

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
ФАКУЛЬТЕТ ХІМІЇ ТА ФАРМАЦІЇ

А. О. Кобернік, Л. В. Еберле, О. І. Грицук

Нейрохімія

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до лабораторних робіт
для студентів денної та заочної форми навчання

ОДЕСА
ОНУ
2021

УДК 573.7:612.603

Рекомендовано вченою радою
факультету хімії та фармації ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 9 від 17.03.2021 р.

Укладачі:

А. О. Кобернік, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків;

Л. В. Еберле, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків;

О. І. Грицук, доктор медичних наук, професор кафедри фармакології та технології ліків.

Рецензенти:

Л. А. Раскола, кандидат хімічних наук, доцент кафедри неорганічної хімії та хімічної екології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

І. Ю. Борисюк, доктор фармацевтичних наук, завідувач кафедри технології ліків Одеського національного медичного університету.

Кобернік А. О.

Нейрохімія : метод. вказівки / А. О. Кобернік, Л. В. Еберле, О. І. Грицук – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2021. – 52 с.

Методичні вказівки для проведення лабораторних занять з курсу «Нейрохімія» призначені для організації роботи студентів з метою вивчення хімічних процесів та клітинних механізмів діяльності нервової системи.

УДК 573.7:612.603

© Кобернік А. О., Еберле Л. В., Грицук О.І., 2021
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2021

ЗМІСТ

	ВСТУП	5
	Інструктаж з техніки безпеки	6
Тема 1.	Фізіологія збудливих систем. Фізіологічні властивості нервів і нервових волокон	9
	1.1. Фізіологія нервів і нервових волокон. Типи нервових волокон	9
	1.2. Механізми проведення збудження по нервовому волокну. Закони проведення збудження по нервовому волокну	11
	Лабораторна робота № 1. Приготування нервово-м'язового препарату жаби і вивчення впливу різних подразників на нього	13
Тема 2.	Фізіологія центральної нервової системи	17
	2.1. Поняття про вищу та нижчу нервову діяльність	17
	2.2. Загальна характеристика умовних і безумовних рефлексів	18
	Лабораторна робота № 2. Вивчення спинномозкових рефлексів. Аналіз рефлекторної дуги	22
Тема 3.	Ліпіди в тканинах головного мозку. Холестерин	26
	3.1. Біологічні функції мембранних ліпідів	27
	3.2. Властивості ліпідного бішару. Ліпіди мієліну ЦНС	28
	3.3. Стероїди	29
	3.4. Метаболізм холестерину в ЦНС	30
	3.5. Дефектні зони. Роль холестерину	31
	Лабораторна робота № 3. Відкриття холестерину в тканинах головного мозку	33
Тема 4.	Ліпіди в тканинах головного мозку. Гліколіпіди	38
	4.1. Загальна характеристика гангліозидів	38

	Лабораторна робота № 4. Методи дослідження гангліозидів	40
Тема 5.	Ліпіди в тканинах головного мозку. Цереброзиди	45
	Лабораторна робота № 5. Методи дослідження цереброзидів головного мозку	45
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ		50

ВСТУП

Вивчення діяльності мозку, в тому числі хімічної, є однією з найважливіших задач біології і є предметом дослідження нейрохімії.

Метою курсу є ознайомлення студентів з загальними біохімічними принципами функціонування центральної і периферичної нервової системи. Ознайомлення з найбільш поширеними хімічними реакціями, які спостерігаються в нервовій системі. Вивчення хімічного складу і метаболізму головного мозку.

Оволодіння знаннями з дисципліни нейрохімія є важливою частиною процесу підготовки висококваліфікованих фахівців з фармацевтичної хімії і фармакології. Глибоке знання предмета дозволяє не тільки розуміти особливості діяльності нервової системи, але і допомагає в розумінні механізмів дії лікарських нейротропних препаратів, а також має вирішальне значення при створенні нових нейротропних ліків і їх клінічному і доклінічному вивченні.

В ході лабораторних занять оволодіння вміннями і навичками проведення нейрохімічних досліджень. Вивчення необхідної термінології, базових принципів і положень нейрохімії.

В ході вивчення дисципліни студент повинен зрозуміти не тільки біохімічні основи функціонування нервової системи, а й знати методи впливу і корекції нейрохімічних процесів, в тому числі, за допомогою фармацевтичних препаратів і лікарських засобів.

Інструктаж з техніки безпеки

Програма навчання на кафедрі фармакології та технології ліків передбачає виконання студентами лабораторних робіт, оволодіння певними практичними навичками роботи з деякими електроприладами, дослідним устаткуванням, лабораторним посудом, хімічними реактивами, експериментальними тваринними і біологічними рідинами, а також з віртуальними програмами з нейрохімії.

1. Загальні вимоги

Студенти до входу в навчальне приміщення повинні надіти халат.

Робоче місце слід утримувати в чистоті, не захаращувати його сторонніми предметами. У робочих приміщеннях лабораторій забороняється зберігати особистий одяг і приймати їжу.

Для загального спостереження за порядком, дотриманням правил і виконанням вимог техніки безпеки при роботі в лабораторіях і навчальних приміщеннях призначаються чергові з числа студентів групи. Чергові по лабораторії зобов'язані йти останніми, перевіривши стан лабораторії і здавши її черговому лаборанту.

Під час роботи в лабораторії слід дотримуватися тиші, порядку і чистоти.

До виконання кожної роботи студенти можуть приступати тільки після отримання дозволу викладача. Приступаючи до роботи, необхідно ознайомитися з методикою її виконання.

2. Правила безпеки при роботі з електрообладнанням і електроприладами

При роботі з електрообладнанням і електроприладами можливі випадки ураження людей електричним струмом і виникнення пожежі.

Причинами пожежі і поразки людей можуть бути: робота з несправним електрообладнанням (рубильники, розетки і ін.),

Відсутність заземлення приладів, порушення правил користування електроприладами, дотик руками або металевими предметами до струмоведучих елементів.

У разі виявлення несправності електроприладу або електрообладнання необхідно повідомити про це викладачеві. При роботі з електрообладнанням і електроприладами суворо забороняється:

- перевіряти наявність напруги пальцями і стосуватися струмоведучих частин;
- працювати на незаземлених обладнанні та приладах, якщо це не дозволено інструкцією до приладу;
- користуватися несправним електрообладнанням і електропроводкою.

3. Правила роботи з лабораторним посудом

У лабораторіях використовується тільки спеціальний неушкоджений посуд. Всі судини повинні мати чіткий і міцний напис. Хімічний посуд повинний бути сухим і чистим. Брудний посуд слід мити відразу ж після закінчення роботи. Для миття посуду можна застосовувати мило, кальциновану соду, сучасні миючі засоби.

4. Правила роботи з отруйними та сильнодіючими речовинами

До отруйних і сильнодіючих речовин, які вимагають при роботі з ними дотримання спеціальних запобіжних заходів, відносяться: концентровані органічні і мінеральні кислоти, кисень, азот, сполуки миш'яку, фосфору, ртуть і ін.

Робота з отруйними та сильнодіючими речовинами доручається тільки працівникам кафедри, допущеним до неї спеціальним наказом або розпорядженням керівника підрозділу.

Студенти до роботи з отруйними та сильнодіючими речовинами не допускаються.

Розчини, необхідні для підтримки життєдіяльності препарату

Для збереження життєдіяльності препарату застосовують ізотонічний розчин хлориду натрію (0,65 % р-н для холонокровних (0,9 % р-н для теплокровних). Такі розчини називаються фізіологічними. Для тривалої підтримки життєдіяльності препарату розчин повинен містити крім хлориду натрію інші речовини (табл.1).

Таблиця 1

Розчини, необхідні для підтримки життєдіяльності препарату

Найменування речовини	Фізіологічний розчин		Розчин Рінгера для холонокровних	Розчин Рінгера-Локка для теплокровних
	для холонокровних	Теплокровних		
Дистильована вода	100 мл	100 мл	100 мл	100 мл
Хлорид натрію	0,65 г	0,9 г	0,65 г	0,9 г
Хлорид калію	-	-	0,014 г	0,042 г
Хлорид кальцію	-	-	0,012 г	0,024 г
Гідрокарбонат натрію	-	-	0,01 г	0,02 г
Глюкоза	-	-	-	0,1 г

Тема 1. ФІЗІОЛОГІЯ ЗБУДЛИВИХ СИСТЕМ. ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НЕРВІВ І НЕРВОВИХ ВОЛОКОН

Структура теми:

1. Збудливість як універсальна властивість клітин. Види подразників.
2. Збудливі тканини: види, неспецифічні властивості (збудливість, провідність, лабільність).
3. Умови ефективності подразника: закон сили, закон часу, закон градієнта.
4. Локальна відповідь: властивості, умови та механізм виникнення.
5. Фізіологічні властивості нервових волокон.
6. Механізми проведення збудження по нервовому волокну.
7. Закони проведення збудження по нервовому волокну

1.1. Фізіологія нервів і нервових волокон. Типи нервових волокон

Фізіологічні властивості нервових волокон:

- 1) *збудливість* – здатність приходити в стан збудження у відповідь на подразнення;
- 2) *провідність* – здатність передавати нервові збудження у вигляді потенціалу дії від місця подразнення по всій довжині;
- 3) *рефрактерність (стійкість)* – властивість тимчасово різко знижувати збудливість в процесі збудження.

Нервова тканина має найкоротший рефрактерний період. Значення рефрактерності - охороняти тканину від перезбудження, здійснює відповідну реакцію на біологічно значимий подразник;

- 4) *лабільність* – здатність реагувати на подразнення з певною швидкістю. Лабільність характеризується максимальним числом

імпульсів збудження за певний період часу (1 с) в точній відповідності з ритмом нанесених подразнень.

Нервові волокна не є самостійними структурними елементами нервової тканини, вони представляють собою комплексне утворення, що включає наступні елементи:

- 1) відростки нервових клітин - осьові циліндри;
- 2) гліальні клітини;
- 3) сполучнотканинну (базальну) пластинку.

Головна функція нервових волокон - проведення нервових імпульсів. Відростки нервових клітин проводять самі нервові імпульси, а гліальні клітини сприяють цьому проведенню. За особливостями будови і функціями нервові волокна поділяються на два види: безмієлінові і мієлінові.

Безмієлінові нервові волокна не мають мієлінової оболонки. Їх діаметр 5-7 мкм, швидкість проведення імпульсу 1-2 м/с.

Мієлінові волокна складаються з осьового циліндра, покритого мієліновою оболонкою, утвореної шваннівськими клітинами. Осьовий циліндр має мембрану і оксоплазму. Мієлінова оболонка складається на 80 % з ліпідів, що володіють високим омичним опором, і на 20 % з білка. Мієлінова оболонка не покриває суцільно осьовий циліндр, а переривається і залишає відкритими ділянки осьового циліндра, які називаються вузловими перехопленнями (перехоплення Ранв'є). Довжина ділянок між перехопленнями різна і залежить від товщини нервового волокна: чим воно товще, тим довше відстань між перехопленнями. При діаметрі 12-20 мкм швидкість проведення збудження становить 70-120 м/с.

Залежно від швидкості проведення збудження нервові волокна діляться на три типи: А, В, С.

Найбільшу швидкість проведення збудження мають волокна типу А, швидкість проведення збудження яких досягає 120 м/с, В має швидкість від 3 до 14 м/с, С - від 0,5 до 2 м/с.

Не слід змішувати поняття «нервове волокно» і «нерв». Нерв – комплексне утворення, що складається з нервового волокна

(мієлінового або безмієлінового), пухкої волокнистої сполучної тканини, що утворює оболонку нерва.

1.2. Механізми проведення збудження по нервовому волокну.

Закони проведення збудження по нервовому волокну

Механізм проведення збудження по нервових волокнах залежить від їх типу. Існують два типи нервових волокон: мієлінові і безмієлінові.

Процеси метаболізму в безмієлінових волокнах не забезпечують швидко компенсацію витрат енергії. Поширення збудження буде йти з поступовим загасанням – з декрементом. Декрементна поведінка збудження характерна для низькоорганізованої нервової системи. Порушення поширюється за рахунок малих кругових струмів, які виникають всередині волокна або в оточуючій його рідині. Між збудженими і незбудженими ділянками виникає різниця потенціалів, яка сприяє виникненню кругових струмів. Струм буде поширюватися від «+» заряду до «-». У місці виходу кругового струму підвищується проникність плазматичної мембрани для іонів Na, в результаті чого відбувається деполяризація мембрани. Між знову порушеною ділянкою і сусідньою незбудженою знову виникає різниця потенціалів, що призводить до виникнення кругових струмів. Порушення поступово охоплює сусідні ділянки осьового циліндра і так поширюється до кінця аксона.

В мієлінових волокнах завдяки досконалості метаболізму збудження проходить, не затухаючи, без декремента. За рахунок великого радіусу нервового волокна, обумовленого мієліновою оболонкою, електричний струм може входити і виходити з волокна тільки в області перехоплення. При нанесенні роздратування виникає деполяризація в області перехоплення А, сусіднє перехоплення В в цей час поляризоване. Між перехопленнями виникає різниця потенціалів, і з'являються кругові струми. За рахунок кругових струмів порушуються інші перехоплення, при цьому порушення поширюється сальтаторно, стрибкоподібно від одного перехоплення

до іншого. Сальтаторний спосіб поширення збудження економічний, і швидкість поширення збудження набагато вище (70-120 м/с), ніж по безмієліновим нервовим волокнам (0,5-2 м/с).

Існує три закони проведення роздратування по нервовому волокну.

● *Закон анатомо-фізіологічної цілісності*

Проведення імпульсів по нервовому волокну можливо лише в тому випадку, якщо не порушена його цілісність. При порушенні фізіологічних властивостей нервового волокна шляхом охолодження, застосування різних наркотичних засобів, здавлювання, а також порізами та ушкодженнями анатомічної цілісності проведення нервового імпульсу по ньому буде неможливо.

● *Закон ізолюваного проведення збудження*

Існує ряд особливостей поширення збудження в периферичних, м'якотних і безм'якотних нервових волокнах.

У периферичних нервових волокнах збудження передається тільки уздовж нервового волокна, але не передається на сусідні, які знаходяться в одному і тому ж нервовому стовбурі.

У м'якушевих нервових волокнах роль ізолятора виконує мієлінова оболонка. За рахунок мієліну збільшується питомий опір і відбувається зменшення електричної ємності оболонки.

У безм'якотних нервових волокнах збудження передається ізолювано. Це пояснюється тим, що опір рідини, яка заповнює міжклітинні щілини, значно нижче опору мембрани нервових волокон. Тому струм, що виникає між деполяризованою ділянкою і неполяризованою, проходить по міжклітинних щілинах і не заходить при цьому в сусідні нервові волокна.

● *Закон двостороннього проведення збудження*

Нервове волокно проводить нервові імпульси в двох напрямках - доцентровий і відцентровий.

В живому організмі збудження проводиться тільки в одному напрямку. Двостороння провідність нервового волокна обмежена в

організмі місцем виникнення імпульсу і клапанною властивістю синапсів, яке полягає в можливості проведення збудження тільки в одному напрямку.

Лабораторна робота № 1. Приготування нервово м'язового препарату жаби і вивчення впливу на нього різних подразників

Роботи по фізіології збудження проводяться на нервово-м'язовому препараті жаби, який складається з литкового м'яза і сідничного нерву з ділянкою хребетного стовпа.

У фізіології застосовують різні подразники: електричні, хімічні, механічні, температурні. Джерелом роздратування препарату може бути також його висихання.

Мета роботи: освоїти методику приготування нервово-м'язового препарату жаби і вивчити дію різних подразників на нього.

Об'єкт дослідження: жаба.

1.1. Приготування нервово-м'язового препарату жаби

Обладнання: набір інструментів для препарування, розчин Рінгера, марлева серветка.

Хід роботи

1. Знерухоміти жабу, зруйнувавши головний і спинний мозок.

Способи знерухомлення жаби:

Для багатьох робіт практикуму з фізіології необхідно знерухоміти жабу. Зробити це можна одним з таких способів.

А. Застосування наркозу. Для наркотизації жаби застосовується 10%-ний розчин спирту або 2%-ний розчин ефіру. Жабу опускають в розчин на 10-15 хвилин. Розслаблення мускулатури і відсутність рухової активності є показниками дії наркозу.

Б. Руйнування спинного і головного мозку. Візьміть жабу в ліву руку спиною вгору так, щоб великий палець лежав на її спині. Вказівний палець покладіть на верхню щелепу жаби і нахиліть її

голову вниз. У такому положенні добре видно місце розташування потиличної ямки. Проколів шкіру і мембрану в цьому місці, введіть голку в порожнину черепа і декількома рухами зруйнують головний мозок. Потім введіть препарувальну голку в спинномозковий канал і зруйнують спинний мозок декількома поворотами голки. Загальне розслаблення м'язів жаби і відсутність у неї рефлекторних реакцій свідчить про повне зруйнування головного і спинного мозку.

В. Декапітація з подальшим руйнуванням спинного мозку. Візьміть жабу в ліву руку, а правою введіть якомога глибше нижнє лезо ножиць в рот під задню частину верхньої щелепи. Швидким рухом відріжте верхню щелепу на рівні заднього кінця барабанних перетинок. В отвір спинномозкового каналу введіть препарувальну голку і зруйнують спинний мозок.

2. Візьміть лівою рукою жабу за стегна і переріжте хребет на 1-1,5 см вище місця відходження тазових кісток. Передню частину тулуба і нутрощі видаліть.

3. Залишок хребта утримуйте пінцетом або лівою рукою. Іншим пінцетом або пальцями правої руки через марлю захопіть шкіру і зніміть її з рук. Отримують препарат задніх лапок жаби, який використовується в деяких експериментах.

4. Обережно візьміть препарат лівою рукою за хребет, обережно виріжте куприкову кістку (уростиль).

5. Розділіть препарат на дві половини. Для цього переріжте уздовж спочатку залишок хребта, а потім - лобкове зчленування.

6. Одну лапку залиште в якості запасної, зберігаючи її в розчині Рінгера. На іншій лапці відпрепаруйте сідничний нерв, видаліть клубову кістку і тканини стегна. Отримана ізольована задня лапка жаби з сідничного нерву (фізіологічний реоскоп). Деякі дослідження виконуються на такому препараті.

7. З ізольованої лапки приготуйте нервово-м'язовий препарат. Для цього підріжте ахіллове сухожилля, відокремте гомілку від кістки. Гомілку і лапку відріжте нижче коліна. Препарат помістіть в розчин Рінгера.

8. Для отримання ізольованого литкового м'яза, після зняття шкіри, не препаруючи нерв, підріжте ахіллове сухожилля, виділіть м'яз і переріжте гомілку нижче колінного суглоба, стегно під колінним суглобом.

9. Занесіть в зошит основні етапи приготування нервово-м'язового препарату.

1.2. Дія різних подразників на нервово-м'язовий препарат

Обладнання: електростимулятор, електроди, набір інструментів для препарування, розчин Рінгера, кристали кухонної солі, спиртівка, гальванічний пінцет.

Хід роботи

1. Електричне подразнення ритмічним струмом нервово-м'язового препарату

Для дослідження порогу збудливості нерву використовуємо віртуальну програму «LuPraFi-Sim» <http://www.ukraine-projekt.de/download.html?n=238>. Розділ: Нервова система «Встановлення порогу збудливості».

Сідничний нерв помістіть на пластину пристрою та підвести електроди, які приєднанні до стимулятора. Встановіть параметри подразнення: частота 20 Гц, тривалість 1 мс, амплітуда 10 - 15 В. Подразнюйте нервовий препарат струмом.

2. Електричне подразнення постійним струмом. Доторкніться гальванічним пінцетом до нерву. Зверніть увагу на швидкість виникнення і припинення відповідної реакції при дії електричного роздратування (рис. 1).

3. Механічне подразнення. Нанесіть пінцетом механічне подразнення на ділянку нерву. Спостерігайте скорочення м'язів.

4. Теплове подразнення. Нагрійте препарувальну голку і доторкніться її бічною поверхнею до нерву. Перевірте, скорочується чи м'яз при дотику нагрітої голки.

5. Хімічне подразнення. Покладіть на нерв кілька кристалів кухонної солі. Відзначте момент настання м'язових скорочень і їх

характер. Змийте сіль розчином Рінгера. Спостерігайте за станом м'язів.

6. **Подразнення внаслідок висихання.** Розмістіть нерв так, щоб він вільно звисав з електродів. Змочуючи м'яз розчином Рінгера, залишайте нерв сухим. Дочекайтесь появи скорочення м'язів.

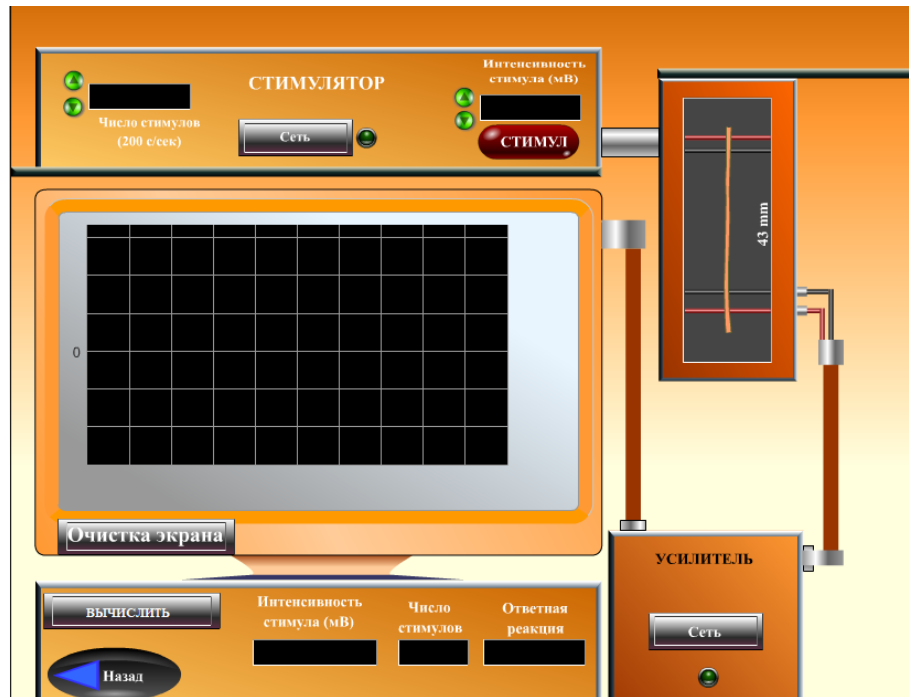


Рис. 1. Віртуальна програма «Встановлення порогу збудливості»

7. Результати спостережень занесіть в зошит. Зробіть висновок про особливості дії різних подразників.

Питання для самостійної роботи:

1. Збудливі тканини: специфічні властивості (генерація нервового імпульсу, скоротність, секреція)
2. Потенціал спокою: величина, методи реєстрації, природа і механізм підтримки.
3. Потенціал дії: величина, методи реєстрації, фази, механізм виникнення і властивості.

ТЕМА 2. ФІЗІОЛОГІЯ ЦЕНТРАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ

Структура теми:

1. Загальні уявлення про нервову систему: функції, класифікація, будова нервової тканини.
2. Проведення збудження по нервовому волокну: структура волокна, закони проведення збудження.
3. Рефлекторна діяльність нервової системи: поняття про рефлекс, класифікація рефлексів, елементи рефлекторної дуги.

2.1. Поняття про вищу й нижчу нервову діяльність

Нижча нервова діяльність являє собою інтегративну функцію спинного і стовбура головного мозку, яка спрямована на регуляцію вегетативно-вісцеральних рефлексів. З її допомогою забезпечується робота всіх внутрішніх органів і їх адекватна взаємодія між собою.

Вища нервова діяльність властива тільки головному мозку, який контролює індивідуальні поведінкові реакції організму в навколишньому середовищі. В еволюційному відношенні це складна функція, яка має ряд особливостей:

1. У якості морфологічного субстрату виступають кора великих півкуль і підкіркові утворення (ядра таламуса, лімбічної системи, гіпоталамуса, базальні ядра).
2. Контролює контакт з навколишньою дійсністю.
3. В основі механізмів виникнення лежать інстинкти і умовні рефлекси.

Інстинкти є вродженими, безумовними рефlekсами і являють собою сукупність рухових актів і складних форм поведінки (харчові, статеві, самозбереження). Вони мають особливості прояву та функціонування, пов'язані з фізіологічними властивостями:

- 1) морфологічним субстратом служать лімбічна система, базальні ядра, гіпоталамус;
- 2) носять ланцюговий характер, тобто час закінчення дії одного безумовного рефlekсу є стимулом для початку дії наступного;

3) для прояву велике значення має гуморальний фактор (наприклад, для харчових рефлексів – зниження рівня глюкози в крові);

4) мають готові рефлекторні дуги;

5) складають основу для умовних рефлексів;

6) передаються у спадок і носять видовий характер;

7) відрізняються постійністю і мало змінюються протягом життя;

8) не вимагають додаткових умов для прояву, виникають на дію адекватного подразника.

2.2. Загальна характеристика умовних і безумовних рефлексів

Умовні рефлекси виробляються протягом життя, так як не мають готових рефлекторних дуг. Вони носять індивідуальний характер і в залежності від умов існування можуть постійно змінюватися. Їх *особливості*:

1) морфологічним субстратом є кора великих півкуль, при її видаленні старі рефлекси зникають, а нові не виробляються;

2) на їх базі формується взаємодія організму з зовнішнім середовищем, тобто вони уточнюють, ускладнюють і роблять тонкими дані відносини.

Отже, умовні рефлекси – це набутий протягом життя набір поведінкових реакцій.

Їх класифікація:

1) по природі умовного подразника виділяють натуральні та штучні рефлекси. Натуральні рефлекси виробляються на природні якості подразника (наприклад, вид їжі), а штучні – на будь-які;

2) за рецепторною ознакою – екстероцептивні, інтероцептивні і пропріоцептивні;

3) в залежності від структури умовного подразника – прості і складні;

4) за еферентним шляхом – соматичні (рухові) і вегетативні (симпатичні і парасимпатичні);

5) за біологічним значенням – вітальні (харчові, оборонні, локомоторні), зоосоціальні, орієнтовні;

6) за характером підкріплення – нижчого і вищого порядку;

7) в залежності від поєднання умовного і безумовного подразника – присутні і слідові.

Таким чином, умовні рефлекси виробляються протягом життя і мають велике значення для людини.

Безумовним рефлексом називається вроджена захисна реакція на стимули зовнішнього або внутрішнього середовища, що здійснюється за участю нижчих відділів ЦНС – спинного мозку або стовбура головного мозку.

Безумовні рефлекси здійснюються без безпосередньої участі кори головного мозку.

При подразненні різних рецептивних полів шкіри жаби можна спостерігати наступні **спинномозкові рефлекси**:

а). *Рефлекс відсмикування*, – виникає при механічному подразненні шкіри лапки пінцетом (пощипування) і полягає у відсмикуванні лапки, що є доказом того, що даний захисний безумовний рефлекс замикається на рівні спинного мозку.

б). *Рефлекс згинання задньої кінцівки*, – виникає при подразненні тильної поверхні стопи або гомілки (здавленням пінцетом або накладенням папірці з кислотою).

в). *Рефлекс розгинання задньої кінцівки*, – виникає при подразненні поверхні стопи або гомілки.

г). *Потирательний рефлекс*, – виникає при подразненні різних ділянок шкіри. Якщо подразнювати шкіру бічної частини тулуба, то виникає потирательний рефлекс тієї кінцівки, яка ближче до місця подразнення.

д). *Рефлекс скидання*, – виникає при накладенні папірці з кислотою між лапками виникає координований рефлекс скидання

папірці відразу двома лапками (передніми або задніми залежно від місця роздратування). Даний факт пояснюється тим, що область роздратування перебувала на кордоні рецептивних полів правої і лівої лап жаби.

Структурною та функціональною основою рефлексу є **рефлекторна дуга** (рис. 2).

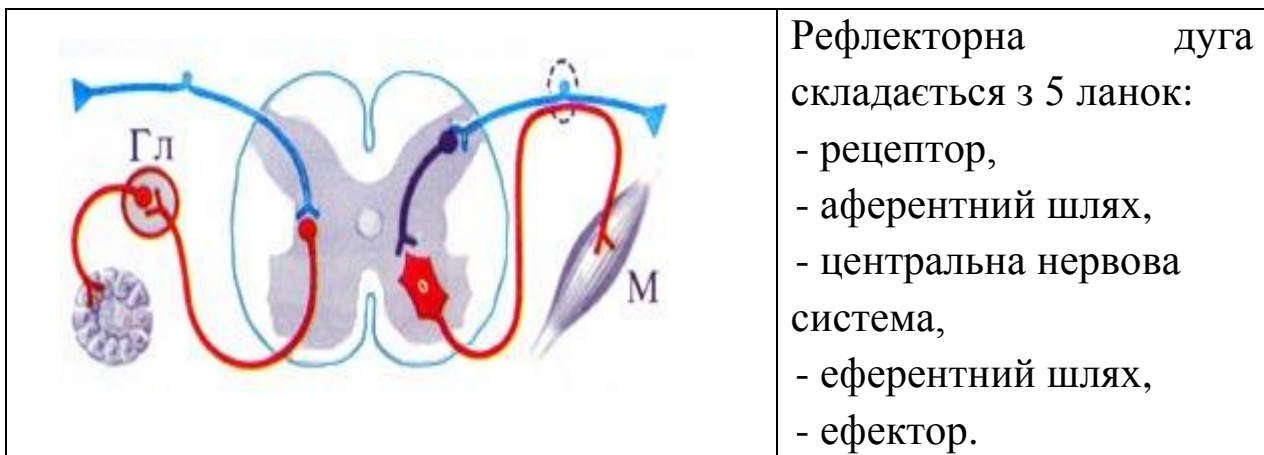


Рис. 2. Рефлекторна дуга вегетативного і соматичного рефлексів: Гл - ганглії, М – м'яз

Будь-яка рефлекторна реакція починається з роздратування рецептивного поля і закінчується руховою реакцією (м'язи або залози).

Рецептивним полем називають ділянку шкіри (або будь-яку іншу ділянку тіла), при подразненні якої виникає певний рефлекс. При подразненні тих чи інших рецептивних полів виникають строго певні рефлекси.

Залежно від кількості нейронів, що беруть участь в здійсненні рефлексу, безумовні рефлекси поділяють на двохнейронні (моносинаптичні: аксон чутливого нейрона безпосередньо переключається на руховий), трьохнейронні (дисинаптичні: в ЦНС розташований один вставний нейрон, який опосередковує вплив чутливого нейрона на руховий) і багатонейронні (полісинаптичні: в ЦНС є кілька вставних нейронів). Більшість рефлекторних реакцій здійснюється по полісинаптичним рефлекторним дугам.

Рефлекторна реакція може здійснюватися тільки за умови цілісності всіх ланок рефлекторної дуги. Якщо порушена хоч одна з них – рефлекторна реакція неможлива.

Роль рецептора в здійсненні рефлекторної реакції можна оцінити, якщо паралельно провести роздратування шкіри кислотою, потім на цій ділянці лапки зрізати шкіру і нанести кислоту на м'яз. Рецептори шкіри видалені – реакція відсутня. Відсутність рефлекторної реакції пояснюється тим, що рецептори м'язів на відміну від шкірних рецепторів не реагують на слабкий розчин кислоти.

Роль аферентного шляху можливо відзначити якщо провести блокаду проведення збудження в чутливих нервових волокнах відпрепарованого сідничного нерву (новокаїном), через кожну хвилину перевіряють наявність рефлексу. Відзначають час, коли на роздратування пальців права лапка жаби не буде відповідати скороченням. Відразу слідом за цим дратують шкіру вище рівня блокади нерву і переконуються в наявності рефлекторного згинання.

Такі речовини як хлорид калію, новокаїн, кокаїн та інші спочатку вимикають аферентні, а потім і еферентні волокна.

Роль еферентного шляху можна оцінити якщо після зникнення рефлексу при подразненні правої лапки дратувати ліву лапку і спостерігати реакцію правої. Виключити проведення збудження по еферентних волокнах можна шляхом перерізання сідничного нерву. Після такого перерізання нерву права лапка не вступає в реакцію при нанесенні подразнення на будь-які ділянки шкіри.

Роль центральної нервової системи можна оцінити, якщо провести рефлекторну реакцію при пощипуванні пінцетом лапки до і після руйнування спинного мозку. Після руйнування спинного мозку спостерігається повне зникнення рефлекторних реакцій.

Лабораторна робота № 2. Вивчення спинномозкових рефлексів.

Аналіз рефлекторної дуги

Мета роботи:

1. Дослідити спинномозкові рефлекси у спінальної жаби.
2. Довести, що реалізація безумовного рефлексу можлива тільки при цілісності і нормальній працездатності всіх ланок рефлекторної дуги.

Прилади й матеріали: жаба, набір інструментів для препарування, штатив із затискачем і пробкою, пінцет, лігатура, бинт, вата, 0,5 % розчин новокаїну, 0,5 % розчин сірчаної кислоти, стакан з водою.

Хід роботи:

2.1. Приготування спінального препарату

Подивитися відео з Інтернет-ресурсу «Приготування препарату спінальної жаби. Дослідження рефлексів спинного мозку. <https://www.youtube.com/watch?v=nS1YFcwwT9o>

Приготуйте спінальну жабу (тобто видаліть головний мозок): обгорніть щільно жабу бинтом, візьміть жабу в руку і введіть в ротовий отвір жаби одну браншу ножиць, поверніть ножиці до себе і швидким рухом відріжте жабі верхню частину голови. Після цього підвісите її на штативі, приколів нижню щелепу шпилькою до пробки, затиснутою в утримувачі. Перед початком досліду почекайте 5 - 6 хвилин, поки не пройде спінальний шок (післяопераційне пригнічення спинного мозку).

2.2. Дослідження спинномозкових рефлексів при подразненні різних рецептивних полів шкіри жаби

Подивитися відео з Інтернет-ресурсу «Дослідження спинномозкових рефлексів при подразненні різних рецептивних полів шкіри жаби». <https://www.youtube.com/watch?v=g6haf1ahAqw>

2.2.1. Зафіксуйте спінальний препарат жаби за нижню щелепу на гачку штатива. Через 5-10 хвилин (час, необхідний для зникнення

спінального шоку) стисніть пінцетом кінчики пальців задньої лапки і поспостерігайте реакцію. Сформулюйте висновки.

2.2.2. а). Невеликі шматочки фільтрувального паперу (4-6 мм) змочіть в 0,1%-ному розчині кислоти і пінцетом помістіть на зовнішню поверхню шкіри гомілки задньої лапки. Після кожного роздратування необхідно обмивати лапки і тіло жаби, занурюючи їх у склянку з водою. Інтервали між подразненнями повинні бути не менше 2 хвилин. Спостерігайте рефлекторну реакцію відповідної кінцівки. сформулюйте висновки.

б). Стисніть пінцетом шкіру тильної поверхні стопи або гомілки і поспостерігайте реакцію. Сформулюйте висновки.

2.2.3. Стисніть пінцетом шкіру поверхні стопи або гомілки і поспостерігайте реакцію і сформулюйте висновки.

2.2.4. Фільтрувальний папірець, змочений 1%-ним розчином сірчаної кислоти, накладіть на зовнішню поверхню верхньої третини стегна, потім - на нижню частину черевця. Поспостерігайте відповідні реакції. Після кожного роздратування необхідно обмивати лапки і тіло жаби, занурюючи їх у склянку з водою. Інтервали між подразненнями повинні бути не менше 2 хвилин.

2.2.5. Невеликий шматочок фільтрувального паперу (4-6 мм) змочіть в 0,1%-ному розчині кислоти і пінцетом помістіть на черевце між передніми лапками. Спостерігайте реакцію і сформулюйте висновки.

2.3. Встановлення ролі різних ланок рефлекторної дуги в здійсненні рефлекторної реакції

2.3.1. Встановлення ролі рецептора в здійсненні рефлекторної реакції.

Покладіть на шкіру гомілки шматочок фільтрувального паперу, змоченого 0,5 % розчином сірчаної кислоти. Відзначте рефлекторну реакцію на подразнення шкіри кислотою. Після кожного роздратування кислоту потрібно змивати, опускаючи лапку в стакан з

водою. На гомілку обережно виріжте шматочок шкіри. Обережно покладіть папірець з кислотою на оголену ділянку м'яза. Слідкуйте, щоб кислота не потрапила на шкіру. Поспостерігайте відповідні реакції і сформулюйте висновки.

2.3.2. Встановлення ролі аферентного шляху

Зніміть жабу зі штатива. На внутрішній частині правого стегна відпрепаруйте сідничний нерв протягом 1,5-2 см. Підводять під нерв лігатуру, але не зав'язують її. Потім підтягують нерв за нитку і кладуть під нього ватку, змочену новокаїном. Через кожну хвилину перевіряють наявність рефлексу. Відзначають час, коли на роздратування пальців права лапка жаби не буде відповідати скороченням. Відразу слідом за цим дратують шкіру вище рівня блокади нерву. Поспостерігайте відповідні реакції і сформулюйте висновки.

2.3.3. Встановлення ролі еферентного шляху

Відразу після зникнення рефлексу при подразненні правої лапки дратуйте ліву лапку і спостерігайте реакцію правої. Потім на шкіру спини накладіть папірець, змочений кислотою. Поспостерігайте відповідну реакцію, поясніть її.

Продовжуйте спостереження кожен раз прикладаючи на шкіру спини новий папірець (кислоту від попередньої папірці з шкіри спини видаляйте ваткою, змоченою у воді!). Відзначте момент зникнення рефлекторної реакції правої лапки.

Переріжте сідничний нерв (перерізати його на стегні якомога вище) і повторіть роздратування: стисніть пінцетом шкіру поверхні стопи або гомілки, кінчики пальців задньої лапки. Поспостерігайте відповідні реакції правої лапки (на якій був перерізаний сідничний нерв). Відзначте, як змінюється тонус м'язів правої кінцівки після перерізання сідничного нерву. Зробіть відповідні висновки.

2.3.4. Встановлення ролі центральної нервової системи

Поспостерігайте рефлекторну реакцію при пощипуванні пінцетом лапки. Зруйнують спинний мозок, вставивши препарувальну голку в спинномозковий канал. Повторіть роздратування лапок пінцетом. Відзначте відповідну реакцію. Сформулюйте висновки.

Обговоріть результати дослідів і оцініть роль різних ділянок рефлекторної дуги в рефлекторному акті. Зробіть відповідні висновки. Замалюйте схему рефлекторної дуги, вказавши всі її ланки.

Питання для самостійної роботи:

1. Передача збудження з нервової клітини: будова і функції синапсів.
2. Проведення імпульсів по ланцюгу нейронів: поняття про нервовий центр, властивості нервових центрів.
3. Роль гальмування в регуляції рефлекторної діяльності: види і механізми гальмування.
4. Приватна фізіологія ЦНС: будова і функції спинного та головного мозку.

ТЕМА 3. ЛІПІДИ В ТКАНИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ. ХОЛЕСТЕРИН

Ліпіди – різноманітні за хімічною будовою речовини, що проявляють ряд загальних фізичних, фізико-хімічних і біологічних властивостей.

Вони характеризуються здатністю розчинятися в ефірі, хлороформі та інших жирних розчинниках і тільки в незначній кількості в H_2O , а також формувати з білками і вуглеводами основний структурний компонент живої клітини.

Ліпіди відносять до групи мультифункціональних речовин живих організмів. Одні з них служать формою депонування (триацилгліцерини) і транспорту речовин (вільні жирні кислоти), при розпаді яких вивільняється велика кількість енергії, інші – представляють собою найважливіші структурні компоненти клітинних мембран (вільний холестерол і фосфоліпіди). Ліпіди беруть участь в процесах терморегуляції, запобіганні життєво важливих органів (наприклад, нирок) від механічних впливів (травм), втрати білка і т. д.

В організмі ліпіди виконують дві основні функції:

- 1) джерела хімічної енергії, запасеної в тригліцеридах;
- 2) структурного компонента клітинних мембран.

Мозок містить мінімальні кількості тригліцеридів. Вся складна діяльність нервової тканини опосередковується мембранами, в формуванні та функціонуванні яких ліпіди беруть безпосередню участь.

Ліпідний склад

Ліпідний склад мозку є унікальним не тільки через високу загальну концентрацію ліпідів, але також через специфіку. Майже всі ліпіди головного мозку представлені трьома основними групами: 1) фосфоліпідами 2) гліколіпідами 3) стероїдами, причому концентрація фосфоліпідів особливо висока.

3.1. Біологічні функції мембранних ліпідів

Клітинна мембрана може містити більше 100 різних типів ліпідних молекул. Чому їх так багато і чому кожна мембрана має унікальний ліпідний склад, поки неясно. Очевидно, що співвідношення ліпідів в різних мембранах мозку не є випадковим. Стає все більш очевидним те, що ліпіди беруть активну участь в процесах, які забезпечуються мембранами.

Розглянемо фактори, що визначають специфіку ліпідного складу мембран нервової тканини

1. Суміш ліпідів обов'язково повинна бути здатною до утворення стабільного бішару, в якому функціонують білки.

2. Деякі ліпіди сприяють стабілізації сильно викривлених ділянок мембрани, утворенню контактів між мембранами або зв'язування певних білків, оскільки форма подібних молекул відповідає потрібної упаковці бішару на тих чи інших ділянках мембрани. За формою ліпідних молекул можна визначити роль окремих ліпідів в бішарі, наприклад в стабілізації ділянок мембрани з великою кривизною і упаковці молекул навколо мембранних білків.

3. Ряд ліпідів – важливі біорегулятори. Деякі мембранні ліпіди служать попередниками вторинних посередників при передачі гормонального сигналу.

4. Окремі ліпіди необхідні для підтримки оптимальної активності ряду ферментів. Вони формують середовище для функціонування мембранних білків, здатних приймати нативну конформацію лише в гідрофобному оточенні. Ферменти, позбавлені специфічного ліпідного оточення, або не виявляють каталітичної активності, як іонні насоси (транспортні АТФази), або проявляють відмінні від нативних ферментів властивості. Така, наприклад, мітохондріальна креатинкіназа – фермент, що каталізує утворення креатинфосфату і бере участь в підтримці енергетичного балансу в мозку. Для його нормальної активності потрібна взаємодія з кардіоліпіном внутрішньої мембрани мітохондрій.

5. Гангліозиди, як вважають, відіграють важливу роль в регуляції росту і диференціюванні клітин, беручи участь в процесах клітинної адгезії.

6. Деякі ліпіди виконують «якірну» функцію, наприклад до молекули фосфатидилінозитола через олігосахарид можуть приєднуватися специфічні білки зовнішньої поверхні клітини і при цьому утворюється фосфатидилінозитолглікан. Прикладом такого «заякореного» білка може служити ацетилхолінестераза, що каталізує гідроліз ацетилхоліну в синаптичних щілинах. Цей фермент фіксується на постсинаптичній мембрані, ковалентно приєднуючись до фосфатидилінозитолглікану. За участю фосфоліпази C (яка гідролізує мембранні ліпіди) може відбуватися модифікація мембрани і відділення білків від зовнішньої поверхні клітини.

Ліпіди можуть бути алостеричними активаторами мембранних ферментів (наприклад, фосфатидилсерин активує протеїнкіназу C). У головному мозку протеїнкіназа C зустрічається переважно в мозочку, гіпокампі і корі. У неактивній формі протеїнкіназа C знаходиться в цитоплазмі. Однак після стимуляції клітини (яка призводить до підвищення в ній концентрації іонів кальцію) фермент змінює свою конформацію і набуває здатності асоціюватися з мембраною. Функціонально активна протеїнкіназа C являє собою комплекс, що містить мономер ферменту, молекулу диацилгліцерола, один або більше іонів кальцію і чотири молекули фосфатидилсерина.

3.2. Властивості ліпідного бішару. Ліпіди мієліну ЦНС

Для мієліну також характерний високий рівень його головних ліпідів – холестерину, загальних галактоліпідів і містить етаноламінплазмалогена. Встановлено, що до 70 % холестерину мозку знаходиться в мієліну. Оскільки майже половина білої речовини мозку може складатися з мієліну, очевидно, що в мозку міститься найбільша кількість холестерину в порівнянні з іншими органами. Висока концентрація холестерину в мозку, особливо в мієліну, визначається основною функцією нейрональної тканини –

генерувати і проводити нервові імпульси. Великий вміст холестерину в мієліну і своєрідність його структури призводять до зменшення іонного витоку через мембрану нейрона (внаслідок її високого опору).

3.3. Стероїди

Стероїди. Це спирти зі стерановим скелетом, до яких відносяться як немембранні ліпіди (з них найбільш важливі стероїдні гормони), так і структурні компоненти мембран. До переліку мембранних компонентів стероїдного ряду входять холестерин, ситостерин, тетрахіменін. У тканинах тварин поширений холестерин. У рослинних клітинах холестерин що невиявлений, його замінюють фітостерини. У бактерій стероїди відсутні. Холестерин і його ефіри – неодмінні складові плазматичних мембран клітин тварин.

Молекула холестерину не містить довгих жирнокислотних ланцюжків, вона складається з чотирьох плоских кілець, до одного з яких (шестичленного) приєднана полярна гідроксильна група (-ОН), а найбільш віддалене від нього п'ятичленне кільце пов'язане з розгалуженим вуглеводневим ланцюжком з восьми атомів вуглецю. Таким чином, молекули холестерину мають полярну головку і витягнуту в довжину неполярну частина. Тому вони добре вбудовуються в бішар ліпідної структури, особливо в області мембранних дефектів, що утворюються в результаті фазового переходу ліпідів.

Особливо багато холестерину міститься в зовнішніх мембранах. Наприклад, в плазматичній мембрані клітин печінки холестерин становить близько 30 % всіх мембранних ліпідів (рис. 3).

Холестерин є єдиним стеролом, представленим в значній кількості в мозку дорослої людини. У людини середня концентрація холестерину в ЦНС вище, ніж в будь-якій іншій тканині (понад 20 мг/г). Незважаючи на те що мозок становить всього близько 2 % ваги тіла, майже 25 % загальної кількості холестерину, присутнього в організмі, локалізовано в цьому органі, причому більша його частина

знаходиться в мієліні. Досить високий вміст холестерину характерний і для плазматичних мембран інших клітин нервової тканини.

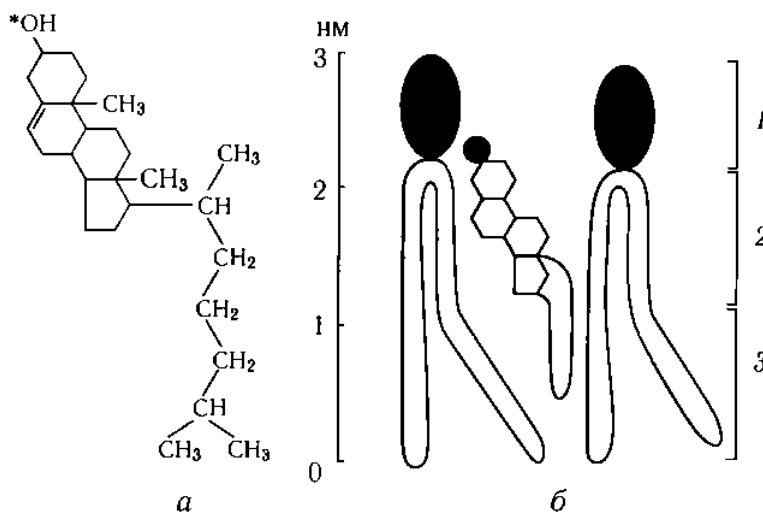


Рис. 3. Структурна формула холестерину(а) та його упаковка між двома молекулами фосфоліпідів

Наприклад, в щільних мієлінових мембранах холестерин і фосфоліпіди містяться у співвідношенні 1: 0,76; в олігодендроциті – 1: 2; в астроциті – 1: 2,5; в нейронах – 1: 3,5.

3.4. Метаболізм холестерину в ЦНС

Метаболізм холестерину в ЦНС істотно відрізняється від метаболізму в інших органах і тканинах. У всіх тваринних організмів найбільше зростання і диференціювання ЦНС спостерігається в ранній постнатальний період, і холестерин, що витрачається на формування плазматичних мембран і компактного мієліну, утворюється виключно в ході дуже інтенсивного синтезу *in novo* в мозку (головним чином в астроцити).

На відміну від інших тканин організму, де інтенсивний синтез холестерину триває протягом усього життя, в мозку людини і тварин швидкість відновлення цього ліпиду значно знижується з віком. Так, в мозку дорослої людини швидкість оновлення холестерину становить

всього 0,03 % на день (у порівнянні з 0,7 % на день для організму в цілому).

В даний час немає доказів надходження холестерину в головний або спинний мозок з крові. У дорослих організмів швидкість його синтезу перевищує потребу в ньому, і екскреція холестерину з ЦНС відбувається з утворенням 24-(С)-гідроксихолестерину. Рівень холестерину в крові і інтенсивність його обміну мають велике значення для розвитку ряду нейродегенеративних хвороб, зокрема хвороби Альцгеймера.

Порівнюючи молярний зміст основних класів ліпідів у спеціалізованих клітинах мозку, можна побачити, що олігодендроцити і мієлін збагачені цереброзидами, а в нейронах і астроцитах більш високий вміст фосфоліпідів. Це зайвий раз підтверджує те, що плазматичні мембрани нейронів і гліальних клітин відмінні від мієліну.

3.5. Дефектні зони. Роль холестерину

Різні види рухливості ліпідних компонентів в бішарі порушують його гомогенну упаковку і призводять до появи в мембрані динамічних дефектів. Висока швидкість обертання жирнокислотних радикалів навколо С-С-зв'язків, а також наявність у складі фосфоліпідів цис-ізомерів ненасичених жирних кислот роблять бішар досить рихлим.

Розглянемо насичені вуглеводневі ланцюги. Найбільш стабільна гараноконформація, в якій ланцюг максимально витягнутий і не змінює свого напрямку, тоді як в гошконформації її напрямок змінюється і утворюється дефект упаковки. Послідовність гош-транс-гош для трьох суміжних С-С-зв'язків призводить до появи в ланцюзі зламу (Кінка), в результаті чого ділянки ланцюга вище і нижче зламу виявляються значно зміщеними один щодо одного – утворюється дефект. Можливість формування таких структур забезпечує виникнення рухливих дефектів, здатних захоплювати цілі кластери мембрани. Їх концентрація і рухливість залежать від температури.

У разі ненасичених жирних кислот майже всі подвійні зв'язки в мембранних ліпідах знаходяться в цис-формі. Як і в разі гош-форми, це призводить до зміни кута нахилу ланцюга - утворюється дефект. Такі просторові дефекти бішару, які індуковані включенням в нього ненасичених жирних кислот, є більш стабільними. В результаті появи дефектів бішар стає більш пухким.

Це вказує на те, що жирнокислотні радикали бішару не розпрямлені повністю, а утворюють пухкі структури. В результаті цього площа мембрани виявляється дещо більшою, ніж впливає з розрахунку теоретичного простору, що припадає на одну молекулу фосфоліпиду. Вбудовування холестерину в бішар уможливорює зміну форми мембран в результаті значної деформації обох сторін ліпідного бішару, так як на відміну від фосфоліпідів холестерин може легко переміщатися з одного моношару в інший. При цьому дещо зростає і товщина бішару.

Гетерогенність бішару і утворення в ньому ліпідних кластерів сприяють розділенню (сегрегації) фаз в мембрані. Латеральний розподіл ліпідних молекул в площині бішару – важлива особливість мембрани. Особлива сегрегуюча роль в мембрані належить холестерину. При низьких концентраціях його в мембрані відбувається латеральний поділ фосфоліпідхолестеринових комплексів і вільних молекул фосфоліпідів. При цьому холестерин взаємодіє в першу чергу з тими молекулами фосфоліпідів, які мають низьку температуру фазового переходу. Завдяки цьому в бішарі будуть існувати як області тільки «рідкі» і тільки «тверді», «так і області змішані, де обидві фази співіснують. Наявність різних за щільністю областей в межах однієї мембрани змінює її стисливість, що позначається на глибині занурення мембранних білків і на ефективності їх роботи.

Необхідно відзначити, що крім сегрегуючого холестерин надає і інший важливий вплив на структуру і фізичні властивості ліпідного бішару. Вбудовування холестерину в фосфоліпідний бішар викликає як порушення упаковки жирнокислотних ланцюгів, так і зменшення

їх рухливості. Ці ефекти холестерину називають відповідно розріджуючим і конденсуючим. При температурі, що перевищує точку фазового переходу фосфоліпиду, холестерин зменшує рухливість його вуглеводневих ланцюгів. Так, при додаванні холестерину до фосфатидилхолінових мембран площа молекули фосфатидилхоліну зменшується з 0,96 до 0,56 нм². Цей ущільнюючий ефект холестерину максимальний в районі центральної ділянки жирнокислотних радикалів і слабшає в напрямку кінцевих металічних груп. Але при температурі нижче точки фазового переходу фосфоліпідів холестерин розріджує вуглеводневу область бішару.

Лабораторна робота № 3. Відкриття холестерину в тканинах головного мозку

Стерини – вторинні одноатомні ненасичені циклічні спирти, що містять ядро циклопентанпергідрофенантрону. Представником стеринів тварин і людини є холестерин. У деяких тканинах людського організму перебуває переважно неестерифікований холестерин (еритроцити), інші тканини (наднирники, сироватка крові та ін.) містять також і пов'язаний холестерин у вигляді ефірів з високомолекулярними жирними кислотами (стериди). Холестерин входить до складу ліпопротеїнів тканин і крові. У плазмі крові холестерин є складовою частиною складних ліпопротеїдних комплексів (хіломікронів, ліпопротеїни дуже низької щільності, ліпопротеїни проміжної щільності, ліпопротеїни низької щільності і ліпопротеїни високої щільності). Особливо багаті на холестерин мозок, наднирники, яєчний жовток, жовч.

Завдання заняття:

1. Знайомство з класифікацією ліпідів за хімічною будовою і фізико-хімічними властивостями;
2. Оволодіння деякими методичними прийомами, використовуваними при виділенні та ідентифікації різних класів ліпідів. Техніка безпеки: на занятті передбачається робота з

органічними розчинниками.

Реактиви та матеріали: мозок, кальцій сірчаноокислий (гіпс) в порошку, хлороформ, сірчана кислота концентрована, оцтовий ангідрид.

Обладнання і посуд: ваги, ступка фарфорова, скляна пластинка, сушильна шафа, скальпель або ніж, скляна паличка або лопаточка, піпетка на 5 мл, лійка з паперовим фільтром, штатив із пробірками, крапельниці.

3.1 Виділення холестерину з мозку щура

Холестерин і його ефіри зустрічаються в крові і різних тканинах тварин: головному мозку, шкірному салі, жовчі. У мозку холестерин в нормі міститься майже виключно в вільному вигляді, а не у вигляді ефірів. У головному мозку відбувається синтез холестерину. У білій речовині мозку міститься 4-5 % холестерину на вологу масу.

Принцип методу: Розчин холестерину в хлороформі дає з оцтовим ангідридом і конц. H_2SO_4 червоне забарвлення, що переходить потім в синє і зелене (реакція Ліберманна-Бурхарда). Під дією конц. H_2SO_4 відбувається відщеплення H_2O від вторинного спирту холестерину з подальшою конденсацією ненасичених вуглеводнів, що з'єднуються з H_2SO_4 , і утворенням забарвлених продуктів.

Хід роботи: 1 г мозку розтирають з 2-3 г гіпсу або піску до гомогенної маси і заливають 5 мл хлороформу. Екстрагують 5 хв при кімнатній температурі, постійно інтенсивно струшуючи. Потім, екстракт фільтрують в суху пробірку і проробляють якісні реакції на холестерин і дослідження складу загальних ліпідів методом тонкошарової хроматографії.

3.2. Дослідження складу загальних ліпідів методом тонкошарової хроматографії (на пластинках «Silufol»)

Принцип методу: поділ ліпідів при тонкошарової хроматографії (ТШХ) відбувається внаслідок різної здатності ліпідів адсорбуватися

на поверхні сорбенту, що визначається властивістю функціональних груп, що входять в структуру ліпідів. Після поділу ліпіди виявляють на пластинці спеціальним реактивом. Метод може бути використаний як для якісного, так і для кількісного вивчення ліпідних комплексів.

Хід роботи: Для фракціонування ліпідів використовують стандартні пластинки «Silufol», на які нанесено тонкий шар SiO_2 як адсорбенту, для закріплення шару доданий крохмаль. На пластинки розміром $2 \cdot 13$ см наносять за допомогою мікропіпетки розчин ліпідів в хлороформі (0,3-0,5 мг).

Пробу наносять, відступаючи приблизно 1,5 см від краю пластинки, при цьому бажано отримати пляму можливо меншого діаметра, не порушуючи шару сорбенту. Платівку поміщають в широку, коротку пробірку, що виконує функції хроматографічної камери, на дно якої попередньо наливається 2-3 мл суміші розчинників: гексан-діетиловий ефір-оцет кислота у співвідношенні 70: 30: 2.

Пробірку встановлюють в штатив, закривають кришечкою з фольги. Через 10-15 хвилин, коли розчинник підніметься майже до верхнього краю пластинки (не менше ніж на 9-10 см), пластинку виймають з камери і сушать на повітрі в витяжній шафі до зникнення запаху розчинників. Для прояву окремих ліпідних фракцій, пластинки поміщають в камеру, насичену парами йоду, на 3-5 хвилин до появи забарвлених плям. Йод, розчиняючись в ліпідах, забарвлюється в них в коричнево-жовтий колір (інтенсивність забарвлення залежить від тривалості прояви).

Оформлення роботи: записують хід роботи, замальовують хроматограми розділення стандартної і дослідної суміші ліпідів.

3.3. Якісна реакція на холестерин Лібермана-Бурхарда

Принцип методу. Кольорові реакції на холестерин засновані на його дегідратації під дією концентрованої сірчаної кислоти з подальшим перетворенням в ненасичені вуглеводні із зв'язаними

подвійними зв'язками. Ці сполуки дають забарвлені продукти з сірчаною кислотою і оцтовим ангідридом.

Хід визначення. Реакцію Лібермана-Бурхарда слід проводити паралельно з хлороформним екстрактом головного мозку і з розчином холестерину в хлороформі.

До 1 мл хлороформного екстракту головного мозку (пробірка № 1) або до 1 мл розчину холестерину в хлороформі (пробірка № 2) додати по 10 крапель оцтового ангідриду і по 2 краплі концентрованої сірчаної кислоти. Розчини перемішати. Рідина набуває червоне забарвлення, потім колір швидко змінюється послідовно на червоно-фіолетовий, фіолетовий, аметистового-синій, синій і зелений.

3.4. Якісна реакція на холестерин – реакція Зальковського

Хід визначення. Реакцію Зальковського слід проводити паралельно з хлороформним екстрактом головного мозку і з розчином холестерину в хлороформі.

До 1 мл хлороформного екстракту головного мозку (пробірка № 1) або до 1 мл розчину холестерину в хлороформі (пробірка № 2) додати 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Розчини перемішати обережним струшуванням пробірки. Дають рідини відстоятися. В результаті утворення холестерилену – продукту дегідратації холестерину, верхній хлороформний шар виявляється забарвленим в червоний колір. Нижній шар (H_2SO_4) має жовто-оранжеве забарвлення з зеленою флуоресценцією (рідина в світлі прозора і жовто-червоного кольору, у відбитому світлі здається каламутною з зеленим відтінком).

Оформлення роботи: записують хід роботи, формулюють висновок про наявність в тканині мозку молекул холестерину.

Питання для самостійної роботи:

1. Чим обумовлена якісна різноманітність білків нервової тканини?

2. Охарактеризуйте структурну і функціональну різноманітність білків цитоскелету нейрональної клітини.
3. Яким чином мембранні ліпіди контролюють функції мембранних білків?
4. Який тип взаємодій між білками і ліпідами в мембранах є домінуючим?
5. Які особливості ліпідного складу нейрональної мембрани?
6. У чому причини трансмембранної асиметрії фосfolіпідів в мембрані?

ТЕМА 4. ЛІПІДИ В ТКАНИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ. ГЛІКОЛІПІДИ

Гліколіпіди представлені глікозилдиацилгліцеринами і глікосфінголіпідами. Знаходяться переважно в тканинах мозку, зустрічаються в мембранах клітин крові та інших тканин. В молекулу глікозилдиацилгліцеринів входить гліцерин, етерифіковані двома залишками жирних кислот, одна або дві молекули моносахариду, пов'язаних з гліцерином глікозидним зв'язком. Найбільш поширені в рослинах, в тваринних клітинах зустрічаються вкрай рідко. Глікосфінголіпіди – це похідні цераміду. Залежно від числа і складу моносахаридних залишків діляться на цереброзиди і гангліозиди.

4.1. Загальна характеристика гангліозидів

Нервова тканина характеризується надзвичайно різноманітним набором гангліозидів.

Гангліозиди – з'єднання багатоконпонентні, вони містять гідрофобну церамідну частину, що включає сфінгозин і жирну кислоту, і гідрофільну, олігосахаридну частину, до складу якої входять: глюкоза, галактоза, N-ацетилгалактозамін або N-ацетилглюкозамін, N-ацетилнейрамінова кислота, фукоза.

Гангліозиди- специфічні ліпіди глікокалікса нейрональних мембран. Гангліозиди локалізовані в нейрональних мембранах: соматичних, аксональних, дендритних, синаптичних, - в самих збудливих елементах, які беруть безпосередню участь у передачі нервового імпульсу.

Кислі гліколіпіди – гангліозиди знаходяться в нервовій тканині в високих концентраціях і виявляються переважно в збудливих мембранах.

Гангліозиди – загальна назва глікосфінголіпідів, в складі яких присутня сіалова кислота.

Завдяки наявності карбоксильної групи в залишку N-ацетилнейрамінової кислоти гангліозиди є кислими сполуками.

Гангліозиди локалізовані на зовнішній стороні пре- і постсинаптичних терміналів, які беруть безпосередню участь у передачі нервового імпульсу.

Молекули гангліозидів в мембрані високоподвижні, що, з одного боку, створює локальну нестійкість мембрани, а з іншого – підтримує її цілісність.

Участь гангліозидів в диференціації клітин

Гангліозиди є сполуками виняткової функціональної значимості.

Функції гангліозидів:

- грають важливу роль в транспорті іонів через мембрани, в рецепції нейромедіаторів, вірусів, токсинів і, можливо, гормонів.
- беруть участь в міжклітинних взаємодіях.
- клітинне впізнавання, адгезія і передача сигналів.
- будучи обов'язковими компонентами екстраклітинного матриксу, гангліозиди багато в чому визначають клітинні контакти і міжклітинні взаємодії - явища, які в ЦНС набувають першорядного значення.
- беруть безпосередню участь в підтримці стійких нейрональних ансамблів і функціонуванні синапсів, є речовинами, які передають інформацію в ЦНС.
- регулюють активність рецепторних тирозинкіназ в плазматичній мембрані, також як і рецепторів епідермального фактору росту, фактору росту нерву, інсуліну, і таким чином можуть регулювати процеси клітинної сигналізації.
- можуть впливати на такі фізіологічні процеси, як ембріогенез і диференціація нейрональних клітин і лейкоцитів.
- беручи участь в диференціації клітин, гангліозиди викликають їх морфологічні зміни, проявляючи реїритогенний ефект.

Структура і кількість гангліозидів змінюється в процесі розвитку клітин в міру формування нейрон-нейрональних взаємодій.

Численні дослідження показали, що рівень гангліозидів під час клітинної диференціації помітно підвищується, що добре корелює зі

зміною активності глікозилтрансфераз, відповідальних за біосинтез цих ліпідів. Активність глікозилтрансфераз може регулюватися на кількох рівнях, включаючи транскрипційний і посттрансляційний контроль.

Таким чином, рівень і просторовий розподіл гангліозидів в нервовій системі регулюється біосинтезом цих специфічних ліпідів в процесі розвитку організму.

Гангліозиди розподілені по поверхні клітини нерівномірно і в комплексі зі сфінгомієліном і холестеринном входять до складу специфічних рафтів, які є фізіологічним середовищем для розміщення різноманітних рецепторних білків.

Доведено, що при зміні числа і структури поверхневих гангліозидів відбувається порушення міжнейронального впізнавання. Нормальна функціональна діяльність головного мозку неможлива без повного набору індивідуальних гангліозидів.

Очевидно, що функціональний динамізм головного мозку забезпечується не тільки структурним різноманіттям, але й відмінністю в метаболізмі як індивідуальних гангліозидів, так і їх складових компонентів.

Однак питання про роль індивідуальних гангліозидів в функціональній активності мозку ще далеке від вирішення, тому в останні роки методам їх вивчення приділяється велика увага.

Лабораторна робота № 4. Методи дослідження гангліозидів

Дані за вмістом гангліозидів в головному мозку довгий час були вкрай суперечливі, що пояснювалося відсутністю точного методу кількісного визначення гангліозидів в нервовій тканині. Методи кількісної оцінки гангліозидів, що розробляються ґрунтувалися на визначенні одного з компонентів, що входять в їх молекули, а так як ця молекула багатокомпонентна, то стають зрозумілими і причини розбіжностей.

Всі сучасні методи кількісного визначення гангліозидів засновані на визначенні змісту N-ацетилнейрамінової кислоти – самого специфічного і характерного їх компонента.

Для кількісного визначення нейрамінової (сілової) кислоти існує кілька методів, заснованих на кольорових реакціях з орцином, дифеніламіном, диметиламінобензальдегідом, триптофанхлорною к-тою, з сумішшю сірчаної і оцтової кислот.

Широке застосування для оцінки сілових кислот отримав резорциновий метод Свеннерхольма і метод Гесса, які представляють собою надійні і чутливі методи визначення загальної N-ацетилнейрамінової кислоти.

4.1. Виділення гангліозидів головного мозку

Реактиви та обладнання: щур лабораторний, 0,9 % розчин NaCl, хлороформ для наркозу, ножиці, пінцет, бинт, вата, фільтрувальний папір, гомогенізатор, пробірки, воронки, піпетки, груши.

Хід роботи: після декапітації щура головний мозок витягують з черепної коробки, звільняють від кровоносних судин, промивають охолодженим 0,9 % розчином NaCl, обсушують фільтрувальним папером і зважують. Мозок гомогенізують в скляному гомогенізаторі з 5 мл води, гомогенат переносять в широку пробірку з притертою пробкою. Екстракцію загальних ліпідів здійснюють протягом 10 хв, струшуючи пробірки. Екстракт фільтрують в суху пробірку через складчастий паперовий фільтр, попередньо оброблений водою.

Присутність гангліозидів виявляють за наявністю в них N-ацетилнейрамінової кислоти нижченаведеними методом.

4.2. Якісне визначення сілових кислот – Резорциновий метод

Принцип методу: при нагріванні сілових кислот, як вільних, так і глікозиднозв'язаних, з резорцином в присутності мінеральних кислот утворюється хромоген. Структура цього хромогену поки

невідома, припускають, що хромоген містить фурфуролові або піррольні похідні, які реагують з резорциновий реактивом.

Реактиви: 1) концентрована HCl; 2) 0,1 М розчин CuSO₄; 3) 200 мг резорцину; 4) стандартний розчин N-ацетилнейрамінової кислоти, що містить від 10 до 60 мкг кислоти; 5) ізоаміловий спирт або суміш n-бутанол - n-бутилацетат (15 : 85).

Резорциновий реактив готують наступним чином: 200 мг перекристалізованого резорцину розчиняють в 80 мл концентрованої HCl, додають 0,25 мл 0,1 М розчину CuSO₄ і обсяг доводять до 300 мл дистильованою водою. Розчин використовують не раніше ніж через 4 години після його приготування, (в холодильнику реактив може зберігатися протягом тижня).

Обладнання: пробірки, воронки, піпетки, груші, водяна баня.

Хід визначення: до 2 мл водного розчину, що містить сіалові кислоти, додають 2 мл резорцинового реактиву. Вміст пробірок ретельно перемішують і проби ставлять в постійно киплячу водяну баню на 15 хв. При наявності в розчині N-ацетилнейрамінової кислоти в пробах розвивається інтенсивне червоно-вишневе забарвлення. Після охолодження забарвлений комплекс екстрагують ізоаміловим спиртом або сумішшю n-бутанол - n-бутилацетат (15:85), додаючи в проби по 5 мл кожного. Утворену інтенсивно забарвлену в синій колір верхню фазу відбирають піпеткою і фотометрують на спектрофотометрі при довжині хвилі 580 нм. Отриману екстинкцію за калібрувальною кривою переводять в мікрограми N-ацетилнейрамінової кислоти. Чутливість резорцинового методу Свеннерхольма становить 10-40 мкг нейрамінової кислоти.

4.3. Отримання N-ацетилнейрамінової кислоти і кількісне визначення загальних гангліозидів

Принцип методу: сіалові кислоти звільняються в результаті гідролізу глікопротеїдів і утворюють забарвлені сполуки при нагріванні з оцтово-сірчаноокислим реактивом.

Реактиви: 10 % розчин ТХУ (трихлороцтова кислота), основний стандартний розчин N-ацетилнейрамінової кислоти, що містить кислоти 50 мг / 100 мл, оцтово-сірчаноокислий реактив.

Оцтово-сірчаноокислий реактив готують наступним чином: В 95 мл крижаної оцтової кислоти додають невеликими порціями при ретельному перемішуванні 5 мл концентрованої сірчаної кислоти. Реактив готують на крижаній бані.

Обладнання: пробірки, воронки, піпетки, груші, центрифуга лабораторна, центрифужні пробірки, водяна баня.

Хід визначення

Таблиця 2

Послідовність додавання реактивів

Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Досліджуваний зразок	1,0	–
Розчин ТХУ	1,0	–
Пробу поміщають в киплячу водяну баню на 5 хв. Потім охолоджують у крижаній бані 5 хв і центрифугують 5 хв.		
Центрифугат	0,4	–
Оцтово-сірчаноокислий реактив	5,0	5,0

Пробірки з дослідною і холостою пробами прикривають скляними пробками і ставлять на киплячу водяну баню на 30 хв. Після цього проби охолоджують до кімнатної температури і спектрофотометрують в кюветах з товщиною шару 10 мм при зеленому світлофільтрі (500-560 нм) проти холостої проби.

Зміст сіалових кислот визначають за калібрувальним графіком. Побудова калібрувального графіка проводять згідно з таблицею 3.

Необхідно побудувати калібрувальну криву, по рівнянню кореляції визначити концентрацію сіалових кислот в досліджуваних зразках.

Дані для калібрувального графіка

Номер пробірки	Робочі стандартні розчини		Концентрація N-ацетилнейрамінової кислоти в пробі, моль/л	Оптична щільність
	Основний стандартний розчин N-ацетилнейрамінової кислоти, мл	Дистильована вода, мл		
1	0,1	0,3	0,80	
2	0,15	0,25	1,21	
3	0,2	0,2	1,61	
4	0,25	0,15	2,02	
5	0,3	0,1	2,42	
6	0,4	–	3,23	

Оформлення роботи: записують хід роботи, формулюють висновок про наявність в тканині мозку гангліозидів.

Питання для самостійної роботи:

1. У чому полягає біологічна роль гангліозидів?
2. Які ліпіди визначають функціональні особливості та структуру глікокаліксу нейронів?
3. Охарактеризуйте організацію гангліозидів в мембранах головного мозку.
4. Охарактеризуйте участь гангліозидів в диференціації клітин.

ТЕМА 5. ЛІПІДИ В ТКАНИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ. ЦЕРЕБРОЗИДИ

Цереброзиди є керамідмоносахаридами. Гліколіпіди цього типу в великих кількостях містяться в мембранах нервових клітин. При гідролізі 1 М цереброзиду утворюється по 1 М сфінгозину, жирної кислоти і гексоз (частіше галактози). Визначення гліколіпідів, особливо цереброзидів і сульфатидів, представляє особливий інтерес у зв'язку з тим, що порушення їх метаболізму призводить до серйозних наслідків – до розвитку демієлінізуючих захворювань. Поглиблене вивчення складу і метаболізму даних гліколіпідів дозволить наблизитися до з'ясування їх функціонального значення як в головному мозку, так і в інших тканинах.

Лабораторна робота № 5. Методи дослідження цереброзидів головного мозку

5.1. Виділення цереброзидів і сульфатидів головного мозку

Після вилучення гангліозидів нижній хлороформний шар, який їх не містить, доводять метанолом до обсягу, відповідного 20 мл суміші на 1 г тканини, і використовують для виділення сумарних цереброзидів і сульфатидів.

Принцип методу: виділення осаду цереброзидів і сульфатидів за методом Азмена засноване на їх здатності утворювати щільний білий шар на кордоні хлороформного і водного шарів при обробці хлороформ-метанолового екстракту ліпідів трихлороцтовою кислотою і водою.

Реактиви: 1) суміш хлороформ - метанол (2: 1); 2) 4 % розчин трихлороцтової кислоти; 3) суміш хлороформ - етанол(1:1).

Хід виділення: хлороформ-метаноловий екстракт ліпідів, звільнений від гангліозидів і інших водорозчинних домішок, охолоджують в бані з льодом до 2-3 °С. Потім до ліпідного екстракту додають 4 % трихлоруксусну кислоту з розрахунку 3 мл кислоти на 7 мл ліпідного екстракту. Суміш енергійно струшують і залишають

на 2 год в бані з льодом; протягом цього часу періодично повторюють струшування. Після цього проби центрифугують протягом 15-20 хв при 3000 об / хв до повного поділу рідини на два шари.

Далі верхній шар обережно видаляють, а до нижнього додають рівний об'єм дистильованої води. Суміш струшують до утворення емульсії, витримують протягом 1 год в бані з льодом, а потім 30 хв центрифугують при 3000 об/хв. В результаті цього утворюється трифазна система, що складається з верхнього водного шару, плівки цереброзидів і сульфатидів і нижнього хлороформного шару. Не руйнуючи цереброзидної плівки, обережно видаляють верхній і нижній шари. Отримані гліколіпіди емульгують в 5-6 мл води, переносять в целофановий мішечок і піддають діалізу проти дистильованої води протягом 2 діб при 2-3 °С, неодноразово міняючи воду в діалізаторі.

Після діалізу вміст мішечка переносять в центрифужну пробірку і центрифугують протягом 15 хв при 3000 об/хв. Отриманий осад розчиняють в 2 мл суміші хлороформу і метанолу (1: 1). Потім проводять очистку осаду цереброзидів і сульфатидів від фосфоліпідів. Для цього хлороформ-етаноловий розчин випарюють при 60 °С. Цереброзиди і сульфатиди утворюють на стінках пробірки плівку, яку зішкрябають скляною паличкою. Далі проводять 2-кратну екстракцію сумарних цереброзидів киплячим ацетоном. (Ацетон нагрівати тільки на водяній бані!).

Сумарні цереброзиди і сульфатиди, розчинені в гарячому ацетоні, фільтрують в центрифужні пробірки, потім закривають корковими пробками і залишають на ніч в холодильнику. Випав за ніч осад очищених цереброзидів і сульфатидів відокремлюють центрифугуванням, розчиняють в 1 мл суміші хлороформ - етанол (1: 1) і використовують для подальших досліджень.

Описаний метод виділення цереброзидів і сульфатидів дозволяє виділити з головного мозку однієї дорослої тварини 1,0-1,5 мг сумарних цереброзидів і сульфатидів, що досить для поділу їх

методом тонкошарової хроматографії і кількісної оцінки отриманих фракцій.

5.2. Поділ цереброзидів і сульфатидів методом тонкошарової хроматографії

Принцип методу: для поділу сумарних цереброзидів і сульфатидів, виділених із загальних ліпідів, використовують різні системи розчинників. Найкраще поділ виходить в системі розчинників хлороформ - метанол - вода(60 : 35 : 8).

Реактиви: 1) система розчинників хлороформ - метанол - вода (60: 35: 8); 2) кристалічний I₂; 3) система розчинників хлороформ - метанол - концентрований NH₃ (80 : 20 : 0,4).

Хід розділення: хроматографічне розділення на тонкому шарі проводять на пластинках розміром (в середньому) 13 * 18 см. Силікагель (6 г) марки КСК з розміром частинок 20-30 мкм ретельно перемішують в агатовій ступці з 18 мл дистильованої води і переносять на пластинки, намагаючись, щоб силікагель рівномірно розподілився по всій поверхні. Пластинки висушують при кімнатній температурі, помістивши їх на рівну горизонтальну поверхню. Безпосередньо перед хроматографуванням пластинки активують в термостаті протягом 1 год при температурі 110 °С. На неостиглу пластинку наносять розчин цереброзидів і сульфатидів, що містить 100 мкг досліджуваної речовини в 0,1 мл. Нанесення проводять скляним капіляром у вигляді окремих смужок довжиною 1,5-2,0 см на відстані 1,5 см від краю пластинки.

Після висихання нанесеного розчину ліпідів проводять хроматографічне розділення в камері, попередньо насиченою сумішшю розчинників. Коли фронт розчинників досягне 17,0-17,5 см, пластинки виймають і висушують у витяжній шафі до повного зникнення запаху розчинника, а потім виявляють парами йоду. Контур отриманих фракцій обводять тонкою голкою, після випаровування йоду фракції елююють. Для елюювання використовують ту систему розчинників, в якій здійснювалося

хроматографічне розділення. Елюат відповідних фракцій упарюють і проводять їх кількісне визначення.

Ідентифікацію отриманих фракцій проводять за стандартами цереброзидів і сульфатидів, по реакціях на галактозу і на сульфатну групу. Експериментально встановлено, що перші дві фракції зі значеннями R_f 0,43 і 0,56 є сульфатидами, а 3, 4 і 5-а фракції представляють власне цереброзиди.

В системі розчинників хлороформ - метанол - концентрований в співвідношенні 80: 20: 0,4 проводять хроматографічне розділення загальної фракції ліпідів, виділеної методом Фолча і звільненій від гангліозидів. При цьому відбувається відділення сульфатидів від цереброзидів. З осаду загальних ліпідів головного мозку можуть бути виділені дві фракції сульфатидів (С1, С2) з величинами R_f 0,26 і 0,35 і три фракції цереброзидів (Ц1, Ц2, Ц3) зі значеннями R_f 0,45; 0,54 і 0,69.

Використані системи розчинників дають добре відтворювані результати. Перевага другої системи розчинників полягає в тому, що в ній досягається відділення сульфатидів від цереброзидів із загальної фракції ліпідів без їх попереднього виділення. Це запобігає неминучі втрати, що особливо важливо в дослідках зі зростаючими тваринами, в головному мозку яких вміст цереброзидів і сульфатидів дуже низький. Однак в цій системі розчинників не вдається розділити глюко- і галактоцереброзиди.

5.3. Поділ цереброзидів на галакто-і глюкоцереброзиди методом тонкошарової хроматографії

Принцип методу: поділ цереброзидів на галакто- і глюкоцереброзиди заснований на різній здатності глюкози і галактози утворювати боратні комплекси, що володіють різною хроматографічною рухливістю.

Реактиви: 1) 1 % розчин $Na_2B_4O_7$; 2) система розчинників хлороформ - метанол - вода – 15 М NH_4OH (280:70:6:1).

Хід роботи: на пластинки розміром 13 на 18 см наносять 3 г силікагелю КСК, який перемішують в агатовій ступці з 7 мл 1 % розчину $Na_2B_4O_7$ і 3-4 мл води. Пластинки висушують при кімнатній температурі в горизонтальному положенні і безпосередньо перед використанням активують протягом 1 год при температурі 125 °С. Хлороформ-метаноловий розчин цереброзидів наносять на пластинки мікрокапіляром і поміщають в камеру із вказаною системою розчинників. При використанні даного методу загальні цереброзиди, виділені з головного мозку новонароджених і 10-денних щурів, поділяються на дві фракції галактоцереброзидів і одну фракцію глюкоцереброзидів з відповідними значеннями R_f 0,06; 0,14; 0,40. Кількісну оцінку отриманих фракцій цереброзидів здійснюють по вуглеводному компоненту з орцином методом Радіна і співавторів, який дає можливість відокремити глюкоцереброзиди від галактоцереброзидів при наявності в пробі не менше 40-50 мкг глюкоцереброзидів.

Контрольні питання і завдання:

1. Що називають «ліпідами» і як їх класифікують?
2. Які закономірності травлення і всмоктування ліпідів в ШКТ?
3. Що являють собою жирні кислоти?
4. Який хімічний склад мила?
5. Чим відрізняються Na^+ -, K^+ - та Ca^{2+} - мила за фізико-хімічними властивостями один від одного?
6. Принципи фракціонування ліпідів методом ТШХ на силікагель.
7. Яке біологічне значення холестерину в організмі людини?
8. Наведіть коротку схему метаболізму холестерину в організмі людини.
9. Назвіть принципи методу визначення загального холестерину в мозку і сироватці крові.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Нейрохимия: учебное пособие для вузов. Болдырев А. А., Ещенко Н. Д., Ильюха В. А., Кяйвяряйнен Е. И., М.: Дрофа, 2010. – 398 с.
2. Ещенко Н. Д. Биохимия психических и нервных болезней. – СПб.: Из-во Санкт Петербургского ун-та. – 2004. – 198 с.
3. Kumar A., Tsao J. W. Alzheimer Disease // StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-2018 May 4.
4. Mitre M., Mariga A., Chao M. V. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology // Clin. Sci. (Lond). – 2017. – v. 131, No 1. – P. 13-23.
5. Schousboe A. Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission // Neurosci. Lett. – 2018. - Feb 2. - pii: S0304- 3940(18)30044-2. doi: 10.1016/j.neulet.2018.01.038.
6. Lefevre A., Hurlemann R., Grinevich V. Imaging neuropeptide effects on human brain function // Cell Tissue Res. - 2018 Aug 1. doi: 10.1007/s00441-018-2899-6.

Навчальне видання

Кобернік Альона Олександрівна

Еберле Лідія Вікторівна, **Грицук** Олександр Іванович

Нейрохімія

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

для лабораторних робіт з курсу «Нейрохімія» для студентів
факультету хімії та фармації спеціальностей

226 «Фармація. Промислова фармація» та 102 «Хімія»

Підп. до друку. 21.10.2021. Формат 60x84/16.

Ум.-друк. арк. 3,02. Тираж 13 пр.

Зам. № 2350.

Видавець і виготовлювач

Одеський національний університет

імені І. І. Мечникова

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12

Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.