

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования
«КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ им. В.П. Астафьева»
(КГПУ им. В.П. Астафьева)

Факультет биологии, географии и химии
Кафедра биологии, химии и экологии

Везо Екатерина Ярославовна

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

**РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО РУКОВОДСТВА ДЛЯ ЗАНЯТИЙ ПО
«СРАВНИТЕЛЬНОЙ ФИЗИОЛОГИИ КЛАССОВ АМФИБИИ И
МЛЕКОПИТАЮЩИЕ» ПРИ РАБОТЕ С НОУ НА БАЗЕ КГПУ
ИМ. В.П. АСТАФЬЕВА**

Направление подготовки 44.03.05 Педагогическое образование

Направление (профиль) образовательной программы География и биология

ДОПУСКАЮ К ЗАЩИТЕ

Зав. кафедрой: док.биол.наук, проф. Антипова Е.М.

(дата, подпись)

Руководитель: канд.биол.наук, доц. Городилова С.Н.

(дата, подпись)

Дата защиты: _____

Обучающийся: Везо Е. Я.

(дата, подпись)

Оценка _____

(прописью)

Красноярск 2019

Содержание

Введение.....	3
ГЛАВА 1. НОРМАТИВНО-ПРАВОВЫЕ ДОКУМЕНТЫ О НАУЧНОМ ОБЩЕСТВЕ УЧАЩИХСЯ (НОУ).....	6
1.1. Направления и структура НОУ.....	6
1.2. История образования НОУ в России.....	8
1.3. Научное общество учащихся Красноярского края.....	9
1.4. Нормативные документы о НОУ на территории РФ и Красноярского края.....	11
ГЛАВА 2. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С ОБУЧАЮЩИМИСЯ НА БАЗЕ КГПУ ИМ. В.П. АСТАФЬЕВА.....	13
2.1. Описание актуальных физиологических тем для НОУ.....	13
2.2. Методы изучения физиологических показателей амфибий, апробированные в лабораторных условиях с НОУ	15
2.3. Общие сведения об энергообмене амфибий.....	22
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО РУКОВОДСТВА ПО СРАВНИТЕЛЬНОЙ ФИЗИОЛОГИИ КЛАССОВ АМФИБИИ И МЛЕКОПИТАЮЩИЕ.....	24
3.1. Правила техники безопасности в лаборатории.....	24
3.2. Алгоритм подготовки приборов и растворов к физиологическим исследованиям	27
3.3. Лабораторные работы, апробированные на базе КГПУ им. В.П. Астафьева.....	39
Выводы.....	43
Список использованных источников.....	45
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	49

ВВЕДЕНИЕ

В начале 90-х гг. произошел переломный момент в российской системе образования. Подал статус нашей системы образования на фоне других стран. Школьникам стало все сложнее поступить в высшие учебные заведения, а к студентам появилось больше требований для успешной учебы. Эти предпосылки являлись причиной создания специализированных учебных заведений: гимназии, частные школы, лицеи, профильные классы и др. «Специализированные классы»:

- Профильные классы, подготавливающие к поступлению в ВУЗы;
- Классы, которые углубленно изучают различные предметы;
- Классы лицея или гимназии;
- Классы, которые обучаются по авторским методикам;
- Коррекционно-развивающие классы.

С 1 сентября 2015 г. по поручению губернатора Красноярского края были открыты 25 специализированных класса (2 класса - по естественнонаучному направлению) в Красноярском крае. Главной задачей было повышение качества образования на государственном уровне, а также повышения уровня знаний учащихся путем углубленного изучения отдельных предметов. Например, на базе КГПУ им. В.П. Астафьева производится подготовка обучающихся уже с 2015 года [30].

Специализированные классы не только ведут подготовку обучающихся к сдаче экзаменов, но и повышают уровень знаний, способствуют приобретению навыков в научных исследованиях. Благодаря выполнению научных исследований происходит личностное развитие школьников, расширение кругозора, овладение различными методами исследования, воспитание ответственности, целеустремленности, развитие умения оптимизировать и рационализировать свою деятельность.

Особенности организации научно-исследовательской деятельности учащихся:

- Субъекты – учащиеся и педагоги. Учителя осуществляют поиск инноваций в образовательном процессе, объединяют учащихся в НОУ для повышения заинтересованности к изучению актуальных проблем.
- Исследования направлены на совершенствование образовательных программ, воспитание и развитие учащихся, повышение качества обучения.
- Результат научно-исследовательской деятельности, как правило, не предусматривает совершение каких-либо серьезных научных открытий, поэтому каждый желающий может принять участие в подобной деятельности.

В рамках школы может возникнуть ряд трудностей в осуществлении научно-исследовательской деятельности: выбор актуальных научных тем, необходимых методов для их исследования, подбор достоверных источников литературы и др. Поэтому возникла необходимость создать практическое руководство, которое подходит для естественнонаучного направления деятельности по биологии в области физиологии человека и животных.

Цель работы: разработка практического руководства для занятий по «сравнительной физиологии классов амфибии и млекопитающие» при работе с НОУ на базе КГПУ им. В.П. Астафьева.

Задачи:

1. изучить нормативно-правовые документы о научном обществе учащихся;
2. выделить темы и методы для физиологических исследований для НОУ на базе КГПУ им. В.П. Астафьева;
3. разработать практическое руководство на тему: «Сравнительная физиология классов: амфибии и млекопитающие»;
4. показать результаты апробированных лабораторных работ по темам: «Измерение уровня гемоглобина в крови лягушки», «Измерение уровня глюкозы в крови лягушки», «Исследование тканевого энергообмена амфибий».

Апробация. Выпускная квалификационная работа была представлена на:

1. VII Международный научно-образовательный форум «Человек, семья и общество: история и перспективы развития»: сертификат за участие в работе II Школы-семинара «Современные биоэкологические и химические исследования на территории Средней Сибири» (Приложение А, рис. 26); диплом за лучшее оформление научного доклада по теме «Биология, экология, некоторые физиологические показатели амфибий Средней Сибири» 2018 г. (Приложение Б, рис. 27).

2. XX Международный научно-практический форум студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века»: диплом за плодотворный труд и активную работу в развитии научно-исследовательской деятельности, а также за участие в научно-практической конференции «БИОЭКО» (Приложение В, рис. 28; Приложение Г, рис.29).

Везо Е.Я., Городилова С.Н. Сравнительный анализ тканевого энергообмена жабы обыкновенной (*Bufo bufo*) и лабораторных мышей линии *ICR* // Современные биоэкологические исследования Средней Сибири: материалы научно-практической конференции «БИОЭКО» в рамках XX Международного научно-практического форума студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века» Красноярск, 25 апреля 2019 г. / отв. ред. Е.М. Антипова; ред. кол.; Краснояр. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева. Красноярск, 2019. С. 133-136. (в печати).

Апробация лабораторных работ из практического руководства «Сравнительная физиология классов амфибии и млекопитающие» прошла на базе КГПУ им. В.П. Астафьева с обучающейся МАОУ СШ № 23 Гаджиевой Амандой Бахтияровной (Приложение Д, рис. 30; Приложение Е, рис. 31). Результат ее работы будет представлен на общешкольной конференции в 2019-2020 учебном году.

ГЛАВА 1. НОРМАТИВНО-ПРАВОВЫЕ ДОКУМЕНТЫ О НАУЧНОМ ОБЩЕСТВЕ УЧАЩИХСЯ (НОУ)

1.1. Направления и структура НОУ

НОУ (научное общество учащихся) – это добровольное объединение школьников, с целью совершенствования своих знаний в определенной области наук, развития творческих способностей, мышления, интеллектуальной инициативы, самостоятельности, аналитического подхода к собственной деятельности, к приобретению умений и навыков научно – исследовательской работы под руководством учителей школы [28].

Существует три основных направления НОУ:

1. естественнонаучное;
2. гуманитарное;
3. психологическое.

Задачи НОУ:

1. формирование у учащихся интереса к исследовательской деятельности, представления о ценности научных знаний в современном мире;
2. приобретение навыков в исследовательской деятельности, выдвигать гипотезы, ставить цели и находить пути ее достижения, умение ориентироваться в информационном пространстве;
3. пропаганда среди учащихся достижений различных наук.

Учащиеся разных возрастов объединены вместе с их руководителями в течение долгого времени для межпредметного многопрофильного обучения. Таким образом, это способствует формированию глубокого систематизированного знания предмета и широкой эрудиции, а также формирование навыков исследовательского труда.

Использование опыта и навыков, приобретенных во время учебной и исследовательской деятельности учащихся, для повышения успеваемости и развития психологической сферы.

Участником НОУ может стать любой учащийся школы, который занимается либо хочет приступить к выполнению исследовательской деятельности, а также участвующий в заседаниях факультативов или кружков. Для приема в НОУ достаточно лишь устного заявления претендента. Все участники научного общества имеют свободный доступ к материальной базе школы, которая может понадобиться для проведения исследовательских работ. Наставник по научному обществу помогает выбрать обучающемуся научного руководителя по выбранной теме исследования [29].

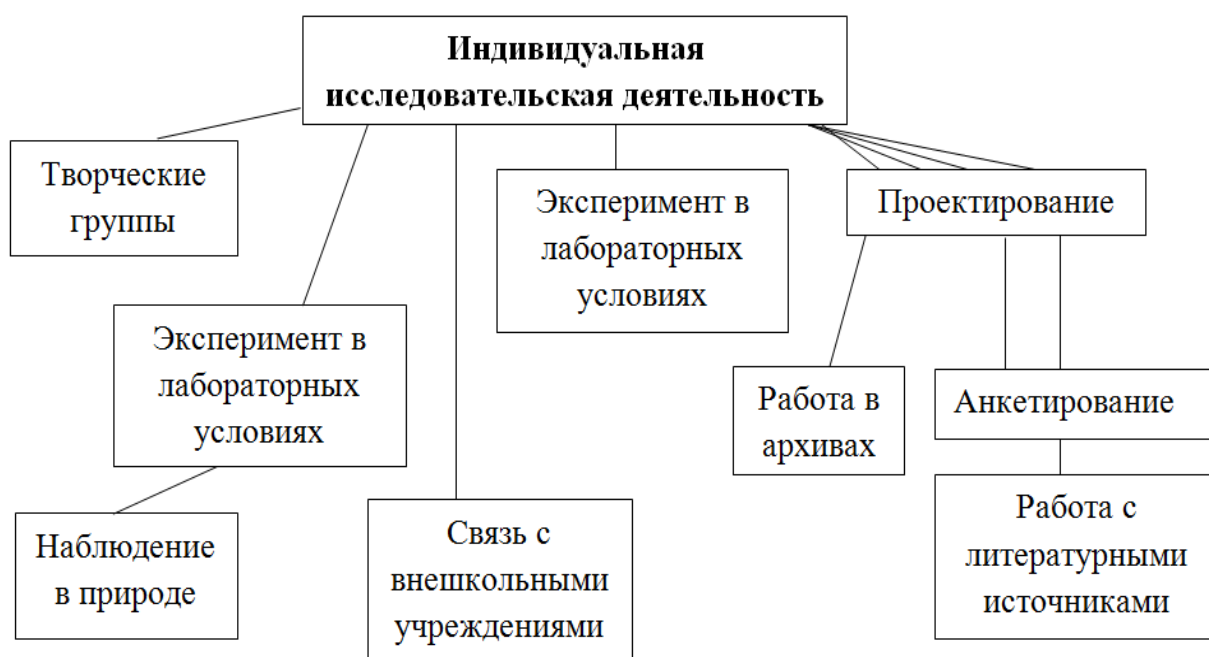


Рисунок 1 - Формы организации научного общества

Экспериментальная работа в лабораторных условиях подходит для естественнонаучного направления деятельности по биологии в области физиологии человека и животных (рис. 1). Данное направление реализовать в рамках школы довольно проблематично, в связи с отсутствием необходимой материальной базы, поэтому базой для проведения научных исследований по экспериментальной физиологии выбран педагогический университет (КГПУ им. В.П. Астафьева), кафедра биологии, химии и экологии, в котором имеется специализированное оборудование.

1.2. История образования НОУ в России

В 1992 г. в России начало формироваться научное общество учащихся (НОУ). Этому способствовала активная деятельность образовательных учреждений (вузы, школы, внешкольные учреждения – Дворцы пионеров и др.), направленная на развитие в учащихся интереса и способностей заниматься исследовательской деятельностью с помощью создания:

- в вузах – научные общества для школьников (например, «Юный геолог», «Юный химик» и др.);
- в школах – кружки;
- во внешкольных учреждениях – кружки, секции, станции («Юный натуралист и др.).

Педагоги, в свою очередь, развивали творческую и интеллектуальную активность учащихся, а также вовлекали их в осуществление научных исследований.

Результаты исследований представляются, как правило, в виде защиты на научно-практической конференции школьников. Спустя некоторое время, данное мероприятие носило межрегиональный характер и переросло в научную конференцию всероссийского масштаба. А в последние несколько лет переросли в Федеральную научно-образовательную программу, которая включает несколько десятков Российских проектов. Такой успех обусловлен тем, что данное научное движение учитывает интересы образовательных учреждений, которые развивают творческие и интеллектуальные инициативы школьников, интересы самих учащихся и молодых ученых в самореализации в данной сфере [11].

Программа НОУ начинает реализовываться с момента его создания и начала проведения конференций с 1993 г. После того, как мероприятие стало приобретать общую популярность, с 1997 г. конференции стали Межрегиональными, Российскими, затем и Международными. Создают

Межрегиональные лагеря (школы) юных исследователей, проводятся интеллектуальные турниры между школьниками и т.д. Наиболее известные центры научной деятельности школьников в России: Смоленск, Москва, Челябинск, Санкт-Петербург, Красноярск, Новосибирск, Рязань.

В 1998 г. программа создания НОУ была включена в Президентскую программу «Дети России», Федеральную целевую программу «Одаренные дети». В наши дни программа включает целый комплекс проектов.

1.3. Научное общество учащихся Красноярского края

Дворец пионеров и школьников стал инициатором создания краевого НОУ в Красноярском крае, и эта идея была поддержана краевым министерством образования и науки, администрациями, вузами, школами, научно-исследовательскими организациями и др. [12].

Губернатор Красноярского края Хлопонин А.Г. на Федерально-окружном соревновании «Шаг в будущее» однажды отметил: «Сегодня на красноярской земле реализуется целый ряд крупнейших в современной истории нашей страны инвестиционных проектов, еще несколько десятков - будут воплощены в жизнь в самом ближайшем будущем. Благодаря этому тысячи молодых и талантливых получили реальный шанс сделать в Сибири блестящую карьеру. Сейчас нам как никогда нужны смелые идеи, свежие мысли, оригинальные и эффективные решения. Именно поэтому мы так активно поддерживаем инициативную, талантливую молодежь».

Основные формы учебно-исследовательской деятельности в Красноярском крае [17].

- краевой форум «Молодежь и наука»;
- краевая научная молодежная выставка «Шаг в будущее»;
- дистанционная школа «Юный исследователь»;
- научно-практические конференции;
- образовательная программа «Поле научных проб»;

- краевая интенсивная школа «Ресурс будущего», «Экспедиция к успеху»;
- турниры, семинары, конкурсы и др.

Структура НОУ может быть представлена следующим образом (рис. 2):

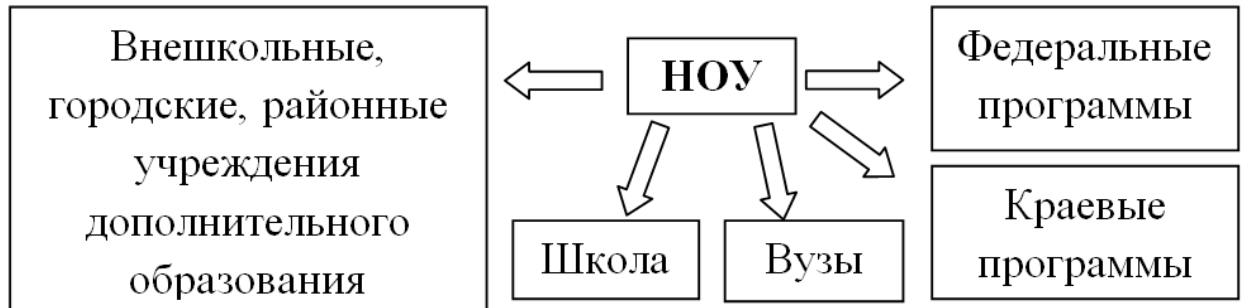


Рисунок 2 - Организационные структуры НОУ в России

Существует несколько уровней представления результатов исследовательской работы НОУ, которые идут в определенной последовательности друг за другом. На каждом этапе отбираются лучшие работы и выводятся на новый уровень (рис. 3).

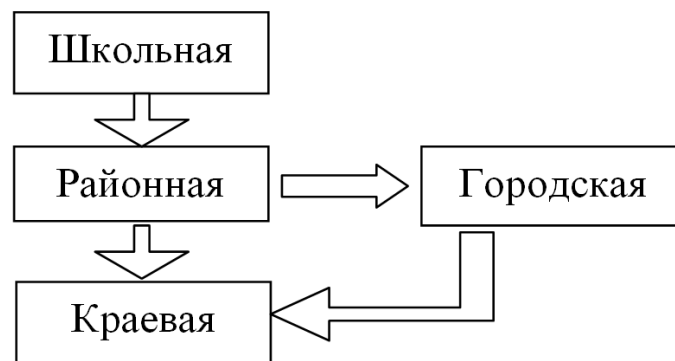


Рисунок 3 - Схема иерархии конференций

Схема, которая подразумевает переход с районного этапа сразу на уровень края, подходит для больших городов, состоящих из нескольких районов (например, г. Красноярск).

1.4. Нормативные документы о НОУ на территории РФ и Красноярского края

Согласно статье 9 «Полномочия уполномоченного Правительством края органа исполнительной власти края в сфере образования», к полномочиям уполномоченного Правительством края органа исполнительной власти края в сфере образования относится, в первую очередь, разработка и реализация государственных программ развития образования края. Причем после получения общего образования, есть возможность получить дополнительное профессиональное образование.

Развитие образования в крае происходит не только благодаря тому, что у каждого учащегося общеобразовательной школы есть широкий выбор дополнительных учебных заведений. В частности, организуются различные мероприятия внутри школы, которые направлены на развитие интеллектуальных и творческих способностей учащихся. (статья 9. 1.9) В Красноярском крае осуществляются выявление и поддержка лиц, проявивших выдающиеся способности. Для них оказывают помощь в получении образования (ст.13.п.1), поэтому органами государственной власти Красноярского края, органами местного самоуправления, общественными и иными организациями организуются и проводятся олимпиады и иные интеллектуальные и (или) творческие конкурсы, физкультурные мероприятия и спортивные мероприятия, направленные на выявление и развитие у обучающихся интеллектуальных и творческих способностей, способностей к занятиям физической культурой и спортом, интереса к научной (научно-исследовательской) деятельности, творческой деятельности, физкультурно-спортивной деятельности, на пропаганду научных знаний, творческих и спортивных достижений.

В целях выявления и поддержки лиц, проявивших выдающиеся способности и добившихся успехов в каком-либо направлении учебной деятельности, создаются специализированные структурные подразделения

(специализированные классы), а также действуют образовательные организации разного уровня, которые реализуют основные и дополнительные образовательные программы, не относящихся к типу таких образовательных организаций (далее - нетиповые образовательные организации). Таким образом, организуются специальные сообщества, которые называют научными обществами учащихся (НОУ) [27].

Согласно ст.9, (1.10) создаются основные общеобразовательные программы с учетом индивидуальных особенностей учащихся (в части учета региональных, национальных и этнокультурных особенностей) – это означает, что в научное общество учащихся могут быть включены учащиеся разного возраста, национальностей, уровня развития и т.д.

Создаются условия для реализации инновационных образовательных проектов, программ и внедрения их результатов в практику (ст.9 1.20).

Требуется специальная подготовка педагогов при работе с НОУ, о которой говорится в ст.9 (1.30): обеспечение подготовки педагогических работников, владеющих специальными педагогическими подходами и методами обучения и воспитания обучающихся с ОВЗ, и содействие привлечению таких работников в организации, осуществляющие образовательную деятельность.

ГЛАВА 2. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С ОБУЧАЮЩИМИСЯ НА БАЗЕ КГПУ ИМ. В.П. АСТАФЬЕВА

Физиология – фундамент теоретической подготовки биолога любого профиля. Эксперимент является основным методом изучения механизмов и закономерностей функционирования организма. При выполнении лабораторных работ члены НОУ могут получить подтверждение теоретическим положениям, излагаемым в литературных источниках, а также формируется физиологическое мышление, развиваются навыки в проведении экспериментов с помощью специального лабораторного оборудования. Кроме того, учащиеся осваивают приемы протоколирования эксперимента, что немаловажно при проведении данного вида работы.

Исследование физиологических показателей проводятся при экспериментальном их выявлении в лабораторных условиях и сравнении с данными литературы.

2.1. Описание актуальных физиологических тем для НОУ

1. Морфологические особенности нейрон-глиальных популяций головного мозга. Анализ взаимосвязи между морфологическими характеристиками нейрон-глиальных клеточных популяций VI слоя крыши среднего мозга и слоев коры мозжечка бесхвостых амфибий и их видовая принадлежность. Данные отделы мозга являются высшими интегративными центрами и обеспечивают регуляцию, и координацию движений земноводных. Наличие видовых специфических морфологических особенностей в организации нейрон-глиальных клеточных популяций связано с филогенетическими преобразованиями нервной системы и с адаптацией земноводных к наземно-водной среде обитания. Следовательно, в рамках этой темы могут быть изучены все отделы головного мозга амфибий, рептилий, птиц и мелких млекопитающих на наличие нейрон-глиальных популяций клеток мозга [31].

2. Исследование интенсивности тканевого энергообмена животных, обитающих на территории Средней Сибири. В рамках этой общей темы могут быть изучены:

- 2.1. показатели тканевого энергообмена печени
- 2.2. показатели тканевого энергообмена покровных тканей
- 2.3. показатели тканевого энергообмена бурого жира
- 2.4. показатели тканевого энергообмена головного мозга
- 2.5. показатели тканевого энергообмена скелетных мышц

3. Гормональная регуляция живых организмов. Гормоны играют очень большую роль в жизни живых организмов. Они делают каждого из нас особенным и непохожим на остальных, определяют вкусы и пристрастия. Гормоны влияют на все аспекты жизнедеятельности. В онтогенезе они влияют на рост, половое созревание, обмен веществ в организме, поведение и т.д.

4. UCP 1. Позитивные адипоциты бежевого типа в адаптивных стратегиях грызунов Средней Сибири. Важнейший эффектор несократительного термогенеза у млекопитающих - бурая жировая ткань. Разновидность жировых клеток – бежевые адипоциты - по наличию разобщающего белка UCP1, по распределению жира сходны с бурыми.

5. Эволюция механизмов факультативного термогенеза, основанного на митохондриальном разобщении. Эндогенное производство тепла - одно из самых захватывающих эволюционных достижений природы и обеспечивает увеличение скорости метаболизма, активности, размножения, функционирования мозга и многих других процессов, которые не зависят от температуры окружающей среды. Эндотермия независимо развивалась в различных группах животных, но только млекопитающие имеют бурый жир - специализированный орган генерации тепла при понижении температуры среды для поддержания температурного гомеостаза.

6. Выявление белков при протеомном анализе . Протеомный анализ — новое быстро развивающееся направление постгеномной биологии. Поскольку

белки — главные действующие лица любого биохимического процесса, выяснение состава экспрессируемых белков, количественные показатели их экспрессии в ткани дает всестороннюю достоверную картину происходящих изменений в онто- и филогенезе, при различных экспериментальных воздействиях.

7. Исследование содержание кровяных клеток, содержание гемоглобина и глюкозы в крови. Гемоглобин — это железосодержащий белок, важнейший элемент крови. Гемоглобин содержится в эритроцитах. Его главная функция - захват O_2 и его транспорт ко всем органам. Без гемоглобина нормальное насыщение тканей кислородом было бы невозможно. Глюкозу называют энергетическом топливом для клеток организма. Она поступает в организм из пищи, как правило из той, которая содержит большое количество углеводов [8].

2.2. Методы изучения физиологических показателей амфибий, апробированные в лабораторных условиях с НОУ

Физиологические механизмы видовых адаптаций у амфибий изучены крайне слабо. Можно предположить, что большая резистентность к температурному фактору у бесхвостых амфибий (остромордой лягушки) может быть связана с особенностями энергообмена этих видов.

Прежде, чем приступить к рассмотрению методов исследования физиологических показателей, важно учесть некоторые соматометрические показатели и особенности условий окружающей среды амфибий до момента проведения эксперимента.

В исследование включены молодые неполовозрелые особи. Такой выбор диктовался возможностями проведения статистического анализа. Время от момента отлова и до исследования не превышало 2-х суток, в течение которых животные содержались при +12-14 °С и не питались. Лабораторные мыши содержались при +25 °С и имели свободный доступ к корму и воде.

Для оценки возможного влияния 2-суточного голодания на метаболизм амфибий определялось содержание гемоглобина и глюкозы в крови, а также масса висцеральной жировой ткани.

Забор крови необходимо производить сразу же после отлова амфибий путем декапитации с использованием гепарина в качестве антикоагулянта.

Метаболиты в плазме крови определяются путем ее центрифугирования при 3000 об/мин, после этого хранить в замороженном состоянии до момента ее использования. Если в плазме присутствуют следы гемолиза, то такие образцы отбраковываются.

Показатель гемоглобина в крови амфибий можно осуществить с помощью гемиглобинцианидного метода с набором реактивов «Клини Тест-ГемЦ» (НПУ «Эко-Сервис» СПб). Концентрации гемоглобина в крови рассчитывается по формуле: $C = E_0/EK * 120$, где C - концентрация гемоглобина в опытной пробе; E_0 – оптическая плотность опытной пробы; EK – оптическая плотность калибровочной пробы; 120 – концентрация гемоглобина в калибровочном растворе (таблица 1).

Глюкоза определяется глюкозооксидазным методом с набором реагентов «Глюкоза-ФДК» (ООО «Фармацевтика и клиническая диагностика») (таблица 1) [1].

Таблица 1 - Основные соматометрические и биохимические показатели исследованных бесхвостых амфибий

	Остромордая лягушка (<i>R. arvalis</i>)	Озерная лягушка (<i>P. ridibunda</i>)	Обыкновенная жаба (<i>Bufo bufo</i>)
Масса тела, г	11,61±0,51 (9)	17,59±1,31 (10)	23,4±1,8 (4)
Длина тела, мм	50,93±0,93 (9)	59,03±1,31 (10)	62,4±1,6 (4)
Масса, абдоминальной	0,80±0,26 (6)	0,28±0,044 (10)	0,86 ±0,31 (4)

жировой ткани, %			
Глюкоза крови ммоль/л	0,92±0,33 (4)	1,57±0,12 (5)	0,94 (1)
Гемоглобин, г/л	66,45±6,55 (4)	69,54±6,50 (7)	94,2±10,2 (4)

Примечание: В скобках указано количество исследованных животных.

Несмотря на 2-суточное голодание у всех исследованных особей имелась жировая ткань, локализованная в абдоминальной полости в районе гонад (менее 1% от массы тела), а также не было оказано пагубного влияния на показатели гемоглобина и глюкозы в крови. В этом можно убедиться, сравнив с литературными данными. За основу была взята статья Вершинина В.Л., в которой он провел сравнительный анализ бесхвостых амфибий Уральской горной страны (таблица 2,3) [2].

Таблица 2 - Сезонные различия в содержании гемоглобина (г/дл) у *Rana amurensis* и *Rana arvalis*

Вид	Июль	Август	Значимость различий
<i>R. arvalis</i> (половозрелые)	7.95 ± 0.3 (n = 23)	8.96 ± 0.3 (n = 19)	$F(1,40) = 5.4628$; $p = 0.025$
<i>R. amurensis</i> (половозрелые)	9.9 ± 0.5 (n = 7)	11.6 ± 0.6 (n = 4)	$F(1,9) = 4.1782$; $p = 0.07$ (не значимо)
<i>R. amurensis</i> (неполовозрелые)	5.8 ± 0.2 (n = 41)	9.4 ± 0.3 (n = 16)	$F(1,55) = 84.655$; $p = 0.000001$

Таблица 3 - Показатели гемоглобина некоторых видов животных

Вид животных	Гемоглобин	
	г/100 мл	г/л
Мыши белые	14,0—18,0	140—180
Хомячки золотистые	11,0—15,6	110—156
Ежи	12,0—14,0	120—140
Куры	8,0—12,0	80—120
Гуси	9,0—13,5	90—135
Утки	10,0—12,5	100—125
Голуби	10,0—17,0	100—170
Индийки	7,0—11,0	70—110
Цесарки	8,0—12,0	80—120
Лягушки	6,5—8,5	65—85

При работе с НОУ также важно учитывать данные показатели, чтобы исключить некоторые ошибки в изучении показателей тканевого энергообмена амфибий. Нельзя опираться лишь на литературные данные, а прежде, необходимо выявить влияние всех возможных факторов, изменяющих интенсивность тканевого энергообмена амфибий.

Интенсивность энергообмена можно оценить по скорости потребления кислорода. Во избежание ошибок, косвенные оценки энергообмена обязательно должны быть подкреплены прямым измерением скорости потребления кислорода.

Сигналы, идущие от датчика в измерительный преобразователь по специальному кабелю, отображаются на дисплее. Рекомендуется вести запись динамики концентрации кислорода в ячейке через определенные интервалы времени. Уменьшение концентрации O_2 говорит о клеточном дыхании. При ее изменении менее, чем на 30% рассчитывают убыль кислорода за минуту и нормируют его к количественному показателю изучаемого объекта (например, вес биологической ткани). Скорость потребления кислорода клетками и тканями определяется при $37^\circ C (\pm 1^\circ C)$ [4].

Тканевой энергообмен оценивали в печени, мозге и мышцах по скорости потребления O_2 . Выбор этих тканей был обусловлен следующими обстоятельствами: печень и мышцы вносят наибольший вклад в энергообмен и

общую облигатную теплопродукцию животного. Скорость реакций на внешние стимулы, их адекватная регуляция определяются состоянием энергообмена мозга. Полученные данные свидетельствуют об очень высоком потенциале аэробного окисления в тканях сибирских амфибий, который сопоставим с показателями млекопитающих в тканях мозга (таблица 4) .

Таблица 4 - Показатели тканевого энергообмена у бесхвостых амфибий и лабораторных мышей

Виды	Скорость потребления O ₂ in vitro, нмоль/мин*мг		
	Мозг	печень	мышцы
Жаба обыкновенная <i>Bufo bufo</i>	0,52±0,06 (3)	0,25±0,15 (4)	0,34±0,1 (3)
Остромордая лягушка <i>Rana arvalis</i>	0,55±0,13* (7)	0,44±0,11 (9)	0,28±0,07+ (5)
Озерная лягушка <i>Pelophylax ridibunda</i>	0,38±0,05 (8)	0,38±0,10+ (9)	0,29±0,07+ (7)
Лабораторные мыши	0,51±0,13 (6)	0,65±0,16 (6)	0,54±0,08 (6)

Примечание: * - $p < 0,05$ статистическая значимость различий между видами лягушек по Манну-Уитни. В скобках указано количество исследованных животных.

Скорость потребления кислорода мышцами практически не отличалась у разных видов амфибий и составила 0,28-0,34 нмоль/мин·мг. Скорость дыхания печени была выше примерно в 1,5 раза, чем в мышцах, составляя 0,38-0,44 нмоль. Как можно было ожидать, показатели энергообмена мышц и печени лягушек были ниже соответствующих показателей лабораторных мышей. Статистически значимые отличия печени и мышц отсутствовали.

Скорость потребления кислорода мозгом у серой жабы практически не отличалась от мышей. Самые высокие показатели отмечены в головном мозге остромордой лягушки (на 45% выше показателя озерной лягушки).

Работа мозга требует большой затраты энергии. По существу, почти 1/4 потребляемого организмом кислорода расходуется в процессах тканевого дыхания клеток мозга. Значительная доля потребляемой мозгом энергии приходится на активный перенос веществ через клеточные мембраны [32].

Более наглядно полученные показатели можно представить в виде диаграммы и сравнить с данными литературы. Таким образом, информация об энергообмене будет представлена в более доступном виде (рис. 4, 5).

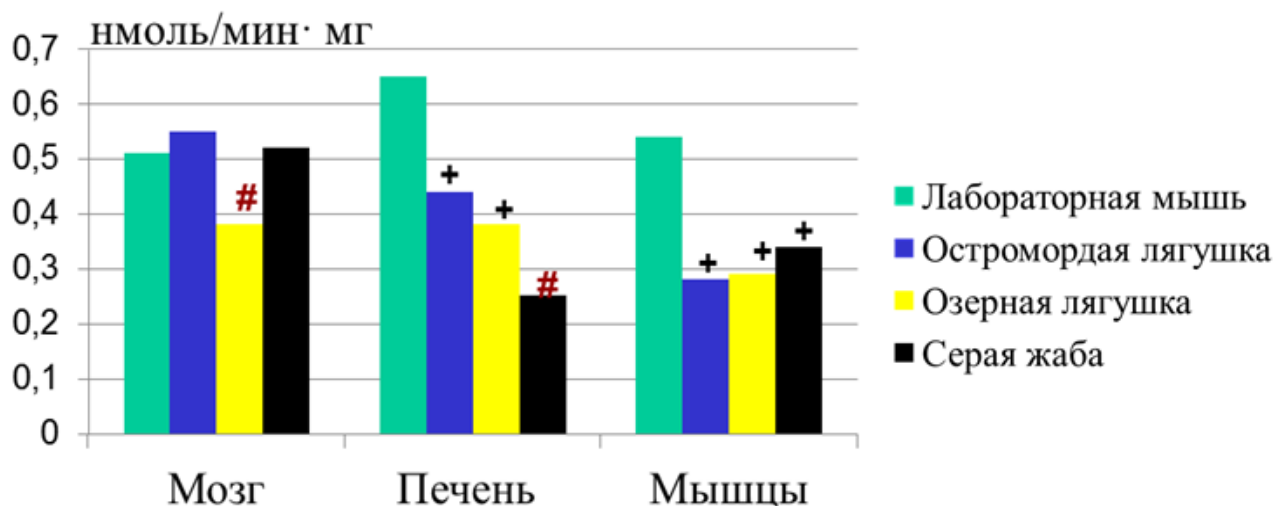


Рисунок 4 - Скорость потребления O_2 тканями бесхвостых амфибий и лабораторных мышей.

Примечание: Цифры внутри столбиков – число исследованных животных. Статистическая значимость различий: # - между видами лягушек; + - между лягушками и мышами.

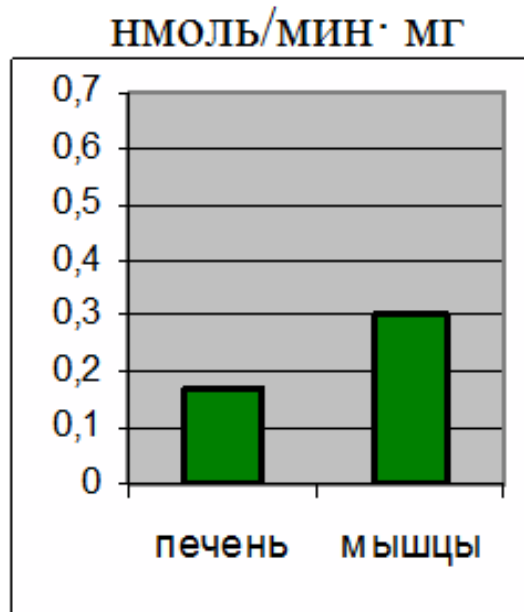


Рисунок 5 - Скорость потребления O₂ тканями амфибий по данным литературы. Печень леопардовой лягушки – Rassard et al., 1974

Мышцы конечностей австалийской квакши – Young et al., 2011

Таким образом, сравнив показатели сибирских видов амфибий и тропических, можно сделать вывод о том, что энергообмен мышц у обеих групп амфибий практически не отличается, но у сибирских видов энергообмен в печени более интенсивный, по сравнению с тропическими видами.

Высокая интенсивность энергообмена именно мозга, а не других тканей, при содержании в условиях низких температур среды делает жабу обыкновенную и остромордую лягушку перспективными объектами для поиска специальных механизмов подогрева мозга у пойкилотермного организма. Данное исследование возможно реализовать и при работе с НОУ, поскольку некоторые показатели уже получены ранее, и на них можно ориентироваться при проведении лабораторных исследований.

2.3. Общие сведения об энергообмене амфибий

Энергообмен обеспечивает устойчивость земноводных к различным условиям окружающей среды и выносливость к существенным колебаниям климатических показателей.

Показатели энергообмена – чувствительный и информативный критерий физиологического статуса и адаптационного потенциала животного [23]. В последние годы было обнаружено, что с мощностями аэробного метаболизма связана терморегуляторная теплопродукция эктотермных животных. Так, эндотермным животным поддерживать температуру тела на холоде млекопитающим помогает бурый жир – (ткань, богатая митохондриями). Основная функция бурого жира – окисление липидов в митохондриях и рассеивания полученной энергии в тепло. За последний процесс отвечает белок термогенин, который кодируется геном UCP1 [25].

Активность и адекватное поведение животного зависит от функционирования мозга, скелетной мускулатуры. У гомойотермных животных значительный вклад в базальный метаболизм вносит печень. У амфибий, как и у млекопитающих, параллельно с созреванием гонад развивается слой окологонадного жира, который по своей природе и функциональным особенностям имеет сходства с бурым жиром [22].

Таким образом, потенциальные термогенные эффекторы у амфибий теоретически могут включать эти ткани. Каковы бы не были конкретные термогенные механизмы, они основаны на аэробном окислении и напрямую зависят от его функциональных резервов. Интегральным показателем интенсивности энергообмена является определение скорости потребления O_2 .

Термогенные механизмы амфибий пока плохо изучены. Установлено, что ген UCP1 присутствует в геноме амфибий, но анатомическая локализация и функциональное значение его экспрессии остаются не известными. Немногие ученые занимались изучением данного вопроса. Они изучали влияние голода и холода на скорость метаболизма и утечку митохондриальных протонов в

печени и скелетных мышцах амфибии, на примере жаба-ага. Результаты оказались следующие:

Циклирование протонов через митохондриальную внутреннюю мембрану вносит существенный вклад, изменяя обычную скорость метаболизма эктотермных и эндотермных животных. Изменение температуры окружающей среды и питания оказывают большое влияние на физиологические потребности эктотермных земноводных и возникнет необходимость корректировки эффективности митохондрий [24].

Чтобы исследовать влияние температуры и питания на митохондриальном уровне, ученые содержали жаб-ага при 10°C и 30°C, половина животных в каждой группе голодала. При воздействии холодом скорость метаболизма в состоянии покоя снизилось в 4 раза, однако голод вызвал незначительные последствия.

Митохондриальные корректировки наблюдались путем сравнения утечки протонов изолированной печени и митохондрии скелетных мышц при 25°C.

При воздействии холодом, у митохондрий печени проявилось снижение протонной проводимости, а митохондрии скелетных мышц остались неизменными [21]. Дополнительное голодание незначительно отразилось на скелетных мышцах, но в печени мы обнаружили различия в механизмах энергосбережения между температурами акклиматизации: у жаб, которые были в тепле, голодание приводило к уменьшению протонной проводимости, а у жаб, которые были на холоде, активность дыхательной цепи снижалась.

Изучив молекулярный механизм лежащий в основе митохондриальной протонной утечки, ученые определили содержание аденин-нуклеотидного транспортера (ANT) (транспортного белка внутренней мембраны митохондрий), которое объясняло специфичные для ткани изменения утечки базальных протонов, но ни корреляция гена ANT, ни расцепляющего белка (UCP) не коррелировала с изменениями утечки протонов в ответ на физиологические стимулы [26].

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО РУКОВОДСТВА ПО СРАВНИТЕЛЬНОЙ ФИЗИОЛОГИИ КЛАССОВ АМФИБИИ И МЛЕКОПИАЮЩИЕ

Практическое руководство рекомендуется для научного общества учащихся. Пособие состоит из трех частей. Первая часть посвящена подготовке к лабораторным исследованиям, которая включает изучение правила техники безопасности. Вторая часть содержит одну лабораторную работу на определение соматометрических показателей амфибий. Третья часть объединяет лабораторные работы по физиологии животных. Каждая тема разбита на две лабораторные работы: подготовка приборов и растворов к исследованию, процесс исследования.

Данное пособие предназначено для самостоятельной работы обучающихся при выполнении научно-исследовательской работы в физиологической лаборатории, а также на занятиях по зоологии анатомии и физиологии позвоночных животных.

3.1. Правила техники безопасности в лаборатории

Общие требования. До входа в лабораторное помещение необходимо надеть халат. Следует постоянно следить за чистотой рабочего места, загромождение его посторонними предметами недопустимо. В лаборатории запрещено принимать пищу и хранить личные вещи.

Приступить к выполнению заданий можно только после ознакомления с методикой их выполнения и разрешения преподавателя. Следует соблюдать чистоту, порядок и тишину во время выполнения работы в лаборатории.

Дежурные, которые назначаются для слежения за порядком и соблюдением техники безопасности, обязаны уходить из помещения последними, предварительно проверив состояние лаборатории, затем сдать отчет о своем дежурстве лаборанту.

Правила безопасности при работе с электрооборудованием и электроприборами. Прежде, чем приступить к работе связанной с использованием электрического тока, важно изучить правила работы с электрооборудованием и электрическими приборами и строго следовать им. Если неправильно обращаться с данными устройствами, есть риск получить травму, а также это может стать причиной возникновения пожара. Наиболее распространенными ошибками являются: работа с неисправным оборудованием, прикосновение руками к токоведущим элементам, нарушение правил работы с приборами и др. Если вы обнаружили, что прибор неисправен, необходимо немедленно сообщить об этом преподавателю [20].

При работе с электрооборудованием и электроприборами следует придерживаться следующих правил:

- При работе с электроприборами перед включением в сеть переменного тока заземлить электроприбор, убедиться в исправности соединения сетевого шнура и штепселя;
- Работать только с сухими руками, не проверять напряжение оборудования или прибора пальцами, затрагивать токоведущие части;
- Не разливать растворы на электропровода;

Правила работы с лабораторной посудой. Посуда, которая используется в лабораторном помещении, имеет специальное предназначение, не должна иметь сколов и других повреждений. Лабораторная посуда требует постоянного ухода: для мытья использовать мыло, соду и другие моющие средства, затем оставить ее сушиться. При работе с режущими инструментами не наносить ранений себе или соседям, не размахивать ножницами, скальпелями, иглами.

Правила работы с ядовитыми и сильнодействующими веществами. При работе с пипетками следить, чтобы в момент насасывания растворов кислот и щелочей эти растворы не попали на кожу и слизистые оболочки. Некоторые химические вещества (кислоты, щелочи, спирт, аммиак и др.) запрещается

пробовать на язык и вдыхать их пары из флаконов. При кипячении растворов на спиртовке не поворачивать пробирку в лицо себе или соседям. При работе с биологическим материалом следует пользоваться резиновыми перчатками. К ядовитым и сильнодействующим веществам относятся: азот, кислород, концентрированные минеральные и органические кислоты, мышьяк, ртуть, фосфор и т.д. Работать с данными веществами разрешается лишь работникам, которые допущены по приказу или распоряжению своего руководителя. Следить, чтобы калибровочный или трансформирующий раствор не попал на кожу, в глаза или рот.

Если ядовитые вещества попали в ротовую полость нужно срочно сделать промывание желудка с помощью раствора поваренной соли – 1 ст. ложка на стакан. При попадании на кожу и слизистую глаз промыть большим количеством воды. В обоих случаях обратиться к врачу.

Правила работы с животными.

- эксперименты на животных следует проводить только после тщательного рассмотрения их значения для здоровья человека и для прогресса биологических знаний;

- для экспериментов следует отбирать здоровых животных надлежащего вида, ограничиваясь тем минимальным их количеством, которое требуется для получения научно достоверных результатов;

- исследователям, другому персоналу всегда надлежит относиться к животным как к чувствительным к различного рода воздействиям существам и считать своим этическим долгом обращаться с животными и использовать их таким образом, чтобы свести к минимуму причиняемые им неудобства, страдания и боль;

- исследователям надлежит исходить из того, что вмешательства, причиняющие большую боль людям, вызывают болевые ощущения и у животных, хотя сведения о восприятии боли животными пока еще далеко недостаточны. Вмешательства, которые не относятся к кратковременным или

минимальным, следует выполнять с применением надлежащих седативных, анальгетических или наркотических средств в соответствии с нормами, принятыми в ветеринарной практике. Хирургические и другие болезненные вмешательства не следует проводить на животных, только обездвиженных с помощью релаксантов и не получивших полноценного наркоза;

- к концу и в процессе эксперимента животных, которые по его завершении будут испытывать сильные или постоянные боли, физические страдания, неудобства или постоянную функциональную недостаточность, не поддающиеся устранению, следует умерщвлять безболезненным способом;

- животным, предназначенным для медико-биологических исследований, следует обеспечить наилучшие возможные условия жизни.

Многие учебные эксперименты заканчиваются эвтаназией – гуманным быстрым и безболезненным умерщвлением животного, не сопровождающимся чувством тревоги и страха. Оптимальным методом эвтаназии является 3-кратная передозировка наркоза (летальная доза). Мелких грызунов, лягушек допустимо умерщвлять с помощью декапитации [6].

Техника безопасности при работе с кровью. Следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как любые образцы крови являются потенциально инфицированными, способны длительное время сохранять или передавать те или иные инфекции [15].

3.2. Алгоритм подготовки приборов и растворов к физиологическим исследованиям

Темы исследования:

- Исследование тканевого энергообмена амфибий в печени;
- Исследование тканевого энергообмена амфибий в головном мозге;
- Исследование тканевого энергообмена амфибий в скелетных мышцах;

Подготовка приборов и растворов для перечисленных выше тем исследования:

1. *Кислородный электрод.* Отвинтите корпус и резервуар электролита, обезжирьте узел электродов с помощью ацетона или тетры, промойте дистиллированной водой и осушите. Привинтите резервуар электрода так, чтобы поверхность чаши резервуара с катодом образовали одну поверхность.

Установите датчик вертикально элементом вверх (рис. 6) и с помощью шприца заполните резервуар электролитом через специальное отверстие в боковой поверхности резервуара.



Рисунок 6 - Установка датчика для заполнения его электролитом

Заполнение производите до момента полного устранения воздуха из резервуара, а избыток электролита должен вытекать через зазор между узлом электродов и резервуаром.

На поверхности катода должны образоваться большие капли электролита. В случае, если капли нет, ее следует наложить с помощью шприца. Затем с помощью пинцета наложите на катод мембрану, но не натягивать. Закрепить мембрану резиновым кольцом. При обнаружении пузырьков воздуха в электролите, следует снять мембрану и повторить заполнение датчика заново [7].

2. *Кислородный датчик.* Универсальный кислородный датчик типа №5221 (рис. 7) предназначен для лабораторных исследований кислорода растворенного в воде и водных растворах. Применение мембран из тефлоновой фольги обеспечивает измерение сточных вод с органическими загрязнениями .

Прежде, чем приступить к измерениям кислородный датчик следует откалибровать. Для этого нужно подключить к гнезду, обозначенному «ВХ», затем поместить в «нулевом» / бескислородном / растворе [16].

Всякие манипуляции при входах кислородомера следует проводить прижатой клавише «0». После истечения около 15 минут, нажать клавишу «50» и воротком зануления установить указания измерителя на нуль (рисунок 25 под цифрой 1).

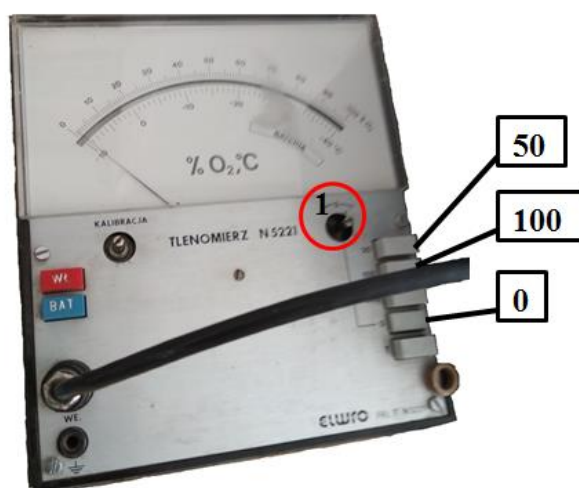


Рисунок 7 - Кислородный датчик

Затем переключите прибор на пределы «100%» и кислородный датчик погрузить в воде с 100%-ным насыщением кислорода.

После стабилизации указаний, воротком «КАЛИБРОВКА» установить указания измерителя точно в конце шкалы.

3. *Термостат.* Циркуляционный термостат (рис. 8,11) предназначен для точного поддержания заданной температуры при проведении измерений физико-химических свойств веществ в диапазоне температур от 0 до 100°C.



Рисунок 8 - Погружной термостат-циркулятор серии LIOP LT-100 и ванна в кожухе с крышкой

ВНИМАНИЕ! Не рекомендуется включать термостат без рабочей жидкости в ванне. В качестве рабочей жидкости может применяться вода. Уровень воды должен быть примерно на 20 мм ниже края ванны. Для температур, превышающих $+80^{\circ}\text{C}$ более удобными теплоносителями являются водно-глицериновые (массовая доля глицерина не более 50%) смеси, ввиду их более низкой испаряемости. Для предотвращения образования накипи, применяйте только дистиллированную воду.

Конструкция насоса позволяет управлять интенсивностью циркуляции и перераспределять потоки между циркуляцией внутри ванны и внешним контуром. Для этого служит регулятор (рис. 9). Для регулировки потоков следует ослабить винт (1), отвернув его на 2 оборота и повернуть регулятор насоса (2) так, чтобы обеспечить необходимое соотношение потоков. После переключения следует ослабить винт (1) [19]. Установка распределения потоков (рис. 10).

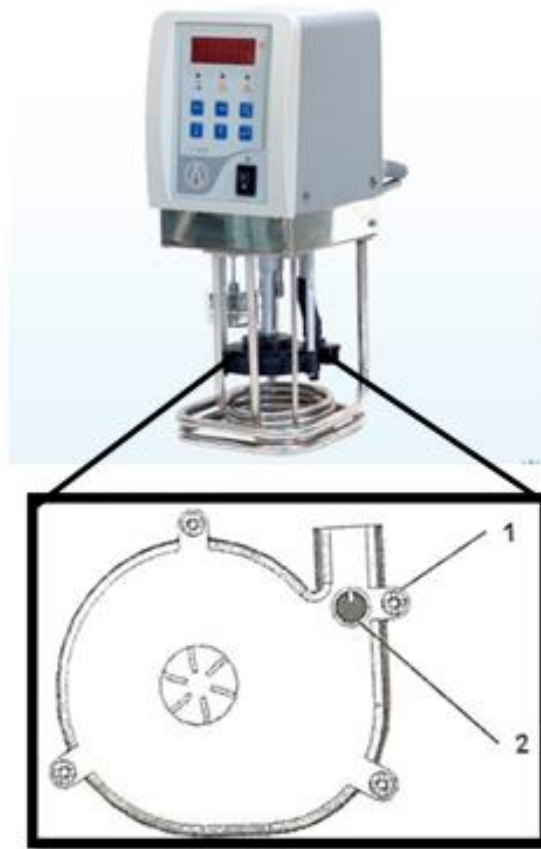


Рисунок 9 - Регулятор циркуляционного насоса

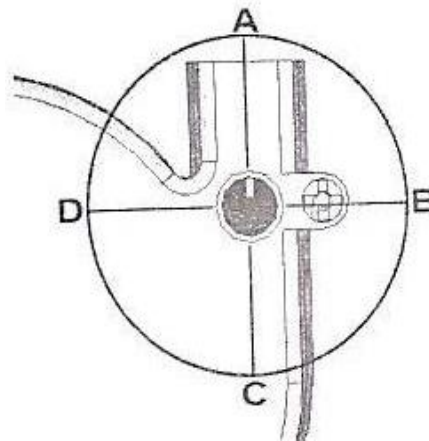


Рисунок 10 - Распределение потоков
при помощи регулятора насоса

Указатель в положении:

«А» или «С» - внешний контур отключен, внутренняя циркуляция максимальна;

«В» - внешний контур отключен, внутренняя циркуляция минимальна;

«D» - внешний контур включен на максимальную производительность, внутренняя циркуляция минимальна.



1. Вкл/выкл;
 2. Текущая температура;
- Порядок действий для установления температуры Тзад. (заданная t°):
 Нажмите \downarrow ;
 - Выбор разряда клавиши \leftarrow и \rightarrow
 - Изменение значения разряда клавиши \uparrow и \downarrow
 - переход к следующему разряду клавиши \leftarrow и \rightarrow

Рисунок 11 - Погружной термостат-циркулятор. Общий вид

4. *Магнитная мешалка.* Мешалку включайте в сеть, имеющую заземление. Запуск - с помощью рычага «СЕТЬ». Магнитная мешалка (рис. 12) предназначена для перемешивания и подогрева неагрессивных и агрессивных водных растворов, не взаимодействующих со стеклом, в лабораториях научно-исследовательских учреждений [10].



Рисунок 12 - Магнитная мешалка

5. *Электролит.* 60 г KCl и 0,3 г K₂CO₃ (чистые для анализа) растворить в 1000 мл дистиллированной воды.

6. *Бескислородный / нулевой / раствор* [7]: 5 г Na_2SO_3 чистого для анализа растворить в 95 мл дистиллированной воды.

7. *Раствор со 100%-ным насыщением O_2* . Путем встряхивания воды в бутылке емкостью в 1000 мл, заполненной до половины емкости в течение 4-5 минут. Во время встряхивания следует многократно открыть бутылку с целью подведения новой порции воздуха.

8. *Лабораторные весы*. Определить вес лягушки можно с помощью лабораторных весов. Для того, чтобы снизить активность амфибии можно использовать лед.

Работа с лабораторными весами [3]:

1. Включить за 5-10 минут до начала работы, нажав на кнопку (рисунок 12).

2. Поставить на весы емкость, в которую затем поместим лягушку. Нажать кнопку «ТАРА».

3. Поместить лягушку в стеклянную емкость.

4. Оценить результат. Например, вес лягушки 17,01 г (рис. 13).

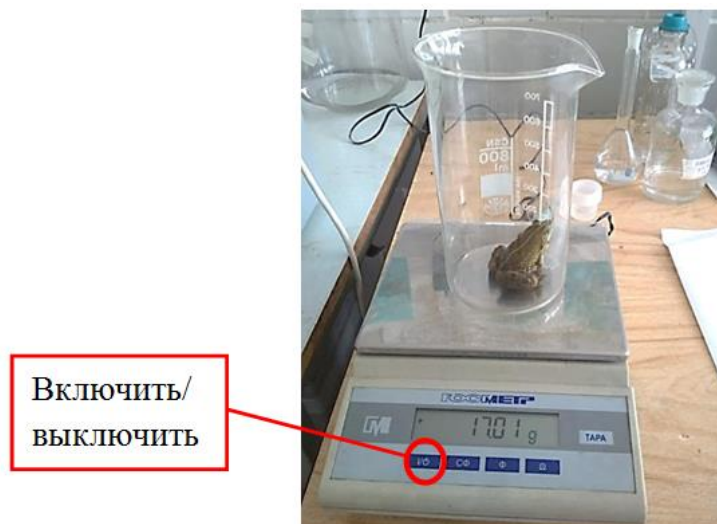


Рисунок 13 - Взвешивание лягушки

Темы исследования:

- Определение уровня гемоглобина в крови
- Измерение уровня глюкозы в крови

Подготовка приборов и растворов для перечисленных выше тем исследования:

1. *Спектрофотометр* (рис. 14) предназначен для измерения коэффициента пропускания, оптической плотности и концентрации жидких проб различного направления [14].

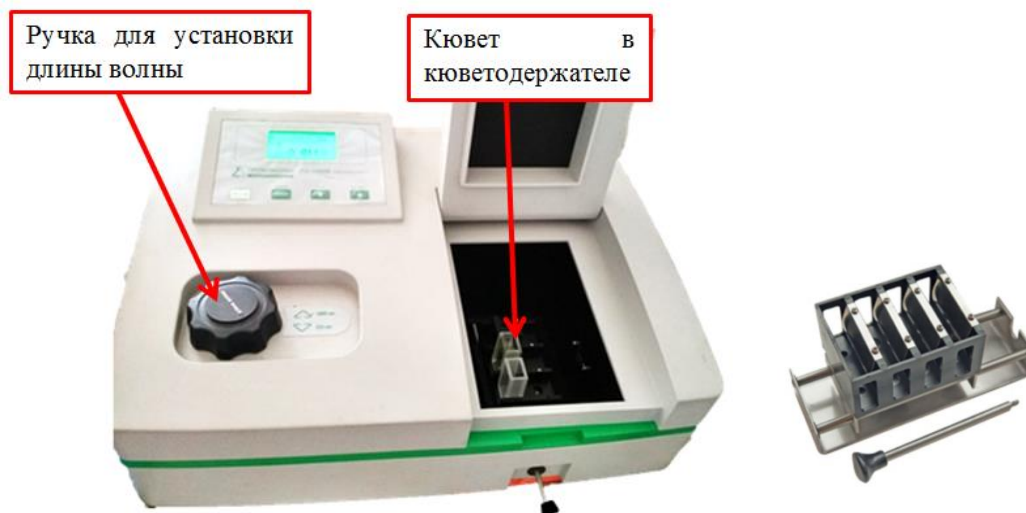


Рисунок 14 - Спектрофотометр и кюветодержатель

Инструкция к спектрофотометру.

1. Включите прибор, нажав на кнопку с обратной его стороны. Оставьте его прогреваться не менее 15 минут (рис. 15).
2. Выберите режим «А» работы с помощью кнопки «РЕЖИМ» (рис. 16).



Рисунок 15 - Включение спектрофотометра



Рисунок 16 - Выбор режима работы

3. Установка длины волны (рис. 17).



Рисунок 17 - Винт для установки длины волны

5. Калибровка прибора.

Установите кювет с контрольной пробой (трансформирующий раствор) (рис. 19).



Рисунок 19 - Установка кювета в кюветное отделение

4. Индикация длины волны отображается на дисплее (рис. 18).

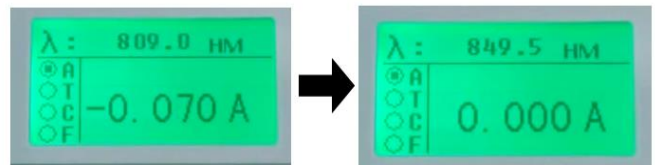


Рисунок 18 - Дисплей спектрофотометра

6. Закройте кюветное отделение и задвиньте ручку кюветодержателя, нажмите на кнопку **0%Т** (рис. 20)

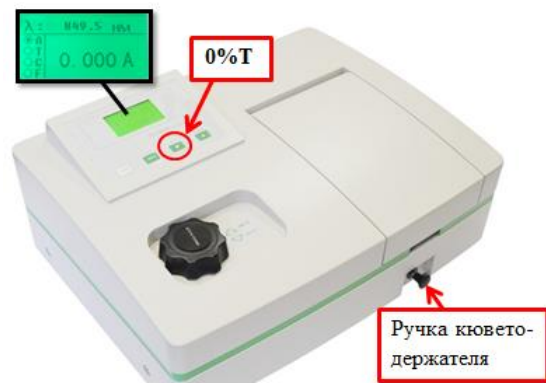


Рисунок 20 - Обнуление прибора

Установите кюветы (как показано на рисунке 21). Закройте кюветное отделение. Кювет с трансформирующим раствором в положении желтой стрелки должен показывать на дисплее значение «0.000 А».



Рисунок 21 - Спектрофотометр с калибровочной пробой: слева – установка кюветов, справа – оценка результата

Подведите в рабочую зону, которая обозначена желтой стрелкой (рис. 21, слева) кювет с калибровочной пробой (или опытной пробой), используя для этого ручку для перемещения кюветодержателя. Оцените результат на дисплее и запишите его в тетрадь (в момент фиксации результатов не забывайте проставлять номера проб, которые привязаны к определенным особям).

Откройте кюветное отделение, достаньте кювет с калибровочной пробой (или опытной пробой), тщательно помойте и заполните раствором из следующей пробирки. Повторите аналогичные действия из 4 пункта в ходе работы.

2. *Центрифуга.* Центрифуга лабораторная клиническая с частотой вращения до 3000 об/мин предназначена для разделения неоднородных жидких систем в поле центробежных сил.

- Установите центрифугу на ровную горизонтальную поверхность.
- Включите центрифугу к питающей сети с помощью шнура.
- Снимите крышку центрифуги.
- Установите гильзы с центрифугатом в гнезда пробиркодержателя.

При неполной загрузке пробиркодержателя центрифуги каждую пару гильз или пробирок, заполненных центрифугатом, располагать в диаметрально противоположных гнездах пробиркодержателя.

Установите переключатель частоты вращения (рис. 22). При этом: крайнее левое положение 1 – 1000 об/мин; среднее значение 1,5 – 1500 об/мин; крайнее правое положение 3 – соответствует 3000 об/мин. Закройте крышку, запустите центрифугу нажатием кнопки включения / выключения.

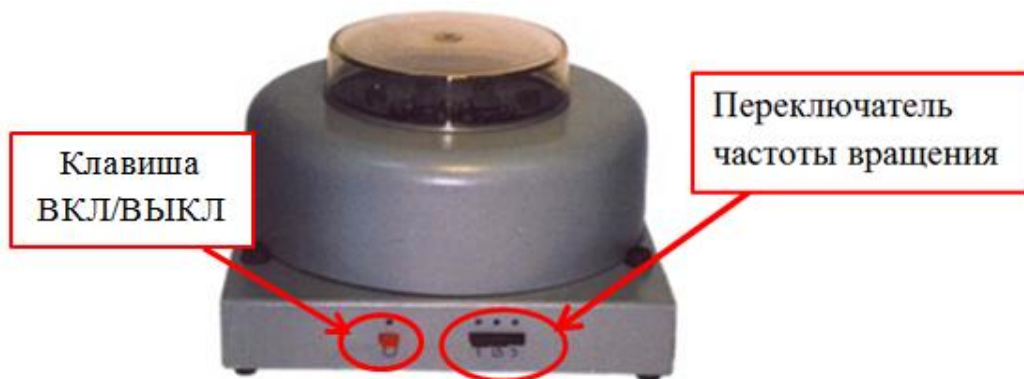


Рисунок 22 - Центрифуга с переключателем частоты вращения

- По истечении требуемого времени центрифугирования выключить центрифугу нажатием на клавишу (рис. 22).
- После полной остановки пробиркодержателя снимите крышку и извлеките пробирки [18].

3. *Рабочий раствор.* Заполните колбу дистиллированной водой наполовину, добавьте содержимое флаконов (рис. 23). Долейте воду. Условия хранения: в темном месте, при температуре +2–8°C, в плотно укупоренной посуде, не более 1 месяца.

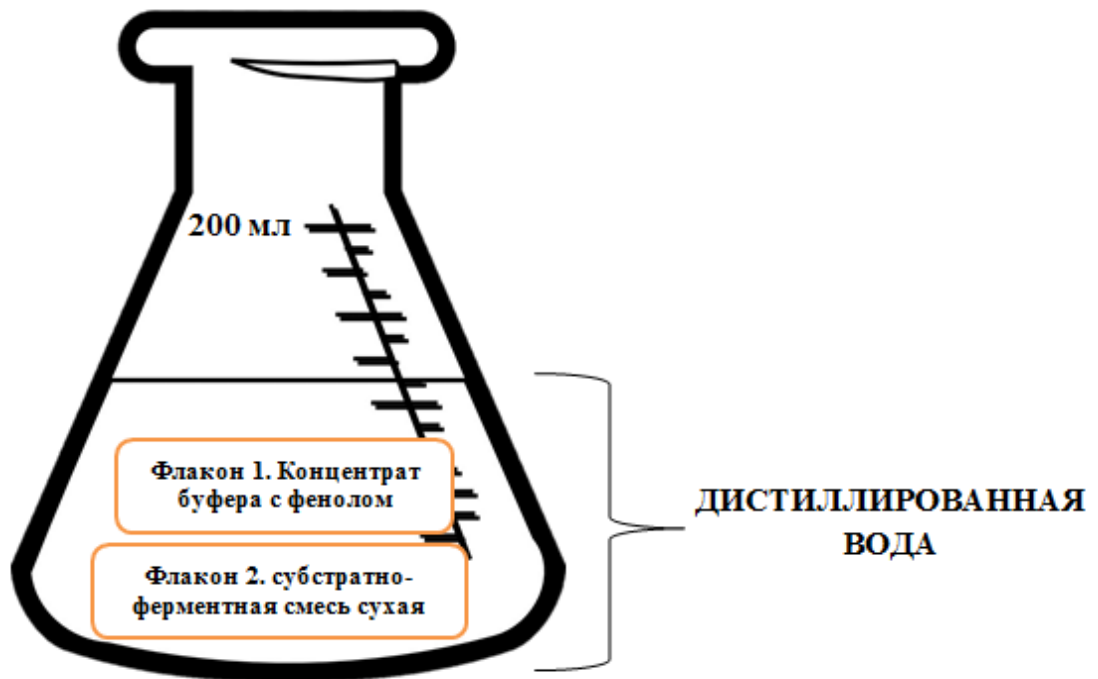


Рисунок 23 - Состав рабочего раствора

Калибровочный раствор глюкозы готов к применению [13].

4. Трансформирующий раствор. Состав (рис. 24):

10 мл	Реагент 1. Калий железосинеродистый, натрий двууглекислый	0,5 мл	Реагент 1. Ацетонциангидрин
Дистиллированная вода (около 990 мл)			

Рисунок 24 - Состав трансформирующего раствора

Храните раствор в посуде темного цвета при 2-25°C, не более 3 месяцев.

5. Набор реактивов «КлиниТест-ГемЦ» - для определения показателя гемоглобина в крови с помощью гемиглобинцианидного метода.

6. Набор реагентов «Глюкоза-АГАТ». Глюкоза определяется глюкозооксидазным методом. Набор предназначен для количественного и качественного колориметрического определения концентрации глюкозы в сыворотке и плазме крови, цельной крови и моче в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

3.3. Лабораторные работы, апробированные на базе

КГПУ им. В.П. Астафьева

Лабораторная работа №1

Исследование тканевого энергообмена бесхвостых амфибий

Оценка тканевого энергообмена производится в печени, мозге и мышцах по скорости потребления O_2 , *in vitro* при $37^\circ C$ с помощью потенциометрического датчика. Подготовка объектов исследования описаны в лабораторных работах №3-5. Эти ткани вносят наибольший вклад в энергообмен и, следовательно, общую облигатную теплопродукцию животного.

Оборудование: кислородомер, кислородный датчик, весы, термостат, магнитная мешалка, градусник, чашка Петри, пинцет, ножницы, пипетки-дозаторы, кребс-рингер-фосфатный буфер.

Цель работы: исследовать тканевой энергообмен у бесхвостых амфибий.

Ход работы

1. Включите кислородомер и термостат за 15-20 минут до начала работы. Подготовьте приборы к работе;
2. Проверьте калибровку датчика. Не забывайте, что при калибровке магнитная мешалка должна быть включенной.
3. Промойте ячейку от раствора Na_2SO_3 и подготовить к работе: заполните ее используемым для дыхания Кребс-Рингер-Фосфатным буфером с 4% бычьим сывороточным альбумином, опустить в ячейку датчик;
4. Быстро достаньте исследуемую ткань, взвесьте кусочки примерно 50-60 мг. Тщательно измельчите кусочки тканей на фрагменты (1-2 мм) помощью глазных ножниц в чашке Петри.
5. Включите кислородомер, магнитную мешалку, самописец. Прописать в течение нескольких секунд буферный раствор, затем с помощью

пипетки с обрезанным широким носиком внесите суспензию фрагментов ткани в ячейку (рис.25).

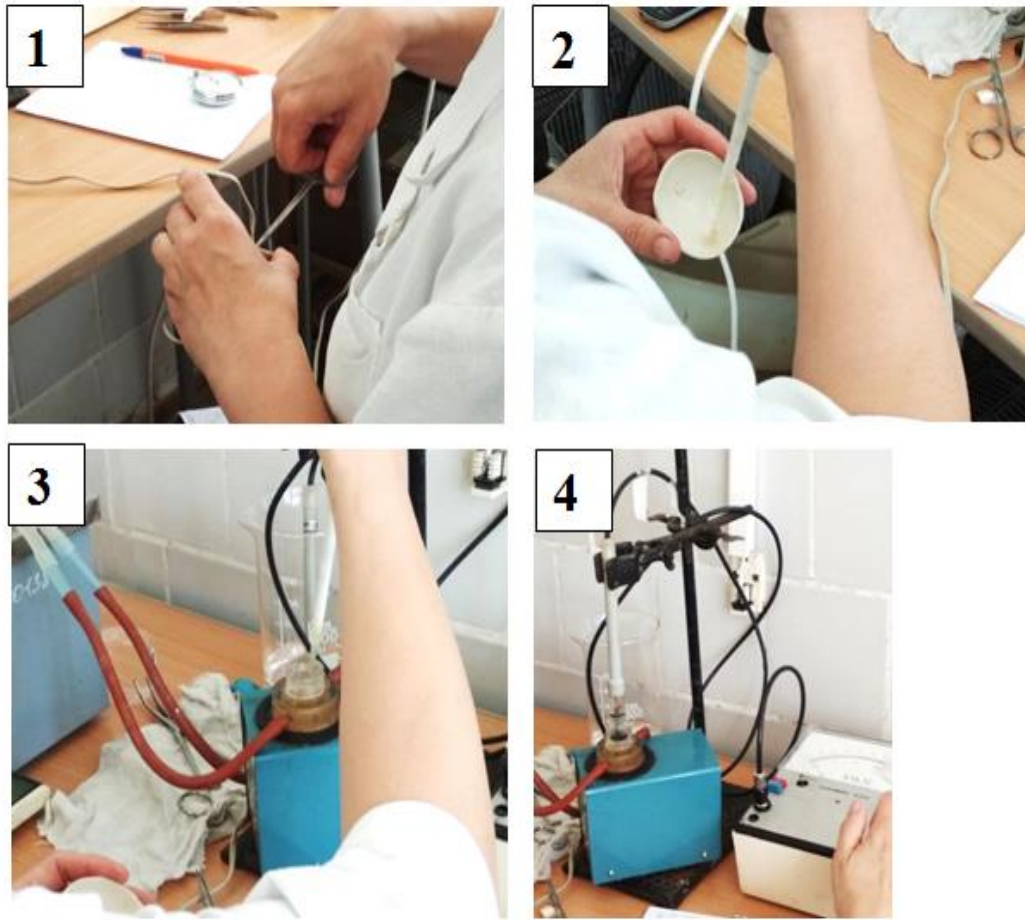


Рисунок 25 - Помещение фрагментов ткани в ячейку

6. Если самописец отсутствует, регистрируйте вручную через каждые 30 секунд показания на дисплее в течение 3-4 минуты. Рассчитайте среднее значение.

7. Пересчитайте среднее значение в нмоль/мин*мг. Для этого надо учесть, что при 37°C и нормальном атмосферном давлении равновесная концентрация кислорода при насыщении воды атмосферным воздухом составляет 6,89 мг/л.

8. Выключите регистрацию, промойте ячейку.

9. Сравните результаты с показателями предыдущих исследований, сделайте вывод.

Лабораторная работа №2

Определение уровня гемоглобина в крови лягушки

Показатель гемоглобина в крови амфибий можно измерить с помощью гемиглобинцианидного метода с набором реактивов «Клини Тест-ГемЦ». В состав наборов входят ядовитые вещества. Необходимо соблюдение правил техники безопасности.

Оборудование: набор реактивов «Клини Тест-ГемЦ», трансформирующий раствор, спектрофотометр, пробирки, пипетки-дозаторы.

Цель работы: определить уровень гемоглобина в крови лягушки.

Ход работы

1. В пробирки внесите по 5 мл трансформирующего раствора и по 0,02 мл крови, тщательно перемешайте (опытная проба);

2. В одну из пробирок внесите 5 мл трансформирующего раствора и 0,02 калибровочного раствора гемоглобина, тщательно перемешайте (калибровочная проба);

3. Оставьте пробирки при комнатной температуре на 10-15 минут;

4. Снимите показания спектрофотометра.

5. Рассчитайте концентрацию гемоглобина в крови по формуле:

$C = E_o / E_K * 120$ C - концентрация гемоглобина в опытной пробе, г/л;

E_o – оптическая плотность опытной пробы;

E_K – оптическая плотность калибровочной пробы;

120 – концентрация гемоглобина в калибровочном растворе г/л.

6. Сравните результаты с показателями предыдущих исследований, сделайте вывод [9].

Лабораторная работа №3

Измерение уровня глюкозы в крови лягушки

Глюкоза - это энергетическое топливо для клеток организма. Глюкоза поступает в организм из потребляемой пищи, в частности, из той, которая содержит углеводы. Для того, чтобы выявить возможные отклонения показателя глюкозы в крови от нормы, необходимо провести анализ [5].

Оборудование: спектрофотометр, пипеточные дозаторы для отбора объемов 0,01 мл и 1,0 мл, секундомер, колбы мерные, пробирки центрифужные, термостат, центрифуга лабораторная на 3000 об/мин.

Цель работы: измерить уровень глюкозы в крови лягушки.

Ход работы:

1. Определение глюкозы в плазме крови. Внесите компоненты реакционной смеси в пробирки.
2. Содержимое пробирок тщательно перемешать и инкубировать 15 минут при 37°C и 30 минут при комнатной температуре (+18-25°C).
3. Через 5-10 минут с момента начала инкубации интенсивно встряхните пробирки.
4. После окончания инкубации измерьте величину оптической плотности калибровочной и опытных проб против контрольной (холостой) пробы.

5. *Концентрацию глюкозы рассчитайте по формуле:*

$C = E_0 / EK * 10$ **C** - концентрация глюкозы в опытной пробе, ммоль/л;

E_0 – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

EK – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

10 – концентрация глюкозы в калибровочном растворе, ммоль/л.

6. Сравните результаты с показателями предыдущих исследований, сделайте вывод [13].

Выводы

1. Законы об образовании Красноярского края (статья 9,13) показывают необходимость совершенствования программ и методов работы с одаренными учащимися. Для повышения качества образования педагогические работники регулярно проходят курсы повышения квалификации, совершенствуют процесс обучения, что не может не отразиться на уровне знания обучающихся и как следствие этого, усиливается познавательный интерес и заинтересованность предметом у одаренных детей, которых объединяют в НОУ.

2. В работе представлены физиологические темы («Исследование тканевого энергообмена бесхвостых амфибий»; «Определение уровня гемоглобина в крови лягушки»; «Измерение уровня глюкозы в крови лягушки») и методы их исследования (забор крови путем декапитации, гемоглобин - гемиглобинцианидным методом, глюкоза – глюкозооксидазным, тканевой энергообмен – потенциометрическим).

3. Разработано практическое руководство на тему: «Сравнительная физиология классов: амфибии и млекопитающие» для научного общества учащихся, которое состоит из трех частей. Первая часть посвящена подготовке к лабораторным исследованиям, которая включает изучение правила техники безопасности. Вторая часть содержит одну лабораторную работу на определение соматометрических показателей амфибий. Третья часть объединяет лабораторные работы по физиологии животных. Каждая тема разбита на две лабораторные работы: подготовка приборов и растворов к исследованию, процесс исследования. Данное пособие предназначено для самостоятельной работы обучающихся при выполнении научно-исследовательской работы в физиологической лаборатории.

4. По результатам апробации лабораторных работ («Измерение уровня гемоглобина в крови лягушки», «Измерение уровня глюкозы в крови лягушки» «Исследование тканевого энергообмена амфибий») установлено, что

полученные биохимические показатели крови (гемоглобин (г/л) - min 66,45; max 94,2; глюкоза (мМоль/л) - min 0,92; max 1,57) согласуются с литературными данными (65-85 г/л; 1-4 мМоль/л, соответственно).

Интенсивность энергообмена головного мозга остромордой лягушки и серой жабы (min 0,44; max 0,63 нмоль/мин*мг) не отличались от соответствующих показателей лабораторных мышей (min 0,38; max 0,64 нмоль/мин*мг). Энергообмен печени у остромордой и озерной лягушки (0,4 нмоль/мин*мг) интенсивнее, чем у серой жабы (0,25 нмоль/мин*мг).

Список использованных источников

1. Баранов А.С, Городилова С. Н. Земноводные лесостепи Средней Сибири. Краснояр. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева. Красноярск, 2015. 193с.
2. Вершинин В.Л., Вершинина С.Д. Сравнительный анализ содержания гемоглобина у четырех видов бесхвостых амфибий Уральской горной страны // Доклады академии наук. 2013. № 450. С. 1-4.
3. Весы лабораторные: руководство по эксплуатации. СПб.: Министерство промышленности, науки и технологий РФ, 2004. 10 с.
4. Елсукова Е.И. Руководство к лабораторно-практическим занятиям по физиологии человека и животных. Красноярск: Краснояр. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева. Красноярск, 2015. 151 с.
5. Жигальский О.А., Дзуев Р.И., Барагунова Е.А. Большой лабораторный практикум. Нальчик: Каб.-Балк. ун.-т, 2002. 112 с.
6. Зеликман А.Л. Практикум по зоологии беспозвоночных. 2 изд. М.: Высшая школа, 1969. 335 с.
7. Кислородный датчик №5972: инструкция по применению. Центр вычислительных систем автоматики и измерений «МЭРА – ЭЛЬВРО». 19 с.
8. Литвин О.О., Ястребов С.А. Сравнительная физиология. Дыхание и кровообращение позвоночных. 2-е изд. М.: МАКС Пресс, 2000. 63 с.
9. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987. 368 с.
10. Мешалка магнитная ММ-5. Паспорт. Ужгород: Закарпатский библиотекографиздат, 1985. 9 с.
11. Петрухина А.И. Устав ученического научного общества // «Классный руководитель», № 8, 2005. С.51-52.
12. Плющ И.В. Краевое научное общество учащихся // Компетентностный подход в учебно-исследовательской деятельности учащихся. 2004. С. 66-77.

13. Смирнов И.В. Глюкоза-АГАТ: инструкция по применению набора реагентов для определения глюкозы в биологических жидкостях глюкозооксидазным методом. М.: ООО «Агат-Мед», 2000. 1 с.
14. Спектрофотометр: руководство по эксплуатации. СПб.: ООО «ПроЭкоЛаб», 2011. 36 с.
15. Тятенкова Н. Н., Невзорова М. Н. Основы физиологии человека и животных. Ярославль: ЯрГУ, 2012. 56 с.
16. Универсальный кислородомер тип № 5221: инструкция по обслуживанию. Центр компьютерных систем автоматики и измерений «МЭРА – ЭЛЬВРО», 20 с.
17. Учебно-исследовательская деятельность как инструмент становления и развития личности: краевой научно-методический семинар "Наука в школе", 22-23 октября 2003 г. : сборник материалов // Гл. упр. образования Адм. Краснояр. края, Краев. дворец пион. и школьн., Краснояр. регион. дет.-молодеж. обществ. орг-ция "Научное общество учащихся". Красноярск, 2003. С. 21-23.
18. Центрифуга лабораторная клиническая ОПн-3.01. «ДАСТАН», 1983. 21 с.
19. Циркуляционные термостаты серии LIOP LT-100: руководство по эксплуатации. СПб.: ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», 2008. 23 с.
20. Шаханова А.В., Челышкова Т.В. Лабораторный практикум по физиологии человека и животных: учебнометодическое пособие для студентов высших учебных заведений. Майкоп: АГУ, 2010. 109 с.
21. Bennett A., Ruben J. Endothermy and activity in vertebrates // Science, 1979. Vol. 206. pp. 649–654.
22. Elsukova E.I., Medvedev L.N., Mizonova O.V. Physiological Features of Perigonadal Adipose Tissue Containing Uncoupling Protein UCP1 in ICR mice. // Bull. Exp. Biol. Med., 2016. Vol. 161. pp. 347-350.

23. Hochachka P., Somero G. Biochemical Adaptation. Mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, 2002. 480 p.
24. Jastroch M., Buckingham J., Helwig M., Brand M. Functional characterisation of UCP1 in the common carp: Uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain // *Journal of Comparative Physiology B.*, 2007. Vol. 177. pp. 743-752.
25. Klingenspor M., Fromme T., Hughes D., Manzke L., Polymeropoulos E., Riemann T., Trzcionka M., Jastroch M. An ancient look at UCP1 // *Biochimica et biophysica Acta*, 2008. Vol. 1777. pp. 637-641.
26. Trzcionka M., Withers K. W., Klingenspor M., Jastroch M. The effects of fasting and cold exposure on metabolic rate and mitochondrial proton leak in liver and skeletal muscle of an amphibian, the cane toad *Bufo* // *J. Exp. Biol.*, 2008. pp. 1911-1918.
27. Закон Красноярского края "Об образовании в Красноярском крае" [Электронный ресурс] // Красноярский край: официальный интернет-портал правовой информации. Красноярск, 2014. URL: <http://www.zakon.krskstate.ru/0/doc/19388> (дата обращения: 27.03.2019).
28. Научное общество учащихся [Электронный ресурс] // Иностранные языки. URL: <http://englishschoolsite.ru/stati/nauchnoe-obschestvo-uchaschikhsya> (дата обращения: 05.04.2019).
29. Приказ «О создании научного общества учащихся» [Электронный ресурс] // МБОУ «СОШ №3». Нефтеюганск. URL: <http://sosh3ugansk.ru> (дата обращения: 01.04.2019).
30. Специализированные классы [Электронный ресурс] // Образование Красноярского края. Красноярск. URL: www.krao.ru/rb_topic1028.html (дата обращения: 27.03.2019).
31. Физиология целостного организма. Уровни и формы адаптаций [Электронный ресурс] // Уральский федеральный университет: каталог

образовательных ресурсов. URL: <http://media.ls.urfu.ru/527/1413/3297> (дата обращения: 13.03.2019)

32. Энергетический обмен в нервной ткани. Возбудимость клеток [Электронный ресурс] // Dommedika - современная медицина. URL: <https://dommedika.com/physiology/1207.html> (дата обращения: 03.05.2019).

ПРИЛОЖЕНИЕ



Рисунок 26 – Сертификат за участие в VII Международном научно-образовательном форуме «Человек, семья и общество: история и перспективы развития»



Рисунок 27 – Диплом за лучшее оформление научного доклада



Рисунок 28 – Сертификат за участие в XX Международном научно-практическом форуме студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века»

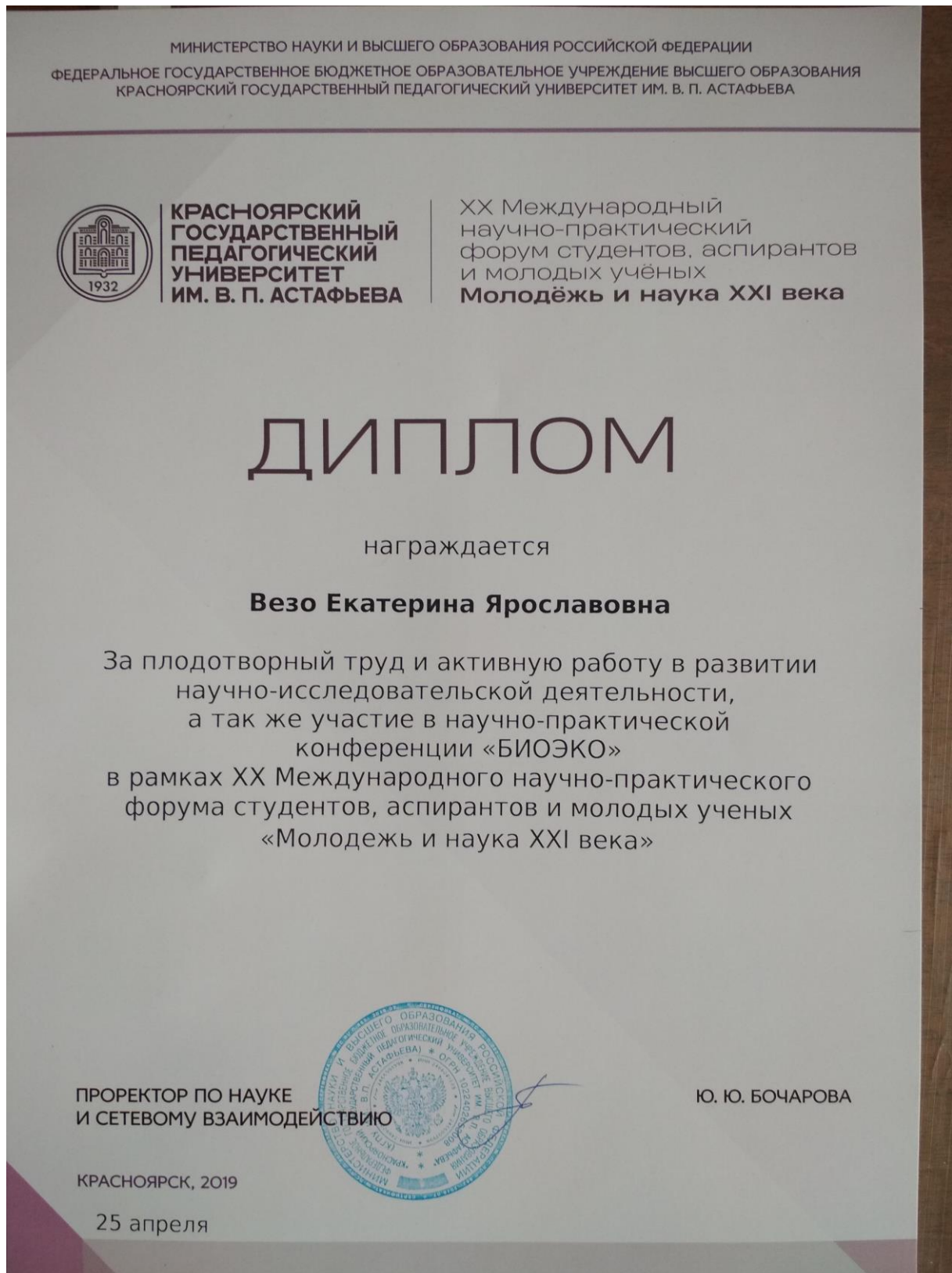


Рисунок 29 - Диплом за плодотворный труд в развитии научно-исследовательской деятельности



Рисунок 30 – Взвешивание ткани печени лягушки
для исследования тканевого энергообмена



Рисунок 31 – Калибровка кислородного датчика