

Міністерство освіти і науки України  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

**БІОХІМІЯ**  
**(загальний курс)**

**Практикум**

Харків – 2025

УДК 577.1(076)  
Б 63

**Рецензенти:**

**Сергій Шерстюк** – д. мед. наук, професор, завідувач кафедри нормальної анатомії та фізіології людини ХНУ імені В. Н. Каразіна;

**Олена Бабаєва** – к. мед. наук, доцент кафедри клінічної лабораторної діагностики та судово-медичної токсикології Науково-навчального інституту післядипломної освіти Харківського національного медичного університету.

*Затверджено до друку рішенням Вченої ради  
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна  
(протокол № 8 від 28 березня 2025 року)*

**Біохімія** (загальний курс) Практикум : / К. В. Седова, С. М. Охріменко,  
Б 63 М. В. Князева. – Харків : Видавничий дім Харківського національного університету,  
2025. – 96 с.

Вказівки містять основні дані про структуру, властивості та шляхи обміну біомолекул, принципи методів досліджень біомолекул та метаболітів, а також пояснення до виконання лабораторних робіт, контрольні питання. Вказівки призначені для активізації самостійної підготовки студентів до занять, конкретизації знань, що отримуються при вивченні теоретичної частини загального курсу біохімії.

The instructions contain basic data on the structure, properties and pathways of metabolism of biomolecules, principles of methods for studying biomolecules and metabolites, explanations for laboratory work, control questions. The instructions are intended to activate the independent preparation of students for classes, to concretize the knowledge obtained during the study of the theoretical part of the general course of biochemistry.

**УДК 577.1(076)**

© Харківський національний університет  
імені В. Н. Каразіна, 2025

© Седова К. В., Охріменко С. М.,  
Князева М. В., 2025

## ВСТУП



На сучасному рівні розвитку медицини біохімія набуває все більш важливого практичного значення. Це пов'язано як зі зростанням обсягу накопиченої наукової інформації, так і з удосконаленням технічної та методичної бази клінічних біохімічних лабораторій. Клінічна біохімія, як і інші клінічні методи обстеження хворих, використовується в складному процесі постановки лікарем діагнозу захворювання. Результати аналізів біохімічних показників у динаміці можуть свідчити про розвиток патологічного процесу на молекулярному, клітинному, органному рівні. Біохімічні дослідження необхідні для своєчасного і правильного моніторингу стану пацієнта та оцінки ступеня ефективності терапії, що проводилась.

Чинні методичні вказівки складені відповідно до типової програми з біохімії для студентів медичних вузів і містять як традиційні, так і нові уніфіковані методи біохімічних досліджень, необхідні для роботи сучасних клініко-діагностичних лабораторій.

**Мета лабораторного практикуму із загального курсу біологічної хімії** – ознайомлення здобувачів вищої освіти із задачами і методами роботи в біохімічній лабораторії; засвоєння принципів якісного і кількісного біохімічного аналізу; конкретизація знань про структуру, властивості і метаболізм основних класів біомолекул; вивчення біохімічних механізмів виникнення патологій, принципів їхньої діагностики і моніторингу. Підведення підсумків виконаних робіт спрямоване на формування навичок студентів правильно інтерпретувати результати біохімічного аналізу.

# ПРАВИЛА РОБОТИ В БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ



Робота в лабораторії вимагає суворого дотримання правил техніки безпеки, порушення яких може бути причиною нещасних випадків.

До роботи допускаються студенти, які пройшли інструктаж з техніки безпеки і розписалися в журналі з техніки безпеки.

Робота в хімічній лабораторії проводиться в спецодязі з використанням індивідуальних засобів захисту відповідно до норм: халат із бавовни, застібається спереду (у випадку необхідності його легко скинути), тонкі гумові рукавички (при роботі з концентрованими розчинами). Без спеціального одягу студенти не допускаються до виконання лабораторної роботи.

## **На лабораторному практикумі забороняється:**

- палити, галасувати, приймати їжу, використовувати для питної води і харчових продуктів хімічний посуд;
- нюхати і пробувати на смак реактиви, набирати ротом в піпетку розчини реактивів, брати реактиви руками; використовувати реактиви і проводити операції, не передбачені методичними вказівками до лабораторної роботи;
- переносити на лабораторні столи посуд з концентрованими розчинами, які знаходяться у витяжній шафі;
- самостійно включати будь-яке обладнання, запалювати газові пальниці, шукати в шафах реактиви;
- залишати відкритими банки з летючими реактивами, підносити їх до відкритого вогню;
- нагрівати пробірки без пробіркоутримувачів, охолоджувати розпечені пробірки або інший посуд під струменем холодної води;
- користуватися тріснутим і побитим хімічним посудом.

## **Вимоги щодо безпеки при роботі в лабораторії:**

- розлиті на столах і підлозі кислоти та луги, одяг, на який потрапила кислота або луг, нейтралізувати: у випадку кислоти – 2 % розчином соди, у випадку лугу – 2 % розчином оцтової кислоти – і далі промити водою. Великі об'єми розлитих реактивів засипати піском, нейтралізувати, а потім змити водою;
- при розбавленні концентрованих кислот (особливо сірчаної) водою виділяється велика кількість тепла, тому слід наливати кислоту у воду або міцну кислоту в слабку, обережно перемішуючи. Розбавлення проводити тільки в термостійкому посуді;

- у разі наявності запаху газу не включати освітлення та електроприлади до усунення витoku газу і повного провітрювання приміщення;
- слідкувати за збереженням чистоти реактивів, не плутати пробки від банок з реактивами, не діставати реактив із банки брудним шпателем;
- при центрифугуванні точно урівноважені центрифужні пробірки встановити одну проти одної в спеціальні гнізда, після чого закрити кришку центрифуги. Забороняється включати центрифугу без дозволу викладача;
- усі роботи з летючими, отруйними і легкозаймистими речовинами (аміак, бром, діетиловий ефір, хлороформ, льодова оцтова кислота, концентровані кислоти тощо) виконувати у витяжній шафі.

Після виконання лабораторної роботи черговий повинен навести порядок у лабораторії і вимити використаний посуд.

### **Надання першої допомоги**

При роботі в хімічній лабораторії можуть бути випадки порізу рук склом, термічні і хімічні опіки, а також інгаляційні ураження парами токсичних речовин. Долікарська допомога має бути надана постраждалому колегами.

При порізах рук склом насамперед необхідно пінцетом, промитим спиртом, видалити з рани уламки скла, промити 2 % розчином перманганату калію, змазати 5 % розчином йоду і забинтувати.

При термічних опіках спочатку зробити примочки з 2 % розчину перманганату калію або етилового спирту (96 %), потім змастити обпечену ділянку маззю проти опіків і накласти пов'язку.

При хімічних опіках необхідно насамперед видалити речовину, яка спричинила опік, і обробити уражену ділянку нейтралізуючим розчином. Якщо на шкіру потрапила кислота, то після змивання сильним струменем води (при слабкому струмені води може бути термічний опік) уражену ділянку протягом 10 хвилин промивати 3 % розчином питної соди (чайна ложка на склянку води). При опіці лугом уражену ділянку рясно промити водою, потім 2 % розчином борної або оцтової кислоти.

При потраплянні на шкіру агресивних органічних речовин (фенолу тощо) уражену ділянку швидко промити етиловим спиртом (96 %), а потім змастити маззю проти опіків.

При хімічних опіках очей до звернення в медпункт промити постраждалому очі великою кількістю води, потім 2 % розчином питної соди (при потраплянні кислоти) або 2 % розчином борної кислоти (при потраплянні лугу). Ці розчини мають бути в лабораторній аптечці.

При інгаляційних ураженнях постраждалого негайно вивести на свіже повітря.

Надзвичайно небезпечним для організму є вдихання парів бромю. Крім того, він спричинює сильні опіки шкіри. При роботі з бромом необхідно для нейтралізації мати поруч 5 % розчин бісульфату натрію.

Для запобігання небезпеки отруєння категорично забороняється працювати з отруйними летючими і газоподібними речовинами на лабораторних столах; працювати з ними можна тільки у витяжних шафах при включеній вентиляції.

**При ураженні електричним струмом**, якщо постраждалий залишається в контактi з джерелом струму, необхідно негайно виключити електрику. До постраждалого, який перебуває під напругою, не торкатися незахищеними (без гумових рукавичок) руками. Якщо постраждалий втратив свідомість, після відключення струму негайно, не чекаючи прибуття лікаря, зробити штучне дихання.

### **Пожеженебезпека і засоби пожежогасіння**

У випадку займання горючих рідин або інших речовин слід швидко загасити пальницю, вимкнути електронагрівальні прилади, прибрати посуд з вогненебезпечними речовинами і вдатись до заходів гасіння пожежі. Рідини, які горять, потрібно накрити азбестовою ковдрою, а потім, якщо це необхідно, засипати піском.

Вода може бути засобом вогнегасіння при займаннях рідин, що змішані з нею.

Воду не можна застосовувати при гасінні горючих рідин, які з нею не змішуються (наприклад, бензол, ефір тощо). Горіння при цьому може посилитися.

Водою не можна гасити електроприлади та електропроводку, які перебувають під напругою.

У жодному разі не можна гасити водою речовини, здатні вступати з нею в хімічну реакцію (лужні метали, гідриди металів, карбід кальцію та ін.), тому що це може спричинити вибух.

Для гасіння пожежі в хімічних лабораторіях використовують ручні вогнегасники: пінні (ОП-6, ОП-М) та вуглекислотні.

# МАТЕРІАЛИ ДЛЯ ДІАГНОСТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. ПРИНЦИПИ ЗАБОРУ МАТЕРІАЛУ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ



Метою лабораторних досліджень є оцінка функціонального стану органів. З урахуванням обмежених можливостей безпосереднього дослідження органів їхня оцінка зазвичай проводиться через біохімічні показники в доступному для забору біологічному матеріалі.

У лабораторних біохімічних дослідженнях використовують кров, сечу, кал, спинномозкову рідину, шлунковий і дуоденальний вміст, відфільтровані рідини (екссудати, трансудати), піт, слину, абіотичну рідину та ін.

Одержані під час звичайних досліджень показники свідчать про стан організму на момент забору матеріалу. Додаткову інформацію дають спостереження біохімічних змін з плином часу, наприклад, добові зміни вмісту глюкози. Дуже корисні також функціональні дослідження (в умовах певних навантажень).

Одержання біологічного матеріалу для дослідження складається з декількох основних етапів:

## **1. Стандартна підготовка хворого**

Найчастіше забір матеріалу проводять у хворого натщесерце (не споживає їжу протягом 12 годин) з 6.00 до 8.00.

## **2. Забір крові для лабораторних досліджень**

Кров беруть у сидячому положенні. Тільки у важкохворих забір крові проводиться лежачи.

*Венозна кров.* Більшість лабораторних досліджень роблять у венозній крові.

Під час забору крові необхідно продезінфікувати місце забору; тривалість забору має бути короткою і стійкою, наприклад, 30–60 с; голка має бути відповідної товщини, гострою і сухою; не можна забирати кров під час крапельного вливання або відразу після нього.

*Артеріальна кров.* Використовують її в лабораторних дослідженнях для оцінки параметрів кислотно-лужного стану, напруги кисню ( $pO_2$ ) та ін. Забір крові необхідно проводити без доступу кисню.

*Капілярна кров.* Це суміш венозно-артеріальної крові, і її можна використовувати замість артеріальної крові під час визначення кислотно-лужного стану і під час забору крові за короткий термін часу (так звана цукрова крива після навантаження глюкозою). Капілярну кров можна забирати з пальця, вушної раковини, у немовлят – з п'яток або великого пальця стопи.

## **3. Правила лабораторних досліджень**

*Правила дослідження крові в лабораторії.* Кров після забору має швидко надійти до лабораторії. Цільну кров не можна зберігати довше,

ніж 3–4 години. Не можна охолоджувати кров, якщо необхідно виділити сироватку або плазму, тому що охолодження впливає на співвідношення показників концентрації між складовими частинами плазми та еритроцитів і підсилює гемоліз.

*Правила дослідження сироватки в лабораторії.* Сироватку одержують шляхом центрифугування крові, що згорнулася. Цей процес можна прискорити, залишивши кров на декілька хвилин при температурі 37 °С. Після відділення сироватки від згустку її необхідно швидко дослідити, тому що тривале зберігання призводить до зміни складу сироватки.

Ферменти, порівняно з іншими компонентами крові, характеризуються набагато меншою стабільністю при зберіганні. Деякі з них не можуть зберігатися при температурі, нижчої за 0 °С, через руйнування їхньої структури.

Необхідно пам'ятати, що, незалежно від виду досліджень, розморожену сироватку не можна повторно заморожувати.

*Особливості лабораторного дослідження цільної крові й плазми.* Цільну кров використовують для морфологічних досліджень, аналізу кислотно-лужного стану та визначення вмісту сполук, які необхідно відразу дослідити (аміак, молочна кислота), з урахуванням процесів, що швидко відбуваються в крові. Цільну кров також можна використовувати для визначення вмісту низькомолекулярних речовин, концентрація яких у формених елементах наближається до їхньої концентрації в плазмі (глюкоза).

Водночас у дослідженнях системи гемостазу або при небезпеці виходу досліджуваних речовин з еритроцитів у сироватку (іони калію, натрію, амінотрансферази) можна скористатися плазмою.

*Антикоагулянти та їхнє застосування.* Використання цільної крові для лабораторних досліджень, а також отримання плазми пов'язані з необхідністю застосування антикоагулянтів.

До основних антикоагулянтів, які використовуються в лабораторній практиці, належать: гепарин, оксалати, цитрати та фториди. Найчастіше в біохімічних дослідженнях використовують гепарин. Гепарин гальмує тромбінову систему, що призводить до усунення кальцію шляхом преципітації або деіонізації. 0,1–0,2 мг гепарину перешкоджає коагуляції 1 мл крові. Найбільш вигідним є використання амонієвої солі гепарину, оскільки іон амонію не заважає визначенню вмісту найбільш важливих катіонів. Гепарин можна використовувати під час забору крові для визначення активності ферментів, оскільки він єдиний антикоагулянт, який не гальмує активність ферментів, окрім кислої фосфатази. Гепарин широко використовують під час визначення параметрів кислотно-лужного стану та для аналізу метаболітів крові.

Гепарин не можна використовувати для морфологічних досліджень, оскільки він впливає на забарвлення мазків і спричинює злипання лейкоцитів.

Для цитологічних досліджень використовують двонатрієві або двокалієві сполуки, які застосовуються в розведенні 1–2 мг на 1 мл крові. З урахуванням властивостей хелатування їх не можна застосовувати під час визначення електролітів, церулоплазміну та ферментів.

Для дослідження коагулянтної системи крові або визначення швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ) використовують цитрати. Кров додають до водного розчину цитрату в співвідношенні 4 : 1 (один об'єм 38 % цитрату на 4 об'єми крові). Рідко застосовують оксалати чи фториди.

*Забір сечі для лабораторних досліджень.* Залежно від виду досліджень забір сечі можна проводити одноразово або цілодобово. Кожен забір сечі має відбуватись у стерильних умовах.

*Одноразовий забір сечі* – це забір середньої порції в період першого ранкового сечовипускання. Протягом 2 годин з моменту забору сеча має надійти до лабораторії.

*Добовий забір сечі* починають з моменту другого сечовипускання, а закінчують після першого сечовипускання наступного дня. Сечу після забору добре перемішують і передають до лабораторії. Зібрана для дослідження сеча потребує консервації. Після декількох годин стояння сеча зазнає вилуговування через розкладання сечовини з утворенням аміаку, що набагато збільшує можливість бактеріального зараження і спричинює розкладання лейкоцитів. Сечу зберігають шляхом охолодження до +4 °С або застосовують консервуючі речовини (тимол, толуол, оцтову кислоту, формальдегід, хлороформ).

Сеча для дослідження ферментів не має містити консервантів. Її необхідно охолодити або заморозити.

#### **4. Помилки при проведенні лабораторних досліджень**

Під час лабораторних досліджень можливі помилки. Кінцевий результат кожного визначення складається з дійсних величин і певної помилки дослідження, яка є його складовою частиною. Оцінка достовірності результату та його клінічна оцінка потребують знання різновидів помилок, які можуть виникати при дослідженні. Помилки клінічних досліджень можна класифікувати наступним чином:

- помилка, що передуює дослідженню;
- аналітична помилка (лабораторна);
- помилка інтерпретації.

**1. Помилка перед проведенням дослідження.** Ця помилка охоплює групу факторів, які пов'язані з підготовкою хворого до обстеження, із забором і зберіганням матеріалу до початку аналізу.

Фактори, які призводять до помилки перед проведенням дослідження:

- при підготовці пацієнта до дослідження: нестандартний час доби, неврахована дієта або прийом ліків тощо;

- при заборі матеріалу: недостатня асептика, неправильно підготовлений посуд для матеріалу, гемоліз крові тощо;
- при зберіганні матеріалу: час, температура, стерильність, необхідність роздільного зберігання різних зразків.

**2. Аналітична (лабораторна) помилка.** Ця помилка пов'язана з ходом дослідження біологічного матеріалу в лабораторії. Виокремлюють декілька видів такої помилки.

*Систематична помилка (точність)* демонструє різницю між одержаною і дійсною величинами. Джерелом систематичної помилки є особливості методу або способи його реалізації.

У процесі лабораторних досліджень виявляють постійно повторювану неточність. Вона може бути пов'язана з кожним етапом процесу (виробництво ідентифікаторів, приготування і визначення стандарту) або з лабораторним обладнанням.

Прикладом систематичної помилки методу може бути визначення концентрації глюкози методами, що базуються на властивостях редукування глюкози. Інші присутні в крові речовини, які мають властивості редукування, також беруть участь у реакції. Через це результат визначення глюкози таким методом буде завищеним.

*Випадкова помилка* характеризує відтворюваність (повторюваність) результатів між паралельними пробами за даних умов.

**3. Помилка інтерпретації результату.** Використання одиничного результату лабораторного аналізу при діагностиці захворювання або моніторингу під час лікування може бути джерелом численних помилок. Наприклад, фізіологічні коливання деяких показників інколи бувають доволі значними і можуть впливати на клінічну інтерпретацію одержаного результату. Ці зміни можуть бути циклічними: годинні, денні, сезонні. У таких випадках необхідне проведення додаткових досліджень.

При інтерпретації результату завжди потрібно враховувати *вплив ліків, які вживає пацієнт*. Існує два основних механізми такого впливу.

Перший механізм полягає у взаємодії ліків або їхніх продуктів з досліджуваним матеріалом і реактивами для аналізу.

Другий механізм полягає у фармакологічній дії ліків на організм пацієнта, що призводить до зміни біохімічних показників, не пов'язаних із хворобою.

Таким чином, кожний етап біохімічного дослідження може бути джерелом помилки. Усунення основних причин помилок допомагає звести їх до мінімуму і дає змогу правильно інтерпретувати результати аналізів, а отже, використовувати одержану інформацію для виявлення, профілактики та лікування захворювань.

# МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ



Біохімічні методи відіграють одну з провідних ролей під час загального медичного обстеження, контролю перебігу захворювань та оцінки ефективності лікування, що проводиться. У медицині використовуються оптичні методи, електрофорез, діаліз та ін.

## Оптичні методи

В основі абсорбційної спектрофотометрії, окремим випадком якої є фотоколориметрія, лежать загальні принципи здатності речовин поглинати енергію світла за законом Бугера – Ламберта – Бера:

$$D = k \times c \times d,$$

де  $D$  – оптична щільність розчину;

$k$  – молярний коефіцієнт поглинання (екстинкція), який дорівнює оптичній щільності 1 М розчину при товщині шару в 10 мм;

$c$  – концентрація розчину, М;

$d$  – товщина шару рідини, см.

Лінійність залежності  $D$  від  $c$  і  $d$  порушується при високих  $D$ . Область лінійності цієї залежності визначається в попередніх експериментах. Зазвичай лінійна залежність оптичної щільності розчину від концентрації досліджуваної речовини зберігається в інтервалі значень від 0,1 до 0,8.

*Спектрофотометрія* – це вимірювання поглинання (пропускання) прозорих розчинів в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній зоні спектра (220–1100 нм).

У фотоколориметрії використовується світло з довжиною хвилі 400–700 нм (видимий спектр).

Вимірювання спектрів здійснюють на спеціальних спектральних апаратах, у яких пробу речовини поміщають між джерелом світла і фотоелементом, що реєструє світло. Кожна речовина має характерний спектр поглинання. З аналітичною метою використовують довжину хвилі, яка відповідає максимуму поглинання досліджуваної сполуки ( $\lambda_{\max}$ ).

До приладів, які вимірюють світлопоглинання речовин, належать фотоелектроколориметри (ФЕК) та спектрофотометри (СФ).

ФЕК дає змогу проводити вимірювання поглинання у видимій частині спектра. Багато сполук, які мають незначне поглинання, вступаючи в реакцію з іншими речовинами, дають забарвлені продукти, кількість яких пропорційна кількості вихідної речовини, а також залежить від температури

і тривалості розвитку забарвлення, тому всі проби мають бути оброблені в однакових умовах. Таким чином проводять кількісне визначення глюкози, фруктози, глікогену, білка, фосфатів та ін.

Вимірювання проводять проти холостої проби (розчинник або розчин, який містить усі компоненти, окрім досліджуваної речовини). Розчини для дослідження мають бути прозорими, без бульбашок повітря, які підсилюють розсіювання світла. Кювети потрібно заповнювати до такого рівня, щоб увесь потік випромінювання проходив через шар розчину. Кювети потребують спеціального догляду. Краплі, подряпини та бруд на їхніх стінках сильно розсіюють і поглинають світло, що призводить до викривлення результатів.

*Способи розрахунку концентрації світлопоглинаючих розчинів:*

- розрахунок концентрації речовин методом порівняння оптичних щільностей стандартного розчину (розчину відомої концентрації) і досліджуваного розчину. Наприклад, стандартний розчин має екстинкцію  $A$  (при відомій концентрації  $C_{\text{станд}}$ ), а екстинкція досліджуваного розчину дорівнює  $B$ . Складаємо пропорцію, з якої знаходимо концентрацію досліджуваного розчину  $X$ :

$$\frac{C_{\text{станд.}} - A}{X - B};$$

- більш точний спосіб – розрахунок концентрації речовин за калібрувальним графіком, який виражає залежність екстинкції від концентрації даної речовини. Для цього зі стандартного розчину готують серію розведень, проводять необхідні для методу хімічні реакції та, вимірявши екстинкцію, будують графік. Знаючи екстинкцію розчину невідомої концентрації, за графіком знаходять концентрацію даного розчину.

## Електрофорез

Явище електрофорезу – це переміщення заряджених частинок в електричному полі.

Поведінка частинки в електричному полі описується трьома основними характеристиками: швидкістю руху частинки  $v$ , електрокінетичним потенціалом  $\xi$  та електрофоретичною рухливістю  $U$ .  $\xi$  – потенціал прямо пропорційний вільному (не скомпенсованому іонами середовища) заряду частинки ( $Q$ ) і зворотно пропорційний її радіусу ( $r$ ). Швидкість зарядженої частинки прямо пропорційна  $\xi$  – потенціалу. Електрофоретична рухливість  $U$  дорівнює співвідношенню швидкості частинки до напруженості електричного поля:

$$\xi = \frac{Q}{r \varepsilon} \quad v = \frac{Q}{r} \frac{E}{6\pi\eta} = \xi \frac{\varepsilon E}{6\pi\eta} \quad U = \frac{Q}{r} \frac{1}{6\pi\eta} = \xi \frac{\varepsilon}{6\pi\eta},$$

де  $E$  – напруженість електричного поля, В/см;

$\varepsilon$  – діелектрична постійна середовища;

$\eta$  – в'язкість середовища.

Найчастіше метод використовують для аналітичних цілей – для розділу суміші заряджених речовин на фракції з наступним якісним і кількісним їх визначенням. Таким способом вдається розділити, наприклад, білки сироватки крові на 5 фракцій: альбумін та 4 фракції глобулінів. Цю задачу часто вирішують у клінічній біохімії, оскільки співвідношення фракцій закономірно змінюється при багатьох патологічних процесах.

Електрофорез поділяється на фронтальний, або вільний (електрофорез у рідкому середовищі), і зональний (електрофорез у підтримуючих середовищах). У якості підтримуючого середовища застосовуються різні інертні пористі природні або синтетичні матеріали: папір, ацетилцелюлоза, крохмаль у вигляді вологих зерен та у вигляді гелю, гель агару або агарози, поліакриламідний синтетичний гель – ПААГ. Задача підтримуючого середовища – стабілізувати рідину, зменшити дифузію, а в низці випадків – створити додатковий механізм розділу. Наприклад, у деяких варіантах метод розділення за електрофоретичною рухливістю можна поєднати з розділенням за молекулярною масою (найкраще це досягається в ПААГ).

Одним з високороздільних різновидів методу є диск-електрофорез (від англійського *discontinuous* – переривчастий, неоднорідний). У цьому методі рух молекул проходить спочатку через великопористий концентруючий гель, де суміш поділу концентрується завдяки руху між двома сортами іонів. Провідні іони (належать сильному електроліту), що рухаються попереду проби, і замикаючі іони (належать слабкому електроліту), що знаходяться позаду проби, створюють різну напруженість поля по обидва боки зони, зайнятої пробю. Унаслідок цього «фронт» проби гальмується, а «тил», навпаки, підганяється. Так досягається ефект концентрування. Потім проба переходить у гель розділу з іншим значенням рН буферного розчину й іншим розміром пор (додатковий механізм розділу). Унаслідок зміни рН (а отже, і ступеня дисоціації слабкого електроліту) іони замикавання випереджають пробу, яка переміщується тепер на тлі іонів замикавання – та опиняється в однорідному за рН дрібнозернистому середовищі. У цьому, другому гелі поділу відбувається звичайний електрофорез. Підвищення дозвільної здатності методу досягається за рахунок того, що перед розділенням проба концентрується у вигляді дуже вузької стартової зони, і таким чином можна розділити навіть речовини, які мало відрізняються одна від одної за властивостями.

## Хроматографія

Хроматографічні методи засновані на динамічному поділі суміші речовин. Загальний принцип хроматографії полягає в тому, що безперервний потік *рухомої* фази, що містить зразок для аналізу, спрямовано проходить через *стаціонарну* фазу, яка, залежно від своєї природи, взаємодіє різним чином з компонентами зразку.

Розподіл речовин між двома фазами, що не змішуються, визначається коефіцієнтом розподілу, який для кожної конкретної речовини в системі з двох фаз при даній температурі є постійним і виражається співвідношенням концентрації речовини в рухомій фазі до її концентрації в стаціонарній фазі. Фази для хроматографічного поділу обирають так, щоб коефіцієнти розподілу компонентів суміші в них були різними.

Залежно від агрегатного стану рухомої фази хроматографічні методи поділяються на *газову* і *рідинну* хроматографію; залежно від геометричної форми стаціонарної фази – на *колонкову* і *площинну* (паперову або тонкошарову).

Залежно від механізму розподілу речовин виділяють наступні види хроматографії:

- адсорбційна хроматографія заснована на різній адсорбованості компонентів суміші, що розділяється, на поверхні поділу фаз. Ці відмінності головним чином пов'язані з відмінностями в дипольних моментах (у полярності) речовин, що розділяються, а також рухомої і нерухомої фаз хроматографічної системи. Так, з полярної фази на неполярному адсорбенті краще адсорбуються неполярні речовини. Прикладом неполярного адсорбенту може бути активоване вугілля, сажа; полярного – окисли металів, гідроокиси, деякі солі, силікагель, полісахариди;

- абсорбційна, або розподільча, хроматографія базується на різній абсорбованості (поглинанні всім об'ємом стаціонарної рідкої фази, розчинення в ній) компонентів суміші, що розділяється. В основі методу лежить співвідношення дипольних моментів речовин, що розділяються, і компонентів хроматографічної системи. Прикладом розподільчої хроматографії може бути поділ амінокислот у системі бутанол – вода або фенол – вода. Стаціонарна полярна фаза – вода – утримується інертним пористим твердим тілом – папером, силікагелем і т. п. Бутанол – неполярна рухома фаза – містить компоненти суміші, яка розділяється, і рухається відносно води, яку утримує тверда пориста підложка;

- хемосорбційні методи засновані на використанні хемосорбції. Найбільш розповсюдженим з них є іонообмінний метод, у якому використовуються відмінності в константах дисоціації речовин-електролітів, що розділяються. Речовини, що розділяються, у вигляді катіонів або аніонів

оборотно обмінюються на катіони або аніони, які містяться в стаціонарній твердій фазі (катіоніті або аніоніті відповідно). Рухома фаза – полярний розчинник (зазвичай буферний або сольовий водний розчин). У якості твердого пористого тіла, яке містить прикріплені до нього іони обміну, слугують природні або синтетичні полімери – іонообмінні смоли (целюлоза, декстрин, агароза, поліакриламід, полістирол);

- гель-хроматографія, або молекулярно-ситова хроматографія, заснована на поділі речовин відповідно до їхніх розмірів (молекулярні маси). У цьому методі використовуються ті ж пористі тіла, що є основою для іонообмінної хроматографії, але без прикріплених до них іоногенних груп. Матеріал стаціонарної фази являє собою сферичні гранули певного розміру, усередині яких є пори. Розмір пор також стандартний і обирається так, щоб забезпечити хорошу розрізнявальну здатність методу. Найбільші молекули не можуть потрапити у внутрішні дрібні пори і пересуваються тільки по проміжкам між гранулами з невеликою швидкістю. Дрібніші молекули рухаються з різними швидкостями, залежно від того, яка частка об'єму внутрішніх пор є досяжною для них відповідно до їхніх розмірів. Найповільніше рухаються найменші молекули;

- афінна хроматографія. Метод заснований на специфічній спорідненості (affinity) деяких біологічно активних речовин одна до одної. Одного з партнерів – аффінант – знерухомлюють (іммобілізують) на твердій пористій підложці, разом з якою він утворює стаціонарну фазу. Другий партнер утримується в рухомій фазі. Афінна хроматографія дозволяє виділити його із суміші будь-якого ступеня складності. Так, при пропусканні через крохмаль було виділено з панкреатичного соку тільки один із його компонентів – фермент амілаза, для якого крохмаль є субстратом. Найбільш розповсюджені пари речовин: фермент та субстрат, фермент та інгібітор, фермент та кофермент, антитіло та антиген, рецептор та сигнальна молекула, транспортний білок та транспортована ним речовина, комплементарні один одному нуклеотиди. Афінна хроматографія широко використовується для очищення антигенів та антитіл, гормонів, рецепторів, транспортних білків, ферментів тощо.

## Метод центрифугування

Поділ і дослідження речовин за допомогою центрифугування засновані на різній швидкості осідання (седиментації) у відцентровому полі частинок, які мають різну щільність, форму або розміри.

Коефіцієнт седиментації залежить від молекулярної маси і форми частинки, а також від щільності і в'язкості середовища виділення, що використовується для визначення молекулярної маси.

Найпростіша задача центрифугування полягає у відокремленні речовин осаду від розчинів як етап виконання аналітичних робіт, наприклад, відокремлення білків від інших органічних сполук після осадження. Підбираючи швидкості центрифугування і певні середовища виділення, можна вибірково осадити різні субклітинні структури: ядра, мітохондрії, лізосоми, рибосоми, ендоплазматичний ретикулум.

### Радіоізотопні методи

Засновані на здатності нестабільних радіоізотопів випускати частинки або електромагнітне випромінювання, які фіксуються спеціальними методами.

Основними перевагами методів із застосуванням радіоізотопних міток є їхня чутливість і можливість вводити мітки в живий організм, що дає змогу досліджувати метаболічні перетворення, механізми і швидкості поглинання та перенесення речовин в інтактному організмі, вік біологічних зразків.

Хворому вводять радіоактивний органотропний ізотоп, який здатний концентруватися в тканинах певного органу. Потім детектор апарату для сканування (він має назву «гама-топограф», або «сканер») переміщується певною траєкторією над об'єктом дослідження і сприймає імпульси від органу, який став джерелом іонізуючого випромінювання. Оскільки інтенсивність випромінювання органу дослідження внаслідок накопичення в ньому радіоактивного ізотопу значно вища, ніж інтенсивність випромінювання оточуючих органів і тканин, то щільність штрихів або точок на ділянці скенограми, яка відповідає цьому органу, значно вища. Таким чином, у процесі дослідження на скенограмі вдається одержати «тінь» органу. При осередковому ураженні паренхіми органу (пухлина, кіста, абсцес та ін.) на скенограмі з'являються вогнища розрідження. Сканування дає змогу визначити зміщення, збільшення чи зменшення розмірів органу, а також зниження його функціональної активності (за дифузним зменшенням щільності скенограми). Сканування застосовується для дослідження структури щитовидної залози, печінки, нирок, інколи – інших органів.

Радіоізотопи використовуються при дослідженні функцій різних органів за швидкістю всмоктування, накопичення в будь-якому органі та виділення з організму радіоактивного ізотопу. Так, при вивченні функції щитовидної залози вивчається динаміка поглинання йодиду натрію щитовидною залозою і визначення концентрації ізотопу, що зв'язує білок, у плазмі крові хворого. Радіоактивні ізотопи також застосовуються для вивчення функції виділення нирок, всмоктування в тонкій кишці та при деяких інших дослідженнях.

# РОЗДІЛ 1

## ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ



### Тема 1.

#### Вступ у біохімію. Біохімічні компоненти клітин

У живих організмів у складі біоорганічних сполук та у вільному стані виявлено більш ніж 40 різних хімічних елементів, серед яких найбільшу кількість складають вуглець (С), кисень (О), водень (Н), азот (N), фосфор (Р), сірка (S). Ці елементи входять до складу біоорганічних сполук живих організмів (біомолекул) і отримали назву біоелементів, або органогенів. Біомолекули утворюють клітинні структури та беруть участь у біохімічних реакціях.

#### Основні класи біомолекул

*Амінокислоти та білки.* Білки – інформативні біополімери, які складаються мінімум з 20 видів L-амінокислот, з'єднаних пептидними зв'язками. Білки виконують різні функції в організмі (структурну, захисну, транспортну, регуляторну, каталітичну тощо). Амінокислоти можуть виконувати і самостійні функції.

*Нуклеїнові кислоти та нуклеотиди.* Нуклеїнові кислоти – дезоксирибонуклеїнові (ДНК) та рибонуклеїнові (РНК) кислоти – біополімери, які складаються з п'яти видів основних нуклеотидів пуринового і піримідинового ряду і є носіями генетичної інформації в усіх живих організмах. Лінійна послідовність відповідних нуклеотидів у складі структурних генів ДНК та інформаційної РНК детермінують послідовність амінокислотних залишків у відповідному білку (його первинну структуру). Суть генетичного коду полягає в тому, що послідовність із трьох нуклеотидів (триплет, або кодон) у молекулі ДНК та РНК відповідає одній із 20 амінокислот, які включаються в певному місці в синтезований поліпептидний ланцюг. Передавання біологічної інформації в живих організмах відбувається в напрямку: ДНК → РНК → білок. Вільні нуклеотиди також мають низку біологічних функцій.

*Вуглеводні та їхні похідні* – моносахариди, олігосахариди, гомо- та гетерополісахариди. В організмі людини моносахариди (глюкоза, фруктоза, галактоза) і гомополісахарид глікоген виконують енергетичну функцію; гетерополісахариди, до складу яких переважно входять гексозаміни, їхні N-ацетилопохідні і сульфатопохідні (гіалуронова кислота, хондроїтинсульфати тощо) беруть участь в утворенні мембран, глікокаліксу, сполучної тканини.

*Ліпіди та їхні похідні.* Це молекули різноманітної хімічної природи, головною особливістю яких є гідрофобні властивості. Ліпіди мають багато

біологічних функцій, виступаючи як енергетичний матеріал (триацилгліцероли), основа структури біомембран (фосфоліпіди, гліколіпіди), фізіологічно активні сполуки (стероїдні гормони, жовчні кислоти, ейкозаноїди).

До складу всіх живих організмів входять попередники всіх вказаних великих молекул: вільні амінокислоти, нуклеотиди, карбонові кислоти, спирти, аміни. Крім того, вони ж є проміжними продуктами обміну речовин.

В усіх живих організмах міститься значна кількість води і мінеральних елементів (кальцію, калію, натрію, магнію, заліза, марганцю, хлору, йоду), які виконують специфічні регуляторні та структурні функції, беруть участь у ферментативних реакціях як кофактори.

## **Лабораторна робота 1**

### **Поділ суміші амінокислот методом розподільчої хроматографії**

Амінокислоти є амінопохідними карбонових кислот. Загальні властивості амінокислот визначаються наявністю карбоксильної та аміногруп, а специфічні – будовою і властивостями радикала.

За структурою радикали амінокислот можна поділити на аліфатичні (розгалужені і нерозгалужені) та циклічні. У кожній з цих груп можна виділити заряджені (позитивно або негативно) і незаряджені, полярні (містять полярну функціональну групу) і неполярні (гідрофобні) амінокислоти.

*Принцип методу.* Метод заснований на різній розчинності окремих амінокислот у двох частково змішаних рідинах. Однією з них є вода (полярна нерухома фаза), іншою – неполярний органічний розчинник – бутанол, змішаний з водним розчином оцтової кислоти (рухома фаза). Водна фаза нерухома, оскільки вода сорбована на інертному носії – целюлозі, яка в насиченій вологою атмосфері (у хроматографічній камері) утримує до 20–22 % води, залишаючись зовні сухою.

Чим більша розчинність амінокислоти у водній фазі і менша в органічному розчиннику, тим повільніше рухається амінокислота на папері з органічним розчинником.

*Хід роботи.* Використовуються смужки хроматографічного паперу завдовжки 12–15 см та завширшки 1,5 см, через верхній кінець яких протягнута нитка довжиною 15–20 см. На нижньому кінці паперу на відстані приблизно 1 см від краю зробити позначку простим олівцем, куди скляною паличкою нанести краплю розчину, який містить суміш амінокислот (діаметр плями не більше 0,5 см). Місце нанесення трохи підсушити.

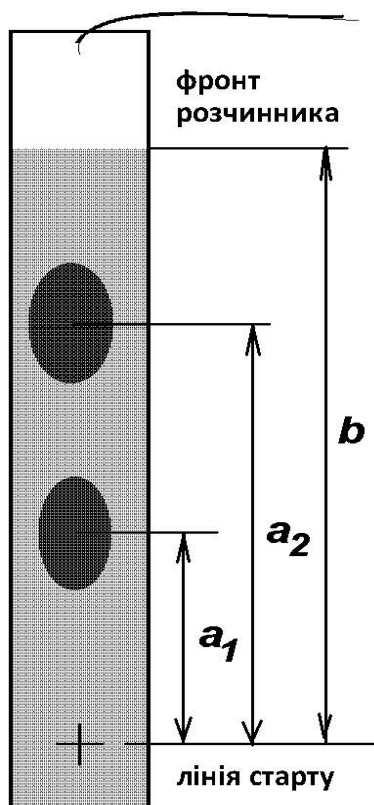
На дно цукрової пробірки (її стінки не змочувати) налити з піпетки 1 мл розчинника (суміш бутилового спирту, оцтової кислоти та води у співвідношенні 12 : 3 : 5).

Підготовану смужку хроматографічного паперу занурити в пробірку, притримуючи за нитку так, щоб папір занурився в розчинник на 2–3 мм, не

торкаючись стінок пробірки, і щоб місце нанесення амінокислот було вище рівня розчинника. Пробірку закрити пробкою і помістити в термостат, нагрітий до 35–40 °С, на 1 годину. Після цього смужку вийняти, позначити фронт розчинника, злегка підсушити і обробити барвником (0,1 % розчин нінгідрину в ацетоні). Хроматограму проявити шляхом нагрівання при 100–110 °С протягом 5–7 хвилин (над полум'ям пальниці). У результаті в місцях приясуності амінокислот з'являться синьо-фіолетові плями (нінгідринова реакція). Відстань від місця нанесення досліджуваного розчину до середини кожної плями ( $a$ ) та від місця нанесення розчину до фронту розчинника ( $b$ ) виміряти і обчислити співвідношення  $a/b$ , що є величиною  $R_f$  (retention factor). Цей коефіцієнт за стандартних умов досліду (розчинник, температура, сорт паперу та ін.) є характерною величиною для кожної речовини (у даному випадку – амінокислоти) і може бути використаний для ідентифікації різних речовин.

Розрахувати значення  $R_f$  для кожної амінокислоти, за допомогою таблиці визначити, які саме амінокислоти були в суміші. У висновках відзначити, чому відбувся поділ, яка з амінокислот пройшла більшу відстань і чому.

У зв'язку з тим, що стандартні умови досліду підтримувати складно, більш надійним методом ідентифікації амінокислот є нанесення на хроматограму «свідків» – стандартних розчинів чистих амінокислот – і порівняння розташування плям.



Поділ суміші 2-х амінокислот методом хроматографії на папері

Амінокислота	$R_f$	
	Бутанол: оцтова кислота: вода (12 : 3 : 5)	Фенол етан л: вода (15 : 4 : 1)
Аланін	0,30	0,41
Аргінін	0,15	0,66
Аспарагін	0,12	0,22
Аспарагінова кислота	0,23	0,06
Валін	0,51	0,62
Гістидин	0,22	0,44
Гліцин	0,23	0,26
Глютамін	0,17	0,29
Глютамінова кислота	0,28	0,12
Ізолейцин	0,6	0,71
Лейцин	0,70	,
Лізін	0,12	0,57
Метіонін	0,50	0,62
Пролін	0,34	0,75
Серін	0,22	0,22
Тирозин	0,45	0,43
Треонін	0,26	0,33
Триптофан	0,50	0,58
Фенілаланін	0,60	0,72
Цистеїн	0,08	0,05

Підходи до класифікації амінокислот. Кожну амінокислоту можна охарактеризувати, скориставшись різними класифікаційними принципами. Крім вже згаданої класифікації амінокислот за структурою радикала, полярності та заряду, амінокислоти поділяють залежно від харчової цінності на замінні (можуть бути створені в організмі з інших амінокислот або з безазотних метаболітів) і незамінні (в організмі не утворюються), залежно від їхньої участі в синтезі білка – на протеїногенні (кодовані та некодовані) та непротеїногенні.

Наприклад: серін – аліфатична нерозгалужена незаряджена полярна амінокислота; замінна; протеїногенна, кодується.

## Білки.

### Склад і властивості білків

Білки, або протеїни, – високомолекулярні органічні сполуки, побудовані із залишків *a,L*-амінокислот, об'єднаних пептидними зв'язками. Білки синтезуються з 20 видів *a*-амінокислот. Пептидний зв'язок утворюється при взаємодії *a*-карбоксихільної групи однієї амінокислоти з *a*-аміногрупою іншої амінокислоти. Полімери, які містять до 50 амінокислотних залишків, називають пептидами. До білків належать поліпептиди, які містять від 50–100 до декількох тисяч амінокислотних залишків.

Білки є гетерополімерами. Величезна різноманітність білків у природі зумовлена різною послідовністю більш ніж 20 видів залишків амінокислот у поліпептидному остові (*первинна структура білка*). Відміни в первинній структурі позначаються на просторовій організації білкової молекули.

Правильне чергування жорстких пептидних і гнучких одинарних зв'язків у ланцюзі головних валентностей створює можливість для укладання поліпептидного ланцюга в упорядковану структуру типу спіралі, яка стабілізована водневими зв'язками між пептидними групами (*вторинна структура*). Якщо молекула білка утворює безперервну спіраль, то такий білок є фібрилярним.

Якщо в молекулі є аморфні, неспіралізовані ділянки, то з'являється можливість подальшого згортання поліпептидного ланцюга в просторі за рахунок взаємодії амінокислотних радикалів (*третинна структура*). Такі білки є глобулярними. Характер зв'язку (водневі, електростатичні, ван-дер-ваальсові, гідрофобні, ковалентні) між амінокислотними радикалами залежить від їхньої хімічної природи. Унаслідок поліпептидний ланцюг згортається дуже складним, але разом з тим строго визначеним чином, набуваючи характерної просторової будови.

Міжмолекулярні взаємодії між окремими поліпептидними ланцюгами, які мають вторинну і третинну структуру, можуть, при їхній нестабільності у відповідних умовах, призводити до утворення олігомірних білків з *четвер-*

тинною структурою. Зворотна дисоціація таких білків на субодиниці відбувається без втрати ними нативних властивостей.

Просторова структура білкової молекули, яка підтримується сукупністю слабких зв'язків, є дуже лабільною і легко змінюється при дії різних фізичних та хімічних факторів, унаслідок чого змінюються її фізико-хімічні та біологічні властивості. Деякі фізичні фактори (температура вище 50–55 °С, різні види іонізуючого випромінювання, зміна полярності середовища) і дія низки хімічних агентів (солі важких металів, мінеральні й органічні кислоти, алкалоїдні реактиви) спричинюють втрату нативної конформації (упорядкованої просторової укладки), тобто *денатурацію* білка (за рахунок порушення третинної і вторинної структури). Денатурація білка супроводжується втратою його біологічної активності і зміною багатьох фізико-хімічних властивостей, у тому числі може різко знижуватися розчинність, зростає в'язкість, змінюється електрофоретична рухливість, виникає схильність до агрегації молекул. Первинна структура білків при денатурації не змінюється.

Реакції осадження білків застосовують при виділенні білків із тканин, при розділенні суміші білків, а також для виявлення їх у різних біологічних рідинах. Осадження білків буває зворотним і незворотним. При зворотному осадженні білок можна перевести в розчинний стан, видаливши осаджувач або знизивши його концентрацію, при цьому білок зберігає свої нативні (природні) властивості. Зворотне осадження білків відбувається при додаванні у великих концентраціях солей лужних і лужноземельних металів, а також амонійних солей, наприклад сульфату амонію. Таке осадження, при якому відбувається дегідратація білкових молекул з одночасною нейтралізацією їхніх зарядів, називається *висолюванням*. Білки, залежно від їхніх  $\xi$ -потенціалів, які є прямо пропорційними зарядам і зворотно пропорційними радіусам, осаджуються (висолюються) розчинами солей різної концентрації.

При незворотному осадженні осад білка не переходить у розчин при видаленні осаджувача або підвищенні концентрації первинного розчинника, що, як правило, зумовлено денатурацією білка. Здатність агентів денатурації спричинювати незворотне осадження білків використовується для виявлення білків у біологічних об'єктах (білок сечі в клінічному аналізі), видалення білка з біологічних рідин при визначенні в них вмісту цукру, мінеральних компонентів, амінокислот тощо.

## Лабораторна робота 2

### Якісні реакції на білки й амінокислоти

Наявність білка в біологічних зразках або розчинах можна виявити за допомогою кольорових реакцій, які зумовлені наявністю пептидних груп або специфічних груп радикалів амінокислот.

За допомогою кольорових реакцій можна порівняти амінокислотний склад глобулярних і фібрилярних білків. За результатами кольорових реакцій заповнити таблицю.

<i>Назва реакції</i>	<i>Чим зумовлена</i>	<i>Колір, вид</i>	<i>Сироватка (+/-)</i>	<i>Желатин (+/-)</i>
1. Біуретова				
2. Нінгідрінова				
3. Ксантопротеїнова				
4. Адамкевича				
5. Ерліха				
6. Сакагучі				
7. Фоля				

Зробити висновок про амінокислотний склад досліджуваних білків та їхню можливу харчову цінність.

Як приклад глобулярних білків можуть бути використані білки сироватки крові. Представником фібрилярних білків є колаген, продукт часткового гідролізу якого – желатин – у цій роботі порівнюється з глобулярними білками сироватки.

#### Робота 1. Біуретова реакція

Зумовлена присутністю в пептидах і білках пептидних груп, які в лужному середовищі утворюють із сірчаною кислотою міддю забарвлені в синьо-фіолетовий колір комплекси.

*Хід роботи.* Взяти 2 пробірки, в одну налити 0,5 мл розчину сироватки крові, у другу – 0,5 мл розчину желатину. У кожен пробірку додати по 3–4 краплі 10 % розчину NaOH та 1–2 краплі 1 % розчину CuSO<sub>4</sub> і перемішати.

#### Робота 2. Нінгідрінова реакція

Зумовлена присутністю вільної  $\alpha$ -аміногрупи у всіх білках, пептидах та  $\alpha$ -амінокислотах. При нагріванні з нінгідрином ці речовини окислюються з утворенням CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> і відповідних альдегідів. Нінгідрин при цьому відновлюється і конденсується з NH<sub>3</sub> і надлишком гідратованої кетоформи, утворюючи комплекс синьо-фіолетового кольору.

*Хід роботи.* У 2 пробірки внести по 0,5 мл сироватки крові або желатину, додати по 5 крапель 0,5 % розчину нінгідрину, перемішати і нагріти до кипіння.

### Робота 3. Ксантопротеїнова реакція

Зумовлена наявністю в більшості білків ароматичних амінокислот, які при нагріванні з азотною кислотою зазнають нітрування. Утворені нітропохідні амінокислот забарвлені в жовтий, а в лужному середовищі – у помаранчевий колір.

*Хід роботи.* У 2 пробірки внести по 0,5 мл сироватки крові або желатину. Додати по 0,5 мл концентрованої  $\text{HNO}_3$  і обережно (!) нагріти. У випадку появи жовтого забарвлення охолодити суміш і додати 30 % розчин  $\text{NaOH}$  по краплях до появи помаранчевого забарвлення.

### Робота 4. Реакція Адамкевича на триптофан

Триптофан у кислому середовищі взаємодіє з альдегідами, даючи забарвлені продукти конденсації. Льодова оцтова кислота може бути джерелом гліоксилової кислоти, що є необхідною для цієї реакції.

*Хід роботи.* У 2 пробірки внести по 0,5 мл сироватки крові або желатину. Додати в кожну по 0,5 мл концентрованої оцтової кислоти, трохи нагріти. Після охолодження по стінці підшарувати 1 мл концентрованої  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до появи червоно-фіолетового кільця.

### Робота 5. Реакція Ерліха на гістидин

При змішуванні розчинів 1 (сульфанілова кислота в  $\text{HCl}$ ) та 2 ( $\text{NaNO}_2$  у воді) один з одним і з аміаком утворюється діазобензолсульфонова кислота, яка дає помаранчеве забарвлення з гістидином.

*Хід роботи.* У 2 пробірки внести по 0,5 мл сироватки крові або желатину. Додати по 0,5 мл реактиву 1, по 1–2 краплі реактиву 2 та  $\text{NH}_4\text{OH}$  (або  $\text{NaOH}$ ) до лужної реакції.

### Робота 6. Реакція Сакагучі на аргінін

У присутності лугу гуанідинова група аргініну окислюється гіпобромітом або гіпохлоридом. Потім окиснений аргінін, об'єднавшись з  $\alpha$ -нафтолом, дає продукт, забарвлений у червоний колір.

*Хід роботи.* Внести в 2 пробірки по 0,5 мл сироватки крові або желатину, додати по 0,5 мл 10 % розчину  $\text{NaOH}$ , по 5 крапель 0,1 % розчину  $\alpha$ -нафтолу в спирті і по 1–5 крапель розчину гіпоброміту.

### Робота 7. Реакція Фоля на сірковмісні амінокислоти

Цистин, цистеїн, метіонін при нагріванні з концентрованими розчинами лугів руйнуються з утворенням сульфідів. При додаванні ацетату

винцю утворюється сірчаний свинець (сульфід свинцю), який випадає в осад чорного кольору.

Особливо багаті на цистеїн фібрилярні білки, що входять до складу волосся і нігтів.

*Хід роботи.* Взяти 3 пробірки: в одну внести 5 крапель сироватки крові, у другу – 5 крапель желатину, у третю – налити 0,5 мл води і занурити шматочок нігтя або волосся. Додати в кожен пробірку по 10 крапель 30 % розчину NaOH і по 1 краплі 5 % розчину  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ . Нагріти до кипіння і кип'ятити 1–2 хвилини.

### **Лабораторна робота 3** **Осадження білків**

У цій лабораторній роботі досліджується дія декількох груп осаджувачів білків.

#### Робота 1. Осадження білків мінеральними кислотами

У 3 пробірки внести по 0,5 мл розчину білка (сироватки крові або яєчного білка, розведеного водою в співвідношенні 1 : 20) і додати по 1–2 краплі наступних концентрованих розчинів кислот:  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ . Перемішати.

#### Робота 2. Осадження білків органічними розчинами

У 2 пробірки внести по 0,5 мл розчину білка і додати в одну 0,5 мл спирту, у другу – стільки ж ацетону. Перемішати.

#### Робота 3. Осадження білків органічними кислотами

У 2 пробірки внести по 0,5 мл розчину білка і додати в одну 0,5 мл 10 % розчину трихлороцтової, а в іншу – 0,5 мл сульфосаліцилової кислот. Перемішати.

#### Робота 4. Осадження білків алкалоїдними реактивами

У 2 пробірки внести по 0,5 мл розчину білка і додати по 5 крапель 1 % розчину оцтової кислоти (у кислому середовищі взаємодія білка з алкалоїдними реактивами відбувається активніше). Потім додати в одну пробірку 5–7 крапель пікринової кислоти, у другу – 5–7 крапель таніну. Перемішати.

#### Робота 5. Осадження білків солями важких металів

У 2 пробірки внести по 0,5 мл розчину білка і додати по 1–2 краплі розчинів  $\text{CuSO}_4$  та  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ . Перемішати.

**Робота 6. Осадження білків солями лужних,  
лужноземельних металів і амонію**

У пробірку внести 0,5 мл розчину білка і додати 0,5 мл насиченого розчину  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Перемішати.

Для перевірки оборотності осадження необхідно додати в кожную пробірку 2 мл дистильованої води для зниження концентрації осаджувача.

<i>Вид осаджувачів</i>	<i>Реактив</i>	<i>Осад (колір, вид)</i>	<i>Оборотність (+/-)</i>
Мінеральні кислоти	$\text{H}_2\text{SO}_4$ $\text{HCl}$ $\text{HNO}_3$		
Органічні кислоти	Трихлороцтова к-та Сульфосаліцилова к-та		
Алкалоїдні реактиви	Пікринова к-та Танін		
Солі важких металів	$\text{CuSO}_4$ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$		
Органічні розчинники	Спирт Ацетон		
Солі лужних, лужноземельних металів і амонію	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		

Зробити висновок про те, які з досліджуваних осаджувачів спричиняють незворотне, а які – оборотне осадження білків.

**Контрольні питання за темою «Вступ у біохімію.  
Біохімічні компоненти клітин»**

1. Біологічна хімія (біохімія) як наука. Місце біохімії серед інших медико-біологічних дисциплін. Об'єкти вивчення і задачі біохімії. Провідна роль біохімії у встановленні молекулярних механізмів патогенезу хвороб людини.

2. Зв'язок біохімії з іншими біомедичними науками. Медична біохімія. Клінічна біохімія. Біохімічна лабораторна діагностика.

3. Біохімічні компоненти клітини, їхні біохімічні функції. Класи біомолекул. Ієрархія біомолекул, їхнє походження.

4. Що розуміють під первинною, вторинною, третинною та четвертинною структурами білка? Які зв'язки стабілізують ці рівні структурної організації білка?

5. Характеристика пептидної групи.

6. Які особливості амінокислотного складу глобулярних і фібрилярних білків?

7. Що таке ізоелектрична точка? На чому ґрунтуються методи її визначення?

8. Від чого залежить розчинність білків? Як впливає на розчинність заряд білкової молекули, рН розчину?

9. Які загальні принципи осадження білків із розчинів?

10. Що таке денатурація? Які агенти її спричиняють? Які рівні просторової структури білка порушуються при денатурації?

11. Яким способом можна осадити білки з розчину, не спричиняючи їхню денатурацію?

12. Класифікація складних білків. Які представники складних білків є найважливішими та які їхні функції?

13. Класифікація простих білків. Які представники простих білків є найважливішими та які їхні функції?

## Тема 2. Ферменти і коферменти

Ферментами називаються білки, які мають каталітичні властивості. Згідно із сучасною класифікацією ферменти поділяють на 7 класів відповідно до типів реакцій, які вони каталізують. У кожному класі є поділ на підкласи і підпідкласи, за допомогою яких уточнюють природу ферментативної реакції.

№	Клас	Які реакції каталізують	Представники
1	Оксидо-Редуктази	Окислювально-відновлювальні реакції	Лактатдегідрогеназа, каталаза, гідроксилази
2	Трансферази	Міжмолекулярне перенесення різних хімічних груп	Амінотрансферази, трансметилаза
3	Гідролази	Гідроліз	Трипсин, уреаза, $\alpha$ -глікозидази, амілаза
4	Ліази	Розщеплення з утворенням подвійних зв'язків або приєднання за подвійними зв'язками	Альдолаза, карбоангідраза
5	Ізомерази	Ізомеризація	Рацемази, епімерази, мутази
6	Лігази	Утворення зв'язків C-C, C-O, C-N та інших з витратою енергії	ДНК-полімераза, аміноацил-тРНК-синтетаза
7	Транслокази	Переміщення іонів та молекул через мембрани	АТФ-синтаза, цитохром-с-оксидаза

Ферменти можуть бути простими і складними білками. Ферменти, які є складними білками, мають у своєму складі білкову частину, яку називають апоферментом, і небілковий компонент (кофермент або простетична група). Ферментативну дію має тільки фермент у цілому (холофермент); ні кофермент, ні апофермент окремо не є активними. Багато коферментів – це похідні вітамінів і розташовані в так званому активному центрі ферментів, який визначає каталітичну активність. Основні властивості ферментів як біологічних каталізаторів – їхня висока активність, специфічність, термолабільність, залежність активності ферментів від рН середовища та регульованість (зміна активності ферментів у присутності активаторів та інгібіторів або за рахунок ковалентних модифікацій). Ці властивості зумовлені білковою природою ферментів.

### Лабораторна робота 4

#### Властивості ферментів

Властивості ферментів зручно вивчати на прикладі амілази слини. Амілаза ( $\alpha$ -1,4-глюкан-4-глюканогідролаза, КФ 3.2.1.1) здійснює гідроліз крохмалю або глікогену через проміжні продукти розщеплення (декстрини)

до мальтози. Мальтоза далі при дії ферменту мальтази слини розщеплюється на дві молекули глюкози.

Спостерігати за перебігом гідролізу можна за допомогою забарвлення реакційної суміші реактивом Люголя (розчин йоду у водному йодистому калії). Нерозщеплений крохмаль з йодом дає синє забарвлення. Декстрини, залежно від величини своїх фрагментів, дають різне забарвлення йодом: амілодекстрини – синьо-фіолетове, еритродекстрини – червоне; ахродекстрини і мальтоза забарвлення з йодом не дають (жовтувате забарвлення зумовлено кольором самого реактиву Люголя). Кінцевими продуктами гідролізу крохмалю при дії  $\alpha$ -амілази є низькомолекулярні декстрини та мальтоза. Про їхню присутність свідчить реакція Фелінга.

Фракція продуктів гідролізу	Забарвлення розчину при додаванні розчину Люголя
Крохмаль	Синій, непрозорий
Амілодекстрини	Синьо-фіолетовий, прозорий
Еритродекстрини	Червоний
Ахродекстрини і мальтоза	Блідо-жовтий

Як джерело амілази в роботах 1–3 використати слину, розведену в 4–5 разів.

#### Робота 1. Вплив температури на активність ферментів

Швидкість ферментативних реакцій, як і будь-яких інших хімічних реакцій, залежить від температури: при підвищенні температури на  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  швидкість зростає приблизно у два рази. Однак для ферментативної реакції це правило виконується тільки в галузі низьких температур – до  $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . При більш високих температурах відбувається денатурація ферменту, а отже, він втрачає каталітичну активність.

*Хід роботи.* У 3 пробірки (№ 1–3) внести по 2 мл 0,5 % розчину крохмалю (субстрат). В інші 3 пробірки (№ 4–6) внести по 10 крапель розведеної слини (джерело ферменту). Протягом 5 хвилин пробірки № 1 і № 4 інкубувати в льодові, пробірки № 2 і № 5 – у термостаті при температурі  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а пробірки № 3 і № 6 – у киплячій водяній бані. Потім вміст пробірок 1 і 4, 2 і 5, 3 і 6 злити разом (пробірки із субстратом і джерелом ферменту), ретельно перемішати і залишити за тих самих температурних умов на 10–15 хвилин. Далі при кімнатній температурі додати в кожен пробірку по 3–5 крапель реактиву Люголя, порівняти забарвлення і занести результати в таблицю.

Пробірки	№ 1 і № 4	№ 2 і № 5	№ 3 і № 6
Температура	$0\text{ }^{\circ}\text{C}$	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	$100\text{ }^{\circ}\text{C}$
Забарвлення з реактивом Люголя			

Зробити висновок про оптимальну температуру для дії амілази.

## Робота 2. Вплив рН середовища на активність ферментів

Кожен фермент виявляє максимальну активність при певному значенні рН. Це значення називається «оптимум рН». Оптимум рН для більшості ферментів лежить у межах від 6 до 8, однак є ферменти з оптимумами рН значно нижче 6 (пепсин,  $pH_{opt} = 1,9$ ) і вище 8 (аргіназа,  $pH_{opt} = 9,7$ ). При рН, що є нижчим і вищим відносно оптимального значення, спостерігається зниження активності ферментів. У певному діапазоні рН процес оборотний. Залежність активності ферменту від рН зумовлена впливом зміни концентрації іонів водню на ступінь іонізації іоногенних груп ферменту і субстрату. При екстремальних значеннях рН відбувається кислотна або лужна денатурація ферменту, а отже, він незворотно втрачає активність.

*Хід роботи.* У 4 пробірки налити по 1 мл буферних розчинів з різними значеннями рН (згідно з таблицею).

№ пробірки	рН буферного розчину	Забарвлення при додаванні реактиву Люголя
1	5,0	
2	6,9	
3	7,5	
4	8,2	

У кожен пробірку додати по 5 крапель 0,5 % розчину крохмалю і по одній краплі розведеної слини. Перемішати, помістити в термостат (+37 °С) на 6–7 хвилин, потім пробірку вийняти з термостату і в кожен додати по краплині реактиву Люголя. Порівняти забарвлення розчинів. Результати занести в таблицю. Зробити висновок про те, при якому саме значенні рН гідроліз крохмалю амілазою відбувається найшвидше.

## Робота 3. Специфічність дії ферментів

*Специфічність дії* є однією з найважливіших властивостей ферментів і полягає в тому, що кожен фермент каталізує перетворення одного субстрату або групи близьких субстратів і одного виду або групи близьких хімічних зв'язків. Специфічність ферментів може бути *абсолютною і відотною*. Ферменти з абсолютною специфічністю (уреаза, сукцинатдегідрогеназа) каталізують перетворення тільки одного субстрату, а з відотною специфічністю (фосфатази, протеїнази) – однотипні перетворення подібних за будовою речовин.

Амілаза розщеплює полісахариди і не діє на дисахариди (мальтозу, лактозу чи сахарозу).

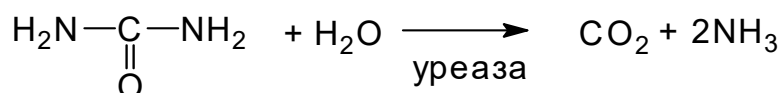
*Хід роботи.* В одну пробірку налити 1 мл 0,5 % розчину крохмалю, а в другу – 1 мл 0,5 % розчину сахарози. В обидві пробірки внести по 5 крапель розведеної слини (джерело амілази). Вміст пробірок перемішати

і помістити на 15 хвилин в термостат (+37 °С). Потім в обох пробірках провести реакцію Фелінга (додати рівний об'єм реактиву Фелінга і нагріти). Відзначити, у якій з пробірок реакція Фелінга є позитивною. На підставі цих результатів роблять висновок про характер дії амілази на ці субстрати.

## **Лабораторна робота 5**

### **Дія уреаз**

Уреаза (карбамідамідогідролаза, КФ 3.5.1.5) є ферментом класу гідролаз, групи амідаз і розщеплює сечовину до двох молекул аміаку і вуглецевого газу:



У воді CO<sub>2</sub> перетворюється на H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (слабка кислота), а NH<sub>3</sub> – на NH<sub>4</sub>OH (сильна основа), у зв'язку з чим змінюється рН середовища.

За своєю дією уреаз є строго специфічною – вона розщеплює тільки сечовину, не впливаючи на її похідні. Уреаза зустрічається у великій кількості рослин, пліснявих грибів і бактерій. Особливо великий вміст уреаз в бобах сої. У людини вона виявлена в шлунку, де частково нейтралізує HCl шлункового соку за рахунок утворення NH<sub>4</sub>OH.

*Хід роботи.* У пробірку налити 2 мл 2 % розчину сечовини і додати близько 0,5 г соєвого борошна, перемішати і додати 2–3 краплі розчину фенолфталеїну. У контрольну пробу налити таку ж кількість розчину сечовини і фенолфталеїну, але не додавати соєве борошно. Обидві проби залишити при кімнатній температурі і простежити за зміною забарвлення індикатора. Дати пояснення.

## **Лабораторна робота 6**

### **Визначення активності амілази за Вольгемутом**

Про присутність ферменту в досліджуваному гомогенаті або екстракті тканини можна дізнаватись або за зниженням концентрації субстрату, на який діє фермент, або за накопиченням продукту реакції. Так, про присутність амілази в слині можна дізнатись за зникненням крохмалю, який додали до слини (проба з йодом), або за накопиченням мальтози (визначають методом Фелінга).

Кількість ферменту можна оцінити, якщо виміряти величину каталітичної активності цього ферменту, тобто швидкість реакції, що каталізується цим ферментом. До того ж вимірюють початкову швидкість реакції, коли вона лінійно залежить від концентрації ферменту. Визначення

активності ферментів проводять у буферних розчинах, які мають значення рН, близькі до оптимального для цього ферменту, при температурі 25–38 °С і при концентрації субстрату, близької до насичення. До складу дослідних сумішей додають необхідні коферменти, активатори та стабілізатори; останні запобігають денатурації ферментного білка.

Згідно з міжнародною угодою за одиницю активності U (1U) ферменту приймається така кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину при 30 °С за оптимальних умов (рН, концентрація субстрату, кофакторів тощо). Молекулярною активністю називається число молекул субстрату, яке перетворюється однією молекулою ферменту за 1 хвилину. Питома активність виражається числом одиниць активності ферменту в розрахунку на мг білка (U/мг білка). Іншою міжнародною одиницею активності ферменту є катал (кат) – така кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 моль субстрату за секунду. Вживаються також (особливо в медицині) деякі тривіальні способи вираження активності ферментів.

Метод визначення активності амілази слини заснований на виявленні межового розбавлення розчину амілази, при якому за стандартних умов ще відбувається розщеплення певної кількості 0,1 % розчину крохмалю до еритродекстрину. Активність амілази слини виражається в кількості (у мл) 0,1 % розчину крохмалю, яка гідролізується 1 мл нерозведеної слини при +38 °С за 30 хвилин. У нормі активність амілази слини  $A(38^{\circ}/30) = 160\text{--}320$  од.

Метод Вольгемута широко використовується в клінічній практиці для визначення активності амілази в крові та сечі.

*Матеріали і реактиви:* 2 мл розчину слини, розведеної в 4 рази (до 0,5 мл слини додати 1,5 мл дистильованої води); 0,1 % розчин крохмалю; реактив Люголя (0,1 % розчин йоду в 0,2 % розчині йодиду калію).

*Хід роботи.* У 7 пронумерованих пробірок внести з бюретки по 1 мл дистильованої води. У першу пробірку додати 1 мл розведеної в 4 рази слини. Вміст добре перемішати і 1 мл одержаного розчину перенести з першої пробірки до другої; з неї – таким же чином у третю і т. д. Із сьомої пробірки 1 мл рідини вилити. Таким чином, у кожній наступній пробірці вміст ферменту у 2 рази менший, ніж в попередній. Далі в усі пробірки додати по 2 мл 0,1 % розчину крохмалю, перемішати і помістити пробірки в термостат (+37 °С) на 30 хвилин. Після цього пробірки охолодити під проточною водою для припинення дії ферменту. У кожну пробірку додати по 2–3 краплі розчину Люголя, ретельно перемішати і спостерігати за зміною забарвлення. Рідина в пробірках може забарвлюватися в жовтий, червоний, синій чи проміжний кольори. Жовтий колір свідчить про повне розщеплення крохмалю. Результати спостережень заносять у таблицю.

Показник	Пробірка						
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
Розведення слини (або сечі)	8	16	32	64	128	256	532
Забарвлення з реактивом Люголя							

Встановити мінімальну кількість слини, що здатна розщепити 2 мл крохмалю, і розрахувати кількість крохмалю, яка розщеплюється амілазою, що міститься в 1 мл слини. Для цього позначають пробірку з розчином червонуватого відтінку і роблять розрахунок амілазної активності.

Приклад розрахунку: у 1, 2, 3, і 4-й пробірках спостерігається слабо-жовте забарвлення, у 5-й пробірці – червоно-помаранчеве або червоно-фіолетове, у 6-й та 7-й – синє. Для розрахунку беремо пробірку № 5, у якій слина розведена в 128 разів. У ній міститься мінімальна кількість слини (1/128 мл), яка здатна розщепити 2 мл 0,1 % крохмалю. Тоді 1 мл слини розщеплює X мл 0,1 % розчину крохмалю.  $X = 1 \times 2 \times 128 = 256$  од.

### **Контрольні питання за темою «Ферменти і коферменти»**

1. Ферменти: визначення, властивості ферментів як біологічних каталізаторів.
2. Класифікація і номенклатура ферментів, характеристика окремих класів ферментів.
3. Будова і механізм дії ферментів. Активний і алостеричний (регуляторний) центри.
4. Кофактори і коферменти. Будова і властивості коферментів, вітаміни як попередники в біосинтезі коферментів.
5. Коферменти: типи реакцій, які каталізують окремі класи коферментів.
6. Ізоферменти: особливості будови і функціонування, значення в діагностиці захворювань.
7. Механізми дії і кінетика ферментативних реакцій: залежність швидкості реакції від концентрації субстрату, рН і температури.
8. Принципи і методи виявлення ферментів у біооб'єктах. Одиниці вимірювання активності і кількості ферментів.
9. Активатори та інгібітори ферментів: приклади і механізми дії.
10. Типи інгібування ферментів: зворотне (конкурентне, неконкурентне) і незворотне.
11. Регуляція ферментативних процесів. Шляхи і механізми регуляції: алостерична регуляція; ковалентна модифікація ферментів.
12. Циклічні нуклеотиди (цАМФ, цГМФ) як регулятори ферментативних реакцій і біологічних функцій клітин.
13. Ензимопатії – вроджені (спадкові) порушення метаболізму вуглеводнів, амінокислот, порфіринів, пуринів.
14. Ензимодіагностика захворювань.
15. Ензимотерапія – застосування ферментів, їх активаторів та інгібіторів у лікувальних цілях.

## Теми 3, 4.

### Основні закономірності метаболізму. Цикл Кребса. Молекулярні основи біоенергетики

Метаболізмом називають усю сукупність хімічних реакцій у живих клітинах. У більш вузькому аспекті «метаболізм» означає проміжний обмін, тобто перетворення речовин усередині клітин з моменту їхнього надходження до утворення кінцевих продуктів. Проміжні продукти носять назву метаболітів або інтермедіатів.

Центральні метаболічні шляхи подібні в усіх живих форм (принцип біохімічної єдності) і забезпечують: а) притік хімічної енергії за рахунок розщеплення харчових речовин або перетворення енергії сонячного світла; б) синтез будівельних блоків для побудови макромолекул; в) збирання клітинних компонентів.

Проміжний обмін складається з двох протилежних фаз: катаболізму та анаболізму. Протягом катаболізму відбувається розщеплення складних органічних молекул до простіших кінцевих продуктів, що супроводжується накопиченням значної частини вільної енергії у вигляді високоенергетичних (макроергічних) сполук. Анаболічні процеси включають біосинтез будівельних блоків та макромолекулярних компонентів клітини, що спрягається з реакціями розпаду макроергічних сполук (насамперед нуклеозидтрифосфатів). Швидкості катаболічних і анаболічних реакцій тонко регулюються відповідно до потреб організму та умов зовнішнього середовища.

Цикл трикарбонових кислот (ЦТК, цикл Кребса) – це загальний кінцевий шлях катаболізму речовин за аеробних умов. Ферменти, які каталізують реакції ЦТК, локалізовані в матриксі та внутрішній мембрані мітохондрій. ЦТК починається з конденсації молекул ацетил-КоА та чотирьохвуглецевого оксалоацетату, що призводить до утворення шестивуглецевого цитрату. Унаслідок подальших перетворень три- та дикарбонових кислот (інтермедіатів ЦТК) відбувається регенерація оксалоацетату і виділяються дві молекули вуглекислого газу.

ЦТК – це амфіболічний шлях. Амфіболічний шлях поєднує в собі катаболічні й анаболічні реакції. У циклі Кребса не тільки здійснюються окислювальні перетворення енергетичних субстратів до кінцевих продуктів, а й відбувається утворення субстратів для інших метаболічних шляхів.

Процеси катаболізму в клітинах тварин супроводжуються споживанням кисню, який необхідний для реакцій окислення. Електрони і протони переходять від органічних субстратів на коферменти НАД- і ФАД-залежних дегідрогеназ, а далі переносяться на кисень через ланцюг переносників, організованих у дихальний ланцюг мітохондрій. Електрони переміщуються ланцюгом від більш електронегативних компонентів до найменше електронегативного кисню.

Компоненти ланцюга дихання вбудовані у внутрішню мембрану мітохондрій у вигляді чотирьох ферментативних комплексів:

*I комплекс* (НАДН-убіхінон-редуктаза): флавопротеїн, який містить ФМН, що окислює НАДН і передає відновлювальні еквіваленти на убіхінон; асоційований із залізосірчаними білками (FeS-білками).

Убіхінон – невелика ліпофільна молекула, що здатна переміщуватися в мембрані і транспортувати протони й електрони між мембранопов'язаними комплексами ланцюга дихання.

*II комплекс* (сукцинат-убіхінон-редуктаза): ФАД-залежний флавопротеїн, який окислює сукцинат, відновлюючи при цьому убіхінон; асоційований з FeS-білками.

*III комплекс* (убіхінон-цитохром *c*-редуктаза): складається із цитохрому *b*, FeS-білків та цитохрому *c*<sub>1</sub>, передає електрони з відновленого убіхінону на цитохром *c*.

Цитохром *c* – єдиний розчинний цитохром, який, поряд з убіхіноном, виступає мобільним компонентом дихального ланцюга і здійснює зв'язок між фіксованими комплексами.

*IV комплекс* (цитохром *c*-оксидаза): складається з цитохромів *a* і *a*<sub>3</sub>, які містять іони міді. Цей комплекс забезпечує перенесення відновлювальних еквівалентів на молекулярний кисень з утворенням води.

Згідно з хеміосмотичною теорією I, III і IV білкові комплекси дихального ланцюга при перенесенні електронів викачують протони з матриксу мітохондрій у міжмембранний простір, створюючи електрохімічний градієнт, який далі використовується АТФ-синтазою для синтезу АТФ з АДФ і неорганічного фосфату. Окислення однієї молекули НАДН(H<sup>+</sup>) забезпечує синтез трьох молекул АТФ, при окисленні ФАДН<sub>2</sub> – дві АТФ. Залежність інтенсивності дихання мітохондрій від концентрації АДФ зветься *дихальним контролем*.

Багато захворювань людей і тварин пов'язано з порушенням енергетичного обміну. Порушення енергетичних процесів можна пояснити багатьма причинами:

- недостатністю субстратів окислення, неможливістю їхнього використання;
- недостатністю ферментів дихального ланцюга, у тому числі через недостатність вітамінів, похідні яких входять до їхнього складу у вигляді коферментів;
- блокуванням процесів окислювального фосфорилування і утворення АТФ;
- токсичними ураженнями, які порушують проникність мітохондріальних мембран;
- дефіцитом кисню.

Порушення регуляції енергетичних процесів спостерігається при гіпоглікемії, коли в крові знижується вміст глюкози – важливого джерела енергії в організмі (при голодуванні, важкому фізичному навантаженні, споживанні алкоголю). Гіпоглікемія несприятливо впливає на функції мозку: викликає гіпоглікемічний шок, втрата свідомості, спазми судин головного мозку, температура тіла знижується.

Приклад патології, зумовленої порушенням енергетичного обміну, – лихоманка. Підвищення температури тіла зазвичай пов'язане з бактеріальною або вірусною інфекцією. Лихоманку спричинюють пірогени, які виділяють бактерії. Ці речовини роз'єднують процеси тканинного дихання і фосфорилування. При цьому зменшується утворення АТФ і енергія, яка не використовується для фосфорилування АДФ, виділяється у вигляді тепла.

### ***Контрольні питання за темою «Основні закономірності метаболізму. Цикл Кребса»***

1. Обмін речовин (метаболізм): загальні закономірності протікання катаболічних і анаболічних процесів.
2. Загальні стадії внутрішньоклітинного катаболізму біомолекул: білків, вуглеводів, ліпідів.
3. Цикл трикарбонових кислот. Локалізація, послідовність ферментативних реакцій, значення в обміні речовин.
4. Енергетичний баланс циклу трикарбонових кислот. Фізіологічне значення реакцій ЦТК.

### ***Контрольні питання за темою «Молекулярні основи біоенергетики»***

1. Реакції біологічного окислення, типи реакцій (дегідрогеназні, оксидазні, оксигеназні) та їхнє біологічне значення. Тканинне дихання.
2. Ферменти біологічного окислення в мітохондріях: піридин-, флавінзалежні дегідрогенази, цитохроми.
3. Послідовність компонентів дихального ланцюга мітохондрій. Молекулярні комплекси внутрішніх мембран мітохондрій.
4. Окислювальне фосфорилування: пункти спряження транспорту електронів і фосфорилування, коефіцієнт окислювального фосфорилування.
5. Хеміосмотична теорія окислювального фосфорилування, АТФ-синтаза мітохондрій.
6. Інгібітори транспорту електронів і роз'єднувачі окислювального фосфорилування.

## РОЗДІЛ 2

### **МЕТАБОЛІЗМ ВУГЛЕВОДІВ, ЛІПІДІВ, АМІНОКИСЛОТ І ЙОГО РЕГУЛЯЦІЯ**



#### **Тема 1.**

#### **Метаболізм вуглеводів і його регуляція**

Вуглеводи – це полігідроксиальдегіди (альдози) або полігідроксикетони (кетози), а також їхні похідні. Функції вуглеводів різноманітні – енергетична, пластична, захисна, регуляторна та ін.

Залежно від кількості мономерних фрагментів вуглеводи поділяються на моносахариди, або монози (не гідролізуються до більш простих вуглеводів), олігосахариди (гідролізуються до невеликої кількості залишків моносахаридів) та полісахариди (містять від десятків до декількох тисяч моносахаридних залишків). В оліго- і полісахаридах залишки моноз сполучені О-глікозидними зв'язками.

Монози за числом атомів вуглецю поділяються на тріози, тетрози, пентози, гексози та гептози. Найбільш розповсюдженими є гексози (глюкоза, галактоза, фруктоза) і пентози (рибоза і дезоксирибоза).

Найбільш розповсюдженими представниками дисахаридів є сахароза, мальтоза і лактоза.

Полісахариди, які зустрічаються в природі, поділяються на гомополісахариди, що складаються із залишків моноз одного типу (наприклад, глікоген, крохмаль, целюлоза), і гетерополісахариди, у складі яких зустрічаються два і більше типів моносахаридів та їхніх похідних (наприклад, гіалуронова кислота, гепарин та ін.). Глікоген і крохмаль є резервними вуглеводнями і використовуються як запас енергетичного матеріалу.

Основним моносахаридом їжі, який бере участь у катаболічних реакціях, є глюкоза. Інші монози, які надходять до організму з їжею (фруктоза – як компонент сахарози, галактоза – лактози), вступають у метаболічні перетворення після їхньої трансформації у фосфорні ефіри глюкози.

#### Основні внутрішньоклітинні перетворення глюкози:

- аеробне окислення, унаслідок якого глюкоза перетворюється на піруват; потім відбувається окислювальне декарбоксилювання пірувату до ацетил-КоА і повне окислення останнього в ЦТК;
- анаеробний гліколіз, унаслідок якого утворюється молочна кислота (лактат);
- запасання глюкози у вигляді глікогену в печінці або використання для синтезу триацилгліцеролів у жировій тканині;

- пентозофосфатний цикл окислення глюкози, унаслідок чого утворюються фосфорні ефіри пентоз, відновлена форма НАДФ<sup>+</sup> (НАДФН) і CO<sub>2</sub>;
- перетворення глюкози на глюкуронову кислоту.

Такі тканини, як мозок і еритроцити, залежать від постійного постачання глюкози. Якщо кількість вуглеводів, одержаних з їжею, є недостатньою, необхідна концентрація глюкози в крові може підтримуватися деякий час за рахунок розщеплення глікогену печінки.

Якщо запаси глікогену вичерпані, то в печінці запускається синтез глюкози *de novo* – глюконеогенез. Разом з печінкою здатність до синтезу глюкози мають також клітини ниркових каналців. Субстратами в глюконеогенезі є глюкогенні амінокислоти, а також лактат, який утворюється в еритроцитах і м'язовій тканині за анаеробних умов, і гліцерол, що утворюється при розщепленні жирів.

До гормонів, які впливають на вуглеводний обмін, належать пептиди інсулін і глюкагон, глюкостероїд кортизон і катехоламін адреналін.

Інсулін індукує синтез *de novo* глікогенсинтази, а також деяких ферментів гліколізу (гексокінази, фосфофруктокінази). Водночас інсулін пригнічує синтез ключових ферментів глюконеогенезу.

Глюкагон діє як антагоніст інсуліну: індукує активність ферментів глюконеогенезу і пригнічує активність піруваткінази, ключового ферменту гліколізу. Також через вторинний месенджер цАМФ глюкагон гальмує синтез глікогену і активує його розщеплення. Подібним чином діє й адреналін.

Глюкостероїди, насамперед кортизон, індукують синтез усіх ключових ферментів глюконеогенезу. Одночасно вони індукують синтез ферментів, що беруть участь у деградації білків та амінокислот, забезпечуючи таким чином глюконеогенез субстратами.

## **Лабораторна робота 1**

### **Хімічні властивості вуглеводів**

Моносахариди взаємодіють з міцними мінеральними кислотами, які відщеплюють від них H<sub>2</sub>O з утворенням циклічних сполук – фурфуролу (з пентоз) та оксиметилфурфуролу (з гексоз). Дисахариди і полісахариди після обробки міцними мінеральними кислотами гідролізуються з утворенням моносахаридів, які далі перетворюються на оксиметилфурфурол. Фурфурол і оксиметилфурфурол утворюють забарвлені комплекси при взаємодії з деякими органічними сполуками (*a*-нафтолом, орцином, резорцином тощо). На здатності більшості вуглеводів взаємодіяти з міцними мінеральними кислотами засновані реакції Подобєдова – Моліша (загальна реакція на вуглеводи), відносно специфічні реакції на пентози з орцином, на фруктозу з резорцином тощо.

Карбонільна група в моносахаридах є найбільш реакційноздатною і зумовлює їхню здатність відновлювати метали, конденсуватися з утворенням смол та вступати в реакції заміщення карбонільного кисню. На цій властивості засновано багато методів якісного і кількісного визначення видів цукрів.

Усі якісні реакції виконуються з розчинами глюкози, фруктози, галактози, ксилози, сахарози, мальтози, лактози та крохмалю.

#### Робота 1. Реакція Подобєдова – Моліша

До 1 мл вуглеводу додати 2–3 краплі спиртового розчину  $\alpha$ -нафтолу. Перемішати. Обережно по стінці підшарувати 2 мл концентрованої  $H_2SO_4$ . Реакція позитивна, якщо на межі розділу рідин з'являється фіолетове кільце.

#### Робота 2. Проба на пентози з орцином

Для порівняння взяти розчини ксилози (або декілька шматочків соломи, яка містить полісахарид, побудований із залишків ксилози) і глюкози. До 1 мл вуглеводу додати 1 мл солянокислого розчину орцину і кип'ятити до появи зеленого забарвлення в пробірці з ксилозою.

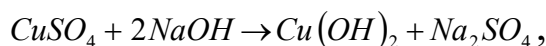
#### Робота 3. Реакція Селіванова (на фруктозу)

Порівняно з іншими гексозами, фруктоза швидше утворює оксиметилфурфурол при обробці мінеральними кислотами. Це видно при використанні розбавлених мінеральних кислот. Ця властивість була покладена в основу якісного визначення фруктози.

*Хід роботи.* У 3 пробірки налити по 1 мл фруктози, глюкози та сахарози (для порівняння) і додати по 2 мл розчину резорцину у 12 %  $HCl$ . Одночасно нагріти всі три пробірки до кипіння і кип'ятити до появи вишнево-червоного забарвлення в пробірці з фруктозою.

#### Робота 4. Реакція Фелінга

Являє собою процес відновлення  $Cu^{2+}$  до  $Cu$  в лужному середовищі в присутності вуглеводів із вільними карбонільними групами. На прикладі гексози:



Поява червоного осаду (закис міді) або жовтого осаду (гідрат закису міді) свідчить про наявність у цьому вуглеводі вільної карбонільної групи.

*Хід роботи.* До 2 мл розчину вуглеводу додати 1 мл розчину Фелінга (готується із суміші розчинів  $NaOH$ ,  $CuSO_4$  і сегнетової солі). Після перемішування нагріти вміст пробірки в полум'ї пальниці або на киплячій водяній бані до появи в деяких пробірках червоного чи жовтого осаду. Нагрівати або одночасно всі пробірки, або по 2 пробірки, одна з яких

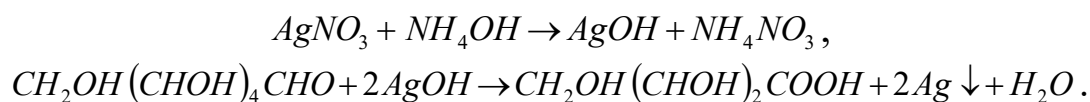
обов'язково має містити розчин вуглеводу, який редукує. Реакцію Фелінга провести також з гідролізованими сахарозою та крохмалем.

Гідроліз сахарози. До 1 мл розчину сахарози додати 0,5 мл 10 % розчину  $H_2SO_4$  і кип'ятити суміш 1–2 хвилини. Нейтралізувати кислоту додаванням 1 мл 10 % розчину  $NaOH$ .

Гідроліз крохмалю. До 2 мл розчину крохмалю додати 0,5 мл 10 % розчину  $H_2SO_4$  і помістити в киплячу водяну баню на 10–15 хвилин. Охолодити і нейтралізувати кислоту додаванням 1 мл 10 % розчину  $NaOH$ .

#### Робота 5. Реакція срібного дзеркала

Являє собою процес відновлення срібла в лужному середовищі вуглеводами з вільними карбонільними групами, тобто має той самий механізм, що й реакція Фелінга:



*Хід роботи.* До 1 мл розчину вуглеводу додати 1 мл аміачного розчину  $AgNO_3$  і обережно нагріти в полум'ї пальниці до появи на стінках пробірки осаду металічного срібла.

#### Робота 6. Реакція з реактивом Ніландера

Базується на відновленні азотнокислого вісмуту до металічного вісмуту в лужному середовищі в присутності вуглеводів, які редукують. Цією реакцією користуються в клінічних лабораторіях для визначення вмісту глюкози в сечі, оскільки, на відміну від солей міді, солі вісмуту не відновлюються сечовою кислотою. Реакція дуже чутлива.

*Хід роботи.* До 0,5 мл вуглеводу додати 5–6 крапель реактиву Ніландера. Нагрівати суміш до появи чорного осаду металічного вісмуту.

#### Робота 7. Реакція осмолення

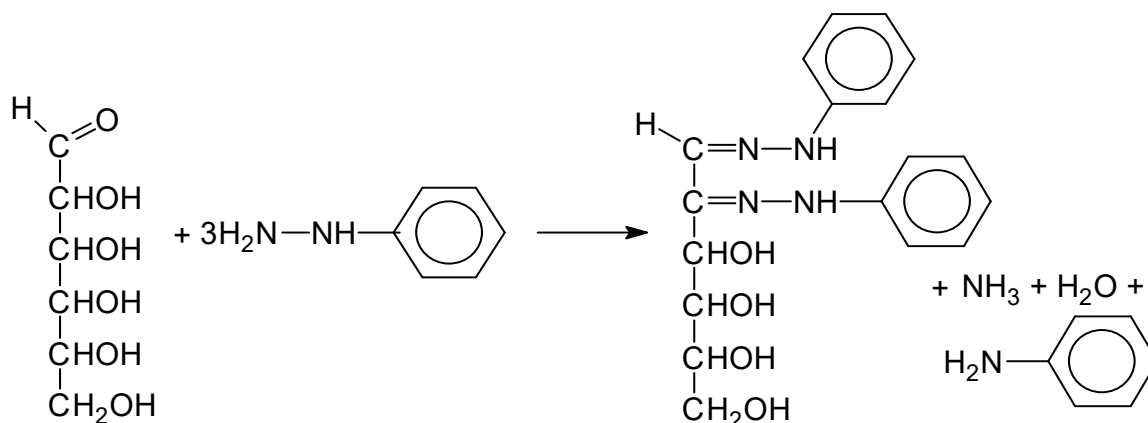
Ця реакція заснована на здатності вуглеводів із вільними карбонільними групами при нагріванні з лугами конденсуватися й утворювати смоли, або карамелі.

*Хід роботи.* До 1 мл вуглеводу додати 0,5 мл 10 % розчину  $NaOH$  і нагріти. Поява золотисто-коричневого забарвлення і запаху паленого цукру свідчать про осмолення досліджуваних видів цукру.

#### Робота 8. Реакція заміщення карбонільного кисню (утворення озонів)

Вуглеводи, які мають вільні карбонільні групи, при нагріванні з фенілгідазином у кислому середовищі утворюють озони. Озони різних видів цукрів відрізняються за формою кристалів, температурою плавлення і розчинністю, що використовується для ідентифікації видів

цукру. Деякі види цукрів (глюкоза, фруктоза, маноза) дають однакові продукти, і тому цим методом не можуть бути ідентифіковані.



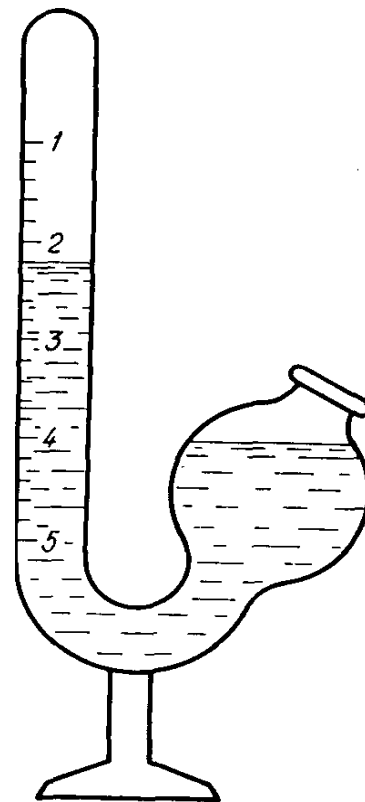
*Хід роботи.* На дно сухої пробірки насипати суміш (свіжоприготовану) солянокислого фенілгідразину з оцтовокислим натрієм (1 : 2) так, щоб дно було вкрите цією сумішшю. Додати 1–2 мл розчину цукру. Пробірки помістити у водяну баню (100 °С) на 30–40 хвилин. Після появи жовтого осаду озазонів рідину охолодити під струменем проточної води. Нанести краплю рідини з осадом на предметне скло і подивитися під мікроскопом. Замалювати форму кристалів.

### Робота 9. Проба на бродіння

Спиртовим бродінням називається процес перетворення глюкози на спирт і  $\text{CO}_2$  за анаеробних умов під впливом мікроорганізмів. Ця проба дає змогу відрізнити вуглеводи, які зброджуються ферментами дріжджів (гексози, тріози та деякі дисахариди), від тих, які не зброджуються. Використовується при ідентифікації розчину вуглеводу.

*Хід роботи.* Налити в пробірки по 9 мл розчинів глюкози, фруктози, галактози, лактози, сахарози, мальтози. Додати по 2 мл суспензії дріжджів і перемішати.

Заповнити сумішшю бродильну посудину Ейхгорна так, щоб у запаяному коліні не було бульбашок повітря. Рідина має заповнити трубку бродильної посудини до розширеної її частини. Для цього, наливши рідину в розширену частину посудини, закрити отвір великим пальцем руки і перевернути посудину. Коли трубка заповниться рідиною, посудину обережно повернути в нормальне положення. Бродильну посудину помістити в термостат (+37 °С).



Бродильна посудина  
Ейхгорна

Через 30–40 хвилин спостерігається виділення бульбашок вуглекислого газу, які збираються у верхній частині закритого коліна трубки, що свідчить про збродження вуглеводу.

На підставі результатів виконаних робіт заповнюють таблицю і роблять висновки про властивості досліджуваних вуглеводів.

Вуглевод	Реакція на вільні карбонільні групи				Озасони (форма кристалів)	Реакція з мінеральними кислотами			Бродіння
	Фелінга	Ніландера	Осмолення	Срібного дзеркала		Подобедова – Моліша	з орціном	Селіванова	
Глюкоза									
Фруктоза									
Галактоза									
Лактоза									
Ксилоза									
Сахароза									
Мальтоза									
Крохмаль									

## Лабораторна робота 2

### **Визначення концентрації глюкози в сироватці крові глюкозооксидазним методом**

У крові з речовин вуглеводневої природи в найбільшій кількості міститься глюкоза. Тому для діагностики порушень вуглеводного обміну в клінічній практиці часто використовується визначення кількості глюкози в крові.

*Принцип методу.* Реакція заснована на здатності глюкози окислюватись у присутності глюкозооксидази (КФ 1.1.3.4). Глюкозооксидаза є флавопротеїном, специфічно каталізує перенесення двох водневих атомів з першого вуглецевого атому глюкози на кисень повітря.

На початку ферментативної реакції утворюється 6-глюконолактон, який, приєднуючи воду, спонтанно перетворюється на глюконову кислоту:



При цьому в еквімолярних кількостях утворюється пероксид водню, який у присутності пероксидази (КФ 1.11.1.7) і відновлювальних еквівалентів відновлюється до води. Додавання до системи барвника (наприклад ортотолуїдину), який набуває забарвлення при окисненні, або інших сполук, які в присутності пероксиду водню утворюють забарвлені продукти (наприклад, фенол і 4-амінофеназон у присутності  $\text{H}_2\text{O}_2$  утворюють хінонімін

червоно-фіолетового кольору), дає змогу зафіксувати кількість  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що утворився, колориметрично.

*Матеріали і реактиви:*

1) ензими – пероксидаза ( $2200 \pm 220$ ) У/л, глюкозооксидаза ( $18000 \pm 1800$ ) У/л, 4-амінофеназон ( $110 \pm 11$ ) мг/л, стабілізатори, активатори;

2) буферний розчин – фосфатний буфер (рН 7,2–7,4) ( $0,1 \pm 0,01$ ) М, фенол ( $190 \pm 19$ ) мг/л, стабілізатори;

3) калібрувальний розчин глюкози ( $10 \pm 0,5$ ) ммоль/л або ( $1802 \pm 90$ ) мг/л;

4) антикоагулянт – розчин цитрату натрію і хлористого натрію.

Матеріал для аналізу: сироватка крові, плазма, сеча.

Відміряти в пробірку, мг	Калібрувальна проба	Дослідна проба	Холоста проба
Калібрувальний розчин	0,04	–	–
Розчин, що аналізується	–	0,04	–
Фізіологічний розчин	–	–	0,04
Буферний розчин	2,00	2,00	2,00
Ензими	2,00	2,00	2,00
Загальний об'єм у пробірці, мл	4,04	4,04	4,04

*Хід роботи.* Додати реактиви згідно з таблицею, витримати 20 хвилин при кімнатній температурі ( $+18$ – $25$  °С) або 12 хвилин при температурі  $+37$  °С. Виміряти поглинання Е калібрувальної та дослідної проб проти холостої при 500–546 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм.

Концентрацію глюкози розрахувати за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{калібр.}}} \times C_{\text{калібр.}},$$

де  $C_{\text{калібр.}}$  – концентрація калібрувального розчину глюкози (10 ммоль/л),

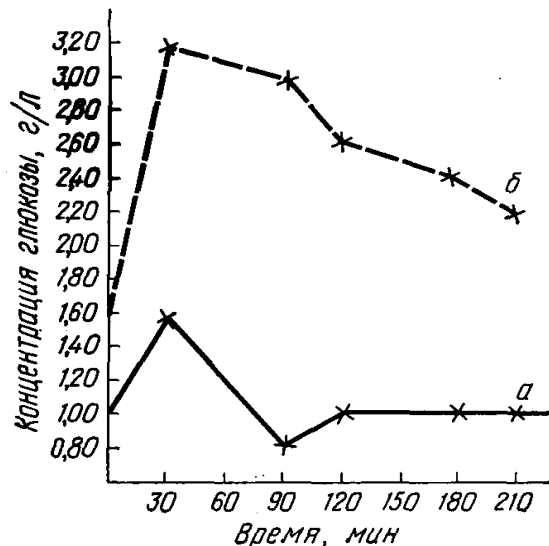
$E_{\text{дослід.}}$  – поглинання дослідної проби,

$E_{\text{калібр.}}$  – поглинання калібрувальної проби.

У нормі концентрація глюкози в сироватці, плазмі крові складає (4,22–6,11) ммМ або (76–110) мг/дкл; у сечі (0–1,11) ммМ або (0–20) мг/дкл.

**Клініко-діагностичне значення.** Гіперглікемія може виникнути при цукровому діабеті, гострому панкреатиті, панкреатичних цирозах (ці захворювання дають гіперглікемію, пов'язану з недостатньою кількістю інсуліну), при травмах і пухлинах мозку, епілепсії, менінгіті, пухлинах кори наднирників, гіперфункції щитовидної залози, при психологічному збудженні тощо.

Для дослідження обміну вуглеводів у клініці застосовують метод цукрового навантаження (одноразовий прийом 50–100 г глюкози, який спричинює харчову, або аліментарну, гіперглікемію в здорової людини). Посилене виділення інсуліну сприяє швидкій утилізації глюкози і призводить до нормалізації вмісту глюкози в крові вже через 1–2 години (лінія *a* на графіку).



При низці патологій підвищення вмісту цукру в крові після цукрового навантаження досягає значно більших величин і зберігається більш тривалий час (лінія б на графіку).

Гіпоглікемія спостерігається при передозуванні інсуліну (при лікуванні діабету), аденомах підшлункової залози (унаслідок збільшення синтезу інсуліну β-клітинами острівців Лангерганса), гіпотиреозі, а також при голодуванні і тривалій фізичній роботі.

У нормі в здорової людини із сечею за добу виділяється до 0,02 % глюкози, яку не виявляють звичайними методами. Поява глюкози в сечі у великій кількості, або глюкозурія, має різні причини. Однією з них може бути гіперглікемія, при якій рівень цукру в крові перевищує нирковий поріг для глюкози (8–10 мМ). Іншою причиною може бути захворювання нирок, пов'язані з порушенням реабсорбції (зворотного всмоктування) глюкози в ниркових каналцях.

### **Контрольні питання за темою «Метаболізм вуглеводів і його регуляція»**

1. Аеробне і анаеробне окислення глюкози, загальна характеристика процесів.
  2. Анаеробне окислення глюкози. Послідовність реакцій і ферменти гліколізу.
  3. Аеробне окислення глюкози. Етапи перетворення глюкози до  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$ .
  4. Окислювальне декарбоксілювання пірувату. Ферменти, коферменти і послідовність реакцій у мультиферментному комплексі.
  5. Утворення АТФ під час гліколізу; субстратне фосфорилування і човникові механізми переносу гліколітичного НАДН у мітохондрії.
  6. Порівняльна характеристика біоенергетики аеробного й анаеробного окислення глюкози, ефект Пастера.
  7. Фосфоролітичний шлях розщеплення глікогену в печінці та м'язах. Регуляція активності глікогенфосфорилази.
  8. Біосинтез глікогену: ферментативні реакції, фізіологічне значення. Регуляція активності глікогенсинтази.
  9. Механізми регуляції глікогенолізу і глікогенезу за участі каскадного цАМФ-залежного фосфорилування ферментних білків.
  10. Генетичні порушення метаболізму глікогену (глікогенози, аглікогенози).
  11. Глюконеогенез: субстрати, ферменти і фізіологічне значення процесу.
  12. Глюкозо-лактатний цикл (цикл Корі) та глюкозо-аланіновий цикл.
  13. Глюкоза крові (глюкоземія): нормоглікемія, гіпо- і гіперглікемія, глюкозурія.
- Цукровий діабет – патологія обміну глюкози, його типи.
14. Гормональна регуляція концентрації та обміну глюкози крові.
  15. Пентозофосфатний шлях окислення глюкози: схема процесу та біологічне значення.
  16. Метаболічні шляхи перетворення фруктози і галактози; спадкові ензимопатії їхнього обміну.

## Тема 2. Метаболізм ліпідів і його регуляція

До ліпідів належать різноманітні слабо полярні органічні сполуки, які погано розчиняються у воді, але є розчинними в органічних неполярних розчинниках.

За хімічним складом можна виділити декілька груп ліпідів: складні ефіри спиртів і жирних кислот (ацилгліцероли, воски), сфінголіпіди (сфінгофосфоліпіди та сфінгогліколіпіди), ейкозаноїди, стероїди і терпени. За властивостями виділяють також нейтральні ліпіди (триацилгліцероли, воски, стероїди) та полярні ліпіди (фосфо- та гліколіпіди).

Жирні кислоти є енергетично ємними молекулами й окислюються в організмі з виділенням енергії або запасуються у складі триацилгліцеролів, головним чином в адипоцитах жирової тканини. Фосфо- та гліколіпіди є основними компонентами біомембран. Ейкозаноїди – це похідні поліненасичених жирних кислот (насамперед арахідонової кислоти) і поділяються за особливостями структури та функцій на простагландини, лейкотрієни і тромбосани. Ейкозаноїди виконують регуляторні функції. Стероїдами є холестерин та його похідні – жовчні кислоти, стероїдні гормони, вітамін D. Холестерин є необхідним компонентом клітинних мембран.

До організму людини і тварин з їжею надходять, головним чином, триацилгліцероли (жири і масла) та холестерин.

Розщеплення триацилгліцеролів (ліполіз) відбувається східчасто з утворенням проміжних продуктів – диацилгліцеролів, моноацилгліцеролів і жирних кислот. Емульгування жирів жовчними кислотами у 12-палій кишці полегшує перетравлювання і всмоктування жирних кислот.

Внутрішньоклітинний катаболізм ліпідів включає розщеплення триацилгліцеролів під впливом тканинних ліпаз з наступним окисленням гліцерину (у гліколізі і далі в циклі Кребса) і жирних кислот ( $\beta$ -окислення в мітохондріях). Ацетил-КоА, що утворився, далі може окислитися в циклі Кребса або використовуватися для синтезу інших жирних кислот чи холестерину. Значна частина жирних кислот може використовуватися для синтезу мембранних ліпідів.

Холестерин, який надходить з їжею і синтезується в організмі, може вбудовуватись у мембранні структури або використовується для утворення біологічно активних похідних.

Як і обмін вуглеводнів, ліпідний обмін регулюється гормонально – адреналіном, глюкагоном, інсуліном. Інсулін активує біосинтез жирів, а також збільшує вміст НАДФН, який утворюється в пентозофосфатному циклі. Адреналін і глюкагон, а також глюкостероїди активують ліпазу жирової тканини та сприяють утилізації жирів.

### Лабораторна робота 3

#### Визначення вмісту загальних ліпідів у сироватці крові

Визначення вмісту загальних ліпідів у сироватці крові часто використовується в лабораторній діагностиці як один із показників ліпідного обміну.

*Принцип методу:* продукти розпаду ненасичених ліпідів утворюють з ваніліновим реактивом забарвлені сполуки. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації ліпідів у пробі.

*Матеріали і реактиви:*

1. Концентрована сірчана кислота.
2. Фосфорнованіліновий реактив: 10 мМ ванілін, 11,5 М ортофосфорна кислота.

3. Калібратор ліпідів – 8 г/л.

*Хід роботи.* Аналіз проводять відповідно до схеми, поданої в таблиці.

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба	Стандарт	Холоста проба
Сироватка крові	0,01	–	–
Сірчана кислота конц.	1,0	1,0	1,0
Калібратор ліпідів	–	0,01	–
Перемішати і витримати на киплячій водяній бані 10 хвилин. Після охолодження пробірок холодною водою протягом 5 хвилин обережно відміряти в пробірки			
Фосфорнованіліновий реагент	2,0	2,0	2,0
Вміст змішати, пробірки інкубувати 25 хвилин при температурі від +20 °С до +25 °С у темряві, потім охолодити 2 хвилини в холодній воді, не більше ніж через 10 хвилин виміряти оптичну щільність дослідної проби та стандарту при 540 нм і довжині оптичного шляху 0,5 або 1 см проти холостої проби			

Розрахунок здійснюють за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{калібр}}} \times 8,0 \text{ г / л ,}$$

де С – концентрація загальних ліпідів у пробі, г/л;

$E_{\text{досл.}}$  – екстинкція дослідної проби;

$E_{\text{калібр}}$  – екстинкція стандарту;

8,0 – концентрація загальних ліпідів у калібрувальному розчині, г/л.

**Клініко-діагностичне значення.** Вміст загальних ліпідів у сироватці крові здорових людей складає від 4 до 8 г/л. Фізіологічна (аліментарна) гіперліпемія розвивається через 2–3 години після прийому їжі, багатой жири, і максимальних значень досягає через 4–6 годин.

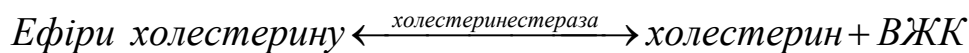
Підвищення вмісту загальних ліпідів у сироватці крові спостерігається при низці захворювань: діабеті (знімається введенням інсуліну), ліпоїдному нефрозі, токсикозах, цирозі, гострому гепатиті, ожирінні, атеросклерозі, ішемічній хворобі серця, гіпотиреозі, панкреатиті, зловживанні алкоголем, а також при голодуванні. Зниження вмісту ліпідів у сироватці крові спостерігається при гіпертиреозі, гіпотрофії тощо.

### **Лабораторна робота 4**

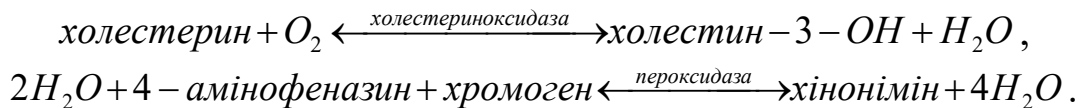
#### **Визначення вмісту холестерину в сироватці крові ферментативним методом**

Біохімічні дослідження вмісту в крові холестерину і його ефірів мають важливе діагностичне значення. Найбільш розповсюдженим захворюванням, пов'язаним з порушенням обміну холестерину, є атеросклероз. При атеросклерозі вміст холестерину в сироватці крові зростає і відбувається його відкладення в стінках артерій.

Принцип методу:



(ВЖК – вільні жирні кислоти),



Інтенсивність рожево-червоного або бузкового забарвлення реакційного розчину пропорційна концентрації холестерину.

Склад набору:

1. Ензимний реагент – 2 флакони по (100±2) мл або 4 флакони по (50±2) мл:

- холестеринестераза (150±15) Е/л;
- холестериноксидаза (100±10) Е/л;
- пероксидаза (5±0,5) КЕ/л;
- 4-амінофеназон (0,3±0,015) моль/л;
- фенол (30±1,5) ммоль/л;
- ТРІС (рН 6,7) (30±1,5) ммоль/л.

2. Калібрувальний розчин холестерину – 1 ампула або флакон з (1,5±0,1) мл з концентрацією (5,17±0,1) ммоль/л.

Обладнання:

1. Фотометричне обладнання, яке забезпечує вимірювання оптичної щільності при 546 (500–520) нм у діапазоні (0–1,0) од. оптичної щільності. Кювети з довжиною оптичного шляху 5 або 10 мм.

2. Автоматична водяна баня або термостат, що підтримує температуру плюс  $(37 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ .

3. Пробірки місткістю 10 мл.

4. Піпетки місткістю 1, 2, 5 та 0,05 мл.

*Зразок для аналізу:*

Свіжа сироватка або плазма крові. Гемоліз неприпустимий.

*Приготування робочих розчинів:*

1. **Ензимний реагент** готовий до роботи. Після використання реактиву для аналізу НЕГАЙНО закрийте флакон, щоб уникнути випаровування реактиву.

2. **Калібрувальний розчин** холестерину – готовий до роботи. Концентрація холестерину в розчині  $(5,17 \pm 0,1)$  ммоль/л  $(2,0 \pm 0,04)$  мг/мл.

*Проведення аналізу:*

аналіз проводять відповідно до схеми, поданої в таблиці.

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Ензимний реагент	2,00	2,00	2,00
Зразок для аналізу	0,02	–	–
Калібрувальний розчин холестерину	–	0,02	–
Дистильована вода	–	–	0,02

Розчин у пробірці ретельно перемішують і витримують у термостаті при плюс  $37 ^\circ\text{C}$  протягом 10 хв або інкубують 20 хв при температурі плюс  $(20-25) ^\circ\text{C}$ . Вимірюють оптичну щільність дослідної проби ( $E_{\text{дос}}$ ) і калібрувальної проби ( $E_{\text{кал}}$ ) проти холостої проби. Остаточне забарвлення (рожево-червоне або бузкове) стабільне протягом 60 хв після закінчення інкубації за умови запобігання потраплянню прямого сонячного світла

Розрахунок провадять за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{калібр.}}} \times 5,17 \text{ ммоль / л,}$$

де  $C$  – концентрація холестерину в пробі, ммоль/л;

$E_{\text{досл.}}$  – оптична щільність дослідної проби, од. оптичної щільності;

$E_{\text{калібр.}}$  – оптична щільність калібрувальної проби, од. оптичної щільності;

5,17 – концентрація холестерину в калібрувальному розчині, ммоль/л.

**Клініко-діагностичне значення.** Нормальний вміст холестерину в крові людини складає 3,0–6,26 ммоль/л. Збільшення вмісту холестерину в крові – найвірогідніший фактор ризику розвитку коронарного атеросклерозу, ішемічної хвороби серця та інфаркту міокарда. Найвищий рівень

холестерину зафіксований при генетичних порушеннях в обміні ліпопротеїнів. Вторинна гіперхолестеринемія спостерігається при захворюваннях печінки, хворобах нирок (гломерулонефриті, нефротичному синдромі з набряками, хронічній нирковій недостатності), злякисних пухлинах підшлункової залози, гіпертонічній хворобі, ендокринних захворюваннях. Дуже високий вміст холестерину в крові (у п'ять разів вище нормального) відзначено при цукровому діабеті та ліпоїдному нефрозі.

У якості речовин гіпохолестеринемічної дії застосовуються деякі інгібітори біосинтезу холестерину.

Гіпохолестеринемія спостерігається в період голодування, при гіпотиреозі, гострих інфекційних захворюваннях, пневмонії, бронхіті, анемії, гемолітичній жовтяниці, злякисних пухлинах печінки, гострому гепатиті тощо.

### **Лабораторна робота 5** **Якісна проба на кетоніві тіла**

Кетоніві тіла (ацетоацетат,  $\beta$ -гідроксибутират і ацетон) синтезуються в мітохондріях печінки з ацетил-КоА. В умовах зниження утилізації глюкози тканинами (голодування, цукровий діабет, зміна дієти тощо) синтез кетонівих тіл значно підсилюється, кетоніві тіла надходять із печінки в кров і використовуються як джерело енергії в інших органах і тканинах.

*Хід роботи.* У пробірку помістити 2–3 мл сечі, яка містить кетоніві тіла, додати кілька крапель свіжоприготованого розчину нітропрусиду Na, потім кілька крапель 10 % розчину NaOH та 0,5 мл льодової оцтової кислоти. Рідина забарвлюється у вишнево-червоний колір, що свідчить про присутність ацетооцтової кислоти та ацетону.

**Клініко-діагностичне значення.** Вміст кетонівих тіл у плазмі крові здорової людини дуже невеликий – до 10 мг/л. Із сечею за добу виділяється 20–40 мг кетонівих тіл.

Збільшення кількості кетонівих тіл у крові (кетонемія) та сечі (кетонурія) спостерігається при цукровому діабеті, дефіциті вуглеводнів у харчуванні (вуглеводне голодування), тиреотоксикозі, ураженні печінки, важких інтоксикаціях.

### **Лабораторна робота 6** **Фурфуролова проба на жовчні кислоти**

Жовчні кислоти є похідними холестерину і беруть участь в емульгуванні ліпідів їжі. Реакція зумовлена утворенням забарвлених у червоний колір продуктів конденсації жовчних кислот з оксиметилфурфуролом.

Оксиметилфурфурол утворюється при взаємодії сахарози з концентрованою сірчаною кислотою.

*Хід роботи.* До 10 крапель розведеної в 3 рази жовчі додати 1 краплю 5 % розчину сахарози і обережно по стінці підшарувати 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. На межі розділу двох рідин з'являється забарвлений у червоний колір продукт конденсації жовчних кислот з оксиметилфурфуролом, який утворився із сахарози.

### **Клініко-діагностичне значення**

При механічній жовтяниці внаслідок закупорки загального жовчного протоку каменем або пухлиною жовчні капіляри переповнюються жовчю, і вона проникає в кров. У цьому випадку відбувається посилене виділення жовчних пігментів (білірубін, білівердин) та жовчних кислот із сечею.

### ***Контрольні питання за темою «Метаболізм ліпідів і його регуляція»***

1. Катаболізм триацилгліцеролів в адипоцитах жирової тканини: послідовність реакцій, механізми регуляції активності триацилгліцеролліпази.
2. Нейрогуморальна регуляція ліполізу за участі адреналіну, норадреналіну, глюкагону та інсуліну.
3. Реакції окислення жирних кислот ( $\beta$ -окислення); роль карнітину в транспортуванні жирних кислот у мітохондрії.
4. Енергетичний баланс  $\beta$ -окислення жирних кислот у клітинах.
5. Окислення гліцерину: ферментативні реакції, біоенергетика.
6. Кетонові тіла. Реакції біосинтезу й утилізації кетонових тіл, фізіологічне значення.
7. Порушення обміну кетонових тіл при патологіях (цукровий діабет, голодування).
8. Біосинтез вищих жирних кислот: реакції біосинтезу вищих жирних кислот і регуляція процесу.
9. Біосинтез моно- і поліненасичених жирних кислот в організмі людини.
10. Біосинтез триацилгліцеролів і фосфоліпідів.
11. Метаболізм сфінголіпідів. Генетичні аномалії обміну сфінголіпідів – сфінголіпідози.
12. Біосинтез холестеролу: схема реакцій, регуляція синтезу холестеролу.
13. Шляхи біотрансформації холестеролу: етерифікація, утворення жовчних кислот, стероїдних гормонів, вітаміну D<sub>3</sub>.
14. Циркуляторний транспорт і депонування ліпідів у жировій тканині. Ліпопротеїнліпаза ендотелію.
15. Ліпопротеїни плазми крові: ліпідний і білковий склад. Гіперліпопротеїнемії.
16. Патології ліпідного обміну: ожиріння, цукровий діабет.
17. Біохімічний склад, будова і функції біологічних мембран.
18. Компартменталізація біохімічних процесів у клітинах.
19. Роль ліпідів у побудові біологічних мембран. Рідинно-мозаїчна модель біомембран.

**Тема 3.**  
**Метаболізм амінокислот.**  
**Ензимопатії амінокислотного обміну**

У живих організмах постійно відбувається інтенсивне оновлення білкових молекул. Амінокислоти, які утворюються при гідролізі ендогенних білків, можуть використовуватися для біосинтезу нових білків або для синтезу біологічно важливих азотовмісних сполук (пуринових і піримідинових основ, деяких гормонів тощо).

Білковий обмін в організмі людини і тварин значною мірою залежить від надходження з їжею достатньої кількості білків, які містять повний набір незамінних амінокислот (повноцінні білки). Для людини незамінними амінокислотами є лізин, аргінін, гістидин, валін, лейцин, ізолейцин, треонін, метіонін, фенілаланін, триптофан.

Білки їжі, що надходять до організму, зазнають у травному тракті гідролітичного розщеплення до амінокислот, які внаслідок всмоктування в тонкому кишечнику надходять у кров, через воротну вену – далі в печінку, де включаються в тканинний обмін. Частина амінокислот із печінки надходить до системи кровообігу і зазнає утилізації тканинами, а частина дезамінується і перетворюється або на ацетил-КоА (кетогенні амінокислоти), або на метаболіти циклу Кребса і піруват (гликогенні).

У тканинах амінокислоти використовуються для синтезу білків або зазнають дезамінування, трансамінування, декарбоксилування, метилювання, залежно від того, чи використовуються вони для синтезу спеціалізованих біологічно активних сполук (див. таблицю), чи беруть участь в енергетичному обміні.

Катаболізм більшості амінокислот починається з реакцій трансамінування (зворотне перенесення аміногрупи від  $\alpha$ -амінокислоти на  $\alpha$ -кетокислоту), які каталізуються амінотрансферазами. Аміногрупи різних амінокислот при трансамінуванні переносяться, головним чином, на  $\alpha$ -кетоглутарову кислоту з утворенням глутамінової кислоти, яка далі може зазнавати окислювального дезамінування до імінокислоти, а потім гідролітично розщеплюється на кетокислоту ( $\alpha$ -кетоглутарову кислоту) і аміак. Ця реакція каталізується глутаматдегідрогеназою.

Амінокислоти	Похідні
Сумарно	Білки, поліпептиди, гормони пептидної природи, нейромедіатори тощо
Тирозин	Катехоламіни, тироксин
Триптофан	Серотонін
Гістидин	Гістамін
Глутамат	$\gamma$ -аміномасляна кислота
Гліцин, аргінін, метіонін	Креатин

Метіонін, серин	Холін
Гліцин	Порфірини
Гліцин, аспарат	Нуклеотиди
Гліцин, аланін, серин, триптофан, валін, аспарат, глутамат та ін.	Ліпіди
Фенілаланін, тирозин, лейцин, лізин, триптофан та ін.	Ліпіди
Орнітин, цитрулін, аргінін, аспарат	Сечовина

Аміак, що вивільнюється, використовується для відновлювального амінування кетокислот, синтезу піримідинових нуклеотидів та деяких інших речовин. При накопиченні аміак є досить токсичним, і в організмі є декілька механізмів, що знешкоджують аміак. У печінці здійснюється основний механізм знешкодження аміаку – синтез сечовини, яка є головним кінцевим продуктом білкового обміну в організмі людини і є значно менш токсичною, ніж інші азотовмісні продукти обміну. Додатковим механізмом є зв'язування аміаку глутаміною і аспарагіною кислотами з утворенням амідів (глутаміну і аспарагіну). Глутамін є транспортною формою аміаку у тварин. У вигляді глутаміну аміак транспортується в печінку і нирки.

Дослідження вмісту небілкового азоту сироватки крові і сечі, а також співвідношення білкового і небілкового азоту в крові дають розуміння про обмін білків в організмі й окремих тканинах, про баланс процесів біосинтезу та деградації білків. Основний внесок у небілковий азот крові роблять сечовина (50–60 %), а також вільні амінокислоти і нуклеотиди, креатин, білірубін, сечова кислота. У загальний азот сечі включають суму всіх азотовмісних речовин: сечовини (80–90 %), амонійних солей (4–6 %), креатиніну (2–7 %), а також індикану, гіпурової кислоти, глюкуронової кислоти, сечової кислоти та вільних амінокислот.

## **Лабораторна робота 7**

### **Визначення активності амінотрансфераз**

Активність амінотрансфераз (насамперед аланін- і аспарат-аміно-трансфераз – АЛАТ та АсАТ відповідно) розглядається як один із важливих показників обміну білків і амінокислот.

*Принцип методу:* при трансамінуванні L-аланіну і  $\alpha$ -кетоглутарату при дії АЛАТ утворюються піруват і L-глутамінова кислота. Визначення базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразонів  $\alpha$ -кетоглутарату і пірувату в лужному середовищі. Оскільки гідразон пірвіноградної кислоти має більш високий коефіцієнт молярної екстинкції, то виявляється прямо пропорційна залежність оптичної щільності реакційного розчину від активності ферменту.

*Матеріали і реактиви:*

1. Субстратно-буферний розчин АЛАТ:

фосфатний буфер ( $0,1 \pm 0,005$ ) мМ;D, L-аланін ( $0,2 \pm 0,01$ ) М;2-оксоглутарова кислота ( $2 \pm 0,1$ ) М.2. Стоп-реагент (розчин 2,4-динітрофенілгідразину – ( $1 \pm 0,05$ ) мМ у розчині азотної кислоти ( $1 \pm 0,005$ ) мМ.3. Калібрувальний розчин піровинограднокислого натрію ( $2 \pm 0,1$ ) мМ, ( $220 \pm 11$ ) мг/мл (що відповідає 176 мкг/мл піровиноградної кислоти).4. Розчин гідроокису натрію ( $4 \pm 0,2$ ) М або сухий NaOH.*Хід роботи.* Аналіз проводиться за схемою, наведеною в таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна або калібрувальна проба	Холоста проба
Субстратно-буферний розчин	0,4	0,4
Інкубувати 3 хвилини при $+37^{\circ}\text{C}$		
Стоп-реагент	–	0,4
Сироватка крові	0,08	0,08
Інкубувати 60 хвилини при $+37^{\circ}\text{C}$		
Стоп-реагент	0,4	–
Витримати 20 хвилин при кімнатній температурі		
Розчин гідроокису натрію 0,4 н	4,0	4,0
Витримати 10 хвилин при кімнатній температурі. Виміряти оптичну щільність дослідної проби проти холостої при довжині хвилі 500–550 нм		

Розрахунок активності ферменту в сироватці крові проводять за калібрувальним графіком. Побудова калібрувального графіка проводиться відповідно до даних таблиці 2.

Таблиця 2

## Графік калібрування для 1 години інкубації

Відміряти в пробірку, мл	Точки калібрування					Контрольна проба
	1	2	3	4	5	
Субстратно-буферний розчин	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,5
Розчин калібрування	0,05	0,10	0,15	0,2	0,25	–
Дистильована вода або фізіологічний розчин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Стоп-реагент	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Витримати 20 хвилин при кімнатній температурі						
Розчин гідроокису натрію 0,4 н	5,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Витримати 10 хвилин при кімнатній температурі. Виміряти оптичну щільність проб калібрування проти контрольної проби. Фотометрію проводити як для дослідного зразка. При побудові графіка калібрування на вісі абсцис – величини активності АЛАТ, виражені в мікромолях піровиноградної кислоти на 1 мл сироватки за 1 годину інкубації						
Активність у мкмоль/год·мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	0,0

Лінійність графіка калібрування має зберігатися до величини екстинкції 0,35.

Нормальна активність АЛАТ у сироватці крові складає (0,1–0,68) мкмоль/год·мл при +37 °С.

**Клініко-діагностичне значення.** Діагностичне значення мають дві амінотрансферази: АЛАТ і АсАТ. Підвищення їхньої активності в крові є чутливим показником порушення функцій печінки і серця.

Для діагностики інфаркту міокарда визначають активність наступних ферментів: креатинкінази, ЛДГ, АсАТ, АЛАТ. При інфаркті міокарда активність АсАТ у сироватці крові підвищується, починаючи з 8–12 годин; максимальна активність досягається через 24–36 годин, а її повернення до нормального рівня відбувається на 4–6 день. У хворих на інфаркт міокарда активність АсАТ у сироватці крові у 2–10 разів вища за верхнє значення норми. Співвідношення активностей АсАТ/АЛАТ при інфаркті міокарда в більшості випадків перевищує 2, а співвідношення менше 1 переважно вказує на ураження печінки.

Підвищена активність ферментів у сироватці крові при захворюваннях печінки є наслідком пошкодження гепатоцитів. Такі пошкодження, незалежно від причини, зумовлюють зростання активності амінотрансфераз не менше, аніж у 10 разів. Токсичне пошкодження печінки, наприклад, при отруєнні парацетамолом, призводить до підвищення активності АЛАТ і АсАТ у 50–100 разів. Значне зростання активності амінотрансфераз виявляють при вірусному гепатиті.

Активність АЛАТ і АсАТ при деяких захворюваннях

Фермент	Захворювання						
	Інфаркт міокарда	Стенокардія	Міокардит	Гострий гепатит	Хронічний гепатит	Цироз печінки	Обтураційна жовтяниця
АсАТ	++	±	±	+	±	±	– або ±
АЛАТ	±	±	+	++	±	±	– або ±
+ – норма							
± – активність ферменту підвищена							
++ – активність ферменту сильно підвищена							

## Лабораторна робота 8

### Визначення концентрації сечовини в сироватці крові і сечі

Сечовина – основний кінцевий продукт азотного катаболізму в організмі ссавців. Вміст сечовини в плазмі крові – важливий показник стану печінки, де вона утворюється при знешкодженні аміаку, і нирок, які регулюють її надходження в сечу (при цьому деяка частина її може реабсорбуватися). Крім того, концентрація сечовини свідчить про співвідношення між азотним катаболізмом і анаболізмом в організмі.

**Принцип методу.** Сечовина утворює з діацетилмонооксидом у кислому середовищі в присутності тіосемикарбазиду і солей  $\text{Fe}^{3+}$  комплекс червоного кольору, за інтенсивністю забарвлення якого визначають концентрацію сечовини.

**Матеріали і реактиви:**

1. Розчин діацетилмонооксиду.
2. Розчин тіосемикарбазиду.
3. Розчин калібрування сечовини – 16,65 мМ.
4. Розчин трихлороцтової кислоти 50 %.
5. Розчин сірчаної кислоти 15 %.

Зразок для аналізу: сироватка крові, сеча (розведена в 50 або 100 разів).

**Хід роботи.** Роботу проводять згідно з таблицею.

	Дослідна проба	Еталон	Холоста проба
Сироватка крові або розведена сеча	0,02	–	–
Калібратор сечовини (розчин)	–	0,02	–
Фізіологічний розчин	–	–	0,02
Розчин діацетилмонооксиду	2,0	2,0	2,0
Розчин тіосемикарбазиду	2,0	2,0	2,0

У пробірки відміряти послідовно згідно з таблицею зразок для аналізу і робочі розчини. Для зменшення помилки аналізу рекомендується дотримуватися вказаного порядку змішування розчинів.

Пробірки закрити алюмінієвою фольгою і поставити в киплячу водяну баню на 10 хвилин. Потім охолодити їх і виміряти на ФЕК оптичну щільність проби ( $E_{\text{досл.}}$ ) і еталону ( $E_{\text{еталон}}$ ) проти холостої проби при довжині хвилі 540–560 нм.

**Розрахунок** концентрації сечовини в дослідній пробі:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{еталону}}} \times C_{\text{етал.}},$$

де  $C_{\text{етал.}}$  – концентрація сечовини в еталоні – дорівнює 16,65 мМ.

У нормі вміст сечовини в сироватці крові складає 1,7–8,32 мМ.

**Розрахунок** концентрації сечовини в сечі за добу:

$$C \text{ г / добу} = C_{\text{дослід.}} \times \frac{A \times K}{B \times 1000},$$

де А – добова кількість сечі, мл;

В – кількість сечі, взятої для аналізу, мл;

К – коефіцієнт розведення сечі;

1000 – коефіцієнт переведення величини екскреції сечовини з мг у г.

У нормі вміст сечовини в сечі складає 333–583 мМ/добу, 20–35 г/добу.

**Клінічно-діагностичне значення.** Відхилення від нормального вмісту сечовини залежить від швидкості процесів синтезу сечовини та її виведення. Вміст сечовини в сироватці крові і сечі може змінюватися внаслідок ураження деяких органів, головним чином, печінки та нирок.

Підвищений вміст сечовини в сироватці крові – уремію – спостерігають при захворюванні нирок. При цьому вміст сечовини в сечі зменшується. Уремію спостерігають також при патологіях, які супроводжуються інтенсивним розпадом білка (сепсис, туберкульоз, опіки, перитоніти). Вміст сечовини в сечі при цьому зростає.

Крім того, зростання рівня сечовини в сироватці крові може відбуватися у випадку втрати рідини (блювота, діарея, зневоднення).

Порушення сечовиноутворюючої функції печінки внаслідок цирозу, гострого жирового гепатозу, отруєння фосфором, миш'яком та іншими отрутами призводить до зменшення синтезу сечовини, зниженню вмісту її в крові і зменшенню виведення її із сечею. У цих випадках збільшується виділення з сечею інших азотовмісних речовин: амінокислот, креатиніну, аміаку тощо.

Вміст сечовини в біологічних рідинах залежить також від характеру харчування: при споживанні багатої на білки їжі вміст сечовини в сироватці крові і сечі збільшується, у випадку безбілкової дієти – зменшується.

Рівень сечовини в біологічних рідинах може змінюватися під впливом деяких препаратів. Збільшується вміст сечовини в крові при прийомі анаболічних стероїдів, а також під впливом нефротоксичних лікарських препаратів.

### ***Контрольні питання за темою «Метаболізм амінокислот. Ензимопатії амінокислотного обміну»***

1. Пул вільних амінокислот в організмі: шляхи надходження і використання вільних амінокислот у тканинах.
2. Трансамінування амінокислот: реакції та їхнє біохімічне значення, механізми дії амінотрансфераз.
3. Пряме і непряме дезамінування вільних L-амінокислот у тканинах.
4. Декарбоксілювання L-амінокислот в організмі людини. Фізіологічне значення продуктів, що утворилися. Окислення біогенних амінів.
5. Шляхи утворення і знешкодження аміаку в організмі.
6. Біосинтез сечовини: послідовність ферментних реакцій біосинтезу, генетичні аномалії ферментів циклу сечовини.
7. Загальні шляхи метаболізму вуглецевих скелетів амінокислот в організмі людини. Глюкогенні і кетогенні амінокислоти.
8. Біосинтез і біологічна роль креатину і креатинфосфату. Креатинін.
9. Глутатіон: будова, біосинтез та біологічні функції.
10. Спеціалізовані шляхи метаболізму циклічних амінокислот фенілаланіну та тирозину.
11. Спадкові ензимопатії обміну циклічних амінокислот фенілаланіну і тирозину.
12. Обмін циклічної амінокислоти триптофану і його спадкові ензимопатії.

# **РОЗДІЛ 3**

## **МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ. БІОХІМІЯ МІЖКЛІТИННИХ КОМУНІКАЦІЙ**



### **Тема 1, 2.**

#### **Основи молекулярної біології. Основи молекулярної генетики**

Нуклеїнові кислоти – біополімери, мономерами яких є нуклеотиди, що з'єднані між собою фосфодіестерними зв'язками. Нуклеотиди складаються з трьох компонентів: азотної основи (аденіну, гуаніну, цитозину, урацилу або тиміну), моносахариду (D-рибози або 2-дезоксид-рибози) і осфоруної кислоти. Залежно від типу мономерних ланок (дезоксирибонуклеотиди або рибонуклеотиди), які входять до складу нуклеїнових кислот, розрізняють дезоксирибонуклеїнові (ДНК) і рибонуклеїнові (РНК) кислоти. Молекули ДНК, як правило, складаються з двох полінуклеотидних ланцюгів, тоді як молекули РНК в основному є одноланцюговими.

Обидва типи нуклеїнових кислот (ДНК і РНК) присутні в усіх клітинних організмах, і тільки віруси можуть містити один тип полімеру.

Функції нуклеїнових кислот полягають у зберіганні, передаванні та реалізації генетичної інформації.

В еукаріотичних організмах ДНК локалізована в основному в ядрах клітин, у прокариот вона утворює нуклеоїд, у якому міститься вся бактеріальна хромосома. Мітохондрії і хлоропласти мають свою власну ДНК. Окрім того, у цитоплазмі багатьох прокариот та нижчих еукаріот виявлено позахромосомні ДНК – плазміди.

У клітинах як про-, так і еукаріот присутні РНК трьох основних типів: інформаційна (матрична, мРНК), транспортна (тРНК) та рибосомна (рРНК); мРНК є матрицею для синтезу білка; тРНК переносять специфічні амінокислоти до місця білкового синтезу і, власне кажучи, переводять послідовність нуклеотидів мРНК у послідовність амінокислотних залишків поліпептиду; рРНК є структурною функціональною основою рибосом.

### **Лабораторна робота 1**

#### **Визначення складу нуклеопротейдів**

У клітині нуклеїнові кислоти, головним чином, знаходяться в комплексі з білками, тобто у вигляді нуклеопротейдів. Залежно від типу нуклеїнової кислоти розрізняють дезоксирибонуклеопротейди – хроматин, і рибонуклеопротейди – рибосоми, інформосоми, РНК-містки віруси.

Гідроліз нуклеопротейдів дає можливість визначити їхній хімічний склад за допомогою якісних реакцій.

Одним із джерел для виділення нуклеопротейдів є дріжджі.

1. Біуретова реакція. До 5-ти крапель гідролізату додати 10 крапель 10 % розчину NaOH і 1 краплю  $\text{CuSO}_4$ . Фіолетове забарвлення свідчить про наявність у гідролізаті пептидів.

2. Проба на пуринові основи. 10 крапель гідролізату нейтралізувати однією краплею концентрованого розчину  $\text{NH}_4\text{OH}$  і додати 5 крапель 1 % розчину  $\text{AgNO}_3$ . За кілька хвилин утвориться пухкий осад сполук пуринових основ із сріблом, що забарвлений у бурий колір.

3. Якісна реакція на вуглеводневий компонент. До 5–7 крапель гідролізату додати 1–2 краплі  $\alpha$ -нафтолу, перемішати й обережно нашарувати 0,5 мл концентрованої  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . На межі розділу рідин з'являється фіолетове кільце, що свідчить про наявність вуглеводневого компонента в нуклеопротейдах.

4. Молібденова проба на фосфорну кислоту. До 10-ти крапель молібденового реактиву (розчин молібдату амонію в азотній кислоті) додати 5 крапель гідролізату і кип'ятити суміш на полум'ї пальниці. У присутності фосфорної кислоти рідина забарвлюється в лимонний колір. Після охолодження в струмені води спостерігається поява жовтого кристалічного осаду фосфомолібдату амонію, що утворився.

## **Лабораторна робота 2**

### **Визначення концентрації сечової кислоти**

Перетравлення нуклеопротейдів їжі починається в шлунку, де при дії пепсину і соляної кислоти вони розпадаються на поліпептиди та нуклеїнові кислоти. Останні під впливом ферментів тонкого кишечника гідролізуються спочатку до мононуклеотидів, а потім до нуклеозидів і осфорної кислоти. У кишечнику здійснюється всмоктування в основному нуклеозидів, але можливий і подальший розпад нуклеозидів до вільних азотних основ і пентоз, які потім надходять до кров'яного руслу.

І нуклеозиди, і вільні азотні основи можуть частково використовуватися для синтезу нуклеїнових кислот і нуклеотидів, однак надходження до організму з їжею азотних основ, мабуть, не має вирішального значення. Синтез нуклеїнових кислот визначається швидкістю синтезу гетероциклічних основ de novo з низькомолекулярних азотних і безазотних попередників: аспарагінової кислоти та карбамоїлфосфату – для піримідинових нуклеотидів, і активованої форми рибози, гліцину, глутаміну,  $\text{CO}_2$ , аспарагінової кислоти та похідних тетрагідрофолату – для пуринових нуклеотидів.

У тканинах, насамперед у печінці, вільні пуринові основи як екзогенного, так і ендogenous походження зазнають катаболізму з утворенням

сечової кислоти – кінцевого продукту пуринового обміну в людини і більшості ссавців, птахів та деяких рептилій. Кінцевими продуктами розпаду піримідинів є  $\text{CO}_2$ , аміак (виводиться у вигляді сечовини),  $\beta$ -аланін та  $\beta$ -аміноізомаляна кислота. Існує складна система регуляції синтезу, повторного використання і розпаду азотних основ. Порушення цих регуляторних механізмів особливо різко позначається на обміні пуринів. Зниження біосинтезу пуринів спричинює обмеження росту і розмноження клітин, тоді як посилений розпад пуринів до сечової кислоти, яка погано розчиняється у воді, супроводжується її відкладенням у суглобах (подагра). У нормі сечова кислота, яка утворюється в печінці та тканинах при окисленні пуринів, надходить у кров і потім через нирки разом із сечею виділяється з організму.

*Принцип методу:* сечова кислота в лужному середовищі відновлює фосфорновольфрамний реактив у барвник синього кольору. Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна концентрації сечової кислоти в пробі, що аналізується.

*Матеріали і реактиви:*

1. Фосфорновольфрамний реактив:  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  –  $(0,12 \pm 0,01)$  М,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  –  $(0,47 \pm 0,05)$  М,  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  –  $(0,29 \pm 0,2)$  М.
2. Кислота сірчана  $(0,35 \pm 0,02)$  М.
3. Вольфрамат натрію  $(0,30 \pm 0,1)$  М.
4. Калібрувальний розчин сечової кислоти  $(300 \pm 3)$  мкМ або 0,05 г/л.
5. Карбонат натрію.

*Зразок:* сироватка крові, негемолізована плазма крові; сеча, розведена дистильованою водою в 10 разів.

*Хід роботи.* Аналіз проводиться відповідно до схеми, поданої в таблиці.

Відміряти в кювету, мл	Дослідна проба	Проба калібрування	Холоста проба
Дистильована вода	4,0	4,0	4,5
Сироватка (плазма), розведена сеча	0,5	–	–
Розчин калібрування сечової кислоти	–	05	–
Кислота сірчана	0,25	0,25	0,25
Вольфрамат натрію	0,25	0,25	0,25
Перемішати, витримати $10 \pm 1$ хв при кімнатній температурі (від $+20$ до $+25$ $^{\circ}\text{C}$ ), центрифугувати $10 \pm 1$ хв при 2000–5000 об/хв, відібрати необхідну кількість центрифугату (замість центрифугування допускається фільтрування одержаного розчину)			
Центрифугат (фільтрат)	3,0	3,0	3,0
Розчин карбонату натрію	1,5	1,5	1,5
Фосфорновольфрамний реактив	1,0	1,0	1,0
Перемішати, витримати $30 \pm$ хв при кімнатній температурі (від $+20$ до $+25$ $^{\circ}\text{C}$ ), виміряти оптичну щільність дослідної проби $E_{\text{дослід.}}$ і проби калібрування $E_{\text{калібр.}}$ проти холостої в кюветах завтовшки 10 мм при довжині хвилі 650 нм. Забарвлення стабільне протягом $30 \pm 2$ хв			

Розрахунок результатів:

$$C(\text{мкМ}) = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{Калібр}}} \times 300 \quad \text{або} \quad C(\text{г/л}) = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{Калібр}}} \times 0,05 .$$

Для розрахунку концентрації сечової кислоти в сечі одержане значення (С) необхідно помножити на коефіцієнт розведення – 10.

**Клініко-діагностичне значення.** У нормі із сечею в людини виділяється 1,60–3,54 ммоль/добу (270–600 мг/добу) сечової кислоти. Нормальна концентрація сечової кислоти в сироватці крові складає для чоловіків 240–530 мкМ (0,05–0,06 г/л), для жінок на 25 % менше – 185–440 мкМ (0,04–0,05 г/л).

Концентрація сечової кислоти в крові збільшується при важкій м'язовій роботі, прийманні їжі, багатій на нуклеопротейди, а також при лейкемії, анемії та інших захворюваннях.

При подагрі (відкладення в тканинах кристалів уратів, що спричинене вродженими ензимопатіями) спостерігається особливо різке збільшення концентрації сечової кислоти в крові, її концентрація може підвищуватися до 0,2 г/л і більше. Кристали уратів призводять до вивільнення в екстрацелюлярний простір як цитоплазматичних, так і лізосомальних ферментів; у тканинах розвивається асептичне запалення.

Для лікування подагри використовують препарати, які гальмують утворення сечової кислоти (алопуринол) або стимулюють її виведення нирками (антуран, цинхофен, алофан).

Зменшення вмісту сечової кислоти в сироватці крові спостерігають при хворобі Коновалова – Вільсона, деяких злоякісних новоутвореннях, при вживанні таких препаратів, як саліцилати, піперазин, алофан, кортикотропін.

***Контрольні питання за темою  
«Основи молекулярної біології»***

1. Азотні основи, нуклеозиди і нуклеотиди – складові компоненти молекул нуклеїнових кислот. Мінорні азотні основи і нуклеотиди.
2. Вільні нуклеотиди (АТФ, НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, ЦТФ, УТФ, 3', 5'-ГМФ) та їхні біохімічні функції.
3. Нуклеїнові кислоти. Загальна характеристика ДНК і РНК, їхнє біологічне значення в збереженні і передаванні генетичної інформації.
4. Особливості первинної структури ДНК і РНК. Зв'язки, які стабілізують первинну структуру нуклеїнових кислот.
5. Вторинна структура ДНК, роль водневих зв'язків в її утворенні (правила Чаргаффа, модель Уотсона – Кріка), антипаралельність ланцюгів.
6. Третинна структура ДНК. Фізико-хімічні властивості ДНК: взаємодія ДНК з катіонними лігандами, утворення нуклеосом.
7. Молекулярна організація ядерного хроматину еукаріотів: нуклеосомна організація; гістонові та негістонові білки.

8. Будова, властивості та біологічні функції РНК. Типи РНК: мРНК, тРНК, рРНК. Особливості структурної організації різних типів РНК.
9. Нуклеопротейди: будова, біологічні функції.
10. Біосинтез пуринових нуклеотидів: схема реакцій синтезу ІМФ; утворення АМФ і ГМФ; механізми регуляції.
11. Біосинтез піримідинових нуклеотидів: схема реакцій, регуляція синтезу.
12. Біосинтез дезоксирибонуклеотидів. Утворення тимідинових нуклеотидів, інгібітори біосинтезу дТМФ як протипухлинні засоби.
13. Катаболізм пуринових нуклеотидів; спадкові порушення обміну сечової кислоти.
14. Схема катаболізму піримідинових нуклеотидів.
15. Реплікація ДНК: біологічне значення; напівконсервативний механізм реплікації.
16. Послідовність етапів і ферменти реплікації ДНК у прокаріотів та еукаріотів.
17. Транскрипція: РНК-полімерази прокаріотів і еукаріотів, сигнали транскрипції (промоторні, ініціаторні та термінальні ділянки генома).
18. Процесинг – посттранскрипційна модифікація синтезованих мРНК.
19. Генетичний (біологічний) код; триплетна структура коду, його властивості.
20. Транспортні РНК і активація амінокислот. Аміноацил-тРНК-синтетаза.
21. Етапи і механізми трансляції (біосинтезу білка) у рибосомах: ініціація, елонгація і термінація. Процесинг.

### ***Контрольні питання за темою «Основи молекулярної генетики»***

1. Посттрансляційна модифікація пептидних ланцюгів. Регуляція трансляції.
2. Інгібітори транскрипції і трансляції в прокаріотів і еукаріотів: антибіотики та інтерферони – їхнє застосування в медицині; дифтерійний токсин.
3. Регуляція експресії генів прокаріотів: регуляторні та структурні ділянки лактозного (Lac-) оперона (регуляторний ген, промотор, оператор).
4. Мутації: геномні, хромосомні, генні; механізми дії мутагенів; роль індукованих мутацій у виникненні ензимопатій і спадкових хвороб людини.
5. Біологічне значення і механізми репарації ДНК. Репарація УФ-індукованих генних мутацій: пігментна ксеродерма.
6. Генна інженерія: конструювання рекомбінантних ДНК; клонування генів; генно-інженерний синтез ферментів, гормонів, інтерферонів тощо.

## Теми 3, 4.

### Молекулярні механізми дії гормонів на клітини-мішені. Біохімія гормональної регуляції метаболізму

Гормони – це органічні сполуки, які продукуються ендокринними залозами, транспортуються кров'ю до органів-мішеней або клітин-мішеней і беруть активну участь у регуляції різних функцій організму (підтримання постійності внутрішнього середовища, розмноження, ріст, адаптаційні реакції на зовнішні подразники тощо). До залоз внутрішньої секреції зазвичай відносять щитовидну залозу, паращитовидні залози, наднирники, підшлункову залозу, статеві залози, гіпофіз, епіфіз та тимус. Функціонування ендокринних залоз не є автономним, а перебуває під контролем центральної нервової системи.

За своєю хімічною природою гормони можна поділити на наступні основні групи:

1) білки і пептиди (рилізинг-фактори гіпоталамуса, тропні гормони гіпофіза, гормони паращитовидної і підшлункової залоз);

2) похідні амінокислот, в основі будови яких лежить фенольне кільце (тиреоїдні гормони щитовидної залози, гормони мозкової речовини наднирників);

3) стероїдні гормони (гормони коркового шару наднирників, гормони статевих залоз).

До особливої групи віднесені так звані тканинні гормони або гуморальні фактори, які утворюються не в чітко локалізованих ендокринних залозах, а в спеціалізованих клітинах, що включені до багатьох тканин організму (гістамін, серотонін, простагландини, пептиди ШКТ тощо).

Нестача або надлишок тих чи інших гормонів пов'язані з порушенням функцій відповідної залози. При цьому окремі ендокринні залози через свої гормони потужно впливають не тільки на функцію своїх органів- і тканин-мішеней, а й на функції інших залоз внутрішньої секреції та на нервову систему. Таким чином, порушення функцій однієї із залоз дуже часто позначається і на діяльності інших.

Регуляторну дію на обмін речовин гормони виявляють опосередковано трьома шляхами: а) через вплив на швидкість синтезу ферментів та інших білків; б) через зміну активності існуючих молекул-ферментів шляхом їх модифікації; в) через зміну проникності клітинних мембран.

Дія гормонів на органи і тканини характеризується високою біологічною ефективністю (впливають у дуже малих концентраціях), дистантністю (як правило, спричинюють ефекти на значній відстані від місця утворення) і специфічністю (спричинюють відповідь лише в клітин-мішеней).

Специфічність гормонів відносно клітин-мішеней пов'язана з наявністю білкових рецепторів. Розрізняють рецептори, які локалізовані на плазматичній мембрані клітини (рецептори водорозчинних гормонів), а також цитоплазматичні та ядерні (рецептори ліпофільних гормонів). Зв'язування гормону (первинної сигнальної молекули) з рецептором плазматичної мембрани зазвичай спричинює появу в клітині вторинних посередників унаслідок активації відповідних ферментів (аденілатциклази, гуанілатциклази або фосфоліпази С), що призводить до активації протеїнкіназ, які є чутливими до цих вторинних месенджерів, і наступного фосфорилування різних білків (мембранних, ферментів, регуляторних тощо). Зв'язування ліпофільних гормонів з цитоплазматичними або ядерними рецепторами призводить до формування гормон-рецепторного комплексу, який взаємодіє з хроматином, змінюючи експресію певних структурних генів, а отже, і біосинтез відповідних білків.

### **Лабораторна робота 3**

#### **Якісні реакції на гормони.**

#### **Визначення концентрації адреналіну**

#### ***Якісні реакції на гормони***

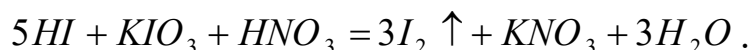
##### **Робота 1. Реакції, що свідчать про білкову природу інсуліну**

У 3 пробірки внести по 3 краплі препарату інсуліну і провести реакції: біуретову, Мілона та Фоля (див. Розділ 1, Лаб. робота 2).

##### **Робота 2. Якісна реакція на тироксин**

Тироксин можна виявити в препараті тиреоїдину, який отримують із щитовидної залози великої рогатої худоби. Виявляють тироксин наступним чином: відщеплюють від нього за допомогою кислотного гідролізу йодоводневу кислоту і переводять її у вільний йод. Останній екстрагують хлороформом, який забарвлюється при цьому у фіолетовий колір.

*Хід роботи.* У пробірку внести половину таблетки тиреоїдину і 10 крапель  $\text{HNO}_3$ . Обережно нагріти 1–2 хв. Потім додати 20 крапель 1 %  $\text{KIO}_3$  (йодат калію), перемішати й охолодити.  $\text{KIO}_3$  окислює йодоводневу кислоту, яка вивільнилася при гідролізі, у вільний йод:



У пробірку додати 1–2 мл хлороформу і ретельно струсити. Після відстоювання шар хлороформу (нижній) забарвлюється у фіолетовий колір.

### Робота 3. Якісні реакції на адреналін

Розчин адреналіну: (вміст ампули 0,1 %) розчинити в 100 мл води.

Адреналін утворюється з тирозину за участю метіоніну (донор метильної групи). При утворенні адреналіну кільце тирозину перетворюється на пірокатехінове кільце (воно легко окислюється, утворюючи різні кольорові сполуки). Це й використовується в багатьох кольорових реакціях на адреналін.

1. Диазореакція. *Хід роботи*. У пробірку помістити 3 краплі 1 % розчину сульфанілової кислоти, 3 краплі 5 % розчину азотистокиислого Na, 5 крапель розчину адреналіну (1 : 1000) і 3 краплі 10 % розчину вуглекислого Na. Рідина забарвиться в червоний колір.

2. Реакція з йодатом калію. *Хід роботи*. У пробірку внести 3 краплі адреналіну (1 : 1000), 2–3 краплі 10 % розчину  $KIO_3$  та 2 краплі 10 %  $CH_3COOH$ . Рідину злегка нагріти. З'являється червоно-фіолетове забарвлення.

Результати дослідження гормонів оформити у вигляді таблиці.

Залоза внутрішньої секреції	Гормон	Хімічна будова	Метаболічна роль	Реактиви, що вживаються	Отримане забарвлення

### Визначення концентрації адреналіну

*Принцип методу*. Метод заснований на колориметричному визначенні інтенсивності синього забарвлення, яке утворюється при взаємодії адреналіну з реактивом Фоліна. Реактив Фоліна складається із солей фосфорно-вольфрамової та фосфорно-молібденової кислот. Ці солі при взаємодії з фенолами відновлюються з утворенням більш низьких окислів, комплекси яких забарвлені в синій колір.

*Хід роботи*. У суху пробірку внести 1 мл досліджуваного розчину, 4 мл 10 % розчину  $Na_2CO_3$  і 0,5 мл реактиву Фоліна. Вміст перемішати. Через 3–5 хв з'явиться синє забарвлення. Екстинкцію виміряти на ФЕК проти контролю (контроль – 1 мл  $H_2O$ , 4 мл 10 %  $Na_2CO_3$  та 0,5 мл реактиву Фоліна) при довжині хвилі 650 нм (620–700 нм). Кількість адреналіну визначити за калібрувальним графіком.

### Калібрування для визначення адреналіну

У мірну колбу ємністю 25 мл вносять точно 1 мл комерційного адреналіну. Доводять до мітки водою. 1 мл стандартного розчину містить 0,04 мг адреналіну, що відповідає концентрації 4 мг%. Цей розчин розводять наступним чином.

Номери пробірок	Контроль	1	2	3	4
Стандартний розчин адреналіну (мл)	0	1	0,75	0,5	0,25
H <sub>2</sub> O (мл)	1	0	0,25	0,5	0,75
Концентрація адреналіну (г/л)	0	0,04	0,03	0,02	0,01
Оптична щільність розчину (E)					

### Лабораторна робота 4

#### Кількісне визначення загального кальцію в біологічних рідинах

Функції кальцію в організмі різноманітні і забезпечуються особливостями його розподілу та хімічними властивостями іонів, зокрема здатністю специфічно і міцно зв'язуватися з білками. Солі кальцію забезпечують жорстку структуру кісток і зубів. Органічною основою кісток є колаген, глікозаміноглікани та ін. Кристали солей кальцію в кістці пов'язані з поверхнею органічного матриксу. Іони мінерального компонента кісток постійно обмінюються шляхом дифузії з іонами міжклітинної рідини і плазми крові, завдяки чому тканина кісток виконує функцію депо мінеральних солей організму, особливо кальцію.

Іони кальцію виконують роль вторинного посередника в реалізації відповіді клітин на зовнішні сигнали (нервові, гормональні тощо). При дії сигналів відкриваються кальцієві канали і вміст іонів кальцію в цитоплазмі зростає в тисячі разів. Іони зв'язуються зі специфічними внутрішньоклітинними білками, запускають ланцюг реакцій, що спричинює фізіологічну відповідь клітини. Такими Ca<sup>2+</sup>-зв'язуваними білками є тропонін С (регуляція скорочення скелетних м'язів і міокарда), легкий ланцюг міозину (регуляція скорочення гладенької м'язової тканини), вітамін D-залежний білок (регуляція всмоктування кальцію в кишечнику), білок S-100 нервової тканини (регуляція фосфорилування білків), кальмодулін (утворення комплексу з іонами кальцію, який активує багато ферментів). Після закінчення дії зовнішнього сигналу Ca<sup>2+</sup>-АТФази викачують іони кальцію з цитоплазми, активний комплекс дисоціює й активність ферментів знижується. Іони кальцію беруть участь у процесі згортання крові, впливають на поріг збудження нервових клітин.

Концентрацію іонів кальцію в плазмі крові регулюють паратгормон і кальцитонін, а також похідні вітаміну D (1,25-діоксихолекальциферол) – кальцитріол. Паратгормон стимулює процес резорбції кісткової тканини і вихід кальцію та фосфатів у кров, а кальцитонін гальмує цей процес. Синергістом паратгормону в дії на кісткову тканину є кальцитріол, який у свою чергу стимулює всмоктування кальцію в кишечнику. У нирках паратгормон стимулює реабсорбцію Ca<sup>2+</sup> дистальними каналцями. Таким

чином, ефективність регуляції гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  залежить від функціонування паращитовидних і щитовидної залоз, нирок, кишечника і надходження до організму кальцію і вітаміну D.

*Принцип методу:* іони кальцію в лужному середовищі вступають у реакцію з  $\alpha$ -крезолфталеїн-комплексом, утворюючи забарвлений комплекс. Інтенсивність фіолетового забарвлення утвореного комплексу пропорційна концентрації кальцію в пробі, що аналізується.

*Матеріали і реактиви:*

1. Хромоген:

- $\alpha$ -крезолфталеїн комплексон ( $0,12 \pm 0,01$ ) мМ;
- $\beta$ -оксихінолін ( $16,0 \pm 0,16$ ) мМ;
- соляна кислота ( $60,0 \pm 6,00$ ) мМ.

2. Буфер: моноетаноламін ( $08 \pm 0,08$ ) мМ.

3. Калібрувальний розчин кальцію ( $2,5 \pm 0,05$ ) мМ або 0,1 г/л.

*Зразок:* сироватка крові, плазма крові (антикоагулянт – гепарин); сеча за добу.

*Хід роботи.* Аналіз проводиться відповідно до схеми, наведеної в таблиці.

Відміряти в кювету, мл	Холоста проба	Калібрувальна проба	Дослідна проба
Хромоген	2,50	2,50	2,50
Зразок	–	–	0,02
Калібрувальний розчин	–	0,02	–
Буфер	2,50	2,50	2,50
H <sub>2</sub> O дистильована	0,02	–	–

Змішати і витримати ( $10 \pm 1$ ) хв при кімнатній температурі (від +20 до +25 °С). Оптичну щільність дослідної ( $E_{\text{дослід.}}$ ) і калібрувальної проби ( $E_{\text{калібр.}}$ ) виміряти проти холостої не пізніше ( $30 \pm 5$ ) хв при 550–590 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 5 або 10 мм

Розрахунок результатів провести за формулою:

$$C_{\text{Ca}} (\text{мМ}) = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{Калібр.}}} \times 2,5 ,$$

$$C_{\text{Ca}} (\text{г / л}) = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{Калібр.}}} \times 0,1 .$$

Для розрахунку концентрації кальцію в добовій сечі одержане вище значення (мМ) помножити на об'єм добової сечі, який виражений у л (одержують ммоль/добу), або значення (г/л) помножити на об'єм добової сечі, виражений у л, і коефіцієнт 10 (одержують г/добу).

Нормальні величини вмісту кальцію:

<i>Сироватка</i>	<i>г/л</i>	<i>мМ</i>
9–10 днів	0,076–0,104	1,90–2,60
10 днів – 24 місяці	0,090–0,110	2,25–2,75
24 місяці – 12 років	0,088–0,108	2,20–2,70
12–18 років	0,040–0,102	2,10–2,55
18–60 років	0,086–10,0	2,15–2,50
60–90 років	0,088–0,102	2,20–2,55
більше 90 років	0,082–0,096	2,05–2,40
<b>Сеча, добова норма</b>		
Відсутність Са в діеті	0,005–0,04	0,13–1,00
Споживання Са нижче середнього рівня	0,05–1,5	1,25–3,75
Середній рівень споживання Са – 0,800 г/добу (20 мМ/добу)	0,1–0,3	2,50–7,50

### Клініко-діагностичне значення

У нормі концентрація кальцію в сироватці крові здорової людини складає 2,2–2,6 мМ.

Концентрація кальцію в сироватці крові зменшується (гіпокальціємія) при гіпопаратиреозі, дефіциті вітаміну D, захворюваннях нирок. Клінічний прояв гіпокальціємії: неврологічні порушення (оніміння, тетанія, розумові розлади), порушення серцево-судинної діяльності, катаракти.

Гіперкальціємія може бути наслідком інтоксикації вітаміном D, гіперпаратиреозу, тиреотоксікозу. Небезпечний для життя рівень кальцію в сироватці крові при гіперкальціємії складає 3,75 мМ. Клінічні симптоми вираженої гіперкальціємії: закріп, блювання, поліурія, сонливість та кома.

### Лабораторна робота 5

#### Кількісне визначення вмісту неорганічного фосфору в біологічних рідинах

В організмі людини містяться органічні та неорганічні фосфати. 85 % фосфатів міститься в кістках. Фосфорні групи є у фосфопротеїдах, нуклеїнових кислотах, фосфоліпідах, нуклеотидних коферментах. Важливе біологічне значення мають макроергічні фосфати – АТФ, АДФ, креатинфосфат. Моно- та дигідрофосфати калію або натрію утворюють фосфатну буферну систему. Регуляція обміну фосфатів здійснюється разом із кальцієм. Підсилюючи остеоліз, паратгормон збільшує вміст фосфатів у крові. Кальцитонін гальмує процес остеолізу. У нирках паратгормон знижує реабсорбцію фосфатів

**Принцип методу:** неорганічний фосфат утворює з молібденовою кислотою в сильно кислому середовищі фосфомолібденову кислоту, яка відновлюється в присутності заліза (II) у молібденову синь. Осаджені індикаторним реагентом білки розчиняються при додаванні стабілізатора – триетаноламіну. Оптична щільність реакційного розчину пропорційна концентрації неорганічного фосфору в пробі.

**Матеріали і реактиви:**

- Індикаторний реагент: молібдат амонію ( $40 \pm 2$ ) мм; сірчана кислота ( $5 \pm 0,25$ ) М; стабілізатори, активатори.
- Розчин стабілізатора: триетаноламін ( $3,42 \pm 0,17$ ) М.
- Калібрувальний розчин фосфору ( $1,615 \pm 0,008$ ) мМ або 50 мкг/л.

**Зразок:** сироватка крові; добова сеча, розведена дистильованою водою у 20 разів.

**Хід роботи.** Аналіз проводиться відповідно до таблиці.

Відміряти в кювету, мл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Зразок	0,10	–	–
Калібрувальний розчин	–	0,10	–
Дистильована вода	–	–	0,10
Індикаторний реагент	2,00	2,00	2,00
Перемішати і витримати при температурі від $+20$ °С до $+25$ °С 15 хвилин. Осад білка, що випав, розчиняється на наступній стадії піпетування			
Розчин стабілізатора	2,00	2,00	2,00
Перемішати, витримати 5–6 хв при кімнатній температурі (від $+20$ °С до $+25$ °С) і виміряти оптичну щільність дослідної ( $E_{\text{дослід.}}$ ) і калібрувальної проби ( $E_{\text{калібр.}}$ ) проти холостої (забарвлення стійке протягом 30 хвилин) при довжині хвилі 570–660 нм у кюветах товщиною 10 мм. Якщо після додавання розчину стабілізатора розчин не очистився, необхідно додати в кожную пробірку по одній краплі 1 М NaOH			

**Розрахунок концентрації фосфору:**

$$C = \frac{E_{\text{дослід.}}}{E_{\text{калібр.}}} \times 1,615(50),$$

де 1,615(50) – концентрація фосфору в калібрувальному розчині, мМ (мкг/л);

$E_{\text{дослід.}}$  – оптична щільність досліджуваної проби, од. оптич. щільності;

$E_{\text{калібр.}}$  – оптична щільність калібрувальної проби, од. оптич. щільності;

C – концентрація фосфору в пробі дослідження, мМ (мкг/л).

Отримане значення концентрації фосфору в сечі необхідно помножити на коефіцієнт розведення – 20.

**Нормальний вміст фосфору:**

<i>Сироватка</i>	<i>мМ</i>	<i>мкг/л</i>
Дорослі 12–60 років	0,87–1,45	27–45
Чоловіки за 60 років	0,74–1,20	23–37
Жінки за 60 років	0,90–1,32	28–41
Немовлята	1,45–2,91	45–90
<b>Сеча</b>	29–48 ммоль/добу	0,9–1,5 г/добу

**Клінічно-діагностичне значення**

Гіпофосфатемія розвивається при нестачі вітаміну D у випадку стеатореї (екскреція з калом жирів призводить до нестачі вітаміну D). Виникає при низці захворювань печінки та підшлункової залози. Виражена гіпофосфатемія спостерігається при гіперпаратиреозі. При цьому інгібується реабсорбція фосфатів у канальцях нирок і, отже, збільшується їхня екскреція.

Помірне зниження фосфатів у крові спостерігають при захворюваннях нирок. Знижується реабсорбція фосфатів у ниркових канальцях, розвивається фосфатурія.

Випадки гіперфосфатемії відзначають при гіпопаратиреозі, хронічній нирковій недостатності, метастазах у кісткових тканинах.

**Контрольні питання за темою****«Молекулярні механізми дії гормонів на клітини-мішені»**

1. Гормони: загальна характеристика; роль гормонів та інших біорегуляторів у системі міжклітинної інтеграції функцій організму людини.
2. Класифікація гормонів і біорегуляторів: відповідність структури та механізмів дії гормонів.
3. Реакція клітин-мішеней на дію гормонів. Мембранні (монотропні, метаботропні) і цитозольні рецептори.
4. Біохімічні системи внутрішньоклітинної передачі гормональних сигналів: G-білки, ефекторні білки, вторинні посередники (цАМФ, Ca<sup>2+</sup>, кальмодулін, ІФз, ДАГ).
5. Молекулярно-клітинні механізми дії стероїдних і тиреоїдних гормонів.

**Контрольні питання за темою****«Біохімія гормональної регуляції метаболізму»**

1. Гормони гіпоталамуса – ліберини і статини.
2. Гормони передньої долі гіпофіза: соматотропні (СТГ), пролактин; патологічні процеси, пов'язані з порушенням функції цих гормонів.
3. Гормони задньої долі гіпофіза. Вазопресин і окситоцин: будова, біологічні функції.
4. Інсулін: будова, біосинтез і секреція; вплив на обмін вуглеводнів, ліпідів, амінокислот та білків. Стимулюючі ростові ефекти інсуліну.

5. Глюкагон: регуляція обміну вуглеводнів і ліпідів.
6. Тиреоїдні гормони: структура, біологічні ефекти  $T_4$  і  $T_3$ . Порушення метаболічних процесів при гіпо- і гіпертиреозі.
7. Катехоламіни (адреналін, норадреналін, дофамін): будова, біосинтез, фізіологічні ефекти, біохімічні механізми дії.
8. Стероїдні гормони кори наднирників ( $C_{21}$  – стероїди) – глюкокортикоїди і мінералокортикоїди; будова, властивості.
9. Жіночі статеві гормони: естрогени, прогестерон. Фізіологічні та біохімічні ефекти, зв'язок з фазами овуляційного циклу.
10. Чоловічі статеві гормони ( $C_{19}$  – стероїди). Фізіологічні і біохімічні ефекти андрогенів; регуляція синтезу і секреції.
11. Гормональна регуляція гомеостазу кальцію в організмі. Паратгормон, кальцитонін, кальцитріол.
12. Ейкозаноїди: будова, біологічні і фармакологічні властивості. Аспірин та інші нестероїдні протизапальні засоби як інгібітори синтезу простагландинів.

## **РОЗДІЛ 4**

### **БІОХІМІЯ ОРГАНІВ І ТКАНИН**



#### **Тема 1.**

#### **Біохімія харчування людини.**

#### **Вітаміни як компоненти харчування**

Після механічного пережовування їжі починається процес ферментативного розпаду, що каталізується травними ферментами в різних відділах шлунково-кишкового тракту. Майже всі ці ферменти є гідролазами (клас 3 за класифікацією ферментів): вони каталізують розщеплення речовин за участю води.

Білки денатуруються в шлунку під дією соляної кислоти і стають більш чутливими до атаки ендопептидазами шлункового соку (пепсин) і секрету підшлункової залози (трипсин, хімотрипсин, еластаза). Пептиди, які утворюються при цьому, розщеплюються далі до амінокислот екзопептидазами (аміно- і карбоксипептидази), що містяться в кишечнику. Потім амінокислоти всмоктуються слизовою кишечника за участю іонів  $\text{Na}^+$ .

Вуглеводні, такі як крохмаль і глікоген, послідовно розщеплюються глікозидазами, які секретуються підшлунковою залозою, до олігосахаридів, а потім глікозидазами поверхневого епітелію кишечника до моносахаридів. Всмоктування глюкози і галактози клітинами епітелію кишечника при їхній низькій концентрації в просвіті кишечника спряжене з активним транспортом іонів  $\text{Na}^+$ . При високій концентрації моносахаридів у просвіті кишечника здійснюється пасивний транспорт.

Нуклеїнові кислоти руйнуються нуклеазами підшлункової залози і тонкого кишечника. Продукти розщеплення, що утворилися, – нуклеїнові основи (похідні пурину і піримідину), пентози (рибоза і дезоксирибоза), фосфат і нуклеозиди (нуклеїнова основа + пентоза) – всмоктуються слизовою тонкої кишки.

На відміну від інших класів речовин, що містяться в їжі, ліпіди є нерозчинними у воді. Процес засвоєння ліпідів починається з утворення емульсій із солями жовчних кислот і фосфоліпідами жовчі. Власне гідроліз ліпідів здійснюється на водно-ліпідній поверхні міцел ліпазами секрету підшлункової залози в присутності коліпази. Основними продуктами розщеплення ліпідів є жирні кислоти, 2-моноацилгліцероли, гліцерин та неорганічний фосфат. Після резорбції епітеліальними клітинами жирні кислоти, гліцерин і моноацилгліцероли знову утворюють жири, які надходять у лімфатичну систему. Найлегше перетравлюються ліпіди молока, які знахо-

дяться у вигляді емульсії і при розщепленні утворюють коротколанцюгові жирні кислоти.

Вітаміни – низькомолекулярні органічні сполуки, є різноманітними за хімічною природою, не синтезуються в організмі та є необхідними для нормальної життєдіяльності людини і тварин у малій кількості порівняно з іншими складовими продуктів харчування.

Вітаміни поділяються на водо- та жиророзчинні. Біологічна роль більшості вітамінів полягає в тому, що вони є складовою частиною коферментів і беруть участь у ферментативних процесах. До коферментних вітамінів належать водорозчинні вітаміни: групи В, РР, біотин. Жиророзчинні вітаміни (А, Е, D, F, К) беруть участь в антиоксидантних реакціях і регуляції обміну речовин. Відсутність або недостатня кількість вітамінів у їжі призводить до розвитку захворювань вітамінної недостатності – авітамінозів або гіповітамінозів. Гіпервітамінози також призводять до цілої низки порушень біохімічних процесів та фізіологічних функцій.

Неорганічні складові їжі, такі як вода і сіль, всмоктуються безпосередньо в кишечнику. Так само всмоктуються вітаміни, які надходять до організму з продуктами рослинного або тваринного походження.

Високомолекулярні складові їжі, які не перетравлюються, наприклад, волокна клітинних стінок рослин (целюлоза і лігнін), проходять через кишечник незмінними. Вони зв'язують воду і стимулюють перистальтику кишечника, чим позитивно впливають на травлення.

## **Лабораторна робота 1** **Якісні реакції на вітаміни**

Для виявлення вітамінів у харчових продуктах або інших біологічних об'єктах зазвичай користуються кольоровими якісними реакціями.

### **Робота 1. Діазореакція на вітамін В<sub>1</sub> (тіамін)**

Тіамін у вигляді тіамініпірофосфату виконує коферментні функції в реакціях декарбокسيلювання  $\alpha$ -кетокислот і в транскетотазній реакції. В основі якісної реакції на вітамін В<sub>1</sub> лежить його здатність у лужному середовищі з діазорективом утворювати складні комплексні сполуки помаранчевого або червоного кольору.

*Хід роботи.* До 5 крапель 1 % розчину сульфанілової кислоти додати 5 крапель 5 % розчину NaNO<sub>2</sub>. До одержаного таким чином діазореактиву додати кілька крапель розчину вітаміну і 5–7 крапель 10 % розчину Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Рідина забарвлюється в помаранчево-червоний колір.

### **Робота 2. Відновлення вітаміну В<sub>2</sub> (рибофлавіну)**

Рибофлавін входить до складу коферментів ФАД і ФМН, які є простетичною групою низки оксидоредуктаз.

При додаванні металевого цинку до концентрованої соляної кислоти утворюється водень, який відновлює жовтий рибофлавін спочатку до родофлавіну (проміжна сполука) червоного кольору, а потім у безколірний лейкофлавін.

*Хід роботи.* У пробірку налити 10 крапель рибофлавіну і додати 5 крапель концентрованої НСІ. Занурити зернятко металевого цинку. Починається бурхливе виділення водню. При цьому розчин забарвлюється в рожево-жовтий колір (утворився родофлавін), а потім знебарвлюється (утворився лейкофлавін).

#### Робота 3. Феррихлоридна проба на вітамін В<sub>6</sub> (піридоксин)

Вітамін В<sub>6</sub> у вигляді піридоксальфосфату виконує коферментні функції в реакціях трансамінування і декарбоксілювання амінокислот.

При взаємодії піридоксину з розчином хлориду заліза утворюється комплексна сіль типу феноляту заліза червоного кольору.

*Хід роботи.* До 5 крапель 1 % водного розчину вітаміну додати 5 крапель 1 % розчину хлористого заліза. Перемішати. Рідина набуває червоного забарвлення внаслідок утворення комплексної сполуки.

#### Робота 4. Виявлення кобальту у вітаміні В<sub>12</sub> (ціанкобаламін)

Вітамін В<sub>12</sub> як кофермент бере участь у реакціях двох типів: трансметилування та ізомеризації.

При сплавлуванні вітаміну В<sub>12</sub> з гідросульфідом калію або при дії сильного окислювача відбувається його руйнування і вивільнення кобальту. Кобальт з  $\alpha$ -нітросо- $\beta$ -нафтолом утворює комплексну сполуку помаранчево-червоного кольору.

*Хід роботи.* Внести в пробірку 2 краплі розчину вітаміну В<sub>12</sub>, додати 2 краплі концентрованої азотної кислоти і нагріти до кипіння. Охолодити пробірку, додати 3 краплі 1 % розчину нітро-Р-солі і кілька крапель 10 % гідрофосфату натрію. Забарвлення підсилюється з часом. Аби переконатися в тому, що забарвлення в цій реакції дає саме кобальт, повторюють дослід, взявши замість вітаміну розчин хлористого кобальту (2 мг %).

#### Робота 5. Проба з міддю на вітамін РР (нікотинову кислоту)

Вітамін РР входить до складу коферментів НАД і НАДФ, які беруть участь в окислювально-відновлювальних реакціях.

При нагріванні вітаміну РР з розчином ацетату міді утворюється погано розчинний синій осад мідної солі вітаміну.

*Хід роботи.* 5–10 мг нікотинової кислоти розчинити при нагріванні в 15 краплях 10 % розчину оцтової кислоти. До нагрітого до кипіння розчину додати рівний об'єм оцтовокислої міді. Рідина забарвлюється в блакитний колір, і випадає в осад мідна сіль нікотинової кислоти.

### Робота 6. Реакція на вітамін Р (рутин)

Під терміном «вітамін Р» об'єднується група речовин – катехіни, флавіни, флавонони та ін. Вони виявляють подібну біологічну активність: підвищують резистентність капілярів, беруть участь в окислювально-відновлювальних реакціях, функціонально пов'язані з вітаміном С.

1. Реакція з хлоридом заліза (III). Хлорид заліза утворює з рутином комплексну сполуку, забарвлену в зелений колір.

*Хід роботи.* До 1–2 мл насиченого водного розчину рутину додати кілька крапель 1 % розчину хлориду заліза. Розвивається забарвлення завдяки утворенню комплексного поєднання хлориду заліза з рутином.

2. Реакція з концентрованою  $H_2SO_4$ . На межі розділу виникає забарвлене в жовтий колір кільце.

### Робота 7. Реакція на вітамін А (ретинол)

Вітамін А бере участь у процесах фоторецепції (входить до складу простетичної групи хромопротеїну, родопсину), бере участь у регуляції проникності біомембран, в окислювально-відновлювальних реакціях, має антиоксидантні властивості.

Сірчана кислота від'єднує у вітаміна А воду з утворенням кольорових продуктів реакції. Аналогічну реакцію дає провітамін А – каротин.

*Хід роботи.* У суху пробірку внести 1 краплю риб'ячого жиру в хлороформі, додати 1 краплю концентрованої  $H_2SO_4$ . Розвивається синє забарвлення, яке переходить у буро-червоне.

Для виявлення провітаміну А взяти шматочки м'якоті ягід шипшини, додати хлороформ (1/3 пробірки). Струшувати протягом декількох хвилин. До кількох крапель екстракту додати 1 краплю концентрованої  $H_2SO_4$ .

### Робота 8. Бромхлороформна проба на вітамін D (кальцифероли)

Вітамін D бере участь у регуляції транспортування кальцію і фосфатів через біологічні мембрани.

*Хід роботи.* У суху пробірку внести 1–2 краплі риб'ячого жиру та 2–4 краплі розчину бром у хлороформі. Розчин вітаміну D з розчином бром у хлороформі набуває зелено-блакитного кольору.

### Робота 9. Реакція на вікасол (водорозчинний аналог вітаміну К)

Вітамін К бере участь у біосинтезі протромбіну та інших факторів згортання крові.

*Хід роботи.* До 5 крапель спиртового розчину вікасолу додати 5 крапель розчину цистеїну та 4 краплі NaOH. Розчин вікасолу в лужному середовищі при додаванні цистеїну забарвлюється в жовто-помаранчевий колір.

**Робота 10. Якісна реакція на вітамін Е (токоферол)**

Вітамін Е має антиоксидантну дію, бере участь в окислювально-відновлювальних реакціях, входить до складу біомембран, у багатьох тварин є «вітаміном розмноження».

*Хід роботи.* У суху пробірку внести 5 крапель 0,1 % спиртового розчину вітаміну Е і додати 10 крапель концентрованої  $\text{HNO}_3$ . При струшуванні утворюється емульсія, яка поступово забарвлюється в червоний колір. При стоянні емульсія розшаровується і забарвлення залишається у верхньому масляному шарі. Реакція зумовлена окисненням токоферолу до продукту, який має хіноїдну структуру червоного кольору. Кольорову реакцію з  $\text{HNO}_3$  використовують для кількісного визначення вітаміну Е.

Особливості структури і функцій деяких вітамінів разом із результатами робіт занести в таблицю:

Вітамін, назва	Структура	Функції	Якісна реакція		
			Реактиви	Колір, вид	Чим зумовлена
В <sub>1</sub> (тіамін)					
В <sub>2</sub> (рибофлавін) та ін.					

**Лабораторна робота 2****Кількісне визначення вітамінів****Робота 1. Кількісне визначення вітаміну С (аскорбінової кислоти)**

Вітамін С (аскорбінова кислота) виконує коферментні функції в реакціях гідроксилювання, у тому числі є необхідним для дозрівання колагену, метаболізму тирозину, а також є водорозчинним антиоксидантом, який разом із рутином необхідний для підтримання еластичності та міцності кровоносних судин.

*Принцип методу.* Аскорбінова кислота має здатність до окислювально-відновлювальних перетворень. Як відновлювальний компонент використовується будь-яка речовина, наприклад 2,6-дихлорфеноліндофенол (2,6-ДХФІФ), який змінює забарвлення при переході з окисленої форми до відновлювальної і навпаки.

*Хід роботи.* У колбу налити 1 мл яблучного соку або іншої рідини дослідження, додати 4 мл 2 % розчину  $\text{HCl}$  і титрувати суміш розчином барвника до слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 с.

Розрахувати кількість аскорбінової кислоти (г/л) у розчині дослідження за формулою, беручи до уваги, що концентрація розчину барвника 0,01 N, грам-еквівалент аскорбінової кислоти – 88.

$$C = N \times V \times E,$$

- де N – концентрація розчину барвника;  
E – грам-еквівалент аскорбінової кислоти (дорівнює 88);  
V – кількість розчину барвника, що витрачена на титрування (л).

**Контрольні питання за темою**  
**«Біохімія харчування людини.**  
**Вітаміни як компоненти харчування»**

1. Біохімія харчування людини: компоненти нормального харчування, біологічна цінність окремих нутрієнтів.
2. Механізми перетворення поживних речовин (білків, вуглеводнів, ліпідів) у травному тракті. Ферменти шлунка і кишечника.
3. Порушення травлення окремих нутрієнтів у шлунку і кишечнику; спадкові ензимопатії процесів травлення.
4. Мікроелементи в харчуванні людини. Біологічні функції окремих мікроелементів; прояв мікроелементної недостатності.
5. Вітаміни в харчуванні людини. Водорозчинні і жиророзчинні вітаміни; екзогенні й ендогенні причини вітамінної недостатності.
6. Характеристика вітамінів: будова, біологічні властивості, механізми дії, джерела, добова потреба.
  - 6.1. Вітамін В<sub>1</sub> (тіамін).
  - 6.2. Вітамін В<sub>2</sub> (рибофлавін).
  - 6.3. Вітамін РР (нікотинова кислота, нікотинамід).
  - 6.4. Вітамін В<sub>6</sub> (піридоксин).
  - 6.5. Вітамін В<sub>12</sub> (кобаламін).
  - 6.6. Вітамін В<sub>с</sub> (фолієва кислота).
  - 6.7. Вітамін Н (біотин).
  - 6.8. Вітамін В<sub>3</sub> (пантотенова кислота).
  - 6.9. Вітамін С (аскорбінова кислота).
  - 6.10. Вітамін Р (флавоноїди).
  - 6.11. Вітамін А (ретинол, ретиналь, ретинова кислота).
  - 6.12. Вітамін К (філохінон, менахінон).
  - 6.13. Вітамін Е (α-токоферол).
  - 6.14. Вітамін D<sub>3</sub> (холекальциферол).

## **Тема 2.**

### **Біохімія і патобіохімія крові**

Кров людини складає приблизно 8 % від маси тіла. Вона складається з клітин, клітинних фрагментів та плазми. Частка клітинних елементів у загальному об'ємі носить назву «гематокрит» і складає приблизно 45 відсотків.

Кров виконує в організмі безліч різноманітних функцій.

Кров забезпечує транспорт газів – кисню і двоокису вуглецю, а також транспортує поживні речовини до різних органів після всмоктування в кишечнику. Вона забезпечує обмін речовин між тканинами і перенесення кінцевих продуктів метаболізму для їхнього виведення з організму легеньми, печінкою та нирками, а також здійснює перенесення гормонів.

Кров підтримує водний баланс між кровоносною системою, клітинами і позаклітинним середовищем. Кислотно-основна рівновага в крові регулюється легеньми, печінкою та нирками.

Кров має механізми захисту проти чужорідних молекул і клітин, які потрапляють до організму. До специфічної захисної системи відносяться клітини імунної системи й антитіла.

Для запобігання втрати крові при пошкодженні кровоносних судин у крові існує ефективна система коагуляції – фізіологічне згортання. Розчинення кров'яних згустків (фібриноліз) також забезпечується кров'ю.

Клітинними елементами крові є еритроцити, лейкоцити та тромбоцити.

Плазма крові – це водний розчин електролітів, поживних речовин, метаболітів, білків крові та сигнальних речовин. Порівняно зі складом цитоплазми в плазмі крові відносно велика концентрація іонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Cl}^-$ . Навпаки, концентрація іонів  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  і фосфату нижча, ніж у клітинах. Концентрація білків також нижча, ніж у клітинах.

Рідка фаза, яка залишається після згортання крові, носить назву «сироватка». Вона відрізняється від плазми тим, що не містить фібриногену та інших білків, які відокремлюються при коагуляції крові.

### **Лабораторна робота 3**

#### **Визначення концентрації гемоглобіну в крові**

До складу гемоглобіну еритроцитів входять простий білок глобін та простетична група гем. Гем – це хелатний комплекс іона заліза і порфірину – циклічної сполуки, яка містить 4 пірольних кільця, з'єднаних метиленовими містками. Глобін складається з 4 поліпептидних ланцюгів, кожен з яких пов'язаний із гемом. Одна молекула гемоглобіну здатна зв'язувати чотири молекули кисню, який переноситься від легень до тканин. У плазмі крові  $\text{O}_2$  є малорозчинним.

У тканинах утворюється  $\text{CO}_2$  (основне джерело – окислювальне декарбоксилювання  $\alpha$ -кетокислот у мітохондріях). Гемоглобін зв'язує чотири молекули  $\text{CO}_2$  N-кінцевою аміногрупою кожного поліпептидного ланцюга.

Таким чином, гемоглобін в організмі виконує функцію газообміну.

*Принцип методу:* у присутності окислювача і ціанід-іонів гемоглобін утворює у водному розчині ціанметгемоглобін, забарвлення якого пропорційне вмісту гемоглобіну в крові.

*Матеріали і реактиви:*

1. Окислювальний реагент.
2. Калібрувальний розчин гемоглобінціаніду (відповідає пробі крові з концентрацією гемоглобіну 150 г/л).
3. Ацетонціангідрин.

*Хід роботи.* Приготування розчину трансформування: вміст флакону з окислювальним реагентом і ампули з ацетонціангідрином перенести в мірну колбу об'ємом 2 л, долити до мітки дистильованою водою і перемішати.

Дослідна проба: 0,02 мл крові обережно перемішати, запобігаючи утворенню піни, з 5 мл розчину трансформування, витримати 15 хвилин, фотометрувати проти розчину трансформування при довжині хвилі 540 нм у кюветах завтовшки 10 мм.

Калібрувальна проба: оптичну щільність калібрувального гемоглобінціаніду виміряти проти розчину трансформування.

Концентрацію гемоглобіну розрахувати за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{дослід.}}}{E_{\text{каліб.}}} \times 150,$$

де  $C$  – концентрація гемоглобіну в пробі, г/л;

150 – калібрувальна концентрація гемоглобіну, г/л;

$E_{\text{дослід.}}$  – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{калібр.}}$  – оптична щільність проби калібрування, од. опт. щільності.

Нормальні величини вмісту гемоглобіну:

0,5–5 років	110–140 г/л	
5–9 років	115–145 г/л	
12–14 років, Ч	120–150 г/л	Ж 115–150 г/л
15–17 років, Ч	117–166 г/л	Ж 117–153 г/л
18–44 роки, Ч	132–173 г/л	Ж 117–155 г/л
45–64 роки, Ч	131–172 г/л	Ж 117–160 г/л
67–74 років, Ч	126–174 г/л	Ж 117–161 г/л

### Клініко-діагностичне значення

Зменшення концентрації гемоглобіну є основним лабораторним показником анемії. Анемія – зниження концентрації гемоглобіну в крові, часто при одночасному зменшенні числа еритроцитів. Існують різні причини виникнення анемії. Розглянемо деякі з них.

1. Серповидна клітинна анемія виникає при утворенні мутантного гемоглобіну HbS, у  $\beta$ -ланцюгах якого в шостому положенні замість залишку глутамінової кислоти знаходиться валін. Ця заміна супроводжується зниженням спорідненості гемоглобіну до кисню і здатністю молекул гемоглобіну злипатися з утворенням ниткоподібних агрегатів. Форма еритроцитів при цьому набуває характерної серповидної форми. Такі еритроцити зазнають гемолізу. Клінічний прояв цієї хвороби варіює від ледь помітних (гетерозиготна форма) до таких, які призводять до летального наслідку в ранньому віці (гетерозиготна форма).

Також зустрічаються форми гемоглобіну, у яких глутамінова кислота в  $\beta$ -ланцюгах в шостому положенні замінена на лізин (HbC). Еритроцити, які містять цей аномальний гемоглобін, також схильні до гемолізу.

2. Таласемії – гемолітичні анемії, що розвиваються внаслідок утворення аномальних форм гемоглобінів, у яких відсутні  $\alpha$ - або  $\beta$ -поліпептидні ланцюги.

3. Мегалобластичні анемії часто є наслідком нестачі вітамінів, наприклад вітаміну B<sub>12</sub> (кобаламіну). Біохімічною основою розвитку B<sub>12</sub>-залежної анемії є порушення біосинтезу білків і нуклеїнових кислот, що особливо виявляється в тканинах з підсиленою проліферацією, до яких належить кровотворна тканина. Ця форма анемії характеризується значним зменшенням кількості еритроцитів при збільшенні їхнього об'єму та зміні форми.

Фолієва кислота (вітамін B<sub>9</sub>) пов'язана з обміном і біохімічними функціями вітаміну B<sub>12</sub>. Хвороби, які пов'язані з недостатністю цих вітамінів, часто протікають разом і мають подібну клінічну картину. Макроцитарна анемія є класичним проявом авітамінозу B<sub>9</sub>.

Підвищення концентрації гемоглобіну спостерігають при мієлопроліферативних порушеннях, симптоматичному еритроцитозі.

Для діагностики цукрового діабету визначають рівень глікозильованого гемоглобіну. У нормі його вміст складає 5–7 % від загальної кількості гемоглобіну.

## **Лабораторна робота 4**

### **Кількісне визначення білка в сироватці крові методом Кірка**

Білки сироватки крові виконують різні функції: транспортну, захисну, регуляторну тощо. Вміст білка в плазмі крові є одним із важливих показників білкового обміну.

*Принцип методу:* білки реагують із сірчанокислою міддю в лужному середовищі з утворенням сполук фіолетового забарвлення (біуретова реакція). Інтенсивність забарвлення реакційного розчину є прямо пропорційною концентрації білків у сироватці, що аналізується.

**Матеріали і реактиви:**

1. Калібрувальний розчин альбуміну ( $100 \pm 2$ ) г/л.
2. Біуретовий реагент (концентрований розчин):  
сульфат міді ( $15,0 \pm 0,75$ ) г/л;  
гідроокис натрію ( $40,0 \pm 2$ ) г/л;  
калій-натрій виннокислий ( $45,0 \pm 2,25$ ) г/л;  
йодид калію ( $25,0 \pm 1,25$ ) г/л.

**Хід роботи.** Аналіз проводиться згідно зі схемою, наведеною в таблиці 1.

Таблиця 1

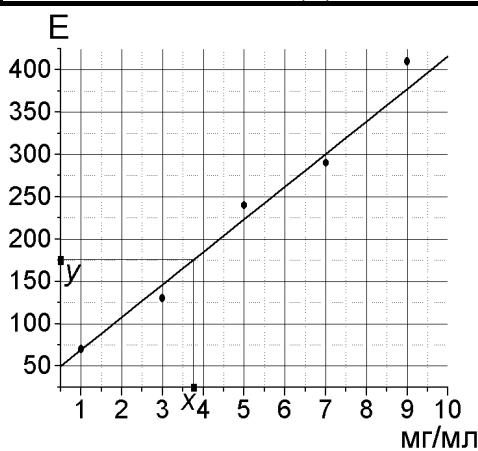
Відміряти в пробірку, мл	Калібрувальна або дослідна проби	Холоста проба
Калібрувальний або дослідний розчин	0,08	–
Фізіологічний розчин	–	0,08
Біуретовий реагент	4,0	4,00

Змішати, витримати 30 хвилин при кімнатній температурі (від +18 до +25 °С). Виміряти оптичну щільність калібрувальної і дослідної проби проти холостої при довжині хвилі 540 нм у кюветах з довжиною оптичним шляху 5 або 10 мм

Концентрацію загального білка в пробі визначають за допомогою калібрувального графіка. З калібрувального розчину білка готують ряд розведень, як це відзначено в таблиці 2.

Таблиця 2

	Пробірки					
	Холоста	1	2	3	4	5
Калібрувальний розчин білка (мл)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Дистильована вода (мл)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Концентрація білка в розчині (г/л)	0,0	20	40	60	80	100
Оптична щільність (E)	–					



З одержаних розчинів відбирають по 0,08 мл і обробляють, як це показано в таблиці 1. Визначають оптичну щільність розчинів і будують калібрувальний графік. Приклад калібрувального графіка і розрахунку за ним показано на рисунку.

Скориставшись графіком, за значенням екстинкції дослідної проби (y) знаходять вміст білка (x). Врахувавши розведення сироватки в 10 разів, отримують значення вмісту білка в 1 мл сироватки. У нормі кількість білка в сироватці складає 60–80 г/л.

**Клініко-діагностичне значення.** Найчастіше збільшення кількості загального білка в сироватці крові є наслідком дегідратації, яка є резуль-

татом втрати частини внутрішньосудинної рідини або її виходу в позасудинний простір. Такий стан розвивається при важких травмах, опіках, діареї (наприклад при холері). При гострих інфекційних захворюваннях підвищення рівня білка може відбуватися через викид білків гострої фази. При хронічних паразитарних або інфекційних захворюваннях гіперпротеїнемія може розвиватися внаслідок інтенсивного протікання імунного процесу та наростання кількості імуноглобулінів.

Зменшення вмісту білка в плазмі крові може бути наслідком затримки води, наприклад, при серцевій декомпенсації або набряку на тлі цирозу печінки. Великі втрати білка, наприклад, із сечею при нефритах або через ШКТ, також можуть бути причиною гіпопротеїнемії, як і порушення синтезу білка при раковій кахексії, хронічних ураженнях печінки, під час голодування.

### ***Контрольні питання за темою «Біохімія і патобіохімія крові»***

1. Біохімічні і фізіологічні функції крові в організмі людини. Дихальна функція еритроцитів.
2. Гемоглобін: механізми участі в транспортуванні кисню і диоксида вуглецю. Варіанти і патологічні форми гемоглобінів людини.
3. Метаболізм порфіринів: будова гема; схема реакцій біосинтезу протопорфірину IX і гема.
4. Спадкові порушення біосинтезу порфіринів, типи порфірій.
5. Буферні системи крові. Порушення кислотно-основного балансу в організмі (метаболічний і респіраторний ацидоз, алкалоз).
6. Біохімічний склад крові людини. Білки плазми крові та їхня клініко-біохімічна характеристика.
7. Ферменти плазми крові; значення в ензимодіагностиці захворювань органів і тканин.
8. Калікреїн-кінінова система крові та тканин. Лікарські засоби – антагоністи кініноутворення.
9. Небілкові органічні сполуки плазми крові.
10. Неорганічні компоненти плазми крові.
11. Біохімічні і функціональні характеристики системи гемостазу.
12. Система згортання крові; характеристика окремих факторів; механізми функціонування каскадної системи згортання крові.
13. Роль вітаміну К у реакціях коагуляції; лікарські засоби – синергісти та антагоністи вітаміну К.
14. Система антизгортання крові; характеристика антикоагулянтів. Спадкові порушення процесу згортання крові.
15. Фібринолітична система крові. Лікарські засоби, які впливають на процеси фібринолізу.
16. Імуноглобуліни; біохімічна характеристика окремих класів імуноглобулінів людини.
17. Медіатори і гормони імунної системи: інтерлейкіни, інтерферони, білково-пептидні фактори регуляції росту і проліферації клітин.
18. Система комплементу; біохімічні компоненти системи комплементу людини; класичний і альтернативний шляхи активації.
19. Біохімічні механізми імунодефіцитних станів: первинні (спадкові) і вторинні імунодефіцити.

## Тема 3. Функціональна і клінічна біохімія органів і тканин.

### Біохімія печінки

Клітини печінки – гепатоцити – займають центральне місце в реакціях проміжного метаболізму. Найважливішими функціями печінки є метаболічна, депонуюча, бар'єрна, екскреторна та гомеостатична.

У печінці відбуваються процеси обміну білків і амінокислот, ліпідів, вуглеводів, біологічно активних речовин (гормонів, біогенних амінів та вітамінів), мікроелементів, регуляція водного обміну. У печінці синтезується багато речовин, що є необхідними для функціонування інших органів.

У печінці здійснюється знешкодження (біохімічна трансформація) чужорідних і токсичних сполук, які надходять з їжею або утворюються в кишечнику, а також токсичних речовин екзогенного походження. З печінки різні речовини ендо- і екзогенного походження або надходять до жовчних протоків і виводяться з жовчю, або потрапляють у кров, звідки виводяться нирками.

Печінка виконує важливі функції щодо підтримування постійного складу крові (гомеостазу), забезпечуючи синтез, накопичення і виділення в кров різних метаболітів, а також поглинання, трансформацію та екскрецію багатьох компонентів плазми крові.

*Метаболізм вуглеводів.* Глюкоза та інші моносахариди надходять у печінку з плазми крові. Тут вони перетворюються на глюкозо-6-фосфат та інші продукти гліколізу. Потім глюкоза депонується у вигляді резервного полісахариду глікогену або перетворюється на жирні кислоти. При зниженні рівня глюкози в крові печінка починає поставляти глюкозу за рахунок мобілізації глікогену. Якщо запас глікогену виявляється вичерпаним, глюкоза може синтезуватися в процесі глюконеогенезу з таких попередників, як лактат, піруват, гліцерин або вуглецевий скелет амінокислот.

*Метаболізм ліпідів.* Жирні кислоти включаються до складу жирів і фосфоліпідів, які надходять у кров у формі ліпопротеїнів. Водночас жирні кислоти надходять у печінку з крові. Для енергозабезпечення організму велике значення мають властивості печінки конвертувати жирні кислоти в кетоніві тіла, які потім знову надходять у кров.

У печінці відбувається синтез холестерину з ацетил-КоА. Потім холестерин у складі ліпопротеїнів транспортується в інші органи. Надлишок холестерину перетворюється на жовчні кислоти або виводиться з організму з жовчю.

*Метаболізм амінокислот і білків.* Рівень амінокислот у плазмі крові регулюється печінкою. Надлишкові амінокислоти розщеплюються, аміак зв'язується в циклі сечовини, сечовина переноситься до нирок. Вуглецевий

скелет амінокислот включається в проміжний метаболізм як джерело для синтезу глюкози (глюконеогенез) або як джерело енергії. Крім того, у печінці здійснюється синтез і розщеплення багатьох білків плазми крові. Зокрема, у печінці синтезується весь альбумін (головний транспортний білок) і деякі фракції глобулінів (у тому числі білки гострої фази), апопротеїни ліпопротеїнів, фактори згортання крові тощо.

Стероїдні гормони і білірубін, а також лікарські речовини, етанол та інші ксенобіотики надходять до печінки, де вони інактивуються.

Печінка є місцем депонування енергетичних резервів організму (вміст глікогену може досягати 20 % маси печінки) і речовин-попередників; тут також депонується багато мінеральних речовин, низка вітамінів (А, D, К, В<sub>12</sub> і фолієва кислота), залізо (близько 15 % усього заліза, що міститься в організмі).

## **Лабораторна робота 5**

### **Визначення концентрації білірубіну в сироватці крові**

Термін життя еритроцитів складає загалом 110–120 днів. Потім вони фагоцитуються, головним чином, у селезінці, а також у кістковому мозку і печінці. Гем після вивільнення повторно не використовується, його порфіриновий цикл перетворюється на жовчні пігменти, які виводяться з організму. Унаслідок розкладання гема в печінці, селезінці та кістковому мозку утворюється червоно-коричневий пігмент білірубін. Подальше перетворення білірубіну відбувається в печінці. Оскільки у воді білірубін малорозчинний, він транспортується кров'ю в комплексі з альбуміном. У печінці альбумін відокремлюється, а білірубін шляхом взаємодії з УДФ-глюкуроноювою кислотою утворює добре розчинний білірубін-диглюкуронід. З жовчю білірубін-диглюкуронід переходить у кишечник, де бактеріальні ферменти відщеплюють глюкуронову кислоту. Потім жовчні пігменти виводяться із сечею і калом. При надлишковому утворенні або порушенні виведення жовчних пігментів розвивається стан, який називається жовтяницею. В організмі здорової людини 75 % припадає на некон'югований білірубін, зв'язаний з альбуміном. Його називають непрямим, тому що забарвлені продукти з діазореактивом він утворює тільки при додаванні спирту, який вивільняє білірубін із комплексу з альбуміном. Білірубін-диглюкуронід одразу утворює забарвлені продукти з діазореактивом, тому називається прямим.

*Принцип методу:* у присутності кофеїнового реактиву діазотована сульфанілова кислота утворює з прямим і непрямим білірубіном азобілірубін рожево-фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації загального білірубіну в пробі. У відсутності кофеїнового реактиву в реакцію вступає лише прямий білірубін. За

різницею між загальним і прямим білірубінном визначають концентрацію непрямого (зв'язаного) білірубіну.

*Матеріали і реактиви:*

1. Розчин сульфанілової кислоти:

сульфанілова кислота –  $(25 \pm 1,2)$  мМ;

соляна кислота –  $(0,5 \pm 0,025)$  М.

2. Кофеїновий реактив (концентрат):

бензоат натрію –  $(0,5 \pm 0,25)$  М;

ацетат натрію –  $(1,5 \pm 0,085)$  М;

кофеїн –  $(50 \pm 1,5)$  г/л.

3. Розчин нітрату натрію – 350 мМ.

*Хід роботи.* Аналіз проводять відповідно до схеми, наведеної в таблиці.

Відміряти в кювету, мл	Загальний білірубін	Прямий білірубін	Холоста проба
Сироватка	0,5	0,5	0,5
Кофеїновий реактив	1,75	–	1,75
Фізіологічний розчин	–	1,75	0,25
Діазосуміш	0,25	0,25	–
Для визначення прямого білірубіну фотометрію слід проводити через 5–10 хвилин після додавання діазосуміші, тому що при тривалій дії в реакцію вступає зв'язаний (непрямий) білірубін			
Для визначення загального білірубіну пробу витримати 20 хвилин, після чого провести фотометрію. При подальшій експозиції забарвлення не змінюється. Оптична щільність калібрувальної ( $E_{\text{калібр.}}$ ) і дослідної ( $E_{\text{досл.}}$ ) проб виміряти проти холостої проби при 540 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм			

**Розрахунок** концентрації білірубіну провести за графіком калібрування. Для його побудови скористатися набором «Білірубін-калібратор».

Показання ФЕКу	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Вміст білірубіну, мг/л	3,8	7,6	11,4	15,2	19,0	22,8	22,6	30,2	34,0	37,6

Для визначення концентрації непрямого білірубіну з величини показника загального білірубіну від'єднати величину показника прямого білірубіну.

Нормальна концентрація загального білірубіну складає 10–12 мг/л ( $1,7$ – $20,5$  мМ); з нього 75 відсотків припадає на частку непрямого, а 25 відсотків складає прямий білірубін.

**Клініко-діагностичне значення.** Токсична дія високих концентрацій білірубіну в крові проявляється ураженням ЦНС, появою некротичних ділянок у паренхіматозних органах, пригніченням клітинного імунітету, розвитком анемії внаслідок гемолізу еритроцитів. Важливу роль у токсинній

дії білірубину відіграє його фотосенсибілізуєча дія. Білірубін, як метаболіт протопорфірину, має здатність переводити молекулярний кисень в активну, синглетну форму. Синглетний кисень окислює ліпіди мембран, нуклеїнові кислоти, амінокислоти білків. Унаслідок активації ним перекисного окислення ліпідів і відщеплення глікопротеїнів, а також високомолекулярних пептидів мембран відбувається гемоліз еритроцитів. Накопичення в крові білірубину (вище, ніж 27,36–34,30 мкМ) призводить до накопичення його в тканинах і появи жовтяниці. Залежно від причини виникнення виділяють кілька видів жовтяниць.

При *гемолітичній жовтяниці* печінка не встигає зв'язувати велику кількість вільного білірубину, який утворюється при посиленому гемолізі еритроцитів. У результаті концентрація білірубину в плазмі крові збільшується до 90–100 мкМ за рахунок вільного білірубину.

При *паренхіматозній жовтяниці* внаслідок ураження гепатоцитів знижується кон'югаційна здатність печінки, синтез жовчі, кон'югований білірубін частково потрапляє в кров. При цьому в крові збільшується вміст як зв'язаного, так і прямого білірубину. Паренхіматозна жовтяниця виникає при жировому гепатозі, гепатиті, цирозі печінки.

При *обтураційній жовтяниці* відбувається закупорка жовчних протоків. Жовч переповнює їх і потрапляє в кров. Підвищення концентрації білірубину в крові до 170–700 мкМ відбувається за рахунок зв'язаного білірубину.

У немовлят унаслідок стерильності кишечника білірубін не перетворюється на похідні, але активно всмоктується в кров, зумовлюючи гіпербілірубінемію. Крім того, у немовлят часто спостерігають тимчасову низьку активність білірубін глюкуронілтрансферази, яка є причиною жовтяниці в немовлят, характеризується високим вмістом у крові некон'югованого білірубину.

### Біохімія нирок

Нирки є одним з головних органів, які виділяють кінцеві продукти обміну речовин з організму в складі сечі. Сеча – це водний розчин, у якому містяться різні речовини органічного і неорганічного походження. Усього за добу із сечею виділяється близько 60 г речовин: 35–45 г органічних та 15–25 г мінеральних. У сечі виявлено близько 150 хімічних інгредієнтів.

Функціональною одиницею нирок є нефрон, у якому відбуваються процеси фільтрації, реабсорбції та секреції.

Для дослідження функціонального стану нирок використовують фізіологічні (проба Зімницького, проба Фольгарда та ін.) і біохімічні (дослідження крові на кількість залишкового азоту та його окремих компонентів, геморенальні проби – співвідношення вмісту окремих речовин у крові і сечі) методи.

З 1200 мл крові, яка проходить через клубочки нирок за 1 хвилину, фільтрується близько 120 мл плазми. Для вимірювання швидкості та об'єму клубочкової фільтрації використовують речовини, які легко проникають через нирковий бар'єр, не зазнають метаболізму, не зв'язуються білками, не реабсорбуються, легко і точно визначаються. З цією метою використовують інулін (полісахарид фруктози), кліренс якого в середньому складає 120 мл/хв. Якщо кліренс будь-якої речовини нижчий за цю величину, то частина його реабсорбується в каналцях нирок, наприклад, для сечовини він складає 70 мл/хв, а для глюкози – майже 0 (порогова речовина; поріг для глюкози відповідає граничній концентрації 8,88–10 ммоль/л); якщо ж він вищий, то кліренс цієї речовини здійснюється не тільки шляхом клубочкової фільтрації, а й шляхом канальцевої секреції.

Близьким до інулінового є кліренс ендogenous креатиніну. З урахуванням відносної стабільності концентрації ендogenous креатиніну в крові та його секреції із сечі за ним визначають клубочкову фільтрацію креатиніну (геморенальна проба). Кліренс креатиніну складає в чоловіків 97–137 мл/хв, у жінок – 88–128 мл/хв.

## **Лабораторна робота 6**

### **Біохімія сечі.**

#### **Виявлення нормальних і патологічних компонентів сечі**

Під час хімічного дослідження виявляють як нормальні, так і патологічні компоненти сечі. Біохімічний аналіз сечі дає змогу зробити висновок про функціональний стан нирок, обмін речовин у різних органах і в організмі загалом; дозволяє встановити причини, характер і прогноз патологічного процесу, оцінити ефективність лікування. Крім того, дослідження сечі на вміст лікарських речовин або їхніх метаболітів дає змогу оцінити фармакологічний вплив ліків і прогнозувати терапевтичний ефект.

У клінічній практиці сьогодні достатньо широко використовуються для аналізу сечі автоматичні біохімічні аналізатори, які дозволяють за відносно короткий проміжок часу і в невеликому об'ємі біологічного матеріалу визначити кілька десятків біохімічних параметрів.

Для експрес-діагностики захворювання різні фірми використовують індикаторні тест-смужки, які містять сухі реактиви (ферменти або інші речовини), що призводять до утворення або зміни забарвлення в результаті їхньої взаємодії з деякими метаболітами досліджуваних біологічних рідин, наприклад сечі.

Аналіз сечі проводять, починаючи з оцінки фізико-хімічних властивостей; кількості, кольору, запаху, прозорості, реакції (рН) та щільності сечі.

### Робота 1. Визначення рН сечі за допомогою індикаторного паперу

На середину індикаторного паперу «Ріфан» нанести 1–2 краплі свіжої сечі і за зміною забарвлення однієї із забарвлених смужок, що співпадає з кольором контрольної смужки, визначити рН сечі. Більш точно визначають рН сечі потенціометричним методом.

#### **Клініко-діагностичне значення**

Реакція сечі (рН) у здорової людини коливається в нормі від 4,5 до 8. На реакцію може впливати склад їжі або патології. Наприклад, лужна реакція сечі спостерігається при блюванні, фосфатурії, запаленні сечового міхура (цистит) і ниркових лоханок (пієліт), під час вагітності, вживання лужних мінеральних вод. Більш кисла реакція сечі буває при цукровому діабеті та при голодуванні (через накопичення в сечі кетонових тіл), при важкій нирковій недостатності через порушення функції нирок і зниження вмісту аміаку, який нейтралізує сечу. Дуже кисла реакція спостерігається при подагрі та гарячці.

Значний вплив на реакцію сечі має характер харчування. У випадку посиленого білкового харчування сеча стає більш кислою, якщо ж переважає рослинна їжа – більш лужною.

### Робота 2. Виявлення білка в сечі

*Принцип методу.* Для виявлення білка в сечі найчастіше застосовують реакцію осадження за допомогою сульфосаліцилової кислоти.

*Матеріали і реактиви:* сеча, яка містить білок (патологічна), і нормальна сеча, 20 % розчин сульфосаліцилової кислоти.

*Хід роботи.* У першу пробірку наливають 2 мл нормальної сечі, у другу – 2 мл патологічної. В обидві пробірки додають по 5 крапель 20 % розчину сульфосаліцилової кислоти. При наявності білка в сечі утворюється білий осад або муть.

#### **Клініко-діагностичне значення**

Розрізняють справжню і помилкову протеїнурію. При справжній, або нирковій, протеїнурії білки сироватки крові потрапляють у сечу через нирки при порушенні фільтраційної мембрани. Помилкову протеїнурію спостерігають при потраплянні в сечу слизу, крові, гною не з нирок, а із сечових шляхів.

Білок з'являється в сечі також при серцевій декомпенсації, інколи під час вагітності, при гіпертонії та інфекційних захворюваннях тощо.

### Робота 3. Кількісне визначення вмісту глюкози в сечі (експрес-метод за допомогою глюкотесту)

*Принцип методу.* В основі цього ферментативного методу лежить специфічне окислення глюкози ферментом глюкозооксидазою до глюко-

нової кислоти в присутності молекулярного кисню. У результаті реакції утворюється пероксид водню, який розпадається під впливом пероксидази, виділений кисень при цьому окислює барвник ортотолідин, який забарвлює тест-папір.

*Хід роботи.* У сечу занурити смужку глюкозесту так, щоб жовта частина смужки була повністю змочена. Швидко дістати папір із сечі, покласти змоченим кінцем на пластмасову пластинку і витримати її протягом 2 хвилин. Якщо в сечі присутня глюкоза, то жовта смужка буде змінювати своє забарвлення на різні відтінки зеленого кольору залежно від концентрації глюкози; у разі відсутності глюкози колір смужки не змінюється. Точно через 2 хвилини порівняти забарвлені смужки із забарвленням кольорової шкали: 0,1 %, 0,5 %, 2 % розчин глюкози і вище.

Завдяки високій специфічності та чутливості цього методу, простоті та швидкості виконання його широко використовують як попередній біохімічний тест під час масового обстеження хворих, а також для самоконтролю в процесі лікування.

### **Клініко-діагностичне значення**

Глюкозурія розвивається тоді, коли рівень цукру в крові перевищує «цукровий поріг» (при цукровому діабеті, аліментарній гіперглікемії, збудженні ЦНС, ураженні нирок, гіпертиреозі, акромегалії, синдромі Іценка – Кушинга та ін.).

У вагітних і жінок-годувальниць у сечі може з'явитися лактоза (лактозурія).

#### **Робота 4. Виявлення жовчних кислот у сечі (проба Петтенкофера)**

*Принцип методу.* Метод базується на здатності жовчних кислот давати яскраво-червоне забарвлення з оксиметилфурфуролом, який утворюється внаслідок дії концентрованої сірчаної кислоти на сахарозу.

*Матеріали і реактиви:* концентрована сірчана кислота, 10 % розчин сахарози.

*Хід роботи.* У пробірку налити 2–3 мл сечі, додати 1–2 краплі 10 % розчину сахарози, суміш перемішати. По стінці пробірки обережно нашарувати 1–2 мл сірчаної кислоти. При наявності жовчних кислот з'являється яскраво-червоне забарвлення на межі двох рідин.

### **Клініко-діагностичне значення**

При механічній жовтяниці внаслідок закупорки загального жовчного протоку каменем або пухлиною жовчні капіляри переповнюються жовчю. Унаслідок цього жовч проникає в кров і відбувається посилене виділення жовчних пігментів (білірубін, білівердин) та жовчних кислот із сечею.

### Робота 5. Виявлення кетонових тіл у сечі (проба Герхарда)

*Принцип методу* заснований на здатності ацетоацетату утворювати з хлоридом заліза (III) сполуки, які забарвлені в червоний колір.

*Матеріали і реактиви:* сеча, 10 % розчин хлориду заліза (III).

*Хід роботи.* До 5 мл сечі додати по краплі 10 % розчин хлориду заліза (III); в осад випадає фосфат заліза. При наявності ацетоацетату після додавання зайвої краплі хлориду заліза (III) з'являється червоне забарвлення (реакція на еноли), яке поступово зникає внаслідок спонтанного декарбоксілювання ацетоацетату (про виявлення кетонових тіл (проба Ланге) див. тему «Метаболізм ліпідів і його регуляція»).

### **Клініко-діагностичне значення**

У нормі за добу виділяється 20–40 мг кетонових тіл. Збільшення кількості кетонових тіл у крові (кетонемія) і сечі (кетонурія) спостерігається при цукровому діабеті, дефіциті вуглеводнів у харчуванні (вуглеводневе голодування), тиреотоксикозі, ураженні печінки, важких інтоксикаціях.

### Робота 6. Якісна реакція на фенілпіровиноградну кислоту (проба Фелінга)

*Принцип методу.* Фенілпіровиноградна кислота (фенілпіруват) утворює з іонами заліза (III) комплексну сполуку, яка забарвлена в синьо-зелений колір.

*Матеріали і реактиви:* сеча, 10 % розчин хлориду заліза (III).

*Хід роботи.* До 2 мл свіжовідфільтрованої сечі додати 8–10 крапель 10 % розчину хлориду заліза (III). При наявності в сечі фенілпірувату через 30–60 с з'являється синьо-зелене забарвлення, яке поступово блідне і за 5–30 хв (залежно від концентрації фенілпірувату в сечі) вицвітає. Цю пробу можна проводити на фільтрувальному папері або дитячій пелюшці.

**Клініко-діагностичне значення.** Підвищений вміст у крові та присутність у сечі фенілпірувату є діагностичним критерієм фенілкетонурії.

### Робота 7. Виявлення уробіліну в сечі (реакція Богомолова)

*Принцип методу.* Уробілін здатний утворювати із сульфатом міді рожево-червоні або мідно-червоні продукти реакції, які добре розчинні в хлороформі.

*Методи і реактиви:* сеча, насичений водний розчин сульфату міді, концентрована соляна кислота, хлороформ.

*Хід роботи.* У пробірку налити 2–3 мл сечі, додати 0,5 мл насиченого розчину сульфату міді. Якщо суміш стає каламутною внаслідок утворення гідроксиду міді, тоді додати одну краплю концентрованої соляної кислоти для освітлення розчину. Через 5 хв додати 0,5 мл хлороформу

й обережно струсити пробірку кілька разів. При наявності уробіліну хлороформ набуває рожево-червоного або мідно-червоного кольору (залежно від концентрації уробіліну в сечі).

### Клініко-діагностичне значення

Уробілінурію спостерігають при паренхіматозних захворюваннях печінки (гепатит, цироз), гемолітичних станах (гемолітична жовтяниця, гемоглобінурія тощо), кишечних захворюваннях, пов'язаних з підсиленою реабсорбцією стеркобіліногену кишечником (ентероколіт, закріп), лихоманках, які супроводжуються токсичним ураженням печінки.

Повна відсутність уробіліну в сечі свідчить про обтураційну жовтяницю.

### Біохімія м'язів

Найважливіша функція м'язового волокна – скорочувальна. Процес скорочення і розслаблення пов'язаний зі споживанням АТФ, гідроліз якого каталізує міозин-АТФ-аза. Однак невеликий запас АТФ, який є в м'язах, витрачається за 1 секунду.

Потреби працюючого м'яза в АТФ задовольняються за рахунок деяких ферментативних реакцій.

Швидка регенерація АТФ може бути досягнута за рахунок перенесення фосфатної групи креатинфосфату на АДФ у реакції, яку каталізує креатинкіназа. Однак і цей м'язовий резерв «високоенергетичного фосфату» витрачається протягом кількох секунд. У спокійному стані креатинфосфат знову синтезується з креатину. При цьому фосфатна група приєднується до гуанідинової групи креатину (N-гуанідино-N-метилгіцину). Креатин, який синтезується в печінці, підшлунковій залозі та нирках, в основному накопичується в м'язах. Тут креатин повільно циклізується за рахунок неферментативної реакції з утворенням креатиніну, який надходить до нирок і видаляється з організму.

Найважливішим довгостроковим енергетичним резервом у м'язовій тканині є глікоген. У тканині в стані спокою вміст глікогену складає до 2 % від м'язової маси. При деградації під дією фосфорилази глікоген легко розщеплюється з утворенням глюкозо-6-фосфату, який при наступному гліколізі перетворюється на піруват. За великої потреби в АТФ і недостатньому надходженні кисню піруват в анаеробному гліколізі відновлюється до лактату, який дифундує в кров і надходить у печінку, де конвертується в глюкозу (цикл Корі).

З усіх шляхів синтезу АТФ найбільш продуктивним є окислювальне фосфорилування. За рахунок процесу забезпечуються потреби в АТФ

постійно працюючого серцевого м'яза (міокарда). Саме через це для успішної роботи серцевого м'яза обов'язковою умовою є достатнє постачання кисню.

Скелетні м'язи беруть активну участь у метаболізмі амінокислот. У них відбувається деградація розгалужених амінокислот. Низка інших амінокислот також деградує переважно в м'язах. Водночас відбувається синтез і вивільнення в кров аланіну та глутаміну. Ці амінокислоти є переносниками азоту, що утворюється при розщепленні білків, у печінку.

При голодуванні м'язові білки відіграють роль енергетичного резерву організму. Вони гідролізуються до амінокислот, які надходять у печінку. Тут вуглецевий скелет амінокислот перетворюється на проміжні продукти циклу Кребса, а також на ацетоацетил-КоА і ацетил-КоА.

## **Лабораторна робота 7**

### **Кількісне визначення креатиніну в сироватці крові і сечі**

Креатинін – один з кінцевих продуктів азотного обміну хребетних тварин і людини, який виділяється із сечею. Креатинін утворюється з креатинфосфату шляхом неферментативного дефосфорилування.

У печінці та підшлунковій залозі з аргініну, гліцину та метіоніну синтезується креатин. У скелетних м'язах, міокарді та нервовій тканині внаслідок зворотної реакції перенесення фосфатної групи з АТФ на креатин утворюється креатинфосфат – макроергічна сполука, яка виконує роль донора енергії для скорочення мускулатури й активного транспорту іонів у нервовій тканині.

При порушенні обміну креатину (наприклад при м'язових дистрофіях) більша його частина виводиться у вигляді креатиніну.

Креатинін не абсорбується в каналцях печінки, тому його вміст у сечі може бути також показником фільтруючої здатності нирок.

*Принцип методу:* пікринова кислота в лужному середовищі утворює з креатиніном продукт помаранчевого кольору (похідне 2,4,6-тринітроциклогексادیєну). Інтенсивність забарвлення дослідного розчину є прямо пропорційною концентрації креатиніну в пробі. У сироватці крові креатинін досліджується після депротеїнізації розчином ТХО, у сечі – після розведення.

*Матеріали і реактиви:*

1. Розчин пікринової кислоти ( $0,04 \pm 0,002$ ) М.
2. Розчин трихлороцтової кислоти ( $1,22 \pm 0,061$ ) М.
3. Гідроокис натрію: розчин 2,3 н або сухий NaOH.
4. Калібрувальний розчин креатиніну ( $442,5 \pm 22$ ) мкМ.

*Хід роботи.* Аналіз провести згідно з таблицею.

Розчин, що відміряється, мл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Сироватка або сеча, розведена в 100 разів	1,0	–	–
Дистильована вода	2,0	2,0	2,0
Калібрувальний розчин	–	1,0	–
Перемішати, центрифугувати 5 хвилин при 3000 об/хв			
Надосадова рідина	2,0	2,0	2,0
Розчин гідроокису натрію	1,0	1,0	1,0
Розчин пікринової кислоти	1,0	1,0	1,0
Перемішати, витримати 20 хвилин при кімнатній температурі, фотометрувати проти холостої проби. Забарвлення стабільне протягом (20±2) хв. Оптичну щільність розчинів вимірюють при довжині хвилі 490–520 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм			

Нормальні значення концентрації креатиніну в сироватці:

Підлітки: 44–88 мкМ;

18–60 років: Ч: 80–115 мкМ;

Ж: 53–97 мкМ;

60–90 років: Ч: 71–115 мкМ;

Ж: 53–106 мкМ.

Розрахунок концентрації креатиніну в пробі проводять за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{дослід.}}}{E_{\text{калібр.}}} \times 0,05 \quad (442),$$

де С – концентрація креатиніну в пробі, г/л (мкМ);

0,05 (442) – калібрувальна концентрація креатиніну, г/л (мкМ);

$E_{\text{дослід.}}$  – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{калібр.}}$  – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності.

Кількість креатиніну в сечі за добу визначають за формулою:

$$KK = \frac{C \times A}{B \times 100},$$

де КК – кількість креатиніну в сечі за добу, мг;

С – концентрація креатиніну в сечі, мг %;

А – кількість сечі за добу, мл;

В – кількість сечі, взятої для аналізу, мл.

Нормальні значення вмісту креатиніну в сечі:

Підлітки 8–30 мг/кг/добу 71–265 мкмоль/кг/добу

Дорослі Ч: 14–6 мг/кг/добу 124–230 мкмоль/кг/добу

Ж: 11–20 мг/кг/добу 97–177 мкмоль/кг/добу.

За добу із сечею в здорової людини виділяється 4,4–17,7 мМ креатиніну.

### **Клініко-діагностичне значення**

Підвищення концентрації креатиніну в крові спостерігається при печінковій недостатності, порушеннях функцій нирок, спричинених нефротоксичними препаратами, закупорці сечовивідних шляхів, кишковій непрохідності, важкому діабеті, декомпенсації серця, механічній жовтяниці, гіпофункції наднирників, голодуванні, вагітності. Зниження концентрації креатиніну в крові спостерігають при анемії та після введення АКТГ.

Концентрація креатиніну в сечі підвищується при посиленій роботі м'язів, лихоманках (при яких відбувається інтенсивніший розпад білків протоплазми), пневмонії, захворюваннях печінки. Знижені величини спостерігаються при м'язовій атрофії, дегенерації нирок, амілоїдозі нирок, лейкемії.

Креатинін у сечі досліджують також для обліку екскреції багатьох фізіологічно значимих сполук. Враховуючи те, що креатинін не зустрічає перепон при екскреції, розрахунок екскреції компонента аналізу проводиться на 1 мг екскретованого із сечею креатиніну (наприклад білок сечі/креатинін, амілаза/креатинін, одновалентні катіони/креатинін).

### ***Контрольні питання за темою «Функціональна і клінічна біохімія органів і тканин»***

1. Біохімічні функції печінки: участь в обміні вуглеводнів, ліпідів, білків.
2. Детоксикаційна функція печінки; типи реакцій біотрансформації ксенобіотиків і ендогенних токсинів.
3. Реакції мікросомального окислення. Цитохром Р-450; ланцюги транспорту електронів у мембранах ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів.
4. Реакції кон'югації в гепатоцитах: біохімічні механізми, функціональне значення.
5. Катаболізм гемоглобіну і гема; утворення і структура жовчних пігментів.
6. Роль печінки в обміні жовчних пігментів. Патобіохімія жовтяниць; типи жовтяниць; спадкові (ферментні) жовтяниці, біохімічна діагностика жовтяниці.
7. Водно-сольовий обмін в організмі. Внутрішньоклітинна і позаклітинна вода; обмін води, натрію, калію.
8. Роль нирок у регуляції обміну, електролітного стану та рН рідин організму. Біохімічні механізми сечоутворюючої функції нирок.
9. Ренін-ангіотензинова система нирок. Гіпотензивні лікарські засоби – інгібітори ангіотензінперетворюючого ферменту.
10. Біохімічний склад сечі людини в нормі і при розвитку патологічних процесів.

Клініко-діагностичне значення аналізу складу сечі.

11. Біохімічний склад м'язів. Білки міофібрилл: міозин, актин, тропоміозин, тропонін.

12. Молекулярні механізми м'язового скорочення. Роль іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляції скорочення і розслаблення м'язів.

13. Біоенергетика м'язової тканини; джерела АТФ; роль креатинфосфату в забезпеченні енергії скорочення м'язів.

14. Біохімія нервової системи: особливості біохімічного складу та метаболізму головного мозку.

15. Енергетичний обмін у головному мозку людини. Значення аеробного окислення глюкози; зміни в умовах фізіологічного сну та наркозу.

16. Біохімія нейромедіаторів; рецептори нейромедіаторів і фізіологічно активних сполук.

17. Пептидергічна система головного мозку: опіюїдні пептиди, рецептори опіюїдних пептидів.

18. Порушення обміну медіаторів і модуляторів головного мозку при психічних розладах. Нейрохімічні механізми дії психотропних засобів.

# ЛІТЕРАТУРА



## Базова література

1. Біологічна хімія : підручник / за ред. А. Л. Загайка, К. В. Александрової. Харків : Форт, 2014. 780 с.
2. Біохімія: підруч. для студентів ВНЗ /за ред. Л. І. Остапченко. Київ : Київський ун-т, 2012. 796 с.
3. Гонський Я. І. Біохімія людини : підручник / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук, М. І. Калинський. Тернопіль : Укрмедкнига, 2002. 744 с.
4. Губський Ю. І. Біохімія : підручник / Ю. І. Губський. Київ – Вінниця : Нова книга, 2009. 664 с.

## Допоміжна література

1. Марінцова Н. Г. Біологічна хімія : підручник / Н. Г. Марінцова, С. В. Половкович, В. П. Новіков. Львів : Нац. ун-т «Львівська політехніка», 2013. 333 с.
2. Мецищен І. Ф., Пішак В. П., Григор'єва Н. П. Біомолекули : структура та функції. Чернівці : Медик, 1999. 149 с.
3. Halkerston I.D.K. Biochemistry: 2nd edition. The National medical series for independent study, 1988. 522 p.
4. Stryer L. Biochemistry. W.H.Freeman and Company. New York, 1995. 1064 p.

# ЗМІСТ



Вступ.....	3
Правила роботи в біохімічній лабораторії.....	4
Матеріал для діагностичних досліджень.	
Принципи забору матеріалу для дослідження .....	7
Методи біохімічних досліджень .....	11
<b>РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ .....</b>	<b>17</b>
<b>Тема 1.</b> Вступ у біохімію. Біохімічні компоненти клітин .....	17
Лабораторна робота 1. Поділ суміші амінокислот методом розподільчої хроматографії.....	18
Лабораторна робота 2. Якісні реакції на білки й амінокислоти .....	22
Лабораторна робота 3. Осадження білків.....	24
<b>Тема 2.</b> Ферменти і коферменти .....	26
Лабораторна робота 4. Властивості ферментів.....	26
Лабораторна робота 5. Дія уреазы .....	29
Лабораторна робота 6. Визначення активності амілази за Вольгемуттом.....	29
<b>Тем 3, 4.</b> Основні закономірності метаболізму. Цикл Кребса. Молекулярні основи біоенергетики.....	32
<b>РОЗДІЛ 2. МЕТАБОЛІЗМ ВУГЛЕВОДІВ, ЛІПІДІВ, АМІНОКИСЛОТ І ЙОГО РЕГУЛЯЦІЯ .....</b>	<b>35</b>
<b>Тема 1.</b> Метаболізм вуглеводів і його регуляція .....	35
Лабораторна робота 1. Хімічні властивості вуглеводів.....	36
Лабораторна робота 2. Визначення концентрації глюкози в сироватці крові глюкозооксидазним методом .....	40
<b>Тема 2.</b> Метаболізм ліпідів і його регуляція .....	43
Лабораторна робота 3. Визначення вмісту загальних ліпідів у сироватці крові .....	44
Лабораторна робота 4. Визначення вмісту холестерину в сироватці крові ферментативним методом .....	45
Лабораторна робота 5. Якісна проба на кетонів тіла .....	47
Лабораторна робота 6. Фурфуролова проба на жовчні кислоти.....	47
<b>Тема 3.</b> Метаболізм амінокислот. Ензимопатії амінокислотного обміну.....	49
Лабораторна робота 7. Визначення активності амінотрансфераз ...	50
Лабораторна робота 8. Визначення концентрації сечовини в сироватці крові і сечі .....	52
<b>РОЗДІЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ. БІОХІМІЯ МІЖКЛІТИННИХ КОМУНІКАЦІЙ.....</b>	<b>55</b>
<b>Тем 1, 2.</b> Основи молекулярної біології. Основи молекулярної генетики.....	55
Лабораторна робота 1. Визначення складу нуклеопротейдів .....	55

Лабораторна робота 2. Визначення концентрації сечової кислоти .....	56
<b>Тема 3, 4.</b> Молекулярні механізми дії гормонів на клітини-мішені. Біохімія гормональної регуляції метаболізму.....	60
Лабораторна робота 3. Якісні реакції на гормони. Визначення концентрації адреналіну .....	61
Лабораторна робота 4. Кількісне визначення загального кальцію в біологічних рідинах .....	63
Лабораторна робота 5. Кількісне визначення вмісту неорганічного фосфору в біологічних рідинах.....	65
<b>РОЗДІЛ 4. БІОХІМІЯ ОРГАНІВ І ТКАНИН .....</b>	<b>69</b>
<b>Тема 1.</b> Біохімія харчування людини. Вітаміни як компоненти харчування .....	69
Лабораторна робота 1. Якісні реакції на вітаміни.....	70
Лабораторна робота 2. Кількісне визначення вітамінів.....	73
<b>Тема 2.</b> Біохімія і патобіохімія крові .....	75
Лабораторна робота 3. Визначення концентрації гемоглобіну в крові.....	75
Лабораторна робота 4. Кількісне визначення білка в сироватці крові методом Кірка.....	77
<b>Тема 3.</b> Функціональна і клінічна біохімія органів і тканин. Біохімія печінки .....	80
Лабораторна робота 5. Визначення концентрації білірубіну в сироватці крові .....	81
Лабораторна робота 6. Біохімія сечі. Виявлення нормальних і патологічних компонентів сечі .....	84
Лабораторна робота 7. Кількісне визначення креатиніну в сироватці крові і сечі .....	89
<b>Література .....</b>	<b>93</b>

Навчальне видання

**Седова** Крістіна Володимирівна  
**Охріменко** Світлана Михайлівна  
**Князева** Марина Владиславівна

**БІОХІМІЯ**  
(загальний курс)

Практикум

Коректор *О. В. Пунько*  
Комп'ютерне верстання *В. В. Савінкова*

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 5,63. Наклад 100 пр. Зам. № 90/25.

Видавець і виготовлювач  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,  
61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.2009  
Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна