

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

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ З БІОХІМІЇ

Навчально-методичний посібник

Харків – 2025

Рецензенти:

В. Ю. Прокопюк – докт. біол. наук, канд. мед. наук, старший науковий співробітник відділу кріобіохімії з центром колективного користування приладами Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАНУ;

В. П. Берест – докт. фіз.-мат. наук, проф., завідувач кафедри молекулярної і медичної біофізики факультету РБЕКС Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

*Затверджено до друку рішенням Науково-методичної ради
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
(протокол № 2 від 20 листопада 2025 року)*

Лабораторний практикум з біохімії : навчально-методичний посібник / уклад.
Л 12 І. В. Нікітченко, Т. В. Бараннік. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2025. – 148 с.

Навчально-методичний посібник розроблений для підготовки до занять з курсу «Біохімія» і містить пояснення теоретичного матеріалу за темами розділів робочої програми курсу (біокаталіз, метаболізм основних класів біомолекул, молекулярні механізми передачі та реалізації генетичної інформації, інтеграція та регуляція метаболізму), огляд основних фізико-хімічних методів дослідження, протоколи лабораторних робіт, контрольні питання і тестові завдання з кожної теми, питання до поточного контролю. Призначений для студентів біологічного факультету, які навчаються за освітньо-професійною програмою «Біологія» підготовки першого (бакалаврського) рівня вищої освіти (спеціальність «Біологія та біохімія»).

УДК 577.1 (073)

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

© Нікітченко І. В., Бараннік Т. В., уклад., 2025

© Нікітченко Н. Ю., рисунки, 2025

© Дончик І. М., макет обкладинки, 2025

ЗМІСТ



Перелік умовних скорочень	6
Вступ.....	8
Основні правила роботи в біохімічній лабораторії	9
Розділ 1. Вступ до біохімії. Біокаталіз. Загальні закономірності метаболізму. 13	
Тема 1.1. Фізико-хімічні методи дослідження в біохімії	13
Спектроскопічні методи	13
Центрифугування	17
Електрофорез	20
Ізоелектричне фокусування.....	23
Поділ речовин за допомогою мембран	24
Хроматографічні методи розділення речовин.....	24
Контрольні питання з теми 1.1.....	27
Тестові завдання з теми 1.1	28
Тема 1.2. Ферментативний каталіз	30
Властивості та структура ферментів	30
Класифікація і номенклатура ферментів	31
Регуляція ферментативних реакцій	32
Методи дослідження ферментів та визначення їхньої активності.....	33
<i>Лабораторна робота 1. Спостереження за дією деяких ферментів.</i> 33	
<i>Лабораторна робота 2. Природа ферментів та їхні основні властивості</i>	35
<i>Лабораторна робота 3. Кількісне визначення активності ферментів.</i> 41	
Контрольні питання з теми 1.2.....	45
Тестові завдання з теми 1.2	46
Тема 1.3. Основи біоенергетики. Біологічне окиснення.	
Дихальний ланцюг	48
Біологічне окиснення. Роль АТФ	48
Дихальний ланцюг. Окисне фосфорилування.....	48
Методи дослідження енергетичного обміну	49
<i>Лабораторна робота 4. Дослідження активності сукцинатдегідрогенази тканин тварин</i>	50
<i>Лабораторна робота 5. Виявлення цитохромоксидази в м'язовій тканині тварин</i>	51
<i>Лабораторна робота 6. Визначення сумарного вмісту основних високоенергетичних сполук м'язової тканини тварин</i>	53
Контрольні питання з теми 1.3.....	55
Тестові завдання з теми 1.3	56
Тема 1.4. Метаболізм. Етапи катаболізму. Цикл Кребса	58

Напрямки метаболізму.....	58
Цикл трикарбонових кислот	58
Контрольні питання з теми 1.4.....	59
Тестові завдання з теми 1.4	60
Розділ 2. Метаболізм основних класів біомолекул.....	62
Тема 2.1. Обмін вуглеводів	62
Перетравлення вуглеводів у ШКТ і транспорт моносахаридів.....	62
Обмін глікогену	63
Гліколіз	64
Пентозофосфатний шлях окиснення глюкози.....	65
Глюконеогенез	66
Методи визначення вуглеводів та продуктів їхнього обміну.....	67
<i>Лабораторна робота 7. Кількісне визначення глюкози</i> <i>глюкозооксидазним методом (з використанням набору реактивів) ..</i>	<i>69</i>
<i>Лабораторна робота 8. Визначення піровиноградної кислоти</i> <i>в крові модифікованим методом Умбрайта.....</i>	<i>70</i>
Контрольні питання з теми 2.1.....	72
Тестові завдання з теми 2.1	73
Тема 2.2. Обмін ліпідів	75
Обмін триацилгліцеролів.....	75
Транспорт ліпідів в організмі людини та тварин	75
Обмін жирних кислот	76
Обмін холестерину	78
Методи визначення ліпідів і продуктів їхнього обміну	79
<i>Лабораторна робота 9. Визначення загальних ліпідів</i> <i>в сироватці крові (з використанням набору реактивів).....</i>	<i>79</i>
<i>Лабораторна робота 10. Визначення вмісту загального</i> <i>холестерину в сироватці крові ферментативним методом</i> <i>(з використанням набору реактивів)</i>	<i>81</i>
<i>Лабораторна робота 11. Проба на кетоніві тіла</i>	<i>83</i>
Контрольні питання з теми 2.2.....	84
Тестові завдання з теми 2.2	85
Тема 2.3. Обмін білків та амінокислот.....	88
Перетравлення білків у ШКТ і транспорт амінокислот	88
Шляхи обміну амінокислот у тканинах	89
Знешкодження аміаку. Біосинтез сечовини	91
Методи кількісного визначення білків та продуктів їхнього обміну	92
<i>Лабораторна робота 12. Метод визначення білка</i> <i>з біуретовим реактивом (з використанням набору реактивів)</i>	<i>93</i>
<i>Лабораторна робота 13. Визначення кількості білка</i> <i>за методом Лоурі</i>	<i>96</i>
<i>Лабораторна робота 14. Кількісне визначення сечовини</i> <i>діацетилмонооксимним методом</i> <i>(з використанням набору реактивів)</i>	<i>98</i>

Контрольні питання з теми 2.3.....	100
Тестові завдання з теми 2.3	101
Тема 2.4. Обмін нуклеїнових кислот і нуклеотидів.....	104
Синтез пуринових і піримідинових нуклеотидів	104
Катаболізм пуринових і піримідинових нуклеотидів.....	105
Лабораторна робота 15. Кількісне визначення сечової кислоти (з використанням набору реактивів)	106
Контрольні запитання з теми 2.4	108
Тестові завдання з теми 2.4	109
Розділ 3. Молекулярні механізми передачі та реалізації генетичної інформації.	
Інтеграція та регуляція метаболізму	111
Тема 3.1. Реплікація ДНК.....	111
Механізм та учасники реплікації.....	111
Стадії реплікації	112
Методи кількісного визначення нуклеїнових кислот.....	113
Лабораторна робота 16. Спектрофотометричне визначення вмісту нуклеїнових кислот	114
Лабораторна робота 17. Кількісне визначення ДНК з дифеніламіном за методом Діше.....	115
Контрольні питання з теми 3.1.....	117
Тестові питання з теми 3.1	117
Тема 3.2. Експресія генів. Біосинтез білка	120
Транскрипція.....	120
Трансляція	121
Контрольні питання з теми 3.2.....	123
Тестові питання з теми 3.2	123
Тема 3.3. Гормональна регуляція метаболізму	126
Загальна характеристика гормонів та механізмів їхньої дії	126
Приклади дії гормонів на обмін речовин.....	127
Методи якісного і кількісного визначення гормонів.....	129
Лабораторна робота 18. Якісні реакції на білково-пептидні гормони	129
Лабораторна робота 19. Якісні реакції на гормони – похідні амінокислот	131
Лабораторна робота 20. Якісні реакції на стероїдні гормони	133
Лабораторна робота 21. Кількісне визначення адреналіну.....	134
Контрольні питання з теми 3.3.....	136
Тестові завдання з теми 3.3	137
Перелік питань для підготовки до поточного контролю	139
Література	145

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМГ-КоА — гідроксиметилглутарил-КоА
ДНКаза — дезоксирибонуклеаза
ЕПР — ендоплазматичний ретикулум
ЖК — жирна кислота
ЛПДНЩ — ліпопротеїни дуже низької щільності
ЛПНЩ — ліпопротеїни низької щільності
ЛПВЩ — ліпопротеїни високої щільності
КоASH — кофермент (коензим) А
КоQH₂ — кофермент (коензим) Q (убіхінон відновлений)
НК — нуклеїнова кислота
ПААГ — поліакриламідний гель
ПФШ — пентозофосфатний шлях
РНКаза — рибонуклеаза
ТАГ — триацилгліцероли
ТГФК — тетрагідрофолієва кислота
Трис — трисамінометан
ТХО — трихлороцтова кислота
ФРА — 5-фосфорибозил-1-амін
ФЕП — фосфоенолпіруват
ФРДФ — 5-фосфорибозил-1-дифосфат
ХМ — хіломікрони
ЦНС — центральна нервова система
ЦТК — цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса)
ШКТ — шлунково-кишковий тракт
ADP — аденозиндифосфат
AMP — аденозинмонофосфат
cAMP — циклічний аденозинмонофосфат
ATP — аденозинтрифосфат
CDP — цитидиндифосфат
CTP — цитидинтрифосфат
GDP — гуанозиндифосфат
GMP — гуанозинмонофосфат
cGMP — циклічний гуанозинмонофосфат
GTP — гуанозинтрифосфат
IMP — інозинмонофосфат
FAD — флавінаденіндинуклеотид окиснений
FADH₂ — флавінаденіндинуклеотид відновлений
FMN — флавінмононуклеотид окиснений
FMNH₂ — флавінмононуклеотид відновлений
NAD⁺ — нікотинамідаденіндинуклеотид окиснений
NADH — нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
NADP⁺ — нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат окиснений
NADPH — нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
dNTP — дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат

P_i – фосфат неорганічний
 PP_i – пірофосфат неорганічний
 $dTMP$ – дезокситимідинмонофосфат
 UMP – уридинмонофосфат
 UDP -глюкоза – уридиндифосфатглюкоза
 UMP – уридинмонофосфат
 UTP – уридинтрифосфат

ВСТУП



Біохімія вивчає молекулярні основи життя – хімічний склад, будову і властивості біомолекул, процеси перетворення речовин та енергії, що лежать в основі життєдіяльності клітин і організму в цілому, а також молекулярні механізми регуляції та інтеграції метаболічних процесів.

Основною метою лабораторного практикуму з біохімії є конкретизація теоретичних знань про структуру і властивості основних класів біомолекул та їхні метаболічні перетворення в живих організмах шляхом формування практичних навичок проведення біохімічного аналізу.

Посібник поділений на розділи і підрозділи відповідно до робочої програми навчальної дисципліни «Біохімія». На початку кожного підрозділу розміщено теоретичний матеріал, в якому розглядаються основні питання теми, що вивчається. Далі наведено протоколи лабораторних робіт із зазначенням принципу методів і хімічних реакцій, на яких базується визначення певних речовин, переліку необхідних реактивів та обладнання, порядку виконання роботи, розрахункових формул. Наприкінці кожної теми є контрольні питання та тестові завдання для самоконтролю засвоєння навчального матеріалу. Також у посібнику наведені питання для поточного контролю.

Виконання завдань лабораторного практикуму дає можливість більш повно засвоїти теоретичний матеріал, опанувати основні прийоми якісного та кількісного визначення досліджуваних речовин, навчитися оформлювати результати експериментів, аналізувати їх і робити висновки. Набуті під час виконання лабораторних робіт знання та навички є необхідним компонентом практичної підготовки за спеціальністю «Біологія та біохімія».

ОСНОВНІ ПРАВИЛА РОБОТИ В БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ



Для допуску до лабораторного практикуму студенти мають ознайомитися з правилами роботи в біохімічній лабораторії, із засобами пожежогасіння та місцем їхнього знаходження, з правилами першої допомоги при нещасних випадках. На початку кожного семестру проводиться первинний інструктаж з техніки безпеки та пожежної безпеки, результати якого реєструються в спеціальних журналах.

Основні правила техніки безпеки під час лабораторного практикуму:

1. Працювати в хімічній лабораторії дозволяється тільки в спецодязі (халат з бавовняної тканини) і з використанням засобів індивідуального захисту (гумові рукавички, захисні окуляри тощо).

2. Суворо дотримуватися послідовності операцій, що зазначена в методичних вказівках до лабораторної роботи. Ніяких додаткових дослідів без дозволу викладача не проводити.

3. Під час роботи в лабораторії має перебувати не менше двох людей. Виконувати лабораторні роботи слід виключно у присутності викладача або лаборанта.

4. У хімічній лабораторії заборонено вживати їжу, пити воду та використовувати хімічний посуд як столовий.

5. Хімічні реактиви не можна брати руками. Для сипучих реактивів використовують чисті сухі шпателі або спеціальні ложечки, для рідких – піпетки, мірні циліндри. Рідкі реактиви заборонено набирати в піпетки ротом, це слід робити за допомогою гумової груші, механічного дозатора або інших пристроїв.

6. Під час ідентифікації за запахом хімічної речовини слід нюхати її обережно, знаходячись на певній відстані і спрямовуючи до себе пари легким рухом руки, але не допускаючи потрапляння часточок сипучих реактивів або концентрованих парів у дихальні шляхи.

7. На всіх банках з хімічними реактивами мають бути етикетки із зазначенням назви реактиву, хімічної формули, концентрації, дати виготовлення. Використовувати реактиви без етикеток заборонено.

8. Необхідно стежити за збереженням чистоти реактивів під час роботи (не плутати корки від банок, які містять різні реактиви; надлишок узятого реактиву не повертати назад у банку; кожний рідкий реактив набирати окремою піпеткою, не плутаючи піпетки від різних реактивів; сухі реактиви відбирати сухим чистим шпателем або лопаткою).

9. Студентам забороняється самостійно запалювати газові пальники та вмикати будь-яке електричне обладнання (центрифуги, фотоелектроколориметри, термостати, водяні бані тощо).

10. При витоку газу не можна вмикати і вимикати електричні прилади й освітлення, це можна робити тільки після перекриття вентилів газопостачання і повного провітрювання приміщення.

11. При нагріванні рідини в пробірці її кількість не має перевищувати 1/3 об'єму пробірки. Спочатку пробірку з рідиною прогрівують всю в полум'ї пальника, а потім продовжують нагрівати нижче рівня рідини в ній, періодично виводячи пробірку з полум'я. При нагріванні розчину в пробірці її отвір слід направляти убік від себе і людей, які знаходяться поруч. При нагріванні пробірок використання пробіркотримачів є обов'язковим.

12. Усі роботи з леткими, токсичними, легкозаймистими речовинами, органічними розчинниками (аміак, діетиловий ефір, бутанол тощо) слід виконувати тільки у витяжній шафі. Роботи з легкозаймистими речовинами не проводити поряд з відкритим вогнем.

13. Усі роботи з концентрованими кислотами і лугами слід проводити тільки у витяжній шафі і з використанням індивідуальних засобів захисту (гумові рукавички, захисні окуляри).

14. При розведенні концентрованих кислот (сірчаної, азотної та ін.) виділяється велика кількість тепла, тому слід *наливати кислоту у холодну воду, але не навпаки*, тонким струменем при постійному обережному помішуванні. Всі реакції, що супроводжуються розігріванням (розбавлення кислот, лугів) необхідно проводити тільки в термостійкому посуді.

15. Пролиті концентровані розчини кислот і лугів засипати піском, після видалення піску місце, де була пролита кислота, посипають содою, а місце, де було пролито луг, обробляють слабким розчином оцтової кислоти, а потім в обох випадках місце промивають водою.

Після виконання лабораторної роботи необхідно прибрати робоче місце, вимити посуд і руки.

Перша допомога при нещасних випадках

Під час роботи в хімічній лабораторії найімовірніші такі види ушкоджень, як поранення, опіки, інгаляційні отруєння. Домедична допомога має бути надана потерпілому співробітниками лабораторії.

При пораненнях (при порізах склом) необхідно насамперед видалити з рани уламки скла стерильним пінцетом або стерильним бинтом, зупинити кровотечу (заливають рану 3 % розчином перекису водню), обробити поверхню шкіри навколо рани розчином йоду і накласти стерильну пов'язку.

При термічних опіках рекомендується спочатку потримати обпечену частину тіла під струменем холодної води протягом 10–15 хв (тільки в тому випадку, якщо не порушена цілісність шкіри), обробити обпечене місце 2 % розчином перманганату калію або етиловим спиртом (96 %), потім змастити засобом від опіків або обробити спеціальним аерозолем. При опіку другого ступеня (коли утворилися пухирці і порушено цілісність верхнього шару шкіри) область опіку спиртом не обробляють, накладають стерильну або асептичну пов'язку. Подальшу допомогу має надавати лікар.

При хімічних опіках слід насамперед видалити речовину, що спричинює опік, і потім обробити уражене місце відповідним розчином, для нейтралізації чинника, дія якого призвела до опіку. При потрапленні кислоти уражену ділянку шкіри промити спочатку великою кількістю проточної води (під сильним струменем), потім 3–5 % розчином питної соди протягом 10 хв, а потім повторно промити водою. При опіку лугом уражену ділянку промити великою кількістю проточної води, потім 2 % розчином борної або оцтової кислоти, а потім повторно промити водою. При хімічних опіках очей слід промити потерпілому очі великою кількістю води, потім промити 2 % розчином питної соди у випадку потраплення в очі кислоти або 2 % розчином борної кислоти при потрапленні луку. Для надання подальшої допомоги слід звернутися до лікаря.

При інгаляційних ураженнях потерпілому необхідно забезпечити доступ свіжого повітря і надати допомогу відповідно до правил детоксикації тієї чи іншої леткої речовини.

При ураженнях електричним струмом слід насамперед звільнити потерпілого від струмопровідних частин обладнання, тобто швидко відключити від мережі ту частину електрообладнання, з якою контактує людина. Потерпілого, що знаходиться під напругою, можна звільнити від контакту з електропроводкою, відтягнувши провід за допомогою сухої дерев'яної палиці або, надівши на руки діелектричні рукавиці. Потерпілому необхідно забезпечити спокій і доступ свіжого повітря. При зупинці дихання і серця необхідно негайно, не чекаючи прибуття лікаря, проводити штучне дихання і масаж серця.

Пожежна безпека і первинні засоби пожежогасіння

Основними причинами виникнення пожеж в хімічних лабораторіях є такі:

- необережне поводження з відкритим вогнем;
- порушення правил застосування і збереження легкозаймистих матеріалів;
- експлуатація несправного електрообладнання, що часто призводить до короткого замикання, як наслідок, до пожежі;

– використання побутових електрочайників, кип'ятильників, подовжувачів мереж тощо.

При виникненні пожежі необхідно прибрати в безпечне місце всі вогне небезпечні та вибухові речовини, закрити загальні газові крани, вимкнути рубильники електромережі і вжити заходів до пожежогасіння.

При гасінні палаючих дерев'яних предметів, стін, паперу, тканин, рідин, що змішуються з водою (наприклад, спирту, ацетону, органічних кислот) можна використовувати воду і пісок.

Нерозчинні у воді органічні речовини (наприклад, бензол, ефір тощо) слід гасити *піском або накриваючи азбестовою ковдрою*.

Заборонено гасити водою:

– палаючі рідини, що не змішуються з водою, тому що горіння при цьому може посилитися, а площа пожежі збільшитися;

– речовини, які здатні вступати з водою в хімічну реакцію (лужні, лужноземельні метали, їхні карбіди тощо), бо це може спричинити вибух і розповсюдження пожежі;

– електроустановки та електропроводку, що знаходяться під напругою.

Для гасіння пожежі в хімічних лабораторіях використовують ручні вогнегасники: вуглекислотні, порошкові й пінні.

РОЗДІЛ 1

ВСТУП ДО БІОХІМІЇ. БІОКАТАЛІЗ. ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ



Тема 1.1. Фізико-хімічні методи дослідження в біохімії

У біохімічних дослідженнях широко використовується ціла низка фізико-хімічних методів (спектроскопічні, хроматографічні, електрофоретичні методи, центрифугування, діаліз, рентген-структурний аналіз, імуноферментний аналіз тощо). Ці методи застосовуються для виділення, очищення та ідентифікації речовин, що входять до складу живих організмів, для встановлення структури та властивостей біомолекул, дослідження шляхів обміну речовин та енергії, проведення якісного і кількісного аналізу.

Спектроскопічні методи

Фізичні основи спектроскопії. До спектроскопічних методів належать фізичні методи, що ґрунтуються на взаємодії електромагнітного випромінювання з атомами і молекулами речовини в різних ділянках електромагнітного спектра, але найбільше значення має оптична спектроскопія – дослідження випромінювання з довжиною хвиль в оптичному діапазоні (10–760 нм). У біохімічних дослідженнях найширше використовуються методи молекулярно-абсорбційної спектроскопії, що ґрунтуються на вивченні поглинання електромагнітного випромінювання молекулами в ультрафіолетовій, видимій або інфрачервоній ділянках спектра.

Світло як один із видів електромагнітного випромінювання являє собою потік частинок, які називають квантами (фотонами), причому енергія кожного із квантів визначається довжиною хвилі випромінювання.

Енергетичний стан атома характеризується енергією електронів, що входять до його складу. В основному енергетичному стані електрони в атомах займають найнижчі енергетичні рівні. Отримуючи енергію електромагнітного випромінювання, електрон переходить на вищий енергетичний рівень, який відповідає збудженому стану. Це відбувається тільки в тому випадку, коли поглинута енергія точно дорівнює енергії переходу між енергетичними рівнями. При переході електрона з більш

високого на більш низький енергетичний рівень система випромінює квант енергії, тобто випромінює світло певної довжини хвилі.

У молекулах відбуваються більш складні процеси обумовлені існуванням декількох типів енергетичних рівнів. Як і атом, молекула, поглинувши квант світла, може перейти із основного стану в один із можливих станів з вищим рівнем енергії. Згідно із законами квантової механіки збуджена молекула володіє набором дискретних енергетичних станів (рівнів). Основні енергетичні рівні обумовлені ймовірним розподілом електронів у просторі і називаються електронними енергетичними рівнями. Крім того, атоми у складі молекул можуть коливатися і обертатися навколо зв'язків, що викликає появу поряд із основними електронними рівнями коливальних і обертальних підрівнів.

У молекулі, як і в атомах, перехід електрона з одного рівня на інший супроводжується поглинанням або випромінюванням кванта енергії, тобто в першому випадку отримуємо спектр поглинання молекули, а в другому – спектр випромінювання.

Спектр являє собою залежність кількості поглинутої або випромінюваної системою енергії від довжини хвилі (λ) або іншого параметра, пов'язаного з довжиною хвилі, наприклад хвильового числа ($1/\lambda$).

Абсорбційна спектроскопія та спектрофотометрія. Електронні спектри поглинання у видимій (400–750 нм) та ультрафіолетовій області (200–400 нм)

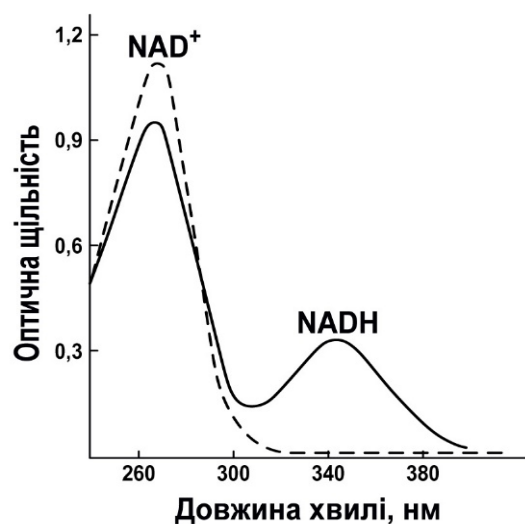


Рис. 1. Спектр поглинання окисненої і відновленої форм коферменту NAD

визначаються переходом електронів в молекулах з одного енергетичного рівня на інший, тоді як в інфрачервоній області (>750 нм) вони більшою мірою обумовлені коливаннями атомів через зміну довжин зв'язків і кутів між атомами речовини, що поглинає світло. Абсорбційні спектри (рис. 1) застосовуються для ідентифікації речовин за розташуванням максимуму поглинання в спектрі, дослідження структурних ізомерів, визначення структурних формул, просторової конформації біополімерів (якісний аналіз або спектроскопія), а також для кількісного аналізу речовин за інтенсивністю поглинання в області максимуму (спектрофотометрія).

При проходженні світла через середовище, що рівномірно поглинає, його інтенсивність зменшується. Відношення інтенсивності потоку світла, що пройшло через середовище, до інтенсивності первинного потоку світла I/I_0 називається *пропусканням* (T). Світлопоглинання, або оптична щіль-

ність, або екстинкція (E) – це величина, що розраховується як десятиковий логарифм зворотної до пропускання величини: $E = \lg(1/T) = \lg(I_0/I)$. Відповідно до основного закону фотометрії Бугера–Ламберта–Бера екстинкція прямо пропорційна концентрації речовини, що поглинає, та довжині оптичного шляху:

$$E = \varepsilon Cl,$$

де E – екстинкція; ε – коефіцієнт молярної екстинкції, який визначається природою речовини та довжиною хвилі світла; C – концентрація речовини, моль/л; l – товщина шару розчину або довжина оптичного шляху, см.

Коефіцієнт молярної екстинкції ε визначається як оптична щільність речовини з концентрацією 1 моль/л при довжині оптичного шляху 1 см. Отже, при відомих значеннях E , ε та l можна прямо розрахувати концентрацію речовини в розчині. Однак пряма залежність між екстинкцією і концентрацією речовини згідно із законом Бугера–Ламберта–Бера спостерігається тільки для монохроматичного світла та розбавлених розчинів. В інших випадках, а також при зміні властивостей речовини, через яку проходить світло, внаслідок низки процесів, що можуть відбуватися в розчинах (гідролізу, гідратації, іонізації, полімеризації тощо), цей закон не виконується.

При фотометричному аналізі кількісне визначення світлопоглинання розчинами здійснюють за допомогою фотоколориметрів та спектрофотометрів. Фотоколориметричні методи ґрунтуються на вимірюванні поглинання поліхроматичного (немонохроматичного) світла у видимій області спектра. Пропускання світла певної ділянки спектра ($\Delta\lambda=10\text{--}100$ нм) через розчин забезпечується набором світлофільтрів. Спектрофотометричні методи використовуються для аналізу поглинання монохроматичного світла в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній областях спектру. Необхідні для аналізу ділянки спектра ($\Delta\lambda=0,5\text{--}1$ нм) виділяються за допомогою призм або дифракційних ґраток, що дозволяє встановлювати будь-яку довжину хвилі в певному діапазоні.

Для визначення концентрації будь-якої речовини порівнюють поглинання у стандартному і у дослідному розчині. Стандартний розчин – це розчин з відомою концентрацією речовини. Вимірюють екстинкцію стандартного ($E_{\text{ст}}$) і дослідного (E_x) розчинів проти нульового (контрольного) розчину. Нульовий розчин містить всі компоненти у відповідних концентраціях, що і дослідний, крім речовини, концентрація якої визначається. Концентрація C_x речовини у дослідному розчині визначається за формулою:

$$C_x = \frac{C_{cm} E_x}{E_{cm}}$$

де C_x – концентрація речовини у дослідному розчині, C_{cm} – концентрація стандартного розчину; E_x і E_{cm} – оптична щільність дослідного і стандартного розчинів відповідно.

Метод порівняння оптичної щільності стандартного і дослідного розчину може застосовуватися тільки при виконанні закону світлопоглинання Бугера–Ламберта–Бера.

Більш точним є метод визначення концентрації речовини за калібрувальним графіком, який відображає залежність екстинкції від концентрації речовини. Готують серію розведень стандартного розчину речовини, за допомогою фотоколориметрів або спектрофотометрів вимірюють екстинкцію

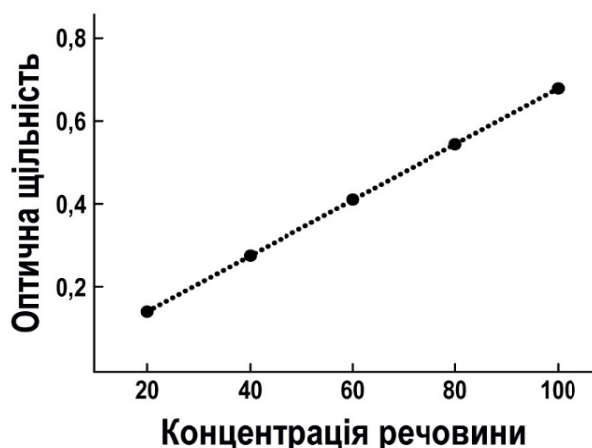


Рис. 2. Калібрувальний графік для визначення концентрації речовини у розчині

отриманих розчинів та будуть калібрувальний графік – графік залежності оптичної щільності (вісь y) від концентрації (вісь x), що має вигляд прямої (рис. 2). Вимірявши екстинкцію дослідного розчину за допомогою калібрувального графіка, знаходять концентрацію речовини.

Метод калібрувального графіка може застосовуватися і тоді, коли спостерігаються відхилення від основного закону світлопоглинання. Для побудови калібрувальної кривої в цьому випадку необхідно приготувати значно більшу кількість стандартних розчинів, які мають відрізнятися один від одного за концентрацією не більше ніж на 10 %.

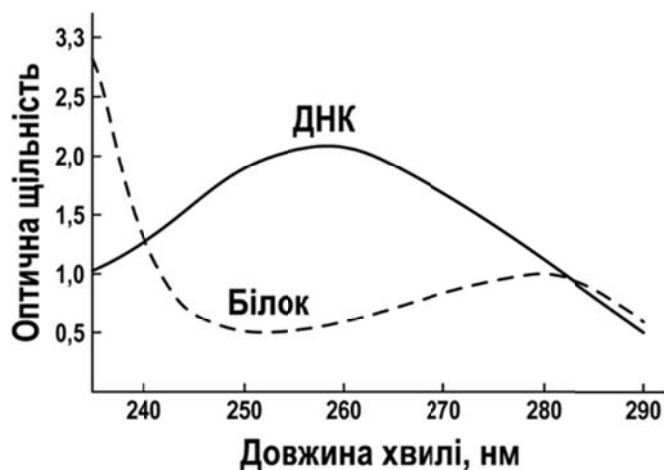


Рис. 3. Спектр поглинання гідролізату білка і ДНК

Отримані в ультрафіолетовій та видимій областях спектри застосовуються для аналітичних цілей – якісного та кількісного аналізу різних типів молекул, зокрема біополімерів. Ультрафіолетові спектри білків характеризуються двома максимумами, поглинання в яких обумовлено наявними в них структурними елементами зі спряженими подвійними зв'язками: при

280 нм (поглинання залишків тирозину і триптофану) та 190 нм (поглинання пептидних груп). Максимум поглинання нуклеїнових кислот, що визначається наявністю азотистих основ, знаходиться в області 260 нм. У зв'язку з цим для аналітичних цілей використовуються області 280 нм для білків та 260 нм для нуклеїнових кислот (рис. 3). За наявності в пробі молекул цих двох класів їх попередньо розділяють, оскільки їхні спектри поглинання частково перекриваються. При дослідженні білків нерідко використовується також область поглинання пептидної групи (190–230 нм), що бере участь у підтримці вторинної структури білка. Ця область поглинання дозволяє судити про ступінь спіралізації, про вид вторинної структури, про структурні переходи у білках.

Інфрачервоні спектри поглинання використовуються найчастіше для структурних досліджень білків та нуклеїнових кислот. Через складність спектрів цих речовин для кількісного аналізу їх практично не застосовують.

Спектрофотометричні методи дозволяють вивчати швидкість ферментативних реакцій та активність ферментів (вимірюючи кількість субстрату або продукту до та після реакції) за умови, що субстрати або продукти поглинають у певній області спектра.

Спектрофлуориметрія. Низка речовин здатна до випромінювання світла під час переходу молекул зі збудженого стану в основний незбуджений, тобто флуоресціювати, що дає можливість ідентифікувати та вивчати ці сполуки. Спектр флуоресценції сполуки зсунутий у довгохвильову ділянку порівняно з її спектром поглинання і дзеркально симетричний йому. Інтенсивність випромінюваного світла флуоресцентними речовинами вимірюється на флуориметрах. Флуориметрію широко застосовують у біохімії для кількісного аналізу низки вітамінів і коферментів, АТФ, рослинних пігментів, гормонів стероїдної природи, для вивчення NAD- і NADP-залежних реакцій, просторової організації біополімерів у розчині та у складі клітинних структур, зв'язування білків з їхніми коферментами, алостеричними регуляторами.

Центрифугування

Центрифугування – це метод розділення частинок, що відрізняються за розмірами, формою або щільністю, і через це мають різну швидкість седиментації (осідання) у відцентровому полі.

Коефіцієнт седиментації частинок S дорівнює швидкості осідання v , віднесеної до одиниці кутового прискорення $\omega^2 x$. Отже, поведінка частинки при центрифугуванні описується співвідношенням:

$$S = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 x} = \frac{v}{\omega^2 x},$$

де S – коефіцієнт седиментації частинок, вимірюється в одиницях Сведберга S ($1S = 10^{-13}$ с); x – відстань від осі ротора до зони, що занята речовиною, см; ω – кутова швидкість, рад/с. Швидкість осідання частинок пропорційна квадрату числа обертів ротора. Залежність коефіцієнта седиментації S від молекулярної маси, форми частинок речовини, а також від густини та в'язкості середовища можна використати для визначення молекулярної маси:

$$M = \frac{SRT}{D(1 - V\rho)},$$

де M – молекулярна маса речовини; V – об'єм одного грама речовини (парціальний питомий об'єм); D – коефіцієнт дифузії речовини; ρ – густина розчинника; R – газова константа; T – абсолютна температура; S – коефіцієнт седиментації. Усі величини в правій частині рівняння можуть бути визначені експериментально, що дає змогу знайти молекулярну масу речовини. За однакової щільності частинки великого розміру осідають швидше, ніж дрібніші, але частинки меншого розміру з більшою щільністю можуть осідати швидше, ніж великі. Чим більша в'язкість середовища, тим повільніше відбувається осідання. Осадження несферичних частинок має свої особливості. Частинки однакової маси, але різної форми, осідають за різних швидкостей: несферичні частинки поводять себе як більш важкі, що використовується при дослідженні конформації макромолекул.

Методи центрифугування поділяють на препаративні та аналітичні.

Препаративне ультрацентрифугування полягає у виділенні біологічного матеріалу, призначеного для подальшого використання або дослідження. Цим методом виділяють компоненти рослинних і тваринних клітин, макромолекули (білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди) тощо. Розрізняють три основні види препаративного ультрацентрифугування: диференційне, зонально-швидкісне та рівноважне (ізопікнічне).

Диференційне центрифугування ґрунтується на використанні відмінностей у швидкостях седиментації частинок. Залежно від завдання досліджень використовують різні середовища виділення: сахарозні, сольові, буферні з різним складом компонентів і відповідним значенням рН.

Використовуючи різні швидкості центрифугування і середовища виділення, можна розділяти клітинні структури або їхні компоненти. На першому етапі здійснюється руйнування клітинної мембрани та отримання безклітинної системи шляхом гомогенізації (перетирання або подрібнення тканини), дії ультразвуку, осмотичного шоку або гідролітичних ферментів.

Усі операції проводять на холоді (2–4 °C).

Осадження ядер і фрагментів клітин еукаріотів відбувається під час центрифугування впродовж 10 хв за кутового прискорення 600–700 g. Далі з надосадової рідини виділяють мітохондріально-лізосомальну фракцію – центрифугування за кутового прискорення 10000 g впродовж 10–15 хв. Виділення мікросомальної фракції (ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі та рибосоми) з постмітохондріальної надосадової рідини проводять при 100000 g протягом 60 хв. Після осадження мікросом надосадова рідина являє собою цитозольну фракцію, у якій містяться розчинні білки (зокрема різні ферменти), амінокислоти, РНК тощо.

Зонально-швидкісне центрифугування полягає в нашаруванні досліджуваного зразка на поверхню розчину з безперервним градієнтом густини за рахунок концентрації певної речовини, наприклад сахарози. Центрифугують доти, доки частинки зразка не розподіляться вздовж градієнта густини середовища у вигляді дискретних зон або смуг. Застосовується для розділення гібридів РНК-ДНК, субодиниць рибосом та інших клітинних компонентів.

Рівноважне (ізопікнічне) центрифугування – це поділ частинок за плавучою щільністю, яка чисельно дорівнює густині розчину, за якої частинка перестає седиментувати (ізопікнічний стан). Чим більша в'язкість середовища, тим повільніше досягається ізопікнічний стан. Розміри частинок та їхня маса не позначаються на остаточному розподілі, положення в градієнті визначається тільки плавучою щільністю частинок. Ізопікнічне центрифугування проводять як в однорідному середовищі, так і в градієнті густини.

Метод рівноважного ізопікнічного центрифугування передбачає створення градієнта густини середовища по довжині пробірки, щоб густина біля дна пробірки була більшою, ніж у найщільніших частинок, а біля меніска меншою, ніж у найменш щільних частинок дослідної суміші. Зазвичай, як середовище використовують розчини солей важких металів (цезію або рубідію). Частинки різної щільності розташовуються в різних ділянках градієнта. В області рівноваги частинки розташовуються смугою, ширина якої визначається співвідношенням концентрування і дифузії. Метод використовують для розділення лізосом і мітохондрій, виділення пероксисом, розділення плазмідної ДНК і хромосомної ДНК бактерії.

Аналітичне ультрацентрифугування застосовують для вивчення седиментаційних властивостей макромолекул, у зв'язку з чим використовують ротори та системи реєстрації особливої конструкції, що дають можливість стежити за процесом седиментації під час центрифугування. Метод використовують для визначення молекулярних мас макромолекул, оцінки чистоти препаратів ДНК, вірусів, білків і для дослідження конформа-

ційних змін макромолекул. Чистоту препаратів оцінюють за характером межі седиментації, враховуючи, що гомогенний препарат дає одну різко окреслену межу.

Електрофорез

Електрофорез – це рух заряджених частинок в електричному полі. Він лежить в основі низки методів поділу та дослідження речовин (електрофоретичні методи). Методи ґрунтуються на здатності частинок або молекул, які мають електричний заряд, рухатися залежно від їхніх властивостей з різною швидкістю в електричному полі. Електрофоретичні методи дозволяють розділяти молекули, які відрізняються одна від одної за розмірами (або молекулярною масою), електричним зарядом, просторовою конфігурацією. Біологічні макромолекули (пептиди, білки, нуклеїнові кислоти тощо), завдяки присутності на їхній поверхні функціональних груп, здатних до дисоціації, несуть певний електричний заряд, величина і знак якого насамперед залежать від рН середовища. Крім того, заряд молекул може змінюватися в результаті адсорбції ними низькомолекулярних іонів із середовища, тобто в результаті утворення подвійного електричного шару.

Під дією електричного поля заряджена молекула буде рухатися до аноду чи катоду відповідно до знака свого заряду за умов, якщо рН середовища відрізняється від ізоелектричної точки pI . При цьому на молекулу буде діяти сила

$$F = QE,$$

де E – напруженість електричного поля; Q – заряд молекули.

При переміщенні молекули в розчині на неї також буде діяти протилежно спрямована сила тертя, яка залежить від розмірів, форми молекули, в'язкості середовища і описується рівнянням Стокса:

$$F = 6\pi r\eta v,$$

де η – в'язкість середовища; r – радіус частинки; v – швидкість руху.

Під час накладення електричного поля швидкість руху частинки швидко збільшується, доки електричну силу не врівноважить сила тертя $QE = 6\pi r\eta v$. Потім частинка рухається з постійною швидкістю відповідно до рівняння:

$$V = \frac{QE}{6\pi r\eta}.$$

Швидкість руху пропорційна напруженості електричного поля і заряду частинки і зворотно пропорційна розміру частинки і в'язкості

середовища. Отже, шлях, який молекули з різним зарядом і молекулярною масою пройдуть за певний проміжок часу, буде різним.

Для характеристики поведінки зарядженої частинки в електричному полі використовують ще один параметр – електрофоретичну рухливість (U), що чисельно дорівнює відношенню швидкості частинки до напруженості електричного поля:

$$U = \frac{v}{E}.$$

На відмінностях в електрофоретичній рухливості молекул ґрунтується розділення сумішей речовин на фракції з їх подальшим якісним і кількісним аналізом. Наприклад, за електрофоретичною рухливістю ліпопротеїни плазми крові розділяються на 4 фракції, при цьому вони переміщуються разом з певним класом глобулінів: хіломікрони (залишаються на лінії старту), ліпопротеїни дуже низької щільності (пре- β -ліпопротеїни), ліпопротеїни низької щільності (β -ліпопротеїни) і ліпопротеїни високої щільності (α -ліпопротеїни). Фракціонування ліпопротеїнів плазми крові та їх наступний аналіз використовують для діагностики порушень обміну ліпідів в організмі людини (атеросклероз, гіперліпопротеїнемії тощо). Можна також застосовувати деякі варіанти методу для препаративних цілей – для отримання електрофоретично гомогенних препаратів заряджених речовин.

Розрізняють такі типи електрофорезу: фронтальний (з рухомою межею) і зональний (у пористому носії). У фронтальному електрофорезі на розчин макромолекул нашаровується буферний розчин у такій спосіб, щоб між ними зберіглася чітка межа. Швидкість руху макромолекул в електричному полі визначається шляхом спостереження за переміщенням цієї межі за допомогою оптичних методів. Цей метод знайшов широке застосування при дослідженні білків, бо дозволяє визначити такі важливі характеристики молекул як електрофоретична рухливість та ізоелектрична точка, досліджувати взаємодії між білками і низькомолекулярними речовинами, взаємодії білків між собою тощо. На теперішній час, коли з'явилися більш зручні методи, метод фронтального електрофорезу застосовується відносно рідко.

У зональному електрофорезі розділення заряджених частинок проводять в різних інертних пористих середовищах: папір, ацетат-целюлозні мембрани, гелі на основі крохмалю, агарози або поліакриламід. Використання пористого носія забезпечує стабілізацію рідини, зменшення дифузії, а також в ряді випадків – створення додаткового механізму поділу. Розчин суміші речовин наносять у вигляді плями або зони на матеріал носія, що насичений електрофорезним буфером, проводять електрофорез, намагаючись досягнути максимально повного розділення всіх компонентів суміші.

Найкращого розділення макромолекул, зокрема, білків і нуклеїнових кислот, можна досягти, якщо як носії використовувати гелі поліакриламідну, агарози або комбіновані – поліакриламідно-агарозні гелі. Основною перевагою гелів є те, що пори гелю виконують роль молекулярного сита. Ефект молекулярного сита обумовлено більшою в'язкістю і високим опором тертя гелів у порівнянні з рідким середовищем. При переміщенні в гелях на молекули залежно від їхніх розмірів діє різна сила тертя, і тому поділ відбувається не тільки відповідно до зарядів частинок, а й відповідно до їхніх розмірів і форми.

Синтетичний поліакриламідний гель (ПААГ) утворюється в результаті спільної полімеризації акриламідів і агента, який зшиває акриламід, зазвичай, N,N'-метиленабісакриламід. Завдяки поперечним зв'язкам між сусідніми довгими полімерними ланцюгами акриламідів формується гель із тривимірною структурою, крізь пори якого переміщуються молекули. Змінюючи концентрацію акриламідів та зшивки можна отримати гель з необхідним розміром пор. Електрофорез у ПААГ дозволяє розділяти речовини з молекулярною масою від 1–2 млн Да (нуклеїнові кислоти, 2,5–3 % ПААГ) до 2–3 тис. Да (низькомолекулярні поліпептиди, 20–30 % ПААГ). Електрофорез у ПААГ у присутності детергенту додецилсульфату натрію (ДСН) широко використовують для визначення молекулярних мас білків. При додаванні детергенту білки денатурують, що нівелює вплив форми і власного заряду молекул на їхнє розділення. За цих умов спостерігається чітка залежність електрофоретичної рухливості білка тільки від його молекулярної маси. Для визначення молекулярної маси білків дослідного зразка одночасно проводять електрофорез низки білків-маркерів, молекулярні маси яких відомі.

Для досягнення максимального розділення використовується диск-електрофорез – це різновид методу поділу, в якому застосовується неоднорідне переривчасте середовище (два шари поліакриламідного гелю, що відрізняються один від одного за розмірами пор) та буфери різного складу і з різними значеннями рН. У верхній частині колонки знаходиться великопористий гель (концентрувальний гель), який готується в буфері з низькою іонною силою і з різними значеннями рН. У нижній частині колонки – гель (розподільний гель) має пори значно меншого розміру та інше значення рН. Скрізь великопористий гель суміш білкових молекул рухається швидко, збираючись у вузьку смугу на межі поділу двох гелів. Це явище називається ефектом концентрування і має вирішальне значення для подальшого чіткого поділу суміші білків у нижньому дрібнопористому гелі відповідно до їхнього заряду, молекулярної маси та конформації. Електрофорез у ПААГ – найуживаніший на теперішній час різновид аналітичного та препаративного електрофорезу білків та нуклеїнових кислот.

Агарозним гелям притаманна механічна міцність і великий розмір пор. Агароза – це особливо чиста фракція лінійного полісахариду агару, в якому чергуються залишки D-галактози і 3,6-ангідрогалактози. Утворення гелю агарози відбувається в результаті формування просторової сітки із полісахаридних ланцюгів за рахунок водневих зв'язків між ними. Розмір пор залежить від концентрації агарози. Під час електрофорезу пори гелю мають бути легко проникні для молекул біополімеру, щоб лише гальмувати їхню міграцію в електричному полі завдяки тертю. Для електрофорезу використовують агарозні гелі з концентрацією 0,4–2 % залежно від розмірів макромолекул, що розділяються. Так, при концентрації агарози 0,4 % вдається розділити високомолекулярні ДНК вірусів і плазмід, а при концентрації агарози 2 % – нативні мРНК і рестрикти ДНК розміром від 100 до 1000 п. н. Електрофорез в агарозних гелях застосовується для розділення нуклеїнових кислот і великих білкових комплексів.

Ізоелектричне фокусування

Цей метод також використовує відмінності в електрокінетичних властивостях речовин, а саме – відмінності в ізоелектричній точці (pI) і використовується для розділення амфотерних електролітів (амфолітів) – білків, пептидів, амінокислот. Відомо, що амфотерні сполуки, можуть змінювати величину і знак свого заряду залежно від рН середовища. Помістивши такі речовини в середовище з градієнтом рН і подаючи на електроди приладу постійну напругу, можна створити умови для того, щоб суміш амфолітів почала рухатися (відбувається електрофорез). Швидкість і напрямок руху кожного амфоліту залежить від того, яка величина і знак його заряду в певному місці в певний час, тобто за якого рН він перебуває. Поступово кожен амфоліт переміщується в зону, де рН дорівнює його ізоелектричній точці, і залишається в цій зоні. Зсув у будь-який бік від цієї зони призводить до появи заряду і руху назад, де заряд втрачається. Отже, електричне поле в поєднанні з градієнтом рН не тільки розділяє речовини, а й різко фокусує зони, що вони займають. Метод використовується як аналітичний метод з високою роздільною здатністю. Він придатний також для вирішення препаративних завдань. Найважливіша сфера його застосування – визначення pI білків і пептидів, що досягається цим методом швидше і точніше, ніж при використанні електрофорезу.

Для створення градієнта рН застосовуються суміші амфолітів-носіїв (фонові амфоліти). Це синтетичні поліамінополікарбоніві кислоти, що мають pI в межах 3–10, тобто в тій ділянці рН, в якій розташовуються pI найпоширеніших білків. Ці фонові амфоліти вносять у прилад і фокусують заздалегідь, перед розділенням дослідної проби. Далі вноситься

проба і відбувається її розділення в умовах створеного градієнта рН. Для стабілізації рідкого середовища використовують градієнт густини речовин-неелектролітів (наприклад, сахарози) або ПААГ.

Поділ речовин за допомогою мембран

Основними методами є діаліз та ультрафільтрація. *Діаліз* – це одностороння дифузія невеликих молекул через напівпроникні мембрани за рахунок різниці їхніх концентрацій у досліджуваному розчині й чистому розчиннику. *Ультрафільтрація* – розділення речовин за рахунок різниці гідростатичних тисків з обох боків мембрани. Мембрани різної пористості часто виготовляють із целюлози. Під час діалізу досліджуваний розчин у целюлозному напівпроникному мішечку занурюють у чистий розчинник, куди з мішечка виходять речовини, що підлягають видаленню. Ефект посилюється при безперервній зміні розчинника. Діаліз може використовуватися також для концентрування розчинів макромолекул проти розчинів високомолекулярних речовин (наприклад, поліетиленгліколь) або випарювання на повітрі. Гемодіаліз застосовується для очищення крові в разі отруєнь і токсикозів.

Хроматографічні методи розділення речовин

Хроматографічні методи ґрунтуються на нерівномірному розподілі компонентів суміші між двома фазами – *нерухомою* і *рухомою*. *Нерухома* (стаціонарна) фаза може являти собою твердий носій, гель, рідину або суміш твердої речовини і рідини. *Рухома* фаза являє собою рідину або газ, яка разом із дослідною сумішшю компонентів рухається по нерухомій фазі або пропускається через неї. Розподіл компонентів між двома фазами визначається коефіцієнтом розподілу, який розраховується як відношення концентрації речовини у фазі 1 (рухомій) до її концентрації у фазі 2 (стаціонарній) і є постійною величиною для конкретної речовини в певній хроматографічній системі за даної температури. Хроматографічне розділення речовин відбувається завдяки різниці в їхніх коефіцієнтах розподілу.

Хроматографічні методи класифікують за такими ознаками:

- за агрегатним станом рухомої фази: газова і рідинна хроматографія;
- за технікою виконання: колонкова і площинна (на папері або в тонкому шарі сорбенту) хроматографія;
- за ефективністю розділення: класична та високоефективна (під тиском) хроматографія;

– за принципом розділення: адсорбційна, розподільна, іонообмінна, афінна, гель-хроматографія.

Адсорбційна хроматографія ґрунтується на розділенні компонентів суміші за рахунок відмінностей у їхніх адсорбційних властивостях. Найчастіше застосовується варіант адсорбційної хроматографії, в якій використовується адсорбція на межі рідкої і твердої фаз. У верхню частину скляної трубки (колонки), заповнену частинками твердого адсорбенту, вносять дослідну суміш речовин, а потім пропускають через неї розчинник. За цих умов відбувається розділення суміші речовин завдяки різниці у ступені зв'язування певних речовин адсорбентом і розчинності цих речовин у вибраному розчиннику. Компоненти суміші адсорбуються на поверхні активного твердого тіла за рахунок нековалентних зв'язків (водневих, сил Ван дер Ваальса, неполярних взаємодій). Адсорбенти поділяють на дві групи: неполярні (активоване вугілля, сажа, деякі смоли) і полярні (оксиди алюмінію, магнію, кальцію, гідроксид кальцію, деякі солі, силікагель, полісахариди). При використанні неполярних адсорбентів треба враховувати, що енергія адсорбції на них зростає зі збільшенням розмірів молекул адсорбованої речовини. На полярних адсорбентах величина енергії адсорбції прямо залежить від таких властивостей адсорбованої речовини, як полярність або ненасиченість. Метод ефективний для розділення органічних сполук, що відрізняються за будовою та полярністю (карбонові кислоти, спирти, аміни, аміді, вітаміни, вуглеводи, гетероциклічні сполуки тощо), а також ізомерів та сполук близьких за будовою, але з різним розташуванням функціональних груп.

Розподільна або абсорбційна хроматографія ґрунтується на різних коефіцієнтах розподілу компонентів суміші між двома рідинами, що не змішуються. У цьому типі хроматографії здебільшого використовується система з двох фаз: одна фаза (нерухома) представлена полярним розчинником (вода або буферні розчини), інша фаза (рухома) – менш полярною рідиною (органічним розчинником). Вода зазвичай іммобілізується на твердих гідрофільних носіях: силікагель, фільтрувальний папір, крохмаль тощо. Рухома фаза являє собою органічну речовину (ацетон, бутанол), яка містить деяку кількість води (нерідко до насичення). Прикладом розподільної хроматографії може бути поділ амінокислот у системі бутанол – оцтова кислота – вода (12:3:5) на фільтрувальному папері.

Іонообмінна хроматографія ґрунтується на оборотному стехіометричному обміні іонів, які присутні у водному розчині (рухома фаза), і іонів, що входять до складу стаціонарної твердої фази (іоніту або іонообмінника). Іонообмінник являє собою твердий пористий каркас, сполучений ковалентно із позитивно або негативно зарядженими групами. Заряд іонообмінника компенсується завдяки електростатичній взаємодії із іонами протилежного

знаку (протиіонами). Іонообмінник здатний обмінювати протиіони на іони розчиненої речовини, що містяться у рідкій рухомій фазі. Розподіл на іонообмінниках зазвичай проводять у дві стадії: спершу сполуку, яку потрібно відокремити, зв'язують з іонообмінником, а потім через колонку пропускають буферний розчин з іншим значенням рН або з іншою іонною силою, що викликає десорбцію сполуки в результаті послаблення її взаємодії з іонообмінником. Залежно від знака іонів, що обмінюються, розрізняють катіонообмінники (катіоніти) та аніонообмінники (аніоніти). Існують також амфотерні іонообмінники (амфоліти), що здійснюють обмін як аніонів, так і катіонів. Властивості іонообмінників притаманні багатьом природним та синтетичним речовинам. Найчастіше використовуються полімери – іонообмінні смоли – на основі целюлози, декстрана, агарози, поліакриламід, полістиролу. Метод застосовується для виділення білків, полісахаридів, а також нуклеотидів, амінокислот та інших біологічно важливих невеликих молекул.

Гель-хроматографія – це метод, що дозволяє розділити речовини відповідно до молекулярної маси, розміру та форми їхніх молекул. Нерухому фазу утворює гель, що являє собою хімічно інертну, зшити, нерозчинну полімерну матрицю, насичену рідиною (зазвичай водою). Та сама рідина служить рухомою фазою. У полімерній матриці є пори, розмір яких залежить від типу гелю, що використовується. Найбільше поширення отримали гелі на основі декстрана, поліакриламід або агарози. Здатність молекул речовини проникати в рідину, поглинуту частинками гелю, залежить від розміру пор гелю і від розмірів молекул речовини. У процесі фракціонування великі молекули, діаметр яких більше розміру пор гелю, не можуть проникнути всередину гелю, вони переміщуються разом із потоком розчинника між частинками гелю, тому швидкість руху цих молекул найвища. Молекули проміжного розміру рухаються з різними швидкостями залежно від того, яка частина об'єму нерухомої фази є доступною для них. Останнє визначається розмірами молекул цієї групи. Найдрібніші молекули, розмір яких значно менше, ніж розмір пор, можуть легко проникати в середину гелю, рівномірно розподілятися між рухомою і нерухомою фазами, і залишатися в нерухомій фазі найдовше, тобто рухаються вони найповільніше. Метод має малу роздільну здатність, але може застосовуватися для швидкого та дешевого орієнтовного визначення молекулярних мас речовин, для відокремлення білків або нуклеїнових кислот від низькомолекулярних домішок, для проведення знесолення розчинів високомолекулярних сполук, для заміни буфера при виділенні макромолекул.

Афінна хроматографія (або біоспецифічна хроматографія) ґрунтується на унікальній здатності біологічно активних речовин специфічно та оборотно зв'язувати певні сполуки, які називаються лігандами (або афінними лігандами). Ліганди ковалентно приєднуються до матриці (нерозчинного

носія), утворюючи специфічний сорбент, що здатний вибірково зв'язати із розчину певні біомолекули, які виявляють до нього високу спорідненість. Утворення комплексу між лігандом і біомолекулою, яку потрібно виділити, відбувається за рахунок нековалентних зв'язків: водневих, електростатичних, сил Ван дер Ваальса, гідрофобних взаємодій. Висока специфічність обумовлена взаємною комплементарністю ділянок зв'язування певної біомолекули і ліганду. Прикладами таких високоспецифічних взаємодій є комплекси ферментів із субстратами або інгібіторами, антитіл – з відповідними антигенами, мРНК – з комплементарними послідовностями ДНК тощо.

Матрицями слугують найчастіше гелі агарози і поліакриламід. Нерозчинний носій разом з лігандом утворюють стаціонарну фазу, а речовина, яку необхідно виділити, міститься в рухомій фазі. Розчин, що містить дослідну речовину, пропускається через колонку заповнену матрицею зі зв'язаним лігандом, до якого ця речовина має спорідненість, і в такий спосіб вона утримується в колонці, а всі інші компоненти проходять через колонку без затримок. Для вивільнення зв'язаної речовини необхідно змінити середовище елюювання, щоб порушити взаємодію речовини з лігандом. Метод афінної хроматографії є більш швидким та досконалим, ніж усі інші методи препаративної біохімії, характеризується високою вибірковістю, що дозволяє виділяти із суміші біологічних речовин компоненти, які присутні в дуже низьких концентраціях, практично за один етап. Метод застосовується для виділення ферментів, антигенів, антитіл, вітамінів, гормонів, рецепторів, транспортних білків, вірусів, нуклеїнових кислот, мембран.

Контрольні питання з теми 1.1

1. На чому ґрунтуються спектроскопічні методи? Які спектроскопічні методи найчастіше використовуються в біохімії?
2. Як відбувається взаємодія світла з речовиною?
3. Що являє собою спектр речовини? Для розв'язання яких задач у біохімії використовують абсорбційні спектри?
4. Що таке пропускання? Екстинкція? Коефіцієнт молярної екстинкції?
5. На якому законі ґрунтується більшість фотометричних методів?
6. Які методи визначення концентрації речовини у розчині використовуються при фотометричному аналізі?
7. Які біохімічні завдання можна розв'язати за допомогою спектрофлуориметрії?
8. На чому ґрунтується розділення частинок при центрифугуванні?
9. Що таке коефіцієнт седиментації? В яких одиницях виражається і від яких чинників залежить коефіцієнт седиментації?
10. Які види центрифугування використовують для фракціонування субклітинних структур і макромолекул?

11. Що собою являє електрофорез? Які типи електрофорезу існують?
12. Що таке електрофоретична рухливість частинок?
13. Які переваги зонального електрофорезу? Які матеріали використовують як носії при електрофорезі?
14. Який загальний принцип хроматографічних методів розділення речовин? Як класифікують хроматографічні методи?
15. Яка область застосування хроматографічних методів розділення речовин?

Тестові завдання з теми 1.1

1. Який діапазон довжин хвиль електромагнітного випромінювання відповідає видимому світлу?
 - А. 10–200 нм.
 - Б. 200–350 нм.
 - В. 400–750 нм.
 - Г. 750–2000 нм.
 - Д. 2000–25000 нм.
2. Для визначення молекулярної маси білків може бути застосований метод:
 - А. Фотокалориметрії.
 - Б. Діалізу.
 - В. рН – метрії.
 - Г. Полярографії.
 - Д. Ультрацентрифугування.
3. Який із біохімічних методів ґрунтується на нерівномірному розподілі компонентів суміші між двома фазами – нерухомою і рухомою?
 - А. Діаліз.
 - Б. Електрофорез.
 - В. Хроматографія.
 - Г. Центрифугування.
 - Д. Спектрофотометрія.
4. Метод розділення білків за допомогою іонообмінної хроматографії ґрунтується на таких властивостях цих молекул, як:
 - А. Відмінності за величиною заряду.
 - Б. Відмінності за молекулярною масою.
 - В. Відмінності за величиною заряду та молекулярної маси.
 - Г. Висока спорідненість до ліганду.
 - Д. Відмінності за розміром.
5. Метод розділення білків за допомогою афінної хроматографії ґрунтується на таких властивостях цих молекул, як:
 - А. Відмінності за величиною заряду.
 - Б. Відмінності за молекулярною масою.

В. Відмінності за величиною заряду та молекулярної маси.

Г. Висока спорідненість до певного ліганду.

Д. Відмінності за розміром.

6. У якому з перелічених процесів застосовується діаліз?

А. Очищення білків від низькомолекулярних сполук.

Б. Фракціонування високомолекулярних білків за відмінністю молекулярної маси.

В. Поділ білків за сумарним зарядом.

Г. Визначення молекулярної маси.

Д. Фракціонування білків за відмінністю молекулярної маси, розмірів і форми їхніх молекул.

7. У клінічній лабораторії для отримання білкових фракцій крові використали метод електрофорезу. Яка властивість білків дозволяє застосовувати цей метод?

А. Оптична активність.

Б. Висока молекулярна маса.

В. Електричний заряд молекул.

Г. Наявність третинної структури.

Д. Високий вміст гідрофобних амінокислот.

8. Гель-хроматографія являє собою метод, де розподіл речовин в основному здійснюється відповідно до молекулярної маси, розміру та форми їхніх молекул. Метод дозволяє вирішувати такі задачі, крім:

А. Визначення молекулярних мас речовин.

Б. Відокремлення білків або нуклеїнових кислот від низькомолекулярних домішок.

В. Проведення знесолення розчинів високомолекулярних сполук.

Г. Заміна буфера при виділенні макромолекул.

Д. Визначення заряду молекул.

9. Метод диференційного центрифугування застосовується для розділення органел та інших компонентів клітин і ґрунтується на відмінностях частинок за:

А. Швидкістю седиментації.

Б. Молекулярною масою.

В. Електричним зарядом.

Г. Формою.

Д. Щільністю.

10. За допомогою якого приладу вимірюють світлопоглинання (екстинкцію) розчинами?

А. Спектрофлуориметр.

Б. Спектрофотометр.

В. Поляриметр.

Г. рН-метр.

Д. Рефрактометр.

Тема 1.2. Ферментативний каталіз

Властивості та структура ферментів

Ферменти (ензими) – це біологічні каталізатори білкової природи, які залучені до перебігу майже всіх хімічних реакцій в живих організмах. Подібно іншим каталізаторам ферменти збільшують швидкість тільки термодинамічно можливих реакцій, не витрачаються в процесі каталізу, не впливають на положення рівноваги в хімічній реакції, а тільки прискорюють досягнення цього стану. У той же час низка властивостей ферментів обумовлена білковою природою – це їхня термолабільність, залежність активності від рН середовища, де відбувається реакція. Важливою властивістю ензимів є висока вибірковість (специфічність) дії, тобто кожен фермент діє тільки на свій субстрат або на групу субстратів близьких за своєю структурою або на певний тип зв'язку в молекулі.

За хімічним складом ферменти поділяють на прості і складні. Прості білки-ферменти побудовані тільки з поліпептидних ланцюгів. Білкова частина складних ферментів називається апоферментом, небілковий компонент – кофактором, а молекула в цілому – холоферментом. Каталітична активність притаманна холоферменту. Кофактори виконують такі функції: беруть участь в акті каталізу, забезпечують взаємодію між апоферментом і субстратом, стабілізують апофермент. Роль апоферменту полягає в посиленні каталітичної активності кофактору і визначенні специфічності дії ферменту. Кофактором може бути іон металу. Якщо небілковим компонентом ферменту є складна органічна молекула (похідне вітамінів, нуклеотид, гем тощо), його називають коферментом. Коферменти беруть участь переважно в редокс-реакціях та реакціях переносу груп.

Ділянки молекули ферменту, що відповідають за зв'язування субстрату (контактна зона) та його перетворення (каталітична зона) утворюють *активний центр*, що є результатом формування просторової структури білка.

У простих ферментів активний центр утворюється бічними радикалами амінокислотних залишків поліпептидного ланцюга, а у складних ферментів у його формуванні беруть участь також деякі хімічні групи небілкового компонента.

Будова активного центру обумовлює одну з найбільш характерних властивостей ферментів – специфічність їхньої дії. Специфічність ферментів забезпечується утворенням безлічі слабких зв'язків (водневих, гідрофобних, електростатичних) між ферментом і його субстратом в активному центрі, внаслідок чого групи субстрату, що атакуються, опиняються у безпосередній близькості до каталітичної групи і правильно орієнтовані відносно неї.

Конформаційні зміни в молекулі ферменту після приєднання субстрату спричиняють напругу структури активного центру і дестабілізацію міжатомних зв'язків в молекулі зв'язаного субстрату. При цьому виникає так звана індукована відповідність ферменту і субстрату, що приводить до тієї орієнтації функціональних груп ферменту, яка необхідна для здійснення каталізу. Серед основних механізмів біокаталізу виділяють ковалентний, і кислотно-основний. У процесі ковалентного каталізу між ферментом і субстратом утворюється нестабільний ковалентний зв'язок, який у подальшому руйнується з вивільненням ферменту і продуктів реакції. Згідно з теорією кислотно-основного каталізу активність ферментів обумовлено участю радикалів амінокислот активного центру в хімічній реакції в якості донорів і /або акцепторів електронів.

Класифікація і номенклатура ферментів

За міжнародною класифікацією ферменти розділені на 7 класів залежно від типу реакції, яку вони каталізують (табл. 1). Кожному ферменту присвоєно чотирьохзначний класифікаційний номер (КФ). Перше число вказує на приналежність ферменту до одного з семи класів, друге (підклас) – уточнює групу, що перетворюється, третє (підпідклас) – уточнює додаткових учасників реакції (наприклад, донора, акцептора), останнє – вказує на порядковий номер ферменту в цьому підпідкласі.

Таблиця 1

Класифікація ферментів

Номер та назва класу	Тип реакції, що каталізується	Представники
1. Оксидо-редуктази	Окисно-відновні реакції за участю двох субстратів (перенос електронів та атомів водню з одного субстрату на інший)	Малатдегідрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, глюкозо-оксидаза, каталаза та ін.
2. Транс-ферази	Реакції міжмолекулярного перенесення різних хімічних груп	Аміно-, метил-, ацилтрансферази, кінази (фосфотрансферази) тощо
3. Гідролази	Реакції гідролізу (розщеплення ковалентного зв'язку з приєднанням молекули води за місцем розриву)	Трипсин, уреаза, α -глюкозидаза, α -амілаза, фосфатази та ін.
4. Ліази	Відщеплення від субстратів не гідролітичним шляхом певної групи або приєднання (найчастіше молекули води) за місцем подвійного зв'язку	Альдолаза, карбоангідраза, фумаратгідратаза (фумараза), глутаматдекарбоксилаза тощо

Номер та назва класу	Тип реакції, що каталізується	Представники
5. Ізомерази	Різні внутрішньомолекулярні перетворення (окисно-відновні реакції, перенесення груп, зміна геометричної конфігурації у подвійному зв'язку)	Аланінрацемаза, фосфоглюкоізомераза, триозофосфатізомераза, малеїнат-цис-транс-ізомераза та ін.
6. Лігази	Приєднання одна до одної двох молекул з утворенням ковалентного зв'язку (C-C, C-O, C-N та ін.) спряжене з розривом фосфоангідридних зв'язків АТФ (та інших нуклеозидтрифосфатів) або макроергічних зв'язків інших сполук	Аміноацил-тРНК-синтетази, малоніл-КоА-синтетаза, піруваткарбоксилаза тощо
7. Транс-локази	Рух іонів або молекул через мембрани або їхнє розділення всередині мембран	АТФ-синтаза, цитохром с-оксидаза, Na ⁺ /K ⁺ АТФаза тощо

На сьогодні прийнято два типи назв ферментів: тривіальна (робоча) і систематична. Робоча назва утворюється шляхом додавання до назви субстрату, на який діє фермент, закінчення *-аза* (амілаза, ліпаза, рибонуклеаза тощо) або в назві ферментів, що каталізують подібні за типом реакції, вказують тип відповідної реакції – дегідрогенази, оксидази, декарбоксилази (малатдегідрогеназа, алкогольдегідрогеназа тощо). Систематична назва ферменту включає назву субстрату (субстратів), назву типу реакції, що каталізується, та закінчення *-аза*. Наприклад, систематична назва лактатдегідрогенази записується так: лактат: NAD⁺ - оксидоредуктаза, де лактат і NAD⁺ – це субстрати, а оксидоредуктаза – тип хімічного перетворення.

Регуляція ферментативних реакцій

Швидкість ферментативної реакції залежить від низки факторів: співвідношення концентрації ферменту і субстратів, температури, значення рН середовища, присутності активаторів та інгібіторів тощо. За умов надлишку субстрату швидкість реакції пропорційна кількості ферменту. Залежність початкової швидкості реакції від концентрації субстрату при незмінній концентрації ферменту має більш складний характер і описується рівнянням Міхаеліса–Ментен (основне рівняння ферментативної кінетики):

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}.$$

Важливими кінетичними характеристиками реакції є константа Міхаеліса (K_M) і максимальна швидкість реакції ($V_{\max}$). Константа

Міхаеліса – це показник спорідненості ферменту до певного субстрату, а $V_{\max}$ – це міра швидкості розпаду фермент-субстратного комплексу, тобто відображає ефективність дії ферменту.

Активність ферментів може швидко регулюватись через зміну конформації існуючих молекул ферментів як наслідок зв'язування низькомолекулярних сполук (субстратів і продуктів реакції, ефекторів), ковалентної модифікації, білок-білкових взаємодій. Довгострокова регуляція активності здійснюється через зміну кількості молекул ферментів. Останнє можливо як через вплив на їх синтез (експресію генів на рівні транскрипції, процесингу мРНК, трансляції тощо), так і на механізми розпаду молекул ферментів. Зміна активності ферментів у відповідь на певні сигнали забезпечує координацію всіх метаболічних процесів в клітині, що спрямована на самовідтворення, на підтримання гомеостазу, на адаптацію до умов навколишнього середовища.

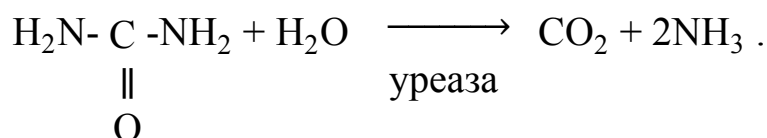
Методи дослідження ферментів та визначення їхньої активності

Більшість ферментів в живих організмах містяться в дуже низьких концентраціях, тому визначити їхній вміст у біологічних зразках досить складна задача. Як правило, визначають не кількість ферменту, а його каталітичну активність, тобто швидкість реакції, що каталізується цим ферментом у певному біологічному матеріалі. Активність ферментів змінюється за різних умов перебігу реакції і залежить від таких факторів, як температура, рН середовища, концентрація субстратів, коферментів, активаторів тощо. Сучасні методи оцінки каталітичної активності ферментів різноманітні: спектрофотометричні, полярографічні, колориметричні, флюориметричні, хемілюмінесцентні, методи хроматографії й електрофорезу та ін.

Лабораторна робота 1. Спостереження за дією деяких ферментів

Дослід 1. Дія уреаз

Уреаза (систематична назва: карбамід-амідогідролаза, КФ 3.5.1.5) каталізує гідролітичне розщеплення сечовини з утворенням двох молекул аміаку і молекули вуглекислого газу. Виділення аміаку в ході реакції змінює рН середовища на лужне, що можна зафіксувати за допомогою індикатора фенолфталеїну.



Уреаза виявляє абсолютну субстратну специфічність – єдиним субстратом для ферменту є сечовина. Навіть незначні зміни в структурі сечовини, наприклад, введення в молекулу атому сірки замість кисню, призводять до того, що такі похідні сечовини не розщеплюються ферментом. Уреаза синтезується бактеріями, дріжджами, рослинами, деякими безхребетними. В організмі ссавців джерелом уреаз є бактеріальна флора.

Матеріали і реактиви.

1. Сечовина – 2 % розчин.
2. Тіосечовина або ацетамід – 2 % розчин.
3. Соеве борошно (джерело уреаз).
4. Фенолфталеїн – 1 % спиртовий розчин.

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1–2 мл, крапельниці, шпатель лабораторний, секундомір.

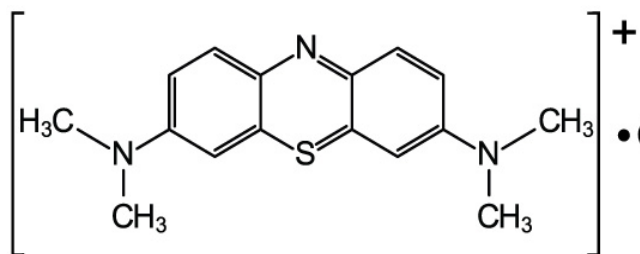
Хід роботи.

У дві пробірки помістити по 0,5 г соєвого борошна й по 2–3 краплі розчину фенолфталеїну. В одну з них додати 2 мл розчину сечовини, а в іншу – 2 мл розчину тіосечовини (ацетаміду), вміст кожної пробірки перемішати. У контрольну пробу налити 2 мл сечовини і 2–3 краплі фенолфталеїну, але не додавати джерело уреаз – соєве борошно. Проби витримати за кімнатної температури протягом 15–30 хв. Результати спостереження за зміною забарвлення індикатора записати у лабораторний журнал, зробити висновок.

Дослід 2. Дія аеробних дегідрогеназ (оксидаз)

Дегідрогенази належать до класу оксидоредуктаз. Вони каталізують дегідрування різних субстратів і перенос водню на інші сполуки. Субстрат, що окиснюється, є донором водню, а сполука, що відновлюється, називається акцептором водню.

Аеробні дегідрогенази або оксидази належать до флавопротеїнів (містять FMN або FAD як простетичну групу) і каталізують перенос



Структурна формула метиленового синього $\text{Cat}^+\cdot\text{Cl}^-$

водню від субстрату безпосередньо на кисень із утворенням продукту реакції – перекису водню. Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) – FAD-залежний фермент, який виділяють із грибів, – використовується при визначенні глюкози в біологічних рідинах.



Аеробні дегідрогенази можуть використовувати в якості акцептора водню не тільки кисень, але й штучні акцептори, наприклад метиленовий синій.

У зв'язку з цим за дією дегідрогеназ легко спостерігати в анаеробних умовах, використовуючи метиленовий синій як акцептор водню. Цей барвник легко окиснюється й відновлюється, змінюючи при цьому забарвлення (відновлена форма безбарвна і називається лейкоформою, окиснена – забарвлена в синій колір і називається хромоформою).

Принцип методу. Атоми водню, що відщеплюються аеробними дегідрогеназами від різних субстратів, в анаеробних умовах переносяться на метиленовий синій, відновлюючи його в безбарвну лейкоформу.

Матеріали і реактиви.

1. Глюкоза – 2 % розчин.
2. Дріжджі.
3. Метиленовий синій – 0,002 % розчин.
4. Рослинна олія.

Обладнання. Хімічні пробірки, штативи, термостат, що підтримує температуру +37 °С, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1–2 мл, крапельниці, скляні палички, секундомір.

Хід роботи.

Помістити в пробірку (дослідна проба) шматочок дріжджів, завбільшки зі чверть горошини, додати 1 мл розчину глюкози й розтерти вміст скляною паличкою до одержання однорідної суспензії. У контрольну пробу налити ту саму кількість розчину глюкози, але не додавати дріжджі. Потім в обидві пробірки додати по 5–6 крапель розчину метиленового синього, перемішати вміст кожної із пробірок і нашарувати зверху тонкий шар рослинної олії, щоб запобігти контактуванню реакційної суміші з киснем повітря. Пробірки помістити в термостат (+37 °С) на 30–40 хв до знебарвлення метиленового синього в одній із них.

Після цього зруйнувати масляну плівку струшуванням пробірки й простежити за зміною забарвлення. Результати спостереження записати у лабораторний журнал, зробити висновок.

Лабораторна робота 2.

Природа ферментів та їхні основні властивості

Амілаза (систематична назва: α -1,4-глюкан-4-глюканогідролаза, КФ 3.2.1.1) каталізує гідроліз α -1,4-глікозидних зв'язків крохмалю та глікогену до декстринів (проміжні продукти гідролізу з різною молекулярною масою), а потім до мальтози.

Оцінити ступінь гідролізу крохмалю можна за інтенсивністю і кольором забарвлення реакційної суміші з реактивом Люголя (0,1 % розчин йоду в 0,2 % водному розчині KI (йодистого калію)). Негідролізований крохмаль (100–6000 кДа) із йодом дає синє забарвлення, а декстрини, залежно від розмірів своїх частинок, забарвлюються йодом у різні кольори. При взаємодії з йодом амілодекстринів (10–12 кДа) розвивається синьо-фіолетове забарвлення, еритродекстринів (4–7 кДа) – червоно-буре, ахро- і мальтодекстринів (2,9–3,7 кДа) забарвлення не розвивається (жовтуватий колір розчину зумовлено кольором самого реактиву Люголя). Виявити в реакційній суміші низькомолекулярні декстрини і мальтозу, які мають вільні карбонільні групи, можна за допомогою реакції Фелінга.

Як джерело амілази використовують розведену слину. Для приготування розчину амілази необхідно ротову порожнину ополоснути кілька разів водою, потім набрати в склянку 10–20 мл дистильованої води, потримати воду 2–3 хв у роті, злити назад у склянку і відфільтрувати через шар вати. Отриманий препарат амілази використовують при виконанні дослідів 1–4.

Дослід 1. Вплив температури на активність ферментів

Відомо, що при підвищенні температури на кожні 10° швидкість хімічних реакцій зростає приблизно в 2–4 рази (правило Вант-Гоффа) за рахунок збільшення кінетичної енергії реагуючих молекул. Подібний вплив спостерігається і для ферментативних реакцій, але через білкову природу ферментів тільки при підвищенні температури до оптимальних значень (температурний оптимум для більшості ферментів тварин знаходиться в діапазоні 37–40 °С, а для рослин – 40–60 °С). За вищої температури кінетична енергія молекули ферменту стає достатньою для розриву слабких зв'язків (водневих, електростатичних, гідрофобних), що підтримують просторову структуру білка в нативному, каталітично активному стані, тобто відбувається теплова денатурація ферменту. Руйнування вторинної, третинної й четвертинної структури ферменту супроводжується втратою його каталітичної активності. При низьких температурах (0 °С і нижче) спостерігається оборотна інактивація ферментів, тобто при подальшому підвищенні температури більшість ферментів відновлюють свою активність. Значення температури, при якому каталітична активність ферменту максимальна, називається його температурним оптимумом.

Матеріали і реактиви.

1. Крохмаль – 0,5 % розчин.
2. Розчин амілази (розведена слина).
3. Реактив Люголя (0,1 % розчин йоду в 0,2 % водному розчині йодистого калію).

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C}$, водяна баня, що підтримує температуру $+100^{\circ}\text{C}$, льодяна баня ($0\text{--}4^{\circ}\text{C}$), піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1–2 мл, крапельниці, секундомір.

Хід роботи.

У три пробірки, що промарковані цифрами: 1, 2, 3, – прилити по 2 мл субстрату амілази 0,5 % розчину крохмалю. В інші три пробірки, які промарковані цифрами: 4, 5, 6, – додати по 10 крапель розчину амілази (розведена слина). Впродовж 5 хв пробірки № 1 і № 4 витримати у льоду ($0\text{--}4^{\circ}\text{C}$), пробірки № 2 і № 5 – у термостаті при 37°C , а пробірки № 3 і № 6 – у киплячій водянній бані (100°C). Потім вміст пробірок із субстратом перелити у відповідні пробірки з ферментом, тобто об'єднати вміст пробірок, що інкубувалися за однакової температури: № 1 + № 4, № 2 + № 5, № 3 + № 6, ретельно перемішати й залишити пробірки з реакційною сумішшю при тих же температурних умовах на 10–15 хв. Після інкубації у пробірки додати по 3–5 крапель реактиву Люголя, перемішати.

Пробірки	№ 1 і № 4	№ 2 і № 5	№ 3 і № 6
Температурні умови інкубації	0°C	37°C	100°C
Забарвлення з реактивом Люголя			
Температурний оптимум			

Результати спостереження за зміною забарвлення вмісту пробірок занести до таблиці в лабораторному журналі, оцінити ступінь гідролізу крохмалю, зробити висновок щодо впливу температури на швидкість реакції, що каталізується α -амілазою слини.

Дослід 2. Вплив рН середовища на активність ферментів

Швидкість ферментативних реакцій залежить також від концентрації іонів водню в середовищі. Кожен фермент характеризується оптимальним значенням рН, при якому його активність максимальна. Відхилення рН у будь-який бік від цього значення призводить до зниження швидкості реакції. Велика кількість внутрішньоклітинних ферментів мають оптимум рН у зоні близькій до нейтрального, але існує низка ферментів, що виявляють максимальну активність у сильнокислому (рН_{опт} пепсину 1,5–2,5) або у сильнолужному середовищі (рН_{опт} аргінази 9,5–10,0).

Чутливість ферментів до рН середовища зумовлена впливом концентрації іонів водню на дисоціацію іоногенних груп у складі активного центру ферменту й субстрату, на взаємодію апоферменту з кофактором (коферментом), на просторову структуру білкової молекули.

Оптимум рН α -амілази слини можна визначити, оцінюючи ступінь гідролізу крохмалю ферментом в середовищі з різними значеннями рН.

Матеріали і реактиви.

1. Крохмаль – 0,5 % розчин.
2. Розчин амілази (розведена слина).
3. Розчини фосфатного буфера з такими значеннями рН: 5,0; 6,9; 7,5; 8,2.
4. Реактив Люголя (0,1 % розчин йоду в 0,2 % водному розчині йодистого калію).

Обладнання. Хімічні пробірки, штативи, термостат, що підтримує температуру +37 °С, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1–2 мл, крапельниці, секундомір.

Хід роботи.

У 4 пробірки, що промарковані цифрами, налити по 1 мл буферних розчинів з різними рН (відповідно до таблиці), додати по 0,5 мл (5 крапель) 0,5 % розчину крохмалю і по одній краплі розчину амілази, перемішати та інкубувати в термостаті при температурі +37 °С впродовж 6–7 хв. Після інкубації у пробірки додати по 1 краплі реактиву Люголя, перемішати.

№ пробірки	рН буферного розчину	Забарвлення з реактивом Люголя	Оптимальне значення рН
1	5,0		
2	6,9		
3	7,5		
4	8,2		

Результати спостереження за зміною забарвлення вмісту пробірок занести до таблиці в лабораторному журналі, оцінити ступінь гідролізу крохмалю, зробити висновок щодо значення рН, за якого α -амілаза розщеплює крохмаль з максимальною швидкістю.

Дослід 3. Вплив активаторів та інгібіторів на активність ферментів

На активність ферментів можуть впливати різноманітні хімічні речовини. Сполуки, що викликають збільшення активності ферментів, належать до активаторів, а сполуки, що знижують активність ферментів – до інгібіторів. Активаторами ферментів є часто йони багатьох металів (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , K^{+} та ін.), деякі аніони (Cl^{-} та інші аніони галогенів), а також органічні сполуки – проміжні продукти обміну речовин. До інгібіторів належать структурні аналоги субстратів і коферментів, кінцеві продукти ферментативних реакцій, токсини й отрути (HCN , CO , HF та ін.), деякі лікарські препарати, йони важких металів (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{+} та ін.) у низьких концентраціях, що не спричиняють денатурацію білкової молекули ферменту, тощо.

Матеріали і реактиви.

1. Крохмаль – 0,5 % розчин.
2. Розчин амілази (розведена слина).
3. NaCl – 1 % розчин.
4. CuSO₄ – 1 % розчин.
5. Реактив Люголя (0,1 % розчин йоду в 0,2 % водному розчині йодистого калію).

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, піпетки мірні градуйовані об'ємом 1–2 мл, крапельниці, секундомір.

Хід роботи.

У 3 пробірки, що промарковані цифрами 1, 2, 3, додати розчини у відповідності до схеми, що представлена в таблиці.

Відміряти у пробірки, краплі	№ пробірки		
	1	2	3
H ₂ O дистильована	10	8	8
Розчин NaCl	–	2	–
Розчин CuSO ₄	–	–	2
Розчин амілази	10	10	10
Розчин крохмалю	10	10	10
Вміст кожної пробірки ретельно перемішати і залишити при кімнатній температурі. Через 5 хв із кожної пробірки відібрати по 2–3 краплі рідини й перенести в інші три пробірки, що промарковані цифрами 4, 5, 6 (вміст із пробірки № 1 перенести до пробірки № 4, із пробірки № 2 – до № 5, із пробірки № 3 – до № 6)			
Відміряти в пробірки, краплі	№ пробірки		
	4	5	6
Вміст пробірки № 1	2–3	–	–
Вміст пробірки № 2	–	2–3	–
Вміст пробірки № 3	–	–	2–3
H ₂ O дистильована	10	10	10
Реактив Люголя	1	1	1
Забарвлення з реактивом Люголя			
Вміст кожної з 3-х пробірок перемішати, порівняти забарвлення. Якщо рідина у всіх пробірках забарвиться однаково (у синій колір), провести повторний відбір розчинів із пробірок № 1–3 через 5 хв і реакцію з реактивом Люголя повторити. Результати спостереження за зміною забарвлення вмісту пробірок занести до таблиці в лабораторному журналі, оцінити ступінь гідролізу крохмалю, зробити висновок щодо характеру впливу хлориду натрію й сульфату міді на активність α-амілази слини.			

Дослід 4. Специфічність дії ферментів

Специфічність дії є однією з найважливіших властивостей ферментів і полягає в тому, що кожний фермент здатний вибірково діяти на

субстрат (або групу структурно близьких субстратів) і визначати шлях його перетворення.

Розрізняють субстратну й каталітичну специфічності ферменту. Під субстратною специфічністю розуміють здатність ферменту каталізувати перетворення одного субстрату або невеликої групи близькоспоріднених сполук, або одного виду зв'язку. Субстратна специфічність визначається будовою ділянки активного центру ферменту, що зв'язує субстрат. Розрізняють такі види субстратної специфічності: *абсолютну, відносну (групову) і стереоспецифічність*. Ферменти, що виявляють абсолютну субстратну специфічність, здатні діяти лише на один субстрат, перетворюючи його в певний продукт (уреаза, сукцинатдегідрогеназа), тоді як ферменти з відотною субстратною специфічністю діють на один тип зв'язку, що присутній у групі структурно подібних субстратів (гексокінази, ліпази, протеази). Ферментам властива також стереоспецифічність – фермент діє тільки на один із стереоізомерів (D- або L- ізомер, α - і β -аномер, *цис*- або *транс*- форму молекули субстрату). Під каталітичною специфічністю розуміють здатність ферменту каталізувати перетворення субстрату по одному з можливих шляхів його перетворення. Наприклад, глюкозо-6-фосфат у клітинах печінки є субстратом 4 різних ферментів, кожний з яких каталізує його перетворення з утворенням однієї з 4-х сполук. аталітична специфічність визначається будовою каталітичної зони активного центру ферменту.

Специфічність дії амілази. α -Амілаза належить до ендоглікозидаз і гідролізує α -1, 4-глікозидні зв'язки.

Матеріали і реактиви.

1. Крохмаль – 0,5 % розчин.
2. Сахароза – 0,5 % розчин.
3. Розчин амілази (розведена слина).
4. Реактив Фелінга (комплекс синього кольору тартрату міді (II), що утворюється при змішуванні рівних об'ємів лужного розчину калій-натрій тартрату та розчину сульфату міді (II)).

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, термостат, що підтримує температуру +37 °С, водяна баня, що підтримує температуру +100 °С або лабораторний газовий пальник, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1–2 мл, крапельниці, секундомір.

Хід роботи.

Дві пробірки промаркувати цифрами 1 і 2. У пробірку № 1 налити 1 мл 0,5 % розчину крохмалю і додати 5 крапель розчину амілази. У пробірку № 2 налити 1 мл 0,5 % розчину сахарози і додати такий самий об'єм розчину амілази. Вміст кожної пробірки перемішати та інкубувати пробірки в термостаті при +37 °С впродовж 15 хв. Потім до вмісту кожної пробірки додати

рівний об'єм реактиву Фелінга й нагріти у киплячій водяній бані або у полум'ї газового пальника до появи в одній із пробірок жовтого або червоного осаду. При наявності у вуглеводі вільної карбонільної групи комплекс Cu (II) в реактиві Фелінга відновлюється і утворює гідроксид міді (I) жовтого кольору, в результаті дегідратації якого випадає червоний осад оксиду міді (I).

Указати, в якій із пробірок утворився червоний осад, тобто реакція Фелінга позитивна. Результати спостереження занести до таблиці в лабораторному журналі й зробити висновок щодо специфічності дії амілази на субстрати, що досліджуються.

№ пробірки	Субстрат	Фермент	Реакція Фелінга	Висновок
1				
2				

Лабораторна робота 3.

Кількісне визначення активності ферментів

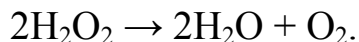
Активність ферменту у біологічному матеріалі оцінюють за зниженням концентрації субстрату, на який діє фермент, за одиницю часу або за збільшенням концентрації продукту реакції за одиницю часу, тобто вимірюють швидкість реакції. Необхідно визначати початкову швидкість ферментативної реакції, тому що саме вона пропорційна кількості ферменту присутньому у пробі.

Визначення активності ферментів проводять в стандартних умовах, за яких підтримується оптимальне значення рН, температура 25–38 °С і концентрація субстрату, що забезпечує повне насичення ним ферменту. Швидкість реакції за цих умов залежить тільки від концентрації ферменту.

За стандартну міжнародну одиницю (МО) активності ферменту приймається така його кількість, що каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв за оптимальних значень рН і температури ($1\text{U} = 1\text{ мкмоль/хв}$). У системі одиниць СІ активність ферменту виражається в *каталах* (кат): 1 кат – це така кількість ферменту, що за оптимальних умов каталізує перетворення 1 моль субстрату в продукт за 1 с. Одна міжнародна одиниця активності ферменту 1МО відповідає 16,67 нкат. Для вираження активності ферментів також використовують молярну й питому активності. *Молярна активність* або число обертів ферменту являє собою число молекул субстрату, яке перетворюється однією молекулою ферменту за 1 с. *Питома активність* дорівнює кількості одиниць активності ферменту у біологічному зразку у перерахунку на масу білка у цьому зразку (нМО/мг білка). Питома активність використовується як критерій чистоти ферментного препарату і зростає в процесі очищення ферменту. На практиці інколи використовують інші способи вираження активності ферментів.

Дослід 1. Визначення активності каталази з молібдатом амонію

Каталаза (H_2O_2 : H_2O_2 – оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) є гемовмісним ферментом, що каталізує розкладання перекису водню з утворенням молекулярного кисню й води:



Каталаза присутня практично у всіх органах і тканинах ссавців, однак найбільша активність ферменту виявлена в еритроцитах, печінці й нирках. У клітинах каталаза перешкоджає накопиченню перекису водню, який здатний пошкоджувати клітинні компоненти. При кількісному визначенні активності каталази вимірюють або кількість перекису водню, що розкладається каталазою, або кількість кисню, що виділяється в цій реакції.

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності перекису водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс із максимумом поглинання при 410 нм.

Матеріали і реактиви.

1. H_2O_2 – 0,6 % розчин.
2. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ – 4 % розчин.
3. Трис- HCl буфер – 0,1 М, рН 7,4.
4. Буферно-субстратна суміш (змішують 0,1 М розчин трис- HCl буфера з 0,6 % розчином H_2O_2 у співвідношенні 1:1, готують перед дослідом).
5. Цитрат натрію (антикоагулянт) – 3,2 % розчин.
6. Біологічний матеріал: сироватка крові або кров, що розведена в 200 разів.

Обладнання. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр, водяна баня або термостат, що підтримує температуру $+37^\circ\text{C}$, центрифуга лабораторна (1000–3000 об/хв), штативи, хімічні і центрифужні пробірки, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 0,1 мл і 1–2 мл, кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм, секундомір.

Хід роботи.

Приготування розчину крові. У мірну колбу на 25 мл, яку попередньо необхідно ополоснути антикоагулянтом, налити близько 5 мл дистильованої води, туди ж додати 0,125 мл крові автоматичним дозатором, наконечник якого також ополоснути антикоагулянтом. Наконечник промити декілька разів, набираючи й випускаючи промивні води в ту саму мірну колбу. Довести об'єм рідини в мірній колбі до мітки водою.

Приготування дослідної, контрольної та холостої проб. У дві хімічні пробірки (дослідну й контрольну) налити по 2 мл буферно-субстратної суміші й інкубувати у термостаті при $+37^\circ\text{C}$ протягом 10 хв. Потім у дослідну пробу додати 0,1 мл сироватки або розчину крові, швидко

перемішати й інкубувати у термостаті при +37 °С протягом 1 хв (по секундоміру). Реакцію зупинити додаванням у дослідну пробу 1 мл 4 % розчину молібдату амонію, перемішати.

У контрольну пробу спочатку додати 1 мл 4 % розчину молібдату амонію, а потім – 0,1 мл сироватки крові або розчину крові. Вміст пробірки перемішати. Якщо активність ферменту визначають у сироватці крові, проби (дослідну й контрольну) центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хв. Після центрифугування надосадову рідину відбирають у чисті пробірки і використовують для вимірювання оптичної щільності.

Як розчин порівняння (холоста проба) використовують суміш такого складу: 2 мл дистильованої води й 1 мл 4 % розчину молібдату амонію.

Вимірюють оптичну щільність контрольної ($E_{\text{КОНТР}}$) і дослідної ($E_{\text{ДОСЛ}}$) проб проти холостої при 410 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Розрахунок.

$$\text{Активність каталази} = \frac{(E_{\text{КОНТР}} - E_{\text{ДОСЛ}}) VK}{\epsilon l},$$

де $E_{\text{ДОСЛ}}$ і $E_{\text{КОНТР}}$ – оптична щільність дослідної й контрольної проб відповідно;

V – об'єм проби, мл (3,1);

K – коефіцієнт перерахування на 1 л сироватки крові (10000) або на 1 мл крові (2000);

ϵ – коефіцієнт молярної екстинкції забарвленого комплексу, $\text{мкМ}^{-1} \text{см}^{-1}$ (22,2);

l – довжина оптичного шляху, см (0,5);

t – час інкубації, 1 хв.

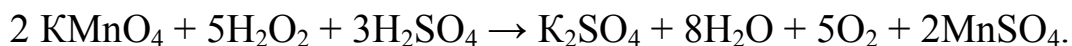
Активність каталази виражають у $\text{мкмоль } \text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на 1 л сироватки. У нормі активність каталази у ссавців становить 20–60 $\text{мкмоль } \text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на 1 л сироватки крові.

Клініко-діагностичне значення. Підвищення активності каталази в сироватці крові спостерігається при низці захворювань, таких як ревматоїдний артрит, хронічна серцева недостатність, при надходженні до організму кофеїну, алкоголю. Зниження активності цього ферменту відзначається при деяких інфекційних захворюваннях (малярія, туберкульоз легень, скарлатина, черевний тиф).

У лабораторному журналі записати результати визначення активності каталази, порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

Дослід 2. Визначення активності каталази в крові титриметричним методом

Принцип методу. Кількість розщепленого перекису водню оцінюють за різницею кількості розчину KMnO_4 , яку витрачено на титрування перекису водню до й після дії каталази.



Активність каталази виражають за допомогою каталазного числа. Каталазним числом називають кількість міліграмів H_2O_2 , який розщеплюється ферментом, що міститься в 1 мкл крові, при кімнатній температурі за 30 хв.

Матеріали і реактиви.

1. H_2O_2 – 1 % розчин.
2. H_2SO_4 – 10 % розчин.
3. KMnO_4 – 0,1 н розчин.
4. Біологічний матеріал: кров розведена (розведення 1: 999).
5. Цитрат натрію (антикоагулянт) – 3,2 % розчин.

Обладнання. Конічні колби об'ємом 100 мл, мірна колба об'ємом 100 мл, лабораторний газовий пальник, тринога лабораторна, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 0,1 мл, 1–2 мл, 5 мл, бюретки, секундомір.

Хід роботи.

Приготування розчину крові. Кров зібрати в пробірку, яку попередньо необхідно ополоснути антикоагулянтом (наприклад, розчином цитрату натрію). У мірну колбу на 100 мл налити близько 10 мл дистильованої води, туди ж додати мікропіпеткою, яку також необхідно ополоснути антикоагулянтом, 0,1 мл крові. Піпетку промити кілька разів, набираючи воду й випускаючи промивні води в ту саму мірну колбу. Довести об'єм рідини в мірній колбі до мітки водою, отже, отримано кров, що розведена в 1000 разів. У 1 мл приготовленого розчину міститься 1 мкл крові. Цей розчин використовують для визначення каталазного числа.

Приготування дослідних і контрольних проб. У дві конічні колби (дослідну й контрольну) налити по 5 мл дистильованої води й додати по 1 мл розведеної в 1000 разів крові. Контрольну пробу нагріти над полум'ям газового пальника до кипіння, прокип'ятити протягом 2–3 хв для інактивації каталази й остудити до кімнатної температури. В обидві проби додати по 2 мл 1 % розчину H_2O_2 , перемішати і залишити при кімнатній температурі на 30 хв. Через 30 хв реакцію зупинити, додавши в кожную колбочку по 5 мл 10 % розчину H_2SO_4 , перемішати.

Титрування й розрахунок.

Вміст колб титрувати 0,1 н розчином KMnO_4 до рожевого забарвлення, яке стабільне протягом 30–60 с. Каталазне число розрахувати за формулою:

$$(A - B) \cdot N \cdot 0,1 ,$$

де A – об'єм 0,1 н розчину KMnO_4 , який пішов на титрування H_2O_2 у контрольній пробі, що містить денатуровану каталазу;

B – об'єм 0,1 н розчину KMnO_4 , який пішов на титрування H_2O_2 у дослідній пробі, що містить нативну каталазу;

N – грам-еквівалент H_2O_2 (34:2);

0,1 – нормальність розчину KMnO_4 .

У нормі каталазне число у ссавців коливається від 10 до 15 одиниць.

У лабораторному журналі записати результати визначення активності каталази, порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

Контрольні питання з теми 1.2

1. Що собою являють ферменти? Яка їхня хімічна природа? Як це впливає на властивості ферментів?

2. Що таке специфічність дії ферментів, чим вона зумовлена? Які типи специфічності ферментів розрізняють?

3. Які види субстратної специфічності розрізняють? Наведіть приклади ферментів з різною субстратною специфічністю.

4. Як впливає температура на швидкість хімічних реакцій? Ферментативних реакцій? Яка температура є оптимальною для дії більшості ферментів? Як змінюється стан ферментів за низьких температур (близько 0 °C)? за високих температур (від 60 до 100 °C)?

5. У чому полягає механізм впливу рН середовища на активність ферментів? Яке значення рН є оптимальним для більшості внутрішньоклітинних ферментів?

6. Як класифікують ферменти? На чому ґрунтується їхня класифікація? Наведіть приклади ферментів різних класів.

7. Які реакції каталізують оксидоредуктази? Гідролази? За дією яких ферментів цих класів ви спостерігали на лабораторних заняттях?

8. Які критерії використовують для вимірювання швидкості ферментативної реакції? В яких одиницях вимірюється активність ферментів? Що таке питома активність? Молярна активність ферменту?

9. Які хімічні зв'язки в молекулах полісахаридів (крохмалю, глікогену) розщеплює α -амілаза слини? У який спосіб можна виявити продукти гідролізу крохмалю?

10. Якими методами можна визначити активність каталази? Які принципи цих методів?

Тестові завдання з теми 1.2

1. Який принцип покладено в основу класифікації ферментів?
 - А. Хімічна природа ферментів.
 - Б. Хімічна природа субстратів.
 - В. Тип реакції, що каталізується ферментом.
 - Г. Тип хімічного зв'язку, що руйнується або утворюється за участю ферменту.
 - Д. Хімічна природа кофактору.
2. Що таке активний центр ферменту?
 - А. Активна область небілкової частини ферменту.
 - Б. Область ферментативної молекули, в якій відбувається зв'язування і перетворення субстрату.
 - В. Унікальна комбінація активних ділянок апо- і коферменту.
 - Г. Ділянка апоферменту, що відповідає за контакт із субстратом.
 - Д. Ділянка ферменту, що відповідає за зв'язування модуляторів.
3. Що описує рівняння Міхаеліса–Ментен: $V_0 = V_{max} \times [S] / (K_M + [S])$?
 - А. Відношення швидкості реакції до концентрації субстрату.
 - Б. Відношення швидкості реакції до концентрації субстрат-ферментного комплексу.
 - В. Швидкість розпаду фермент-субстратного комплексу.
 - Г. Залежність швидкості реакції від концентрації ферменту.
 - Д. Залежність початкової швидкості реакції від концентрації субстрату.
4. Фермент α -амілаза каталізує таку реакцію:
 - А. Транспорт електронів.
 - Б. Розщеплення пероксиду водню.
 - В. Дегідрування субстратів.
 - Г. Гідроліз 1,4-глікозидних зв'язків.
 - Д. Гідроліз пептидних зв'язків.
5. Що характеризує константа Міхаеліса (K_M)?
 - А. Спорідненість ферменту до певного субстрату.
 - Б. Швидкість розпаду фермент-субстратного комплексу.
 - В. Ефективність дії ферменту.
 - Г. Залежність швидкості реакції від концентрації ферменту.
 - Д. Ступінь конформаційної лабільності ферменту.
6. Залежність активності ферменту від рН середовища обумовлено впливом концентрації іонів водню на:
 - А. Іонізацію функціональних груп ферменту і субстрату.

- Б. Специфічність дії ферменту.
- В. Стабілізацію вторинної структури білкової молекули.
- Г. Ступінь гідролізу білка.
- Д. Електрофоретичну рухливість білкової молекули.

7. Який фермент переносить атоми водню або електрони безпосередньо на атоми кисню?

- А. Фумаратгідратаза.
- Б. Глюкозооксидаза.
- В. Уреаза.
- Г. Глутаматдекарбоксилаза.
- Д. Лактатдегідрогеназа.

8. Одна міжнародна одиниця (МО) активності ферменту відповідає:

А. Кількості ферменту, що каталізує перетворення 1 моль субстрату за 1 секунду.

Б. Кількості молекул субстрату, що перетворюється однією молекулою ферменту за 1 хвилину.

В. Кількості ферменту, що каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 секунду.

Г. Числу одиниць ферментативної активності, що припадає на 1 мг білка.

Д. Кількості ферменту, що каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину.

9. Ферменти, що каталізують реакції синтезу з використанням енергії макроергічних зв'язків АТФ або інших сполук належать до класу:

- А. Оксидоредуктаз.
- Б. Трансфераз.
- В. Лігаз.
- Г. Ліаз.
- Д. Транслоказ.

10. Каталітичну активність ферменту визначають за:

- А. Швидкістю зменшення концентрації субстрату.
- Б. Зміною конформації субстрату.
- В. Швидкістю утворення фермент-субстратного комплексу.
- Г. Зміною температури.
- Д. Зміною рН середовища.

Тема 1.3. Основи біоенергетики. Біологічне окиснення. Дихальний ланцюг

Біологічне окиснення. Роль АТР

Живі системи потребують енергії та структурних блоків для синтезу своїх компонентів, для забезпечення росту, поділу, захисних і регуляторних процесів. Хімічні процеси у клітинах відбуваються за умов постійного тиску і температури, тому доступним видом енергії для виконання роботи є вільна енергія Гіббса. При $\Delta G = 0$ система перебуває у стані рівноваги, а для спонтанної реакції зміна вільної енергії $\Delta G < 0$. Прикладом реакцій, перебіг яких відбувається у напрямку зменшення вільної енергії (*екзергонічних*), є гідроліз нуклеозидтрифосфатів, ацилфосфатів, енолфосфатів, фосфогуанідинів, тіоестерів, естерів амінокислот та інших *макроергів*. Макроергами вважають молекули, при гідролізі яких виділяється вільна енергія (ΔG), що дорівнює або більша ніж енергія розщеплення молекули АТР на АДФ і неорганічний фосфат (-30 – 32 кДж/моль за стандартних умов). Основними природними макроергами є креатинфосфат, фосфоенолпіруват, бісфосфогліцерат, фосфатна група яких може бути перенесена на молекулу АДФ з утворенням АТР (реакції *субстратного* фосфорилування). АТР вважається основною «енергетичною валютою» клітин. Синтез АТР потребує енергії і у клітинах аеробних організмів відбувається переважно через *окисне* фосфорилування, пов'язане із біологічним окисненням.

Біологічне окиснення – це різноманітні окисно-відновні реакції, в основі яких є перенесення електронів від молекули-донора (*відновник*) до молекули-акцептора (*окисник*). Відновник і окисник утворюють спряжену *окисно-відновну пару*, що має певний *редокс-потенціал* E'_0 (міра спорідненості до електронів). Перенесення електронів у напрямку зростання редокс-потенціалу відбувається спонтанно і супроводжується зменшенням вільної енергії, яка може бути використана на синтез АТР (*окисне фосфорилування*) або розсіяна у вигляді тепла (*вільне* окиснення). Реакції окиснення каталізуються ферментами класу оксидоредуктаз – оксигеназами, пероксидазами та оксидазами.

Дихальний ланцюг. Окисне фосфорилування

Оскільки перенос електронів може ефективно відбуватись лише в гідрофобному середовищі, дихальні ланцюги зосереджені у біомембранах. Природні переносники електронів залежно від їхньої структури – NADH, флавіни, хінони, геми певного типу (b, c, a), комплекси іонів міді – мають різну спорідненість до електронів. Це дозволяє формувати електрон-

транспортний ланцюг за зростанням редокс-потенціалу, а первинними донорами електронів можуть бути два типи редокс-коферментів – нікотинамідаденіндинуклеотид (NADH) або флавінаденіндинуклеотид (FADH₂). Найвищий редокс-потенціал має кисень (O₂), який діє як *термінальний акцептор* і за рахунок 4-х електронів та 4-х протонів відновлюється до двох молекул води.

За допомогою інтегрованих білкових комплексів енергетично вигідний процес транспорту електронів спрягається з направленим переносом протонів (H⁺) через мембрану за рахунок чого створюється *електрохімічний градієнт*. В мітохондріях протони викачуються з матриксу до міжмембранного простору, в результаті із зовнішнього боку внутрішньої мембрани мітохондрій накопичується позитивний заряд і рН досягає 6,5, а з боку матриксу спостерігається брак протонів і рН зростає до 8. Згідно з хеміосмотичною теорією протони повертаються у матрикс за електрохімічним градієнтом через протон-провідний канал АТР-синтази у внутрішній мембрані мітохондрій і ця енергія використовується для приєднання фосфату до ADP (*окисне фосфорилування*).

Дихальний ланцюг мітохондрій організований як послідовність великих білкових комплексів, вбудованих у мембрану, та мобільних переносників (убіхінон та цитохром с) електронів. Три комплекси здатні перекачувати протони і забезпечують спряження переносу електронів із синтезом АТР: 1-й (NADH-Q-редуктаза), 3-й (QH₂-редуктаза) і 4-й (цитохром с-оксидаза). NADH передає електрони на перший комплекс, який здатний викачувати протони, тоді як FADH₂ входить до складу другого комплексу (сукцинат-убіхінон-дегідрогеназа), що не є протонною помпою. Отже, окиснення у дихальному ланцюгу молекули FADH₂ приносить клітині у 1,5 рази менше АТР, ніж молекули NADH. Для розрахунку приблизної кількості молей АТР при перенесенні пари електронів до кисню послуговуються таким співвідношенням: 1 молекула NADH забезпечує градієнт протонів для фосфорилування 3-х молекул ADP, FADH₂ – 2-х молекул ADP. За експериментальними даними це співвідношення менше, що обумовлено необхідністю транспорту АТР із матриксу мітохондрій до цитозолу, де цей макроерг використовується як джерело енергії. У аеробів за умов нормального вмісту кисню і ефективної роботи дихального ланцюга окисне фосфорилування забезпечує близько 95 % всієї енергії, решту постачає субстратне фосфорилування.

Методи дослідження енергетичного обміну

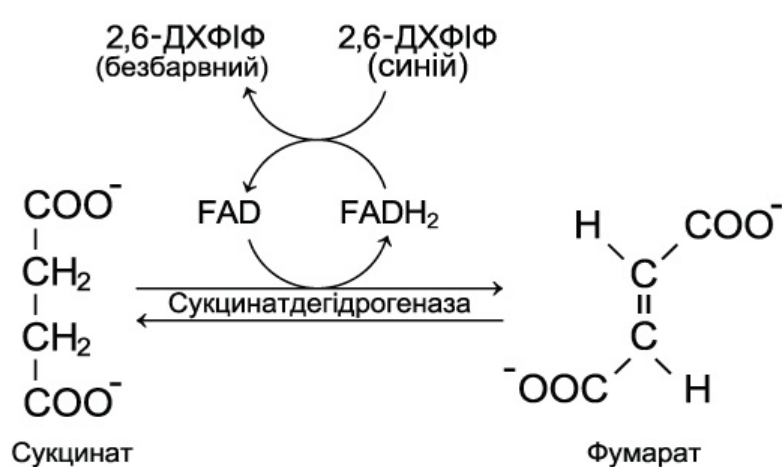
Для вивчення структурних компонентів редокс-ланцюгів, шляхів переносу електронів, механізму генерації електрохімічного потенціалу різними системами, процесів окисного і субстратного фосфорилування,

трансформації енергії в клітинах різних видів живих організмів сучасна біоенергетика використовує різноманітні фізико-хімічні методи: рентгено-структурний аналіз, електронний парамагнітний резонанс, диференційну спектрофотометрію, флуориметрію, полярографічні методи тощо.

Лабораторна робота 4.

Дослідження активності сукцинатдегідрогенази тканин тварин

Сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.99.2, сукцинат-убіхінон-оксидоредуктаза) каталізує реакцію дегідрування сукцинату з утворенням фумарату в циклі Кребса. Фермент в еукаріотів міцно зв'язаний з внутрішньою мембраною мітохондрій, а в прокаріотів – з плазматичною мембраною. Сукцинатдегідрогеназа складається з 4-х субодиниць, містить FAD як простетичну групу та 3 залізо-сірчані центри. Фермент має абсолютну субстратну специфічність. Структурний аналог сукцинату – малонат ($\text{OOC-CH}_2\text{-COO}^-$) – є потужним конкурентним інгібітором сукцинатдегідрогенази.



Принцип методу. FADH₂, що утворюється в сукцинатдегідрогеназній реакції, у присутності феназинметасульфату відновлює 2,6-дихлорфеноліндофенол (2,6-ДХФІФ). Відновлена форма (лейкоформа) 2,6-ДХФІФ безбарвна, а окиснена – забарвлена у синій колір.

Матеріали і реактиви.

1. Сукцинат натрію – 3 % розчин.
2. Малонат натрію – 3 % розчин.
3. 0,1 М К-На-фосфатний буфер, рН 7,4.
4. 2,6-Дихлорфеноліндофенол (2,6- ДХФІФ) – 0,001 М розчин.
5. Феназинметасульфат – 0,02 М розчин.
6. Азид натрію – 0,15 М розчин.
7. Дистильована вода охолоджена.
8. Біологічний матеріал – м'язова тканина тварин.

Розчини № 4, 5 та 6 готують та використовують у день дослідів.

Обладнання. Пінцет, ножиці, лабораторні ваги, порцелянова ступка з товкачиком, циліндр, воронка, штативи, хімічні пробірки, марля (бинт), фільтрувальний папір, льодяна баня (0–4 °С), кипляча водяна баня, водяна баня або термостат, що підтримує температуру +37 °С, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори змінного об'єму 0,2, 1 та 5 мл, секундомір.

Хід роботи.

Свіжу тканину (1–2 г) подрібнити ножицями і розтерти в ступці на льоду з невеликою кількістю охолодженої дистильованої води (2–3 мл) впродовж 1–2 хв. Отриманий гомогенат перенести на подвійний шар марлі, розміщений на воронці, промити охолодженою дистильованою водою (приблизно 25 мл), віджати, висушити фільтрувальним папером і суспендувати в 4 мл К-Na-фосфатного буфера. У 4 пробірки, що промарковані цифрами 1, 2, 3, 4 додати по 1 мл отриманої суспензії. Суспензію в першій пробірці інкубувати на киплячій водяній бані впродовж 10–15 хв для інактивації ферменту. Потім у всі пробірки налити реактиви відповідно до схеми, що представлена в таблиці.

Відміряти в пробірки, Мл	№ пробірки			
	1	2	3	4
Сукцинат натрію	1,0	1,0	–	1,0
H ₂ O дистильована	0,5	0,5	1,5	–
Малонат натрію	–	–	–	0,5
Феназинметасульфат	0,2	0,2	0,2	0,2
Азид натрію	0,2	0,2	0,2	0,2
2,6- ДХФІФ	0,2	0,2	0,2	0,2
Забарвлення після інкубації				

Вміст кожної пробірки перемішати. Проби інкубувати в термостаті при 37 °С впродовж 10–20 хв. Під час інкубації відбувається знебарвлення 2,6-ДХФІФ в другій пробірці (дослід). Порівняти забарвлення дослідної пробірки (№ 2) із забарвленням пробірки № 1 (інактивованій фермент), пробірки № 3 (контроль) і пробірки № 4 (у присутності інгібітору). Час знебарвлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу в присутності субстрату, сукцинату, є показником активності сукцинатдегідрогенази. Результати спостереження записати у лабораторний журнал, зробити висновок.

Лабораторна робота 5.**Виявлення цитохромоксидази в м'язовій тканині тварин**

Цитохромоксидаза (КФ 7.1.1.9, цитохром *c*-оксидоредуктаза) каталізує кінцеву стадію біологічного окиснення в дихальному ланцюзі мітохондрій – відновлення молекулярного кисню до води. Фермент може окиснювати низку штучних субстратів, зокрема диметилпарафенілендіамін і α -нафтол.

Принцип методу. Метод ґрунтується на утворенні при окисненні α -нафтолу та диметилпарафенілендіаміну (реактив НАДІ) цитохромоксидазою індофенолового блакитного, інтенсивність забарвлення якого пропорційна активності ферменту.

Матеріали і реактиви.

1. α -Нафтол – 1,5 % розчин.
2. Диметилпарафенілендіамін – 1 % водний розчин.
3. Диметилпарафенілендіамін – 1 % спиртовий розчин.
4. Карбонат натрію – 1,5 % розчин.
5. Реактив НАДІ: змішують 1 мл 1 % водного розчину диметилпарафенілендіаміну з рівним об'ємом 1 % спиртового розчину диметилпарафенілендіаміну, з 1 мл 1,5 % розчину карбонату натрію і 1 мл 1,5 % розчину α -нафтолу. Реактив готують за 1 год до досліду.
6. Дистильована вода охолоджена.
7. Біологічний матеріал – м'язова тканина тварини.

Обладнання. Пінцет, ножиці, лабораторні ваги, порцелянова ступка з товкачиком, воронка, марля (бинт), фільтрувальний папір, штативи, хімічні пробірки, скляні палички, крапельниця, льодяна баня, кипляча водяна баня, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори змінного об'єму 1 та 5 мл, секундомір.

Хід роботи.

Наважку свіжої м'язової тканини (1 г) подрібнити ножицями і ретельно розтерти в ступці на льоду, додаючи порціями 4–5 мл охолодженої дистильованої води. Отриманий гомогенат фільтрувати через подвійний шар марлі і багаторазово промити охолодженою дистильованою водою до повного знебарвлення промивних вод. Відмитий від водорозчинних ферментів гомогенат розділити на дві частини: одну перенести в пробірку, а іншу перенести на фільтрувальний папір і віджати між листами фільтрувального паперу. Другу порцію слід зберігати на холоді до проведення кольорової реакції.

У пробірку, що містить першу порцію безбарвної м'язової кашки, підлити 1 мл води та інкубувати впродовж 10–15 хв на киплячій водній бані для інактивації ферменту. Пробірку охолодити, рідину обережно злити, а м'язову кашку, що залишилася, перенести скляною паличкою на фільтрувальний папір і віджати.

На обидві порції м'язової кашки (з нативним та інактивованим ферментом) нанести 2–3 краплі реактиву НАДІ. Простежити за зміною забарвлення однієї з проб. Результати спостереження записати у лабораторний журнал, надати пояснення.

Практичне значення. У тканинах людини і тварин реакція окиснення вищезазначених штучних субстратів не відбувається, проте ця реакція використовується в клініці і цитології для виявлення цитохромоксидази у біоптатах і мазках крові з метою діагностики порушень тканинного дихання, що викликані отруєнням ціанідами, азидами та іншими сполуками, які взаємодіють із залізом гема ферменту.

Лабораторна робота 6.

Визначення сумарного вмісту основних високоенергетичних сполук м'язової тканини тварин

До основних високоенергетичних сполук м'язової тканини ссавців належать АТР і креатинфосфат. АТР слугує безпосереднім джерелом енергії працюючого м'яза, проте її запасів для підтримки скорочувальної активності вистачає не більше ніж на 1 с. Креатинфосфат знаходиться у м'язі в концентрації 20 мМ, виконуючи роль резервуару високоенергетичних фосфатних груп. У зв'язку з тим, що за термодинамічною шкалою ця сполука розташована вище АТР, креатинфосфат за необхідності термінового включення процесу м'язового скорочення може віддавати свою фосфатну групу на ADP в реакції, що каталізується креатинкіназою:



У період розслаблення м'язів внаслідок оборотності креатинкіназної реакції відбувається ресинтез креатинфосфату.

Принцип методу. Метод ґрунтується на тому, що лабільні фосфорні сполуки, до яких належать АТР і креатинфосфат, при нетривалому гідролізі в кислому середовищі розщеплюються з утворенням неорганічного фосфату. Вміст неорганічного фосфору визначають за кольоровою реакцією з молібдатом амонію у присутності аскорбінової кислоти. Порівняння вмісту неорганічного фосфору в пробах до і після гідролізу дозволяє оцінити вміст лабільно зв'язаного фосфору високоенергетичних сполук.

Матеріали і реактиви.

1. ТХО – 2,5 % розчин.
2. HCl – 1 М розчин.
3. NaOH – 1 М розчин.
4. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ – 1 % розчин.
5. Аскорбінова кислота – 1 % розчин (готується безпосередньо перед дослідом).
6. Стандартний розчин K_2HPO_4 – 0,1099 г K_2HPO_4 розчиняють у воді і доводять об'єм до 1 л. Як консервант до розчину додають 1 краплю хлороформу. У 1 мл отриманого розчину міститься 0,025 мг фосфору.
7. Дистильована вода охолоджена.
8. Біологічний матеріал – м'язова тканина тварини.

Обладнання. Фотоелектроколориметр, пінцет, ножиці, лабораторні ваги, скляний гомогенізатор для подрібнення тканин, воронка, фільтрувальний папір, штативи, хімічні пробірки, мірна пробірка об'ємом 10 мл, льодяна баня, кипляча водяна баня, піпетки мірні градуйовані або

автоматичні дозатори змінного об'єму 1, 2 та 10 мл, секундомір, кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи.

Наважку свіжої м'язової тканини (0,5 г) гомогенізувати на льоду в 5 мл охолодженого 2,5 % розчину ТХО. Отриманий гомогенат відфільтрувати в мірну пробірку, що стоїть у льоду. Осад на фільтрі промити 5 мл холодної дистильованої води. Об'єм безбілкового фільтрату довести дистильованою водою до 10 мл. Визначення неорганічного фосфору у безбілковому фільтраті провести, як указано в таблиці.

Відміряти в пробірки, мл	Дослідна проба	Контрольна проба
Безбілковий фільтрат	0,5	0,5
HCl	1,0	1,0
Інкубація на киплячій водяній бані	Інкубувати 10 хв, потім охолодити	Не інкубувати
NaOH	1,0	1,0
H ₂ O дистильована	7,5	7,5
Відібрати по 5 мл суміші із кожної пробірки і перенести у чисті у відповідний спосіб промарковані пробірки. Провести кольорову реакцію.		
Молібдат амонію	0,5	0,5
Аскорбінова кислота	0,5	0,5
H ₂ O дистильована	2,0	2,0
Вміст кожної пробірки перемішати, інкубувати впродовж 10 хв за кімнатної температури (від +20 °C до +25 °C), виміряти оптичну щільність контрольної ($E_{\text{КОНТР}}$) та дослідної ($E_{\text{ДОСЛ}}$) проб проти дистильованої води при 670 нм (червоний світлофільтр) у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм.		

Одночасно з розчинами, що досліджувалися, провести кольорову реакцію зі стандартними розчинами фосфату калію, як вказано в таблиці.

Відміряти в пробірки, мл	Калібрувальна проба 1	Калібрувальна проба 2
Стандартний розчин фосфату калію	0,5	1,0
H ₂ O дистильована	4,5	4,0
Вміст фосфату, мг	0,0125	0,025

Як калібрувальний розчин використовується той розчин, значення оптичної щільності якого найближче до оптичної щільності розчинів, що досліджувалися.

Після гідролізу в дослідній пробі неорганічний фосфор, що визначається, є сумою лабільно зв'язаного фосфору і фосфатних солей, які присутні в тканині, в контрольній пробі – тільки фосфатних солей.

Розрахунок.

Вміст лабільно зв'язаного неорганічного фосфору високоенергетичних сполук у дослідній пробі розраховується за формулою:

$$C_{\text{ДОСЛ}} = C_{\text{КАЛІБ}} \frac{E_{\text{ДОСЛ}} - E_{\text{КОНТР}}}{E_{\text{КАЛІБ}}},$$

де $C_{\text{КАЛІБ}}$ – кількість мг фосфору в 5 мл калібрувальної проби (0,0125 або 0,025);

$E_{\text{ДОСЛ}}$, $E_{\text{КОНТР}}$ і $E_{\text{КАЛІБ}}$ – оптична щільність дослідної, контрольної та калібрувальної проб відповідно.

Розрахунок кількості лабільно зв'язаного неорганічного фосфору на 1 г тканини:

$$C_{\text{ФОСФ.ЛАБ.}} = C_{\text{ДОСЛ}} \times 80,$$

де $C_{\text{ДОСЛ}}$ – вміст лабільно зв'язаного неорганічного фосфору високоенергетичних сполук в дослідній пробі, мг;

80 – коефіцієнт перерахунку на 1 г тканини з урахуванням розведення проб.

Вміст АТР у стані спокою в серцевому м'язі на 1 г тканини складає 2,6 мкмоль, у скелетному – 4,43 мкмоль, а в гладкій мускулатурі – 1,38 мкмоль.

У лабораторному журналі записати результати визначення вмісту лабільно зв'язаного неорганічного фосфору високоенергетичних сполук у біологічному зразку, порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

Контрольні питання з теми 1.3

1. Які сполуки належать до високоенергетичних (макроергічних)? Яка енергія гідролізу АТР? Які функції виконує АТР?
2. Які реакції належать до біологічного окиснення? Які типи біологічного окиснення існують? Які функції виконує біологічне окиснення?
3. Що таке субстратне фосфорилування? Окисне фосфорилування?
4. Що являє собою дихальний ланцюг? Чим обумовлена послідовність переносу електронів у дихальному ланцюгу?
5. Назвіть основні компоненти дихального ланцюга мітохондрій. Які із білкових комплексів є протонними помпами?
6. Яка речовина є кінцевим акцептором електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій?
7. Який механізм спряження окиснення та фосфорилування?
8. Синтез скількох молекул АТР забезпечується енергією, що депонується при перенесенні пари електронів на кисень: а) від NADH? б) від FADH₂?
9. Який принцип методу виявлення цитохромоксидази в біологічних зразках?

10. Які речовини є джерелами енергії в працюючому скелетному м'язі? Яка роль похідного креатину в енергетичному обміні скелетних м'язів?

11. Який принцип методу визначення в тканинах тварин активності сукцинатдегідрогенази? Який механізм дії малонату на активність сукцинатдегідрогенази?

Тестові завдання з теми 1.3

1. Комплекс NADH-дегідрогеназа дихального ланцюга мітохондрій як простетичну групу містить:

- А. NAD^+ .
- Б. NADP^+ .
- В. CoASH .
- Г. FAD .
- Д. FMN .

2. Яка сполука не належить до макроергічних?

- А. 1,3-дифосфогліцерат.
- Б. Ацетил-КоА.
- В. Креатинфосфат.
- Г. Фруктозо-6-фосфат.
- Д. Фосфоенолпіруват.

3. Дихальний контроль – це регуляція:

- А. Інтенсивності дихання вмістом ADP .
- Б. Субстратного фосфорилування вмістом ADP .
- В. Інтенсивності дихання вмістом GDP .
- Г. Субстратного фосфорилування вмістом ATP .
- Д. Вільного окиснення вмістом ATP .

4. Синтез ATP з ADP і неорганічного фосфату за рахунок енергії, що вивільняється при перенесенні електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій, називається:

- А. Вільним окисненням.
- Б. Субстратним фосфорилуванням.
- В. Окисним фосфорилуванням.
- Г. Фотосинтетичним фосфорилуванням.
- Д. Перекисним окисненням.

5. Усі компоненти дихального ланцюга мітохондрій являють собою білки, окрім:

- А. NADH-дегідрогеназа.
- Б. Убіхінон.
- В. Сукцинатдегідрогеназа.
- Г. Цитохром с.
- Д. Цитохром-с-оксидаза.

6. Чому дорівнює коефіцієнт окисного фосфорилування (P/O) при переносі пари електронів від FADH_2 до кисню?

- А. 1.
- Б. 2.
- В. 3.
- Г. 4.
- Д. 5.

7. До складу якого компонента дихального ланцюга мітохондрій входять гем і Cu^{2+} :

- А. NADH-дегідрогеназа.
- Б. Убіхінолдегідрогеназа.
- В. Цитохром *c*-оксидаза.
- Г. Сукцинатдегідрогеназа.
- Д. Цитохром *c*.

8. Чим менше значення редокс-потенціалу E'_0 , тим нижча спорідненість редокс-пари до електронів. Який компонент дихального ланцюга мітохондрій має найменшу величину редокс-потенціалу?

- А. $\text{NADH} + \text{H}^+$.
- Б. FADH_2 .
- В. Цитохром *b*.
- Г. Цитохром *c*₁.
- Д. Цитохром *a*.

9. Інгібітор NADH-дегідрогенази ротенон блокує синтез АТФ, якщо використовуються як субстрати такі сполуки, за винятком:

- А. Глутамат.
- Б. Ізоцитрат.
- В. Малат.
- Г. Піруват.
- Д. Сукцинат.

10. Деякі хімічні сполуки, які здатні переносити протони через внутрішню мембрану мітохондрій, роз'єднують тканинне дихання й окисне фосфорилування, що призводить до зниження синтезу АТФ. До таких сполук належать:

- А. Піруват, лактат.
- Б. Ротенон, барбітурати.
- В. Сукциніл-КоА, ацетил-КоА.
- Г. 2,4-Динітрофенол, тироксин.
- Д. Ціаніди, чадний газ.

Тема 1.4. Метаболізм.

Етапи катаболізму. Цикл Кребса

Напрямки метаболізму

Метаболізм – це сукупність хімічних перетворень у живому організмі, що забезпечує генерацію енергії та синтез клітинних компонентів. Метаболічні реакції каталізуються ферментами і переважно організовані у *метаболічні шляхи*, де продукт однієї реакції є субстратом для наступної. Хімічні сполуки, що утворюються в ході метаболізму, називають *метаболітами*. Метаболізм складається з катаболізму та анаболізму.

Катаболізм – це різноманітні реакції розщеплення органічних молекул, переважно – реакції гідролізу та окиснення, що відбуваються із вивільненням енергії (екзергонічні реакції). *Анаболізм* – це процеси біосинтезу, що потребують енергії, насамперед синтез біополімерів. Енерговитратні (ендергонічні) процеси у живих системах *спрягаються* з процесами екзергонічними, наприклад з розщепленням АТФ. Спряження енергетично вигідних і невіддатних процесів забезпечується наявністю спільних метаболітів, використанням макроергічних сполук та відновних еквівалентів. АТФ бере участь у різних клітинних процесах, в той час як інші нуклеозидтрифосфати мають певну спеціалізацію – УТР задіяний переважно в обміні вуглеводів, СТР – в обміні ліпідів, GTP – в обміні білків. NADH та FADH_2 утворюються у катаболічних процесах і постачають електрони в дихальний ланцюг, а у біосинтезах, регуляторних та захисних реакціях використовується NADPH, що є продуктом фосфорилування NADH.

Можна виділити три стадії катаболізму: (1) гідролітичне розщеплення великих біомолекул, зокрема біополімерів. Наприклад полісахариди розщеплюються до моносахаридів, жири – на гліцерол і жирні кислоти, протеїни – на амінокислоти; (2) перетворення різноманітних продуктів, що утворилися на першій стадії, на декілька типів ключових метаболітів, серед яких основними є піруват і ацетил-КоА. До реакцій другої стадії належать реакції окиснення, гідролізу, вилучення карбоксильної або аміногруп; (3) стадія катаболізму – це окиснення пірувату й ацетил-КоА до кінцевих продуктів – CO_2 і H_2O . У реакціях другої і третьої стадій утворюються NADH і FADH_2 , що далі віддають електрони у дихальний ланцюг, отже, необхідні для створення електрохімічного градієнту протонів і окисного фосфорилування. Третя стадія катаболізму у еукаріот локалізована в мітохондріях.

Цикл трикарбонових кислот

Цикл трикарбонових кислот (ЦТК або цикл Кребса) являє собою циклічний метаболічний шлях, де продукт останньої реакції використовується у першій як один із субстратів. Всього ЦТК складається з 8 по-

слідовних хімічних реакцій, у ході яких здійснюється повне окиснення ацетильної групи до двох молекул CO_2 . На першому етапі із оксалоацетату (4 атоми карбону) і ацетильного залишка (2 атоми C) утворюється цитрат (6C), що далі ізомеризується до ізоцитрату. Потім послідовно відбуваються дві реакції окиснення з відщепленням атомів водню і карбоксильної групи у вигляді CO_2 з утворенням спочатку альфа-кетоглутарату (5C) і далі сукциніл-КоА (4C). Сукциніл-КоА у наступній реакції розщеплюється до сукцинату і КоА. Енергія, що вивільняється під час останньої реакції, використовується на фосфорилування GDP до GTP (реакція субстратного фосфорилування). Ще три реакції необхідні для регенерації молекули оксалоацетату через утворення спочатку фумарату із сукцинату, а потім малату. Останній дегідрується до оксалоацетату. В одному оберті ЦТК утворюється 3 молекули NADH і 1 молекула FADH_2 , які далі віддають електрони у дихальний ланцюг. Окиснення NADH та FADH_2 необхідно для підтримки реакцій ЦТК, тому в анаеробних умовах та за дії інгібіторів дихального ланцюга цикл Кребса гальмується. Для розрахунку енергетичного балансу ЦТК враховують кількість відновлених еквівалентів та субстратне фосфорилування (синтез GTP). Отже, баланс ATP у ЦТК складає:

$$3\text{ATP} \cdot 3 \text{ (від 3-х NADH)} + 2\text{ATP} \cdot 1 \text{ (від FADH}_2\text{)} + 1 \text{ GTP} = 12 \text{ ATP}.$$

Джерелом ацетил-КоА, що окиснюється в циклі Кребса, можуть бути реакції катаболізму вуглеводів, жирних кислот і амінокислот. Отже, ЦТК є кінцевим етапом катаболізму органічних сполук. Окрім цього, ЦТК постачає субстрати для багатьох анаболічних шляхів, зокрема для синтезу глюкози, жирних кислот, певних амінокислот і коферментів, тому його називають *амфіболічним* шляхом. Відтік проміжних метаболітів ЦТК на реакції біосинтезу компенсується додатковим утворенням оксалоацетату, необхідного для першої реакції. В основному це відбувається за рахунок карбоксилування пірувату, і такі реакції поповнення субстратів називають *анаплеротичними*. ЦТК є одним із центральних метаболічних шляхів у природі і функціонує у всіх аеробних організмів. Основними регуляторами ЦТК і загалом реакцій катаболізму є співвідношення енергетичних субстратів (ATP/ADP) і відновних еквівалентів (NADH/NAD^+), що є показниками забезпечення клітини енергією.

Контрольні питання з теми 1.4

1. Надайте визначення метаболізму. Які функції виконує метаболізм?
2. Що таке катаболізм? Анаболізм? Як пов'язані катаболічні та анаболічні процеси в клітині?
3. Які три стадії катаболізму основних поживних речовин виділяють? Опишіть стисло кожен з трьох стадій катаболізму.

4. Які реакції циклу Кребса забезпечують його енергетичну функцію? Яка із реакцій є реакцією субстратного фосфорилування?
5. Які реакції постачають ацетил-КоА для циклу Кребса?
6. Яка біологічна роль циклу Кребса? Чому ЦТК називають амфіболічним шляхом?
7. Скільки молекул АТФ утворюється при окисненні у циклі Кребса 1 моля ацетил-КоА? Чи буде цикл Кребса функціонувати за відсутності кисню? Поясніть.
8. Яку реакцію каталізує сукцинатдегідрогеназа? Який кофермент входить до складу ферменту?

Тестові завдання з теми 1.4

1. До складу піруватдегідрогеназного комплексу, що каталізує окисне декарбоксилювання пірувату, входять такі коферменти:
 - А. FAD, ліпоєва кислота, коензим А.
 - Б. Тіаміндифосфат, коензим А, FMN, гем.
 - В. NAD, тіаміндифосфат, коензим А, FMN.
 - Г. NAD, FAD, коензим А, тіаміндифосфат, ліпоєва кислота.
 - Д. FMN, FAD, коензим А, тіаміндифосфат, ліпоєва кислота.
2. У циклі Кребса дегідрування субстратів відбувається в реакціях, в яких утворюються такі продукти, за винятком:
 - А. Ізоцитрат.
 - Б. Альфа-кетоглутарат.
 - В. Сукциніл-КоА.
 - Г. Фумарат.
 - Д. Оксалоацетат.
3. Яка роль циклу Кребса в катаболічних процесах?
 - А. Специфічний шлях окиснення вуглеводів.
 - Б. Специфічний шлях окиснення ліпідів.
 - В. Основний шлях розщеплення більшості амінокислот.
 - Г. Загальний шлях катаболізму.
 - Д. Шлях окиснення ксенобіотиків.
4. Який із перелічених ферментів є регуляторним в циклі Кребса?
 - А. Малатдегідрогеназа.
 - Б. Аконітаза.
 - В. Сукцинатдегідрогеназа.
 - Г. Сукцинілтіюкіназа.
 - Д. Ізоцитратдегідрогеназа.
5. Який із перелічених ферментів циклу Кребса безпосередньо постачає протони в дихальний ланцюг мітохондрій?
 - А. Сукцинатдегідрогеназа.
 - Б. Малатдегідрогеназа.

- В. Ізоцитратдегідрогеназа.
- Г. Альфа-кетоглутаратдегідрогеназний комплекс.
- Д. Усі, що перелічені в інших пунктах.

6. В якому компартменті еукаріотичної клітини відбувається перебіг реакцій III етапу катаболізму основних класів біомолекул?

- А. Ядро.
- Б. Цитоплазма.
- В. Мітохондрії.
- Г. Лізосоми.
- Д. Рибосоми.

7. Анаболічні функції циклу Кребса визначаються:

- А. Утворенням відновлених форм коферментів для реакцій біосинтезу.
- Б. Синтезом АТФ у реакції субстратного фосфорилування.
- В. Утворенням CO_2 , що використовується в синтезі карбамоїлфосфату.
- Г. Використанням проміжних метаболітів циклу для синтезу амінокислот, глюкози, гему, жирних кислот.
- Д. Передачею відновних еквівалентів в електронтранспортні ланцюги.

8. Який із ферментів ЦТК каталізує реакцію субстратного фосфорилування?

- А. Цитратсинтаза.
- Б. Сукцинілтіокіназа.
- В. Сукцинатдегідрогеназа.
- Г. Малатдегідрогеназа.
- Д. Ізоцитратдегідрогеназа.

9. Яка кількість молекул FAD бере участь в реакціях дегідрування ЦТК при окисненні 1 молекули ацетил-КоА?

- А. 1.
- Б. 2.
- В. 3.
- Г. 4.
- Д. 5.

10. Які метаболіти пригнічують функціонування ЦТК?

- А. Оксалоацетат, ацетил-КоА.
- Б. NAD^+ , ADP.
- В. ADP, Ca^{2+} .
- Г. АТФ, NADH.
- Д. Малат, фумарат.

РОЗДІЛ 2

МЕТАБОЛІЗМ ОСНОВНИХ КЛАСІВ БІОМОЛЕКУЛ

Тема 2.1. Обмін вуглеводів

Вуглеводи входять до складу всіх тваринних і рослинних організмів і виконують різноманітні функції. Одні вуглеводи слугують джерелом енергії в метаболічних процесах (моносахариди – глюкоза, фруктоза, галактоза; гомополісахариди – крохмаль, глікоген) і забезпечують до 50–60 % потреби організму в енергії. Інші використовуються для синтезу низки важливих сполук клітини: нуклеїнових кислот, замінних амінокислот, ліпідів тощо. Крім цього, вуглеводи виконують рецепторну, захисну, резервну, структурну функції та інші.

Перетравлення вуглеводів у ШКТ і транспорт моносахаридів

Основним джерелом вуглеводів для людини і тварин є харчові продукти, до складу яких входять полісахариди (крохмаль, глікоген), дисахариди (сахароза, лактоза) і в невеликій кількості моносахариди (глюкоза, фруктоза). Розщеплення полісахаридів починається у ротовій порожнині під дією ферменту слини – альфа-амілази, який гідролізує внутрішні α -1,4-глікозидні зв'язки з утворенням суміші полісахаридних ланцюгів меншої довжини. Шлунковий сік не містить амілолітичних ферментів, а альфа-амілаза слини інактивується у шлунку за умов кислих значень рН. Наступні етапи перетравлення частково розщеплених полісахаридів відбуваються в тонкому кишечнику під дією панкреатичної альфа-амілази (α -1,4-глікозидази). Продукти, що утворюються, а також дисахариди їжі (сахароза і лактоза) розщеплюються на поверхні епітеліальних клітин кишечника специфічними глікозидазами:

- сахарозо-ізомальтазний комплекс гідролізує α -1,2-, α -1,4- та α -1,6-глікозидні зв'язки, відповідно, в сахарозі, мальтозі та ізомальтозі;
- глікоамілазний комплекс гідролізує α -1,4-глікозидні зв'язки в олігосахаридах з відновного кінця;
- β -глікозидазний комплекс (лактаза) розщеплює β -1,4-глікозидний зв'язок у молекулі лактози.

У процесі травлення вуглеводи розщеплюються до моносахаридів, переважно, глюкози, фруктози і галактози, які всмоктуються епітеліальними клітинами кишечника шляхом полегшеної дифузії. Глюкоза і галактоза можуть переноситися також проти градієнта концентрації за механізмом вторинного активного транспорту (Na^+ – залежний симпорт). Із ентероцитів моносахариди транспортуються у кров за допомогою білків-переносників за градієнтом концентрації. Переважна кількість глюкози кров'ю ворітної вени переноситься до печінки, решта глюкози надходить до клітин інших тканин шляхом полегшеної дифузії. У клітинах глюкоза фосфорилується за рахунок АТР за участю ферменту гексокінази (у печінці та підшлунковій залозі – глюकोкінази) та перетворюється на глюкозо-6-фосфат. Це ключовий метаболіт, що може використовуватися на синтез глікогену, у гліколізі, пентозофосфатному шляху та інших метаболічних процесах.

Обмін глікогену

Синтез глікогену. У тварин у багатьох тканинах глюкоза депонується у вигляді глікогену, але найбільше глікогену синтезується у м'язах та печінці. Глікоген печінки використовується для підтримання постійної концентрації глюкози в крові, а глікоген м'язів – як джерело енергії при скороченні. В абсорбтивний період у клітинах накопичується глюкозо-6-фосфат, який перетворюється на глюкозо-1-фосфат, і далі в UDP-глюкозу. Глюкоза від UDP-глюкози переноситься глікогенсинтазою (ключовим ферментом синтезу глікогену) на невідновний кінець олігосахаридного ланцюга і приєднуються α -1,4-глікозидним зв'язком. Утворення $\alpha(1\rightarrow6)$ -зв'язків, що знаходяться в точках розгалуження, каталізується аміло-1,4 $\rightarrow$ 1,6 глюкозилтрансферазою (фермент «розгалуження»). Указаний фермент переносить фрагмент із 6–7 залишків глюкози від кінця лінійного ланцюга на гідроксильну групу в C6-положенні внутрішнього залишку глюкози цього або сусіднього ланцюга з утворенням нової гілки. Подальше подовження нового ланцюга каталізує глікогенсинтаза.

Розщеплення глікогену відбувається в печінці в постабсорбтивний період або в печінці і м'язах за умов фізичного навантаження на організм. Основним шляхом розпаду глікогену у тварин є фосфороліз, під час якого здійснюється послідовне відщеплення глюкози у формі глюкозо-1-фосфату. Каталізує розщеплення лінійних α -1,4-глікозидних зв'язків глікогенфосфорилаза (ключовий фермент розпаду глікогену). Залишки глюкози на ділянці розгалуження відщеплює фермент «дерозгалуження», що виявляє дві активності. Спочатку за допомогою трансферазної активності фермент переносить три залишки глюкози із чотирьох, що залишилися до точки розгалуження, на невідновний кінець сусіднього ланцюга. Четвертий

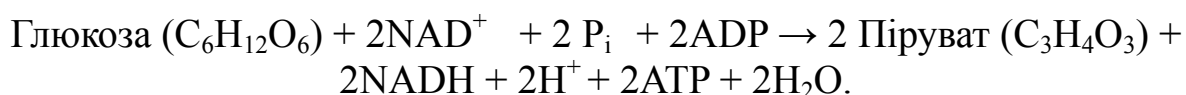
залишок глюкози відщеплюється під дією α -1,6-глюкозидазної активності ферменту у формі вільної глюкози. Глюкозо-1-фосфат, що утворюється при розпаді глікогену, перетворюється в глюкозо-6-фосфат, який може залучатися в різні метаболічні шляхи в залежності від типу клітин, а також від їхніх енергетичних і пластичних потреб. Регуляція обміну глікогену в клітині здійснюється через зміни в протилежних напрямках активності ключових ферментів – глікогенсинтази та глікогенфосфорилази – за допомогою їх фосфорилування і дефосфорилування.

Гліколіз

Гліколіз – один із основних шляхів утилізації глюкози в клітинах, перебіг реакцій якого відбувається як за аеробних, так і за анаеробних умов. Це дихотомічний шлях розпаду глюкози, під час якого шестикарбоновий скелет глюкози розщеплюється навпіл з утворенням двох молекул трикарбонової сполуки – пірувату, а енергія, що вивільнюється, депонується у формі АТР. У присутності кисню піруват переноситься в мітохондрії, де піддається окисненню до CO_2 і H_2O в загальних шляхах катаболізму (окисне декарбоксилювання пірувату, ЦТК, дихальний ланцюг мітохондрій). У середовищі, що не містить кисню, піруват відновлюється до лактату.

Ферменти гліколізу локалізовані в цитозолі. Процес гліколізу, що включає 10 реакцій, можна умовно розділити на два етапи. На першому (підготовчому) етапі глюкоза та інші гексози фосфорилуються і розщеплюються на дві фосфотриози: діоксиацетонфосфат та гліцеральдегід-3-фосфат. На цьому етапі використовується 2 молекули АТР на кожную молекулу глюкози. На другому етапі відбувається окиснення двох молекул гліцеральдегід-3-фосфату з утворенням двох молекул пірувату. Цей етап включає окисно-відновні реакції, спряжені з генерацією 2 молекул NADH і чотирьох молекул АТР.

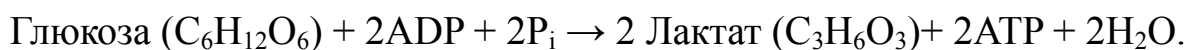
Сумарне рівняння гліколізу за аеробних умов:



Необхідною умовою перебігу гліколізу є регенерація окисненої форми коферменту NAD^+ . За аеробних умов це відбувається в результаті перенесення відновних еквівалентів від цитозольного NADH в дихальний ланцюг мітохондрій за допомогою однієї з човникових систем: малат-аспартатної або гліцеролфосфатної. В результаті за рахунок окисного фосфорилування утворюється 6АТР або 4АТР в залежності від того, який човниковий механізм було використано.

За анаеробних умов цитозольний NADH витрачається для відновлення пірувату до лактату лактатдегідрогеназою. За допомогою лактатдегідрогеназної реакції забезпечується регенерація NAD^+ з NADH без участі дихального ланцюга мітохондрій.

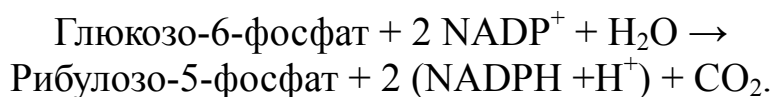
Сумарне рівняння гліколізу в анаеробних умовах:



Швидкість реакцій гліколізу регулюється на рівні трьох незворотних реакцій цього катаболічного шляху: гексокіназної, фосфофруктокіназної та піруваткіназної. Ключовою реакцією гліколізу, що визначає швидкість всього процесу, є перетворення фруктозо-6-фосфату на фруктозо-1,6-дифосфат, яка каталізується фосфофруктокіназою. Активність фосфофруктокінази алостерично контролюється рядом важливих метаболітів: АТР та цитрат є негативними, а АДФ та АМР – позитивними модуляторами ферменту. Крім енергії гліколіз постачає також будівельні блоки для реакцій синтезу біомолекул клітини: амінокислот, фосфопентоз, гліцерину тощо.

Пентозофосфатний шлях окиснення глюкози

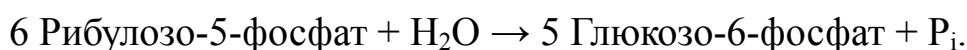
Альтернативним шляхом окиснення глюкози є пентозофосфатний (фосфоглюконатний) шлях, під час перебігу реакцій якого відбувається окиснення і відщеплення першого атому карбону глюкози. Пентозофосфатний шлях (ПФШ) виконує щонайменше дві важливі функції: постачає відновні еквіваленти у формі NADPH для біосинтезу жирних кислот, стероїдів, глутатіону і рибозо-5-фосфат для синтезу нуклеотидів і нуклеїнових кислот. Ферменти ПФШ локалізовані в цитозолі клітин. Процес можна розділити на дві стадії: окисну і неокисну. Під час першої стадії відбувається спочатку дегідрування глюкозо-6-фосфату, а потім окисне декарбоксилювання проміжного метаболіту 6-фосфоглюконату NADP-залежними дегідрогеназами з утворенням фосфопентози – рибулозо-5-фосфату і 2 молекул NADPH:



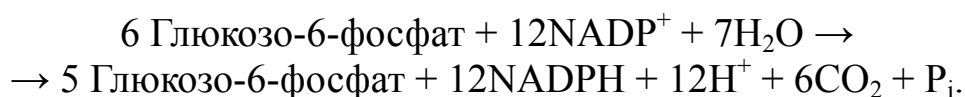
Швидкість перебігу ПФШ регулюється ферментом глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою, що каталізує першу реакцію цього шляху. Активність ферменту контролюється співвідношенням $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ у клітині.

Реакції неокисної стадії є оборотними. Ці реакції являють собою взаємоперетворення моносахаридів, які містять 3, 4, 5, 6 і 7 атомів карбону. Основними ферментами другої стадії є транскетолаза і трансальдолаза, що каталізують перенесення дво- і трикарбонових фрагментів

відповідно з одного моносахариду на інший. У результаті реакцій неокисної стадії утворюються гліцеральдегід-3-фосфат і фруктозо-6-фосфат. Останній може ізомеризуватися в глюкозо-6-фосфат. Пентозофосфатному шляху притаманна висока лабільність. Залежно від наявності субстратів і потреб клітини у продуктах обирається напрямок реакцій і варіант ПФШ. Якщо потреби клітини в рибозо-5-фосфаті і в NADPH збалансовані, тоді фермент ізомераза каталізує перетворення рибулозо-5-фосфату в рибозо-5-фосфат, всі інші реакції неокисної стадії не потрібні. Однак, якщо, наприклад, клітина потребує більше NADPH ніж рибозо-5-фосфату, тоді надлишок останнього внаслідок перебігу реакцій неокисної стадії перетворюється в глюкозо-6-фосфат – вихідний субстрат окисної стадії ПФШ.



У цьому випадку молекули глюкози повторно включаються в реакції окисної стадії і можуть повністю окиснюватися до CO_2 . Сумарне рівняння окисної і неокисної стадій ПФШ можна записати у такому вигляді:



Таке повне окиснення глюкозо-6-фосфату відбувається не у всіх клітинах, у більшості пентозофосфатний шлях на одному з етапів перемикається на гліколітичний. Ці два шляхи окиснення глюкози взаємопов'язані і мають три точки спряження: на рівні глюкозо-6-фосфату, фруктозо-6-фосфату та гліцеральдегід-3-фосфату. Перетин метаболічних шляхів дозволяє регулювати потік метаболітів залежно від енергетичних та пластичних потреб клітини.

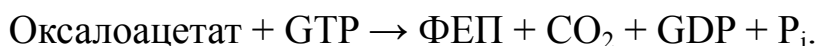
Глюконеогенез

Глюконеогенез – це метаболічний шлях синтезу глюкози із сполук неуглеводної природи, таких як піруват, лактат, гліцерол, метаболіти циклу Кребса, низка амінокислот. Основною функцією глюконеогенезу є підтримання рівня глюкози в крові в постабсорбтивний період, коли вичерпуються запаси глікогену в печінці, в умовах тривалого голодування та інтенсивних фізичних навантажень. У ссавців повний набір ферментів глюконеогенезу є в клітинах печінки, кіркової речовини нирок та слизової оболонки кишечника. Перебіг реакцій глюконеогенезу відбувається, переважно, тим самим шляхом, що і гліколізу, тільки у зворотному напрямку. Однак в гліколізі є три необоротні реакції: гексокіназна, фосфофруктокіназна і піруваткіназна. В обхід цих стадій в процесі глюконеогенезу мають місце необоротні реакції, що каталізуються іншими ферментами, тільки у зворотному напрямку.

Першою необоротною стадією глюконеогенезу є перетворення пірувату у фосфоенолпіруват, яке відбувається в результаті перебігу двох реакцій. У першій реакції піруват під дією мітохондріального біотин-вмісного ферменту піруваткарбоксилази перетворюється на оксалоацетат:

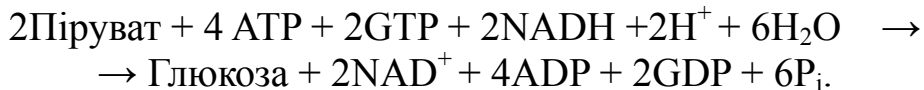


Оксалоацетат, що утворився в мітохондріях, транспортується до цитоплазми, де декарбоксилюється та фосфорилується за участю фосфоенолпіруваткарбоксикінази з утворенням фосфоенолпірувату (ФЕП):



Далі ФЕП включається в оборотні реакції гліколізу і перетворюється на фруктозо-1,6-дифосфат. Цей метаболіт під дією специфічного ферменту глюконеогенезу фруктозо-1,6-дифосфатази дефосфорилується і перетворюється на фруктозо-6-фосфат. У наступній реакції, що каталізується гліколітичним ферментом, фруктозо-6-фосфат ізомеризується у глюкозо-6-фосфат. Заклучна реакція глюконеогенезу – це дефосфорилування глюкозо-6-фосфату ще одним специфічним ферментом – глюкозо-6-фосфатазою – з утворенням вільної глюкози, яка може виходити із печінки у кров.

Сумарне рівняння глюконеогенезу із пірувату таке:



Отже, на синтез однієї молекули глюкози із 2 молекул пірувату витрачається 6 моль АТР: 2АТР у піруваткарбоксилазній реакції, 2GTP – у фосфоенолпіруваткіназній реакції, 2АТР – для утворення 1,3-дифосфогліцерату, і 2 моль NADH як відновника – у гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназній реакції.

Важливу роль в регуляції глюконеогенезу відіграють два ферменти – піруваткарбоксилаза і фруктозо-1,6-дифосфатаза. Аlostеричним активатором піруваткарбоксилази є ацетил-КоА. Активність фруктозо-1,6-дифосфатази контролюється аlostеричними модуляторами: АТР і цитрат діють як активатори, а фруктозо-2,6-дифосфат (регуляторний метаболіт, що утворюється із фруктозо-6-фосфату) і АМР – як інгібітори.

Методи визначення вуглеводів та продуктів їхнього обміну

Однією з головних характеристик вуглеводного обміну є вміст глюкози в крові, що підтримується на рівні 3,5–5,5 ммоль/л (70–99 мг/дл) за рахунок нейрогуморальних механізмів та регуляторної функції печінки.

До гормонів, що регулюють вуглеводний обмін, належать: інсулін (практично єдиний гормон, що знижує концентрацію глюкози в крові), глюкагон, адреналін, глюкокортикоїди, соматотропін (група так званих контрінсулярних гормонів, що збільшують вміст глюкози в крові). Відхилення концентрації глюкози в крові за межі фізіологічних коливань спостерігається при низці патологій, зокрема при цукровому діабеті. Цукровий діабет – це група захворювань, що зумовлені недостатністю секреції або ефективності дії інсуліну та призводять до глибоких порушень обміну речовин (вуглеводного, ліпідного, білкового). Характерні ознаки цукрового діабету – це підвищення вмісту глюкози у крові (гіперглікемія) та надмірне виведення глюкози із сечею (глюкозурія).

У зв'язку з цим вимірювання концентрації глюкози в крові та сечі використовується як тест при діагностиці діабету. Більш чутливим діагностичним тестом є проба на толерантність до глюкози (рис. 4). У здорової людини однократний прийом 50–100 г глюкози (цукрове навантаження) викликає короточасне підвищення вмісту цукру в крові – харчову (або

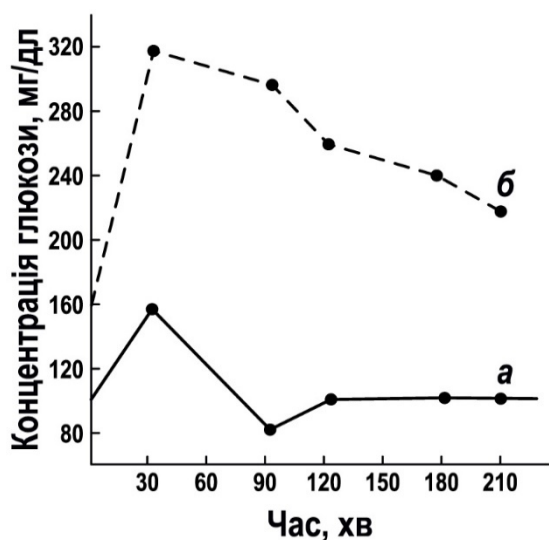


Рис. 4. Зміна концентрації глюкози в крові після цукрового навантаження в нормі (лінія а) та при цукровому діабеті (лінія б)

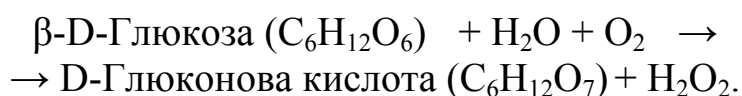
аліментарну) гіперглікемію. У здорових людей за умов гіперглікемії посилюється синтез і секреція інсуліну, який сприяє швидкому перенесенню глюкози як до печінки, так і до периферичних тканин, що приводить до нормалізації концентрації глюкози в крові наприкінці другої години (лінія а на рис. 4). У хворих на цукровий діабет через недостатність секреції інсуліну гіперглікемія більш виражена, і повернення рівня глюкози до нормальних значень відбувається дуже повільно (лінія б на рис. 4), тобто знижується толерантність до глюкози. Отже, за допомогою цукрового навантаження можна виявити приховані (латентні) форми діабету, перебіг яких

відбувається без клінічних симптомів із збереженням вмісту глюкози в крові натще в межах значень, що відповідають нормі.

Лабораторна робота 7.

Кількісне визначення глюкози глюкозооксидазним методом (з використанням набору реактивів)

Принцип методу. Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) каталізує окиснення D-глюкози киснем повітря до глюконової кислоти і еквімолярної кількості пероксиду водню.



Пероксид водню у присутності пероксидази реагує з фенолом і 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації глюкози у розчині і визначається колориметричним методом.

Матеріали і реактиви.

1. Монореагент: пероксидаза (1100 U/л), β ,D-глюкозооксидаза (9000 U/л), 4-амінофеназон (55 мг/л), фосфатний буфер із рН 7,2–7,4 (0,10 моль/л), фенол (190 мг/л), стабілізатори, активатори.
2. Калібрувальний розчин глюкози (10 ммоль/л або 180,2 мг/дл).
3. Антикоагулянт – розчин натрію щавлевокислого і натрію хлористого.
4. Фізіологічний розчин – 0,9 % розчин NaCl.
5. Біологічний матеріал – сироватка (плазма) крові або сеча.

Обладнання. Фотоелектроколориметр, водяна баня або термостат, що підтримують температуру +37 °С, секундомір, хімічні пробірки, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 0,01–0,1 мл та 5 мл, кювети з довжиною оптичного шляху 5 мм або 10 мм.

Хід роботи.

Аналіз провести у відповідності до схеми, що представлена в таблиці.

Відміряти у пробірки, мл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Калібрувальний розчин	–	0,04	–
Розчин, що аналізується	0,04	–	–
Фізіологічний розчин	–	–	0,04
Монореагент	4,00	4,00	4,00

Вміст кожної пробірки перемішати, витримати 25 хв при кімнатній температурі (+18–25 °С) або 15 хв при температурі +37 °С. Виміряти оптичну щільність калібрувальної ($E_{\text{КАЛИБР}}$) і дослідної ($E_{\text{ДОСЛ}}$) проби проти холостої при 500–550 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм. Забарвлення стабільне протягом 30 хв.

Розрахунок.

$$C_{\text{ДОСЛ}} = C_{\text{КАЛИБ}} \frac{E_{\text{ДОСЛ}}}{E_{\text{КАЛИБ}}},$$

де $C_{\text{ДОСЛ}}$ – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л (мг/дл);

$C_{\text{КАЛИБ}}$ – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, що дорівнює 10 ммоль/л (180 мг/дл);

$E_{\text{ДОСЛ}}$ і $E_{\text{КАЛИБ}}$ – оптична щільність дослідної та калібрувальної проб відповідно.

У нормі вміст глюкози в цільній капілярній крові становить 3,5–5,5 ммоль/л (70–99 мг/дл), в сироватці (плазмі) крові – 4,22–6,11 ммоль/л (76–110 мг/дл), в сечі – 0–1,11 ммоль/л (0–20 мг/дл).

Клініко-діагностичне значення. Підвищення концентрації глюкози в сироватці (плазмі) крові (гіперглікемія) спостерігається при цукровому діабеті, гострому і хронічному панкреатиті, хронічних захворюваннях печінки і нирок, емоційному стресі, інтенсивних фізичних навантаженнях.

Зниження вмісту глюкози в крові (гіпоглікемія) може бути ознакою захворювань підшлункової залози, важких захворювань печінки, порушення всмоктування вуглеводів, отруєнь алкоголем, фосфором, миш'яком тощо.

У лабораторному журналі записати результати визначення вмісту глюкози, порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

Лабораторна робота 8.

Визначення піровиноградної кислоти в крові модифікованим методом Умбрайта

Піровиноградна кислота – це один із ключових метаболітів, який знаходиться у точці перетину головних метаболічних шляхів. Піруват утворюється переважно із глюкозо-6-фосфату, лактату та аланіну. За аеробних умов піруват піддається окисному декарбоксилюванню за участю піруватдегідрогеназного комплексу с утворенням ацетил-КоА, який окиснюється до CO_2 і H_2O в циклі Кребса або спрямовується на синтез ліпідів. За анаеробних умов піруват в лактатдегідрогеназній реакції відновлюється до лактату. В цій реакції відбувається регенерація NAD^+ , що необхідний для безперервного перебігу гліколізу у разі дефіциту кисню в тканинах. Ще один шлях використання пірувату – його карбоксилювання в мітохондріях з утворенням оксалоацетату – це перша реакція необоротної стадії глюконеогенезу, – що дозволяє синтезувати глюкозу з пірувату. В оборотній реакції трансамінування піруват перетворюється на амінокислоту аланін. Отже, піруват відіграє важливу роль в інтеграції обміну вуглеводів, ліпідів і білків.

Принцип методу. При взаємодії з 2,4-динітрофенілгідразином пірвіноградна кислота перетворюється в 2,4-динітрофенілгідразон пірвату, який в лужному середовищі забарвлюється у коричнево-червоний колір. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації пірвіноградної кислоти у розчині.

Матеріали і реактиви.

1. ТХО – 10 % розчин.
2. 2,4-Динітрофенілгідразин – 0,1 % розчин у 2 н розчині НСІ.
3. NaOH – 12 % розчин.
4. Стандартний розчин пірвіноградної кислоти – 2 мг% (2 мг у 100 мл води).
5. Дистильована вода.
6. Біологічний матеріал – кров.

Обладнання. Фотоелектроколориметр, центрифуга лабораторна (1000–3000 об/хв), секундомір, центрифужні пробірки, хімічні пробірки, скляні палички, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1–2 мл, штатив для пробірок, кювети з довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи.

Осадження білків крові. У центрифужній пробірці змішати 0,3 мл крові з 0,7 мл дистильованої води. До отриманого гемолізату додати 1 мл 10 % розчину ТХО, перемішати вміст скляною паличкою і центрифугувати при 3000 об/хв протягом 10 хв.

Утворення 2,4-динітрофенілгідразону пірвату і колориметрія. Із центрифужної пробірки акуратно відібрати 1 мл надосадової рідини і перенести в чисту хімічну пробірку. До надосадової рідини додати 0,4 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину, перемішати та інкубувати при кімнатній температурі в темному місці 20 хв. Потім у пробірку додати 1 мл 12 % розчину NaOH і перемішати. Через 5 хв виміряти оптичну щільність дослідної проби проти холостої при 490 нм (синій світлофільтр) в кюветі з довжиною оптичного шляху 5 мм. Холосту пробу готують так само, як і дослідну, тільки замість крові використовують воду. Паралельно проводять обробку стандартного розчину пірвіноградної кислоти, так само, як і проби крові.

Розрахунок.

$$C_{\text{ДОСЛ}} = C_{\text{СТАНД}} \frac{E_{\text{ДОСЛ}}}{E_{\text{СТАНД}}},$$

де $C_{\text{ДОСЛ}}$ – концентрація пірвіноградної кислоти у дослідній пробі, мг%;
 $C_{\text{СТАНД}}$ – концентрація пірвіноградної кислоти у стандартному розчині (2 мг%);

$E_{\text{ДОСЛ}}$ і $E_{\text{СТАНД}}$ – оптична щільність дослідної та стандартної проб відповідно.

Для переведення мг% у мкмоль/л отриману концентрацію піровиноградної кислоти необхідно помножити на 113,6.

Клініко-діагностичне значення. У нормі вміст піровиноградної кислоти у крові становить 0,4–1,0 мг% (45,6–114 мкмоль/л). Концентрація піровиноградної кислоти в крові підвищується під час посиленої м'язової роботи, а також за деяких патологічних станів (гіповітаміноз В₁, захворювання печінки, цукровий діабет тощо).

У лабораторному журналі записати результати визначення вмісту піровиноградної кислоти у крові, порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

Контрольні питання з теми 2.1

1. Які ферменти беруть участь у перетравленні вуглеводів, які продукти утворюються і в яких компартментах ШКТ це відбувається? Які механізми транспорту моносахаридів до ентероцитів? До кровоносних капілярів? Із крові до клітин?

2. У яких органах найбільше депонується глікогену і які його функції? Які ферменти залучені до синтезу глікогену? Які реакції вони каталізують? Який фермент є ключовим в синтезі глікогену і як регулюється його активність?

3. Який основний шлях розщеплення глікогену? Які ферменти залучені до розщеплення глікогену? Які реакції вони каталізують? Який фермент є ключовим в розщепленні глікогену і як регулюється його активність?

4. Що таке гліколіз? Який кінцевий продукт гліколізу за аеробних умов? За анаеробних умов? Яка біологічна роль гліколізу? Який енергетичний баланс гліколізу за анаеробних умов? За аеробних умов?

5. Які реакції гліколізу є регуляторними? Які ферменти їх каталізують? Як регулюється активність цих ферментів?

6. Що таке глюконеогенез? Які сполуки є первинними субстратами глюконеогенезу і за яких умов використовуються? Яка основна функція глюконеогенезу?

7. Які реакції глюконеогенезу є регуляторними? Які ферменти їх каталізують? У який спосіб регулюється активність цих ферментів?

8. Які функції пентозофосфатного шляху окиснення глюкози? Які реакції відбуваються і які продукти утворюються в окисній стадії ПФШ? В неокисній стадії ПФШ? Як взаємопов'язані гліколіз і ПФШ?

9. Який принцип глюкозооксидазного методу визначення глюкози? Яке діагностичне значення має визначення вмісту глюкози в крові?

10. На чому ґрунтується визначення пірувату за модифікованим методом Умбрайта? Яка роль пірувату в проміжному обміні речовин?

Тестові завдання з теми 2.1

1. Перелічені положення правильно характеризують глікогенсинтазу, за винятком:

- А. Каталізує необоротну реакцію.
- Б. Локалізована в цитозолі клітин.
- В. Як субстрат використовує уридиндифосфатглюкозу.
- Г. Каталізує утворення альфа-1,6- глікозидних зв'язків.
- Д. Регулюється шляхом фосфорилування-дефосфорилування.

2. До яких тканин або клітин транспорт глюкози із крові здійснюють інсулінозалежні білки-переносники:

- А. М'язової і жирової тканин.
- Б. Підшлункової залози і кишечника.
- В. Нервової тканини.
- Г. Мозкового шару нирок.
- Д. Еритроцитів, ентероцитів.

3. В реакціях субстратного фосфорилування анаеробного розпаду 1 молекули глюкози утворюється 4 молекули АТР. Які ферменти каталізують ці реакції?

- А. Фосфогексоізомераза та фосфофруктокіназа.
- Б. Гексокіназа та фосфогліцеромутаза.
- В. Фосфогліцераткіназа та піруваткіназа.
- Г. Гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа та альдолаза.
- Д. Ізоцитратдегідрогеназа, глюкокіназа та енолаза.

4. Перелічені положення правильно характеризують глікогенфосфорилазу, за винятком:

- А. Активується в постабсорбтивний період.
- Б. Каталізує розщеплення субстрату фосфоролітичним шляхом.
- В. Розщеплює тільки альфа-1,4- глікозидні зв'язки.
- Г. Регулюється шляхом фосфорилування-дефосфорилування.
- Д. Каталізує гідролітичне розщеплення полісахариду.

5. Під час гліколізу АТР витрачається в реакції утворення:

- А. Фосфоенолпірувату.
- Б. Фруктозо-1,6-дифосфату.
- В. 2-Фосфогліцерату.
- Г. Гліцеральдегід-3-фосфату.
- Д. Фруктозо-6-фосфату.

6. Регенерація NAD^+ під час гліколізу відбувається в реакції:

- А. Утворення фруктозо-1,6-дифосфату.
- Б. Ізомеризації 3-фосфогліцерату.
- В. Перетворення фосфоенолпірувату.

Г. Окиснення гліцеральдегід-3-фосфату.

Д. Утворення лактату.

7. Аlostеричним активатором регуляторного ферменту гліюконеогенезу піруваткарбоксілази є:

А. Цитрат.

Б. Ацетил-КоА.

В. NADPH.

Г. ADP.

Д. cAMP.

8. Які реакції неокисної стадії пентозофосфатного циклу є основними?

А. Дегідратації та гідратації.

Б. Карбоксилування і транскарбоксилування.

В. Транскетолазна і трансальдолазна.

Г. Дегідрування та ізомеризації.

Д. Фосфорилування та дефосфорилування.

9. Перелічені положення правильно характеризують процес гліюконеогенезу, за винятком:

А. Субстратами є лактат, піруват, гліцерол, метаболіти ЦТК.

Б. Регуляторні ферменти каталізують необоротні реакції.

В. На синтез 1 моль гліюкози витрачається 6 моль АТР.

Г. Перебіг реакцій відбувається переважно в клітинах печінки.

Д. Стимулюється інсуліном.

10. Регуляторним ферментом пентозофосфатного шляху окиснення гліюкози є:

А. Гексокіназа.

Б. Гліюкозо-6-фосфатдегідрогеназа.

В. 6-Фосфогліюконатдегідрогеназа.

Г. Транскетолаза.

Д. Трансальдолаза.

Тема 2.2. Обмін ліпідів

До ліпідів належать різноманітні за структурою гідрофобні біомолекули, розчинні у неполярних розчинниках. Принципово можна поділити всі ліпіди на дві групи за здатністю утворювати мила (солі жирних кислот). До омилювальних ліпідів належать жирні кислоти (ЖК) та їхні похідні, зокрема ейкозаноїди, триацилгліцероли (жири), гліцерофосфоліпіди і сфінголіпіди. Неомилювальні ліпіди є похідними ізопрену та у людини і тварин представлені переважно стероїдами.

Обмін триацилгліцеролів

Триацилгліцероли (ТАГ) складають основну частку ліпідів їжі і для використання у клітинах проходять кілька етапів розщеплення і ресинтезу. На першому етапі після обробки детергентами (жовчними кислотами) ТАГ розщеплюються у кишечнику ліпазами на жирні кислоти і гліцерол, що переносяться в ентероцити, де відбувається ресинтез ТАГ і формування ліпопротеїнових комплексів – хіломікронів. Хіломікрони через лімфатичну систему кишечника потрапляють у кров, де ТАГ поступово гідролізуються ліпазами і жирні кислоти надходять у клітини периферичних тканин.

Подальша доля жирних кислот залежить від забезпечення організму енергією і дії гормонів. В абсорбтивний період (після прийому їжі) інсулін стимулює синтез ТАГ у печінці та жировій тканині як з жирних кислот, що надійшли з кишечника, так і з жирних кислот, синтезованих у клітинах з глюкози.

Біосинтез ТАГ відбувається з активованих КоА-похідних жирних кислот і гліцерол-3-фосфату, з яких спочатку утворюється фосфатидна кислота (1,2-діацилгліцеролфосфат) – ключовий метаболіт обміну всіх гліцероліпідів. Для синтезу ТАГ фосфатна група у третьому положенні гліцеролу видаляється і замінюється на третій залишок жирної кислоти. Фосфатидна кислота може використовуватись також для синтезу гліцерофосфоліпідів мембран.

У постабсорбтивний період, при голодуванні та інтенсивній м'язовій роботі під впливом глюкагону, адреналіну, соматотропіну та кортизолу відбувається розщеплення депонованих жирів. Продуктами розщеплення є вільні жирні кислоти і гліцерол, що далі окиснюються для генерації енергії.

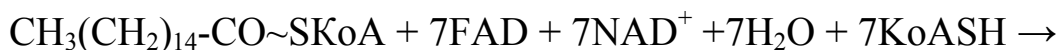
Транспорт ліпідів в організмі людини та тварин

Ліпіди нерозчинні у воді, тому для транспорту у крові вони з'єднуються зі спеціальними білками з утворенням ліпопротеїнів. Це складні водорозчинні частинки, що мають всередині гідрофобне ядро з неполярних ліпідів (триацилгліцеролів і ефірів холестерину), а на поверхні – гідрофільний моно-

шар фосфоліпідів, вільного холестерину і білків (аполіпопротеїнів). Залежно від щільності та складу ліпопротеїни плазми крові розділяють на кілька класів: 1) хіломікрони (ХМ) утворюються в тонкому кишечнику і забезпечують транспорт екзогенних (харчових) ліпідів із кишечника в тканини; 2) ліпопротеїни дуже низької щільності (ЛПДНЩ) утворюються у печінці та здійснюють транспорт ендogenous ліпідів з печінки у периферичні тканини, зокрема жири у такий спосіб переносяться в адіпоцити; 3) ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ) – є продуктом кінцевої стадії метаболізму ЛПДНЩ і здійснюють транспорт холестерину у тканини; 4) ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ), що формуються у печінці та частково у тонкому кишечнику, забезпечують доставку білків на інші ліпопротеїни та видалення надлишку холестерину з периферичних тканин до печінки. Вільні жирні кислоти у крові транспортуються у комплексі з сироватковим альбуміном.

Обмін жирних кислот

Жирні кислоти, що надходять у клітину з кров'яного русла, в цитоплазмі активуються під дією ацил-КоА-синтетази з утворенням КоА-похідних жирних кислот. Всі етапи катаболізму жирних кислот відбуваються в мітохондріях, куди ацильні залишки переносяться за допомогою карнітину і ферментів – ацилтрансферази I і II. Ацилтрансфераза I є регуляторним ферментом, що контролює швидкість окиснення жирних кислот. У матриксі мітохондрій ацильний залишок залучається до циклу реакцій, де окиснення в радикалі жирної кислоти відбувається за бета-атомом карбону. Цикл складається з 4 послідовних реакцій (дегідрування за участю FAD-залежної дегідрогенази, гідратація, дегідрування за участю NAD⁺-залежної дегідрогенази і тіолазне розщеплення). Унаслідок перебігу цих чотирьох реакцій вивільняється ацетил-КоА, а ланцюг жирної кислоти стає коротшим на два атоми карбону. Ацетил-КоА повністю окиснюється в циклі Кребса. Вкорочений ацильний залишок залучається в наступний цикл бета-окиснення. В результаті перебігу декількох циклів жирна кислота повністю розщеплюється до ацетил-КоА. Наприклад, сумарне рівняння бета-окиснення пальмітинової кислоти виглядає так:



Пальмітоїл-КоА



Ацетил-КоА

Енергетичний баланс окиснення залежить від довжини ланцюга жирної кислоти, що визначає кількість циклів бета-окиснення ($n/2-1$, де n – кількість атомів карбону) і утворених ацетильних залишків ($n/2$).

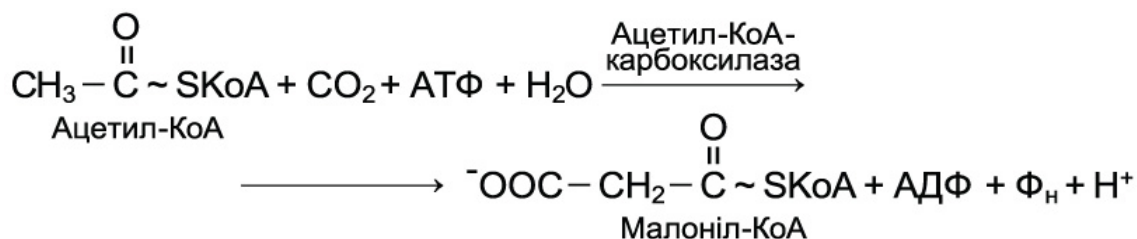
Кожний з циклів супроводжується утворення 1 NADH і 1 FADH₂, які при подальшому окисненні у дихальному ланцюгу забезпечують синтез відповідно 3 і 2 молекул АТФ (разом 5 АТФ). Продукт бета-окиснення, ацетил-КоА, далі надходить у цикл Кребса і окиснюється до СО₂ з виходом 12 АТФ. Отже, баланс повного окиснення жирної кислоти становить:

$$[(n/2-1) \times 5 + n/2 \times 12] - 1^* = \text{число моль АТФ / моль жирної кислоти}$$

* – 1 молекула АТФ використовується на активацію жирної кислоти.

При одній кількості атомів карбону енергетична цінність жирних кислот більша, ніж моносахаридів, однак окиснення жирних кислот має місце виключно за аеробних умов.

Синтез жирних кислот найбільш інтенсивно відбувається в абсорбтивний період у цитоплазмі клітин печінки і жирової тканини. – Вихідним субстратом для синтезу жирних кислот є внутрішньомітохондріальний ацетил-КоА, що утворюється, переважно, в реакції окисного декарбоксилювання пірувату. Ацетил-КоА не здатен проникати через внутрішню мітохондріальну мембрану, тому його перенесення до цитоплазми здійснюється у вигляді цитрату. В першій реакції циклу Кребса ацетил-КоА взаємодіє з оксалоацетатом з утворенням цитрату. Проте високі концентрації АТФ і NADH в мітохондріях, що характерно для абсорбтивного періоду, гальмують роботу циклу Кребса, а отже, і подальше окиснення цитрату. За цих умов цитрат виходить у цитоплазму, де розщеплюється з утворенням ацетил-КоА і оксалоацетату. Ацетил-КоА далі карбоксилюється до малоніл-КоА.



Ця реакція каталізується біотинвмісним ферментом ацетил-КоА-карбоксилазою, активність якого визначає швидкість всього шляху біосинтезу жирних кислот. Наступні реакції синтезу жирних кислот здійснює ферментативний комплекс – синтаза жирних кислот (пальмітилсинтаза), що включає всі необхідні каталітичні активності для елонгації ланцюга жирної кислоти. Процес є циклічним, кожен цикл включає 4 послідовні реакції: конденсації ацетильного і малонільного залишків з утворенням ацетоацетильного, відновлення, дегідратації, другого відновлення, – в результаті перебігу яких ланцюг жирної кислоти подовжується на два атоми карбону. Для реакцій відновлення використовується кофермент NADPH. Продуктом першого циклу є бутирильний залишок, зв'язаний з ферментом. Потім цикл повторюється і утворюється радикал жирної кислоти із 6 атомів карбону.

Утворення кінцевого продукту потребує 7 циклів елонгації, після чого вивільнюється продукт – пальмітинова кислота (C16).



NADPH надходить переважно з пентозофосфатного шляху або з реакції окисного декарбоксилювання малату в піруват. З пальмітинової кислоти у людини і тварин можуть синтезуватись жирні кислоти з довшим ланцюгом або мононенасичені. Жирні кислоти з двома подвійними зв'язками типу лінолевої кислоти і трьома подвійними зв'язками типу ліноленової кислоти для ссавців є есенціальними. Їх основним джерелом є ліпіди їжі. На основі цих жирних кислот у реакціях десатурації і нарощення ланцюга можуть утворитись інші поліненасичені жирні кислоти, зокрема попередник ейкозаноїдів – арахідонова кислота, з якої потім синтезуються простагландини, тромбосани і лейкотриєни.

Новосинтезовані жирні кислоти використовуються залежно від потреб організму або для запасання ТАГ, або для синтезу полярних мембранних ліпідів на основі гліцеролу та сфінгозину. Попередником гліцерофосфоліпідів, як і ТАГ, є фосфатидна кислота. Синтез гліцерофосфоліпідів (фосфатидилетаноламіна, фосфатидилхоліна, фосфатидилсерина, фосфатидилінозитола) відбувається через утворення активованих форм або полярних залишків, або 1,2-діацилгліцеролу у вигляді CDP-похідних.

Сфінгозин синтезується з пальмітинової кислоти і амінокислоти серин. В процесі синтезу сфінголіпідів залишок жирної кислоти приєднується до сфінгозину через аміногрупу, утворюється N-ацилсфінгозин (церамід). На основі цераміду можуть бути синтезовані сфінгомієліни, що містять фосфат і холін, або глікосфінголіпіди, що містять тільки вуглеводний компонент. Мембранні ліпіди, що синтезуються у печінці, можуть у складі ліпопротеїнів високої щільності транспортуватись до інших органів.

Обмін холестерину

Холестерин належить до похідних ізопрену і є обов'язковим компонентом біомембран у людини і тварин. Також холестерин є попередником низки біологічно активних сполук – стероїдних гормонів, жовчних кислот і вітаміну Д₃. Холестерин не розщеплюється в організмі і повільно виводиться, переважно у складі жовчних кислот. Основними місцями синтезу холестерину є печінка (близько 50 %) і тонкий кишечник (близько 15–20 %), решта утворюється у шкірі, корі надниркових залоз і статевих залозах, що використовують його для синтезу регуляторних молекул.

Пул холестерину поповнюється за рахунок синтезу *de novo* і надходження з їжею. Холестерин синтезується у цитозолі і гладенькому ендоплазматичному ретикулумі з ацетил-КоА у 4 етапи: (1) синтез гідроксиметилглутарил-КоА (ГМГ-КоА, С6) з трьох молекул ацетил-КоА і подальше його відновлення до мевалонату за участю ГМГ-КоА-редуктази, (2) активація і декарбоксилювання мевалонової кислоти до ізопентенил-пірофосфату (активованій ізопрен, С5), (3) поступова конденсація шести ізопренових одиниць з утворенням лінійної молекули сквалену (С30), (4) циклізація сквалену і модифікація ланостерину до холестерину (С27). Синтез холестерину регулюється на рівні ГМГ-КоА-редуктази через різні механізми, зокрема через фосфорилювання-дефосфорилювання ферменту, гальмування його синтезу на рівні транскрипції або індукцію деградації. Інсулін викликає збільшення, а глюкагон – зниження синтезу холестерину.

Методи визначення ліпідів і продуктів їхнього обміну

Діагностика ліпідного обміну включає аналіз ліпідного профілю (вміст загальних ліпідів, холестерину, тригліцеридів та фосфоліпідів) і вмісту ліпопротеїнів, особливо співвідношення холестерину в ліпопротеїнах високої та низької щільності. Вказані показники дозволяють виявити початкові стадії атеросклерозу, діабету, захворювань печінки, підшлункової та щитоподібної залози, ожиріння, оцінити ризик розвитку серцево-судинних захворювань.

Лабораторна робота 9.

Визначення загальних ліпідів в сироватці крові (з використанням набору реактивів)

У крові присутні в основному чотири групи ліпідів: триацилгліцероли, фосфоліпіди, холестерин та його ефіри, а також у невеликій кількості вільні (неестерифіковані) жирні кислоти. Визначення концентрації загальних ліпідів в сироватці (плазмі) крові є одним із показників ліпідного обміну і використовується в лабораторній діагностиці.

Принцип методу. Продукти кислотного гідролізу ненасичених ліпідів взаємодіють з фосфорнованіліновим реактивом з утворенням забарвленого комплексу, який має максимум поглинання при довжині хвилі 530 нм. Реакція специфічна тільки з ненасиченими ліпідами, продукти гідролізу насичених ліпідів з фосфорнованіліновим реактивом не реагують.

Матеріали і реактиви.

1. Фосфорнованіліновий реактив: суміш розчину ваніліну (10,0 ммоль/л) і концентрованої ортофосфорної кислоти (11,5 моль/л).

2. Калібрувальний розчин ліпідів (8 г/л).

3. Реагент для гідролізу – сірчана кислота з концентрацією не менше 95 %.

4. Біологічний матеріал – свіжа сироватка (плазма) крові.

Обладнання. Фотоелектроколориметр, водяна баня або водяний термостат, що здатні підтримувати температуру +100 °С, секундомір, хімічні пробірки, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 0,01 та 1 мл, штатив для пробірок, кювети з довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи.

Для визначення ліпідів їх слід попередньо гідролізувати концентрованою сірчаною кислотою. В хімічні пробірки додати реактиви за схемою, що зазначена в таблиці.

Відміряти у пробірку, мл	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Холоста проба, мл
Сироватка (плазма) крові	0,01	–	–
Калібрувальний розчин ліпідів	–	0,01	–
Реагент для гідролізу (H ₂ SO ₄)	1,0	1,0	–
Інтенсивно перемішати одразу після додавання сірчаної кислоти (Обережно! Їдка речовина!) і нагрівати впродовж 20 хв на киплячій водяній бані. Можливе забарвлення калібрувальної проби у коричневий колір. Після охолодження пробірок впродовж 3–5 хв холодною водопровідною водою, в холосту пробу додати сірчану кислоту, а потім в кожную пробірку обережно внести фосфорнованіліновий реагент.			
Реагент для гідролізу (H ₂ SO ₄)	–	–	1,0
Фосфорнованіліновий реагент	2,0	2,0	2,0
Ретельно перемішати, помістити проби в холодну воду на 15 хв. Після інкубації виміряти оптичну щільність дослідної та калібрувальної проб проти холостої при 530 нм (жовто-зелений світлофільтр) в кюветі з довжиною оптичного шляху 5 мм. Забарвлення стабільне протягом 30 хв.			

Розрахунок.

$$C_{\text{ДОСЛ}} = C_{\text{КАЛИБ}} \frac{E_{\text{ДОСЛ}}}{E_{\text{КАЛИБ}}},$$

де $C_{\text{ДОСЛ}}$ – концентрація загальних ліпідів у дослідній пробі, г/л;

$C_{\text{КАЛИБ}}$ – концентрація ліпідів у калібрувальному розчині (8 г/л);

$E_{\text{ДОСЛ}}$ і $E_{\text{КАЛИБ}}$ – оптична щільність дослідної та калібрувальної проб відповідно.

Клініко-діагностичне значення. У нормі вміст загальних ліпідів у сироватці крові людини становить 4–8 г/л. Аліментарна гіперліпемія зберігається протягом 4–6 годин після прийому їжі багатої на жири. Підвищення концентрації ліпідів у сироватці крові характерне для ряду патологічних станів, зокрема ожиріння, цукрового діабету, атеросклерозу,

ішемічної хвороби серця, гострого панкреатиту, голодування. Зниження концентрації загальних ліпідів у крові (гіполіпемія) виявляється при дистрофії, гіпертиреозі, хронічних ентеритах.

У лабораторному журналі записати результати визначення вмісту загальних ліпідів в сироватці крові, порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

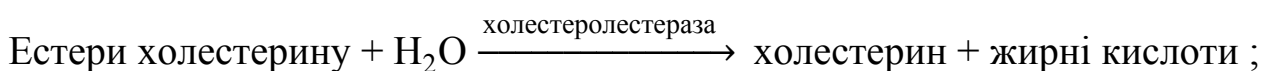
Лабораторна робота 10.

Визначення вмісту загального холестерину в сироватці крові ферментативним методом (з використанням набору реактивів)

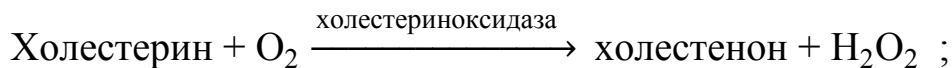
Визначення в крові концентрації холестерину має важливе значення для діагностики захворювань, що пов'язані з порушенням обміну ліпідів. Одним з таких захворювань є атеросклероз, що супроводжується формуванням у стінках судин «бляшок», які, переважно, складаються із холестерину та його естерів. Утворені «бляшки» звужують просвіт судин і порушують нормальний кровоток в органах і тканинах. Атеросклероз призводить до розвитку таких захворювань, як інфаркт міокарда та інсульту. Однією з причин розвитку атеросклерозу є гіперхолестеринемія. Для профілактики і лікування атеросклерозу застосовують інгібітори біосинтезу холестерину.

Принцип методу. Метод ґрунтується на використанні спряжених ферментативних реакцій, що каталізуються:

1) холестеролестеразою, яка здійснює гідроліз естерів холестерину до вільного холестерину і жирних кислот:



2) холестеролоксидазою, що каталізує перетворення холестерину в холестерон з утворенням перекису водню:



3) пероксидазою, що каталізує в присутності фенолу окиснення перекисом водню 4-амінофенозону з утворенням *орто*-хіноніміну, продукту рожево-червоного кольору:



Отже, концентрація забарвленого продукту пропорційна концентрації холестерину. Інтенсивність забарвлення визначається фотометричним методом.

Матеріали і реактиви.

1. Ензимний реагент, що містить суміш ферментів і субстратів: холестеролестераза – 150 Од/л, холестеролоксидаза – 100 Од/л, пероксидаза – 5 КОд/л, 4-амінофенозон – 0,3 ммоль/л, фенол – 30 ммоль/л; трис – 30 ммоль/л, стабілізатори, активатори.

2. Калібрувальний розчин (стандарт) холестерину – 5,17 ммоль/л.

3. Біологічний матеріал – сироватка (плазма) крові.

Обладнання. Фотоелектроколориметр, водяна баня або термостат, що підтримує температуру +37 °С, секундомір, хімічні пробірки, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 0,01 та 1 мл, штатив для пробірок, кювети з довжиною оптичного шляху 5 мм або 10 мм.

Хід роботи.

Аналіз провести у відповідності до схеми, що представлена в таблиці.

Відміряти у пробірку, мл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Ензимний реагент	1,00	1,00	1,00
Сироватка (плазма) крові	0,01	–	–
Калібрувальний розчин холестерину	–	0,01	–
Дистильована вода	–	–	0,01

Вміст кожної пробірки ретельно перемішати, інкубувати 20 хв при температурі +20–+25 °С або 10 хв у термостаті при +37 °С. Виміряти оптичну щільність калібрувальної ($E_{КАЛИБР}$) і дослідної ($E_{ДОСЛ}$) проб проти холостої при 500–550 нм (жовто-зелений світлофільтр) у кюветі з довжиною оптичного шляху 5 мм або 10 мм. Забарвлення стабільне протягом 60 хв після закінчення інкубації за умов захищеності від прямого сонячного світла.

Розрахунок.

Концентрація холестерину в сироватці крові розраховується за формулою:

$$C_{ДОСЛ} = C_{КАЛИБ} \frac{E_{ДОСЛ}}{E_{КАЛИБ}},$$

де $C_{ДОСЛ}$ – концентрація холестерину в дослідній пробі, ммоль/л;

$C_{КАЛИБ}$ – концентрація холестерину в калібрувальному розчині, що дорівнює 5,17 ммоль/л;

$E_{ДОСЛ}$ і $E_{КАЛИБ}$ – оптична щільність дослідної та калібрувальної проб відповідно.

Концентрація холестерину в сироватці крові в нормі (ммоль/л).

Вік, років	Чоловіки	Жінки
20–29	3,21–6,32	3,16–5,75
30–39	3,57–6,99	3,37–6,27
40–49	3,91–7,15	3,81–6,86
> 50	4,09–7,10	4,20–7,85

Клініко-діагностичне значення. Підвищення концентрації холестерину в сироватці крові (гіперхолестеринемія) спостерігається при деяких типах спадкових порушень обміну ліпопротеїнів, при низці захворювань ЦНС, а також при захворюваннях печінки та нирок, при емоційному стресі, вагітності, гіпотиреозі, діабеті. Гіперхолестеринемія призводить до раннього розвитку атеросклерозу.

Зниження рівня холестерину в крові (гіпохолестеринемія) може спостерігатися при гіпертиреозі, голодуванні, туберкульозі, анемії, гострих гепатитах, колітах різної етіології, ряді інфекційних захворювань. Гіпохолестеринемія часто зумовлена різними порушеннями процесів синтезу ендогенного або засвоєння екзогенного холестерину.

У лабораторному журналі записати результати визначення вмісту холестерину в сироватці крові, порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

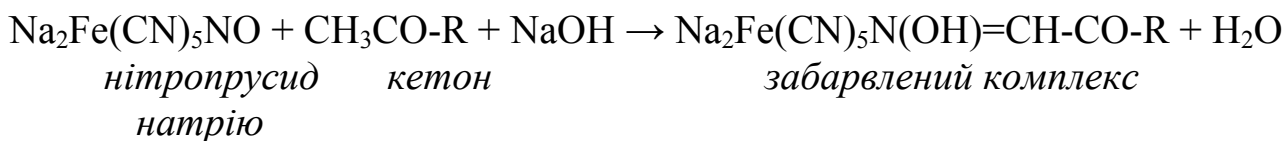
Лабораторна робота 11. **Проба на кетонові тіла**

У постабсорбтивний період або при голодуванні жирні кислоти використовуються як джерело енергії багатьма тканинами (скелетними м'язами, серцем, печінкою та ін.). В умовах інтенсивного окиснення жирних кислот у мітохондріях печінки утворюється велика кількість ацетил-КоА. Однак окиснення ацетил-КоА в циклі Кребса відбувається дуже повільно через низьку концентрацію оксалоацетату, що утворюється з пірувату та амінокислот. Дефіцит оксалоацетату обумовлено використанням його як субстрату для гліюконеогенезу. За цих умов із ацетил-КоА, що накопичується в мітохондріях печінки, синтезуються ацетоацетат і β -гідроксибутират. Частина ацетоацетату може спонтанно декарбоксилюватися з утворенням ацетону. Ці три сполуки (ацетоацетат, β -гідроксибутират і ацетон) належать до кетонових тіл.

Ацетоацетат і β -гідроксибутират дифундують у кров і переносяться до різних тканин (мозку, скелетних м'язів, серця, нирок та ін.), як джерело ацетил-КоА для подальшого окиснення, знижуючи потребу цих тканин у глюкозі. У печінці кетонові тіла не використовуються, оскільки відсутні ферменти для їх метаболізму. У нормі в печінці утворюється невелика кількість кетонових тіл, але їх синтез суттєво зростає при таких станах, як голодування, цукровий діабет, низьковуглеводна дієта, важке фізичне навантаження тощо.

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності ацетону і ацетооцтової кислоти в лужному середовищі утворювати з нітропрусидом натрію комплекси помаранчево-червоного кольору, які перетворюються

при підкисленні розчину в сполуки вишнево-червоного кольору. Проба більш чутлива до ацетооцтової кислоти, ніж до ацетону, з β -гідроксибутиратом реакція не відбувається.



Матеріали і реактиви.

1. Нітропрусид натрію – 10 % розчин (свіжоприготований).
2. NaOH – 10 % розчин.
3. CH_3COOH концентрована (крижана).
4. Біологічний матеріал – сеча.

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив для пробірок, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1–2 мл, крапельниці.

Хід роботи.

У пробірку помістити 2–3 мл сечі, що містить кетонові тіла, додати кілька крапель свіжоприготованого розчину нітропрусиду натрію, потім кілька крапель 10 % розчину NaOH і 0,5 мл крижаної оцтової кислоти. Вміст пробірки набуває вишнево-червоного забарвлення, що свідчить про наявність ацетоацетату і ацетону. Якщо ацетон відсутній, то при підкисленні колір розчину змінюється на жовтий. Результати спостереження записати у лабораторний журнал, зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. У нормі вміст кетонових тіл у крові складає менше 10 мг/л, а з сечею за добу виділяється 20–50 мг кетонових тіл. Збільшення кількості кетонових тіл у крові (кетонемія) і сечі (кетонурія) спостерігається при некомпенсованому цукровому діабеті, при тиреотоксикозі, гострому панкреатиті, при гіперпродукції гормону росту і глюкокортикоїдів, при обширних механічних м'язових травмах, важких інтоксикаціях, голодуванні.

Контрольні питання з теми 2.2

1. Як відбувається гідроліз харчових ліпідів (тригліцеридів, фосфоліпідів, стеридів) і всмоктування продуктів їхнього гідролізу у шлунково-кишковому тракті? Яка роль жовчі в цих процесах?
2. У якому вигляді ліпіди транспортуються в кров'яному руслі? Як екзогенні ліпіди надходять до крові і до яких тканин переносяться у подальшому?
3. Який загальний принцип будови ліпопротеїнів сироватки крові? На чому ґрунтується класифікація ліпопротеїнів крові? Які існують відмінності між ліпопротеїнами різних класів за такими параметрами, як хімічний склад, місце синтезу, біологічні функції?

4. У якому компартменті клітини відбувається синтез жирних кислот? У який спосіб ацетильні групи із мітохондрій потрапляють до цього компартменту? Який фермент каталізує ключову реакцію біосинтезу жирних кислот? Які реакції каталізує синтаза жирних кислот?

5. В яких органах і тканинах найбільш інтенсивно відбувається синтез жирів (тригліцеридів)? Які метаболіти використовуються для синтезу жирів? Які існують джерела цих метаболітів?

6. Який метаболіт служить субстратом для синтезу холестерину? На які етапи можна розділити шлях синтезу холестерину? Яка реакція є ключовою і який фермент каталізує цю реакцію? Які функції виконує холестерин?

7. У якому компартменті клітини відбувається β -окиснення жирних кислот і у який спосіб вищі жирні кислоти потрапляють до цього компартменту? Який фермент регулює швидкість шляху β -окиснення жирних кислот? Які основні етапи цього процесу? Як розрахувати енергетичний баланс β -окиснення жирних кислот?

8. Які ліпіди присутні в сироватці крові? На чому ґрунтується метод визначення загальних ліпідів у сироватці крові за допомогою фосфорнованілінового реактиву? Які чинники впливають на вміст загальних ліпідів в сироватці крові?

9. На яких реакціях ґрунтується ферментативний метод визначення холестерину в сироватці крові? Яке діагностичне значення має визначення рівня холестерину в крові?

10. Що собою являють кетоніві тіла? Які функції виконують? За допомогою якої якісної реакції їх можна виявити? При яких захворюваннях вони накопичуються в організмі людини?

Тестові завдання з теми 2.2

1. У комплексі з якою сполукою вищі жирні кислоти транспортуються із цитозолу до матриксу мітохондрій, де локалізовані ферменти бета-окиснення?

- А. Малат.
- Б. Оксалоацетат.
- В. Карнітин.
- Г. Альбуміни.
- Д. Глобуліни.

2. Ресинтезовані в епітеліальних клітинах кишечника триацилгліцероли транспортуються в кров у складі такого типу комплексу:

- А. Ліпопротеїни дуже низької щільності.
- Б. Ліпопротеїни низької щільності.
- В. Комплекси з сироватковим альбуміном.
- Г. Хіломікрони.
- Д. Ліпопротеїни високої щільності.

3. Скільки молекул ацетил-КоА утворюється в результаті повного бета-окиснення лауринової кислоти (C12) ?

- А. 2.

- Б. 3.
- В. 4.
- Г. 6.
- Д. 12.

4. Енергетичний баланс повного бета-окиснення капронової кислоти (C6) складає

- А. 12.
- Б. 24.
- В. 36.
- Г. 45.
- Д. 50.

5. Який фермент регулює швидкість перебігу шляху біосинтезу жирних кислот?

- А. АПБ-ацетилтрансфераза.
- Б. АПБ-малонілтрансфераза.
- В. Синтаза жирних кислот.
- Г. Ацетил-КоА-карбоксилаза.
- Д. Цитратліаза.

6. Перша стадія біосинтезу холестерину закінчується утворенням такого метаболіту:

- А. β -Окси- β -метилглутарил - КоА.
- Б. Мевалонату.
- В. Малонату.
- Г. Сквалену.
- Д. Ізопентенил-пірофосфату.

7. Естерні зв'язки в молекулах триацилгліцеролів (жирів їжі) піддаються ферментативному гідролізу в кишечнику за участю:

- А. Ацетилхолінестерази.
- Б. Неспецифічної естерази.
- В. Тригліцеридліпази, дигліцеридліпази, моногліцеридліпази.
- Г. Панкреатичної ліпази.
- Д. Фосфоліпаз A1, A2, C, D.

8. Як вихідний субстрат для синтезу жирних кислот в цитоплазмі використовується ацетил-КоА, що утворюється в мітохондріях. У вигляді якої сполуки ацетил-КоА транспортується в цитоплазму?

- А. Малату.
- Б. Цитрату.
- В. Карнітину.
- Г. Глутамату.
- Д. Пірувату.

9. Яка сполука є вихідним субстратом для синтезу холестерину?

- А. Ацетил-КоА.
- Б. Малоніл-КоА.
- В. Сукциніл-КоА.
- Г. Фосфоенолпіруват.
- Д. Креатинфосфат.

10. У реакціях синтезу вищих жирних кислот як донор відновних еквівалентів використовується:

- А. NADH.
- Б. NADPH.
- В. КоQH₂.
- Г. FADH₂.
- Д. FMNH₂.

Тема 2.3. Обмін білків та амінокислот

Білки входять до складу всіх основних структурних компонентів клітин і тканин, виконують безліч важливих біологічних функцій: каталітичну, регуляторну, скорочувальну, захисну, транспортну та інші. У живих організмах білки мають певний термін життя і постійно оновлюються: «старі» модифіковані молекули розщеплюються, нові поліпептидні ланцюги синтезуються. Частина амінокислот, що утворюються при розщепленні білків, використовується для синтезу нових білків, інша частина – для синтезу важливих азотовмісних сполук (гормонів, нейромедіаторів, нуклеотидів, коферментів тощо).

Повноцінні білки їжі, на відміну від *неповноцінних*, містять усі 10 *незамінних амінокислот*, тобто тих, які не синтезуються в організмі людини і тварин. До цієї групи амінокислот належать лізин, аргінін, гістидин, валін, лейцин, ізолейцин, треонін, метіонін, фенілаланін, триптофан. Карбонові скелети *замінних амінокислот* синтезуються з проміжних продуктів окиснення глюкози або ЦТК, а донором аміногрупи стають інші амінокислоти в реакціях трансамінування. Більшість білків тварин містять повний набір незамінних амінокислот в оптимальному співвідношенні, тоді як у багатьох рослинних білків відсутня одна або декілька незамінних амінокислот зазвичай лізин, метіонін, триптофан.

Отже, джерелом вільних амінокислот в організмі є амінокислоти, що утворюються в результаті гідролізу білків їжі та власних білків тканин, а також синтез замінних амінокислот.

Перетравлення білків у ШКТ і транспорт амінокислот

Білки їжі піддаються у травному тракті людини і тварин гідролітичному розщепленню до амінокислот під дією ферментів, пептидгідролаз (протеаз). Перетравлення білків починається у шлунку під дією шлункового соку, основними компонентами якого є соляна кислота і пепсин. Пепсин належить до ендопептидаз з широкою субстратною специфічністю. Під дією пепсину утворюється суміш поліпептидів, що переміщується до кишечника, де піддається подальшому розщепленню за участю ферментів підшлункової залози і клітин кишечника.

Спільна дія панкреатичних протеаз (трипсину, хімотрипсину, еластази, карбоксипептидаз) спричинює глибокий гідроліз білків до пептидів. Завершується гідроліз пептидів до вільних амінокислот під дією амінопептидаз, дипептидаз і трипептидаз, що секретуються клітинами тонкого кишечника.

Перенесення вільних L-амінокислот через мембрани всередину ентероцитів здійснюється за механізмом вторинного активного транспорту (Na^+ -залежного симпорту). У кров амінокислоти надходять за механізмом полегшеної дифузії за участю специфічних транслоказ.

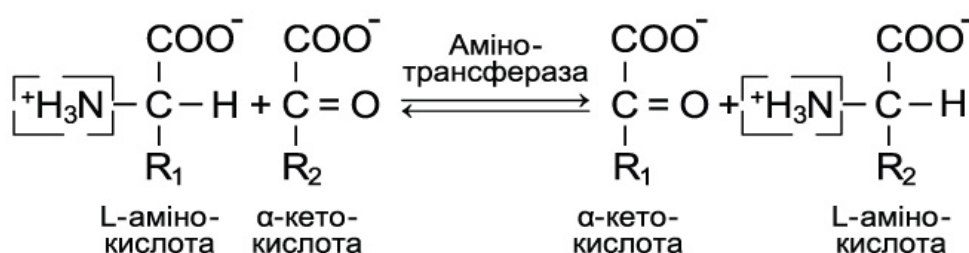
Після всмоктування в тонкому кишечнику амінокислоти надходять у кров ворітної вени і далі в печінку. Частина амінокислот надходить у кров через лімфатичну систему і використовується різними органами і тканинами організму.

Шляхи обміну амінокислот у тканинах

Найважливіші реакції обміну амінокислот у тканинах – це реакції трансамінування, дезамінування, декарбоксилювання і окисного розщеплення карбонових скелетів амінокислот.

Катаболізм більшості амінокислот починається з відщеплення α -аміногрупи, яку вони втрачають під час реакцій дезамінування або трансамінування.

Трансамінування – це реакція переносу аміногрупи від амінокислоти на α -кетокислоту (акцептор аміногрупи). В результаті утворюється α -кетоаналог вихідної амінокислоти і нова амінокислота.

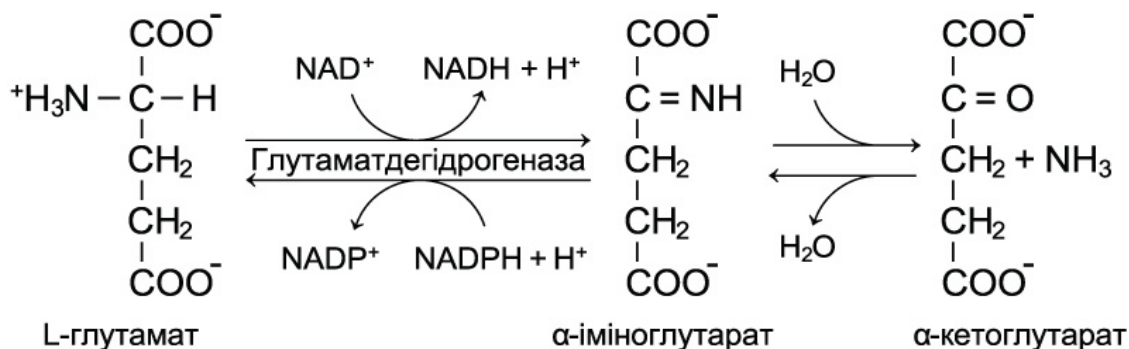


Реакції трансамінування є оборотними. Каталізують ці реакції аміно-трансферази, коферментом яких є піридоксальфосфат. Майже всі амінокислоти піддаються трансамінуванню, за винятком лізину, треоніну і проліну. Основний акцептор аміногруп в реакціях трансамінування – альфа-кетоглутарат, тобто α -аміногрупи від різних амінокислот збираються у формі однієї амінокислоти – глутамінової. Біологічна роль трансамінування полягає в тому, що по-перше, цей процес, забезпечує синтез необхідних для організму замінних амінокислот з відповідних кетокислот; по-друге, трансамінування – це початковий етап катаболізму більшості амінокислот, в ході якого ці сполуки втрачають аміногрупу. Остання потім спрямовується на синтез кінцевих продуктів обміну азоту (у людини це сечовина), а кетокислоти, що утворюються, окиснюються в ЦТК або залучаються до синтезу глюкози і кетонових тіл.

Дезамінування – це реакція відщеплення від амінокислоти аміногрупи у формі вільного аміаку з утворенням безазотистого залишку амінокислоти. Відомо чотири типи дезамінування амінокислот (відновне,

окисне, гідролітичне, внутрішньомолекулярне), але в організмі вищих тварин основну роль в обміні амінокислот відіграє окисне дезамінування.

В мітохондріях печінки, а також низки інших органів тварин з найбільшою інтенсивністю відбувається окисне дезамінування глютамінової кислоти. Реакція каталізується NAD-залежною глютамаатдегідрогеназою з утворенням аміаку, α -кетокислоти і $\text{NADH} + \text{H}^+$.



Окисне дезамінування глютаму – це оборотна реакція, і за певних умов її перебіг може бути спрямований у бік синтезу глютаму. У зворотній реакції глютамаатдегідрогеназа використовує як кофермент NADPH . Окисне дезамінування амінокислот каталізує ще одна група ферментів – флавінзалежні оксидази L- і D-амінокислот, але внесок цих ферментів в катаболізм амінокислот за фізіологічних умов незначний.

На відміну від глютаму більшість амінокислот дезамінується непрямим шляхом, перебіг якого відбувається у два етапи: спочатку аміногрупи амінокислот передаються на α -кетоглютарат в реакціях трансамінування з утворенням глютамінової кислоти, а потім остання дезамінується під дією глютамаатдегідрогенази. Через те, що обидва етапи оборотні, в цілому непряме дезамінування теж є оборотним, отже, може забезпечувати як катаболізм амінокислот, так і синтез замінних амінокислот.

Перетворення карбонового скелету амінокислот. Утворені в результаті прямого та непрямого дезамінування амінокислот безазотисті карбонові скелети у вигляді α -кетокислот можуть піддаватися подальшому розщепленню з утворенням метаболітів ЦТК, які окиснюються до CO_2 та H_2O .

Шляхів включення амінокислот до ЦТК кілька: через піруват, ацетил-КоА, оксалоацетат, фумарат, сукциніл-КоА, α -кетоглютарат. Амінокислоти, карбонові скелети яких перетворюються у піруват або проміжні продукти ЦТК (α -кетоглютарат, сукциніл-КоА, фумарат, оксалоацетат), можуть використовуватись для синтезу глюкози – так звані *глікогенні* амінокислоти.

Карбонові скелети лізину і лейцину (*кетогенні* амінокислоти) перетворюються на ацетил-КоА і можуть залучатися у синтез кетонів тіл. Фенілаланін, тирозин, триптофан, ізолейцин є *гліко-кетогенними* амінокислотами – при розщепленні дають одразу два продукти: ацетил-КоА і один із проміжних метаболітів ЦТК.

Декарбоксилювання амінокислот. Ряд амінокислот та їхніх похідних у процесах проміжного обміну можуть залучатися до реакцій декарбоксилювання, що супроводжуються відщепленням карбоксильної групи у вигляді CO_2 та утворенням біологічно активних амінів з широким спектром дії:



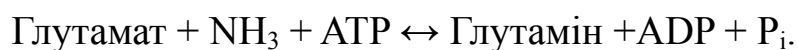
Наприклад, при декарбоксилюванні гістидину утворюється гістамін, глутамату – γ -аміномасляна кислота, 3,4-діоксифенілаланіну – дофамін. Реакції декарбоксилювання незворотні та каталізуються специфічними декарбоксилазами амінокислот. Більшість декарбоксилаз використовують як простетичну групу піридоксальфосфат.

Знешкодження аміаку. Біосинтез сечовини

У живих організмів внаслідок дезамінування нітрогеновмісних сполук – амінокислот, амідів, біогенних амінів, нуклеотидів – утворюється аміак, який є високотоксичною сполукою для клітин тварин. В ході еволюції сформувалися такі шляхи зв'язування (знешкодження) аміаку з утворенням нетоксичних речовин:

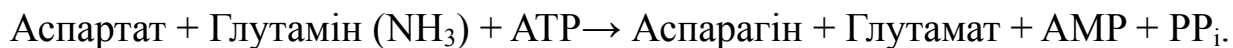
1. Синтез амідів глутамінової і аспарагінової кислот.

А) Синтез глутаміну під дією глутамінсинтетази відбувається у всіх тканинах ссавців:



Глутамін є нейтральною сполукою, яка за механізмом полегшеної дифузії транспортується через клітинні мембрани із периферичних тканин (мозок, м'язи, сітківка та інші) до крові.

Б) Синтез аспарагіну, здебільшого, каталізується глутамінзалежною аспарагінсинтетазою, хоча є і аміакзалежна аспарагінсинтетаза:



У тварин внесок цієї реакції у знешкодження аміаку значно менший, ніж шляху синтезу глутаміну.

2. Відновне амінування α -кетоглутарату під дією глутаматдегідрогенази (зворотна реакція окисного дезамінування глутамату):

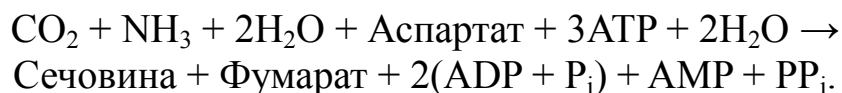


Цей шлях знешкодження аміаку використовується рідко, проте спряження глутаматдегідрогеназної реакції з глутамінсинтетазною у тканинах мозку дозволяє зв'язати одразу дві молекули аміаку:



У м'язах і кишечнику у реакціях трансамінування глутамату та інших амінокислот з піруватом утворюється аланін, який разом з глутаміном є ще однією транспортною формою аміаку в організмі тварин.

Основним шляхом знешкодження аміаку в організмі ссавців, а також низки інших тварин є синтез сечовини в печінці. Сечовина утворюється в ході 5 послідовних реакцій, які організовані в так званий орнітиновий цикл. У мітохондріях гепатоцитів у першій реакції аміак конденсується з діоксидом вуглецю за участю двох молекул АТФ з утворенням макроергічної сполуки – карбамоїлфосфату. Реакцію каталізує регуляторний фермент циклу – *карбамоїлфосфатсинтетаза I*. У другій реакції карбамоїльна група переноситься на амінокислоту орнітин з утворенням цитруліну. Останній транспортується в цитозоль, де конденсується з аспарагіновою кислотою (донор другого атому азоту сечовини) і утворюється аргініносукцинат, який в наступній реакції розщеплюється на аргінін і фумарат. В останній реакції під дією ферменту аргінази відбувається гідроліз аргініну на сечовину і орнітин. Орнітин може включатися в новий оберт циклу синтезу сечовини. Сечовина надходить у кров і через нирки виділяється з сечею. Сумарне рівняння синтезу сечовини:



Отже, у складі сечовини із організму виводиться два атоми азоту у вигляді аміногруп і одна молекула CO_2 . Крім видалення із організму токсичних продуктів метаболізму (NH_3 і CO_2) орнітиновий цикл виконує ще одну функцію – синтез аргініну і поповнення фонду цієї амінокислоти в організмі.

Частина аміаку у формі глутаміну із крові транспортується у нирки, де під дією глутамінази глутамін розщеплюється з вивільненням аміаку. Останній використовується для нейтралізації кислих продуктів і виводиться із сечею у вигляді амонійних солей.

Методи кількісного визначення білків та продуктів їхнього обміну

Одним із важливих показників білкового обміну є *вміст білка* в тканинах і біологічних рідинах. Кількісне визначення білка у різних біологічних зразках використовується і для наукових досліджень, і для клініко-лабораторної діагностики.

Для визначення вмісту білка використовують різні *фізичні та хімічні методи*. До фізичних методів належать спектрофотометричний (заснований на здатності ароматичних амінокислот поглинати в ультрафіолетовій області спектра з максимумом при 280 нм), рефрактометричний (за показником

заломлення білкових розчинів), гравіметричний (фракцію білків, що досліджується, осаджують, висушують до постійної маси і зважують на аналітичних вагах) тощо. До хімічних методів належать азотометричні, що ґрунтуються на визначенні кількості білкового азоту (класичний метод К'ельдаля та його різні модифікації). Найпоширенішими з хімічних методів є колориметричні (біуретовий метод, метод Лоурі та їхні модифікації), що засновані на визначенні вмісту білка за інтенсивністю забарвлення, яке розвивається після взаємодії білків з певними реактивами.

Основну масу як ендогенного азоту, так і азоту їжі складають білки. У зв'язку з цим як критерій стану обміну білків в організмі використовують *азотистий баланс* – різниця між кількістю азоту, що надійшов з їжею, і кількістю азоту, виведеного нирками у формі сечовини й амонійних солей. *Позитивний* азотистий баланс (азоту надходить більше, ніж виводиться з організму) характерний для зростаючого організму і при вагітності. *Негативний* (виводиться азоту більше, ніж надходить) спостерігається при голодуванні, старінні, білковій недостатності, недостатності незамінних амінокислот, деяких важких захворюваннях. При повноцінному харчуванні у здорової людини встановлюється азотиста рівновага.

Низькомолекулярні азотисті речовини або небілкові азотисті компоненти крові складаються, в основному, з кінцевих продуктів обміну білків і нуклеїнових кислот. Ці речовини залишаються в сироватці крові після осадження білків і складають залишковий (небілковий) азот. Основний внесок в небілковий азот крові вносять сечовина (~ 50 %), а також вільні амінокислоти (~ 25 %), креатин і креатинін (~ 7,5 %), аміак та індикан (~ 0,5 %), нуклеотиди, білірубін та інші азотисті сполуки. У загальний азот сечі включають суму всіх азотовмісних речовин: сечовини (80–90 %), амонійних солей (4–6 %), креатиніну (2–7%), сечової кислоти (1 %), а також індикану, гіпурової кислоти і вільних амінокислот. Дослідження вмісту небілкового азоту сироватки крові і сечі, а також співвідношення білкового і небілкового азоту в крові дозволяють судити про обмін білків в організмі та окремих тканинах, про баланс процесів біосинтезу і деградації білка.

Лабораторна робота 12.

Метод визначення білка з біуретовим реактивом (з використанням набору реактивів)

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності пептидних груп білків і пептидів, які мають щонайменше три пептидні зв'язки, утворювати в лужному середовищі з сірчаною кислотою міддю комплекси, що забарвлені в синьо-фіолетовий колір. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна вмісту білка в пробі.

Матеріали і реактиви.

1. Стандартний розчин альбуміну (100 г/л). Розчин зберігати при температурі від +2 °С до +8 °С.

2. Біуретовий реагент (концентрований розчин) – містить сульфат міді (15 г/л), гідроокис натрію (40 г/л), калію натрію тартрат (45 г/л), йодид калію (25 г/л). Вміст флакону з концентрованим реагентом перенести в мірну колбу об'ємом 500 мл і довести до мітки дистильованою водою. Розчин зберігати в поліетиленовій ємності в темному місці при температурі від +2 °С до +8 °С

3. Біологічний матеріал – сироватка (плазма) крові.

4. Фізіологічний розчин – 0,9% розчин NaCl.

Обладнання. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр, секундомір, мірна колба на 500 мл, хімічні пробірки, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори змінного об'єму 0,01–0,1 мл та 2 мл, штатив для пробірок, кювети з довжиною оптичного шляху 5 мм або 10 мм.

Хід роботи.

Аналіз провести у відповідності до схеми, що представлена в таблиці.

Відміряти у пробірку, мл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Сироватка (плазма) крові	0,04	–	–
Стандартний розчин альбуміну	–	0,04	–
Фізіологічний розчин	–	–	0,04
Біуретовий реактив	2,00	2,00	2,00

Вміст кожної пробірки ретельно перемішати і витримати при температурі +18–+25 °С протягом 30 хв. Виміряти оптичну щільність калібрувальної ($E_{КАЛИБР}$) і дослідної ($E_{ДОСЛ}$) проб проти холостої при 540–560 нм (зелений світлофільтр) у кюветі з довжиною оптичного шляху 5 мм або 10 мм. Забарвлення стабільне протягом 60 хв.

Розрахунок.

Концентрація білка в сироватці крові розраховується за формулою:

$$C_{ДОСЛ} = C_{КАЛИБ} \frac{E_{ДОСЛ}}{E_{КАЛИБ}},$$

де $C_{ДОСЛ}$ – концентрація білка в дослідній пробі, г/л;

$C_{КАЛИБ}$ – концентрація білка в стандартному розчині, 100 г/л;

$E_{ДОСЛ}$ і $E_{КАЛИБ}$ – оптична щільність дослідної та калібрувальної проб відповідно.

Кількість білка в пробі точніше визначається за допомогою калібрувального графіка, що відображає залежність між концентрацією білка і оптичною щільністю розчину. Для побудови калібрувального графіка із

стандартного розчину альбуміну (100 г/л) методом розведення готують робочі розчини з відомими концентраціями білка за схемою, що зазначена в таблиці.

№ пробірки	Стандартний розчин білка (мл)	Фізіологічний розчин (мл)	Вміст білка в робочому розчині (г/л)	Оптична щільність робочого розчину
1	0,1	0,4	$0,2 \cdot C_{\text{СТАНД}}$	
2	0,2	0,3	$0,4 \cdot C_{\text{СТАНД}}$	
3	0,3	0,2	$0,6 \cdot C_{\text{СТАНД}}$	
4	0,4	0,1	$0,8 \cdot C_{\text{СТАНД}}$	
5	0,5	—	$1,0 \cdot C_{\text{СТАНД}}$	

$C_{\text{СТАНД}}$ – концентрація білка в стандартному розчині.

З кожного робочого розчину відібрати по 0,04 мл і обробити так само, як дослідну пробу. Через 30 хв виміряти оптичну щільність отриманих розчинів проти холостої проби (замість розчину білка містить відповідний об'єм фізіологічного розчину). Побудувати калібрувальний графік у системі координат, де по осі абсцис – величини концентрацій білка у робочих розчинах, по осі ординат – відповідні значення оптичної щільності робочих розчинів. Провести калібрувальну пряму як лінію тренда між значеннями, що отримані для робочих розчинів. Для визначення концентрації білка в дослідній пробі потрібно відкласти по осі ординат значення оптичної щільності дослідної проби (y) і провести горизонтальну пряму до перетину калібрувального графіку, далі через цю точку перетину провести вертикальну пряму до осі абсцис, де буде значення концентрації білка (x). Приклад калібрувального графіка і визначення за ним концентрації білка показані на рис. 5.

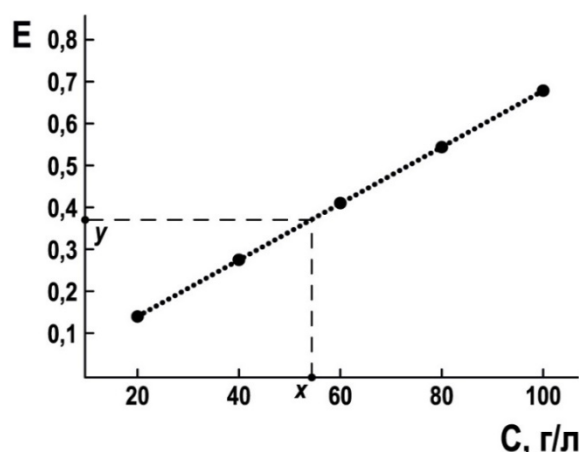


Рис. 5. Калібрувальний графік для визначення концентрації білка

Чутливість цього методу дозволяє визначати білок в діапазоні концентрацій від 5 до 100 г/л. При вищій концентрації білка в сироватці крові зразок необхідно розвести фізіологічним розчином і при розрахунках отриманий результат помножити на коефіцієнт розведення.

У лабораторному журналі записати розрахунок визначення вмісту білка у біологічному матеріалі, використовуючи метод порівняння оптичної щільності стандартного і дослідного розчину. Отриманий результат порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

Лабораторна робота 13.

Визначення кількості білка за методом Лоурі

Принцип методу. Метод Лоурі ґрунтується на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот (тирозину, триптофану, фенілаланіну) з реактивом Фоліна в поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки. Максимум поглинання забарвлених продуктів складає 750 нм. Висока чутливість цього методу дозволяє визначати 10–100 мкг білка в пробі. Однак у порівнянні з методами, що засновані на біуретовій реакції, метод Лоурі менш специфічний, оскільки інтенсивність забарвлення залежить від амінокислотного складу білка, а на розвиток забарвлення впливає багато речовин (компоненти буферних систем, цукри, детергенти, відновники тощо).

Матеріали і реактиви.

1. Реактив В: готується змішуванням у співвідношенні 50 : 1 за об'ємом реактиву А (2 % розчин Na_2CO_3 у 0,1 М розчині NaOH) і реактиву Б (1 % розчин $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ змішується з 2 % розчином сегнетової солі 1 : 1 за об'ємом). Реактив готується перед визначенням концентрації білка.

2. Реактив Фоліна – 1н розчин (містить солі фосфорновольфрамової і фосфорномолібденової кислот).

3. ТХО – 7 % розчин.

4. NaOH – 0,1 М розчин.

5. Стандартний розчин білка, що містить 2 мг сироваткового альбуміну в 1 мл.

6. Біологічний матеріал – сироватка (плазма) крові.

Обладнання. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр, настільна центрифуга (від 1000 об/хв до 3000 об/хв), секундомір, мірний циліндр на 50 мл, центрифужні і хімічні пробірки, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори змінного об'єму 0,01–0,1 мл, 1, 2 і 10 мл, штатив для пробірок, кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи.

У центрифужну пробірку внести 0,1 мл сироватки крові і додати 1,9 мл дистильованої води (розведення у 20 разів), добре перемішати. В іншу центрифужну пробірку відібрати із першої 0,1 мл розведеної сироватки, додати 0,4 мл 7 % розчину ТХО, перемішати, витримати при кімнатній температурі 5 хв. Потім суміш центрифугувати при 1500 об/хв у настільній центрифугі протягом 10 хв. Надосадову рідину видалити, а до осаду додати 0,1 мл 0,1 М NaOH . За допомогою скляної палички вміст пробірки ретельно перемішати до повного розчинення білкового осаду, додати 9,0 мл реактиву В, знову перемішати і витримати 10 хв при кімнатній температурі. Далі до проби (дослідна) додати 0,9 мл 1 н реактиву Фоліна, перемішати. Холосту пробу приготувати шляхом змішування 9,1 мл реактиву В і 0,9 мл 1 н реак-

тиву Фоліна. Після цього залишити дослідну і холосту проби при кімнатній температурі на 30 хв. Потім виміряти оптичну щільність дослідної проби проти холостої при 750 нм (червоний світлофільтр) у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Кількість білка в пробі визначити за допомогою калібрувального графіка.

Для побудови калібрувального графіка з стандартного розчину (водний розчин кристалічного альбуміну, що містить 2 мг альбуміну в 1 мл) методом розведення приготувати робочі розчини з відомими концентраціями білка за схемою, що зазначена в таблиці.

№ пробірки	Стандартний розчин білка (мл)	Розчин 0,1 М NaOH (мл)	Вміст білка у робочому розчині (мг/мл)
1	0,1	0,9	0,2
2	0,2	0,8	0,4
3	0,3	0,7	0,6
4	0,4	0,6	0,8
5	0,5	0,5	1,0

З кожного отриманого робочого розчину відібрати по 0,1 мл і обробити так само, як дослідну пробу. Виміряти оптичну щільність отриманих розчинів, внести значення оптичної щільності в таблицю і побудувати калібрувальний графік.

Показники	№ пробірки				
	1	2	3	4	5
Вміст білка в пробі (мг)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
Оптична щільність					

За графіком визначити кількість білка в дослідній пробі (приклад розрахунку за допомогою калібрувального графіка наведено в лабораторній роботі № 12) і перерахувати на 1 мл сироватки з урахуванням розведення.

Розрахунок.

$$C_{\text{ДОСЛ}} = C_{\text{КАЛИБ}} K_1 K_2 ,$$

де $C_{\text{КАЛИБ}}$ – вміст білка в 0,1 мл розведеної в 20 разів сироватки крові, визначений за калібрувальним графіком;

K_1 – коефіцієнт розведення сироватки (20);

K_2 – коефіцієнт перерахунку на 1 л сироватки крові (10000).

Клініко-діагностичне значення. У нормі кількість білка в сироватці крові людини становить 65–85 г/л. Зміни концентрації загального білка в сироватці крові можуть мати абсолютний і відносний характер. Останній зазвичай спостерігається при зміні об'єму крові (плазми). Найчастішими причинами розвитку *гіпопротеїнемії* є такі:

- недостатнє надходження харчових білків, що пов'язано з голодуванням, низькобілковою дієтою, порушенням функції шлунково-кишкового тракту;
- порушення синтезу білка при порушенні функції печінки (гепатити, цирози), при тривалих запальних процесах;
- підвищена втрата білка, що викликана різними захворюваннями нирок, сильними крововтратами.

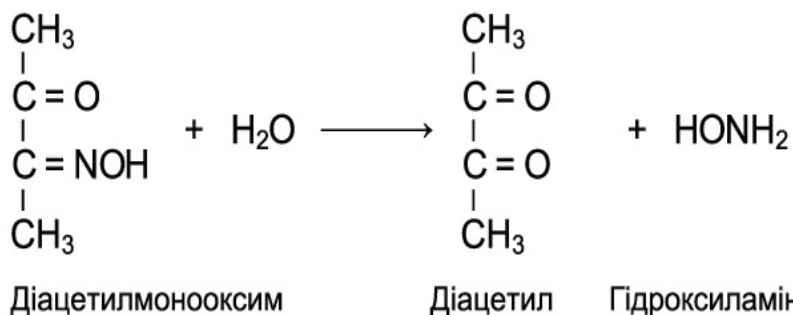
Гіперпротеїнемія (відносна) часто розвивається внаслідок дегідратації організму, що спричинено важкими травмами, великими опіками, проносом, блювотою. Абсолютна гіперпротеїнемія зустрічається при хронічних запальних захворюваннях (ревматоїдний артрит, колагенози, цироз печінки). При гострих інфекційних захворюваннях гіперпротеїнемія розвивається за рахунок посиленого синтезу білків гострої фази, при хронічних захворюваннях – за рахунок посилення синтезу імуноглобулінів.

У лабораторному журналі записати розрахунок визначення вмісту білка у біологічному матеріалі з використанням калібрувального графіка. Отриманий результат порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

Лабораторна робота 14.

Кількісне визначення сечовини діацетилмонооксимним методом (з використанням набору реактивів)

Біосинтез сечовини – це основний шлях знешкодження аміаку, що утворюється, переважно, при дезамінуванні амінокислот, в організмі ссавців. Сечовина – це водорозчинна нейтральна сполука, яка синтезується виключно в печінці і переноситься кров'ю в нирки. Уся синтезована сечовина фільтрується в просвіт проксимальних каналців нирок, а потім частина її реабсорбується. З сечею за добу виділяється біля 75 % синтезованої сечовини. Процеси синтезу сечовини в печінці і виділення її нирками взаємопов'язані. Тому при патології деяких органів, здебільшого, печінки і нирок,



може спостерігатися відхилення концентрації сечовини в крові і сечі від референтних значень.

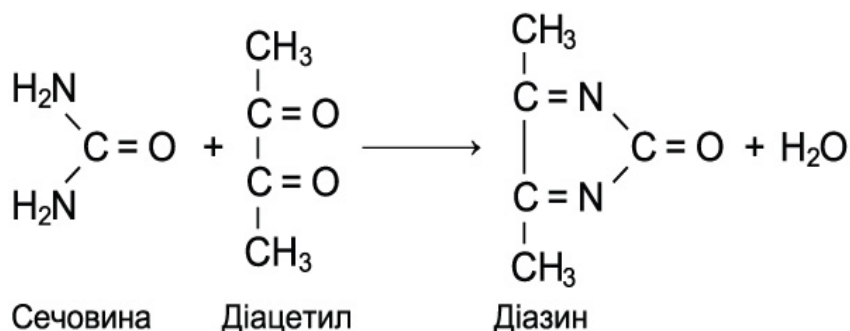
Принцип методу. Сечовина утворює з діацетилмонооксимом у присутності тіосемікарбазиду та

іонів Fe^{3+} у кислому середовищі комплекс рожево-червоного кольору, за інтенсивністю забарвлення якого визначають її концентрацію.

Матеріали і реактиви.

1. Розчин діацетилмонооксиму: вміст ампули з реактивом № 1 (розчин діацетилмонооксиму і солей заліза) кількісно перенести у мірну колбу на 100 мл, довести до мітки дистильованою водою, перемішати, зберігати при температурі від 0 °С до +25 °С не більше двох місяців.

2. Розчин розбавлювача: у мірну колбу на 200 мл налити (60–80) мл дистильованої води і додати при



перемішуванні вміст одного (100 мл) флакону з реактивом № 5 (концентрат розбавлювача). Об'єм розчину довести до мітки дистильованою водою, перемішати.

3. Розчин тіосемікарбазиду: вміст ампули з реактивом № 2 (розчин тіосемікарбазиду) кількісно перенести у мірну колбу на 100 мл, довести до мітки охолодженим до кімнатної температури розчином розбавлювача, перемішати. Зберігати при температурі від 0 °С до +25 °С не більше двох місяців.

4. Калібрувальний розчин сечовини (10 ммоль/л).

5. Біологічний матеріал – сироватка (плазма) крові, сеча.

Обладнання. Фотоелектроколориметр, водяна баня з киплячою водою, секундомір, мірні колби місткістю 50, 100, 200 мл, хімічні пробірки, фольга, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 0,02 та 2 мл, кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи.

Аналіз провести у відповідності до схеми, що представлена в таблиці, дотримуючись указаної послідовності додавання розчинів. Сечу перед аналізом необхідно розбавити в 50 разів дистильованою водою.

Відміряти у пробірки, мл	Дослідна проба	Калібруваль- на проба	Холоста проба
Сироватка крові або розбавлена сеча	0,02	–	–
Калібрувальний розчин	–	0,02	–
Фізіологічний розчин	–	–	0,02
Розчин тіосемікарбазиду	2,0	2,0	2,0
Розчин діацетилмонооксиму	2,0	2,0	2,0

Пробірки закрити ковпачками з алюмінієвої фольги, одночасно перемішати і помістити в бурхливо киплячу водяну баню *точно* на 10 хв. Потім пробірки швидко охолодити в проточній холодній воді і виміряти оптичну щільність калібрувальної ($E_{\text{КАЛИБ}}$) і дослідної ($E_{\text{ДОСЛ}}$) проб проти

холостої при 540–560 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Забарвлення стабільне протягом 15 хв.

Розрахунок.

$$C_{\text{ДОСЛ}} = C_{\text{КАЛИБ}} \frac{E_{\text{ДОСЛ}}}{E_{\text{КАЛИБ}}},$$

де $C_{\text{ДОСЛ}}$ – концентрація сечовини у дослідній пробі, ммоль/л;

$C_{\text{КАЛИБ}}$ – концентрація сечовини у калібрувальному розчині, що дорівнює 10 ммоль/л;

$E_{\text{ДОСЛ}}$ і $E_{\text{КАЛИБ}}$ – оптична щільність дослідної та калібрувальної проб відповідно.

Розрахунок сечовини у добовій сечі.

$$C_{\text{ДОБ}} = C_{\text{ДОСЛ}} \frac{A \cdot K}{B \cdot 1000},$$

де A – добова кількість сечі, мл (1500–2000);

B – кількість сечі, що взяли для аналізу, мл;

K – коефіцієнт розведення сечі (50).

У нормі вміст сечовини в сироватці крові дорослої людини складає 2,1–7,1 ммоль/л, а в сечі 430–710 ммоль/добу.

Клініко-діагностичне значення. Вміст сечовини в сироватці крові залежить від швидкості утворення сечовини в орнітиновому циклі в печінці та її виведення нирками. *Підвищення* вмісту сечовини в крові спостерігається при захворюванні нирок, у той же час концентрація цієї сполуки в сечі знижується. Концентрація сечовини в сироватці крові може підвищуватися при втраті рідини (зневоднення, блювота, пронос), при посиленому розпаді білків (гострий інфаркт міокарда, опіки), а також при дієті з високим вмістом білка. *Зниження* концентрації сечовини в крові спостерігається при дієті з низьким вмістом білка, при інтенсивній утилізації білка тканинами (на пізніх стадіях вагітності, у дітей під час інтенсивного зростання), при захворюваннях печінки (гепатити, цироз печінки) через порушення синтезу сечовини в цьому органі. Всі перераховані вище стани супроводжуються також зниженням вмісту сечовини і в сечі.

У лабораторному журналі записати розрахунок і результат визначення концентрації сечовини в біологічному матеріалі, порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

Контрольні питання з теми 2.3

1. Яку роль відіграють білки у харчуванні людини? Що таке повноцінні білки? Неповноцінні білки? Що таке замінні і незамінні амінокислоти? Які амінокислоти є незамінними для людини?

2. В яких відділах ШКТ і за участю яких протеолітичних ферментів відбувається перетравлення білків?
3. Який біологічний сенс утворення протеолітичних ферментів у формі проферментів (зимогенів)?
4. Що собою являє дезамінування амінокислот? Які ферменти каталізують реакції окисного дезамінування амінокислот? Яку роль відіграє глутаматдегідрогеназа в обміні амінокислот?
5. Що собою являє трансамінування амінокислот? Які ферменти каталізують реакції трансамінування амінокислот? Який кофермент використовується в цих реакціях? Біологічна роль трансамінування амінокислот?
6. Що собою являє непряме дезамінування L-амінокислот? Складіть схему цього процесу. Яка біологічна роль непрямого дезамінування амінокислот?
7. Які існують шляхи включення амінокислот до загального шляху катаболізму? Які амінокислоти належать до глікогенних? Кетогенних? Глікокетогенних?
8. Назвіть основні джерела аміаку в організмі людини. У якій формі аміак переноситься в крові? У вигляді яких кінцевих продуктів азотистого обміну виводиться аміак із організму ссавців?
9. У якому компартменті клітини відбуваються реакції орнітинового циклу? Які реакції є регуляторними і які ферменти каталізують ці реакції? Які сполуки постачають атоми азоту для синтезу сечовини? Які функції виконує орнітиновий цикл?
10. Назвіть методи кількісного визначення білка. Які реакції лежать в основі біуретового методу? Метода Лоурі?
11. Який метод кількісного визначення білка більш чутливий: біуретовий чи метод Лоурі? Який метод слід застосувати для точного визначення вмісту білка, якщо його приблизна концентрація в досліджуваному розчині становить 250 мкг/мл?
12. Який принцип методу та діагностичне значення кількісного визначення сечовини у крові та сечі?

Тестові завдання з теми 2.3

1. Протеази ШКТ синтезуються у вигляді неактивних проферментів. Який механізм активації цих проферментів?
 - А. Приєднання ліганда.
 - Б. Фосфорилування-дефосфорилування.
 - В. Алостерична регуляція.
 - Г. Зміни просторової структури.
 - Д. Обмежений протеоліз.
2. Яка сполука є основним акцептором аміногруп в реакціях трансамінування амінокислот?
 - А. Фумарат.
 - Б. Оксалоацетат.

- В. Альфа-кетоглутарат.
- Г. Малат.
- Д. Піруват.

3. Яке твердження найточніше характеризує процес трансамінування амінокислот?

- А. Синтез замінних амінокислот.
- Б. Перенесення аміногрупи від амінокислоти на піридоксальфосфат.
- В. Перенесення аміногрупи від амінокислоти на кетокислоту.
- Г. Утворення кетокислот.
- Д. Включення амінокислот в шлях катаболізму.

4. До складу ферментів амінотрансфераз і декарбоксилаз амінокислот входить кофермент:

- А. NAD^+ .
- Б. NADP^+ .
- В. FAD.
- Г. Піридоксальфосфат.
- Д. Ліпоат.

5. При дезамінуванні амінокислот утворюються безазотисті вуглецеві скелети, які далі можуть розщеплюватися до таких метаболітів, окрім:

- А. Фумарат.
- Б. Сукциніл-КоА.
- В. Альфа-кетоглутарат.
- Г. Малонат.
- Д. Піруват.

6. Вуглецеві скелети яких амінокислот можуть бути залучені тільки до синтезу кетонових тіл?

- А. Пролін і гістидин.
- Б. Метіонін і ізолейцин.
- В. Фенілаланін і тирозин.
- Г. Аланін і гліцин.
- Д. Лізин і лейцин.

7. У складі сечовини із організму людини виводиться два атоми азоту. Яка сполука є донором другого атому азоту при синтезі сечовини?

- А. Аміак.
- Б. Орнітин.
- В. Цитрулін.
- Г. Аспартат.
- Д. Аргінін.

8. Аміак є високотоксичною речовиною для нервової системи. Яка сполука бере участь у зв'язуванні вільного аміаку у мозку?

- А. Аланін.

- Б. Аргінін.
- В. Глутамінова кислота.
- Г. Тирозин.
- Д. Метіонін.

9. Підвищений вміст сечовини в сироватці крові за нормальної функції нирок може спостерігатися при:

- А. Значному ураженні паренхіми печінки.
- Б. Посиленому розпаді тканинних білків.
- В. Низькобілковій дієті.
- Г. Посиленій утилізації білка тканинами.
- Д. Зниженні активності карбамоїлфосфатсинтетази I.

10. Основний шлях знешкодження аміаку в організмі ссавців – це синтез сечовини в печінці і виведення її нирками з сечею. Який ще існує спосіб виведення аміаку у вигляді кінцевих продуктів із організму?

- А. Сечова кислота.
- Б. Амонійні солі.
- В. Глутамін.
- Г. Глутамінова кислота.
- Д. Білірубін.

Тема 2.4. Обмін нуклеїнових кислот і нуклеотидів

Нуклеотиди як мономер-попередники в синтезі нуклеїнових кислот є важливими компонентами клітини. Однак ці сполуки та їхні похідні залучені також до цілої низки інших метаболічних процесів: реакції депонування та перенесення енергії (АТФ, рідше інші нуклеозидтрифосфати), передача регуляторних сигналів (сAMP, сGMP), входять до складу коферментів (NAD⁺, NADP⁺, FAD, КоASH), функціонують як активовані метаболіти в обміні вуглеводів (UDP-глюкоза) та ліпідів (CDP-холін) тощо.

Синтез пуринових і піримідинових нуклеотидів

Синтезувати пуринові і піримідинові нуклеотиди здатні більшість клітин. Відомо два шляхи синтезу нуклеотидів: синтез *de novo* із низькомолекулярних попередників (основний спосіб) і синтез шляхом реутилізації азотистих основ, що утворилися в результаті деградації ендогенних та екзогенних нуклеотидів (допоміжний, забезпечує не більше 10–20 % загальної кількості цих сполук).

Шляхи синтезу *de novo* пуринових і піримідинових основ різні. В утворенні пуринового кільця як джерело атомів використовуються амі-

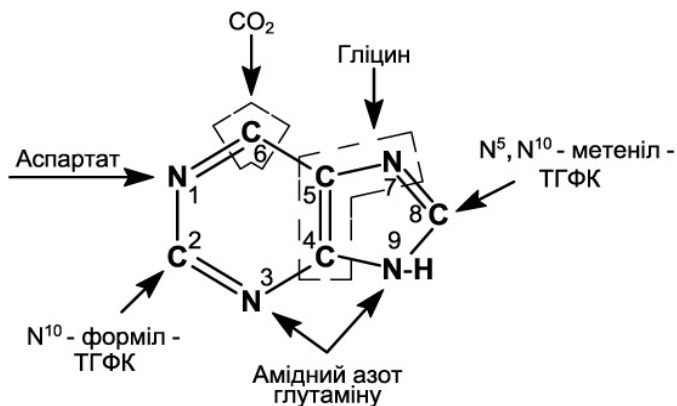
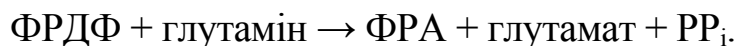


Рис. 6. Походження атомів пуринового ядра

нокислоти: гліцин (постачає три атома – С-4, С-5 і N-7), аспартат (N-1), глутамін (N-3 і N-9), CO₂ (C-6) і два похідних тетрагідрофолату: форміл-ТГФК (C-2) і метеніл-ТГФК (C-8) (рис. 6).

Збирання пуринового кільця починається з перенесення амідної групи глутаміну на залишок активованої рибози – 5-фосфорибозил-1-дифосфату (ФРДФ) – з утворенням 5-фосфорибозил-1-аміну (ФРА).

Ця реакція є ключовою і каталізується амідофосфорибозилтрансферазою:



Перший етап біосинтезу пуринів, що включає десять реакцій, закінчується утворенням інозин-5'-монофосфату (ІМР) – спільного попередника інших пуринових нуклеотидів. ІМР в ході двох послідовних реакцій може перетворюватися на АМР або GMP. Регулюється синтез пуринів шляхом алостеричного інгібування за принципом негативного зворотного зв'язку на рівні перших двох ферментів. АМР, GMP, ІМР та інші ди- і трифосфати пуринових нуклеозидів інгібують активність ФРДФ-синтетази (відповідає за

утворення активованої форми рибози із рибозо-5-фосфату) і амідофосфорибозилтрансферази. Крім того, AMP і GMP кожен гальмує власне утворення із IMP.

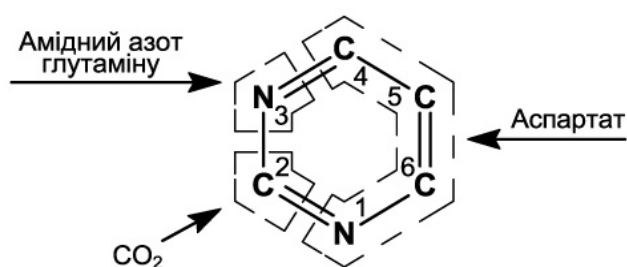


Рис. 7. Походження атомів піримідинового кільця

Синтез піримідинових нуклеотидів починається з побудови піримідинового кільця з простих попередників: глутаміну (постачає N-3), CO₂ (C-2) і аспартату (N-1, C-4, C-5, C-6) (рис. 7), і тільки потім до піримідиновій основи приєднується рибозо-5-фосфат, активованою формою якого є ФРДФ.

У першій реакції шляху синтезу піримідинів із амідної групи глутаміну, CO₂ і АТР під дією карбамоїлфосфатсинтази II (цитозольна форма) утворюється карбамоїлфосфат:



Останній конденсується з аспартатом в N-карбамоїласпартат, а потім після циклізації молекули утворюється дигідрооротат. У наступній реакції дигідрооротат окиснюється в оротат, який взаємодіє з фосфорибозилдифосфатом (ФРДФ) з утворенням нуклеотиду оротидил-5-монофосфату. Унаслідок декарбоксилювання останнього виникає уридин-5-монофосфат (UMP) – спільний попередник інших піримідинових нуклеотидів. Наприклад, UMP за участю АТР фосфорилується до UTP, останній акцептує аміногрупу від глутаміну і перетворюється у CTP. Регулюється синтез піримідинів у ссавців на рівні карбамоїлфосфатсинтази II кінцевим продуктом шляху, UMP, за механізмом негативного зворотного зв'язку.

Дезоксирибонуклеотиди утворюються із відповідних рибонуклеотидів в результаті відновлення рибози в 2-дезоксирибозу. Цей процес каталізує рибонуклеотидредуктазний комплекс, до складу якого входить рибонуклеотидредуктаза, SH-вмісний білок – тіоредоксин і фермент – тіоредоксинредуктаза, що забезпечує відновлення тіоредоксину за допомогою NADPH.

Синтез dTMP із dUMP відбувається в результаті метилювання, що каталізується тимідилатсинтазою, кофермент якої, N⁵,N¹⁰-метилентетрагідрофолат, є джерелом одновуглецевого фрагменту.

Катаболізм пуринових і піримідинових нуклеотидів

У клітинах нуклеїнові кислоти зазнають постійного оновлення. Унаслідок спільної дії гідролітичних ферментів дезоксирибонуклеаз (ДНКаз) і рибонуклеаз (РНКаз) вони розщеплюються до нуклеотидів. Певна кількість вільних нуклеотидів, яка не використовуються для синтезу нуклеї-

нових кислот або в інших метаболічних шляхах, підлягає деградації. Розпад пуринових мононуклеотидів включає реакції відщеплення фосфатного залишку, рибози (або рибозо-1-фосфату) та аміногрупи. У результаті з АМР утворюється гіпоксантин, а з ГМР – ксантин. Під дією ксантиноксидази гіпоксантин окиснюється в ксантин, а ксантин – у сечову кислоту. У людини і приматів, птахів та деяких рептилій сечова кислота є кінцевим продуктом пуринового обміну, який виводиться із організму. У більшості ссавців сечова кислота окиснюється до алантоїну. У риб та амфібій алантоїн може розпадатися далі до алантоїнової кислоти або сечовини.

В організмі людини в печінці та інших тканинах за добу утворюється 0,5–1 г сечової кислоти, яка надходить у кров і потім через нирки разом із сечею виділяється з організму. Сечова кислота та її солі (урати) погано розчиняються у воді. Концентрація сечової кислоти в крові у нормі складає 30–70 мг/л, що наближається до межі розчинності цієї сполуки. Тому навіть незначне підвищення концентрації цього показника у крові (гіперурикемія) призводить до відкладання сечової кислоти та її солей у вигляді кристалів у суглобових хрящах, зв'язках, м'яких тканинах з утворенням подагричних вузликів, спричиняючи розвиток запалення. Це захворювання називається подагрою. Іншим характерним проявом подагри є утворення в нирках уратних каменів і, як наслідок, розвиток сечокам'яної хвороби. Часто причиною розвитку подагри є гіперпродукція сечової кислоти, що викликана дефектами низки ферментів, зокрема гіперактивністю ФРДФ-синтетази, низьким синтезом гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (фермент шляху реутилізації азотистих основ) та ін.

Розпад піримідинових нуклеотидів до вільних азотистих основ відбувається аналогічно до розпаду пуринових нуклеотидів. Піримідинові основи відновлюються за участю NADPH, атоми N-3 та C-2 відщеплюються у формі аміаку та CO₂ відповідно, а частина піримідинового кільця, що залишилася, являє собою або β-аміноізобутират (утворюється з тиміну або 5-метилцитозину), або β-аланін (утворюється з урацилу та цитозину). Оскільки всі продукти водорозчинні, вони або виводяться з організму, або повторно використовуються в інших метаболічних шляхах (β-аланін використовується для синтезу КоASH, а β-аміноізобутират перетворюється на метаболіт циклу Кребса – сукциніл-КоА).

Лабораторна робота 15.

Кількісне визначення сечової кислоти (з використанням набору реактивів)

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності сечової кислоти в лужному середовищі відновлювати фосфорновольфрамовий реактив з утворенням фосфорновольфрамової сині (оксиди вольфраму). Інтенсив-

ність забарвлення реакційного розчину у синій колір пропорційна концентрації сечової кислоти в пробі, що аналізується.

Матеріали і реактиви.

1. Фосфорновольфрамовий реактив: Na_2WO_4 (0,12 моль/л), H_3PO_4 (0,47 моль/л), Li_2SO_4 (0,29 моль/л).
2. Розчин каталізатора (0,35 моль/л кислота сірчана).
3. Розчин вольфраму натрію (0,30 моль/л).
4. Калібрувальний розчин сечової кислоти (300 мкмоль/л або 5,04 мг%).
5. Карбонат натрію (20,5 г). Вміст флакону з карбонатом натрію перенести в мірну колбу на 200 мл, додати 130–150 мл дистильованої води, перемішати до повного розчинення, довести дистильованою водою до мітки, за необхідності відфільтрувати.

6. Біологічний матеріал – сироватка (плазма) крові, сеча добова.

Обладнання. Фотоелектроколориметр, центрифуга настільна (від 2000 об/хв до 5000 об/хв), секундомір, мірна колба місткістю 200 мл, хімічні пробірки, центрифужні пробірки, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори змінного об'єму 1, 2 та 5 мл, кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи.

Аналіз проводити відповідно до схеми, що наведена в таблиці. Сечу перед аналізом слід розвести в 10 разів дистильованою водою.

Відміряти в центрифужну пробірку, мл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Дистильована вода	4,0	4,0	4,5
Сироватка (плазма) крові або розведена сеча	0,5	–	–
Калібрувальний розчин сечової кислоти	–	0,5	–
Розчин каталізатора	0,25	0,25	0,25
Розчин вольфраму натрію	0,25	0,25	0,25
Вміст кожної пробірки перемішати, витримати 10 хв при кімнатній температурі (від +20 °С до +25 °С), центрифугувати 10 хв при 2000–5000 об/хв, відібрати в чисті пробірки необхідну кількість центрифугату (замість центрифугування допускається фільтрування отриманого розчину)			
Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Центрифугат (фільтрат)	3,0	3,0	3,0
Розчин карбонату натрію	1,5	1,5	1,5
Фосфорновольфрамовий реактив	1,0	1,0	1,0
Вміст кожної пробірки перемішати, інкубувати 30 хв при кімнатній температурі (від +20 °С до +25 °С), виміряти оптичну щільність калібрувальної ($E_{\text{КАЛІБ}}$) і дослідної ($E_{\text{ДОСЛ}}$) проб проти холостої при 650 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Забарвлення стабільне протягом 30 хв.			

Розрахунок.

$$C_{\text{ДОСЛ}} = C_{\text{КАЛИБ}} \frac{E_{\text{ДОСЛ}}}{E_{\text{КАЛИБ}}},$$

де $C_{\text{КАЛИБ}}$ – концентрація сечової кислоти в калібрувальному розчині, що дорівнює 300 мкмоль/л (або 5,04 мг%);

$E_{\text{ДОСЛ}}$ і $E_{\text{КАЛИБ}}$ – оптична щільність дослідної та калібрувальної проб відповідно.

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

У нормі концентрація сечової кислоти в сироватці крові становить у чоловіків – 4,4–7,6 мг% (262–452 мкмоль/л), у жінок – 2,3–6,6 мг% (137–393 мкмоль/л).

Вміст сечової кислоти в сечі у середньому 250–750 мг/добу (1,48–4,43 ммоль/добу).

Клініко-діагностичне значення. Спадкова гіперурикемія зумовлена посиленням синтезом пуринів унаслідок дефектів низки ферментів пуринового обміну (ФРДФ-синтетази, амідифосфорибозилтрансферази, гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази) і є причиною розвитку первинної подагри. Вторинна подагра розвивається при всіх захворюваннях, що пов'язані з розпадом нуклеопротейнів: лейкози, лікування цитостатиками, опромінення. Причиною подагри також може бути й уповільнене виведення сечової кислоти з організму, яке зумовлене порушенням функції нирок. Надмірне вживання продуктів, що містять багато пуринів (чай, кава, дріжджі, м'ясо), викликає аліментарну гіперурикемію.

Зниження концентрації сечової кислоти в крові (гіпоурикемія) спостерігається відносно рідко і може бути пов'язане з уродженим дефіцитом ферментів обміну пуринів (ксантиноксидази), а також із дефектом механізмів реабсорбції сечової кислоти в ниркових канальцях, прийомом препаратів, що сприяють виведенню сечової кислоти.

У лабораторному журналі записати результати визначення концентрації сечової кислоти, порівняти з референтними значеннями цього показника, зробити висновок.

Контрольні запитання з теми 2.4

1. Які функції виконують вільні нуклеотиди? Які компоненти входять до складу нуклеозидів? Нуклеотидів?
2. Які прості попередники використовуються в синтезі пуринових основ? Укажіть походження атомів С і N пуринових основ.
3. Які прості попередники використовуються в синтезі піримідинових основ? Укажіть походження атомів С і N піримідинових основ.

4. Які реакції в синтезі пуринових і піримідинових нуклеотидів є регуляторними? Укажіть ферменти та механізми їхньої регуляції.

5. У чому полягає відмінність процесів синтезу пуринових і піримідинових нуклеотидів?

6. Як відбувається розпад нуклеїнових кислот у шлунково-кишковому тракті? У тканинах?

7. Які сполуки є кінцевими продуктами розпаду піримідинових основ? Пуринових основ? У чому полягає відмінність процесів катаболізму основ пуринів і піримідинів у людини?

8. Який фермент каталізує дві послідовні необоротні реакції утворення сечової кислоти? Який кофермент входить до складу цього ферменту?

9. Який принцип методу та діагностичне значення кількісного визначення сечової кислоти у біологічних рідинах? Яка в нормі концентрація сечової кислоти у дорослої людини в сироватці крові? В сечі?

10. Що означають терміни «гіперурикемія» та «гіпоурикемія»? Які фактори спричиняють розвиток цих станів?

Тестові завдання з теми 2.4

1. Синтез пуринових нуклеотидів *de novo* починається з формування пуринового кільця на рибозо-5-фосфаті, джерелом якого є:

- А. Гліколіз.
- Б. Пентозофосфатний шлях.
- В. Глюконеогенез.
- Г. Глікогеноліз.
- Д. Цикл Кребса.

2. Які сполуки є донорами карбону в синтезі пуринових нуклеотидів?

- А. Гліцин, глутамін.
- Б. Глутамін, CO_2 .
- В. Форміл-ТГФК, метеніл-ТГФК, гліцин, CO_2 .
- Г. Аспартат, глутамін, гліцин, форміл-ТГФК.
- Д. Аланін, гліцин, CO_2 .

3. Які сполуки є донорами нітрогену в синтезі піримідинових нуклеотидів?

- А. Гліцин.
- Б. Глутамін, аспартат.
- В. Аспартат, гліцин.
- Г. Аланін, аміак.
- Д. Форміл-ТГФК, аміак.

4. Інозинова кислота в результаті двостадійних реакцій може перетворюватися на:

- А. Уридилову і цитидилову кислоти.
- Б. Пуринові і піримідинові основи.
- В. Оротову кислоту.

- Г. Аденілову і гуанілову кислоти.
 - Д. Аргінін.
5. Регуляторними ферментами синтезу пуринових нуклеотидів є:
- А. Карбамоїлфосфатсинтетаза II і аспартаткарбамоїлтрансфераза.
 - Б. Ксантиноксидаза та алантоїказа.
 - В. ФРДФ-синтетаза і амідифосфорибозилтрансфераза.
 - Г. Аспартаткарбамоїлтрансфераза і піруваткарбоксилаза.
 - Д. Аденозинкіназа і дигідрооротаза.
6. Регуляторними ферментами синтезу піримідинових нуклеотидів є:
- А. Карбамоїлфосфатсинтетаза II і аспартаткарбамоїлтрансфераза.
 - Б. Аденілосукцинатсинтетаза й інозитмонофосфатдегідрогеназа.
 - В. ФРДФ-синтетаза й амідифосфорибозилтрансфераза.
 - Г. Аспартаткарбамоїлтрансфераза і піруваткарбоксилаза.
 - Д. Аденозинкіназа і дигідрооротаза.
7. Кінцевими продуктами розпаду піримідинових гетероциклів є:
- А. α -Амінокислоти та сечовина.
 - Б. β -Амінокислоти, аміак, CO_2 .
 - В. Сечова кислота та сечовина.
 - Г. Сечова кислота, аміак і CO_2 .
 - Д. Аміак і CO_2 .
8. У більшості ссавців, за винятком людини та людиноподібних мавп, сечова кислота:
- А. Відновлюється до аміаку.
 - Б. Окиснюється до алантоїну.
 - В. Розпадається до аміаку та вуглекислого газу.
 - Г. Розпадається на сечовину та гліоксилову кислоту.
 - Д. Перетворюється на алантоїнову кислоту.
9. Тимідилові нуклеотиди, що використовуються для синтезу ДНК, утворюються з dUDP, які спочатку гідролізуються до dUMP, а потім метилюються. Яка сполука є донором метильних груп?
- А. Метіонін.
 - Б. Холін.
 - В. Лецитин.
 - Г. Метилен-ТГФК.
 - Д. Карнітин.
10. У реакціях відновлення рибонуклеотидів до дезоксирибонуклеотидів безпосереднім донором водню є:
- А. NADH.
 - Б. FADH_2 .
 - В. Ліпоева кислота.
 - Г. Глутатіон.
 - Д. Тіоредоксин.

РОЗДІЛ 3

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ПЕРЕДАЧІ ТА РЕАЛІЗАЦІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ. ІНТЕГРАЦІЯ ТА РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЗМУ



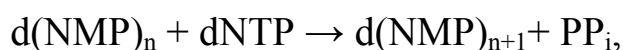
Тема 3.1. Реплікація ДНК

Механізм та учасники реплікації

Реплікація – це процес подвоєння батьківських молекул геномної ДНК, що передуює поділу клітини. Реплікація ДНК відбувається за напівконсервативним механізмом, тобто ланцюги батьківської молекули ДНК розходяться і кожен служить матрицею для синтезу нового комплементарного ланцюга. У результаті утворюються дві дочірні молекули ДНК, ідентичні батьківській молекулі, один ланцюг у яких слугував матрицею, а другий синтезовано *de novo*. Порядок включення нуклеотидів у новий ланцюг визначається матрицею за правилами комплементарного спарювання азотистих основ: аденіну (А) – з тиміном (Т), а гуаніну (G) – з цитозином (С).

У реплікації бере участь макромолекулярний комплекс (реплісома), який містить низку ферментів, структурних і регуляторних білків. На прикладі прокаріотів можна виділити такі основні компоненти: ДНК-залежні ДНК-полімерази I і III, білок-ініціатор (DnaA), хеліказа (DnaB), праймаза (DnaG), топоізомераза II класу (ДНК-гіраза), ДНК-лігаза, білки, що стабілізують одноланцюгову ДНК (SSB-білки).

Для синтезу ДНК потрібні макроергічні *субстрати* – чотири види дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатів на основі аденіну (dATP), тиміну (dTTP), гуаніну (dGTP) і цитозину (dCTP), *матриця* – неспарений ланцюг ДНК, і *праймер* – короткий фрагмент РНК, що комплементарно зв'язаний з відповідною ділянкою матричного ланцюга ДНК і має на кінці вільну 3'-ОН групу. Матриця зчитується в напрямку від 3'- до 5'-кінця, а синтез ланцюга ДНК відбувається від 5'- до 3'-кінця (рис. 8). ДНК-полімерази каталізують реакцію утворення фосфодіестерного зв'язку між дезоксирибонуклеотидами:



де $d(NMP)_n$ – ланцюг ДНК; $d(NMP)_{n+1}$ – ланцюг ДНК, подовжений на один нуклеотид; dNTP – дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат; PP_i – піро-

фосфат. Включення дезоксирибонуклеозидмонофосфату в ланцюг ДНК супроводжується гідролізом макроергічного зв'язку dNTP, енергія якого йде на утворення 3',5'-фосфодіестерного зв'язку між кінцевим нуклеотидом і наступним нуклеотидом, що приєднується.

Стадії реплікації

Процес реплікації найбільш повно вивчений у бактерії *E. coli*. У реплікації виділяють 3 стадії: ініціацію, елонгацію та термінацію. На стадії ініціації в результаті розриву водневих зв'язків між парами комплементарних азотистих основ відбувається розкручування дволанцюгової ДНК з утворенням протяжних одноланцюгових ділянок і формуванням двох реплікативних

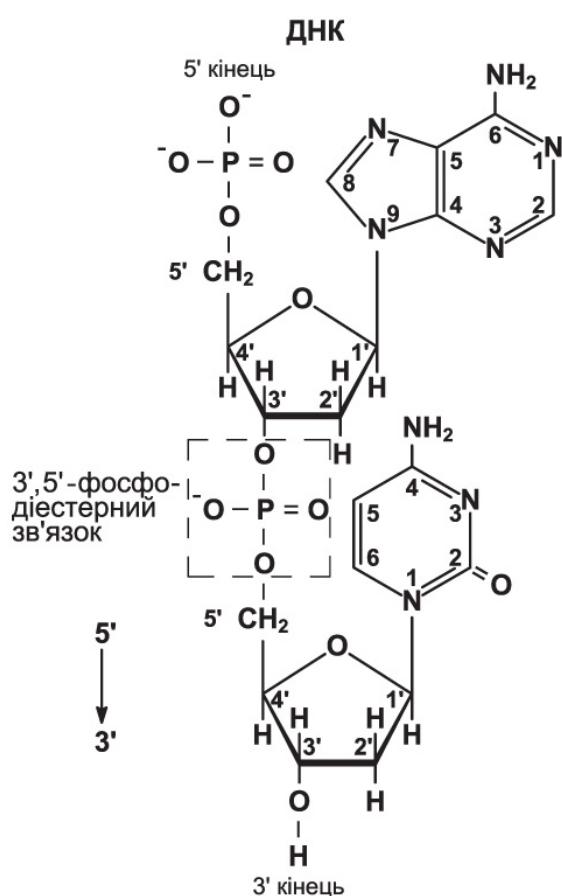


Рис. 8. Фрагмент ДНК

вилوک, що рухаються в протилежних напрямках. У зв'язку з антипаралельністю ланцюгів ДНК напрямок синтезу ДНК збігається з напрямком руху реплікативної вилки тільки для одного ланцюга (провідного), а другий ланцюг (той, що відстає) синтезується в напрямку, протилежному руху реплікативної вилки. Провідний ланцюг синтезується безперервно, а той, що відстає, – переривчасто, відносно короткими фрагментами, так званими *фрагментами Оказаки*. Пізніше між сусідніми фрагментами Оказаки утворюються фосфодіестерні зв'язки. В результаті з окремих фрагментів формується безперервний ланцюг ДНК. Завершується синтез ДНК у *E. coli* в ділянці термінації реплікації, де відбувається зустріч двох реплікативних вилок. Висока точність реплікації (менш ніж 1 помилка на 10 млрд нуклеотидів) зумовлена властивостями ДНК-полімерази III (основної ДНК-полі-

мерази реплікації). Цей фермент контролює комплементарність нуклеотиду, що приєднується, матриці та в разі невідповідності, здатний видалити помилково вбудований мономер, повернутися в попередню позицію і повторити цю стадію, отже, виправити помилку.

Методи кількісного визначення нуклеїнових кислот

Нуклеїнові кислоти – це біополімери, мономерами яких є нуклеотиди, що з'єднуються один з одним фосфодіестерними зв'язками. До складу кожного нуклеотиду входить три компоненти: азотиста основа, пентоза і залишок фосфатної кислоти. Методи кількісного визначення нуклеїнових кислот ґрунтуються на кольорових реакціях з такими компонентами як пентози і фосфор (колориметричні методи), або як спектрофотометричні методи – на визначенні поглинання азотистими основами в УФ області спектра при 240–290 нм.

Лабораторна робота 16. Спектрофотометричне визначення вмісту нуклеїнових кислот

Для кількісного визначення нуклеїнових кислот широко використовуються спектрофотометричні методи, які відрізняються досить високою чутливістю, простотою і швидкістю проведення аналізу. Концентрацію нуклеїнових кислот оцінюють, вимірюючи оптичну щільність розчину при 260 нм (максимум поглинання більшості азотистих основ). Нерідко необхідним етапом різних спектрофотометричних методів визначення нуклеїнових кислот є їхня екстракція з біологічного матеріалу, яка спряжена з гідролізом полінуклеотидів до мономерів. Тому перед екстракцією нуклеїнових кислот необхідно обов'язково провести видалення вільних нуклеотидів із біологічного зразка. Крім того, відомо, що розчин нативної нуклеїнової кислоти поглинає УФ-світло менш інтенсивно (в середньому на 40 %), ніж розчин денатурованої або суміші нуклеотидів, що еквівалентна досліджуваній нуклеїновій кислоті (рис. 9). Цей так званий гіпохромний ефект зумовлено стекінг-взаємодією між парами азотистих основ укладених стопками всередині подвійної спіралі ДНК або двоспиральних ділянок РНК: пари азотистих основ екранують одна одну і саме тому загальне поглинання УФ-світла нуклеїновими кислотами зменшується. Отже, перед спектрофотометруванням необхідно проводити гідроліз зразків нуклеїнових кислот у стандартних умовах.

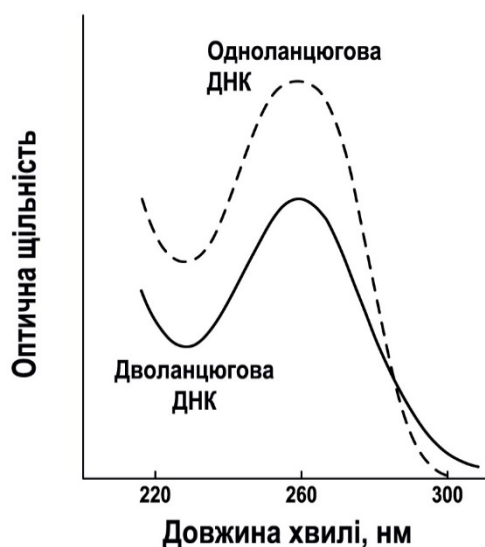


Рис. 9. Нативна (дволанцюгова) ДНК поглинає світло менш інтенсивно, ніж одноланцюгова

Присутність білків у дослідному зразку є ще одним фактором, що може впливати на величину поглинання нуклеїновими кислотами при 260 нм. Як відомо, один із максимумів поглинання білків в УФ знаходиться в області 280 нм, тобто спектри поглинання нуклеїнових кислот і білків частково перекриваються (див. рис. 3). У зв'язку з цим перед спектрофотометричною оцінкою вмісту нуклеїнових кислот необхідно максимально видалити із дослідного зразка білки.

Принцип методу. В основі методу визначення сумарного вмісту нуклеїнових кислот лежить екстракція їх із біологічного матеріалу гарячою перхлоратною кислотою з подальшим визначенням поглинання екстрактів в УФ-області спектра при 270 і 290 нм. Гаряча перхлоратна кислота гідролізує нуклеїнові кислоти і осаджує значну частину білків, що заважають спектрофотометруванню. Через те, що частина білків залишаються в гідролізаті, вміст нуклеїнових кислот визначають за різницею поглинання гідролізату при двох довжинах хвиль: при 270 нм (область поглинання нуклеїнових кислот) і при 290 нм (область поглинання білків).

Матеріали і реактиви.

1. HClO_4 – 0,2 н і 0,5 н розчини охолоджені.
2. Біологічний матеріал – свіжа печінка або селезінка щура.

Обладнання. Спектрофотометр, що дозволяє вимірювати оптичну щільність розчинів в УФ-області спектра, рефрижераторна центрифуга (до 3000 g), центрифуга настільна (до 3000 об/хв), ваги для врівноваження центрифужних пробірок, ваги лабораторні, чашка Петрі, ножиці, пінцет, ручний скляний гомогенізатор (об'ємом 10 мл), секундомір, центрифужні пробірки, мірні пробірки, пробки з повітряним холодильником, водяна баня з киплячою водою, скляні палички, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1, 5 та 10 мл, кварцові кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи.

Подрібнену на холоді наважку печінки або селезінки (100 мг) помістити у ручний скляний гомогенізатор з 5–10 мл охолодженого 0,2 н розчину перхлоратної кислоти. Шматочки тканини ретельно гомогенізувати на льоду до утворення однорідної суспензії, яку потім перенести у центрифужну пробірку. Осад відокремити центрифугуванням (3000 g) на холоді протягом 10 хв. Надосадову рідину, що містить кислоторозчинні сполуки (вільні нуклеотиди), відкинути. До осаду додати 5–10 мл 0,5 н розчину HClO_4 , ретельно розтерти скляною паличкою, перемішати. Закрити пробірки пробками з повітряним холодильником і нагрівати їх у киплячій водяній бані протягом 30 хв. Остання процедура забезпечує кількісну екстракцію нуклеїнових кислот із біологічного зразка та їх кислотний гідроліз до розчинних фрагментів. Пробірку з гідролізатом охолодити в проточній холодній воді

і потім центрифугувати при 3000 об/хв протягом 10 хв. Визначити об'єм надосадової рідини, акуратно відібравши її в чисту мірну пробірку. Виміряти оптичне поглинання гідролізату при 270 і 290 нм проти контролю (розчин 0,5 н HClO_4) в кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм. За необхідності гідролізат розвести розчином 0,5 н перхлоратної кислоти.

Розрахунок.

Концентрація нуклеїнових кислот (мкг/мл) розраховується за формулою:

$$C_{\text{НК}} = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot 10,3}{0,19},$$

де E_{270} і E_{290} – оптична щільність дослідної проби при 270 нм і 290 нм відповідно;

0,19 – значення різниці оптичної щільності ΔE ($E_{270} - E_{290}$), яке має гідролізат нуклеїнових кислот, що містить 1 мкг нуклеїнового фосфору в 1 мл розчину;

10,3 – усереднений коефіцієнт для перерахунку кількості нуклеїнового фосфору на кількість нуклеїнових кислот (для ДНК цей коефіцієнт складає 10,1, для РНК – 10,5).

Необхідно також визначати оптичну щільність при 260 нм. Різниця між оптичною щільністю при 260 нм і 270 нм не має складати більше ніж $\pm 15\%$.

Вміст нуклеїнових кислот на 1 г тканини розраховується з урахуванням загального об'єму гідролізату (V , мл) і маси наважки тканини (0,1 г):

$$\text{Вміст НК (мкг/г тканини)} = C_{\text{НК}} \times V \times 10.$$

У лабораторному журналі записати результати визначення вмісту нуклеїнових кислот у біологічному матеріалі.

Лабораторна робота 17.

Кількісне визначення ДНК з дифеніламіном за методом Діше

Для кількісного визначення нуклеїнових кислот використовують також колориметричні методи, що ґрунтуються на кольорових реакціях з такими компонентами нуклеотидів як пентози і фосфор. Однак при застосуванні цих методів із дослідної проби попередньо необхідно видалити всі речовини, що дають подібні кольорові реакції: дезоксирибозу, рибозу, неорганічний фосфат, фосфоровмісні сполуки ненуклеотидної природи, вільні нуклеотиди тощо.

Принцип методу. Метод ґрунтується на кольоровій реакції між дифеніламіном і дезоксирибозою, що відщеплюється від пуринових

нуклеотидів під час кислотного гідролізу. У піримідинових нуклеотидах N-глікозидний зв'язок не руйнується за цих умов, тому в реакції з дифеніламіном визначається тільки близько половини дезоксирибози, що входить до складу ДНК. У зв'язку з цим як стандарт слід використовувати гідролізат ДНК, точна концентрація якого визначається спектрофотометричним методом. У реакції дезоксирибози з дифеніламіном утворюється сполука синього кольору з максимумом поглинання при 600 нм.

Матеріали і реактиви.

1. Реактив Діше: 1 г дифеніламіну (двічі перекристалізованого з 70 % етилового спирту) розчинити в 100 мл крижаної оцтової кислоти й додати 2,75 мл концентрованої сірчаної кислоти.

2. HClO_4 – 0,5 н розчин.

3. NaOH – 5 мМ розчин.

4. Стандартний розчин ДНК – 1 мг/мл. Наважку (1 мг) комерційного препарату ДНК розчинити у 1 мл 5 мМ NaOH . До отриманого розчину ДНК додати 9 мл 0,5 н HClO_4 і помістити в киплячу водяну баню на 30 хв, попередньо закривши пробірку пробкою з повітряним холодильником. Після охолодження до кімнатної температури гідролізат розвести у 4 рази 0,5 н розчином HClO_4 , виміряти поглинання на спектрофотометрі при 270 і 290 нм, як це описано в лабораторній роботі 16, і розрахувати точну концентрацію ДНК в стандартному розчині.

5. Досліджуваний розчин ДНК.

Обладнання. Спектрофотометр, що дозволяє вимірювати оптичну щільність розчинів в УФ-області спектра, фотоелектроколориметр, центрифуга настільна (до 3000 об/хв), ваги для врівноваження центрифужних пробірок, секундомір, центрифужні пробірки, мірні пробірки, пробки з повітряним холодильником, скляні палички, водяна баня з киплячою водою, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1, 5 та 10 мл, кварцові кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм, скляні кювети з довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи.

В одну пробірку (калібрувальна проба) налити 1 мл стандартного розчину ДНК, а в іншу (дослідна проба) – 1 мл досліджуваного розчину ДНК, у третю (холоста проба) – 1 мл 0,5 н HClO_4 . Потім в усі пробірки додати по 2 мл реактиву Діше, вміст пробірок перемішати і помістити в киплячу водяну баню на 10 хв. При нагріванні розвивається стійке синє забарвлення. Після охолодження виміряти оптичну щільність калібрувальної ($E_{\text{КАЛИБ}}$) і дослідної ($E_{\text{ДОСЛ}}$) проб проти холостої при 600 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 5 мм. За необхідності пробу слід розвести сумішшю реактив Діше – вода (2:1).

Розрахунок.

Концентрація ДНК (мкг/мл) у дослідній пробі розраховується за формулою:

$$C_{\text{ДОСЛ}} = C_{\text{КАЛИБ}} \frac{E_{\text{ДОСЛ}}}{E_{\text{КАЛИБ}}},$$

де $C_{\text{КАЛИБ}}$ – концентрація стандартного розчину ДНК, що визначено спектрофотометричним методом;

$E_{\text{ДОСЛ}}$ і $E_{\text{КАЛИБ}}$ – оптична щільність дослідної та стандартної проб відповідно.

Практичне значення. Методи кількісного визначення нуклеїнових кислот використовуються в експериментальній та клінічній біохімії.

У лабораторному журналі записати результати визначення вмісту ДНК.

Контрольні питання з теми 3.1

1. Що таке реплікація ДНК? Який механізм реплікації ДНК?
2. Що таке реплісома? Стисло охарактеризуйте основні компоненти реплісоми.
3. Яку реакцію каталізують ДНК-залежні ДНК-полімерази? Назвіть субстрати, матрицю, джерела енергії для реакції, що каталізується цією групою ферментів.
4. Що таке реплікон? Реплікативна вилка?
5. Які стадії розрізняють в реплікації?
6. Як здійснюється синтез провідного ланцюга та ланцюга ДНК, що відстає? Чим зумовлені відмінності в синтезі цих ланцюгів?
7. Що забезпечує високу точність реплікації?
8. Якими методами можна визначити вміст нуклеїнових кислот у тканинах? На чому ці методи ґрунтуються?
9. Що таке гіпохромний ефект ДНК і чим він зумовлений? Які фактори впливають на величину поглинання ДНК?
10. Як впливає присутність білків на спектри поглинання нуклеїнових кислот і чому?

Тестові питання з теми 3.1

1. Субстратами в реакції біосинтезу ДНК за участю ДНК-полімерази є:
 - А. dATP, dCTP, dGTP, dUTP.
 - Б. dADP, dCDP, dGDP, dTDP.
 - В. ATP, CTP, GTP, TTP.
 - Г. ADP, CTP, GTP, TTP.
 - Д. dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

2. Яка з перерахованих нижче нуклеїнових кислот є матрицею для процесу реплікації в клітинах прокаріотів:

- А. ДНК.
- Б. мРНК.
- В. рРНК.
- Г. тРНК.
- Д. пре-мРНК.

3. Яке з перелічених тверджень найбільш повно характеризує процес реплікації:

- А. Між мономерами утворюються 3',5'-фосфодіестерні зв'язки.
- Б. Відбувається локальне розходження ланцюгів ДНК-матриці.
- В. Відбувається подвоєння геному клітини.
- Г. Синтезуються нуклеотидні ланцюги, що комплементарні матричним ланцюгам.
- Д. Один із ланцюгів синтезується переривчасто, фрагментами Оказакі.

4. Як називається ланцюг ДНК ($5' \rightarrow 3'$), синтез якого збігається з напрямком руху реплікативної вилки?

- А. Провідний.
- Б. Фрагмент Оказакі.
- В. Праймер.
- Г. ДНК-матриця.
- Д. Той, що відстає.

5. Який із ферментів є основною полімеразою при реплікації у прокаріотів?

- А. ДНК-залежна ДНК-полімераза I.
- Б. ДНК-залежна ДНК-полімераза II.
- В. ДНК-залежна ДНК-полімераза III.
- Г. ДНК-залежна ДНК-полімераза альфа.
- Д. ДНК-залежна РНК-полімераза.

6. Який із ферментів видаляє РНК-праймери і заповнює прогалини після їх видалення при реплікації у прокаріотів?

- А. ДНК-залежна ДНК-полімераза I.
- Б. ДНК-залежна ДНК-полімераза II.
- В. ДНК-залежна ДНК-полімераза III.
- Г. ДНК-залежна ДНК-полімераза альфа.
- Д. ДНК-залежна РНК-полімераза.

7. Який метод із перелічених нижче можна застосувати для кількісного визначення ДНК у дослідному зразку?

- А. Діаліз.
- Б. Поляриметрія.
- В. Іонообмінна хроматографія.

- Г. Спектрофотометрія.
- Д. Ізоелектричне фокусування.

8. В якій ділянці УФ-спектра знаходиться максимум поглинання нуклеїнових кислот?

- А. 190 нм
- Б. 260 нм.
- В. 280 нм.
- Г. 320 нм.
- Д. 340 нм.

9. Чим обумовлено гіпохромний ефект (зниження поглинання УФ-світла) розчинів нативної ДНК?

- А. Стекінг-взаємодіями азотистих основ.
- Б. Водневими зв'язками між азотистими основами.
- В. Глікозидними зв'язками між основами і залишками дезоксирибози.
- Г. Присутністю вуглеводного компонента.
- Д. Дволанцюговою структурою молекули.

10. Визначення ДНК з дифеніламіном за методом Діше ґрунтується на кольоровій реакції з:

- А. Фосфором.
- Б. Пуриновими основами.
- В. Піримідиновими основами.
- Г. Дезоксирибозою.
- Д. Рибозою.

Тема 3.2. Експресія генів. Біосинтез білка

Транскрипція

Транскрипція – це процес синтезу РНК на матриці ДНК. В основі механізму транскрипції лежить той самий принцип комплементарного спарювання азотистих основ, що й під час реплікації. Синтез РНК в ході транскрипції каталізують ДНК-залежні РНК-полімерази. Для перебігу реакції потрібні 4 види рибонуклеозид-5'-трифосфатів (АТР, ГТР, СТР, УТР). Як матриця використовується один із ланцюгів ДНК, що зчитується у напрямку від 3'- до 5'-кінця, а синтез ланцюга РНК відбувається від 5'- до 3'-кінця. В результаті транскрипції синтезується послідовність, що є копією певної ділянки комплементарного ланцюга ДНК, де розташовано структурний ген або група генів. Синтез РНК починається в певних сайтах ДНК, які називаються промоторами, і завершується в термінаторах. Ділянка ДНК обмежена промотором і термінатором являє собою одиницю транскрипції – транскриптон. У еукаріотів до складу транскриптона входить один ген. Транскриптони прокаріотів часто містять декілька генів, що функціонально між собою пов'язані, і називаються оперонами. У прокаріотів усі види РНК (мРНК, тРНК, рРНК) синтезуються одним типом РНК-полімерази, що є олігомерним білком з 5 видів субодиниць – альфа, бета, бета-штрих, омега і сигма у пропорції $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ (холофермент).

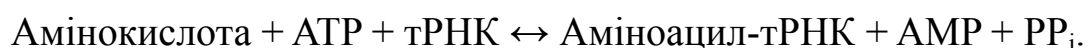
У процесі транскрипції виділяють 4 стадії: 1) зв'язування РНК-полімерази з ДНК і розпізнавання промотора; 2) ініціація синтезу ланцюга РНК; 3) елонгація ланцюга РНК; 4) термінація синтезу ланцюга РНК. Специфічне впізнавання промотора ферментом забезпечує σ -субодиниця. Після зв'язування холоферменту з промотором відбувається локальне плавлення подвійної спіралі ДНК і розходження її ланцюгів, один із ланцюгів використовується як матриця для синтезу РНК. РНК-полімерази не потребують праймерів і здатні каталізувати утворення першого фосфодіестерного зв'язку. Після включення в ланцюг РНК близько 10 нуклеотидів σ -субодиниця дисоціює від комплексу, а подальше подовження (елонгацію) РНК здійснює корфермент РНК-полімерази – $(\alpha_2\beta\beta'\omega)$. Транскрипція завершується, коли РНК-полімераза досягає послідовності термінатора. Після цього відбувається вивільнення РНК-продукту і дисоціація РНК-полімерази від ДНК.

У прокаріотів транскрипт, що утворився, може відразу використовуватися як матриця для синтезу білка. У еукаріотів необхідний етап процесингу первинного транскрипта, який складається зі сплайсингу (вирізання інтронів і з'єднання екзонів), кепування і поліаденілювання. Далі зріла мРНК переноситься з ядра в цитоплазму, де використовується як матриця для синтезу білка.

Трансляція

Синтез РНК (транскрипція) – це перший етап реалізації генетичної інформації в клітині. На наступному етапі, на етапі *трансляції*, відбувається переклад нуклеотидної послідовності мРНК в амінокислотну послідовність поліпептиду за допомогою генетичного коду. Генетичний код *однозначно* визначає відповідність послідовності нуклеотидів кодону матричної РНК певній амінокислоті в молекулі білка.

На підготовчій стадії – рекогніції – відбувається активування амінокислот за участю АТР та їхнє приєднання до відповідних тРНК за допомогою спеціальних ферментів, аміноацил-тРНК-синтетаз:



Фермент аміноацил-тРНК-синтетаза має абсолютну субстратну специфічність до амінокислоти та відносну субстратну специфічність до тРНК (впізнає всі ізоакцепторні тРНК, що переносять певну амінокислоту). Аміноацил-тРНК-синтетази каталізують утворення естерного (макроергічного) зв'язку між α -карбоксильною групою активованої амінокислоти та 2'- або 3'-ОН групами рибози кінцевого аденозину акцепторного стебла тРНК.

Далі навантажені тРНК переносять амінокислоти до місця синтезу білка – рибосом – і через комплементарну взаємодію нуклеотидного триплету тРНК (антикодону) зв'язуються з відповідними кодонами мРНК. Отже, молекули тРНК виконують роль адаптерів, забезпечуючи певний порядок включення амінокислот у поліпептидний ланцюг, що синтезується, відповідно до послідовності нуклеотидів у мРНК.

До синтезу поліпептидних ланцюгів залучено низку клітинних компонентів (табл. 2).

Таблиця 2

Компоненти білоксинтезуючої системи прокаріотів

Компоненти	Функції
Амінокислоти	Після активування і приєднання до 3'-кінця відповідних тРНК є субстратами у синтезі поліпептидних ланцюгів
тРНК	Переносять активовані амінокислоти до рибосом і функціонують як адаптери, зв'язуючись через антикодони з кодонами мРНК
Аміноацил-тРНК-синтетази	Каталізують активування амінокислот у присутності АТФ і специфічне приєднання кожної з 20 амінокислот до відповідної тРНК
мРНК	Кодувальна ділянка мРНК містить послідовність нуклеотидних триплетів, що визначають амінокислотну послідовність поліпептиду. Кодувальна ділянка починається зі старт-кодону (AUG або GUG), що визначає рамку зчитування, а закінчується одним із стоп-кодонів (UAA, UAG, UGA)

Продовження табл. 2

Рибосоми (70S $\leftrightarrow$ 30S + 50S)	Рибонуклеопротеїнові частинки, які складаються з двох нерівних субодиниць, що здійснюють синтез поліпептидів, зокрема 50S субодиниця каталізує утворення пептидного зв'язку між амінокислотами
N-формілметіоніл-тРНК ^{fMet}	Ініціаторна аміноацил-тРНК у прокаріотів, антикодон якої комплементарний старт-кодону мРНК
Нерибосомні білкові фактори	Білки, що необхідні для відповідних етапів трансляції – ініціації (IF-1, IF-2, IF-3); елонгації (EF-T _U , EF-T _S , EF-G) та термінації (RF-1, RF-2, RF-3)
ATP, GTP	Джерела енергії

У процесі синтезу поліпептидного ланцюга виділяють 3 стадії: ініціацію, елонгацію, термінацію. *На стадії ініціації* відбувається збирання ініціаторного комплексу, що для прокаріотів починається із взаємодії факторів ініціації IF-3 і IF-1 з малою субодиницею (30S) рибосоми. Далі приєднується мРНК та ініціаторна N-формілметіоніл-тРНК^{fMet} у складі комплексу з фактором ініціації IF-2 і GTP. Коли антикодон N-формілметіоніл-тРНК^{fMet} розпізнає ініціаторний кодон мРНК, GTP гідролізується до GDP і P_i, і до комплексу приєднується 50S субодиниця рибосоми, а всі фактори ініціації вивільнюються. В результаті формується функціонально активна 70S рибосома – *ініціаторний* комплекс, що містить два тРНК-зв'язувальні центри: Р-центр (пептидильний), в якому розташовується ініціаторна N-формілметіоніл-тРНК^{fMet}, і вільний А-центр (аміноацильний).

На стадії елонгації вільний А-центр рибосоми приєднує (акцептує) аміноацил-тРНК, антикодон якої комплементарний наступному після старт-кодону триплету мРНК, у комплексі з фактором елонгації EF-T_U і GTP. Після зв'язування антикодона аміноацил-тРНК з кодоном мРНК GTP гідролізується і комплекс EF-T_U-GDP залишає рибосому. Потім утворюється пептидний зв'язок між N-формілметіоніном та амінокислотою, акцептованою А-центром. Реакцію каталізує пептидилтрансферазний центр 23S рРНК великої субодиниці. В А-центрі опиняється дипептидил-тРНК, а в Р-центрі залишається вільна (деацильована) тРНК.

На завершальному етапі елонгації за участю фактора елонгації EF-G у комплексі з GTP відбувається переміщення рибосоми на три нуклеотиди вздовж мРНК у напрямку від 5'-кінця до 3'-кінця, вільна тРНК, що віддала амінокислоту, переміщується в Е-центр (для деацильованих тРНК), а дипептидил-тРНК з А-центру – у Р-центр. У результаті транслокації в А-центр приходить третій кодон мРНК. Цикл елонгації повторюється з надходженням нової аміноацил-тРНК в А-центр.

Термінація трансляції відбувається після того, як до А-центру потрапляє один із стоп-кодонів (UAA, UAG, UGA), що розпізнаються білковими факторами термінації (RF-1 або RF-2). Активація пептидилтранс-

феразного центру внаслідок приєднання фактора термінації RF-3 у комплексі з GTP до 50S субодиноці спричинює гідролітичне відщеплення синтезованого поліпептиду від тРНК. Після вивільнення поліпептиду і тРНК рибосома дисоціює на субодиноці, які можуть знову залучатися до біосинтезу білка.

Після завершення синтезу поліпептидні ланцюги можуть піддаватися пострасляційним модифікаціям, що включають: згортання (фолдинг) поліпептидного ланцюга в тривимірну структуру, обмежений протеоліз, утворення дисульфідних зв'язків між залишками цистеїну, ковалентні модифікації амінокислотних залишків (фосфорилування, глікозилювання і т. ін.), приєднання лігандів тощо. У результаті білок набуває нативної конформації зі специфічною біологічною активністю.

Контрольні питання з теми 3.2

1. Що таке транскрипція? Який механізм транскрипції? Стисло охарактеризуйте основні стадії транскрипції.
2. Яку реакцію каталізують ДНК-залежні РНК-полімерази? Назвіть субстрати, матрицю, джерела енергії для реакції, що каталізується цією групою ферментів.
3. Що таке транскриптон? Оперон? Яка їхня структура?
4. Що таке промотор? Яка структура промоторів прокаріотичних генів?
5. Що таке процесинг РНК? Які реакції включає процесинг попередників мРНК в еукаріотів?
6. Що таке трансляція? Які стадії виділяють в процесі трансляції?
7. Які фактори трансляції беруть участь у кожній із стадій і яка їхня роль?
8. Що таке рекогніція? Яка роль аміноацил-тРНК-синтетази у рекогніції?
9. Яку функцію виконують тРНК у синтезі білка?
10. Який компонент білоксинтезуючої системи відповідальний за каталіз пептидного зв'язку між амінокислотними залишками?
11. У якому напрямку під час трансляції зчитується мРНК? Синтезується поліпептидний ланцюг?

Тестові питання з теми 3.2

1. Одиниця транскрипції у прокаріотів називається:
А. Оператором.
Б. Опероном.
В. Кодоном.
Г. Антикодоном.
Д. Цистроном.
2. Як називається ділянка ДНК, з якою зв'язується РНК-полімераза перед початком транскрипції?
А. Ориджин.

- Б. Екзон.
- В. Інtron.
- Г. Промотор.
- Д. Оператор.

3. До складу холоферменту ДНК-залежної РНК-полімерази прокариотів входять такі субодиниці:

- А. $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$.
- Б. $\alpha\beta\beta'\omega\sigma$.
- В. $\beta\beta'\omega\sigma$.
- Г. $\alpha_2\beta\beta'\sigma$.
- Д. $\alpha_2\beta\beta'\omega$.

4. Яка з субодиниць РНК-полімерази прокариотів залучена до специфічного впізнання промотора?

- А. Альфа.
- Б. Бета.
- В. Омега.
- Г. Сигма.
- Д. Жодна.

5. Виберіть, які сполуки використовуються як субстрати в процесі транскрипції в клітинах еукаріотів:

- А. dATP, dCTP, dGTP, dUTP.
- Б. dADP, dCDP, dGDP, dTDP.
- В. ATP, CTP, GTP, UTP.
- Г. ADP, CDP, GDP, TDP.
- Д. ATP, CTP, GTP, TTP.

6. У комплексі аміноацил-тРНК амінокислота сполучена з тРНК за допомогою зв'язку:

- А. Пептидного.
- Б. Глікозидного.
- В. Фосфодіестерного.
- Г. Водневого.
- Д. Естерного.

7. Процес приєднання амінокислот до тРНК за участю аміноацил-тРНК-синтетаз називається:

- А. Сплайсингом.
- Б. Процесингом.
- В. Ініціацією.
- Г. Рекогніцією.
- Д. Рекомбінацією.

8. В процесі трансляції як джерело енергії використовується гідроліз:

- А. АТР.

- Б. GTP.
- В. CTP.
- Г. TTP.
- Д. UTP.

9. Пептидилтрансферазна активність пов'язана з:

- А. мРНК.
- Б. тРНК.
- В. 5S рРНК.
- Г. 16S рРНК.
- Д. 23S рРНК.

10. Який із білкових факторів залучений до ініціації трансляції у прокаріотів?

- А. RF-1.
- Б. IF-2.
- В. eIF-4G.
- Г. EF-T_U.
- Д. EF-G.

Тема 3.3. Гормональна регуляція метаболізму

Загальна характеристика гормонів та механізмів їхньої дії

Регуляція клітинних процесів здійснюється через системи сигнальної трансдукції, що перетворюють різноманітні сигнали фізичної і хімічної природи на зміни активності білків і у такий спосіб впливають на процеси життєдіяльності. До сигнальних молекул належать різноманітні сполуки, які можуть зв'язатись з відповідними рецепторами і змінити активність клітинних білків. Сигнальні молекули і сигнальні каскади зустрічаються у всіх живих організмів, але мають особливості у різних таксономічних груп. Гормони є різновидом сигнальних молекул тварин, що продукуються у спеціалізованих ендокринних залозах і виділяються у кров для переносу до клітин-мішеней. Також існують тканинні гормони (гістогормони), які чинять свої регуляторні ефекти на клітини-мішені, що розташовані у безпосередній близькості від місця їхнього синтезу. Загалом регуляторна дія гормонів на клітинні процеси здійснюється або через регуляцію кількості молекул білків, або через зміну активності вже існуючих білків шляхом алостеричної регуляції, ковалентної модифікації тощо. Кінцевими мішенями сигнальних каскадів переважно стають білки-ферменти, транскрипційні фактори або мембранні транспортери.

За розчинністю гормони поділяють на гідрофільні, до яких належать білки, пептиди та деякі похідні амінокислот, і ліпофільні – стероїдні гормони, йодтироніни, ретиноева кислота. Гормони специфічно зв'язуються з відповідними білками-рецепторами за рахунок слабких взаємодій (електростатичних, водневих, гідрофобних). Усі рецептори в залежності від їхньої локалізації можна розділити на дві групи: мембранні та внутрішньоклітинні. Мембранні рецептори розташовані на поверхні плазматичної мембрани клітин і взаємодіють з водорозчинними гормонами, що приводить до передачі регуляторного сигналу всередину клітини. Внутрішньоклітинні рецептори локалізовані в цитоплазмі або в ядрі, і після зв'язування з ліпофільними сигнальними молекулами змінюють швидкість транскрипції певних генів, і як наслідок, в клітині змінюється кількість відповідних білків.

Мембранні рецептори залежно від їхньої молекулярної організації та активності поділяють на три типи: (а) рецептори, що мають тирозинкіназну активність і при активації фосфорилують білок-мішень для передачі сигналу (рецептори інсуліну, факторів росту, цитокінів), (б) рецептори, що формують іонний канал, який відкривається при зв'язуванні гормону чи нейромедіатора (рецептори ацетилхоліну, γ -аміномасляної кислоти), (в) ре-

цептори, які взаємодіють з GTP-зв'язувальними білками (G-білками) та передають сигнал на інші білки-ефектори, зазвичай на ферменти: аденілатциклазу, фосфоліпазу C, фосфоліпазу A₂ та інші, що відповідають за утворення вторинних месенджерів. До найважливіших вторинних (внутрішньоклітинних) месенджерів належать циклічні нуклеотиди (сАМР, сGMP), іони Ca²⁺, інозитол-1,4,5-трифосфат, діацилгліцерол, сфінголіпіди та монооксид азоту (NO). Після зв'язування гормону з рецептором відбувається зміна конформації рецептора, що впливає на його ферментативну активність або спорідненість до інших білків. Прикладом сигнального каскаду за участю вторинних месенджерів є робота аденілатциклазної системи за дії адреналіну на β-рецептори, глюкагону, тиреотропіну, кортикотропіну та ін.

На відміну від гідрофільних, ліпозчинних сигнальних молекул надходять у клітини-мішені шляхом дифузії через плазматичну мембрану і зв'язуються з внутрішньоклітинними цитоплазматичними або ядерними рецепторами. Приєднання гормону викликає конформаційні зміни в молекулі рецептору, що забезпечує перенесення комплексу в ядро (якщо рецептор перебував у цитоплазмі) і його зв'язування зі специфічними послідовностями ДНК (гормон-чутливими елементами, HRE – hormone response element). Як результат змінюється швидкість транскрипції певних генів. Отже, основний ефект ліпофільних гормонів реалізується через активацію або гальмування експресії генів, що потребує більше часу для прояву ефекту, тоді як гідрофільні гормони змінюють активність білків, зокрема ферментів і транспортерів, що вже через кілька хвилин може позначитися на обміні речовин і фізіологічних реакціях.

Приклади дії гормонів на обмін речовин

Ендокринна система побудована за ієрархічною системою та у значній мірі перебуває під контролем центральної нервової системи (ЦНС). Нейроендокринні клітини гіпоталамусу секретують гормони, що посилюють (ліберини) або пригнічують (статини) синтез та секрецію тропних гормонів гіпофіза. Гіпофізарні гормони стимулюють синтез та секрецію гормонів периферичних ендокринних залоз, які надходять у кров та взаємодіють із клітинами-мішенями, викликаючи зміни клітинного метаболізму. Концентрація гормонів в організмі контролюється через механізми позитивного та негативного зворотного зв'язку. Так, наявність певних внутрішньоклітинних метаболітів у крові впливає на швидкість синтезу і секреції гормонів відповідних периферичних ендокринних залоз або гіпоталамусу. Синтез і секреція тропних гормонів гіпофіза регулюється концентрацією у крові гормонів периферичних залоз. При порушенні механізмів регуляції обміну гормонів виникають ендокринні та метаболічні захворювання.

Особливу роль у регуляції обміну вуглеводів, ліпідів та білків відіграють гормони інсулін, глюкагон та адреналін. Глюкагон та інсулін належать до групи білково-пептидних гормонів, що синтезуються відповідно альфа- і бета-клітинами підшлункової залози. Ці гормони здійснюють регуляцію метаболізму при зміні абсорбтивного та постабсорбтивного періодів та при голодуванні.

Інсулін має різноманітні біологічні ефекти, пов'язані із впливом на метаболізм, синтез білків, диференціювання та проліферацію клітин. Основним регулятором секреції інсуліну є глюкоза: чим вища концентрація глюкози, тим більша швидкість виділення гормону. Зниження рівню глюкози під впливом інсуліну обумовлено: (а) впливом на мембранні транспортери глюкози, що збільшує захоплення глюкози клітинами; (б) індукцією глюкокінази в гепатоцитах, що знижує внутрішньоклітинну концентрацію вільної глюкози та сприяє її переносу із крові за градієнтом концентрації; (в) стимуляцією ферментів, що відповідають за використання глюкози в різних метаболічних шляхах, зокрема на синтез глікогену та ліпідів.

Глюкагон є основним гормоном, який збільшує концентрацію глюкози у крові, що є результатом (а) посилення розпаду глікогену та зниження його синтезу в печінці, (б) гальмування окиснення глюкози і збільшення швидкості глюконеогенезу, зокрема з амінокислот. У жировій тканині глюкагон стимулює ліполіз, що викликає вивільнення жирних кислот – джерело енергії для різних тканин, а для печінки – субстрат для синтезу кетонових тіл.

Адреналін стимулює процеси, необхідні для адаптації організму до стресових ситуацій. Синтезується з тирозину у мозковому шарі наднирників. Основні органи-мішені – печінка, м'язи, жирова тканина. Адреналін стимулює розпад та пригнічує синтез глікогену, стимулює гліколіз у м'язах та глюконеогенез у печінці. В результаті активується надходження глюкози з печінки в кров, що дозволяє в умовах стресу забезпечити енергетичним субстратом мозок і м'язи, що скорочуються. У жировій тканині адреналін стимулює розпад триацилгліцеролів і вихід у кров жирних кислот. У такий спосіб скелетні м'язи і міокард забезпечуються ще одним енергетичним субстратом для функціонування за умов стресу.

Гормони щитоподібної залози синтезуються з тирозину із залученням іонів йоду. 3,5,3',5'-Тетрайодтиронін (тироксин, Т4) та 3,5,3'-трийодтиронін (Т3) є гідрофобними молекулами і діють через ядерні рецептори, які постійно зв'язані з певними сайтами ДНК, що забезпечує вплив на регуляцію експресії генів. Біологічні функції тиреоїдних гормонів різноманітні: збільшення швидкості основного обміну, окиснення вуглеводів, ліпідів, амінокислот, регуляція біосинтезу білків, диференціювання та проліферація клітин, зростання та розвиток органів та тканин тощо.

Стероїдні гормони синтезуються з холестерину і за особливостями структури поділяються на три типи: C_{21} -стероїди (кортикостероїди, прогестин), C_{19} -стероїди (андрогени), C_{18} -стероїди (естрогени).

Гормони кори надниркових залоз або кортикостероїди (C_{21} -стероїди) синтезуються у корі наднирників і поділяються за типом біологічних ефектів на глюкокортикоїди (кортизол і кортизон, серед найбільш важливих ефектів – регуляція обміну вуглеводів та білків) та мінералокортикоїди (альдостерон та дезоксикортикостерон, регулюють водно-сольовий обмін).

Основним місцем синтезу жіночих статевих гормонів (естрогенів та прогестинів) є яєчники. Чоловічі статеві гормони – андрогени – виробляються в інтерстиціальних клітинах Лейдіга сім'яників. Статеві гормони забезпечують розвиток статевих ознак, мають виражений вплив на синтез білків, нуклеїнових кислот та обмін ліпідів.

Методи якісного і кількісного визначення гормонів

Вміст гормонів зазвичай визначається у біологічних зразках з діагностичною метою або для оцінки чистоти гормональних препаратів. Методи дослідження залежать від хімічної природи гормонів і можуть базуватись на хімічних або імунологічних реакціях та особливостях спектра поглинання.

Лабораторна робота 18.

Якісні реакції на білково-пептидні гормони

До групи гормонів білково-пептидної природи належать гіпоталамо-гіпофізарні гормони, гормони паращитоподібної та підшлункової залоз, нейропептиди тощо. Гормони цієї групи представлені пептидами, простими і складними (глікопротеїнами) білковими молекулами.

Інсулін (гормон, що синтезується і секретується β -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози) належить до простих білків і дає характерні кольорові реакції на білок, що зумовлені наявністю пептидних зв'язків або специфічних груп амінокислот: біуретову, ксантопротеїнову, Фоля тощо.

Дослід 1. Біуретова реакція

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності пептидних груп білків утворювати в лужному середовищі з сірчанокислої міддю забарвлені в синьо-фіолетовий колір комплекси.

Матеріали і реактиви.

1. NaOH – 10 % розчин.
2. Cu_2SO_4 – 1 % розчин.
3. Інсулін – розчин для ін'єкцій.

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, піпетки мірні градуйовані або автоматичні дозатори об'ємом 1 мл, крапельниці.

Хід роботи.

У пробірку внести 5 крапель розчину інсуліну, додати 0,5 мл 10 % розчину NaOH і 1–2 краплі 1 % розчину Cu_2SO_4 , перемішати. Вміст пробірки забарвлюється в синьо-фіолетовий колір.

Дослід 2. Ксантопротеїнова реакція

Принцип методу. Реакція зумовлена наявністю в більшості білків ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину, триптофану), які під час нагрівання з азотною кислотою піддаються нітруванню. Утворені нітропохідні амінокислот забарвлені в жовтий колір, який в лужному середовищі змінюється на помаранчевий.

Матеріали і реактиви.

1. HNO_3 – концентрований розчин.
2. NaOH – 30 % розчин.
3. Інсулін – розчин для ін'єкцій.

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, водяна баня, піпетки мірні градуйовані об'ємом 1 мл, крапельниці.

Хід роботи.

У пробірку внести 5 крапель препарату інсуліну, додати 0,5 мл концентрованої HNO_3 і *обережно нагріти* на киплячій водяній бані. У разі появи жовтого забарвлення *суміш охолодити* й додати 30 % розчин NaOH по краплях до появи помаранчевого забарвлення.

Дослід 3. Реакція Фоля на сірковмісні амінокислоти

Принцип методу. Реакція зумовлена наявністю в білках амінокислот зі «слабозв'язаною сіркою» – цистеїну і цистину. Нагрівання білків із концентрованими розчинами лугів призводить до відщеплення сірки від амінокислот, унаслідок чого утворюється сірководень, який, реагуючи з лугом, утворює сульфід натрію. При додаванні ацетату свинцю утворюється сірчистий свинець (сульфід свинцю), що випадає в осад сіро-чорного кольору.

Матеріали і реактиви.

1. NaOH – 30 % розчин.
2. $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ – 5 % розчин.
3. Інсулін – розчин для ін'єкцій.

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, водяна баня, крапельниці.

Хід роботи.

У пробірку внести 5 крапель розчину інсуліну, додати 10 крапель 30 % розчину NaOH і 1 краплю 5 % розчину $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. Вміст пробірки перемішати. Витримати пробірку з сумішшю на киплячій водяній бані 2 хв. Через 3–5 хв випадає осад сіро-чорного кольору.

Лабораторна робота 19.

Якісні реакції на гормони – похідні амінокислот

До групи гормонів – похідних амінокислот належать гормони щитоподібної залози, гормони та нейромедіатори мозкового шару надниркових залоз, так звані катехоламіни, гістогормони (гістамін, серотонін), гормон епіфіза (мелатонін).

Дослід 1. Якісні реакції на адреналін

Принцип методу. Адреналін синтезується в хромафінних клітинах мозкового шару надниркових залоз. Попередником у біосинтезі адреналіну є тирозин, молекула якого в процесі перетворення на гормон піддається гідроксилюванню, декарбоксилюванню, метилюванню. В результаті гідроксилювання кільце тирозину перетворюється на катехол, який є сильним відновником. При окисненні катехолове кільце утворює сполуки, забарвлені у різні кольори. Саме на цій властивості катехолового кільця ґрунтується низка якісних реакцій на адреналін.

1.1 Діазореакція. При взаємодії адреналіну з діазореактивом (суміш сульфанілової кислоти та нітриту натрію) утворюється сполука червоного кольору типу азобарвника.

Матеріали і реактиви.

1. Сульфанілова кислота – 1 % розчин.
2. NaNO_2 – 5 % розчин.
3. NaCO_3 – 10 % розчин.
4. Розчин адреналіну (1:1000).

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, крапельниці.

Хід роботи.

У пробірку внести 3 краплі 1 % сульфанілової кислоти, 3 краплі 5 % нітриту натрію, 5 крапель розчину (1:1000) адреналіну і 3 краплі 10 % карбонату натрію. Перемішати. Розчин в пробірці набуває червоного забарвлення.

1.2. Реакція з йодатом калію. Під час взаємодії адреналіну з йодатом калію в кислому середовищі утворюється сполука червоно-фіолетового кольору.

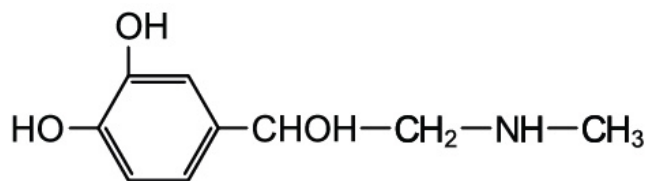
Матеріали і реактиви.

1. KIO_3 – 10 % розчин.
2. CH_3COOH – 10 % розчин.
3. Розчин адреналіну (1:1000).

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, водяна баня, крапельниці.

Хід роботи.

У пробірку внести 3 краплі розчину адреналіну (1:1000), 2–3 краплі 10 % йодату калію і 2 краплі 10 % оцтової кислоти. Пробірку з сумішшю нагріти до температури 60–65 °С. Вміст пробірки набуває червоно-фіолетового забарвлення.



1.3. Реакція з хлорним залізом. Під час взаємодії адреналіну з ферум (III) хлоридом утворюється комплексна сполука типу феноляту зеленого кольору. Забарвлення комплексу зумовлене гідроксильними групами катехолового кільця. У лужному середовищі адреналін легко окиснюється киснем повітря з утворенням адренохрому, внаслідок чого розчин забарвлюється в червоний колір, а потім при появі продуктів полімеризації адренохрому набуває коричневого забарвлення.

Матеріали і реактиви.

1. FeCl_3 – 1 % розчин.
2. NaOH – 10 % розчин.
3. Розчин адреналіну (1:1000).

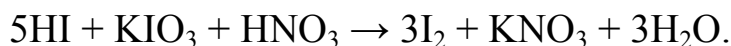
Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, крапельниці.

Хід роботи.

У пробірку внести 3–5 крапель розчину адреналіну (1:1000) і 1 краплю 1 % розчину хлорного заліза. Вміст пробірки набуває смарагдово-зеленого забарвлення. При додаванні в пробірку 1 краплі 10 % розчину NaOH забарвлення змінюється на червоне, а потім – на коричневе.

Дослід 2. Якісна реакція на йодтироніни

Принцип методу. Під час кислотного гідролізу тиреоїдних гормонів (йодтиронінів) відщеплюється йодоводнева кислота (HI), що окиснюється у вільний йод при додаванні йодату калію. Вільний йод екстрагують хлороформом. Хлороформ, що містить йод, забарвлюється у фіолетовий колір.



Матеріали і реактиви.

1. HNO_3 – концентрований розчин.
2. KIO_3 – 1 % розчин.
3. Хлороформ.
4. Тиреоїдин – лікарський препарат.

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, водяна баня, піпетки мірні градуйовані об'ємом 1 мл, крапельниці.

Хід роботи.

Як джерело тиреоїдних гормонів використовується лікарський препарат тиреоїдин, який виділяють зі щитоподібної залози тварин. Помістити у пробірку пів таблетки тиреоїдину і додати 10 крапель концентрованої азотної кислоти. *Обережно нагріти* протягом 1–2 хв на киплячій водянній бані. Потім внести 20 крапель 1 % розчину йодату калію, перемішати та охолодити. У пробірку прилити 1–2 мл хлороформу, струсити протягом кількох секунд і залишити до розшарування. Шар хлороформу набуває фіолетового забарвлення.

Лабораторна робота 20.

Якісні реакції на стероїдні гормони

До стероїдних гормонів належать гормони кори надниркових залоз (глюкокортикоїди та мінералокортикоїди) і статеві гормони (естрогени, прогестерон і тестостерон).

Дослід 1. Якісні реакції на фолікулін (естрон)

1. Реакція з концентрованою сірчаною кислотою.

Принцип методу. Під час взаємодії фолікуліну з концентрованою сірчаною кислотою утворюється фолікулінсульфат – сполука солом'яно-жовтого кольору.

Матеріали і реактиви.

1. H_2SO_4 – концентрований розчин.
2. Фолікулін – 0,1 % спиртовий розчин.

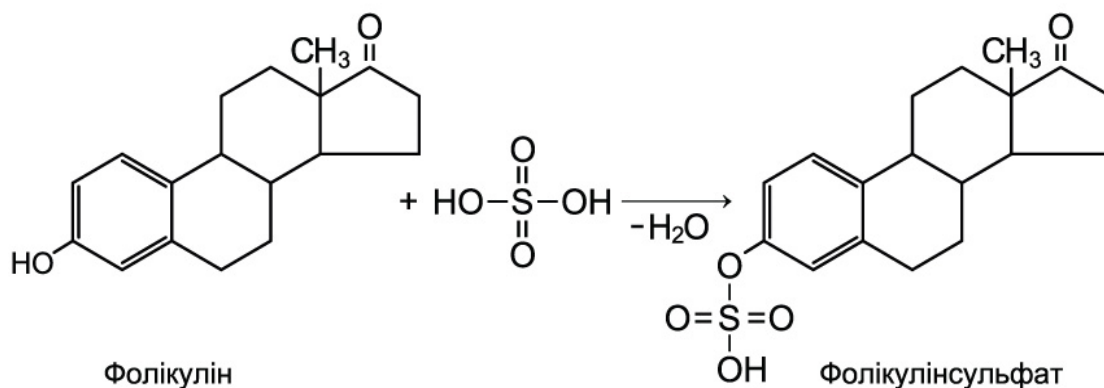
Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, водяна баня, крапельниці.

Хід роботи.

У суху пробірку внести 20–30 крапель спиртового розчину фолікуліну і помістити в киплячу водяну баню на 5–10 хв для видалення спирту. Потім у пробірку додати 20–30 крапель концентрованої сірчаної кислоти і знову помістити пробу в киплячу водяну баню на 5–10 хв. Вміст пробірки поступово набуває солом'яно-жовтого забарвлення, яке змінюється на помаранчеве.

2. Реакція з реактивом Фоліна.

Принцип методу. Під час взаємодії фолікуліну з реактивом Фоліна, який складається із солей фосфоровольфрамової та фосфомолібденової кислот, утворюються комплекси синього кольору. Реакція зумовлена наявністю фенольної групи в молекулі фолікуліну.



Матеріали і реактиви.

1. NaOH – 30 % розчин.
2. Реактив Фоліна – 1 н розчин.
3. Фолікулін – 0,1% спиртовий розчин.

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, крапельниці.

Хід роботи.

У пробірку внести 5 крапель розчину фолікуліну, додати по 2–3 краплі 30 % розчину гідроксиду натрію і реактиву Фоліна. Вміст пробірки забарвлюється в синій колір.

3. Реакція на 17-кетогрупу.

Принцип методу. Кінцевими продуктами обміну статевих гормонів і гормонів кори надниркових залоз є 17-кетостероїди, для яких характерна наявність кетогрупи при 17-му атомі вуглецю циклопентанпергідрофенантронового ядра. При взаємодії 17-кетостероїдів у лужному середовищі з *m*-динітробензолом утворюються продукти конденсації вишнево-червоного кольору. Ця реакція використовується і для кількісного визначення 17-кетостероїдів у сечі.

Матеріали і реактиви

1. NaOH – 30 % розчин.
2. *m*-Динітробензол – 2 % розчин в абсолютному етанолі.
3. Фолікулін – 0,1 % спиртовий розчин.

Обладнання. Хімічні пробірки, штатив, крапельниці.

Хід роботи.

У суху пробірку внести по 5 крапель розчину фолікуліну, 30 % розчину гідроксиду натрію і 2 % спиртового розчину *m*-динітробензолу. Вміст пробірки перемішати. Через 3–8 хв вміст пробірки набуває вишнево-червоного забарвлення.

Результати, отримані при проведенні якісних реакцій на гормони, оформити у вигляді таблиці.

Назва гормону	Місце синтезу гормону	Хімічна природа	Тип рецепторів, механізм дії	Біологічна роль	Якісні реакції	Продукти реакції

Лабораторна робота 21. **Кількісне визначення адреналіну**

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності адреналіну відновлювати солі фосфорновольфрамкової і фосформолібденової кислот реактиву Фоліна з утворенням оксидів металів з нижчим ступенем окиснення, комплекси яких забарвлені у синій колір. Інтенсивність забарвлення реакційного розчину визначають колориметричним методом.

Матеріали і реактиви.

1. Na₂CO₃ – 10 % розчин (свіжоприготований).

2. Реактив Фоліна – 1 н розчин.

3. Стандартний розчин адреналіну, який містить 0,04 мг адреналіну в 1 мл (4 мг%). Для приготування стандартного розчину в мірну колбу об'ємом 25 мл внести 1 мл розчину адреналіну (1:1000) і довести до мітки водою.

4. Досліджуваний розчин адреналіну.

Обладнання. Мірні пробірки об'ємом 10 мл, штатив, мірна колба на 25 мл, піпетки мірні градуйовані об'ємом 1 і 4 мл, крапельниці.

Хід роботи.

У сухі мірні пробірки об'ємом не менше 10 мл налити реактиви відповідно до схеми, що представлена в таблиці.

Відміряти в пробірці, мл	Калібрувальна проба	Дослідна проба	Холоста проба
Стандартний розчин адреналіну	1,0	–	–
Досліджуваний розчин адреналіну	–	1,0	–
Дистильована вода	–	–	1,0
Розчин вуглекислого натрію	4,0	4,0	4,0
Реактив Фоліна	0,5	0,5	0,5

Вміст кожної пробірки ретельно перемішати. Рідина поступово набуває синього забарвлення. Через 5 хв об'єм рідини в пробірках довести до 10 мл, додаючи по 4,5 мл 10 % розчину вуглекислого натрію. Вміст пробірок перемішати і виміряти оптичну щільність калібрувальної ($E_{КАЛИБ}$) і дослідної ($E_{ДОСЛ}$) проб проти холостої при червоному світлофільтрі (540–750 нм) в кюветі з довжиною оптичного шляху 5 або 10 мм.

Розрахунок.

$$C_{ДОСЛ} = C_{КАЛИБ} \frac{E_{ДОСЛ}}{E_{КАЛИБ}},$$

де $C_{ДОСЛ}$ – концентрація адреналіну в досліджуваному розчині, мг%;

$C_{КАЛИБ}$ – концентрація адреналіну в стандартному розчині, що дорівнює 4 мг%;

$E_{ДОСЛ}$ і $E_{КАЛИБ}$ – оптична щільність досліджуваного і стандартного розчинів відповідно.

Для більш точного визначення концентрації адреналіну необхідно за стандартним розчином побудувати калібрувальний графік. Зі стандартного розчину адреналіну методом розведення приготувати серію робочих розчинів з концентрацією адреналіну 1, 2, 3, 4 мг%, як зазначено в таблиці, що наведена нижче, а потім додати всі реактиви, як і в дослідну пробу.

Параметр	Маркування пробірок				
	Холоста	1	2	3	4
Стандартний розчин адреналіну, мл	–	1	0,75	0,5	0,25
Дистильована вода, мл	1	–	0,25	0,5	0,75
Концентрація адреналіну в робочому розчині (мг%)	0	4	3	2	1
Оптична щільність розчину (E)	–				

Виміряти оптичну щільність робочих розчинів проти холостої проби. Отримані результати відобразити графічно, відкладаючи по осі абсцис концентрацію адреналіну в робочих розчинах, а по осі ординат – величини оптичних щільностей відповідних робочих розчинів. Після визначення оптичної щільності досліджуваного розчину знайти в ньому концентрацію адреналіну за калібрувальним графіком (приклад розрахунку за допомогою калібрувального графіка дивіться в лабораторній роботі № 12).

У нормі вміст адреналіну в плазмі крові становить менше ніж 0,1 нг/мл, а в сечі – 5–15 мкг/добу.

Клініко-діагностичне значення. Збільшення концентрації адреналіну в крові спостерігається за феохромоцитомі, за різкого зниження рівня глюкози в крові, гострого інфаркту міокарда, тривалого болювого синдрому, вживання низки лікарських препаратів (кофеїн, етанол, теофілін, інсулін тощо), а також під час емоційного та фізичного навантаження. Зниження концентрації адреналіну в крові трапляється рідше і може спостерігатися при ураженні гіпоталамуса, міастенії, гострих лейкозах.

У лабораторному журналі записати результати визначення вмісту адреналіну у досліджуваному розчині.

Контрольні питання з теми 3.3

1. Що собою являють гормони? Як класифікують гормони за хімічною природою? За розчинністю у воді? Навести приклади.
2. У який спосіб гормони впливають на метаболізм в клітинах?
3. Що собою являють рецептори гормонів? Чим обумовлена специфічність зв'язування гормону з рецептором? Які взаємодії забезпечують утворення гормон-рецепторного комплексу?
4. Що собою являють мембранні рецептори? Які типи мембранних рецепторів відомі?
5. Який механізм дії гідрофільних гормонів? Ліпофільних гормонів?
6. Які сполуки належать до вторинних посередників дії гормонів? Які шляхи їх утворення в клітині?
7. За допомогою якої якісної реакції можна виявити гормони пептидно-білкової природи?

8. На чому ґрунтуються якісні реакції на адреналін?
9. Як впливає на метаболізм вуглеводів, ліпідів і білків інсулін? Глюкагон? Адреналін?
10. Який принцип методу і діагностичне значення кількісного визначення адреналіну у крові та сечі?

Тестові завдання з теми 3.3

1. Перелічені сполуки належать до вторинних посередників в передачі гормонального сигналу в клітини, за винятком:
 - А. цАМФ.
 - Б. цГМФ.
 - В. Діацилгліцерол.
 - Г. Гліцерол.
 - Д. Інозитолтрифосфат.
2. Перелічені положення правильно характеризують метаболічні ефекти інсуліну, за винятком:
 - А. Збільшує транспорт глюкози до м'язової і жирової тканин.
 - Б. Активує синтез і пригнічує розпад глікогену в печінці.
 - В. Стимулює синтез жирів у жировій тканині.
 - Г. Знижує концентрацію глюкози в крові.
 - Д. Активує глюконеогенез в печінці.
3. До гормонів, що є похідними амінокислот, належать:
 - А. Тироксин, адреналін.
 - Б. Глюкагон, соматотропін.
 - В. Альдостерон, кортизол.
 - Г. Ретиноєва кислота.
 - Д. Тестостерон, прогестерон.
4. До гормонів білково-пептидної природи не належить:
 - А. Інсулін.
 - Б. Глюкагон.
 - В. Вазопресин.
 - Г. Альдостерон.
 - Д. Кортикотропін.
5. Яке з тверджень, що характеризує гормони, помилкове?
 - А. Гормони синтезуються в клітинах-мішенях.
 - Б. Регулюють експресію генів.
 - В. Змінюють активність ферментів в клітинах.
 - Г. Ефекти гормонів опосередковані їхньою взаємодією з рецепторами.
 - Д. Синтез і секреція гормонів регулюється за механізмом зворотного зв'язку.

6. Які молекули є рецепторами тиреоїдних гормонів?
 - А. Глікопротеїни та гліколіпіди плазматичної мембрани.
 - Б. Цитозольні білки, що зв'язані з шаперонами.
 - В. Ядерні білки, що зв'язані з ДНК.
 - Г. Білки, що утворюють іонні канали.
 - Д. Білки, що зв'язані з мембранами ЕПР.
7. Де в клітині локалізовані рецептори ліпофільних гормонів?
 - А. Мітохондрії.
 - Б. Цитозоль та ядро.
 - В. Плазматична мембрана.
 - Г. Пероксисоми.
 - Д. Лізосоми.
8. Перелічені положення правильно характеризують метаболічні ефекти глюкагону, за винятком:
 - А. Активує аденілатциклазу.
 - Б. Пригнічує синтез і активує мобілізацію глікогену в печінці.
 - В. Стимулює ліполіз у жировій тканині.
 - Г. Пригнічує гліколіз і активує глюконеогенез в печінці.
 - Д. Стимулює мобілізацію глікогену в м'язах.
9. При дії гідрофільних гормонів посилення сигналу всередині клітини зумовлене:
 - А. Збільшенням концентрації рецепторів.
 - Б. Безпосередньою взаємодією гормону з хроматином.
 - В. Утворенням вторинних посередників.
 - Г. Повторним використанням гормону.
 - Д. Взаємодією гормону з цитозольними білками.
10. До білків-ефекторів, що беруть участь у передачі сигналу від гідрофільних гормонів в середину клітини, не належить:
 - А. Аденілатциклаза.
 - Б. Гуанілатциклаза .
 - В. Фосфоліпаза С.
 - Г. Глікогенфосфорилаза.
 - Д. Фосфоліпаза А₂.

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ПОТОЧНОГО КОНТРОЛЮ

Ферментативний каталіз

1. Загальні і специфічні властивості ферментів як каталізаторів.
2. Поняття про активний центр ферменту. Особливості амінокислотного складу активного центру ферментів.
3. Основні етапи і молекулярні механізми ферментативного каталізу.
4. Як залежить швидкість ферментативної реакції від концентрації ферменту? Від концентрації субстрату? Рівняння Міхаеліса–Ментен. Розкрити біологічний сенс K_M і V_{max} .
5. Структура простих і складних ферментів. Поняття про апофермент, кофактор, кофермент, простетичну групу і холофермент. Функції коферменту і апоферменту.
6. Фактори, що впливають на швидкість ферментативних процесів. Охарактеризувати вплив pH і температури.
7. Функціональні центри ферментів та їхня роль у ферментативному каталізі. Фермент-субстратні взаємодії: уявлення Фішера і Кошланда.
8. Ізоферменти та їхня біологічна роль. Приклади ізоферментів.
9. Структура активного центру ферменту. Хімічна і субстратна специфічність. Приклади.
10. Основні кінетичні характеристики ферментативних реакцій і їхнє графічне відображення.
11. Вплив активаторів та інгібіторів на швидкість ферментативних реакцій. Механізми їхньої дії. Навести приклади.
12. Алостеричні ферменти: особливості будови і функціонування, локалізація в метаболічних шляхах. Приклади.
13. Принципи регуляції метаболічних шляхів. Механізми тривалої і термінової регуляції.
14. Визначення активності ферментів. Одиниці активності ферментів.
15. Характеристика коферментів, що беруть участь у перенесенні атомів водню й електронів. Навести приклади.
16. Характеристика коферментів, що беруть участь у реакціях синтезу, ізомеризації і розщеплення вуглець-вуглецевих зв'язків. Навести приклади.
17. Характеристика коферментів, що беруть участь у перенесенні хімічних груп. Навести приклади.

18. Характеристика основних способів регуляції активності ферментів. Навести приклади.

19. Загальний принцип каталізу. Енергія активації. Молекулярні механізми ферментативного каталізу.

20. Класифікація і номенклатура ферментів. Стисла характеристика класів ферментів. Приклади.

Основи біоенергетики. Біологічне окиснення.

Дихальний ланцюг

21. Високо- і низькоенергетичні фосфати. АТФ і її роль в енергетичних процесах.

22. Біологічне окиснення, типи, функції.

23. Цитохроми та піридин- і флавінзалежні дегідрогенази мітохондрій.

24. Послідовність компонентів дихального ланцюга мітохондрій.

25. Характеристика молекулярних комплексів внутрішніх мембран мітохондрій.

26. Окисне фосфорилування: пункти спряження транспорту електронів і фосфорилування, дихальний контроль.

27. Хеміосмотична теорія окисного фосфорилування.

28. Структура АТФ-синтаза мітохондрій. Синтез АТФ.

29. Молекулярна організація електронтранспортних ланцюгів мембран ЕПР, ферменти, біологічна роль.

30. Цитохром Р-450: особливості функціонування та біологічна роль.

Основні закономірності обміну речовин.

Цикл трикарбонових кислот

31. Загальні закономірності метаболізму. Катаболічні та анаболічні процеси.

32. Катаболізм основних класів біомолекул: специфічні і спільні стадії.

33. Цикл Кребса. Реакції, ферменти, регуляція, біологічна роль.

34. Характеристика піруватдегідрогеназного мультиферментного комплексу. Регуляція.

35. Характеристика α -кетоглутаратдегідрогеназного мультиферментного комплексу.

36. Енергетичний баланс циклу трикарбонових кислот. Біологічне значення реакцій ЦТК.

Біологічні мембрани. Механізми транспорту

37. Види біологічних мембран та їхні основні функції. Основні властивості біологічних мембран.

38. Стисла характеристика компонентів біологічних мембран. Роль окремих компонентів мембран у формуванні структури і виконанні функцій.

39. Перенесення речовин через біологічні мембрани. Механізми пасивного та активного транспорту. Навести приклади.

40. Перенесення частинок і високомолекулярних сполук через мембрани. Навести приклади.

Метаболізм вуглеводів і його регуляція

41. Анаеробний розпад глюкози. Послідовність реакцій і ферменти гліколізу. Регуляція. Біологічна роль процесу. Енергетичний баланс анаеробного розпаду глюкози.

42. Аеробне окиснення глюкози. Етапи перетворення глюкози в CO_2 і H_2O . Регуляція.

43. Окисне декарбоксилювання пірувату. Ферменти, коферменти і перебіг реакцій в мультиферментному комплексі.

44. Енергетичний баланс окиснення глюкози в анаеробних і аеробних умовах. Ефект Пастера.

45. Біосинтез глікогену: ферментативні реакції, фізіологічне значення. Регуляція активності глікогенсинтази.

46. Фосфоролітичний шлях розщеплення глікогену в печінці. Регуляція активності глікогенфосфорилази.

47. Глюконеогенез: субстрати, ферменти та біологічна роль процесу.

48. Глюкозо-лактатний цикл (цикл Корі). Біологічна роль.

49. Пентозофосфатний шлях окиснення глюкози: схема процесу, транскетолазні та трансальдолазна реакції, біологічна роль, регуляція.

50. Ферментативний гідроліз вуглеводів у шлунково-кишковому тракті: субстрати, ферменти, продукти.

51. Продукти ферментативного гідролізу вуглеводів їжі. Всмоктування моносахаридів із просвіту кишечника. Транспорт моносахаридів із ентероцитів в кров.

52. Транспорт глюкози із крові до клітин. Внутрішньоклітинний метаболізм глюкози.

Метаболізм ліпідів і його регуляція

53. Перетравлення ліпідів (тригліцеридів, фосфоліпідів, ефірів холестерину) і всмоктування продуктів їхнього гідролізу у шлунково-кишковому тракті.

54. Ресинтез жирів у слизовій оболонці кишечника. Транспорт жирів із кишечника хіломікронами.

55. β -Окиснення жирних кислот у мітохондріях: ферменти, коферменти, етапи, енергетичний баланс. Роль карнітину в транспорті жирних кислот до мітохондрій.

56. Кетонові тіла. Реакції біосинтезу та утилізації кетонових тіл, фізіологічна роль. Енергетичний баланс окиснення ацетоацетату.

57. Біосинтез вищих насичених жирних кислот. Реакція утворення малоніл-КоА. Послідовність реакцій, що каталізуються синтазою жирних кислот. Регуляція.

58. Біосинтез триацилгліцеролів і фосфогліцеридів. Зв'язок вуглеводного і ліпідного обміну.

59. Біосинтез холестерину: схема реакцій, регуляція синтезу холестерину. Шляхи біотрансформації холестерину.

60. Ліпопротеїни плазми крові: будова, ліпідний і білковий склад, біологічна роль.

61. Порівняння β -окиснення жирних кислот в мітохондріях і пероксисомах. Інші види окиснення жирних кислот (α - і ω -окиснення) та їхня біологічна роль.

62. Структура, біосинтез і біологічна роль ейкозаноїдів.

Метаболізм білків та амінокислот і його регуляція

63. Повноцінні і неповноцінні білки. Перетравлення білків і всмоктування продуктів їхнього гідролізу в шлунково-кишковому тракті.

64. Протеолітичні ферменти шлунково-кишкового тракту і регуляція їхньої активності.

65. Транспорт амінокислот до клітин.

66. Джерела і шляхи використання вільних амінокислот в організмі людини і тварин.

67. Реакції трансамінування амінокислот, основні субстрати і продукти, механізм дії амінотрансфераз. Біологічна роль.

68. Пряме і непряме дезамінування вільних L-амінокислот в тканинах.

69. Декарбоксилювання L-амінокислот. Фізіологічне значення продуктів, що утворюються. Реакції інактивації біогенних амінів.

70. Загальні шляхи метаболізму вуглецевих скелетів амінокислот. Глюкогенні і кетогенні амінокислоти.

71. Особливості метаболізму фенілаланіну і тирозину в різних тканинах організму людини. Спадкові порушення обміну фенілаланіну і тирозину.

72. Метаболізм сірковмісних амінокислот (метіоніну і цистеїну) та їхня біологічна роль.

73. Джерела утворення аміаку, його токсичні ефекти та шляхи знешкодження аміаку в організмі. Основні кінцеві продукти азотистого обміну у людини і тварин.

74. Біосинтез сечовини: послідовність ферментативних реакцій. Зв'язок орнітинового циклу і ЦТК.

75. Біосинтез замінних амінокислот і його регуляція в організмі людини.

Метаболізм нуклеїнових кислот і нуклеотидів та його регуляція

76. Перетравлення нуклеїнових кислот їжі в шлунково-кишковому тракті.

77. Біосинтез пуринових нуклеотидів: ключові реакції шляху, джерела атомів вуглецю та азоту пуринових основ, утворення AMP і GMP, механізми регуляції.

78. Біосинтез піримідинових нуклеотидів: послідовність реакцій утворення UMP, утворення CTP і dTMP, механізми регуляції.

79. Катаболізм пуринових і піримідинових нуклеотидів.

80. Будова (структурні формули, типи зв'язків між компонентами) та біохімічні функції вільних нуклеотидів.

Молекулярні механізми передачі і реалізації генетичної інформації

81. Реплікація ДНК: біологічне значення, напівконсервативний механізм реплікації, поняття реплікону і реплікативної вилки.

82. Основні компоненти реплісом (ДНК-полімерази, гелікази, топоізомерази, SSB-білки, праймази, ДНК-лігази) прокаріотів.

83. Послідовність подій у реплікативній вилці у прокаріотів. Синтез провідного ланцюга і ланцюга ДНК, що запізнюється.

84. ДНК-полімерази прокаріотів: особливості будови та функції.

85. Загальна характеристика процесу транскрипції. РНК-полімераза *E. coli*.

86. РНК-полімерази еукаріотів. Процесинг первинних транскриптів мРНК еукаріотів.

87. Основні закономірності генетичного коду.

88. Адапторна гіпотеза Ф. Кріка та її докази. Неоднозначна відповідність у процесі кодон-антикодового спарювання («wobble» гіпотеза Ф. Кріка) та її біологічна роль.

89. Транспортні РНК та активація амінокислот. Аміноацил-тРНК-синтетази.

90. Загальна характеристика функціональних центрів рибосом.

91. Біосинтез білка в рибосомах прокаріотів: етапи трансляції, основні білкові фактори.

Гормональна регуляція метаболізму. Інтеграція та регуляція метаболізму

92. Основні системи регуляції метаболізму та їхній взаємозв'язок. Роль гормонів у регуляції обміну речовин і функцій.

93. Гормони: загальна характеристика та класифікація.

94. Загальна характеристика рецепторів гормонів: мембранні та внутрішньоклітинні рецептори.

95. Механізми передачі гормональних сигналів у клітини через мембранні рецептори: G-білки, вторинні посередники (сАМР, сGMP, Ca^{2+} / кальмодулін, ІФ₃, ДАГ).

96. Механізми передачі гормональних сигналів у клітини через внутрішньоклітинні рецептори.

97. Механізми передачі гормональних сигналів у клітини через рецептори, що пов'язані з іонними каналами.

98. Інсулін: будова, біохімічні механізми регуляторного впливу на метаболізм вуглеводів, ліпідів, амінокислот, білків. Структура інсулінового рецептору.

99. Глюкагон: будова, біохімічні механізми регуляторного впливу на обмін вуглеводів і ліпідів. Механізми передачі гормонального сигналу у клітини.

100. Регуляція рівня глюкози в крові. Роль адреналіну, глюкагону та інсуліну.

101. Основні метаболічні шляхи і регуляторні реакції. Взаємодія метаболічних шляхів на рівні ключових проміжних сполук: глюкозо-6 фосфату, пірувату і ацетил-КоА.

ЛІТЕРАТУРА

1. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі : навч. посібник / Т. І. Бондарчук, Н. М. Гринчишин, Л. І. Кобилінська та ін.; за ред. О. Я. Склярова. – К. : Медицина, 2010. – 360 с.
2. Біоорганічна хімія. Практикум : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, І. В. Компанець, О. В. Скопенко та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2019. – 400 с.
3. Біохімія : підручник / Л. І. Остапченко, Т. Р. Андрійчук, Ю. Д. Бабенюк та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2012. – 796 с.
4. Біохімія : підруч. для студентів фармацевт. спец. / [А. Л. Загайко та ін.] ; за ред. проф. А. Л. Загайка, проф. К. В. Александрової. – Харків : Форт, 2014. – 725 с.
5. Біохімія. Практикум / Л. І. Остапченко, І. В. Компанець, О. В. Скопенко та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2018. – 296 с.
6. Біохімія : тестовий контроль / М. Е. Кучеренко, О. Ю. Пашенко, І. М. Туряниця та ін. – К. : Либідь, 1995. – 339 с.
7. Боєчко Ф. Ф. Лабораторний практикум з біохімії : навчально-методичний посібник / Ф. Ф. Боєчко, Л. О. Боєчко, І. В. Шмиголь. – Черкаси : ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2015. – 279 с.
8. Вороніна Л. М. Біологічна хімія / Л. М. Вороніна, В. Ф. Десенко, Н. М. Мадієвська та ін. – Харків : Основа, 2000. – 607 с.
9. Гонський Я. І. Біохімія людини : підручник / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук, М. І. Калинський. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2002. – 744 с.
10. Губський Ю. І. Біохімія : підручник / Ю. І. Губський. – Київ – Вінниця : Нова книга, 2009. – 664 с.
11. Інструкції Філісіт-Діагностика / Режим доступу: <https://felicity.com.ua/instructions> (Дата звернення: 17.06.25)
12. Копильчук Г. П., Николайчук І. М. Лабораторний практикум із біохімії : навч.-метод. посібник. – Чернівці : Чернівець. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2019. – 144 с.
13. Кучеренко М. Є. Сучасні методи біохімічних досліджень / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войцицький. – К. : Укрфіто-соціологічний центр, 2001. – 424 с.
14. Лабораторні та семінарські заняття з біологічної хімії : навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл. / Л. М. Вороніна, В. Ф. Десенко, А. Л. Загайко та ін. – Х. : Вид-во НФаУ – Оригінал, 2004. – 384 с.
15. Нельсон Д. Л., Кокс М. М. Основи біохімії за Ленінджером : навч. посібник / переклад з англ., наук. ред. перекладу С. Комісаренко. – Львів : Бак, 2015. – 1280 с.

16. Нікітченко І. В. Біохімія : навчально-методичний посібник / І. В. Нікітченко, Т. В. Бараннік, Н. І. Буланкіна. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2015. – 192 с.
17. Особливості дотримання техніки безпеки при роботі в біохімічній та хімічній лабораторіях : навч. посібник для студентів та викладачів вузів / К. В. Александрова, В. М. Швець, М. В. Дячков, Д. А. Васильєв. – Запоріжжя : [ЗДМУ], 2017. – 76 с.
18. Практикум з біологічної хімії / [Д. П. Бойків, О. Л. Іванків, Л. І. Кобилінська та ін.] ; за ред. О. Я. Складярова. – К. : Здоров'я, 2002. – 298 с.
19. Фізичні методи в молекулярній генетиці. Практикум : навч. посіб. / К. С. Афанасьєва. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2016. – 127 с.
20. Biochemical Nomenclature Committee of IUPAC and NC-IUBMB. Newsletter 2018. Translocases (EC 7): A new EC Class. – Режим доступу: <https://iubmb.qmul.ac.uk/newsletter/2018.html> (Дата звернення: 18.06.25).

Для нотаток

Навчальне видання

Нікітченко Ірина Василівна
Бараннік Тетяна Володимирівна

**ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ
З БІОХІМІЇ**

Навчально-методичний посібник

Рисунки виконано *Н. Ю. Нікітченко*
Коректор *Л. В. Стешенко*
Комп'ютерне верстання *В. В. Савінкова*
Макет обкладинки *І. М. Дончик*

Формат 60х84/16. Ум. друк. арк. 7,59. Наклад 100 пр. Зам. № 554/23.

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