

Część praktyczna

A. WŁASNOŚCI REDUKUJĄCE CUKRÓW

a) *Próba Benedicta*

Obecność w cząsteczce cukru wolnej grupy karbonylowej (aldehdowej lub ketonowej) nadaje mu własności redukujące. Reakcja Benedicta pozwala na odróżnienie cukrów redukujących od nieredukujących na podstawie redukcji jonów miedziowych (Cu^{2+}) do miedziowych (Cu^{+}) w środowisku zasadowym. W reakcji tej w obecności cukru redukującego pojawia się ceglastoczerwony osad tlenku miedziawego (Cu_2O).

Wykonanie:

- odmierzyć do dwóch probówek po 1 ml roztworu: do pierwszej glukozy,
do drugiej skrobi
- do każdej próby dodać 2,5 ml odczynnika Benedicta i kilka kropeł roztworu NaOH
- ogrzewać probówki przez kilka minut we wrzącej łaźni wodnej
- zaobserwować zmiany i wyciągnąć wnioski dotyczące charakteru badanych cukrów

Demonstracja: Wykonać powtórnie próbę z glukozą, dodając w miejsce NaOH, 2 ml roztworu 1N HCl – porównać wyniki prób i wyciągnąć wnioski odnośnie trwałości struktur cyklicznych cukrów w środowisku kwaśnym i zasadowym

b) *Próba z błękitem metylenowym*

Do probówki zawierającej 2 ml 1% roztworu cukru (glukoza) dodać kilka kropeł 0,1% błękitu metylenowego i kilka kropeł 5% roztworu NaOH, ogrzewać i obserwować zmianę barwy. Następnie roztwór ochłodzić pod bieżącą wodą i obserwować zmianę barwy.

Cukier redukujący przeprowadza barwnik (błękit metylenowy) z postaci utlenionej (niebieskiej) w zredukowaną (bezbarwną – leukozwiązku). W wyniku kontaktu z powietrzem następuje ponowne utlenienie zredukowanego barwnika i pojawienie się niebieskiego zabarwienia.

Demonstracja: Wykonać reakcję kontrolną bez dodawania roztworu NaOH. Wyciągnąć wnioski z przeprowadzonych obserwacji.

B. ODRÓŻNIANIE KETOSZ OD ALDOSZ

a) reakcja Seliwanowa

Pod działaniem rozcieńzonego kwasu solnego ketozy przekształcają się znacznie szybciej niż aldozy w pochodne furfuralowe dające z rezorcynolem produkty kondensacji o intensywnej barwie łososiowo-czerwonej.

Wykonanie:

- odmierzyć do dwóch probówek po 1 ml: do pierwszej glukozy,
do drugiej - fruktozy
- dodać do obu probówek po 1 ml odczynnika Seliwanowa
- ogrzewać przez kilka minut we wrzącej łaźni wodnej
- zaobserwować powstałe zabarwienie i wyciągnąć wnioski dotyczące natury badanych cukrów.

C. ODRÓŻNIANIE PENTOSZ OD HEKSOZ

a) reakcja Biała

W obecności soli żelazowych furfural powstały w wyniku odwodnienia pentozy pod wpływem kwasu solnego dają z orcyną kompleksy o barwie zielonej. Wykonanie:

Do 2 ml 0,2% roztworu orcyny w 20% kwasie silnym dodać kroplę 1% roztworu FeCl_3 oraz 0,5 ml roztworu cukru (pentozy lub heksozy). **Uwaga:** Zachować podane proporcje objętości roztworów cukru i orcyny. Obie probówki wstawić do wrzącej łaźni wodnej. Zaobserwować w obecności którego cukru występuje zmiana barwy.

ĆWICZENIE nr 4

TŁUSZCZE I ICH METABOLIZM, HORMONY

I. TŁUSZCZE

Część teoretyczna:

Trawienie tłuszczów. Enzymy lipolityczne. Lipoproteiny. Mobilizacja Tłuszczów z komórek tłuszczowych. β -oksydacja, etapy cyklu, koenzymy. Bilans energetyczny β oksydacji (jeden obrót cyklu oraz pełny bilans degradacji kwasu palmitynowego C16, stearynowego C18, mirystynowego C14, arachidonowego C20). Różnice pomiędzy β -oksydacją a biosyntezą (lokalizacja, enzymy, koenzymy). Ciała ketonowe.

Część praktyczna

Wykrywanie składników tłuszczowców

Tłuszcze właściwe (albo proste) są mieszaninami różnych estrów glicerolu z wyższymi kwasami tłuszczowymi, typu trójglicerydów. Glicerol wykrywa się wykorzystując jego zdolność do tworzenia, w środowisku zasadowym, kompleksu o głęboko niebieskiej barwie..

a) wykrywanie

glicerolu Wykonanie:

- umieścić w próbówce kroplę glicerolu,
- dodać 3 ml 5% etanolowego roztworu NaOH,
- dodać 0,5 ml nasyconego roztworu siarczanu miedziowego CuSO₄, -wykonać próbę kontrolną z wodą destylowaną zamiast glicerolu, -porównać wyniki reakcji.

b) Wykazanie obecności podwójnych wiązań w nienasyconych kwasach tłuszczowych

Jako składniki tych trójglicerydów występują wyłącznie kwasy tłuszczowe o parzystej liczbie atomów węgla (najczęściej C₁₆ i C₁₈) zarówno nasycone jak i nienasycone (zawierające podwójne wiązania). Nienasycone kwasy tłuszczowe zdolne są przyłączać w miejscach podwójnego wiązania:

- chlorowców np. chlor, brom lub jod z utworzeniem chlorowcopochodnych:
- wodór, w wyniku czego tworzy się nasycony kwas tłuszczowy,
- tlenu, z czym połączony jest rozpad kwasu tłuszczowego na dwa fragmenty. W tym ostatnim przypadku czynnikiem utleniającym może być KMnO₄.
- wodę, w wyniku czego powstaje hydroksykwas.

Wykonanie:

- do próbówki zawierającej kilka kropli oliwy dodać 5 ml 1 molowego roztworu Na₂CO₃, -zawartość próbówki lekko ogrzać i wstrząsając dodawać kroplami 0,01 molowy roztwór KMnO₄ aż do pojawienia się nieznikającego różowego zabarwienia,
- wyciągnąć wnioski dotyczące zaobserwowanego zachowania się badanego tłuszczu.

c) Wykrywanie cholesterolu – próba Salkowskiego

do 2 suchych próbek wlać odpowiednio około 2 ml chloroformowego roztworu cholesterolu i tłuszczu zwierzęcego lub roślinnego, następnie oba roztwory podwarstwić stężonym kwasem siarkowym. W obecności cholesterolu na granicy warstw tworzy się pierścień barwy czerwonej. Kwas siarkowy znajdujący się na dnie naczynia wykazuje zieloną fluorescencję.

II. HORMONY

Część teoretyczna:

Podział hormonów ze względu na ich budowę chemiczną. Mechanizm hormonalnego oddziaływania glukagonu i hormonów katecholowych na metabolizm glikogenu. Cykliczny AMP i jego rola w regulacji hormonalnej. Mechanizm działania hormonów steroidowych. Mechanizm działania insuliny.

ĆWICZENIE nr 5

METABOLIZM WYSIŁKOWY

Część teoretyczna

ATP jako nośnik energii. Fosforany wysokoenergetyczne. Fosfageny. Energetyka skurczu mięśnia. Reakcja kinazy adenylowej. Mechanizm resyntezy ATP. Losy pirogronianu w mięśniu. Substraty energetyczne wykorzystywane do produkcji energii w mięśniu szkieletowym w zależności od Intensywności pracy mięśniowej. Zmiany strukturalne i metaboliczne wywołane pod wpływem treningu (szybkościowego lub wytrzymałościowego).

Część praktyczna

1. Oznaczanie kreatyniny

Kreatyna jest syntezowana w wątrobie z trzech aminokwasów: glicyny, argininy i metioniny. Około 98% kreatyny ustrojowej występuje w mięśniach, głównie w postaci połączenia z kwasem fosforowym (fosfokreatyna). Rozszczepienie tego związku przy udziale kinazy fosfokreatynowej dostarcza energii potrzebnej do resyntezy ATP (energii niezbędnej do skurczu mięśnia); resynteza fosfokreatyny odbywa się dzięki energii uwalnianej z ATP. Kreatyna jest wydalana w moczu ludzi dorosłych w postaci bezwodnika zwanego kreatyniną powstającego w wyniku nieodwracalnego i nieenzymatycznego odszczepienia od fosfokreatyny cząsteczki wody i nieorganicznego fosforanu.

Kreatynina tworzy z kwasem pikrynowym w środowisku zasadowym (próba Jaffego) czerwono zabarwiony pikrynian kreatyniny.

– do 1 ml roztworu kreatyniny dodać kilka kropli kwasu pikrynowego i 2N NaOH.

Wymieszać i odstawić na 15 minut

– w obecności kreatyniny roztwór barwi się na pomarańczowo

3. Wykrywanie białek, cukru i ciał ketonowych w moczu

a) wykrywanie białka

W moczu fizjologicznym nie stwierdza się obecności białka. Pojawienie się białka w moczu (proteinuria) jest objawem zwiększonej przepuszczalności kłębków nerkowych lub zmniejszonej reabsorpcji w kanalikach proksymalnych występującej w warunkach patologicznych (zespół nerczycowy, dysfunkcja kanalików proksymalnych) lub fizjologicznych (długotrwały intensywny wysiłek fizyczny).

Wykonanie:

– Zdenaturowane, pod wpływem kwasu, białko ulega wytrąceniu. Dostrzegalne zmętnienie powstaje przy stężeniu białka 1,5 mg%.

– do 1 ml moczu dodać 2 krople 10% kwasu sulfosalicylowego. Pojawienie się osadu lub zmętnienia świadczy o obecności białka

b) wykrywanie glukozy

W moczu fizjologicznym obecności glukozy nie stwierdza się. Glukoza ulega przesączeniu w kłębkach nerkowych w ilości proporcjonalnej do jej stężenia w osoczu krwi. W wyniku reabsorpcji w kanalikach nerkowych stężenie glukozy w moczu jest niskie (rzędu 0,1 do 1 mmol/l) pod warunkiem, że stężenie glukozy w osoczu krwi nie przekracza 11 mmol/l (200 mg/dl).

Glukozuria jest najczęściej objawem podwyższonego stężenia glukozy w osoczu krwi (> 200 mg/dl), gdy ładunek sączonej się glukozy przekracza możliwości transportowe kanalików nerkowych (tzw. próg nerkowy). Ma to miejsce w cukrzycy. Wykonanie:

- Glukoza redukuje kationy miedziowe Cu^{2+} do miedziowych Cu^+ . Wytrąca się czerwony osad tlenku miedziawego.
- do probówki zawierającej 3 ml odczynnika Benedicta dodać 1 ml moczu. Wstawić na 5 minut do wrzącej łaźni wodnej. Wyjąć próbkę, oziębic. Wytrąca się ceglasty osad.

c) wykrywanie ciał ketonowych

Związki („ciała”) ketonowe powstają w przypadku zaburzenia przemiany kwasów tłuszczowych. Pod pojęciem ciał ketonowych rozumie się 3 blisko spokrewnione ze sobą związki: kwas acetooctowy, aceton i kwas β -hydroksymasłowy. Ilość ciał ketonowych występujących normalnie w ustroju w bardzo małych ilościach ulega znacznemu zwiększeniu głównie w cukrzycy, w głodzeniu i przy diecie wysokotłuszczowej. Nasilona ketogeneza ma miejsce również w wysiłku fizycznym o charakterze wytrzymałościowym, gdy głównym substratem energetycznym są tłuszcze. W moczu kwas acetooctowy i aceton występują zawsze razem. Kwas β -hydroksymasłowy pojawia się w moczu w stanach ciężkiej kwasy.

Ciała ketonowe wykrywa się w próbie Legala:

–Každy mocz z nitroprusydkiem po zalkalizowaniu daje czerwone zabarwienie pochodzące od kreatyny. W obecności acetonu lub kwasu acetooctowego zabarwienie to pogłębia się i przechodzi w wiśniowe po dodaniu kwasu octowego. Jeżeli ciał ketonowych brak, czerwone zabarwienie znika po dodaniu kwasu octowego i przechodzi w żółtozielone.

Wykonanie:

- do około 5 ml moczu dodać 0,5 ml 1% roztworu nitroprusydki i 0,5 ml 10% NaOH
 - obserwować zmianę zabarwienia po dodaniu 1 ml kwasu octowego lodowatego
- Przy dużej ilości acetonu, oprócz silnej wiśniowej barwy, zaznacza się wyraźna nieprzejrzystość próby badanej.