

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

Л. І. ОСТАПЧЕНКО, І. В. КОМПАНЕЦЬ,
О. В. СКОПЕНКО, Т.Б. СИНЕЛЬНИК,
О. О. КРАВЧЕНКО, С. М. БЕРЕГОВИЙ

БІОХІМІЯ

ПРАКТИКУМ



УДК 576.3(075.8)
ББК 28.05я73

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф., акад. НАН України С. О. Костерін
(Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України),
д-р біол. наук, проф. М. С. Мірошніченко
(Київський національний університет імені Тараса Шевченка)

*Рекомендовано до друку вченою радою
ННЦ "Інститут біології та медицини"*

*Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол № 10 від 10 квітня 2017 року)*

*Ухвалено науково-методичною радою
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол №4-16/17 н.р. від 16 червня 2017 року)*

K90 Біохімія. Практикум / Л. І. Остапченко, І. В. Компанець, О. В. Скопенко та ін. – К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2018. – с.

Системно викладено основи сучасної цитології з елементами молекулярної біології. Проаналізовано сучасні уявлення щодо еволюції клітинної форми життя, основні етапи розвитку методів дослідження клітини. Наведено структурно-функціональний аналіз поверхневого апарату клітини і його участі в міжклітинній сигналізації та адгезії. Із сучасних позицій молекулярної біології висвітлено принципи структурно-функціональної організації цитозолю, клітинного ядра, органел. З урахуванням гістофізіологічних підходів розглянуто особливості функціонування клітини в нормі та висвітлено закономірності змін у її будові й функціях ультраклітинних структур із розвитком певних патологій. Наведено теоретичні та практичні аспекти застосування основних цитологічних прийомів, що ввійшли у практику біологів і патологів. Друге видання, суттєво доповнене й перероблене.

Для студентів біологічних факультетів вищих навчальних закладів.

УДК 576.3(075.8)

ISBN

© Остапченко Л. І., І. В. Компанець, О. В. Скопенко та ін. 2018
© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2018

ЗМІСТ

Список умовних скорочень.....	13
Вступ.....	16

Розділ 1. Обмін білків

Тема 1. Перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті18

1.1.1. Принципи перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті.....	18
1.1.2. Механізми всмоктування амінокислот у кишечнику.....	19
1.1.3. Аналіз шлункового соку.....	20
1.1.4. Гниття білків у кишечнику.....	21

Лабораторна робота № 1.1. Аналіз складу і властивостей шлункового соку.....

23

Дослід 1. Якісні реакції на вільну соляну кислоту у шлунковому соку

23

Дослід 2. Якісна реакція на молочну кислоту у шлунковому соку

24

Дослід 3. Визначення загальної кислотності, вільної а зв'язаної соляної кислоти в одній пробі шлункового соку

24

Лабораторна робота № 1.2. Визначення протеолітичної активності ферментів шлунково-кишкового тракту.....

26

Лабораторна робота № 1.3. Оцінка стану процесів гниття білків у кишечнику.....

27

Дослід 1. Виявлення ефірів сірчаної кислоти в сечі.....

27

Дослід 2. Визначення вмісту тваринного індикану в сироватці крові та сечі

28

Контрольні запитання.....

29

Тема 2. Проміжний обмін амінокислот.....30

1.2.1. Найважливіші метаболічні перетворення амінокислот.....	30
1.2.2. Клінічне значення визначення активності трансаміназ.....	33
1.2.3. Біологічна роль амінів	34
1.2.4. Шляхи обміну безазотистого залишку амінокислот	37

<i>Лабораторна робота № 1.4. Вивчення процесів</i>	
трансамінування амінокислот	38
<i>Дослід 1. Виявлення процесів трансамінування α-амінокислот</i>	
у м'язовій тканині з використанням хроматографічного методу	38
<i>Дослід 2. Визначення аланінамінотрансферазної активності</i>	
сироватки крові методом Райтмана – Френкеля	
з використанням набору реактивів	40
<i>Дослід 3. Визначення аспартатамінотрансферазної</i>	
активності сироватки крові методом Райтмана-Френкеля	
із використанням набору реактивів	42
<i>Лабораторна робота № 1.5. Вивчення процесів</i>	
декарбоксилювання амінокислот	43
<i>Дослід 1. Якісне виявлення декарбоксилаз</i>	
у бактерій (метод Є. М. Губарева та Ю.В. Галаєва)	43
<i>Дослід 2. Реакція ідентифікації гістаміну із солями кобальту</i>	47
<i>Контрольні запитання</i>	48
Тема 3. Специфічні шляхи обміну амінокислот	49
1.3.1. Особливості обміну гліцину	49
1.3.2. Особливості обміну аргініну	49
1.3.3. Особливості обміну сірковмісних амінокислот	50
1.3.4. Особливості обміну фенілаланіну й тирозину	51
1.3.5. Особливості обміну триптофану	52
1.3.6. Особливості обміну розгалужених амінокислот	53
<i>Лабораторна робота № 1.6. Вивчення особливостей</i>	
обміну фенілаланіну	54
<i>Дослід 1. Експрес-метод визначення підвищеного вмісту</i>	
фенілаланіну в крові (за Ф. Б. Левіним)	54
<i>Дослід 2. Якісна реакція на фенілпірвіноградну</i>	
кислоту (проба Фелінга)	56
<i>Контрольні запитання</i>	56
Тема 4. Обмін аміаку в організмі. Біосинтез сечовини	57
1.4.1. Біосинтез сечовини в печінці	57
1.4.2. Роль печінки в обміні білків	57
1.4.3. Клінічне значення визначення аміаку, сечовини	
та залишкового азоту крові	60

<i>Лабораторна робота № 1.7. Визначення вмісту сечовини у біологічних рідинах</i>	<i>61</i>
<i>Дослід 1. Визначення сечовини в сечі уреазним методом.....</i>	<i>63</i>
<i>Дослід 2. Визначення вмісту сечовини в біологічних рідинах діацетилмоноксимним методом із використанням набору реактивів</i>	<i>64</i>
<i>Лабораторна робота № 1.8. Визначення вмісту аміаку в сечі</i>	<i>66</i>
<i>Лабораторна робота № 1.9. Визначення вмісту залишкового азоту крові (метод Боданського)</i>	<i>67</i>
<i>Контрольні запитання.....</i>	<i>69</i>
Тема 5. Розпад та оновлення білків. Специфічність білків	70
1.5.1. Характеристика ферментів розпаду білків у тканинах	70
1.5.2. Убіквітинзалежна деградація білків у протеасомі	71
1.5.3. Інгібітори протеїназ. Значення для клініки	74
1.5.4. Молекули середньої маси як маркери протеолізу білків за ендогенної інтоксикації.....	75
1.5.5. Специфічність білків. Біохімічні основи групової сумісності крові	76
1.5.6. Білки й амінокислоти як лікарські препарати	80
<i>Лабораторна робота № 1.10. Кількісне визначення вмісту гідроксипроліну (оксипроліну) в сечі</i>	<i>81</i>
<i>Лабораторна робота № 1.11. Визначення вмісту молекул середньої маси в сироватці крові</i>	<i>82</i>
<i>Контрольні запитання.....</i>	<i>83</i>
<i>Тестові завдання до розділу I.....</i>	<i>83</i>

Розділ 2. Обмін вуглеводів

Тема 1. Обмін вуглеводів у шлунково-кишковому тракті	87
2.1.1. Принципи перетворення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті.....	87
2.1.2. Механізми всмоктування моносахаридів у кишечнику.....	88
<i>Лабораторна робота № 2.1. Дія ферментів шлунково-кишкового тракту на вуглеводи.....</i>	<i>88</i>

<i>Лабораторна робота № 2.2. Ферментативне розщеплення крохмалю</i>	90
<i>Лабораторна робота № 2.3. Визначення α-амілазної активності в біологічних рідинах (за Каравесем) із використанням наборів реактивів</i>	92
<i>Контрольні запитання</i>	93
Тема 2. Внутрішньоклітинний обмін моносахаридів	94
2.2.1. Синтез глікогену	95
2.2.2. Фосфоролітичне розщеплення глікогену	95
2.2.3. Гліколіз.....	96
2.2.4. Глюконеогенез.....	98
2.2.5. Цикл Корі.....	99
2.2.6. Пентозофосфатний шлях	100
<i>Лабораторна робота № 2.4. Кількісне визначення глюкози крові</i>	101
<i>Дослід 1. Визначення вмісту глюкози в крові глюкозооксидазним методом</i>	101
<i>Дослід 2. Визначення вмісту глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом з використанням набору для клінічної діагностики</i>	103
<i>Дослід 3. Визначення вмісту глюкози в крові за Гультманом</i>	104
<i>Лабораторна робота № 2.5. Виявлення молочної і піровиноградної кислот у біологічному матеріалі</i>	105
<i>Дослід 1. Кількісне визначення вмісту піровиноградної кислоти за модифікованим методом Умбрайта</i>	105
<i>Дослід 2. Кількісне визначення молочної кислоти методом Бюхнера</i>	107
<i>Лабораторна робота № 2.6. Визначення загальної лактатдегідрогеназної активності сироватки крові (кінетичний УФ-метод із використанням набору реактивів)</i>	108
<i>Лабораторна робота № 2.7. Визначення сіалових кислот у сироватці крові</i>	111
<i>Дослід 1. Реакція Гесса на сіалові кислоти</i>	111
<i>Дослід 2. Визначення сіалових кислот за реакцією з резорцином</i>	112
<i>Контрольні запитання</i>	113
<i>Тестові завдання до розділу 2</i>	114

Розділ 3. Обмін ліпідів

Тема 1. Обмін ліпідів у шлунково-кишковому тракті.....	117
3.1.1. Роль жовчних кислот у розщепленні жирів.....	117
3.1.2. Особливості розщеплення у шлунково-кишковому тракті ліпідів різних класів.....	118
3.1.3. Усмоктування продуктів травлення ліпідів у кишечнику. Ресинтез жирів у кишечнику.....	119
<i>Лабораторна робота № 3.1. Виявлення жовчних кислот.....</i>	<i>120</i>
<i>Лабораторна робота № 3.2. Вплив жовчі на активність ліпази триацилгліцеролів.....</i>	<i>121</i>
<i>Контрольні запитання.....</i>	<i>122</i>
Тема 2. Транспорт ліпідів у крові. Ліпопротеїни та їхній метаболізм	123
3.2.1. Особливості будови й функцій ліпопротеїнів різних класів	123
3.2.2. Метаболізм ліпопротеїнів.....	124
<i>Лабораторна робота № 3.3. Визначення загальних ліпідів у сироватці крові з використанням набору для клінічної діагностики</i>	<i>126</i>
<i>Лабораторна робота № 3.4. Визначення вмісту ліпопротеїнів у плазмі крові</i>	<i>127</i>
<i>Лабораторна робота №3.5. Визначення вмісту холестеролу в сироватці крові.....</i>	<i>129</i>
<i>Дослід 1. Визначення холестеролу в сироватці крові ферментативним методом з використанням набору для клінічної діагностики.....</i>	<i>129</i>
<i>Дослід 2. Визначення вільного і загального холестеролу в сироватці крові за Н. Станкевичене</i>	<i>130</i>
<i>Дослід 3. Визначення вмісту холестеролу ліпопротеїнів високої щільності в сироватці та плазмі крові прямим методом із використанням набору реактивів</i>	<i>131</i>
<i>Дослід 4. Визначення вмісту холестеролу ліпопротеїнів низької щільності в сироватці та плазмі крові прямим методом із використанням набору реактивів</i>	<i>133</i>
<i>Контрольні запитання.....</i>	<i>135</i>

Тема 3. Обмін ліпідів у тканинах	136
3.3.1. β -окиснення жирних кислот	136
3.3.2. Утворення кетонів	137
3.3.3. Біосинтез насичених жирних кислот	138
<i>Лабораторна робота № 3.6. Визначення кетонів у сечі</i>	139
Дослід 1. Проба Лібена на ацетон	139
Дослід 2. Проба Люголя на ацетон і ацетоацетат	140
Дослід 3. Проба Герхарда на ацетооцтову кислоту	140
Дослід 4. Проба на β -оксимасляну кислоту	141
Дослід 5. Кількісне визначення кетонів	141
<i>Контрольні запитання</i>	143
Тема 4. Пероксидне окиснення ліпідів. Антиоксидантні системи	144
3.4.1. Активні форми кисню	144
3.4.2. Пероксидне окиснення ліпідів	145
3.4.3. Антиоксидантні системи	148
<i>Лабораторна робота № 3.7. Визначення продуктів пероксидного окиснення ліпідів у тканинах</i>	153
Дослід 1. Визначення гідропероксидів ліпідів	153
Дослід 2. Визначення малонового діальдегіду	154
<i>Лабораторна робота № 3.8. Визначення супероксиддисмутазної активності в біологічному матеріалі</i>	155
<i>Лабораторна робота № 3.9. Визначення каталазної активності сироватки крові</i>	156
<i>Лабораторна робота № 3.10. Проба Ратнера (лінгвальна проба) на вміст в організмі вітаміну С</i>	157
<i>Контрольні запитання</i>	158
<i>Тестові завдання до розділу 3</i>	158

Розділ 4. Обмін нуклеїнових кислот

Тема 1. Обмін нуклеопротеїнів і нуклеїнових кислот у шлунково-кишковому тракті	161
4.1.1. Ферменти розпаду нуклеїнових кислот	161

4.1.2. Загальні принципи обміну нуклеопротейнів і нуклеїнових кислот у шлунково-кишковому тракті	162
<i>Лабораторна робота № 4.1. Визначення активності рибонуклеази за кислоторозчинними продуктами розпаду РНК методом Шнейдера і Хогебума.....</i>	<i>163</i>
<i>Лабораторна робота № 4.2. Турбідиметричне визначення активності рибонуклеази методом Хаука.....</i>	<i>164</i>
<i>Лабораторна робота № 4.3. Визначення активності дезоксирибонуклеази за кислоторозчинними продуктами розпаду ДНК</i>	<i>165</i>
<i>Дослід 2. Метод Шнейдера і Хогебума</i>	<i>165</i>
<i>Дослід 3. Метод Алфрея і Мирського</i>	<i>165</i>
<i>Лабораторна робота № 4.4. Визначення активності дезоксирибонуклеази за утворенням кислотних груп методом Алфрея та Мирського</i>	<i>166</i>
<i>Лабораторна робота № 4.5. Спектрофотометричне визначення активності дезоксирибонуклеази за методом Куніца</i>	<i>167</i>
<i>Контрольні запитання</i>	<i>168</i>

Тема 2. Обмін азотистих основ. Біосинтез дезоксирибонуклеотидів і нуклеїнових кислот	169
4.2.1. Біосинтез пуринових основ і рибонуклеотидів	169
4.2.2. Розпад пуринових основ.....	171
4.2.3. Біосинтез піримідинових основ і рибонуклеотидів	173
4.2.4. Катаболізм піримідинових основ	175
4.2.5. Біосинтез дезоксирибонуклеотидів і нуклеїнових кислот.....	176
<i>Лабораторна робота № 4.6. Визначення вмісту сечової кислоти в біологічному матеріалі з використанням набору реактивів</i>	<i>178</i>
<i>Контрольні запитання</i>	<i>181</i>
<i>Тестові завдання до розділу 4.....</i>	<i>181</i>

Розділ 5. Метаболічні шляхи перетворення енергії

Тема 1. Цикл кребса	184
5.1.1. Джерела ацетил-КоА для циклу Кребса.....	184

5.1.2. Піруватдегідрогеназна реакція	185
5.1.3. Цикл Кребса.....	186
<i>Лабораторна робота № 5.1. Визначення вмісту проміжних метаболітів циклу трикарбонових кислот</i>	<i>188</i>
<i>Дослід 1. Визначення вмісту цитрату у м'язовій тканині.....</i>	<i>189</i>
<i>Дослід 2. Визначення кількості ізоцитрату у м'язовій тканині</i>	<i>190</i>
<i>Дослід 3. Визначення кількості α-кетоглутарату у м'язовій тканині</i>	<i>192</i>
<i>Дослід 4. Визначення кількості сукцинату у м'язовій тканині</i>	<i>194</i>
<i>Дослід 5. Визначення кількості малату у м'язовій тканині</i>	<i>196</i>
<i>Лабораторна робота № 5.2. Вивчення дії сукцинатдегідрогенази</i>	<i>198</i>
<i>Лабораторна робота № 5.3. Вивчення інгібуючої дії маленової кислоти на активність сукцинатдегідрогенази</i>	<i>200</i>
<i>Контрольні запитання.....</i>	<i>200</i>
Тема 2. Дихальний ланцюг і окисне фосфорилування.....	201
5.2.1. Компоненти й комплекси дихального ланцюга	201
5.2.2. Інгібітори дихального ланцюга.....	202
5.2.3. Механізм окисного фосфорилування	202
<i>Лабораторна робота № 5.4. Вивчення окисного фосфорилування</i>	<i>204</i>
<i>Дослід 1. Виділення мітохондрій, субмітохондріальних фрагментів та субмітохондріальних частинок</i>	<i>204</i>
<i>Дослід 2. Отримання субмітохондріальних фрагментів</i>	<i>205</i>
<i>Дослід 3. Отримання субмітохондріальних частинок із використанням ультразвуку</i>	<i>206</i>
<i>Дослід 4. Визначення ступеню спряження процесів окиснення і фосфорилування</i>	<i>207</i>
<i>Дослід 5. Визначення кількості та редокс-стану убіхінону в мітохондріях.....</i>	<i>211</i>
<i>Дослід 6. Визначення активності цитохромоксидази</i>	<i>213</i>
<i>Дослід 7. Визначення АТФазної активності мітохондрій.....</i>	<i>214</i>
<i>Контрольні запитання.....</i>	<i>216</i>
Тема 3. Особливості енергетичного обміну у м'язах і в нервовій тканині.....	217
5.3.1. Особливості енергетичного обміну у м'язах. Джерела АТФ для роботи м'язів	217

5.3.2. Роль креатину та його похідних у функціонуванні м'язів.....	218
5.3.3. Особливості енергетичного обміну в нервовій тканині	220
5.3.4. Енерговитратні процеси нервової системи.....	220
<i>Лабораторна робота № 5.5. Виявлення креатиніну у м'язах і в сечі</i>	<i>221</i>
<i>Лабораторна робота № 5.6. Визначення вмісту креатиніну і креатину в сечі</i>	<i>223</i>
<i>Лабораторна робота № 5.7. Визначення креатиніну в сироватці крові й сечі із застосуванням набору реактивів (метод Поппера)</i>	<i>225</i>
<i>Лабораторна робота № 5.8. Визначення активності креатинкінази у м'язовій тканині</i>	<i>228</i>
<i>Контрольні запитання.....</i>	<i>230</i>
<i>Тестові завдання до розділу 5.....</i>	<i>230</i>

Розділ 6. Гормони

Тема 1. Гормони як біорегулятори. Механізми дії гормонів	233
6.1.1. Принципи гормональної регуляції	233
6.1.2. Механізми дії гормонів.....	234
<i>Лабораторна робота № 6.1. Доведення білкової природи інсуліну.....</i>	<i>236</i>
Контрольні запитання.....	237

Тема 2. Роль гормонів та їх визначення в біологічних рідинах	238
6.2.1. Гормони гіпоталамуса	238
6.2.2. Гормони передньої частки гіпофіза.....	239
6.2.3. Гормони щитоподібної залози	239
6.2.4. Гормони-регулятори обміну кальцію.....	241
6.2.5. Гормони кори надниркових залоз.....	242
6.2.6. Гормони мозкової частини надниркових залоз	245
6.2.7. Статеві гормони.....	246
6.2.8. Гормони підшлункової залози	247
<i>Лабораторна робота № 6.2. Якісні реакції для визначення гормонів.....</i>	<i>248</i>
<i>Дослід 1. Реакція на гормони щитоподібної залози</i>	<i>248</i>
<i>Дослід 2. Реакція на адреналін з хлоридом заліза (III).....</i>	<i>249</i>

Дослід 3. Реакція на адреналін із діазореактивом	249
Лабораторна робота № 6.3. Кількісні реакції визначення вмісту гормонів	249
Дослід 1. Кількісне визначення адреналіну методом Фоліна.....	249
Дослід 2. Визначення 17-оксикортикостероїдів (17-ОКС) у плазмі крові	250
Дослід 3. Визначення рівня 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) у плазмі крові	253
Дослід 4. Визначення 17-кетостероїдів у сечі.....	254
Контрольні запитання	257
Тестові завдання до розділу 6.....	257
Розділ 7. Техніка безпеки та протипожежні заходи в біохімічній лабораторії	262
Додатки	270
Список літератури	293

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

11-ОКС – 11-оксикортикостероїди
17-КС – 17-кетостероїди
17-ОКС – 17-оксикортикостероїди
2,4-ДНФГ – 2,4-динітрофенілгідазин
GSH – відновлений глутатіон
GS-SG – окиснений глутатіон (глутатіондисульфід)
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid,
4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота
InH – антиоксидант
КоА – кофермент А
 $L^\bullet$ – ліпідний радикал
ЛН – ліпід
 $LO^\bullet$ – алкоксильний радикал
 $LOO^\bullet$ – пероксильний радикал
LOOH – гідропероксид ліпіду
 R_f – коефіцієнт розподілу
 $ROO^\bullet$ – пероксидний радикал жирної кислоти
ROOH – гідропероксид жирної кислоти
 α -ГБДГ – α -гідроксибутиратдегідрогеназа
АКТГ – кортикотропін
АлАТ – аланінамінотрансфераза
АПБ – ацилпереносний білок
АсАТ – аспартатамінотрансфераза
АТФ – аденозинтрифосфорна кислота
АФК – активні форми кисню
АХАТ – ацил-КоА:холестерол-ацилтрансфераза
ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія
ВІП – вазоактивний інтестинальний поліпептид
Г6Ф – глюкозо-6-фосфат
ГАМК – γ -аміномасляна кислота
ДАО – діамінооксидаза
ДЦДА – дикетогідриндилідендикетогідринамін
ДІТ – дийодтиронін
ДК – дихальний контроль
ДНКаз – дезоксирибонуклеаза
ДНП – дезоксирибонуклеопротеїни

ДОФА – 3,4-діоксифенілаланін
ДСН – додецилсульфат натрію
ДТТ – дитіотреїтол
ЕГТО – етиленглікольбісаміноетиловий ефір тетраоцтової кислоти
ЕДТО – етилендіамінтетраоцтова кислота
ЕПР – ендоплазматичний ретикулум
ІЗЦД – інсулінозалежний цукровий діабет
ІМФ – інозинова кислота
ІНЦД – інсулінонезалежний цукровий діабет
кат – катал (кількість ферменту, що здійснює за 1 с перетворення 1 моля субстрату)
КК – креатинкіназа
ЛГ – лютеїнізуючий гормон
ЛДГ – лактатдегідрогеназа
ЛПВЩ – ліпопротеїни високої щільності
ЛПДНЩ – ліпопротеїни дуже низької щільності
ЛПЕ – ланцюг перенесення електронів
ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності
ЛППЩ – ліпопротеїни проміжної щільності
ЛХАТ – лецитин:холестерол-ацилтрансфераза
МАО – моноамінооксидаза
МО – міжнародна одиниця активності ферментів
МСГ – меланотропін
МСМ – молекули середньої маси
НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид
НАДФ – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
 $\text{NO}^\bullet$ – гідроксильний радикал
 $\text{O}_2^{\bullet-}$ – супероксидний аніон (супероксид)
ПААГ – поліакриламідний гель
ПВК – піровиноградна кислота
ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
ПОМК – проопіомеланокортин
ПТГ – паратгормон
Р63Б – рибофлавінзв'язувальний білок
РНКаза – рибонуклеаза
РНП – рибонуклеопротейни
СДГ – сукцинатдегідрогеназа
СМФ – субмітохондріальні фрагменти
СМЧ – субмітохондріальні частинки

СОД – супероксиддисмутаза
СР – саркоплазматичний ретикулум
СТГ – соматотропний гормон
Т₃ – трийодтиронін
Т₄ – тироксин
ТГФК – тетрагідрофолієва кислота
ТЕМЕД – тетраетилметилендіамін
титр. од. – титраційні одиниці
трис – трисамінометан
ТТГ – тиреотропний гормон
ТХО – трихлороцтова кислота
УДФГК – уридиндифосфоглюкуронова кислота
УДФ-глюкоза – уридиндифосфоглюкоза
УЗДН – ультразвуковий дезінтегратор
Ф-1,6-дифосфат – фруктозо-1,6-дифосфат
Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат
ФАД – флавінаденіндинуклеотид
ФАФС – 3'-фосфоаденозил-5'-фосфосульфат
ФЕК – фотоелектроколориметр
ФМН – флавінмононуклеотид
Фн – неорганічний фосфат
ФРПФ – 5-фосфорибозил-1-пірофосфат
ФСГ – фолікулостимулювальний гормон
ЦНС – центральна нервова система
ЦТК – цикл трикарбонових кислот
ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ВСТУП

Дисципліна "Біохімія" викладається студентам денної та заочної форм навчання освітнього рівня "бакалавр", які навчаються за напрямом "Біологія" і є логічним продовженням дисципліни "Хімія біоорганічна". Тоді як біоорганічна хімія вивчає структуру та функції біологічних молекул, біохімія приділяє увагу процесам, пов'язаним з їхнім перетворенням, механізмам енергетичного обміну та регуляції обміну речовин.

Вивчення процесів обміну речовин проводиться сьогодні як у наукових дослідженнях на експериментальних моделях різних розладів, так і в клініці для діагностики захворювань, контролю ефективності їхньої терапії й пошуку нових лікарських засобів. Існує цілий ряд лабораторних методів, які дають змогу виявити сполуки, що утворюються у різних біохімічних процесах, а також за вмістом цих речовин оцінити активність ферментів їхнього синтезу. Так, визначення кінцевих продуктів і проміжних метаболітів шляхів перетворення білків, вуглеводів, ліпідів та нуклеїнових кислот дозволяє оцінити інтенсивність перебігу цих шляхів і виявити можливі їхні порушення. Важливим також є визначення активності регуляторних ферментів біохімічних перетворень, що надає інформацію про особливості регуляції метаболізму не тільки в нормі, а й при патології.

Отже, студентам, які вивчають дисципліну "Біохімія", слід опанувати розміщені у пропонованому виданні методи вивчення основних показників обміну речовин, що дасть їм змогу застосовувати набуті навички у власних наукових дослідженнях, а також при роботі в галузі лабораторної діагностики. У посібнику наведено протоколи експериментальних методик з вивчення основних показників обміну речовин, які використовуються не тільки у фундаментальних дослідженнях, а й у клінічній діагностиці. Зокрема, активність амінотрансфераз сироватки крові вимірюють при вивченні процесів обміну амінокислот, а також для оцінки функціонального стану печінки за таких хвороб як гепатит, цироз тощо. Визначення вмісту фенілаланіну у крові проводять з метою виявлення фенілкетонурії в новонароджених дітей. Вміст глюкози у крові, який установлюють глюкозооксидазним методом, є основним показником стану вуглеводного обміну в організмі й одним із найважливіших діагностичних маркерів цукрового діабету. За рів-

нем продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активності ферментів антиоксидантного захисту судять про стан клітинних мембран та окисно-відновний статус клітин, тому їх визначають при вивченні біохімічних механізмів розвитку і прогресування різних патологій, таких як онкологічні та нейродегенеративні захворювання (хвороби Альцгеймера, Паркінсона), інсульт, діабет, серцево-судинні хвороби, ожиріння, а також при дослідженні ефективності нових антиоксидантів.

Матеріал, поданий у посібнику, поділено на розділи, у яких розглянуто обмін амінокислот і білків, вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот в організмі, а також шляхи перетворення енергії та механізми гормональної регуляції обміну речовин. Окремі розділи поділяються на теми, що висвітлюють молекулярні особливості розщеплення відповідних біомолекул у шлунково-кишковому тракті, їхнє перетворення у клітинах та клінічне значення показників, що відображають інтенсивність перебігу даних процесів. У кожній темі присутній короткий теоретичний матеріал стосовно процесів обміну даного виду сполук та їхніх порушень, надається короткий огляд методів, які використовуються для їхнього дослідження, а також наведено протоколи відповідних лабораторних робіт. Ті з них, які мають діагностичне застосування, містять пояснення щодо інтерпретації отриманих даних у нормі та при патологіях. Для багатьох робіт використовуються набори реактивів, виготовлені вітчизняними й іноземними виробниками.

У кожному протоколі пропонованого практикуму в доступній формі наведено послідовність операцій, які студент може виконати самостійно, набуваючи навичок роботи з лабораторним посудом та обладнанням. У кінці кожної теми також подано контрольні запитання, а в кінці кожного розділу – тести до наведеного теоретичного матеріалу, принципів описаних лабораторних робіт та отриманих у них результатів.

Використання цього видання поліпшить розуміння студентом біохімічних основ метаболізму та сприятиме його формуванню як дослідника, здатного не тільки виконувати практичні методи, а й аналізувати експериментальні дані. Роботи, наведені у книзі, допоможуть студентові краще зрозуміти наявну в підручниках та навчальних посібниках інформацію щодо існуючих в організмі шляхів обміну макромолекул та власноруч дослідити їх на практиці. Створений нами посібник рекомендований студентам біологічних і медичних спеціальностей вищих навчальних закладів, які вивчають курс біохімії.

Розділ 1. ОБМІН БІЛКІВ

ТЕМА 1. ПЕРЕТРАВЛЕННЯ БІЛКІВ У ШЛУНКОВО-КИШКОВОМУ ТРАКТІ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

За добу дорослій людині в середньому необхідно спожити 100 г білка. Білки можуть бути повноцінними та неповноцінними. Повноцінні білки містять усі незамінні амінокислоти: валін, лейцин, ізолейцин, лізин, метіонін, треонін, аргінін. За добу розпадається й знову синтезується 400 г білка, оновлюються всі білки за 35 днів.

Мати уявлення про білковий обмін в організмі дозволяє *азотистий баланс* – кількісне співвідношення кількості азоту, який надходить у складі всіх продуктів, та кількості азоту, що виводиться, протягом доби:

- 1) *азотиста рівновага*: кількість азоту, який надходить за добу, дорівнює кількості азоту, що виводиться;
- 2) *позитивний азотистий баланс*: кількість азоту, який надходить, більша за кількість азоту, що виводиться за добу;
- 3) *негативний азотистий баланс*: кількість азоту, який надходить, менша за кількість азоту, що виводиться за добу.

Оскільки білки організмів відрізняються суворою видовою специфічністю, живий організм має здатність використовувати білок, що надходить, тільки після повного його гідролізу до амінокислот, із яких організм будує властиві йому специфічні білки. Тому білки, що надходять із продуктами харчування, підлягають перетравленню у шлунково-кишковому тракті (ШКТ) людини за дії протеолітичних ферментів.

1.1.1. Принципи перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті

У шлунку білки розщеплюються під впливом ферменту *пепсину* (ендопептидаза) при $\text{pH} = 1,5 - 2,5$ у присутності соляної кислоти. Утворені високомолекулярні поліпептиди надходять до дванадцятипалої кишки і при $\text{pH} = 7,8 - 8,4$ підлягають дії *трипсину*, *хімотрипсину*, *еластази* (ендопептидази) і *карбоксипепти-*

даз *A* і *B* (екзопептидаз). У результаті комплексної дії цих ферментів утворюються оліго-, ди- і трипептиди, а також вільні амінокислоти, які надходять до тонкого кишечника, де при $\text{pH} = 7,8 - 8,4$ за дії аміно-, ди-, три- і олігопептидаз (екзопептидази) відбувається їхнє розщеплення до вільних амінокислот.

У регуляції процесів травлення важливу роль відіграють біологічно активні сполуки, більшість яких формується безпосередньо у шлунково-кишковому тракті (гормоноїди місцевої дії). Наприклад, *гістамін* збільшує кількість шлункового соку, що виділяється. Він утворюється у слизовій оболонці шлунка, стимулює виділення соляної кислоти. *Гастрин* діє на головні й обкладові клітини шлунку, стимулюючи тим самим вироблення соляної кислоти і пепсиногену. У слизовій оболонці тонкої кишки виробляється *секретин*, котрий посилює секреторну функцію підшлункової залози, стимулюючи тим самим секрецію бікарбонатів. *Холецистокінін* впливає на підшлункову залозу, стимулюючи виділення ферментів підшлункової залози, *хімоденін* стимулює виділення хімотрисиногену, *ентерогастрон* гальмує секрецію соляної кислоти і пепсиногену, а *вілікінін* викликає скорочення кишкових війок.

1.1.2. Механізми всмоктування амінокислот у кишечнику

Усмоктування амінокислот через мембрану тонкого кишечника здійснюється за участю *глутатіону* (трипептиду γ -глутамініл-цистеїніл-гліцину) за дії ферменту *γ -глутамілтрансферази*, що міститься на мембрані слизової оболонки кишечника. Амінокислота утворює комплекс із глутатіоном, який проходить через мембрану; надалі цей комплекс розпадається на вільну амінокислоту й амінокислоти-похідні глутатіону, із яких потім із залученням енергії трьох молекул АТФ регенерується глутатіон.

Існує й інший механізм усмоктування амінокислот у тонкому кишечнику: їхній симпорт із натрієм (вторинно-активний транспорт, який здійснюється за рахунок градієнта концентрації іонів натрію, створеного Na^+ , K^+ -АТФазою). Після всмоктування у кишечнику амінокислоти надходять у кров ворітної вени, а з нею – до печінки, де підлягають ряду перетворень.

1.1.3. Аналіз шлункового соку

Шлунковий сік – секрет залоз слизової оболонки шлунку, що утворюється в кількості 1,5–2,0 л за добу – є безбарвною рідиною із сильнокислою реакцією ($\text{pH} = 1,5\text{--}2,5$). Шлунковий сік людини в нормі містить воду, соляну кислоту, пепсин, муцин, білки, хлористий натрій, кислореагуючі фосфати і ряд інших речовин, а при патології – молочну кислоту й леткі жирні кислоти.

Для оцінки вмісту всіх кислих продуктів у шлунковому соку визначають такий біохімічний показник, як *кислотність шлункового соку*. Її виражають у кількості мл 0,1 н. розчину їдкого натрію, що витрачається на нейтралізацію 100 мл відфільтрованого шлункового соку.

Розрізняють наступні види кислотності:

- *загальна кислотність*, обумовлена сукупністю всіх кислореагуючих речовин (норма 40–60 титрувальних одиниць (титр. од.));
- *вільна HCl* , обумовлена наявністю вільної соляної кислоти (у нормі становить 20–40 титр. од.);
- *зв'язана HCl* – соляна кислота, зв'язана з білками та продуктами їхнього перетравлення (у нормі становить 15–20 титр. од.).

При підвищенні загальної кислотності й вільної HCl говорять про *гіперацидний стан*. Підвищена кислотність може вказувати на виразку шлунка і гіперацидний гастрит. Зниження загальної кислотності й вільної HCl називають *гіпоацидним станом*, який зустрічається при гіпоацидному гастриті, а також при захворюванні на рак шлунку.

1.1.4. Гниття білків у кишечнику

Гниття білків – процес перетворення амінокислот під впливом ферментів непатогенних бактерій у товстому відділі кишечника. При *декарбоксилюванні ароматичних амінокислот* утворюються аміни (фенілаланін → фенілетиламін, тирозин → тирамін, триптофан → триптамін) і діаміни (лізин → кадаверин, орнітин → путресцин, аргінін → агматин). Діаміни переважно утворюються при гнитті трупів (трупні отрути). *Розпад бічних*

ланцюгів триптофану й тирозину веде до утворення крезолу й фенолу (із тирозину) та скатолу й індолу (із триптофану) (рис. 1.1; 1.2). При розпаді сірковмісних амінокислот утворюються сірководень (H_2S) і метилмеркаптан (CH_3SH).

Під час гниття білків у кишечнику утворюються два типи речовин:

1) *токсичні продукти*: фенол, крезол, індол, скатол, сірководень, аміни, меркаптан.

2) *нетоксичні продукти*: кетокислоти, оксикислоти, жирні кислоти, спирти.

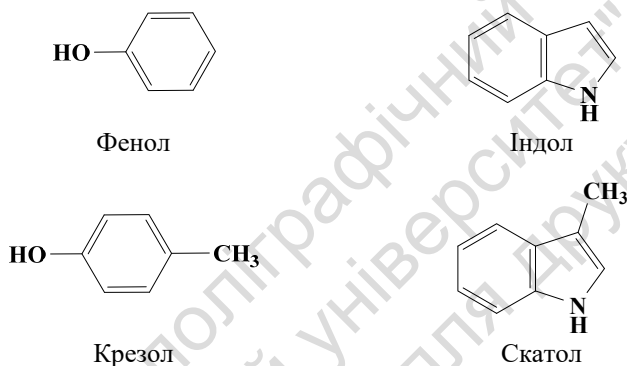


Рис. 1.1. Структурні формули продуктів гниття білків у кишечнику – похідних триптофану й тирозину

Посилення процесів гниття у кишечнику характерне для більшості кишкових інфекцій. При цьому за дії декарбоксилаз патогенних бактерій у кишечнику утворюється велика кількість ди- та моно амінів, які спричиняють:

- 1) загальну інтоксикацію;
- 2) порушення проникності мембран слизової оболонки кишечника, що призводить до проносів;
- 3) зневоднення тканин;
- 4) підвищення температури тіла.

Знешкодження більшості утворених токсичних речовин відбувається у печінці – органі, у який вони потрапляють, транспортуючись із кров'ю по ворітній вені (рис. 1.2). Залежно від наявності полярних функціональних груп, зокрема $-OH$, реакції детоксикації можуть

Oc1ccc(cc1)CC(N)C(=O)O $\rightarrow$ Oc1ccc(cc1)C $\rightarrow$ Oc1ccccc1
 Тирозин Крезол Фенол

Oc1ccc2c(c1)c(c[nH]2)CC(N)C(=O)O $\rightarrow$ Cc1c[nH]c2ccccc12 $\rightarrow$ c1ccc2c(c1)c(c[nH]2) $\rightarrow$ O=S(=O)(O)c1c[nH]c2ccccc12
 Триптофан Скато́л Індол Індоксилсірчана кислота

Індол $\rightarrow$ Індокси $\xrightarrow[\text{3',5'-АДФ}]{\text{ФАФС}}$ Індоксилсірчана кислота $\rightarrow$ Тваринний індикан (K⁺-сіль індоксилсірчаної кислоти)

A B

Утворені в реакціях модифікації гідроксильовані похідні токсичних речовин (такі як індоксил і скатоксил), а також токсини, у молекулах яких наявні полярні функціональні групи (напр., фенол і крезол) надалі вступають у *реакції кон'югації*, які передбачають приєднання до субстрату гідрофільної сполуки – сірчаної кислоти, глюкуронової кислоти, гліцину, таурину, глутатіону тощо – за участю ферментів *трансфераз*.

Кон'югація із сірчаною кислотою передбачає взаємодію субстрату з активною формою сірчаної кислоти – 3'-фосфоаденозил-5'-фосфосульфатом (ФАФС) під впливом ферменту сульфотрансферази. У випадку субстрату індоксилу продуктом реакції є індоксилсірчана кислота. Визначення вмісту калієвої солі індоксилсірчаної кислоти – *тваринного індикану* – використовують як для оцінки стану процесів кон'югації в печінці, так і для визначення рівня процесів гниття білків у кишечнику.

Кон'югація з глюкуроноювою кислотою потребує активної форми глюкуронової кислоти – уридиндифосфоглюкуронової кислоти (УДФГК) і ферменту УДФ-глюкуронілтрансферази.

Лабораторна робота № 1.1

Аналіз складу і властивостей шлункового соку

Дослід 1. Якісні реакції на вільну соляну кислоту у шлунковому соку

Нормальний шлунковий сік завжди містить вільну соляну кислоту. Її можна виявити за сильнокислою реакцією (рН нижче 3,0). Для виявлення вільної соляної кислоти зазвичай користуються індикаторами: конго червоним (зони зміни забарвлення рН = 3,0–5,2), парадиметиламіноазобензолом (зона зміни забарвлення рН = 2,9–4,2).

Матеріали та реактиви. 0,2%-й розчин соляної кислоти, профільтований шлунковий сік, 0,5%-й спиртовий розчин парадиметиламіноазобензолу.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, скляні палички, крапельниці, червоний папір конго.

Хід роботи. На червоний папір конго наносять скляною паличкою краплю 0,2%-го розчину соляної кислоти. Утворюється синє забарвлення. Цю саму реакцію виконують зі шлунковим соком. Синє забарвлення вказує на присутність вільної соляної кислоти.

Кілька краплин 0,2%-го розчину соляної кислоти наливають у пробірку й додають 1–2 краплини індикатора – 0,5%-го спиртового розчину парадиметиламіноазобензолу. Спостерігається поява червоного забарвлення. Цю саму реакцію виконують зі шлунковим соком. У присутності вільної соляної кислоти утворюється червоне забарвлення. Органічні кислоти можуть давати з індикатором помаранчевий колір.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 2. Якісна реакція на молочну кислоту у шлунковому соку

Молочна кислота є патологічною складовою шлункового соку (наприклад, при захворювання на рак шлунка). Крім того, за відсутності соляної кислоти в шлунку розвиваються процеси бродіння (за дії мікроорганізмів), які також спричиняють утворення молочної кислоти. Реакція ґрунтується на взаємодії молочної кислоти з фенолятом заліза, забарвленим у фіолетовий колір (фенолят заліза отримують впливом хлориду заліза (III) на фенол). У результаті реакції утворюється лактат заліза із зеленувато-жовтим кольором. Таке забарвлення з'являється лише тоді, коли у шлунковому соку соляна кислота або відсутня, або міститься у незначній кількості. Сильна соляна кислота повністю руйнує комплекс заліза з фенолом, а також витісняє більш слабку кислоту з її солі.

Матеріали та реактиви. 1%-й розчин молочної кислоти, профільтрований шлунковий сік, 0,2%-й розчин соляної кислоти, 10%-й розчин хлорного заліза, 1%-й розчин фенолу.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, крапельниці.

Хід роботи. До 15 мл 1%-го розчину фенолу додають 4–5 краплин 10%-го розчину хлорного заліза і струшують. Рідина забарвлюється у фіолетовий колір. У три пробірки наливають по 2 мл цього реактиву (реактив Уффельмана), потім у першу пробірку – 1%-й розчин молочної кислоти по краплинах, у другу – шлунковий сік, у третю – 0,2%-й розчин соляної кислоти. У першій пробірці з'являється зелено-жовте забарвлення, у другій – тільки в тому випадку, якщо шлунковий сік містить молочну кислоту, а у третій пробірці розчин стає безбарвним.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 3. Визначення загальної кислотності, вільної та зв'язаної соляної кислоти в одній пробі шлункового соку

Роздільне титрування шлункового соку в одній пробі досягається шляхом використання індикаторів із різними зонами зміни забарвлення – парадиметиламіноазобензолу, що змінює забарвлення з червоного на жовте при рН 2,4–4,0, та фенолфталеїну, який набуває червоного забарвлення при рН > 8,2.

Матеріали та реактиви. Профільтрований шлунковий сік, 0,5%-й спиртовий розчин парадиметиламіноазобензолу, 1%-й спиртовий розчин фенолфталеїну, 0,1 н. розчин їдкого натру.

Обладнання. Колби, піпетки, крапельниці, бюретки для титрування.

Хід роботи. У колбу піпеткою наливають 10 мл відфільтрованого шлункового соку. Додають 1–2 краплі 0,5%-го спиртового розчину парадиметиламіноазобензолу та 2 краплини 1%-го спиртового розчину фенолфталеїну. Титрують 0,1 н. розчином їдкого натру до жовтувато-червонуватого забарвлення (колір сьомги) (перший пункт, $\text{pH} = 2,9$), далі продовжують титрування до лимонно-жовтого кольору (другий пункт, $\text{pH} = 4,0$), і, нарешті, продовжують титрування до появи рожевого забарвлення (третій пункт, $\text{pH} = 8,0$).

Перший пункт відповідає вільній соляній кислоті, оскільки при $\text{pH} = 2,9$ відтитровується практично вся вільна соляна кислота (майже 99%).

Середнє арифметичне між другим і третім пунктами титрування вважають відповідним загальній соляній кислоті.

Третій пункт відповідає загальній кислотності шлункового соку.

Виходячи з отриманих даних, будують графік титрування шлункового вмісту, відкладаючи по осі абсцис кількість мілілітрів 0,1 н. розчину їдкого натру, яку було витрачено на титрування, а по осі ординат – значення pH середовища. За графіком знаходять числові значення для загальної кислотності, зв'язаної, вільної та загальної соляної кислоти. Потім перераховують отримані цифри на 100 мл шлункового соку.

Приклад розрахунку. Припустимо, що на титрування від початку витрачено 0,1 н. розчину їдкого натру:

до першого пункту	– 4,10 мл,
до другого «	– 4,44 мл,
до третього «	– 6,36 мл.

Середнє арифметичне між другим і третім пунктом $= (4,44 + 6,36)/2 = 5,40$ мл.

Отже, у титраційних одиницях (титр. од.) вільна соляна кислота: $4,10 \times 10 = 41$, загальна соляна кислота: $5,40 \times 10 = 54$, зв'язана соляна кислота: $54 - 41 = 13$, загальна кислотність: $6,36 \times 10 = 63,6$.

Розрахунок загальної кислотності, вільної та зв'язаної соляної кислоти в досліджуваній пробі шлункового соку і отримані результати записують у зошит, роблять висновок про характер досліджуваного шлункового соку.

Лабораторна робота № 1.2

Визначення протеолітичної активності ферментів шлунково-кишкового тракту

Протеолітичну активність ферментів шлунково-кишкового тракту (трипсин, хімотрипсин, пепсин) визначають за їхньою здатністю гідролізувати казеїн з утворенням низькомолекулярних олігопептидів. Ступінь гідролізу білка визначають за зменшенням кількості соляної кислоти, яка зв'язується з казеїном, що не розщепився.

Матеріали та реактиви. 4%-й розчин казеїну у фосфатному буфері, ферментний розчин (1 мг/мл), 7,5%-й розчин сульфату натрію в 0,1 н. HCl, 0,1 н. розчин NaOH, розчин фенолфталеїну.

Обладнання. Колби, піпетки, крапельниці, термостат, годинник, фільтрувальний папір, лійки для фільтрування, бюретки для титрування.

Хід роботи. У дві колбочки (контроль і дослід) відміряють по 2,5 мл 4%-го розчину казеїну у фосфатному буфері й залишають у термостаті при 30 °C на 10 хв. Після преінкубації у першу колбу (дослід) доливають 0,5 мл ферментного розчину (1 мг/мл) і залишають у термостаті на 30 хв. У другу колбу (контроль) доливають 0,5 мл ферментного розчину і відразу ж додають 2 мл 7,5%-го розчину сульфату натрію в 0,1 н. HCl для осадження казеїну. Після інкубації в дослідну пробу теж додають 2 мл 7,5%-го розчину сульфату натрію в 0,1 н. HCl.

Осад, що утворився, відфільтровують і відміряють по 2 мл прозорого фільтрату контрольної й дослідної проби, додають 2–3 краплі розчину фенолфталеїну і титрують 0,1 н. розчином NaOH до появи слабо-рожевого забарвлення.

Протеолітичну активність розраховують в умовних одиницях як різницю у титруванні дослідної та контрольної проб ($V_{\text{досл}} - V_{\text{контр}}$), у перерахунку на 1 мг ферменту:

$$\text{ПА} = (V_{\text{досл}} - V_{\text{контр}}) \times 5$$

Розрахунок протеолітичної активності ферментів шлунково-кишкового тракту й отриманий результат записують у зошит.

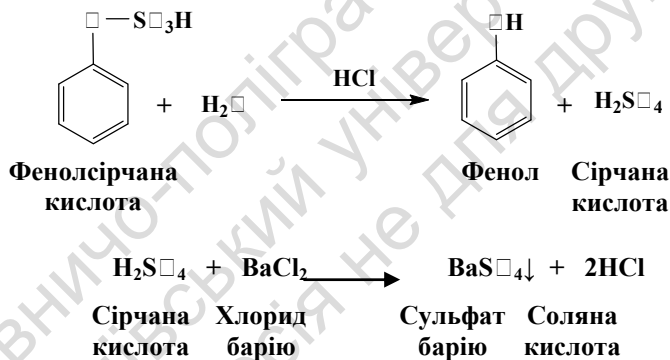
Лабораторна робота № 1.3

Оцінка стану процесів гниття білків у кишечнику

Дослід 1. Виявлення ефірів сірчаної кислоти в сечі

У сечі людини завжди містяться сполуки-продукти кон'югації токсичних речовин із сірчаною кислотою. Ці сполуки – солі ефірів сірчаної кислоти (сульфат фенолу, сульфат крезолу тощо) – є менш отруйними, ніж феноли, і виводяться із організму із сечею в кількості 0,2–0,3 г/добу.

Залишок сірчаної кислоти реагує з хлоридом барію і випадає в осад у вигляді нерозчинної барієвої солі. Для вивільнення сірчаної кислоти з ефіросірчаних кислот їх піддають гідролізу шляхом нагрівання із соляною кислотою. Якщо сеча містить білок, то його заздалегідь осаджують додаванням ТХО.



Вміст ефіросірчаних сполук у сечі збільшується в разі посилення процесів кон'югації в печінці, а також при інтенсифікації процесів гниття білків у кишечнику внаслідок закріпів, непрохідності тощо.

Матеріали та реактиви. Сеча, 10%-й розчин соляної кислоти, 5%-й розчин хлориду барію.

Обладнання. Водяна баня, пробірки, піпетки.

Хід роботи. До 20 крапель сечі додають 5 крапель 10%-го розчину соляної кислоти. До кислого фільтрату додають краплями 5%-й розчин хлориду барію (додавати по одній краплі!) доти, поки не утвориться мутний осад, і фільтрують. Кислий фі-

льтрат ставлять на киплячу водяну баню. Через 5–10 хв уміст пробірки стає мутним у результаті вивільнення сірчаної кислоти під час гідролізу ефіросірчаних кислот і утворення нової порції кристалічного осаду сульфату барію, нерозчинного в кислотах та основах. При цьому виділяються продукти окиснення фенолу, що можуть надавати рідині рожевого забарвлення.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 2. Визначення вмісту тваринного індикану в сироватці крові та сечі

Тваринний індикан (калієва сіль індоксилсірчаної кислоти) – кінцевий продукт детоксикації в печінці індолю – токсину, що утворюється із амінокислоти триптофану під час гниття білків у товстому кишечнику за участю ферментів мікроорганізмів. У нормі концентрація індикану в крові коливається в межах від 0,88 до 3,20 мкмоль/л (0,22–0,80 мг/л). Гіперіндіканемію і гіперіндіканурію спостерігають при посиленні процесів гниття білків у кишечнику (закрепи, кишкова непрохідність та інші стани, що спричиняють виникнення умов для активації мікробної флори кишечника), при посиленому розпаді білків (при пухлинах, абсцесах, туберкульозі), за деяких типів ниркової недостатності.

Метод ґрунтується на кислотному гідролізі (у присутності соляної кислоти) індикану з наступним окисненням індоксилу й тимолу хлоридом заліза до індиголігнону – сполуки рожево-фіолетового кольору.

Матеріали та реактиви. Розчин ТХО (200 г/л), хлороформ для наркозу, розчин тимолу в 96%-му розчині етилового спирту (50 г/л), ацетат свинцю (100 г/л), реактив Jolles (0,5 г хлориду заліза розчиняють у 100 мл концентрованої соляної кислоти густиною 1,19 кг/л), який використовують тільки свіжовиготовленим.

Обладнання. Піпетки, пробірки, центрифуга

Хід роботи

1. Визначення вмісту індикану в крові. До 1,5 мл сироватки додають 1,5 мл розчину ТХО і через 10 хв суміш центрифугують. Отриману надосадову рідину обережно зливають у градуйовану пробірку, додають 7 крапель розчину тимолу й реактив Jolles у кількості, рівній об'єму центрифугату. Суміш витримують за кімнатної температури протягом 20 хв, після чого доливають до неї 2 мл хло-

роформу для видалення тимоліндигогнолу. Вміст пробірки ретельно перемішують (уникаючи утворення емульсії в разі дуже інтенсивного струшування) і залишають стояти на 2 год (краще на добу).

Якщо вміст індикану не збільшений, то помітити забарвлення нижнього хлороформного шару майже неможливо. За незначного фіолетового забарвлення вміст індикану становить близько 0,22 мг/л (0,88 мкмоль/л). За більш інтенсивного забарвлення (від рожево-фіолетового до яскраво-червоно-фіолетового) органічну фазу розчиняють хлороформом доти, поки розчин не стане безкольоровим. З цією метою шар хлороформу переносять у мірний циліндр (на 25 мл), у який додають чистий хлороформ до зникнення характерного забарвлення. Вміст індикану в пробірці з розчином дорівнює величині, яку знаходять шляхом перемноження 0,88 мкмоль/л на величину розведення.

2. Визначення вмісту тваринного індикану в сечі. До 20 мл сечі додають 10 мл розчину ацетату свинцю (100 г/л) і після струшування фільтрують. До 10 мл фільтрату додають 1 мл тимолового розчину і 10 мл реактиву Jolles. Через 15 хв у склянку доливають кілька крапель хлороформу, суміш перемішують і проводять напівкількісну оцінку результатів. У нормі спостерігають рожево-фіолетове забарвлення хлороформу, при вираженій індиканурії інтенсивність забарвлення посилюється до червоно-фіолетового кольору.

Результати визначення вмісту тваринного індикану в крові й сечі записують у зошит, роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Перерахувати умови перетравлення білків: у шлунку, у 12-палій кишці, у тонкому кишечнику.
2. Які ферменти відносять до екзо- та ендопептидаз?
3. Назвіть ферменти, що здійснюють порожнинне та пристінкове травлення білків.
4. Принцип кількісного визначення загальної кислотності, вільної, зв'язаної й загальної соляної кислоти в одній пробі шлункового соку.
5. Що таке тваринний індикан? З якою метою визначають його вміст у крові й сечі?

ТЕМА 2. ПРОМІЖНИЙ ОБМІН АМІНОКИСЛОТ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

Більшість реакцій перетворення амінокислот відбувається в печінці. Тут синтезуються білки печінки, а також більшість білків плазми крові, й відбувається їхній розпад. У печінці синтезуються деякі азотовмісні сполуки: пуринові й піримідинові основи, нікотинамід, сечова кислота, креатин, сечовина. Деякі із цих перетворень виявляються необоротними, і сполуки, що утворюються, транспортуються із печінки та виводяться із організму із сечею. Крім того, у печінці синтезуються деякі замінні амінокислоти. Після дезамінування вуглецевий скелет амінокислот або окиснюється в аеробних умовах і служить тим самим джерелом енергії, або використовується в біосинтезі, включаючись у цикл трикарбонових кислот (ЦТК).

1.2.1. Найважливіші метаболічні перетворення амінокислот

Декарбоксистювання – процес відщеплення за участю *декарбоксилаз* карбоксильної групи амінокислот у вигляді CO_2 (рис. 1.3).

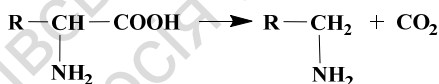


Рис. 1.3. Узагальнена схема реакції
декарбоксистювання амінокислот

Простетичною групою декарбоксилаз є піридоксальфосфат.

Це загальний, але не основний шлях обміну амінокислот, у результаті якого утворюється ряд біологічно активних речовин – біогенних амінів. Моноаміномонокарбонові кислоти при цьому є попередниками моноамінів, а діаміномонокарбонові – діамінів. Утворені аміни надалі метаболізуються ферментами моноаміноксидазою (МАО) або діаміноксидазою (ДАО).

Процес декарбоксихлювання амінокислот у тканинах відбувається у незначних масштабах (головним чином у печінці); основне місце локалізації процесу – кишечник, де під час гниття білків на неперетравленні залишки протеїнів діють бактеріальні декарбоксихлази (див. підрозд. 1.1.4). У кишечнику здорової людини декарбоксихлювання здійснюється на низьких рівнях за участю декарбоксихлаз непатогенних бактерій, тоді як при кишкових захворюваннях (дизентерія, черевний тиф, холера та ін.) підвищується активність декарбоксихлаз патогенних бактерій, у результаті чого утворюються аміни, що обумовлюють картину кишкового захворювання.

Трансамінування, або переамінування, – основна біосинтетична реакція замісних амінокислот, що каталізується ферментами *аміотрансферазами* (*трансаміназами*) у присутності коферменту, роль якого виконує піридоксальфосфат (рис. 1.4).

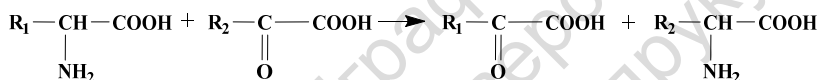


Рис. 1.4. Узагальнена схема реакції трансамінування амінокислот

Реакція трансамінування є загальною для катаболічних і анаболічних шляхів проміжного обміну амінокислот. Суть реакції – перенесення аміногрупи від амінокислот, що на даний момент містяться в організмі в надлишку, на α -кетокислоту з утворенням нової амінокислоти та α -кетокислоти.

Окисне дезамінування. При окисному дезамінуванні амінокислот утворюються відповідні кетокислоти. НАД⁺, ФАД або ФМН виконують роль акцептора водню. У цій реакції беруть участь оксидози амінокислот і дегідрогенази. Окисне дезамінування амінокислот здійснюється кількома шляхами:

- Пряме окисне дезамінування відбувається в мітохондріях клітин печінки і нирок за дії *неспецифічних L-оксидаз амінокислот* із коферментом ФМН. Оптимум рН даних ферментів дорівнює 10, і, оскільки у тканинах рН ≈ 7 , то L-оксидози є малоактивними.

- За участю оксидаз *D-амінокислот*, які є набагато активнішими, присутні в печінці, нирках, мозку і функціонують у присутності ФАД. Реакція відбувається за схемою, наведеною на рис. 1.5.

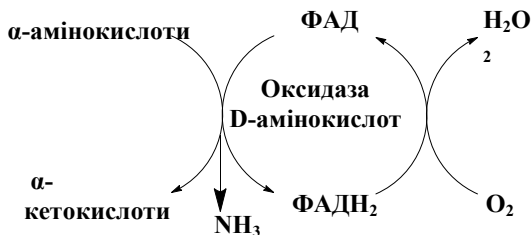


Рис. 1.5. Узагальнена схема реакції ФАД-залежного окисного дезамінування D-амінокислот

Таке окиснення відбувається молекулярним киснем з утворенням пероксиду водню, який або розкладається за допомогою каталази до води і кисню, або використовується як окисник у реакціях різноманітних пероксидаз (які містяться в пероксисомах). Однак у складі білків немає D-амінокислот, тому внесок даного ферменту в дезамінування амінокислот незначний.

■ Із залученням НАД^+ -залежної *глутаматдегідрогенази*, що каталізує реакцію дезамінування глутамінової кислоти з утворенням α -кетоглутарату (рис. 1.6).

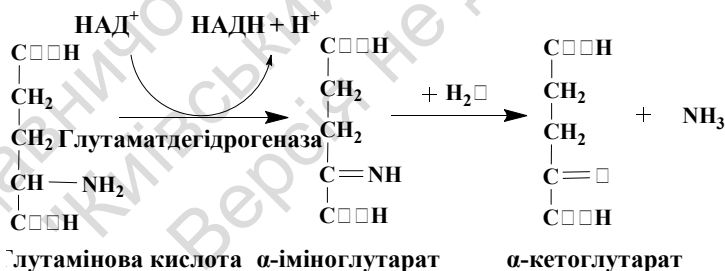


Рис. 1.6. Узагальнена схема реакції НАД^+ -залежного окисного дезамінування глутамінової кислоти

Ця реакція є основним джерелом аміаку в організмі людини; вона є оберненою, тобто глутаматдегідрогеназа може каталізувати й відновлення α -кетоглутарату до глутамату.

Існує ще один шлях перетворення, за якого окисному дезамінуванню передують трансамінування – процес, у результаті якого вихідні амінокислоти перетворюються на відповідні кетокислоти, і водночас α -кетоглутарова кислота за дії НАД⁺-залежної глутаматдегідрогенази перетворюється на глутамінову кислоту, яка і стає об'єктом окисного дезамінування (рис. 1.7). Цей процес отримав назву *транздезамінування*. Цей шлях перетворення амінокислот є досить загальним і забезпечує непряме окисне дезамінування майже всіх амінокислот.

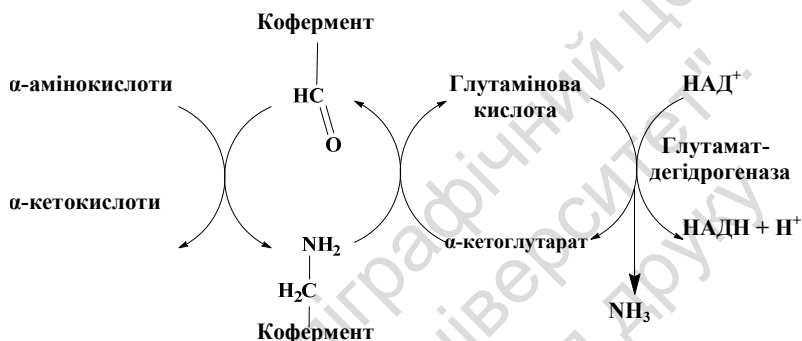


Рис. 1.7. Узагальнена схема реакцій транздезамінування амінокислот

Дезамінування ще кількох амінокислот відбувається неокисним шляхом (серин, треонін, цистеїн, гістидин). У печінці та інших тканинах відкрито три специфічні ферменти: сериндегідратаза, треоніндегідратаза, цистатіонін- γ -ліаза, які каталізують дезамінування відповідно серину, треоніну, цистеїну. Внутрішньомолекулярному дезамінуванню підлягає гістидин.

1.2.2. Клінічне значення визначення активності трансаміназ

У клініці серед трансаміназ найбільше значення мають аспаратамінотрансфераза (АсАТ) і аланінамінотрансфераза (АлАТ). Трансаміназний тест використовується не тільки для встановлення діагнозу захворювання, але й для прогнозування та контролю ефективності лікування.

У сироватці крові здорових людей активність АсАТ і АлАТ у тисячі разів нижча, ніж у клітинах паренхіматозних органів, причому АсАТ є більш активною в серцевому м'язі, тоді як АлАТ – у нирках. Органічні ураження при гострих і хронічних захворюваннях призводять до пошкодження клітин відповідних органів і до виходу трансаміназ у кров із джерела ураження.

При інфаркті міокарда активність АсАТ у сироватці крові вже через 3–4 год після його настання різко підвищується (у 20–30 разів). Максимум активності припадає на кінець першої доби, а вже через 2–3 дні в разі сприятливого закінчення хвороби рівень активностей сироваткових трансаміназ повертається до норми. При гострому інфекційному гепатиті активність АлАТ зростає потужніше, ніж АсАТ, при цирозі печінки більш виражені зміни характерні для АсАТ, а при метастазах у печінці або первинній пухлині печінки активність АсАТ більша, ніж АлАТ. При гіпоксії активності АлАТ і АсАТ підвищуються одночасно, тоді як при стенокардії зазначені показники для АсАТ і АлАТ залишаються в нормі.

Зниження активностей АсАТ і АлАТ відбувається у разі нестачі піридоксину (вітаміну В₆), унаслідок повторних процедур гемодіалізу, при печінковій недостатності та під час вагітності.

1.2.3. Біологічна роль амінів

Гістамін – біогенний амін, який утворюється при декарбоксілюванні гістидину (рис. 1.8).

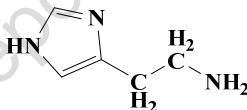


Рис. 1.8. Структурна формула гістаміну

Він:

- 1) стимулює секрецію шлункового соку і слини;
- 2) чинить судинорозширювальну дію. Велика його кількість утворюється в місці запалення. Викликаючи розширення судин у місці запалення, гістамін прискорює надходження лейкоцитів, сприяючи активації захисних сил організму;

4) скорочує гладенькі м'язи легень, що може призвести до нападу задухи і викликати "гістаміновий" шок;

5) знижує тиск;

6) підвищує проникність судин;

7) є медіатором болю;

8) бере участь у патогенезі алергії.

Серотонін – біогенний амін, який утворюється при декарбоксілюванні та подальшому окисненні триптофану (рис. 1.9).

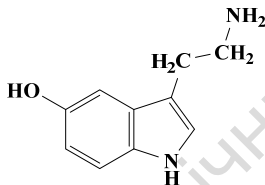


Рис. 1.8. Структурна формула серотоніну

Серотонін:

1) є потужним засобом для звуження судин;

2) підвищує кров'яний тиск;

3) бере участь у патогенезі гіпертонічної хвороби;

4) відіграє роль у регуляції температури тіла;

5) є медіатором центральної нервової системи (ЦНС).

Дофамін є катехоламіном, який утворюється при декарбоксілюванні діоксифеніланіну (ДОФА) (рис. 1.10).

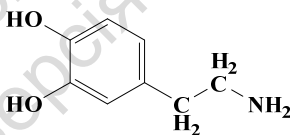


Рис. 1.10. Структурна формула дофаміну

При подальшому окисненні та метилюванні утворюються інші катехоламіни – норадреналін і адреналін.

Катехоламіни:

1) є гормонами мозкового шару надниркових залоз (норадреналін і адреналін);

2) регулюють діяльність серцево-судинної системи (дофамін, норадреналін і адреналін);

3) стимулюють мобілізацію депонованих вуглеводів і жирів (адреналін);

4) є нейромедіаторами ЦНС (дофамін і норадреналін).

Гамма-аміномасляна кислота (ГАМК) утворюється при декарбокسيلюванні глутамінової кислоти (рис. 1.11).

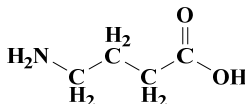


Рис. 1.11. Структурна формула γ -аміномасляної кислоти

Її роль:

1) головний гальмівний нейромедіатор ЦНС (чинить гальмівну дію на процеси збудження у сірій речовині кори мозку);

2) використовується у психіатрії як заспокійливий засіб.

Кадаверин утворюється при декарбокسيلюванні лізину (рис. 1.12).

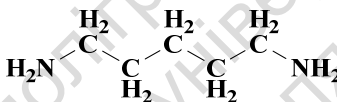


Рис. 1.12. Структурна формула кадаверину

При деяких захворюваннях, що супроводжуються посиленням процесів гниття білків у кишечнику, процеси декарбокسيلювання лізину під впливом мікрофлори інтенсифікуються (див. підрозд. 1.1.4), що може призвести до отруєння організму цим біогенним діаміном, який належить до трупних отрут.

Путресцин – біогенний амін, який утворюється внаслідок декарбокسيلювання орнітину (рис. 1.13).

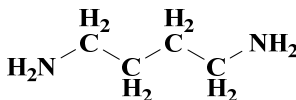


Рис. 1.13. Структурна формула путресцину

Подібно до кадаверину, путресцин утворюється при гнитті білків у кишечнику й може бути причиною отруєння організму.

Етаноламін утворюється при декарбоксилюванні серину (рис. 1.14).

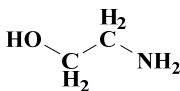


Рис. 1.14. Структурна формула етаноламіну

В організмі етаноламін використовується для синтезу холіну, ацетилхоліну, фосфатидилетаноламінів, фосфатидилхолінів.

Знешкодження біогенних амінів відбувається в печінці за дії ферментів двох видів: моноамінооксидаз у мітохондріях і діамінооксидаз у цитозолі.

1.2.4. Шляхи обміну безазотистого залишку амінокислот

α -кетокислоти, що утворюються в результаті дезамінування, підлягають у тканинах тварин різним перетворенням. За участю трансаміназ може відбуватися відновлювальне амінування кетокислот з утворенням замінних амінокислот.

Вуглецеві скелети 20-ти амінокислот можуть включатися в цикл трикарбонових кислот через наступні сполуки: піруват, ацетил-КоА, ацетоацетил-КоА, α -кетоглутарат, сукциніл-КоА, фумарат і оксалоацетат.

Амінокислоти, котрі розкладаються з утворенням ацетил-КоА і ацетоацетил-КоА, називаються *кетогенними*, бо в результаті їхнього розпаду підвищується вміст кетонових тіл.

Амінокислоти, розпад яких призводить до утворення пірувату, α -кетоглутарату, сукциніл-КоА, фумарату чи оксалоацетату, називають *глюкогенними*, оскільки ці компоненти ЦТК і піруват можуть перетворюватись на фосфоенолпіруват і потім на глюкозу.

ЛЕЕ, ЛІЗ, ФЕН, ТРИ, ТИР належать одночасно і до кетогенних, і до глюкогенних амінокислот. Із 19-ти амінокислот виключно кетогенним є тільки ЛЕЙ. Інші 13 амінокислот є чисто глюкогенними: АЛА, АРГ, АСП, ЦИС, ГЛІ, ГЛУ, ГІС, ПРО, ПРООН, МЕТ, СЕР, ВАЛ, ТРЕ.

Лабораторна робота № 1.4

Вивчення процесів трансамінування амінокислот

Дослід 1. Виявлення процесів трансамінування α -амінокислот у м'язовій тканині з використанням хроматографічного методу

Основою методу є реакція трансамінування у м'язовій тканині. Як субстрати використовують глутамінову і піровиноградну кислоти:



Матеріали та реактиви. Свіжа м'язова кашиця, 1%-й розчин піровиноградної кислоти, нейтралізований їдким калі, 1%-й розчин глутамінової кислоти, нейтралізований їдким калі, 0,025%-й розчин монобромцтової кислоти, нейтралізований їдким калі, 2%-й розчин оцтової кислоти, 1%-й розчин аланіну, бутилово-оцтово-водна суміш (40:15:5), розчин нінгідрину

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, кипляча водяна баня, термостат, скляні палички, фільтрувальний папір, лійки для фільтрування, хроматографічний папір, скляний капіляр, хроматографічна камера, сушильна шафа.

Хід роботи:

1. У дві пробірки (досліджувану і контрольну) наливають по 0,5 мл 1%-х розчинів піровиноградної та глутамінової кислот, нейтралізованих їдким калі, по 1 мл 0,025%-го розчину монобромцтової кислоти (для запобігання гліколізу).

2. В обидві пробірки додати по 0,5 г свіжорозтертої м'язової тканини. У контрольну пробірку відразу ж доливають 0,3 мл 2%-го розчину оцтової кислоти, і цю пробу кип'ятять на водяній бані 2–3 хв для інактивації ферментів.

3. Пробірки розміщують у термостаті на 1,5 год, періодично помішуючи їхній вміст скляними паличками. У досліджувану пробу додають 0,3 мл 2%-го розчину оцтової кислоти і кип'ятять її на водяній бані 2–3 хв. Відфільтровують вміст кожної проби через маленький фільтр у чисту пробірку, помічаючи її відповідним номером.

4. Готують листок хроматографічного паперу. Роблячи відступ 1 см від краю паперу, наносять чотири крапки (помітки). На першу помітку наносять капіляром 1%-й розчин глютамінової кислоти, на другу – 1%-й розчин аланіну (тобто розчини "свідків"), на третю – досліджуваної проби, на четверту – контрольної проби. Нанесення розчинів здійснюють обов'язково чистими капілярами. Розчини досліджуваної та контрольної проби наносять два-три рази на одну й ту саму помітку, попередньо підсушивши на повітрі краплю, що була нанесена першого разу, для того, щоб збільшити концентрацію амінокислот на місці нанесення.

5. Хроматограми поміщають у хроматографічну камеру і хроматографують у бутилово-оцтово-водній суміші (40:15:5). Хроматограми висушують і проявляють у розчині нінгідрину. Потім прогрівають у сушильній шафі при 100 °С.

Забарвлені плями амінокислот (рис. 1.15) обводять олівцем (оскільки плями втрачають колір), розраховують коефіцієнт розподілу R_f і порівнюють інтенсивність плям глютамінової кислоти та аланіну у досліджуваній та контрольній пробах.

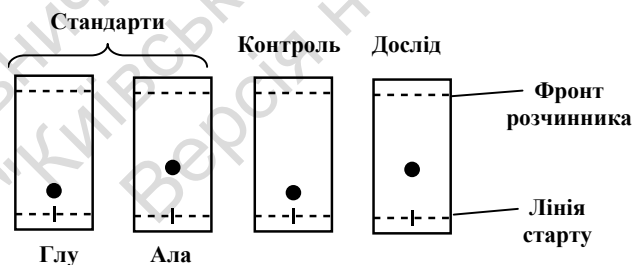


Рис. 1.15. Схематичне зображення хроматограм, отриманої при проведенні досліді

6. Записують принцип методу, реакцію трансамінування, розрахунок R_f для плям амінокислот, роблять висновки, хроматограму підклеюють до протоколу.

Дослід 2. Визначення аланінамінотрансферазної активності сироватки крові методом Райтмана – Френкеля з використанням набору реактивів

АлАТ каталізує утворення глютамінової кислоти з α -кетоглутарової під час трансамінування аланіну. Цей фермент міститься у клітинах різних тканин (найбільше – у печінці й нирках) і належить до індикаторних ферментів. Подібно до інших індикаторних ферментів, аланінамінотрансферазна активність сироватки крові в нормі є низькою (0,1–0,68 мкмоль/(год $\times$ мл). Зростання рівнів цього показника є свідченням цитолітичних процесів і, зокрема, спостерігається за некротичної загибелі гепатоцитів при гепатиті, цирозі та інших печінкових розладах.

Унаслідок трансамінування α -кетоглутарової кислоти й аланіну за дії аланінамінотрансферази утворюється L-глютамінова та піровиноградна кислоти. Визначення базується на вимірюванні оптичної густини 2,4-динітрофенілгідразонів α -кетоглутарової та піровиноградної кислот у лужному середовищі. Оскільки гідразон піровиноградної кислоти має більш високий коефіцієнт молярної екстинції, то спостерігається прямо пропорційна залежність оптичної густини реакційного розчину від активності ферменту.

Матеріали та реактиви. Сироватка крові, субстратно-буферний розчин АлАТ (фосфатний буфер ($0,100 \pm 0,05$ моль/л), D,L-альфа-аланін ($0,20 \pm 0,01$ моль/л), α -кетоглутарова кислота ($2,0 \pm 0,1$ ммоль/л)), стоп-регент (2,4-динітрофенілгідразин ($1,00 \pm 0,05$ ммоль/л), калібрувальний розчин (піровинограднокислий натрій ($2,0 \pm 0,1$ ммоль/л, або 220 ± 11 мкг/мл, що відповідає 176 мкг/мл піровиноградної кислоти), розчин гідроксиду натрію, який готують із наявного в наборі розчину гідроксиду натрію ($4,0 \pm 0,2$ моль/л): вміст флакона (50 мл) переносять у колбу ємністю 500 мл і доводять до мітки дистильованою водою.

Обладнання. Фотометричне обладнання, яке дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 500–550 нм, кювети товщиною 5 або 10 мм, термостат, мірна колба ємністю 500 мл, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Аналіз проводять за схемою, наведеною у табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Схема проведення дослідів з визначення аланінамінотрансферазної активності сироватки крові методом Райтмана – Френкеля

Відміряти у пробірку	Макроаналіз		Мікроаналіз	
	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Субстратно-буферний розчин	0,40	0,40	0,10	0,10
Інкубують 3 хв при температурі 37 °С і додають				
Стоп-реагент	–	0,40	–	0,10
Сироватка крові	0,08	0,08	0,02	0,02
Інкубують 60 хв при температурі 37 °С та додають				
Стоп-реагент	0,40	–	0,10	–
Витримують 20 хв при кімнатній температурі й додають				
Розчин гідроксиду натрію (0,4 н.)	4,00	4,00	1,00	1,00
Витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину дослідної проби ($E_{\text{досл}}$) проти холостої проби				

Знаючи $E_{\text{досл}}$, за калібрувальним графіком здійснюють розрахунок ферментативної активності ($C_{\text{досл}}$). Для побудови калібрувального графіка використовують табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Схема проведення дослідів для побудови калібрувального графіка залежності оптичної густини стандартних розчинів від ферментативної активності у них АЛАТ

Відміряти у пробірку, мл	Калібрувальні точки					Контр. проба
	1	2	3	4	5	
Субстратно-буферний розчин	0,475	0,450	0,400	0,350	0,300	0,500
Калібрувальний розчин	0,025	0,050	0,100	0,150	0,200	–
Дистильована вода або фізрозчин	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Стоп-реагент	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Витримують 20 хв при кімнатній температурі, додають						
Розчин гідроксиду натрію (0,4 н.)	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину калібрувальної проби ($E_{\text{калібр}}$) проти контрольної проби						
Вміст пірвіноградної кислоти в калібрувальних пробах, мкг	4,400	8,800	17,600	26,400	35,200	–
Вміст пірвіноградної кислоти в калібрувальних пробах, мкмоль	0,050	0,100	0,200	0,300	0,400	–
Активність АЛАТ у мкмоль/(год×мл)	0,500	1,000	2,000	3,000	4,000	–
Оптична густина калібрувальних проб, од. оптич. густини	$E_1=$	$E_2=$	$E_3=$	$E_4=$	$E_5=$	–

При побудові калібрувального графіка по осі абсцис відкладають ферментативну активність АлАТ (у мкмоль/(год×мл)), а по осі ординат – оптичну густину (E_1 – E_5) (рис. 1.16).

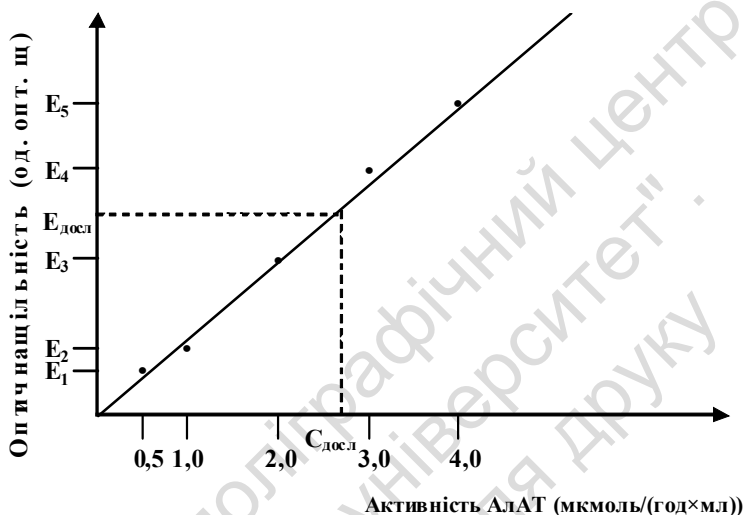


Рис. 1.16. Схематичне зображення калібрувального графіка для визначення ферментативної активності АлАТ

Лінійність калібрувального графіка зберігається до величини оптичної густини 0,25 од. оптич. густини.

Результат визначення аланінамінотрансферазної активності сироватки крові записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами й роблять висновок.

***Дослід 3.** Визначення аспаратамінотрансферазної активності сироватки крові методом Райтмана – Френкеля з використанням набору реактивів*

АсАТ каталізує утворення глутамінової кислоти з α -кетоглутарової під час трансамінування аспарагінової кислоти. Цей фермент міститься у клітинах різних тканин (найбі-

льше – у серцевому м'язі, печінці, нирках і підшлунковій залозі) і належить до індикаторних ферментів. Подібно до інших індикаторних ферментів, аспартатамінотрансферазна активність сироватки крові в нормі є низькою (0,1–0,45 мкмоль/(год×мл). Зростання рівнів цього показника є свідченням цитолітичних процесів і, зокрема, спостерігається при інфаркті міокарда, важкій серцевій недостатності, некротичній загибелі гепатоцитів при гепатиті, цирозі та інших печінкових розладах.

Унаслідок трансамінування α -кетоглутарової та L-аспарагінової кислот за дії аспартатамінотрансферази утворюються L-глутамінова й щавлевооцтова кислоти. Остання самоцільно декарбоксилується до піровиноградної кислоти. Визначення базується на вимірюванні оптичної густини 2,4-динітрофенілгідразонів α -кетоглутарової та піровиноградної кислот у лужному середовищі. Оскільки гідразон піровиноградної кислоти має більш високий коефіцієнт молярної екстинції, то спостерігається прямо пропорційна залежність оптичної густини реакційного розчину від активності ферменту.

Матеріали та реактиви. Сироватка крові, субстратно-буферний розчин АсАТ (фосфатний буфер ($0,100 \pm 0,005$ моль/л), L-аспарагінова кислота ($0,100 \pm 0,005$ моль/л), α -кетоглутарова кислота ($2,0 \pm 0,1$ ммоль/л)), стоп-реагент (2,4-динітрофенілгідразин ($1,00 \pm 0,05$ ммоль/л), калібрувальний розчин (піровинограднокислий натрій ($2,0 \pm 0,1$ ммоль/л, або 220 ± 11 мкг/мл, що відповідає 176 мкг/мл піровиноградної кислоти), розчин гідроксиду натрію, який готують із наявного в наборі розчину гідроксиду натрію ($4,0 \pm 0,2$ моль/л): вміст флакона (50 мл) переносять у колбу ємністю 500 мл і доводять до мітки дистильованою водою.

Обладнання. Фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 500–550 нм, кювети товщиною 5 або 10 мм, термостат, мірна колба ємністю 500 мл, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Аналіз проводять за схемою, наведеною в табл. 1.3.

Таблиця 1.3

Схема проведення дослідів з визначення аспартатамінотрансферазної активності сироватки крові методом Райтмана – Френкеля

Відміряти у пробірку,	Макроаналіз		Мікроаналіз	
	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Субстратно-буферний розчин	0,40	0,40	0,10	0,10
Інкубують 3 хв при температурі 37 °С та додають				
Стоп-реагент	–	0,40	–	0,10
Сироватка крові	0,08	0,08	0,02	0,02
Інкубують 60 хв при температурі 37 °С та додають				
Стоп-реагент	0,40	–	0,10	–
Витримують 20 хв при кімнатній температурі та додають				
Розчин гідроксиду натрію (0,4 н.)	4,00	4,00	1,00	1,00
Витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину дослідної проби ($E_{\text{досл}}$) проти холостої проби				

Знаючи $E_{\text{досл}}$, за калібрувальним графіком здійснюють розрахунок ферментативної активності ($C_{\text{досл}}$).

Для побудови калібрувального графіка використовують табл. 1.4.

Таблиця 1.4

Схема проведення дослідів для побудови калібрувального графіка залежності оптичної густини стандартних розчинів від ферментативної активності у них АсАТ

Відміряти у пробірку, мл	Калібрувальні точки					Контроль-на проба
	1	2	3	4	5	
Субстратно-буферний розчин	0,475	0,450	0,400	0,350	0,300	0,500
Калібрувальний розчин	0,025	0,050	0,100	0,150	0,200	–
Дистильована вода чи фізрозчин	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Стоп-реагент	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Витримують 20 хв при кімнатній температурі, додають						
Розчин гідроксиду натрію (0,4 н.)	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину калібрувальної проби ($E_{\text{калібр}}$) проти контрольної проби.						
Вміст пірвиноградної кислоти в калібрувальних пробах, мкг	4,400	8,800	17,600	26,400	35,200	0
Вміст пірвиноградної кислоти у калібрувальних пробах, мкмоль	0,050	0,100	0,200	0,300	0,400	0
Активність АсАТ у мкмоль/(год×мл)	0,500	1,000	2,000	3,000	4,000	0
Активність АсАТ у мккат/л	0,139	0,278	0,556	0,833	1,111	0
Оптична густина калібрувальних проб, од. оптич. густини	$E_1=$	$E_2=$	$E_3=$	$E_4=$	$E_5=$	–

При побудові калібрувального графіка по осі абсцис відкладають ферментативну активність АсАТ (у мкмоль/(год×мл)), а по осі ординат – оптичну густина (E_1 – E_5) (рис. 1.17). Лінійність калібрувального графіка зберігається до величини оптичної густини 0,25 од. оптич. густ.

Результат визначення аспартатамінотрансферазної активності сироватки крові записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами й роблять висновок.

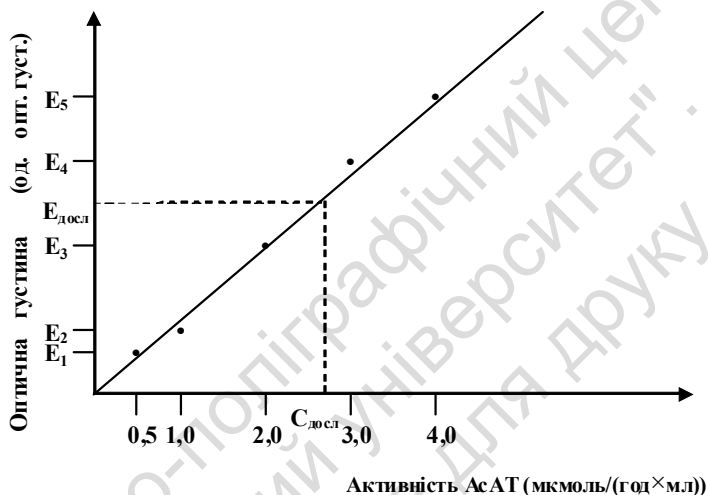


Рис. 1.17. Схематичне зображення калібрувального графіка для визначення ферментативної активності АсАТ

Лабораторна робота № 1.5

Вивчення процесів декарбоксилювання амінокислот

Дослід 1. Якісне виявлення декарбоксилаз у бактерій (метод Є. М. Губарева та Ю. В. Галаєва)

Декарбоксилаза кишкової палички перетворює глютамінову кислоту на γ -аміномасляну. Метод електрофорезу дозволяє виявити продукти декарбоксилювання, розділення яких відбувається внаслідок різного знаку заряду молекул.

Матеріали та реактиви. Осад бактеріальної маси, 0,5%-й розчин глутамінової кислоти у фосфатному буфері з $\text{pH} = 6,0$, вероналовий буфер із $\text{pH} = 8,6$, 0,1%-й розчин нінгідрину, 5%-й розчин фенолу.

Обладнання. Центрифужні пробірки, лабораторні пробірки, піпетки, термостат, центрифужні ваги, центрифуга (2500 об./хв), прилад для електрофорезу, хроматографічний папір, фільтрувальний папір, сушильна шафа.

Хід роботи:

1. Проведення реакції декарбоксилування: до 1 мл осаду бактеріальної маси в центрифужній пробірці додають 1 мл 0,5%-го розчину глутамінової кислоти в буфері з $\text{pH} = 6,0$, вміст пробірок перемішують і поміщають на 1 год у термостат при температурі 37°C . Після цього пробірку врівноважують на центрифужних вагах і центрифугують 5 хв при 2500 об./хв, надосадову рідину зливають у чисту пробірку.

2. Проведення електрофорезу на папері: до складу приладу для електрофорезу входять дві кювети з електродами, випрямляч та стабілізатор струму. Кожна кювета розділена перегородкою на два відсіки. У зовнішніх відсіках містяться вугільні електроди, а у внутрішній занурюють кінці паперових смужок із досліджуваною речовиною.

а) В обидві кювети приладу наливають вероналовий буфер із $\text{pH} = 8,6$. На перегородку між зовнішнім і внутрішнім відсіками кладуть по шматочку фільтрувального паперу для іонофорезу між ними.

б) Готують смужку хроматографічного паперу розміром 2×25 см, олівцем проводять поперечну лінію посередині смужки і на кінцях проставляють знаки “+” та “-”.

в) Дві смужки розміщують на листі фільтрувального паперу; на одну з них упродовж поперечної лінії наносять капіляром або мікропіпеткою 0,05 мл надосадової рідини, на другу – 0,05 мл 0,5%-го розчину глутамінової кислоти та підсушують на повітрі.

г) Обидві смужки змочують буферним розчином із $\text{pH} = 8,6$, переносять у прилад і занурюють їхні кінці в кювети, причому смужки не повинні провисати (у камері можна помістити 6 смужок). Камеру накривають кришкою. Підключають випрямляч до кола і збільшують напругу.

д) Електрофорез проводять при напрузі 200–300 В та силі струму 1,5–2 мА протягом 1–1,5 год. Потім знижують напругу до нуля й виключають прилад.

ф) Смужки виймають із апарата, висушують у шафі при 100 °С, змочують 0,1%-м розчином нінгідрину і знову розміщують у сушильній шафі на 5 хв. На смужці з досліджуваною пробою спостерігається поява двох плям, що належать глутаміновій та γ-аміномасляній кислотам, оскільки за час інкубації повне декарбоксилювання зазвичай не настає.

Весь використаний посуд (піпетки, пробірки) складають у 5%-й розчин фенолу для дезінфекції.

Записують реакцію декарбоксилювання, принцип методу та приклеюють отримані електрофореграми.

Дикарбонова глутамінова кислота заряджена негативно й рухається до анода. Електрофореграму цієї кислоти зображено на рис. 1.18, А.

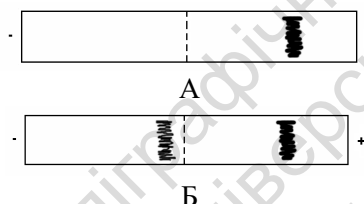
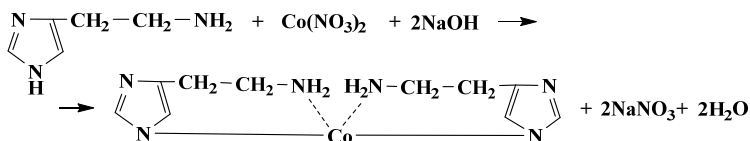


Рис. 1.18. Схематичне зображення електрофореграм глутамінової кислоти (А) і надосадової рідини дослідної проби (Б)

Утворена з неї монокарбонова γ-аміномасляна кислота при рН = 5,6–6,0 залишається на місці нанесення або навіть дещо зсувається до катода. У випадку, якщо повне декарбоксилювання глутамінової кислоти не настало, на електрофореграмі видно смужки обох кислот (рис. 1.18, Б).

Дослід 2. Реакція ідентифікації гістаміну із солями кобальту

Гістамін реагує із солями кобальту з утворенням забарвлених комплексних солей:



Матеріали та реактиви. Гістамін, 5%-й розчин нітрату кобальту або 5%-й розчин хлориду кобальту, 10%-й розчин гідроксиду натрію.

Обладнання. Піпетки, штатив із пробірками.

Хід роботи. 0,01–0,02 г гістаміну розчиняють в 1 мл води, додають 2–3 краплі розчину нітрату кобальту або хлориду кобальту й 1 краплю гідроксиду натрію. Випадає осад червоно-фіолетового кольору.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які амінокислоти підлягають:

- а) прямому окисному дезамінуванню?
- б) непрямому?
- в) гідролітичному?
- г) внутрішньомолекулярному?

Напишіть рівняння реакцій.

2. Принцип методів виявлення переамінування та визначення ферментативних активностей АЛАТ і АсАТ.

3. При яких хворобах трансамінази виходять із джерел ураження в кров?

4. Які речовини утворюються під час декарбоксилювання: гістидину, триптофану, лізину, аргініну? Напишіть рівняння відповідних реакцій.

5. Що таке глюको- і кетогенні амінокислоти?

ТЕМА 3. СПЕЦИФІЧНІ ШЛЯХИ ОБМІНУ АМІНОКИСЛОТ

1.3.1. Особливості обміну гліцину

Гліцин входить до складу глутатіону, бере участь у синтезі тканинних білків, креатину, серину, порфіринового кільця гему, пуринів, ДНК, РНК, жовчних кислот, метіоніну, ліпідів, гіпурової кислоти.

Головним шляхом метаболізму гліцину є його перетворення на діоксид вуглецю, аміак та N^5 -, N^{10} -метилентетрагідрофолієву кислоту. Реакція є оборотною і відбувається в печінці.

ТГФК – тетрагідрофолієва кислота – переносить одновуглецеві групи: метильну ($-\text{CH}_3$), метиленову ($-\text{CH}_2$), метенильну ($-\text{CH}=\text{}$), формільну ($-\text{COH}$), форміламіногрупу ($-\text{CH}=\text{NH}$). Ці групи використовуються в багатьох складних ферментативних реакціях (для біосинтезу серину, пуринів, піримідинів, метіоніну, гему).

1.3.2. Особливості обміну аргініну

Аргінін бере участь у біосинтезі тканинних білків, сечовини в печінці, агматину (ця реакція відбувається лише в кишечнику за дії декарбоксилаз бактерій), цитруліну, орнітину, креатину.

Біосинтез *креатину* відбувається за участю аргініну, гліцину, метіоніну. Перша стадія проходить у нирках, друга – у печінці. У м'язах у стані спокою креатин фосфорилується АТФ і запасється у вигляді макроергічної сполуки *креатинфосфату*. Під час роботи м'язів у першу чергу використовується енергія макроергічного зв'язку креатинфосфату (детальніше про роль креатину в енергетичному обміні у м'язах див. підрозд. 5.3.2).

Фосфорилування креатину каталізується ферментом *креатинкіназою* (КК). Молекула цього ензиму складається із двох субодиниць М- або В-типу (від *muscle* – м'яз, *brain* – мозок). В організмі наявні три ізоферменти КК: KK_3 (або MM) характерний для скелетних м'язів, KK_2 (або MB) – для міокарда, KK_1 (або VB) – для мозку. Загальна активність КК у сироватці підвищується при пошкодженні скелетних м'язів, м'язів серця, мозку; при захворюванні

м'язів (дистрофія, поліміозит, гіпотиреоз); після важкого фізичного навантаження. Активність МВ-ізоформи підвищується одразу після інфаркту міокарда (протягом 2–5 год), а ВВ-ізоформи – при важкому шоку, деяких карциномах, ураженнях мозку.

1.3.3. Особливості обміну сірковмісних амінокислот

Метіонін бере участь у біосинтезі тканинних білків, ацетилхоліну, ансерину, адреналіну, карнітину, цистеїну, тиміну, холіну, креатину. Він утворюється із амінокислоти L-гомоцистеїну в процесі, що отримав назву *цикл активного метилу*, із залученням ферменту гомоцистеїнметилтрансферази та коферментів ТГФК і метилкобаламіну.

Метіонін використовується в організмі при біосинтезах у реакціях трансметилування (синтез креатину, утворення холіну з етаноламіну, адреналіну з норадреналіну, метилювання азотистих основ), але не у вільному стані, а у вигляді S-аденозилметіоніну, який утворюється із метіоніну за дії метіонаденозилтрансферази.

L-гомоцистеїн є попередником в утворенні ще однієї сірковмісної амінокислоти – цистеїну. Цей шлях передбачає формування проміжного продукту цистатіоніну і залучення двох ферментів – цистатіонін-β-синтази й цистатіонін-β-ліази – і коферменту піридоксальфосфату. *Гомоцистинурія* – захворювання, що проявляється розумовою відсталістю – пояснюється вродженою недостатністю ферменту цистатіонін-β-синтази (рідше – гомоцистеїнметилтрансферази), а також недостатністю вітамінів B₆, B₁₂ та фолієвої кислоти. Недостатність цистатіонін-β-ліази або надмірна активність цистатіонін-β-синтази є причинами іншого розладу – цистатіонінурії.

Інші порушення обміну сірковмісних амінокислот спричинені ушкодженням функцій транспортних систем, що здійснюють їх реабсорбцію в ниркових канальцях. Так, при *цистинурії* цистин виділяється із сечею внаслідок повного блокування реабсорбції цистину та часткового – орнітину, лізину й аргініну. Оскільки цистеїн і його похідна цистин є слабкорозчинними у водному середовищі, цистинурія супроводжується утворенням цистинових каменів у сечових шляхах. *Цистиноз* є генералізованим розладом, пов'язаним із повним блокуванням реабсорбції майже всіх амінокислот у канальцях нирок. При цьому розладі цистинові камені не

утворюються, проте кристали цистину накопичуються у тканинах (кістковому мозку, селезінці, печінці, рогівці, ретикуло-ендотеліальній системі тощо). Унаслідок посилення екскреції із сечею цистину й цистеїну (у 20–30 разів) та інших амінокислот (у 5–10 разів) ці амінокислоти втрачаються і біосинтез білка порушується.

Цистеїн використовується в організмі на синтез тканинних білків, цистину, серину. Обмін цистеїну в організмі здійснюється двома основними шляхами: прямим окисним (цистеїнсульфінатним) і шляхом переамінування. У результаті утворюються:

- 1) цистеїнсульфінат;
- 2) сульфінілпіруват;
- 3) піруват;
- 4) сульфат, який використовується для синтезу ФАФС, що бере участь у знешкодженні отрут у печінці;
- 5) таурин, який відіграє певну роль в утворенні кон'югованих (парних) жовчних кислот.

1.3.4. Особливості обміну фенілаланіну й тирозину

У здорових людей майже весь фенілаланін, який не був використаний для синтезу білка, перетворюється у печінці на тирозин за дії 4-фенілаланінгідроксилази. Інший (мінорний) катаболічний шлях передбачає втрату аміногрупи в реакції трансамінування з утворенням фенілпірувату, а надалі – фенілацетату, що екскретується з організму.

Із тирозину в результаті складних біохімічних перетворень в організмі формуються катехоламіни та меланіни (цей шлях починається окисненням тирозину специфічною гідролазою до 3,4-діоксифенілаланіну (ДОФА), який при декарбоксілюванні до дофаміну стає попередником катехоламінів, а при окисненні тирозиназою до дофахінону – попередником меланінів), а в щитоподібній залозі – тиреоїдні гормони. Катаболічний шлях обміну тирозину починається з реакції трансамінування тирозину з утворенням пара-оксифенілпірувату; останній окиснюється до гомогентизинової кислоти (кофермент вітамін С). Гомогентизинова кислота окиснюється до фумарилацетоацетату (фермент оксидаза гомогентизинової кислоти), який потім розщеплюється до фумарату й ацетоацетату (фермент фумарилацетоацетатгідролаза).

Таким чином, у результаті обміну фенілаланіну й тирозину утворюються:

- 1) пара-оксифенілаланін;
- 2) гомогентизинова кислота;
- 3) фумарилацетооцтова кислота;
- 4) фумарат, який надходить до ЦТК;
- 5) ацетоацетат, що стає попередником ацетил-КоА, який надходить до ЦТК;
- 6) меланін;
- 7) катехоламіни: дофамін, норадреналін, адреналін.

Спадкова відсутність ферменту 4-фенілаланінгідроксилази блокує реакцію окиснення фенілаланіну до тирозину і, відповідно, усі подальші перетворення тирозину. Нагромадження у крові та тканинах фенілаланіну і продуктів його розпаду, у тому числі й фенілпірвіноградної кислоти, спричиняє потужну інтоксикацію з ушкодженням мозку (*фенілкетонурія*, або *фенілпірвіноградна олігофренія*).

1.3.5. Особливості обміну триптофану

Триптофан є попередником серотоніну й нікотинової кислоти, яка синтезується у вигляді НАД. 95% триптофану метаболізується по *кінуреніновому шляху* – спершу триптофан окиснюється (фермент триптофанпіролаза) до формілкінуреніну, із якого надалі утворюються кінуренін та 3-оксикінуренін. Далі під впливом кінуренінази (кофермент піридоксальфосфат) із 3-оксикінуреніну утворюються аланін і 3-оксіантранілова кислота; із останньої через низку реакцій синтезується НАД⁺.

Через уроджену недостатність ферментів цього метаболічного шляху гальмується перетворення триптофану на формілкінуренін, унаслідок чого порушується синтез НАД⁺ із одночасним розвитком пелагроподібних станів та накопиченням проміжних сполук кінуренінового шляху. Деякі з них – 3-оксикінуренін, ксантуренова та 3-оксіантранілова кислоти – при підвищенні їх вмісту здійснюють патогенні впливи. Ксантуренова кислота сприяє розпаду глікогену та гіперглікемії; у разі тривалого підвищення її вмісту спостерігаються дегенеративні зміни в β-клітинах підшлункової залози. Інші речовини мають канцерогенні властивості.

Інший – *серотоніновий шлях* обміну триптофану, за яким у нормі перетворюється лише 1% триптофану – починається гідроксилюванням цієї амінокислоти до 5-окситриптофану, який після декарбоксилювання перетворюється на серотонін. Останній в організмі перетворюється на оксііндолілацетат, що виділяється із сечею.

При захворюванні на карциноїдну пухлину понад 60% триптофану окиснюється серотоніновим шляхом, що веде до підвищення екскреції із сечею оксііндолілацетату, зменшення пулу триптофану і супроводжується пелагроподібними проявами – діареєю, дерматитами, деменцією (через послаблення кінуренінового шляху).

Ще один шлях обміну триптофану відбувається виключно в товстому кишечнику, де під впливом ферментів кишкової мікрофлори у процесі гниття білків у кишечнику з нього утворюються токсичні сполуки індол і скатол (детальніше див. підрозд. 1.1.4).

Хвороба Хартнупа – вроджене порушення всмоктування триптофану в кишечнику та реабсорбції його в нирках унаслідок мутацій відповідних транспортних систем – теж викликає розвиток пелагроподібного стану. Крім того, через накопичення триптофану в кишечнику посилюється його перетворення на індол і, як наслідок, у сечі виявляють надлишок тваринного індикану.

Отже, під час обміну триптофану утворюються:

- 1) тканинні білки;
- 2) продукти детоксикації – індикан;
- 3) серотонін;
- 4) токсичні речовини: індол, скатол;
- 5) НАД⁺;
- 6) формілкінуренін, кінуренін, оксикінуренін;
- 7) аланін;
- 8) хінолінова кислота, яка витрачається на біосинтез НАД⁺.

1.3.6. Особливості обміну розгалужених амінокислот

Шлях обміну амінокислот із розгалуженими ланцюгами (лейцин, валін, ізолейцин) відбувається у три стадії.

Унаслідок першої реакції – *трансамінування* (фермент – специфічна трансаміназа, кофермент В6) – утворюються відповідні кетокислоти; друга стадія – *окисне декарбоксилювання* – потребує залучення мультиферментного мітохондріального комплексу –

дегідрогенази розгалужених α -кетокислот і завершується утворенням ацил-КоА-тіоефірів. У результаті наступної *реакції дегідрогенування*, яку здійснюють ферменти, подібні до ФАД-залежної ацил-КоА-дегідрогенази нерозгалужених жирних кислот, ацил-КоА-тіоефіри перетворюються на α , β -еноіл-ацил-КоА-тіоефіри. Останні через низку перетворень стають попередниками ацетоацетату й ацил-КоА (у випадку метаболізму лейцину) або сукциніл-КоА (при перетвореннях валіну та ізолейцину).

Спадковий дефект гена, що відповідає за синтез дегідрогенази розгалужених α -кетокислот, викликає розвиток *кетоацидурії кислот із розгалуженим ланцюгом*. При цьому розладі у крові та внутрішніх органах накопичуються указані амінокислоти й відповідні їм кетокислоти; сеча набуває специфічного запаху кленового сиропу, з чим пов'язана інша назва цієї патології – *хвороба кленового сиропу*. Захворювання супроводжується затримкою загального розвитку та важкими психічними розладами.

Лабораторна робота № 1.6

Вивчення особливостей обміну фенілаланіну

Дослід 1. Експрес-метод визначення підвищеного вмісту фенілаланіну в крові (за Ф. Б. Левіним)

Метод ґрунтується на хроматографічному визначенні підвищеного вмісту фенілаланіну в мінімальному об'ємі крові. Він може набути широкого застосування для ранньої діагностики фенілкетонурії – спадкового розладу, за якого зростання вмісту фенілпіровиноградної кислоти в сечі (до 2000 мг/добу) поєднується з високим вмістом фенілаланіну в крові (15–63 мг/100 мл). Тому визначення підвищеної кількості фенілаланіну крові є надійним діагностичним тестом для виявлення фенілкетонурії в новонароджених дітей перших двох місяців. Метод радіальної хроматографії дозволяє розділити амінокислоти сироватки або плазми крові.

Матеріали та реактиви. Дослідна й контрольна цільна кров або плазма крові, розчинник – суміш бутанолацтова кислота : вода, розчин нінгідрину, стандартний розчин фенілаланіну з концентрацією 6 мг/100 мл.

Обладнання. Мікропробірка, змочена розчином гепарину або цитрату, піпетки та мікропіпетки, крапельниці, центрифуга (2000 – 2500 об./хв), диск із хроматографічного паперу, чашка Петрі, фільтрувальний папір, сушильна шафа.

Хід роботи: У змочену розчином гепарину або цитрату натрію мікропробірку вносять 3–4 краплини досліджуваної крові й центрифугують 2 хв при 2000–2500 об./хв. Утворену плазму (її можна отримати також відстоюванням) у кількості 0,02 мл наносять мікропіпеткою в центр диска з хроматографічного паперу та висушують на повітрі протягом 10 хв. Диск розміщують на чашці Петрі. Із невеличкого трикутника фільтрувального паперу скочують гніт і встромлюють його в отвір у центрі диска, зроблений голкою. Нижній кінець гніта повинен торкатися дна чашки, у яку наливають 10–15 мл розчинника (суміш бутанолоцтова кислота : вода). Розділення проводять доти, поки фронт розчинника не пройде відстань 5 см. Потім хроматограму сушать у сушильній шафі при 80 °С, проявляють розчином нінгідрину, злегка підсушують на повітрі й знову кладуть у сушильну шафу на 10 хв.

Паралельно з дослідною пробою ставлять 2 контрольні стандарти:

1. Із плазмою (0,02 мл) здорової людини (дитини), що містить приблизно 1 мг/100 мл фенілаланіну.

2. Із цією ж плазмою, на висушену пляму якої наносять 0,02 мл стандартного розчину фенілаланіну з концентрацією 6 мг/100 мл. Концентрація цього стандарту відповідає 7 мг/100 мл, і зразки досліджуваної плазми, що дають забарвлення такої самої або більшої інтенсивності, вважаються позитивними.

У стандарті № 1 (норма) результат негативний, оскільки вміст фенілаланіну тут нижче 7 мг/100 мл, забарвлюється лише пляма нанесеної плазми та невеличка частина середовища, що її оточує.

У стандарті № 2 і в пробах, узятих у хворих на фенілкетонурію, виявляється чіткий ореол фенілаланіну, що відділяється просвітом від центрального ядра.

У випадку позитивної проби доцільно проводити ідентифікацію фенілаланіну повторним хроматографуванням. Найбільш близькі до фенілаланіну за рухливістю амінокислоти – ЛЕЙ, ВАЛ, МЕТ – забарвлюються нінгідрином у бузково-червоний

колір, який при нагріванні хроматограми переходить у помаранчево-рожевий тон, тоді як фенілаланін має стійкий синьо-фіолетовий колір.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 2. Якісна реакція на фенілпіровиноградну кислоту (проба Фелінга)

Фенілпіровиноградна кислота утворює з іонами тривалентного заліза комплексну сполуку, забарвлену в синьо-зелений колір.

Матеріали та реактиви. Сеча, 10%-й розчин хлориду заліза.

Обладнання. Піпетки, пробірки, крапельниці, фільтри.

Хід роботи. До 2 мл свіжовідфільтрованої сечі наливають 8–10 крапель 10%-го розчину хлориду заліза. За наявності в сечі фенілпіровиноградної кислоти через 30–60 с з'являється синьо-зелене забарвлення, яке поступово блідне і щезає через 5–30 хв залежно від концентрації фенілпіровиноградної кислоти в сечі. Цю пробу можна робити на фільтрувальному папері: смужку фільтрувального паперу змочують сечею, висушують на повітрі й наносять краплю 10%-го розчину хлориду заліза. Позитивна проба дає синьо-зелене забарвлення. Аналогічну пробу проводять із сухою або вологою дитячою пелюшкою.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які головні метаболіти утворюються в організмі людини із: гліцину, аргініну, метіоніну, фенілаланіну, тирозину, триптофану?
2. До чого приводять порушення обміну окремих амінокислот?
3. Принцип методу якісного та кількісного визначення фенілаланіну в крові.
4. Яка роль таурину, що утворюється у процесі обміну цистеїну?
5. Як саме проявляються порушення обміну триптофану при хворобі Хартнупа?

ТЕМА 4. ОБМІН АМІАКУ В ОРГАНІЗМІ. БІОСИНТЕЗ СЕЧОВИНИ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

У результаті обміну білків в організмі в усіх тканинах постійно утворюється аміак. Джерела аміаку в організмі:

- амінокислоти;
- амід амінокислот: глутамін, аспарагін;
- біогенні аміни;
- пуринові нуклеотиди;
- піримідинові основи.

Аміак є токсичною речовиною для організму, особливо для центральної нервової системи.

Існує п'ять шляхів знешкодження аміаку:

1. Біосинтез сечовини в печінці.
2. Відновлювальне амінування у тканинах.
3. Утворення амідів кислот у тканинах.
4. Утворення піримідинових основ у цитозолі клітин.
5. Утворення амонійних солей у нирках.

Основний шлях знешкодження аміаку в організмі – біосинтез сечовини в печінці (*орнітиновий цикл*). У печінку аміак надходить із мозку та інших тканин не у вільному вигляді, а у вигляді глутаміну, який глутаміназою гідролітично розщеплюється на аміак і глутамінову кислоту. Із м'язів і кишечника аміак надходить у вигляді аланіну.

1.4.1. Біосинтез сечовини в печінці

Біосинтез сечовини відбувається у 5 етапів (рис. 1.19).

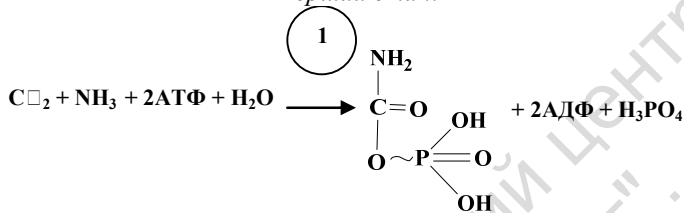
Перший і другий етапи біосинтезу проходять у мітохондріях клітин печінки (фермент, що каталізує перший етап орнітинового циклу – карбамоїлфосфатсинтетаза I – локалізований лише в зазначених органелах цього органа); третій, четвертий і п'ятий етапи відбуваються у цитозолі.

Ферменти біосинтезу сечовини (цикл сечовини):

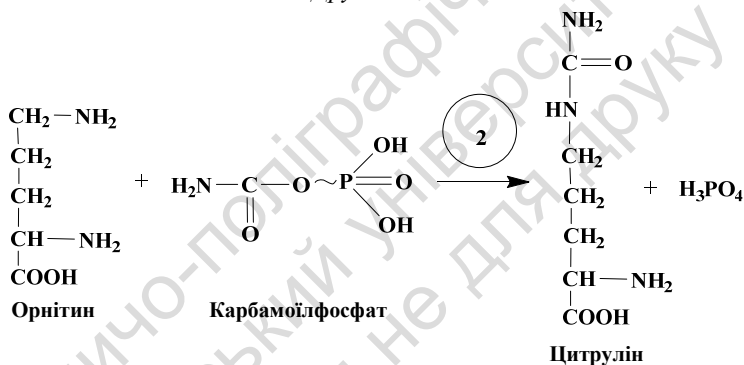
- 1) карбамоїлфосфатсинтетаза I;
- 2) орнітинкарбамоїлтрансфераза;

- 3) аргініносукцинатсинтетаза;
- 4) аргініносукцинатліаза;
- 5) аргіназа.

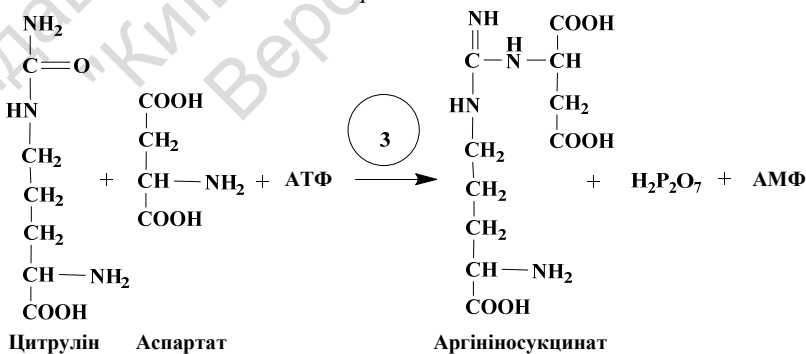
Перший етап:



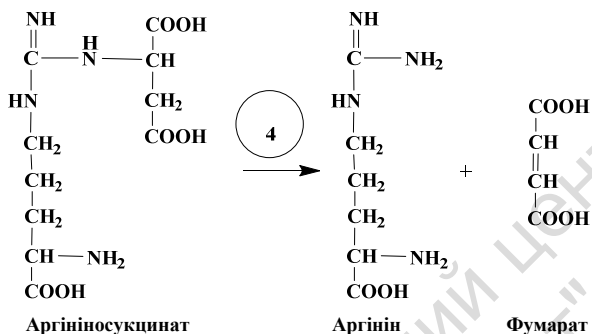
Другий етап:



Третій етап:



Четвертий етап:



П'ятий етап:

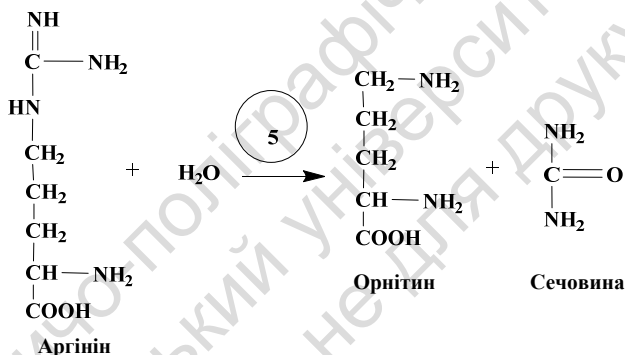
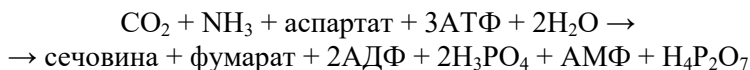


Рис. 1.19. Реакції орнітинового циклу: 1 – карбамоїлфосфатсинтетаза I; 2 – орнітинкарбамоїлтрансфераза; 3 – аргініносукцинатсинтетаза; 4 – аргініносукцинатліаза; 5 – аргіназа

Джерела атомів азоту, вуглецю та кисню в циклі сечовини:

- перша аміногрупа – із вільного аміаку, що утворюється при окисному дезамінуванні глутамату;
- друга аміногрупа постачається аспаратом, який утворився в реакції трансамінування оксалоацетату з амінокислотами;
- вуглець – із молекули CO₂, що утворився в мітохондріях у процесі дихання;
- кисень – із молекули води.

Сумарне рівняння синтезу сечовини:



Біологічна роль орнітинового циклу:

1. Знешкодження аміаку в організмі.
2. Регуляція азотистого балансу в організмі – при надходженні великої кількості білка в організм швидкість циклу збільшується.
3. Постачає фумарат у ЦТК.
4. Біосинтез замінних амінокислот через оксалоацетат.
5. Постачає оксалоацетат для біосинтезу глюкози.

Аномалії та недостатність циклу сечовини є спадковими ензимопатіями, спричиненими повним або частковим дефектом утворення в печінці окремих ферментів циклу сечовиноутворення. Повна відсутність будь-якого ферменту циклу спричиняє кому і веде до смерті одразу після народження. Часткова недостатність супроводжується затримкою розумового розвитку, порушенням координації рухів, відразою до білкової їжі. Для всіх цих розладів характерна *гіперамоніємія* – підвищення вмісту аміаку в крові.

Найважчими клінічними проявами характеризуються порушення синтезу *карбамоїлфосфатсинтетази* та *орнітинкарбамоїлтрансферази*. Діти з такими генетичними дефектами страждають вираженою енцефалопатією, прояви якої дещо послаблюються в умовах повного виключення споживання харчових білків. Зниження утворення карбамоїлфосфату також зумовлює порушення синтезу піримідинових нуклеотидів у організмі.

1.4.2. Роль печінки в обміні білків

У гепатоцитах відбуваються такі реакції:

1. Переамінування.
2. Відновлювальне амінування.
3. Окисне дезамінування.
4. Знешкодження амінів.

5. Біосинтез білків – ферментів біосинтезу сечовини, кетонів тїл, глюконеогенезу.
6. Біосинтез білків плазми крові.
7. Біосинтез білків системи згортання крові та антикоагуляційної системи.
8. Біосинтез сечовини.
9. Біосинтез пуринів, піримідинів та їхній розпад.
10. Біосинтез гемму.

1.4.3. Клінічне значення визначення аміаку, сечовини та залишкового азоту крові

Визначення аміаку в крові має велике прогностичне значення при захворюваннях печінки. У нормі в крові міститься менше 65 мкмоль/л цієї речовини, а із сечею виділяється 0,5 г за добу. За тяжких паренхіматозних ушкоджень печінка стає неспроможною знешкодити аміак, що надходить, унаслідок чого він нагромаджується у крові й виникає гіперамоніємія. Клінічними симптомами, загальними для всіх порушень біосинтезу сечовини, є блювання (у дітей), відраза до багатих на білки продуктів, порушення координації рухів, роздратованість, сонливість, розумова відсталість. Причиною гіперамоніємії також можуть бути вроджена недостатність хоча б одного із п'яти ферментів біосинтезу сечовини, надлишкове споживання білків, кишкові кровотечі.

Вміст аміаку в сечі є важливим показником стану кислотно-основної рівноваги. Кількість аміаку в сечі підвищується як при респіраторному, так і при метаболічному ацидозі. Підвищення кількості аміаку в сечі зустрічається також при гіперфункції кори надниркових залоз, лихоманці, цистопієлітах (унаслідок бактеріального розкладання сечі) та при деяких інших захворюваннях.

Залишковий азот крові – це азот небілкових азотистих компонентів сироватки крові. До складу залишкового азоту крові входить головним чином азот кінцевих продуктів обміну простих і складних білків: сечовини (85%), креатиніну, сечової кислоти, індикану, амінокислот, солей амонію (загалом – 15%). Оскільки 85% залишкового азоту являє собою азот сечовини, у

клініко-біохімічних лабораторіях часто визначають не сумарний залишковий азот, а кількість сечовини. У нормі азот сечовини крові становить 2,9–8,9 ммоль/л, а сечовина крові – 3,5–9,0 ммоль/л. Якщо добове споживання білка дорівнює 100 г, із сечею в нормі виділяється 25–35 г сечовини за добу.

Рівень сечовини в крові та сечі залежить від співвідношення процесів її синтезу та виведення із організму.

Азотемія – підвищення вмісту залишкового азоту (найчастіше – за рахунок збільшення концентрації сечовини) у крові спостерігається:

1) при нирковій недостатності, гострому та хронічному нефриті, гострому канальцевому некрозі, при обструкції сечовивідних шляхів, порушенні функції нирок при дегідратації, зменшенні ниркового кровотоку. При цьому виділення сечовини із сечею різко знижується, тому концентрація сечовини в крові зростає і розвивається *уремія* (сечокрів'я) – стан, який потребує видалення сечовини із крові за допомогою гемодіалізу.

2) при посиленні метаболізму азоту на фоні зменшення ниркового кровотоку, а також при кровотечах із верхніх відділів шлунково-кишкового тракту. Тут поєднується підвищене всмоктування білків крові та зменшення ниркового кровотоку;

3) при шоку тощо.

Зниження концентрації сечовини в крові спостерігається під час вагітності, при дотриманні дієти з низьким вмістом білків, при патологіях печінки, що супроводжуються порушенням синтезу сечовини (отруєння фосфором, арсеном (миш'яком) та іншими токсинами, а також при цирозі печінки).

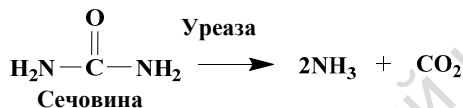
Характерні зміни вмісту сечовини в сечі спостерігаються при голодуванні. Перша фаза голодування триває протягом 1 доби й супроводжується розпадом глікогену – запасного вуглеводу печінки. Друга фаза триває один тиждень – у цей час як енергетичний матеріал використовуються ліпіди та вищі жирні кислоти. Остання – третя фаза – триває декілька тижнів. Оскільки енергетичний матеріал не надходить з їжею, а запаси вуглеводів, ліпідів і жирних кислот уже вичерпалися, відбувається розпад власних білків. За добу руйнується близько 20 г власних білків, унаслідок чого із сечею виділяється приблизно 5 г сечовини. Спостерігається негативний азотистий баланс в організмі. Якщо розпадеться 1/3–1/2 білків організму, організм загине.

Лабораторна робота № 1.7

Визначення вмісту сечовини в біологічних рідинах

Дослід 1. Визначення сечовини в сечі уреазним методом

Сечовина за дії уреаз розкладається на аміак та вуглекислий газ. Аміак відтитровують розчином соляної кислоти.



За добу у людини із сечею виділяється 25–30 г сечовини (це залежить від кількості білка, що надходить з їжею). При захворюваннях печінки добова кількість сечовини, що виводиться із сечею, зменшується.

Матеріали та реактиви. Розчин уреаз, фосфатний буфер із рН = 7,0, профільтована й розведена в 10 разів сеча, 0,1 н. розчин соляної кислоти, індикатор метиловий червоний

Обладнання. Колби, піпетки, водяна баня, бюретки для титрування.

Хід роботи. У дві колби на 100 мл наливають по 5 мл розчину уреаз, одну з них (контрольну) нагрівають до кипіння й кип'ятять протягом 2 хв. Надалі в колби додають по 5 мл фосфатного буфера рН = 7,0 і по 5 мл профільтрованої й розведеної в 10 разів сечі.

Колби залишають стояти при кімнатній температурі на 1 год. Потім в обидві колби додають по 10 краплин індикатора метилового червоного й титрують 0,1 н. розчином соляної кислоти до появи оранжевого кольору.

1 мл 0,1 н. розчину соляної кислоти відповідає 3 мг сечовини. Кількість сечовини, що виділяється із організму із сечею, розраховують за формулою:

$$C = \frac{(A - B) \times 3 \times 1500}{5} \times 10,$$

де A – кількість розчину соляної кислоти, витраченої на титрування;

B – кількість розчину соляної кислоти, витраченої на титрування контрольної пробірки;

10 – розведення сечі;

1500 – кількість сечі, що виділяється за добу в організмі людини.

Розрахунок кількості сечовини, що виділяється з організму із сечею за добу, та отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

Дослід 2. Визначення вмісту сечовини в біологічних рідинах діацетилмонооксимним методом із використанням набору реактивів

Утворення сечовини є основним шляхом знешкодження аміаку, що утворюється в печінці. Печінка є єдиним органом, у якому відбувається синтез сечовини. У нормі сечовина виводиться із організму у складі сечі, причому в процесі сечоутворення вона підлягає процесам фільтрації, реабсорбції та секреції, які потребують нормального функціонування клубочкового фільтру та транспортних систем ниркових каналців.

Вміст сечовини в сироватці крові в нормі становить 1,7–8,3 мкмоль/л, у сечі – 333–583 ммоль/добу. Підвищений вміст сечовини у крові зазвичай свідчить про порушення функцій нирок, посилений катаболізм білків або вживання продуктів із високим вмістом протеїнів. Зниження вмісту сечовини може бути зумовлене низькобілковою дієтою, фізіологічними станами, що супроводжуються потужним використанням амінокислот на біосинтез білків (останній триместр вагітності, діти віком до 1 року, акромегалія), важкими порушеннями функцій печінки.

Сечовина утворює з діацетилмонооксимом у присутності тіосемікарбазиду й солей заліза в кислому середовищі комплексну сполуку червоного кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту сечовини в розчині.

Матеріали та реактиви. Сеча, сироватка крові або гепаринізована плазма, реагент діацетилмонооксиму (для виготовлення розчину діацетилмонооксиму в мірну колбу на 100 мл кількісно переносять вміст однієї ампули ($5,0 \pm 0,5$ мл) реагенту діацетилмонооксиму й доливають дистильованою водою до мітки, перемішують), концентрат розбавлювача (для виготовлення такого розчину в мірну колбу на 200 мл наливають 60–80 мл дистильованої води і додають при перемішуванні вміст одного (100 мл) або двох (по 50 мл) флаконів із концентратом розбавлювача; об'єм розчину доводять дистильованою водою до мітки, перемішують), реагент тіосемікарбазиду (для виготовлення розчину

тіосемікарбазиду в мірну колбу на 100 мл кількісно переносять вміст однієї ампули ($5,0 \pm 0,5$ мл) реагенту тіосемікарбазиду й доводять охолодженим до кімнатної температури розчином розбавлювача до мітки, перемішують), калібрувальний розчин сечовини ($10,0 \pm 0,5$ ммоль/л), розчин ТХО ($50 \pm 2\%$) (перед використанням у мірну колбу місткістю 50 мл переносять вміст ампули з ТХО і при перемішуванні доводять розчин до мітки дистильованою водою, перемішують).

Обладнання. Фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 540–560 нм, кювети товщиною 10 мм, водяна баня з киплячою водою, мірні колби місткістю 100, 200 та 50 мл, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Сечу перед аналізом розводять у 50 разів (отриманий результат, відповідно, множать на коефіцієнт розведення, який дорівнює 50), сироватку або плазму крові використовують без розведення.

Аналіз проводять за схемою, наведеною в табл. 1.5 (рекомендовано використовувати макровизначення).

Таблиця 1.5

Схема проведення дослідів з визначення вмісту сечовини в біологічних рідинах діацетилмонооксимним методом

Відміряти у пробірці	Мікровизначення			Макровизначення		
	Проба					
	Дослідна мл	Калібру- вальна	Холоста	Дослід- на	Калібру- вальна	Холо- ста
Біологічна рідина	0,01	—	—	0,02	—	—
Калібрувальний розчин	—	0,01	—	—	0,02	—
Фізіологічний розчин	—	—	0,01	—	—	0,02
Розчин тіосемікар- базиду	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
Розчин діацетилмоно- оксиму	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00

Пробірки закривають ковпачками, перемішують вміст і одночасно поміщають у бурхливо киплячу водяну баню рівно на 10 хв. Потім пробірки швидко охолоджують у проточній холодній воді. Вимірюють оптичну густину дослідної проби ($E_{\text{досл}}$) і калібрувальної проби ($E_{\text{калібр}}$) проти холостої проби. Якщо після нагрівання розчин у пробірці з дослідною пробою мутний, його центрифугують протягом 5 хв або депротеїнують розчином ТХО

Розрахунок концентрації сечовини проводять за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{калібр}}} \times 10,0,$$

де C – концентрація сечовини у пробі, ммоль/л;

10,0 – калібрувальна концентрація сечовини, ммоль/л;

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби, од. оптич. густини;

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

Розрахунок вмісту сечовини в досліджуваній пробі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

Лабораторна робота № 1.8

Визначення вмісту аміаку в сечі

Вміст амонієвих солей у сечі визначають титриметричним методом після реакції з формальдегідом. Метод базується на взаємодії солей амонію з формальдегідом, у результаті чого утворюється гексаметилентетрамін (уротропін), і вивільнюється еквівалентна кількості аміаку кількість кислоти, яку відтитровують розчином основи:



Вміст аміаку в сечі є важливим показником кислотно-основного стану. Зростання цього показника свідчить про розвиток респіраторного або метаболічного ацидозу (станів, які супроводжуються підвищенням кислотності крові), а його зниження, відповідно, може бути ознакою розвитку алкалозу (залуження крові).

Матеріали та реактиви. Сеча з добової кількості, нейтралізований формальдегід, фенолфталеїн, 0,1 М розчин гідроксиду натрію.

Обладнання. Колби, піпетки, бюретки.

Хід роботи. У колбу наливають 10 мл сечі, додають 1–2 краплі фенолфталеїну і нейтралізують 0,1 М розчином гідроксиду натрію. Додають рівний об'єм свіжонеутралізованого розчину формальдегіду. Внаслідок виділення кислоти рожеве забарвлення зникає. Суміш титрують 0,1 М розчином гідроксиду натрію до появи рожевого забарвлення. За об'ємом основи, витраченої на титрування, розраховують вміст аміаку в добовій кількості сечі:

$$X = \frac{a \times 0,0017 \times D}{10},$$

де X – кількість аміаку в добовій сечі, г;

a – об'єм основи, витраченої на титрування, мл;

0,0017 – кількість аміаку, що відповідає 1 мл 0,1 М розчину гідроксиду натрію (титр аміаку), г;

D – добова кількість сечі, мл;

10 – кількість сечі для аналізу, мл.

Розрахунок вмісту аміаку в сечі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами й роблять висновок.

Лабораторна робота № 1.9

Визначення вмісту залишкового азоту крові (метод Боданського)

Залишковий азот – це показник, який відображає вміст у крові азотовмісних небілкових сполук. Головною складовою залишкового азоту є сечовина. *Азотемія* – підвищення показника – зумовлена порушенням балансом між утворенням і виведенням продуктів азотистого обміну з організму. Причинами азотемії можуть бути затримка виведення азотовмісних сполук унаслідок порушення видільної здатності нирок (гломерулонефрити, гостра чи хронічна ниркова недостатність), тяжкої недостатності кровообігу або надлишкове надходження їх у кров через посилений розпад білків при пораненнях, опіках, кахексії, поширених запаленнях тощо. Зниження вмісту залишкового азоту вказує на розвиток тяжкої печінкової недостатності. Нормальні значення даного показника становлять 14,3–25 ммоль/л (20–30 мг%).

Для диференційної діагностики захворювань нирок від глибоких дистрофічних ушкоджень печінки використовують коефіцієнт X (у відсотках):

$$X = (\text{азот сечовини} / \text{залишковий азот}) \times 100.$$

У нормі він дорівнює 46–60%, при хронічних нефритах зростає до 90% (утримання сечовини), а при тяжких формах гепатитів, навпаки, зменшується (порушення утворення сечовини).

Вміст залишкового азоту крові визначають у безбілковому фільтраті після осадження білків крові. Безбілковий фільтрат мінералізують концентрованою сірчаною кислотою. При цьому

азот усіх азотовмісних сполук у вигляді аміаку зв'язується із сірчаною кислотою й утворює сульфат амонію, який із реактивом Несслера утворює сполуку жовто-оранжевого кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту азоту.

Матеріали та реактиви. Кров, 10%-й розчин ТХО, концентрована сірчана кислота, пергідроль, 12,5 М розчин гідроксиду натрію, реактив Несслера (калій-меркурію йодид), стандартний розчин сульфату амонію (1 мл розчину сульфату амонію містить 0,05 г азоту), лакмусовий папір.

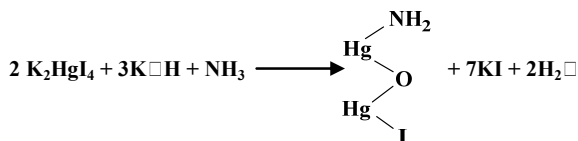
Обладнання. Мікропіпетки, ФЕК, центрифуга, термостійкі пробірки, піщана баня.

Хід роботи.

Отримання безбілкового фільтрату. У центрифужну пробірку наливають 2,8 мл 10%-го розчину ТХО і 0,2 мл крові. Суміш ретельно перемішують, залишають на 15 хв і центрифугують.

Мінералізація. У термостійку пробірку наливають 0,5 мл центрифугату, додають 0,05 мл концентрованої сірчаної кислоти. Спалювання здійснюють на піщаній бані. У разі спалювання пробірка має торкатися тільки верхнього шару піску. Спочатку випаровується вода, досліджувана рідина набуває бурого забарвлення. Пробірку знімають із бані, дають їй охолонути, додають у пробірку 2 краплі пергідроллю і знову ставлять для спалювання до знебарвлювання рідини. Слід перевірити колір рідини у пробірці після її охолодження, оскільки часто рідина, яка здається безбарвною в гарячому стані, під час охолодження темнішає. Після охолодження у пробірку додають 10 мл свіжокип'яченої дистильованої води й нейтралізують 12,5 М розчином гідроксиду натрію до слабколужної реакції. Реакцію визначають за зміною кольору лакмусового паперу із червоного кольору на синій. Надлишок основи у разі нейтралізації призводить до помутніння розчину. Недостатність основи спричиняє випадання солей ртуті з реактиву Несслера, і дослід вважають зіпсованим.

Кольорова реакція (неслеризація). У пробірку додають 0,5 мл реактиву Несслера, унаслідок чого вміст пробірки забарвлюється у жовтий колір різної інтенсивності залежно від вмісту азоту:



Паралельно з дослідною пробою обробляють стандартну пробу (0,2 мл стандартного розчину сульфату амонію, 0,05 мл концентрованої сірчаної кислоти, 0,3 мл 12,5 М розчину гідроксиду натрію, 0,5 мл реактиву Несслера і 9,8 мл дистильованої води). Дослідну і стандартну проби вимірюють порівняно з контролем на реактиви (*контрольну пробу* роблять так, як і стандартну, але замість 0,2 мл стандартного розчину сульфату амонію додають 0,2 мл дистильованої води; контрольна проба має легкий жовтуватий відтінок, більш насичений колір контролю свідчить про наявність у дистильованій воді азоту). Вимірювання здійснюють за довжини хвилі 440–450 нм (фіолетовий світлофільтр) у кюветі завтовшки 5 мм.

Розрахунок здійснюють за формулою:

$$C_{\text{досл}} = C_{\text{станд}} \times \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{станд}}},$$

де $C_{\text{досл}}$ – концентрація залишкового азоту в дослідній пробі, ммоль/л;

$C_{\text{станд}}$ – концентрація залишкового азоту у стандартній пробі, 21,4 ммоль/л;

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби, од. оптич. густини;

$E_{\text{станд}}$ – оптична густина стандартної проби, од. оптич. густини.

Розрахунок вмісту залишкового азоту в досліджуваній пробі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Із яких субстратів і в яких реакціях утворюється NH_3 в організмі людини? Напишіть рівняння цих реакцій.
2. Наведіть рівняння реакцій основних шляхів знезараження аміаку в клітинах тканин (крім гепатоцитів).
3. Напишіть рівняння реакцій, що приводять до біосинтезу сечовини в гепатоцитах печінки. Назвіть ферменти процесу.
4. Принципи методів визначення сечовини у біологічних рідинах.
5. Для чого при визначенні сечовини в крові використовують ТХО?

ТЕМА 5. РОЗПАД ТА ОНОВЛЕННЯ БІЛКІВ. СПЕЦИФІЧНІСТЬ БІЛКІВ

І Н Ф О Р М А Ц І Й Н И Й М А Т Е Р І А Л

Терміни функціонування деяких білків: колаген – 6–8 місяців, інсулін – 20–30 хв, гемоглобін – 100–120 днів, білки слизової оболонки кишечника – 2–4 доби, фактори згортання крові (прокоагулянти) – 6–10 діб, білки-антикоагулянти – 10–15 хв.

Причинами розпаду білків є:

- 1) старіння клітин чи їх пошкодження;
- 2) денатурація білків;
- 3) частковий протеоліз білків-ферментів;
- 4) перетравлювання білків травних соків;
- 5) розпад регуляторних білків (наприклад, білків-гормонів);
- 6) використання білків з метою отримання енергії.

Аутофагія – поглинання і перетравлення у лізосомах пошкоджених чи постарілих власних білків мембран клітин.

Гетерофагія – поглинання зовні вірусів, мікробів і перетравлення їх у лізосомах клітин.

1.5.1. Характеристика ферментів розпаду білків у тканинах

За локалізацією тканинні протеїнази – катепсини – поділяються на дві групи. *Кислі катепсини* (85–90%) містяться у лізосомах клітин органів. Тут відбувається основний процес гідролітичного розщеплення білків. *Основні та нейтральні катепсини* (10–15%) локалізовані в цитозолі й ендоплазматичному ретикулумі. Вони доповнюють дію кислих катепсинів.

За специфічністю дії катепсини поділяють на екзопептидази (С, А, Н) та ендопептидази (В, N, L, S, D) (табл. 1.6).

Таблиця 1.6

Типи катепсинів, їхні властивості та функції

Тип катепсину	Оптимум рН	Функція
Катепсин С	5,0–6,0	Відщеплює дипептид з N-кінця поліпептидного ланцюга
Катепсин А	5,0–5,5	Принцип дії аналогічний карбоксипептидазі А
Катепсин Н	6,0–7,0	За дією аналогічний амінопептидазі ШКТ. Найбільш активний у клітинах печінки
Катепсин В	5,5–6,0	Дія схожа на трипсин
Катепсин N	3,6–6,0	При рН = 3,6–6,0 діє на нативний колаген. При рН = 6,0 розщеплює розчинний колаген
Катепсин L	5,0	За дією аналогічний хімотрипсину
Катепсин S	3,0–4,0	Розщеплює білки у клітинах селезінки та в лімфовузлах
Катепсин D	3,5–4,0	Дія аналогічна пепсину

Катепсини:

1. Здійснюють тканинний гідроліз білків, необхідний для їхнього оновлення.
2. Мобілізують ендogenousний білок для енергетичних цілей, особливо під час голодування.
3. Виконують катаболічну роль – утворюють амінокислоти, що беруть участь у метаболізмі та подальшому розпаді (1/4 амінокислот).
4. Здійснюють регуляторну роль – сприяючи частковому протеолізу чи посттрансляційному добудовуванню, катепсини активують гормони і ферменти.

1.5.2. Убіквітинзалежна деградація білків у протеасомі

Молекули різних білків дуже різняться між собою за часом життя в організмі. Цей час визначається функцією білків: деякі структурні білки можуть залишатися незмінними протягом багатьох років, тоді як регуляторні часто є необхідними організму лише протягом кількох хвилин для запуску певного процесу й

після виконання своєї функції вони повинні бути зруйновані. Окрім подібних непотрібних на даний момент білків, із клітини повинні видалятися й невірно згорнуті та окиснені білки, які з часом накопичуються в ній у великій кількості.

Деградація відпрацьованих і дефектних білків має бути селективною і здійснюватися в ізольованих компартментах, щоб не ушкоджувати структурні компоненти клітини й функціонуючі білки. В еукаріотичній клітині одним із подібних відділів для утилізації білків є лізосома. Однак ця органела здійснює неспецифічний протеоліз – у лізосомах руйнуються лише білки, сполучені з мембранами, та чужорідні білки, що надійшли у клітину в процесі ендоцитозу (вірусні, бактеріальні тощо). Деградація більшості (80–90%) внутрішньоклітинних білків – як з коротким, так і з тривалим терміном життя – здійснюється у порожнині протеасоми.

Протеасома (від *протео-* і *сома* – *частинка із протеолітичною функцією*, за К. Танакою і А. Голдбергом) – це високомолекулярний білковий комплекс, що функціонує в клітинах за певних умов як кілька протеолітичних ферментів. Цей комплекс виявлено в клітинах як найбільш примітивних, так і вищих еукаріотів, як в ядрі, так і в цитоплазмі, що свідчить про його важливу роль у нормальній життєдіяльності клітин.

Протеасомою названі дві частинки з різною складністю будови, з різними молекулярними масами та коефіцієнтами седиментації (S): уперше виділений комплекс з молекулярною масою близько 700 кДа та коефіцієнтом седиментації 20S (так звана *20S-протеасома*) як протеолітичне ядро входить до складу ще більш складної частинки – *26S-протеасоми*.

Зрозуміло, що перш ніж розпочати деградацію відпрацьованого/ушкодженого білка, протеасома має розпізнати об'єкт гідролізу за певною ознакою. Відбір субстратів для протеолізу забезпечується тим, що вхід у 20S протеасому звичайно є закритим, і потрапити до неї можуть лише білки, що мають спеціальну "мітку". Таке "маркування" здійснює спеціальна система ферментів – *система убіквітинування*, а "ярликом" слугує ланцюг не менш ніж із чотирьох молекул білка *убіквітину*, кожна з яких складається із 76 амінокислотних залишків.

Як утворення ланцюга через залишок лізину в 48-му положенні кожної молекули, так і приєднання його до білка-субстрату здійснюється зазначеною ферментативною системою.

Вона включає *три типи ферментів* – E1, E2 і E3, є високоспецифічною та вибірковою за рахунок того, що побудована за принципом ієрархічного ускладнення (рис. 1.20).

Фермент E1 (у клітині він лише один) активує молекулу убіквітину та передає її одному із **ферментів родини E2** (це так звані "кон'югуючі" ферменти). Надалі залучається **третій ензим – представник родини E3 – лігаза**, або "живий" фермент. Він приймає убіквітин від E2, з'єднується з білком-субстратом і ковалентно пришиває до нього ланцюг убіквітину.

Під час входу в канал протеасоми поліпептидний ланцюг білка розгортається й протягується через нього, гідролізуючись до коротких пептидів (від 3 до 25 амінокислотних залишків), які виходять із протилежного отвору каналу і надалі руйнуються до амінокислот, які використовуються на синтез нових білків.

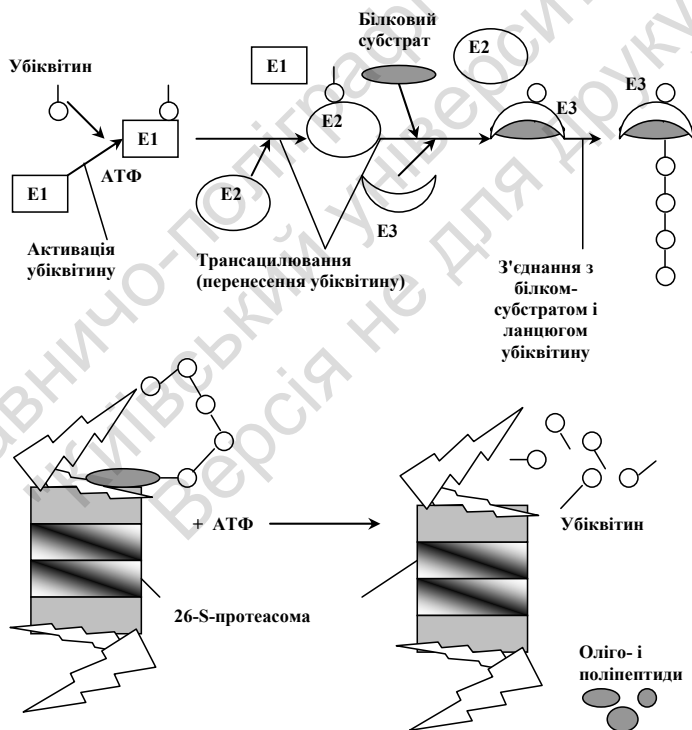


Рис. 1.20. Принцип функціонування системи протеасоми та убіквітинування як шляху гідролітичного розщеплення білків

Сам Ub усередину протеасоми не потрапляє, а після знищенні "поміченої" молекули звільнюється й мітить іншу білкову молекулу. Цей процес отримав назву *убіквітинзалежна деградація білка*. За відкриття цього явища його дослідникам – А. Кичановер, А. Хершко й І. Роуз (А. Ciechanover, А. Hershko, І. Rose) було присуджено Нобелівську премію з хімії.

1.5.3. Інгібітори протеїназ.

Значення для клініки

Протеїнази тканин можуть брати участь у розвитку різних патологій міокарда, м'язової дистрофії, міопатії тощо. Тому інгібітори протеїназ використовують для зниження активності ферментів і усунення патологічного процесу.

Фізіологічні інгібітори протеїназ:

1) α -1-антитрипсин, α -1-антихімотрипсин та інші інгібітори протеїназ із широкою субстратною специфічністю та подібними функціями утворюють з протеїназами (трипсином, хімотрипсином, плазміном, тромбіном, протеазами лейкоцитів чи чужорідних клітин, протеїназами підшлункової залози при гострому панкреатиті) комплекси, пригнічуючи при цьому їхню протеолітичну активність. Ці протеїни належать до білків гострої фази – зокрема, при запальних процесах зростає синтез α -1-антитрипсину в гепатоцитах. Уроджена недостатність α -1-антитрипсину веде до розвитку в молодому віці емфіземи легенів через розщеплення тканинним трипсином міжальвеолярних перетинок.

2) іон амонію, що підвищує рН у лізосомах;

3) амінокислоти: ЛЕЙ, ГІС, ПРО, ТИР, ФЕН, ТРИ, МЕТ, АСН, ГЛН;

4) гормони, наприклад інсулін.

Лікарські препарати – інгібітори протеїназ:

1) антибіотики;

2) лейпептин;

3) хімостатин;

4) хлорохін та ін.

1.5.4. Молекули середньої маси як маркери протеолізу білків за ендогенної інтоксикації

При численних патологічних процесах, котрі супроводжуються *синдромом ендогенної інтоксикації*, у біологічних рідинах організму накопичуються патологічно високі концентрації метаболітів, які виявляють токсичну дію на організм. Більшість цих ендогенних токсинів належать до *молекул середньої маси* (МСМ).

МСМ – гетерогенна група речовин різної хімічної природи з М.м. 500–5000 Да. Основна частина МСМ представлена олігопептидами – продуктами деградації білків організму; іншими представниками МСМ є похідні вуглеводів, ліпідів, у тому числі й фосфоліпідів. Склад олігопептидної фракції МСМ залежить від типу патології, його причини і природи його ускладнень, оскільки спектр протеаз, що активуються, та кінетичні параметри протеолізу для різних захворювань є різними. МСМ підлягають фільтрації у гломерулах нефронів, не реабсорбуються в канальцях нирок і видаляються з організму із сечею.

Усі МСМ у незначних кількостях наявні в біологічних рідинах організму і в нормі, але при патологіях, що супроводжуються розвитком ендогенної інтоксикації, вони накопичуються у великих кількостях залежно від типу хвороби, ступеня порушення функції органа або системи та природи ускладнень. До захворювань, які супроводжуються акумуляцією МСМ, зокрема, належать полінефропатія, фізичні травми, перикардити, анемія, порушення гемодинаміки та серцевого викиду, набряк легенів і головного мозку тощо.

Пептидні МСМ мають вазо-, кардіо-, нейро- та імуносупресивні властивості, інгібують такі метаболічні процеси як мітохондріальне дихання, синтез ДНК, синтез і утилізацію глюкози, утворення гемоглобіну, активність ряду ферментів. Дія МСМ порушує транспорт амінокислот, спричиняє посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах мозку. Зростання рівня МСМ у 3–5 і більше разів впливає на процеси метаболізму, мембранного транспорту речовин, клітинний імунітет, фагоцитоз, гліколіз, гліюкогенез, еритропоез, тканинне дихання, мікроциркуляцію, лімфодинаміку, синтез нуклеїнових кислот, цитопротекцію, процеси антикоагуляції тощо.

Таким чином, показник вмісту МСМ є достатньо чітким критерієм наявності метаболічної інтоксикації й використовується як маркер патологічних процесів різного походження. Ступінь збільшення вмісту МСМ вказує на тяжкість захворювання та його ускладнень, а також відображає ефективність лікування.

1.5.5. Специфічність білків. Біохімічні основи групової сумісності крові

Видова специфічність – це специфічність складу білків, внаслідок якої представники одного виду відрізняються від іншого виду. *Доказами видової специфічності є:*

1) вироблення антитіл (γ -глобулінів) у відповідь на введення стороннього білка, що є антигеном;

2) зв'язування вироблених антитіл із білком-антигеном при подальшому продовженні введення цього стороннього білка із розвитком реакції антиген-антитіло.

У судовій медицині за допомогою антитіл проти сироваткових білків людини відрізняють плями крові людини від тварин, установлюють батьківство чи материнство, визначають спорідненість.

У бактеріології за допомогою специфічних сироваток проводять:

1) типування різних класів мікроорганізмів;

2) діагностику інфекційних захворювань.

У діагностиці пухлин використовують стандартні антисироватки. Якщо в сироватці крові є антитіла проти пухлинних клітин, то відбудеться реакція преципітації антиген-антитіло.

Білки різних органів мають власну структуру залежно від виконуваних ними функцій, унаслідок чого існує *тканинна специфічність білків*. Наприклад, колаген, еластин, кератин є структурними білками. Вони скріплюють біологічні структури і надають їм міцності. Актин, міозин – скоротливі білки скелетних м'язів. Антитіла – захисні білки. Фібриноген і тромбін захищають організм від втрати крові при пошкодженні судин. Гемоглобін здійснює транспорт кисню від легень до тканин, міоглобін зберігає кисень і транспортує його до мітохондрій клітин.

Кожна людина має виключно свій специфічний індивідуальний набір білків, завдяки чому виділяють *індивідуальну специфічність білків*. Головний комплекс гістосумісності (HLA) представлений білками тканинної сумісності двох типів:

- 1) інтегральних глікопротеїнів плазматичних мембран клітин;
- 2) білків-ферментів, що беруть участь у біосинтезі детермінантних груп на поверхні мембран клітин.

Унаслідок наявності на поверхні мембран клітин інтегральних білків із різними детермінантами клітини однієї людини є антигенами для іншої. Найбільш вираженою є антигенність у лейкоцитів, клітин печінки, селезінки.

При трансплантації органів і тканин намагаються досягти максимального збігу білкових детермінант пересаженого органа і клітин організму, що потребує трансплантації, для чого здійснюють їх підбір за білковими детермінантами донора та реципієнта (це близько 70 комбінацій різних видів антигенів). Реакцію відторгнення трансплантата можна загальмувати шляхом використання імунодепресантів та опроміненням.

Біохімічні основи групової сумісності крові теж ґрунтуються на специфічності білкових молекул. Мембрани еритроцитів людини містять різноманітні антигени груп крові, представлені глікопротеїнами та гліколіпідами, які ще називають *аглютиногенами*, або *гемаглютиногенами* (рис. 1.21).



Рис. 1.21. Схематичне зображення аглютиногенів мембран еритроцитів (А) і аглютининів плазми крові (Б)

У кожної людини свій специфічний набір аглютиногенів, найбільш вивчені серед них А- і В-аглютиногени. Відповідно, за наявністю цих антигенів виділяють чотири головні групи крові (*система АВ0*). Люди з групою А мають аглютиноген А, з групою В – аглютиноген В, з групою АВ – мають обидва аглютиногени, з групою 0 – не мають жодного з цих аглютиногенів (табл. 1.7).

Таблиця 1.7

Загальна характеристика системи АВ0

Група крові	Аглютиногени в мембрані еритроцитів	Аглютиніни у плазмі	Плазма аглютинус еритроцити типу
0	Немає	Анти-А (α), анти-В (β)	А, В, АВ
А	А	Анти-В (β)	В, АВ
В	В	Анти-А (α)	А, АВ
АВ	А, В	Немає	Немає

Антигенні властивості аглютиногенів А і В визначаються вуглеводною частиною, а точніше – природою кінцевого вуглеводного залишку.

Люди з групою 0 (I), не маючи аглютиногенів А і В, містять аглютиноген Н, специфічність якого обумовлена наявністю трьох кінцевих вуглеводних залишків – N-ацетилгалактозаміну, β -галактози і L-фукози (рис. 1.22).

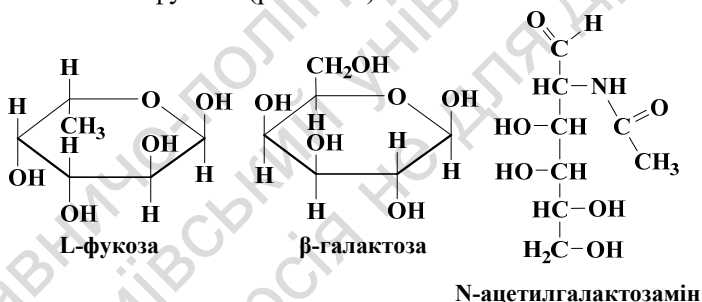


Рис. 1.22. Структурні формули вуглеводів, наявність і локалізація яких у складі аглютиногену визначає його належність до А-, В- чи Н-типу

У людей, що належать до групи А (II), до цих трьох залишків приєднаний ще один залишок N-ацетилгалактозаміну, що перетворює аглютиноген Н на аглютиноген А; у людей із групою В (III) аглютиноген Н шляхом приєднання ще одного залишку галактози перетворюється на аглютиноген В. Еритроцити АВ (IV) групи крові мають обидва типи аглютиногенів – А і В (рис. 1.23).

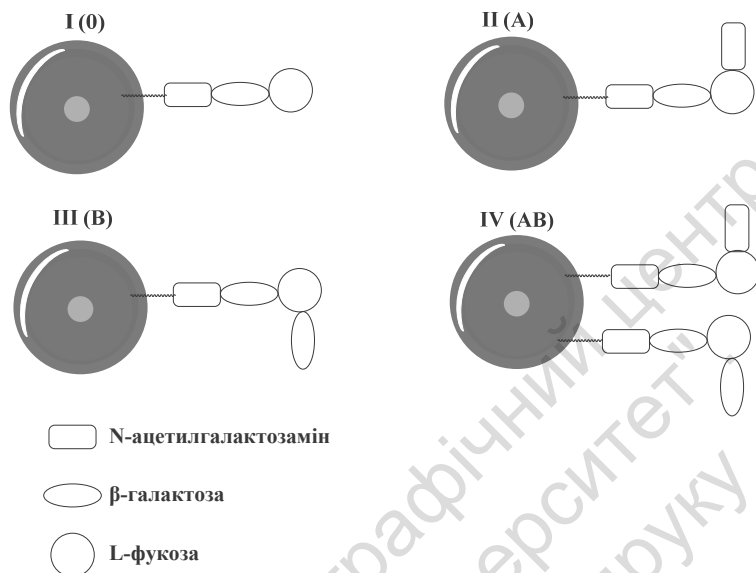


Рис. 1.23. Схематичне зображення особливостей хімічного складу аглютиногенів еритроцитів у людей різних груп крові системи AB0

Такі закономірності в антигенному складі людей з різними групами крові пов'язані з наявністю або відсутністю в їхніх геномах генів, що кодують специфічні трансферази. У людей групи A (II) наявний ген, що кодує трансферазу, яка каталізує приєднання кінцевого A-ацетилгалактозаміну до аглютиногену H, люди з групою B (III) мають ген, що кодує трансферазу для приєднання кінцевої галактози, люди з групою AB (IV) мають обидва види трансфераз. Люди з групою 0 (I) не мають жодної з цих трансфераз, отже, структура аглютиногену H у них збережена.

Антитіла до аглютиногенів еритроцитів називають *аглютинінами (ізоаглютинінами)* (рис. 1.21). Вони містяться у плазмі крові й представлені γ -глобулінами. Найпоширеніші з них – α - та β -аглютиніни (або, відповідно, анти-A- та анти-B-аглютиніни). При зустрічі однойменних аглютиногенів і аглютинінів (A і α , B і β) розвивається реакція гемаглютинації, яка супроводжується склеюванням, гемолізом і руйнуванням еритроцитів (рис. 1.24).

Небезпечні гемолітичні трансфузійні реакції виникають унаслідок переливання людині несумісної крові, тобто проти еритроцитів якої у людини є аглютиніни.

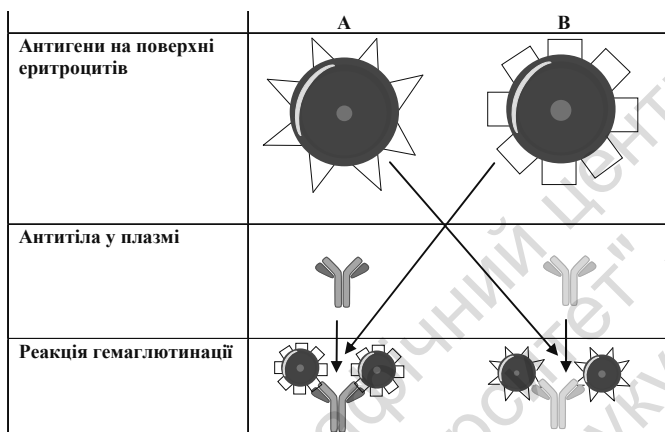


Рис. 1.24. Схематичне зображення реакції гемаглютинації

Люди з групою крові АВ – це універсальні реципієнти. Оскільки в них немає циркулюючих аглютининів, то їм можна переливати кров будь-якої групи без ризику розвитку трансфузійної реакції внаслідок несумісності АВ0. Люди з групою крові 0 є універсальними донорами; оскільки вони не мають антигенів А і В, то кров цієї групи можна переливати будь-кому без загрози розвитку трансфузійної реакції в системі АВ0.

1.5.6. Білки й амінокислоти як лікарські препарати

Препарати на основі протеїнів і амінокислот (гідролізати для парентерального харчування) компенсують білкове голодування організму й забезпечують азотисту рівновагу у хворих після операції на шлунково-кишковому тракті та за інших важких травм. До них належать: гідролізін (із крові великої рогатої худоби), гідролізат казеїну (із молока), амінокровін (із крові людини), амінопептид (із крові великої рогатої худоби), ліпофундин (жирова емульсія соєвого масла), фібриносол (із крові свиней), поліамін (розчин 13 амінокислот).

Деякі амінокислоти використовують як лікарські препарати: метіонін – ліпотропна речовина, застосовується при жировій дегенерації печінки; ГАМК – у психіатрії для зняття емоційного збудження; глутамінова й аспарагінова кислоти – у психіатрії для знешкодження аміаку при гіперамоніємії.

Лабораторна робота № 1.10

Кількісне визначення вмісту

гідроксипроліну (оксипроліну) у сечі

Гідроксипролін – це амінокислота білків сполучної тканини. Зокрема, вона становить 12–14% амінокислотного складу колагену і 1–2% – еластину. Вміст гідроксипроліну в сечі й крові характеризує інтенсивність катаболізму колагену. У нормі в людини віком 10–20 років виділяється із сечею 422–610 мкмоль/добу, а в осіб віком понад 20 років – 125–209 мкмоль/добу гідроксипроліну. Збільшений вміст гідроксипроліну в крові й сечі може свідчити про *колагенози* (ревматизм, ревматоїдний артрит тощо); ще більше виділяється гідроксипроліну при спадковій гіпергідроксипролінемії (це стан, спричинений дефектом ферменту гідроксипролінооксидази, залученого в обмін гідроксипроліну).

Метод ґрунтується на окисненні в лужному середовищі гідроксипроліну пероксидом водню до піролу за наявності іонів міді, наступному видаленні надлишку пероксиду водню й утворенні рожевого забарвлення з парадиметиламінобензальдегідом у кислому середовищі. Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна концентрації гідроксипроліну.

Матеріали та реактиви. Сеча, 5%-й розчин парадиметиламінобензальдегіду (реактив Ерліха), 3 н. розчин сірчаної кислоти, 6%-й розчин пероксиду водню, 2,5 н. розчин гідроксиду натрію, 0,05 М розчин сульфату міді, стандартний розчин гідроксипроліну (10 мкг/мл, або 1 мг у 100 мл).

Обладнання. Водяна баня, ФЕК, кювети завтовшки 10 мм пробірки, піпетки, лійка, фільтрувальний папір.

Хід роботи. Беруть три пробірки: у першу відміряють 1 мл профільтрованої сечі (дослід), у другу – 1 мл стандартного розчину гідроксипроліну, у третю – 1 мл дистильованої води (конт-

роль). У три пробірки додають по 1 мл 0,05 М розчину сульфату міді, по 1 мл 2,5 н. розчину гідроксиду натрію, по 1 мл 6%-го розчину пероксиду водню. Проби перемішують протягом 10 хв за кімнатної температури, після чого нагрівають протягом 3 хв на киплячій водяній бані для видалення надлишку пероксиду водню, після чого пробірки охолоджують водою з крану. Після охолодження у пробірки додають по 4 мл 3 н. розчину сірчаної кислоти і по 2 мл реактиву Ерліха і стоять на 5 хв у киплячу водяну баню, охолоджують водою з-під крану і колориметрують за довжини хвилі 500–560 нм (зелений світлофільтр) проби досліду та стандартного розчину проти контролю в кюветах завтовшки 10 мм. Вміст гідроксипроліну розраховують за формулою:

$$X = \frac{C_{\text{станд}} \times E_{\text{досл}} \times V_{\text{доб}}}{E_{\text{станд}} \times V_{\text{досл}}},$$

де X – вміст гідроксипроліну в добовій сечі, мг/добу;

$C_{\text{станд}}$ – концентрація стандартного розчину гідроксипроліну;

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби, од. оптич. густини;

$E_{\text{станд}}$ – оптична густина стандартного розчину, од. оптич. густини;

$V_{\text{доб}}$ – добовий об'єм сечі;

$V_{\text{досл}}$ – об'єм сечі, узятої для аналізу, мл.

Розрахунок вмісту гідроксипроліну в сечі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами й роблять висновок.

Лабораторна робота № 1.11

Визначення вмісту молекул середньої маси в сироватці крові

Рівень МСМ у сироватці крові вивчають методами гель-хроматографії на сефадексі, високовольтного електрофорезу, іонообмінної хроматографії та спектрофотометрії. Спектрофотометричний метод

належить до експрес-методів. Принцип методу полягає у вимірюванні на спектрофотометрі за довжини хвиль 254 і 280 нм оптичної густини сироватки крові, звільненої від високомолекулярних білків і ліпідів. Визначають дві фракції МСМ – та, що містить ароматичні амінокислоти (виявляють за довжини хвилі 280 нм), і та, що їх не містить (виявляють за довжини хвилі 254 нм).

Матеріали та реактиви. Сироватка крові, 10%-й розчин ТХО.

Обладнання. Мікропіпетки, піпетки, спектрофотометр.

Хід роботи. У центрифужну пробірку вливають 1 мл сироватки крові і додають 0,5 мл 10%-го розчину ТХО. Після перемішування проводять осадження білків на центрифугі за швидкості 3000 об/хв протягом 30 хв. До 0,5 мл центрифугату додають 4,5 мл дистильованої води, перемішують і вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 280 й 254 нм у кюветі завтовшки 10 мм порівняно з контролем (контроль: 0,25 мл 10%-го розчину ТХО змішують із 4,75 мл дистильованої води).

Рівень МСМ виражають в одиницях, що кількісно дорівнюють показникам екстинції. Нормальним рівнем МСМ у сироватці крові вважають значення до 0,246 ум. од. за довжини хвилі 254 нм і до 0,296 ум. од – за 280 нм.

Результат визначення вмісту молекул середньої маси у крові записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами й роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Укажіть основні причини розпаду білків в організмі людини.
2. Що називають катепсинами? Які катепсини належать до екзо- й ендопептидаз?
3. Як в організмі здійснюється інгібування протеолітичної активності?
4. Які існують види специфічності білків?
5. Що таке молекули середньої маси і яке значення має вимірювання їхнього вмісту в сироватці крові?

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДО РОЗДІЛУ 1

Завдання 1

Оптимальний рН для функціонування яких ферментів створюють бікарбонати підшлункового соку?

- а) пепсин; г) ренін
- б) катепсин D; д) хімотрипсин;
- в) трипсин; е) еластаза.

Завдання 2

Для яких процесів необхідний фермент γ -глутамілтрансфераза?

- а) гниття білків у кишечнику;
- б) усмоктування амінокислот у кишечнику;
- в) травлення білків у кишечнику;
- г) травлення білків у шлунку;
- д) ресинтез глутатіону в еритроцитах;
- е) трансамінування амінокислот.

Завдання 3

У результаті якого процесу в організмі можуть утворюватися триптамін, кадаверин, індол, метилмеркаптан?

- а) гниття білків у кишечнику;
- б) усмоктування амінокислот у кишечнику;
- в) травлення білків у кишечнику;
- г) знешкодження токсинів у печінці;
- д) ресинтез глутатіону в еритроцитах;
- е) трансамінування амінокислот.

Завдання 4

Визначення вмісту якої сполуки в сечі використовують для оцінки стану процесів кон'югації у печінці та інтенсивності процесів гниття білків у кишечнику?

- а) глутатіон;
- б) індол; г) тваринний індикан;
- в) триптофан; д) гіпурова кислота.

Завдання 5

Який кофермент необхідний для перебігу реакцій трансамінування та декарбоксилювання амінокислот?

- а) НАДН; г) ФАД;
- б) НАДФН; д) піридоксальфосфат;
- в) ФМН; є) ТГФК.

Завдання 6

Синтез яких сполук буде пригнічуватися при спадковому дефекті ферменту 4-фенілаланінгідроксилази?

- а) норадреналін; г) ДОФА
- б) фенілпіровиноградна кислота; д) меланіни;
- в) фенілаланін; є) тиреоїдні гормони.

Завдання 7

Хвороба Хартнупа зумовлена:

- а) вродженою недостатністю ферменту цистатіонін-β-синтази (рідше – гомоцистеїнметилтрансферази);
- б) вродженим порушенням усмоктування триптофану в кишечнику та реабсорбції його в нирках унаслідок мутацій відповідних транспортних систем;
- в) спадково зумовленою відсутністю ферменту 4-фенілаланінгідроксилази;
- г) повним блокуванням реабсорбції майже всіх амінокислот у каналцях нирок;
- д) повним блокуванням реабсорбції цистину та частковим – орнітину, лізину й аргініну;
- є) недостатністю цистатіонін-β-ліази або надмірною активністю цистатіонін-β-синтази.

Завдання 8

Спадкові дефекти яких ферментів можуть спричинити розвиток гіперамоніємії?

- а) карбамоїлфосфатсинтетаза I;
- б) аланінамінотрансфераза;
- в) аргіназа;
- г) аконітаза;

- д) 4-фенілаланінгідроксилаза;
- є) аргініносукцинатсинтетаза

Завдання 9

Які сполуки з наведених не роблять внеску в показник залишкового азоту крові?

- | | |
|------------------|--------------------|
| а) амінокислоти; | г) сечова кислота; |
| б) альбумін; | д) трансферин; |
| в) сечовина; | є) білірубін. |

Завдання 10

Для визначення якого показника крові використовують реактив Несслера?

- | | |
|-----------------------------|----------------------------------|
| а) молекули середньої маси; | г) амінотрансферазна активність; |
| б) білок; | д) тваринний індикан; |
| в) залишковий азот; | є) сечовина. |

Розділ 2

ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

ТЕМА 1. ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ У ШЛУНКОВО-КИШКОВОМУ ТРАКТІ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

Незважаючи на те, що вміст вуглеводів в організмах тварин значно менший від вмісту білків і ліпідів (близько 2% сухої маси), обмін вуглеводів є одним із основних у метаболізмі речовин і енергії. Серед різноманітних функцій, які виконують вуглеводи, найважливішою є енергетична, оскільки за рахунок вуглеводів забезпечується більш ніж половина енергетичних потреб організму. Так, у добовому раціоні дорослої людини, їхня кількість становить 400–500 г, що еквівалентно приблизно $9,2 \times 10^6$ Дж метаболічної енергії.

Вуглеводи можуть розщеплюватися як за анаеробних, так і за аеробних умов. Проміжні метаболіти їхнього розпаду можуть бути використані безпосередньо як енергетичний субстрат (глюкоза), резервуватися у тканинах (глікоген) або застосовуватися як складові компоненти макромолекул глікопротеїнів, гліколіпідів, нуклеотидів і нуклеїнових кислот. У складі глікопротеїнів і гліколіпідів глікокаліксу вуглеводи забезпечують міжклітинні контакти, зв'язок із міжклітинним матриксом, до складу якого вони входять у вигляді глікозаміногліканів. У складі клітинних рецепторів вуглеводи беруть участь у гормональній рецепції тощо.

2.1.1. Принципи перетворення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті

Джерелом забезпечення організмів тварин вуглеводами в основному є вуглеводи рослинного (крохмаль, сахароза, глюкоза, фруктоза) і частково тваринного походження (глікоген, лактоза), які в шлунково-кишковому тракті гідролізуються за допомогою амілолітичних ферментів.

Гідролітичне розщеплення вуглеводів їжі починається одразу в ротовій порожнині за участю α -амілази і α -глюкозидази (мальтази) слини, але переважно відбувається в тонкому кишечнику за дії

панкреатичних ензимів α -амілази та α -1,6-глікозидази, а також дисахараз епітелію слизової оболонки – β -галактозидази (лактази), β -фруктофуранозидази (сахарази). У процесі травлення гомота гетерополісахариди (за винятком клітковини), олігосахариди, а також вуглеводні складові глікопротеїнів і гліколіпідів розпадаються на моносахариди, які поглинаються епітеліальними клітинами із просвіту слизової тонкого кишечника.

2.1.2. Механізми всмоктування моносахаридів у кишечнику

Трансmemбранне перенесення моноз здійснюється за механізмами *вторинно-активного транспорту* проти градієнта концентрації за участю Na^+ -залежних білків-переносників і системи енергозабезпечення (через апікальні мембрани ентероцитів) і шляхом *полегшеної дифузії* за градієнтом концентрації (через їх синусоїдальні мембрани). Із клітин кишечника моносахариди виходять у міжклітинну рідину, із неї – у ворітну вену і з кров'ю потрапляють до печінки, де більша частина їх затримується, а менша через загальний кровообіг переноситься до клітин інших тканин. Порівняно із вмістом глюкози в плазмі крові внутрішньоклітинна концентрація глюкози в периферійних тканинах значно нижча, унаслідок чого її надходження у клітини здійснюється також шляхом *полегшеної дифузії* за участю специфічних білків-переносників.

Лабораторна робота № 2.1

Дія ферментів шлунково-кишкового тракту на вуглеводи

Амілаза слини прискорює гідроліз тільки полісахаридів, не діючи на дисахариди (зокрема, на сахарозу). Сахараза розщеплює тільки сахарозу й не розщеплює крохмаль та інші дисахариди.

Сахароза не має вільної альдегідної групи, тому не дає реакції Троммера (про яку детальніше див. дод. 13). Реакція Троммера може бути позитивною лише в тому випадку, якщо сахароза розщепиться на свої складові частини – глюкозу і фруктозу.

Матеріали та реактиви. Розчин слини (для його отримання рот два-три рази ополіскують водою, відмірюють циліндром 50 мл дистильованої води й полощуть нею рот кілька разів протягом 3–5 хв. Зібрану рідину фільтрують через вату. Фільтрат використовують як джерело ферменту), 0,5%-й розчин крохмалю, 0,5%-й розчин сахарози, 0,1%-й розчин йоду в 0,2%-му розчині йодиду калію, препарат сахарози (5 г пивних дріжджів розтирають у фарфоровій ступці з 2–3 мл дистильованої води та невеликою кількістю скляного піску, додають 8–10 мл води й фільтрують через вату), реактиви для проведення реакцій Фелінга і Троммера (див. дод. 8 і 13).

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, водяна баня, крапельниці, термостат.

Хід роботи. У дві пробірки (№ 1 та № 2) наливають по 3 мл розчину крохмалю. У пробірку № 1 додають 1 мл розчину слини (амілази), у пробірку № 2 – 1 мл препарату сахарози, потім перемішують і ставлять у термостат (38 °С).

У дві інші пробірки (№ 3 та № 4) наливають по 3 мл розчину сахарози. У пробірку № 3 додають 1 мл препарату сахарози, а в пробірку № 4 – 1 мл розчину слини й залишають за тих самих умов.

Через 5 хв в обидві пробірки з крохмалем додають по п'ять краплин розчину йоду й спостерігають за забарвленням. У пробірці з амілазою (№ 1) синє забарвлення розчину зникає внаслідок розщеплення крохмалю амілазою. У пробірці №2 розчин має синій колір, тому що сахароза не діє на крохмаль.

У пробірках № 3 і № 4 дію ферменту виявляють, використовуючи якісні реакції на наявність моно- та дисахаридів, які володіють відновлювальними властивостями – реакцію з реактивом Фелінга (див. дод. 8) або пробу Троммера (див. дод. 13).

У першому випадку в пробірці додають по 1 мл реактиву Фелінга й нагрівають до кипіння. Оскільки сама сахароза відновлювальних властивостей не має, а амілаза на сахарозу не діє, то у пробірці № 4 жодних змін не відбувається (негативна реакція Фелінга). У пробірці № 3, у якій за дії сахарози сахароза розщепилася на глюкозу та фруктозу, спостерігається поява червоного забарвлення внаслідок утворення осаду геміоксиду міді (позитивна реакція Фелінга).

При проведенні реакції Троммера у пробірки наливають по 0,5 мл розчину сульфату міді й додають краплями розчин гідроксиду натрію. Після цього пробірки нагрівають. Поява червоного цегляного забарвлення свідчить про присутність глюкози (пробірка № 3).

Результати спостережень записують у зошит, роблять висновки.

Лабораторна робота № 2.2

Ферментативне розщеплення крохмалю

Крохмаль є структурно гетерогенним полімером, який складається із двох компонентів: амілози і амілопектину. Молекули амілози мають нерозгалужені ланцюги глікозидних залишків, що з'єднані між собою α -1,4-глікозидним зв'язком. Амілопектин має розгалуження, утворені за участю α -1,6-глікозидного зв'язку. Крім того, амілоза й амілопектин різняться за фізико-хімічними властивостями. Зокрема, для амілози характерна невелика молекулярна маса (до 1 тис. глікозидних залишків), легка здатність до гідролізу за допомогою амілаз. Амілопектин значно важчий (до 6 тис. глікозидних залишків) і повільніше розщеплюється амілазою.

α -амілаза розщеплює α -1,4-глікозидні зв'язки переважно всередині молекул амілози і амілопектину з утворенням низькомолекулярних декстринів: $(C_6H_{10}O_5)_x + mH_2O \rightarrow m(C_6H_{10}O_5)_y$.

β -Амілаза гідролізує ті самі α -1,4-глікозидні зв'язки, послідовно відщеплюючи від нередукуючого кінця полімерного ланцюгу молекули дисахариду мальтози: $(C_6H_{10}O_5)_x + nH_2O \rightarrow nC_{12}H_{22}O_{11}$.

Глюкоамілаза (γ -амілаза) гідролізує і α -1,4- і α -1,6-глікозидні зв'язки і відщеплює молекули глюкози від нередукуючих кінців молекул амілози і амілопектину:



Матеріали та реактиви. Солод, 1%-й розчин хлориду натрію, сульфат амонію, цитратний буфер із рН 5,6 (84 мл 0,1 М розчину цитратної кислоти змішують із 116 мл 0,2 М розчину $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$), 0,1 н. розчин соляної кислоти, 0,15 М розчин гідрофосфату натрію, 2%-й розчин крохмалю, 20%-й розчин соляної кислоти, розчин Люголя, реактиви для проведення реакцій Фелінга і Барфедда (див. дод. 8 і 9).

Обладнання. Штатив із пробірками, мірна колба місткістю 500 мл, піпетки, водяна баня, термостат, ємність із льодом, годинник, лійка Бюхнера, центрифуга (3000 g).

Хід роботи. Гідроліз крохмалю в роботі виконують за участю амілаз рослинного походження. 100 г солоду витримують у колбі ємністю 500 мл із 400 мл 1%-го розчину хлориду натрію при температурі 30–35 °С протягом 60–75 хв, періодично струшуючи. Екстракт відфільтровують на лійці Бюхнера і додають по 35 г сульфату амонію на кожні 100 мл екстракту. За такого ступеня насичення розчином суль-

фату амонію амілази осаджуються. Осад відстоюють на холоді й осаджують із розчину центрифугуванням при 3000 г протягом 10–15 хв. Осад розчиняють у 20 мл води й розділяють на дві частини.

У 10 мл отриманого розчину інактивують β -амілазу шляхом нагрівання в конічній колбі при 70 °С протягом 15 хв, після чого охолоджують, додають 10 мл цитратного буфера, рН 5,6 і досліджують активність α -амілази.

До другої половини (10 мл) водного розчину амілаз для інактивації α -амілази додають 2 мл 0,1 н. розчину соляної кислоти і 8 мл води (загальний об'єм розчину дорівнює 20 мл, рН 3,3) і залишають на льодяній бані на 15 хв. Надалі додаванням 4 мл 0,15 М розчину гідрофосфату натрію доводять рН розчину β -амілази до 6,0.

Декстринізуючу властивість амілаз виявляють якісною реакцією з йодом. Для цього у два ряди пробірок (по сім у кожному) наливають по 5 мл 2%-го розчину крохмалю і додають ферментні розчини і воду в кількостях, наведених у табл. 2.1, причому в пробірки першого ряду вносять розчин α -амілази, а в пробірки другого ряду – розчин β -амілази.

Таблиця 2.1

**Схема внесення реактивів для проведення досліду
з вивчення ферментативного розщеплення крохмалю**

№ проб	1	2	3	4	5	6	7
Назва речовини							
Ферментний розчин, мл	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	0
Вода, мл	4,0	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	0

Розчини перемішують та інкубують у термостаті при 40 °С протягом 10 хв. Після охолодження на льодяній бані в шість пробірок додають по 0,1 мл 20%-го розчину соляної кислоти для припинення ферментної реакції. Після внесення в проби по 1–2 краплини розчину Люголя за забарвленням йодом визначають декстринізуючу здатність амілаз і ступінь розщеплення крохмалю амілазами.

Водночас вміст двох пробірок під номером 7 знову перемішують і додають в одну 1 мл розчину α -амілази, у другу – 1 мл розчину β -амілази. Суміші добре перемішують і знову інкубують у термостаті при 40 °С протягом 30 хв. Гідроліз крохмалю зупиняють кип'ятінням розчинів. Після охолодження до кімнатної температури з кожним розчином проводять реакції Фелінга й Барфедда (див. дод. 8 і 9).

Спостереження записують у зошит і роблять висновки щодо ферментативних властивостей амілаз.

Лабораторна робота № 2.3

Визначення α -амілазної активності в біологічних рідинах (за Каравеем) із використанням наборів реактивів

α -амілаза каталізує гідроліз $\alpha(1\rightarrow4)$ -глікозидного зв'язку між моносахаридними одиницями в молекулах крохмалю і глікогену, унаслідок чого утворюється суміш декстринів, мальтози й глюкози. Фермент секретується підшлунковою залозою (Р-тип) та слинними залозами (S-тип).

Нормальні величини α -амілазної активності сироватки (плазми) крові становлять 3,3–8,9 мг/(с $\times$ л), сечі – до 44 мг/(с $\times$ л). Оцінка амілазної активності у біологічних рідинах широко застосовується для оцінки функціонального стану та діагностики захворювань підшлункової залози: збільшення даного показника є високоспецифічною ознакою гострого або хронічного панкреатиту. Поряд із цим амілазна активність може зростати і за інших патологій, зокрема при нирковій недостатності. Зниження показника може свідчити про недостатність підшлункової залози, її атрофію або фіброз.

У присутності α -амілази крохмаль гідролізується до похідних, що не дають кольорової реакції з йодом. Зміна інтенсивності фарбування йод-крохмального комплексу пропорційна активності ферменту в пробі, яка аналізується.

Матеріали та реактиви. Сироватка крові, гепаринізована плазма або розведена у 10 разів сеча, буферний розчин із рН 7,0 $\pm$ 0,1 (фосфат натрію – 200 $\pm$ 20 ммоль/л, хлорид натрію – 150 $\pm$ 15 ммоль/л), розчин йоду 0,1 н. (йод – 12,7 $\pm$ 1,2 г/л, йодистий калій – 30,0 $\pm$ 1,5 г/л), розчин концентрату інгібітору, розчин субстрату (крохмаль розчинний – 10,0 $\pm$ 0,5 мг/мл).

Обладнання. Фотометричне обладнання (для вимірювання при довжині хвилі 640 (600–700) нм, кювети завтовшки 10 мм, водяна баня, термостат, мірна колба місткістю 1000 мл, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Готують субстратно-буферний розчин шляхом змішування буфера і розчину субстрату у співвідношенні 24:1. Розчин інгібітору отримують розведенням розчину концентрату інгібітору дистильованою водою у мірній колбі до об'єму 1000 мл.

Аналіз проводять згідно зі схемою, що наведеною в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Схема проведення дослідів з визначення α -амілазної активності в біологічних рідинах (за Каравесм)

Відміряти у пробірку	Холоста проба, мл	Дослідна проба, мл
Субстратно-буферний розчин	0,50	0,50
Прогріти точно 5 хв на водяній бані при 37 °С, наступні реагенти вносити в термостатовані пробірки		
Зразок	-	0,01
Перемішати та інкубувати на водяній бані при 37 °С точно 5 хв		
Розчин інгібітору	4,50	4,50
Зразок	0,01	-
Розчин йоду 0,1 н.	0,05	0,05
Не пізніше ніж через 10 хв вимірюють екстинцію холостої ($E_{хол}$) та дослідної ($E_{досл}$) проб проти дистильованої води. Остаточне забарвлення проб може бути від світло-коричневого до синьо-зеленого залежно від активності α -амілази		

Розрахунок α -амілазної активності (мг/(с × л)) здійснюють за формулами:

$$\alpha\text{-амілазна активність} = \frac{E_{хол} - E_{досл}}{E_{досл}} \times 66,6 \times K,$$

де K – коефіцієнт розведення зразка (якщо його розводили).

Розрахунок α -амілазної активності у крові або в сечі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

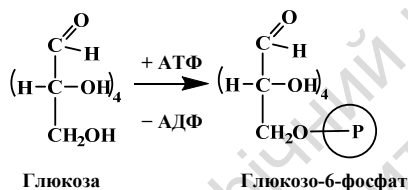
КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Дати характеристику специфічності дії амілолітичних ферментів шлунково-кишкового тракту.
2. Як здійснюється всмоктування моносахаридів у кишечнику?
3. У чому полягає принцип визначення альфа-амілазної активності у біологічних рідинах?
4. У чому відміна функцій α -1,6-глікозидази та α -амілази?
5. Навести приклад ферментів, які здійснюють пристінкове травлення вуглеводів у кишечнику.

ТЕМА 2. ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИЙ ОБМІН МОНОСАХАРИДІВ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

Значна кількість глюкози, що надходить до печінки з кров'ю ворітної вени під час травлення, затримується її клітинами завдяки фосфорилюванню глюкози за дії глюкокінази або гексокінази:



На відміну від *гексокінази* – ферменту, який міститься у різних тканинах і здійснює неспецифічне фосфорилювання гексоз, *глюкокіназа* характерна виключно для печінки (тобто є органоспецифічним ферментом) і діє тільки на глюкозу. Цей фермент є інсулінозалежним – інсулін індукує його синтез та підвищує активність, тим самим не допускаючи значного зростання рівня глюкози у крові.

Для *глюкозо-6-фосфату*, який утворюється в реакції, існує декілька альтернативних шляхів використання: гліколітичне розщеплення до пірувату, перетворення на рибозо-5-фосфат у пентозофосфатному шляху або дефосфорилювання за участю глюкозо-6-фосфатази (рис. 2.1). Але в умовах аліментарної гіперглікемії, коли концентрація глюкози в крові ворітної вени перевищує 10 ммоль/л, практично увесь глюкозо-6-фосфат, що утворюється у клітинах печінки, використовується для біосинтезу глікогену.

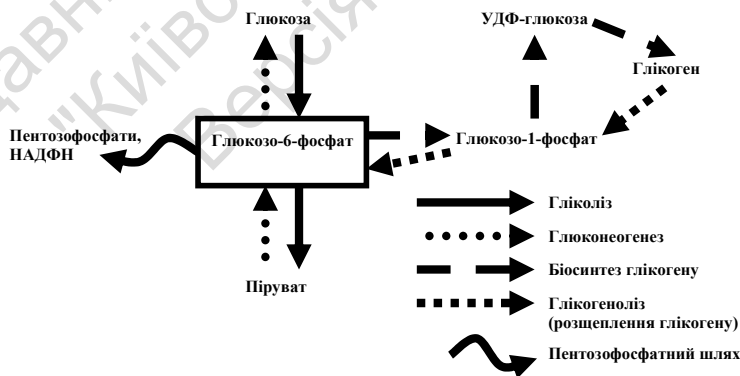
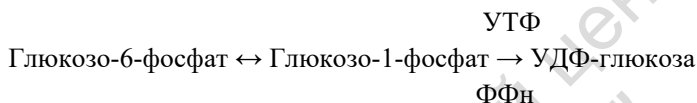


Рис. 2.1. Шляхи утилізації глюкозо-6-фосфату клітинами печінки

2.2.1. Синтез глікогену

У молекулах розгалуженого гомополісахариду глікогену глікозидні залишки сполучені α -1,4- і α -1,6-глікозидними зв'язками, які утворюються в ендоергічних реакціях. Тому для приєднання до полісахаридних ланцюгів глікогену глюкозо-6-фосфат спочатку перетворюється на реакційноздатну форму – УДФ-глюкозу – за схемою:



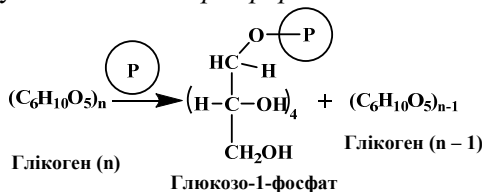
За участю *глікогенсинтази* активований глікозильний залишок від УДФ-глюкози приєднується до кінцевого глікозидного залишку одного з полісахаридних ланцюгів глікогену. Саме таким чином у печінці дорослої людини може накопичуватись до 100 г глікогену.

Крім печінки, глікоген утворюється і в інших тканинах, але особливо інтенсивно відбувається біосинтез глікогену у м'язовій тканині, оскільки цей полісахарид потрібний для процесів м'язового скорочення. Тому вміст глікогену у м'язах дорослої людини середньої ваги становить близько 250 г.

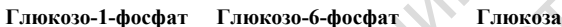
Стани, які характеризуються майже повною відсутністю у клітинах глікогену, називаються *аглікогенозами*. Причиною виникнення їх є знижена активність глікогенсинтази печінки або повна відсутність активності цього ферменту.

2.2.2. Фосфоролітичне розщеплення глікогену

Глікоген, у разі потреби у глюкозі, швидко розщеплюється фосфоролітичним або гідролітичним шляхами. *Гідролітичне розщеплення глікогену* відбувається здебільшого у шлунково-кишковому тракті, тоді як у клітинах переважно має місце його *фосфороліз* за участю *глікогенфосфорилази*:



реакцию в обеих направлениях.

$$\begin{array}{ccccc}
 \begin{array}{c} \text{O}-\text{P} \\ | \\ \text{HC}-\text{H} \\ | \\ (\text{H}-\text{C}-\text{OH})_4 \\ | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} & \rightleftharpoons & \begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ (\text{H}-\text{C}-\text{OH})_4 \\ | \\ \text{CH}_2\text{O}-\text{P} \end{array} & \xrightarrow{-\text{P}} & \begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ (\text{H}-\text{C}-\text{OH})_4 \\ | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \\
 \text{Глюкозо-1-фосфат} & & \text{Глюкозо-6-фосфат} & & \text{Глюкоза}
 \end{array}$$


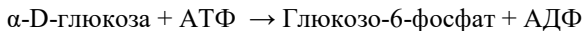
Глікоgenoзи – спадкові ензимопатії, викликані порушенням обміну глікогену, що характеризуються надлишковим накопиченням глікогену в клітинах. Їх відносять до хвороб накопичення. Вони супроводжуються *гіпоглікемією* через нездатність глікогену вивільнювати глюкозу, *гепатомегалією*, *жировою дистрофією печінки*, *цирозом*.

Гліколіз – це анаеробний процес перетворення глюкози, кінцевим продуктом якого є *молочна кислота*. Біологічне значення гліколізу – утворення високоенергетичних сполук (АТФ); саме гліколіз забезпечує виконання фізіологічних функцій при нестачі кисню. Енергетична цінність гліколізу – 2 молекули АТФ з 1 молекули глюкози.

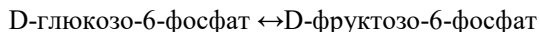
$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{АДФ} + 2\text{Фн} \longrightarrow 2\text{СН}_3\text{СН(ОН)СООН} + 2\text{АТФ} + 2\text{Н}_2\text{О}$$

Глюкоза Молочна кислота

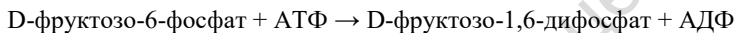
I – фосфорилювання глюкози за рахунок АТФ з утворенням глюкозо-6-фосфату (Г6Ф) (фермент *гексокіназа*). Реакція необоротна:



II – перетворення Г6Ф на фруктозо-6-фосфат (Ф6Ф) (фермент *глюкозо-6-фосфат ізомераза*):



III – Ф6Ф фосфорилується за рахунок другої молекули АТФ з утворенням фруктозо-1,6-дифосфату (Ф-1,6-дифосфату) (фермент *фосфофруктокіназа*). Реакція необоротна. Ця реакція визначає швидкість всього процесу гліколізу:



IV – розщеплення Ф-1,6-дифосфату на 2 фосфотріози (діоксіацетонфосфат та гліцеральдегід-3-фосфат), фермент *альдолаза*:
$$\text{D-фруктозо-1,6-дифосфат} \leftrightarrow \text{Діоксіацетонфосфат} + \text{Гліцеральдегід-3-фосфат}$$

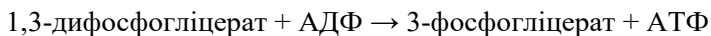
V – реакція ізомеризації тріозофосфатів (фермент *тріозофосфатізомераза*). Рівновага реакції зсунута в бік утворення діоксіацетонфосфату, але в наступні реакції гліколізу включається лише гліцеральдегід-3-фосфат, і в міру його зменшення діоксіацетонфосфат перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат:



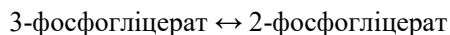
VI – гліцеральдегід-3-фосфат окиснюється з утворенням 1,3-дифосфогліцерату, фермент *гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа*. Утворена сполука є макроергічною.



VII – передача макроергічного фосфатного залишку від 1,3-дифосфогліцерату на АДФ з утворенням АТФ і 3-фосфогліцерату. Фермент – *фосфогліцераткіназа*. Це реакція субстратного фосфорилування:



VIII – внутрішньомолекулярне перенесення фосфатної групи, яка залишилася, з утворенням 2-фосфогліцерата. Фермент – *фосфогліцеромутаза*.



IX – 2-фосфогліцерат у результаті відщеплення молекули води перетворюється на фосфоенолпіровиноградну кислоту (фосфоенолпіруват), а фосфатний зв'язок у II положенні стає макроергічним. Фермент – *енолаза*.



X – розрив макроергічного зв'язку й перенесення фосфатного залишку від фосфоенолпірувату на АДФ (субстратне фосфорилювання). Фермент – *піруваткіназа*. Реакція є необоротною.



XI – відновлення пірувату до лактату за участю НАДН, утвореного в реакції 6. Фермент – *лактатдегідрогеназа*.



Необоротних реакцій три: № 1, 3, 10.

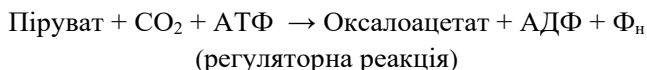
Швидкість гліколізу лімітується реакціями № 3 (основна), 1, 11.

2.2.4. Глюконеогенез

Це синтез глюкози із неуглеводних продуктів (молочна, піровиноградна кислоти, глікогенні амінокислоти, гліцерол), який здійснюється у клітинах нирок і печінки. Більшість стадій цього процесу – це **обернені** реакції гліколізу; **необернені** реакції йдуть "обхідними" шляхами із залученням інших ферментів.

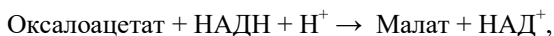
Обхід реакції №10 (пряма реакція: фосфоенолпіруват + АДФ $\rightarrow$ піруват + АТФ) полягає в синтезі фосфоенолпірувату із пірувату і здійснюється у кілька етапів:

- карбоксилювання пірувату в мітохондріях з утворенням оксалоацетату (фермент *піруваткарбоксилаза*):

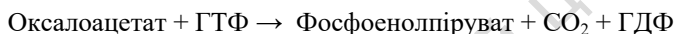


- човниковий механізм перенесення оксалоацетату через мембрану мітохондрій у цитозоль, оскільки мітохондріальна мембрана є непроникною для оксалоацетату (ферменти *НАД⁺-залежна мітохондріальна малатдегідрогеназа* і *НАД⁺-залежна*

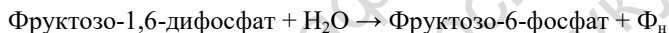
цитоплазматична малатдегідрогеназа, які здійснюють перетворення оксалоацетату на малат (який здатний перетинати мембрану мітохондрій) і зворотну реакцію утворення оксалоацетату:



▪ декарбоксилювання і фосфорилування оксалоацетату в цитоплазмі з утворенням фосфоенолпірувату (фермент *фосфоенолпіруваткарбоксикіназа*):



Обхід реакції № 3 (пряма реакція: фруктозо-6-фосфат + АТФ $\rightarrow$ фруктозо-1,6-дифосфат + АДФ) полягає у перетворенні фруктозо-1,6-дифосфату на фруктозо-6-фосфат за участю *фруктозодифосфатфосфатази* і є регуляторною реакцією:



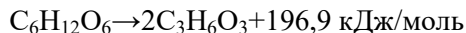
Обхід реакції № 1 (пряма реакція: глюкоза + АТФ $\rightarrow$ глюкозо-6-фосфат + АДФ) іде за механізмом дефосфорилування Г6Ф ферментом глюкозо-6-фосфатазою:



2.2.5. Цикл Корі

Загальну схему циклу Корі наведено на рис. 2.2.

Утворений у м'язах глікоген в умовах активного скорочення скелетної мускулатури легко розщеплюється до глюкозо-6-фосфату, який за відсутності у м'язах глюкозо-6-фосфатази і активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в реакціях анаеробного розпаду (гліколізу) перетворюється на дві молекули лактату за рівнянням:



Частина вивільненої під час гліколізу енергії акумулюється в макроергічних зв'язках АТФ та креатинфосфату, за рахунок яких і відбувається енергозабезпечення м'язового скорочення. Молочна кислота, що утворюється у скелетних м'язах під час

їхнього інтенсивного скорочення-розслаблення, із кров'ю надходить до печінки, де в реакціях гліюконеогенезу перетворюється на глюкозу, яка із печінки знову потрапляє до м'язів і може бути використана на енергетичні потреби.

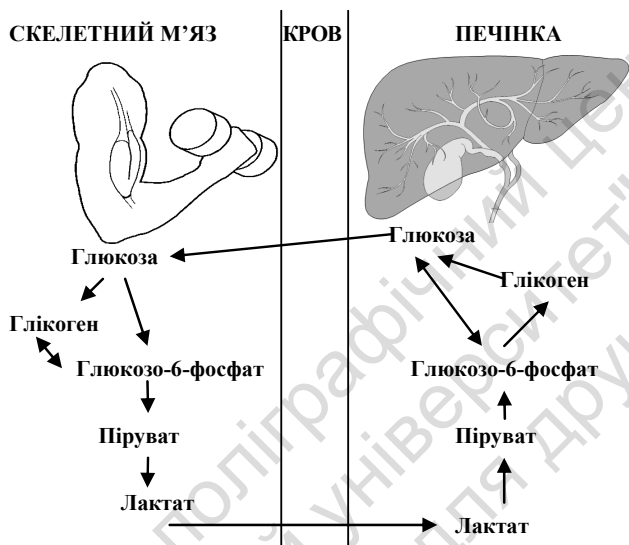


Рис. 2.2. Зв'язок глікогенезу і гліюконеогенезу (цикл Корі)

2.2.6. Пентозофосфатний шлях

Розходження шляхів окиснення вуглеводів – гліколізу та пентозофосфатного шляху – починається зі стадії утворення глюкозо-6-фосфату. Роль пентозофосфатного шляху полягає в постачанні відновленого НАДФН для біосинтезу жирних кислот, холестеролу та інших сполук, причому утворений НАДФН використовується у цитозолі на відновні синтези і у нормі не бере участі в окисному фосфорилуванні у мітохондріях. Також у процесі пентозофосфатного шляху утворюються пентозофосфати, які надалі використовуються для синтезу нуклеїнових кислот і ряду коферментів.

Лабораторна робота № 2.4

Кількісне визначення глюкози крові

Постійна концентрація глюкози в крові (у людини в нормі вона становить 3,3–5,5 ммоль/л) регулюється нервово-гуморальними механізмами, які забезпечують рівновагу між надходженням глюкози у кров та її утилізацією тканинами.

До регуляторних механізмів у першу чергу належать метаболічні центри гіпоталамуса та довгастого мозку, рефлекторне збудження яких у відповідь на зниження або підвищення рівня цукру в крові викликає стимуляцію відповідних ендокринних залоз.

Гормональна регуляція зумовлена антагоністичними взаємодіями між інсуліном та групою так званих "діабетичних гормонів" – глюкагоном, адреналіном, кортикотропіном, соматотропіном, глюкостероїдами. При цьому гіпоглікемічна дія інсуліну пов'язана насамперед з полегшенням поглинання глюкози тканинами, зі стимуляцією синтезу глікогену (у печінці, м'язовій та інших тканинах), прискоренням гліколізу й аеробного окиснення глюкози, синтезу жирних кислот у печінці та наступного відкладання триацилгліцеролів у жировій тканині.

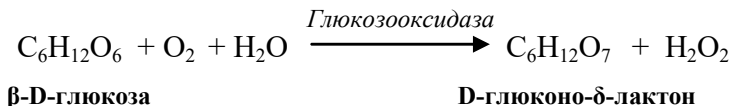
Гіперглікемічні ефекти глюкагону, адреналіну та інших гормонів-антагоністів інсуліну, у свою чергу, обумовлені стимуляцією мобілізації глікогену в печінці та м'язах, стабілізацією глюконеогенезу, мобілізацією жирних кислот з триацилгліцеролів жирової тканини, пригніченням виділення інсуліну та зниженням поглинання глюкози тканинами.

Отже, рівень глюкози у крові є інтегральним показником стану вуглеводного обміну в організмі тварин.

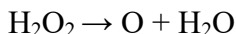
Визначення концентрації глюкози крові базується на реакціях її специфічного і неспецифічного окиснення з подальшим визначенням метаболітів шляхом фотометрування її забарвлених розчинів або титриметричного аналізу.

Дослід 1. Визначення вмісту глюкози в крові глюкозооксидазним методом

В основі методу лежить специфічна реакція ферментативного окиснення глюкози глюкозооксидазою до глюконової кислоти та гідропероксиду водню за схемою:



Гідропероксид водню, що утворюється в реакції, розщеплюється пероксидазою згідно з реакцією:



Атомарний кисень, що виділяється, окиснює хромогенний акцептор кисню *o*-толідін з утворенням сполуки синього кольору, інтенсивність якого пропорційна концентрації глюкози в межах від 20 до 400 мг%.

Матеріали та реактиви. Біологічна рідина (сироватка або плазма крові, сеча, гемолімфа, спинномозкова рідина), 0,9%-й розчин NaCl, 0,3 н. розчин NaOH, 5%-й розчин ZnSO₄, робочий реактив на глюкозу (у мірній колбі ємністю 50 мл у 30 мл 0,25 М ацетатного буфера, рН 4,8, розчиняють послідовно 1 мг глюкозооксидази і 0,5 мг пероксидази, додають 0,5 мл 1%-го розчину *o*-толідину в абсолютному етанолі й доводять об'єм до мітки ацетатним буфером), стандартний розчин глюкози (0,1%-й розчин глюкози в 0,2%-му розчині бензойної кислоти)

Обладнання. Центрифужні пробірки, штатив із пробірками, піпетки, центрифужні ваги, центрифуга (5000 g), годинник, фотометричне обладнання (для вимірювання при довжині хвилі 625 нм (червоний світлофільтр)), кювети завтовшки 10 мм.

Хід роботи. Для осадження білка у зразках біологічних рідин (плазми і сироватки крові, гемолімфи, спинномозкової рідини) у центрифужних пробірках змішують 1,1 мл 0,9%-го розчину NaCl, 0,4 мл 5%-го розчину ZnSO₄, 0,4 мл 0,3 н. розчину NaOH і додають 0,1 мл біологічної рідини. Після перемішування розчини центрифугують при 5000 g протягом 10–15 хв.

Для визначення глюкози 1 мл надосадової рідини змішують із 3 мл робочого реактиву на глюкозу.

Одночасно у дві хімічні пробірки вносять: в одну 1 мл стандартного розчину глюкози (0,1%-й розчин глюкози в 0,2%-му розчині бензойної кислоти), у другу – 1 мл води (контрольна проба) і додають по 3 мл робочого реактиву. Робочі реактиви в кожную пробірку додають послідовно з інтервалом 2 хв, який витримують і під час подальшого визначення оптичної густини (екстинкції) розчинів.

У ході реакції розвивається забарвлення, інтенсивність якого досягає максимуму через 15–20 хв після початку реакції. Екстинкцію розчинів визначають на максимумі забарвлення при $\lambda = 625$ нм (червоний світлофільтр) у кюветі товщиною 1 см відносно контрольної проби.

Розрахунки проводять за формулою:

$$C_{\text{д}} = \frac{E_{\text{досл}} \cdot C_{\text{станд}}}{E_{\text{станд}}},$$

де $C_{\text{досл}}$ і $C_{\text{станд}}$ – концентрації глюкози в досліджуваній і стандартній пробах відповідно, мкмоль/мл;

$E_{\text{досл}}$ і $E_{\text{станд}}$ – екстинкція досліджуваного і стандартного розчинів відповідно.

Розрахунок вмісту глюкози в досліджуваній пробі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами і роблять висновок.

***Дослід 2.** Визначення вмісту глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом із використанням наборів для клінічної діагностики*

Глюкоза у присутності глюкозооксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти та пероксиду водню, який за наявності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового забарвлення, який визначається фотометрично. Нормальні величини для людини 12–60 років становлять 4,1–5,9 ммоль/л (сироватка), 0,1–0,8 ммоль/л (сеча).

Матеріали та реактиви. Сироватка крові або сеча; монореагент (пероксидаза (1100 ± 110 U/л), β ,D-глюкозооксидаза (9000 ± 900 U/л), 4-амінофеназон (55 ± 5 мг/л), фосфатний буфер із рН 7,2–7,4 ($0,10 \pm 0,01$ моль/л), фенол (190 ± 19 мг/л), стабілізатори, активатори; калібрувальний розчин глюкози ($10,0 \pm 0,5$ ммоль/л, або 1802 ± 90 мг/л).

Обладнання. Фотометричне обладнання (для вимірювання за довжини хвилі 500–550 нм, кювети завтовшки 5 мм або 10 мм, термостат, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Аналіз проводять згідно зі схемою, наведеною в табл. 2.3.

Таблиця 2.3

**Схема проведення дослідів з визначення вмісту глюкози
в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом**

Відміряти у пробірку	Холоста Проба, мл	Калібру- вальна проба, мл	Дослідна проба, мл
Фізіологічний розчин	0,04	—	—
Калібрувальний розчин	—	0,04	—
Дослідний розчин	—	—	0,04
Монореагент (буферний розчин ферментів)	4,00	4,00	4,00

Уміст пробірок перемішують і витримують 20 хв за кімнатної температури або 12 хв при температурі 37 °С. Спостерігають утворення червоно-фіолетового забарвлення. Вимірюють оптичну густину калібрувальної ($E_{\text{калібр}}$) та дослідної ($E_{\text{досл}}$) проб проти холостої проби при довжині хвилі 500–550 нм. Забарвлення стабільне протягом 60 хв.

Розрахунок концентрації глюкози (C , ммоль/л) проводять за формулою:

$$C = (E_{\text{досл}} / E_{\text{калібр}}) \times K \times 10,$$

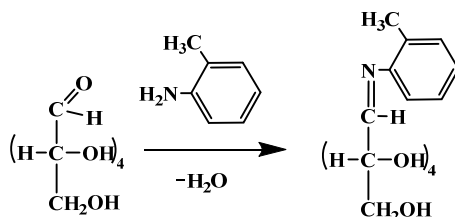
K – коефіцієнт розведення проби;

10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л.

Розрахунок вмісту глюкози в біологічній рідині та отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами й роблять висновок.

Дослід 3. Визначення вмісту глюкози в крові за Гультманом

При нагріванні глюкози з ортотолуїдином у розчині оцтової кислоти розвивається синьо-зелене забарвлення, інтенсивність якого прямо пропорційна концентрації вуглеводу:



Матеріали та реактиви. Біологічна рідина (сироватка або плазма крові, сеча, гемолімфа, спинномозкова рідина), 3%-й розчин ТХО, стандартний розчин глюкози (0,1%-й розчин глюкози у 0,2%-му розчині бензойної кислоти), ортотолуїдиновий реактив (у мірній колбі на 100 мл розчиняють 0,15 г тіосечовини в 94 мл льодяної оцтової кислоти і додають 6 мл орто-толуїдина).

Обладнання. Центрифужні пробірки, штатив із пробірками, піпетки, центрифужні ваги, центрифуга (5000 g), годинник, кипляча водяна баня, фотометричне обладнання (для вимірювання при довжині хвилі 625 нм (червоний світлофільтр), кювети завтовшки 10 мм.

Хід роботи. Для депротейнізації зразків біологічних рідин (сироватки крові, гемолімфи та ін.) у центрифужні пробірки з 0,9 мл 3%-го розчину ТХО додають: у одну 0,1 мл досліджуваної рідини, у другу – 0,1 мл стандартного розчину глюкози (0,1%-й розчин глюкози в 0,2%-му розчині бензойної кислоти), перемішують і надалі центрифугують дослідну і стандартну суміші при 5000 g протягом 10 хв.

Для визначення глюкози 0,5 мл надосадової рідини змішують з 4,5 мл ортотолуїдинового реактиву. Пробірки із сумішами нагрівають на киплячій водянній бані протягом 8 хв і одразу охолоджують до кімнатної температури під струмом водопровідної води.

Екстинкцію розчинів вимірюють при $\lambda = 625$ нм (червоний світлофільтр) у кюветі товщиною 1 см відносно води. Вміст глюкози визначають за формулою (див. лаб. роб. № 2.4, дослід 1).

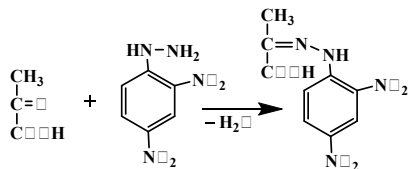
Розрахунок вмісту глюкози в біологічній рідині та отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами і роблять висновок.

Лабораторна робота № 2.5

Виявлення молочної та піровиноградної кислот у біологічному матеріалі

Дослід 1. Кількісне визначення піровиноградної кислоти за модифікованим методом Умбрайта

Метод базується на реакції між піровиноградною кислотою і кислим розчином 2,4-динітрофенілгідазину (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідазону піровиноградної кислоти:



Розрахунок концентрації проводять з урахуванням екстинції стандартного розчину пірувату.

Матеріали та реактиви. Дистильована вода, стандартний розчин пірувату – 625 мг у 100 мл води (625 мг%), слина, м'язи щурів, 0,1%-й розчин 2,4-ДНФГ у 2 н. розчині хлоридної кислоти, 12%-й розчин гідроксиду натрію, 10%-й розчин ТХО.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, ФЕК для вимірювання довжин хвиль при синьому світлофільтрі, кювети заготовшки 5 або 10 мм.

Хід роботи. Беруть 4 пробірки, в одну наливають 1 мл дистильованої води, у другу – 1 мл стандартного розчину пірувату, у третю – 1 мл слини, у четверту – 1 мл розчину гомогенату м'язів щура, виготовленого з наважки масою 1 г (1 г наважки розтирають, додають 9 мл фізіологічного розчину).

В усі пробірки додають по 1 мл ТХО, перемішують вміст і центрифугують при 2000 об/хв протягом 5 хв.

Із кожної пробірки відбирають по 1 мл центрифугату й додають по 0,5 мл розчину 2,4-ДНФГ. Вміст пробірок перемішують і ставлять у термостат при температурі 25 °С на 20 хв. В усі пробірки додають по 2 мл 12%-го розчину гідроксиду натрію і залишають на 10 хв.

Вміст пробірок колориметрують на ФЕК проти контролю (дистильованої води) при синьому світлофільтрі. Концентрацію пірувату в біологічному матеріалі (мг%) розраховують за формулою:

$$C_{\text{досл}} = \frac{E_{\text{досл}} \cdot C_{\text{станд}}}{E_{\text{станд}}},$$

де $C_{\text{досл}}$ і $C_{\text{станд}}$ – концентрації пірувату в дослідній і стандартній пробах відповідно;

$E_{\text{досл}}$ і $E_{\text{станд}}$ – екстинція дослідного і стандартного розчинів, відповідно.

Розрахунок визначення вмісту піровиноградної кислоти у біологічному матеріалі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

Дослід 2. Кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера

У крові здорової людини міститься 1–2 ммоль/л молочної кислоти. Показник зростає при інтенсивному фізичному навантаженні, тетанії, при гіпоксії внаслідок легеневої та серцевої недостатності, порушеннях функцій печінки.

Молочна кислота при нагріванні із сірчаною кислотою перетворюється на оцтовий альдегід, який за взаємодії з гідрохіном утворює сполуку червоно-коричневого кольору.

Матеріали та реактиви. Дистильована вода, гомогенат тканини (наважку тканини (1 г) розтирають і додають 5 мл фізіологічного розчину) або сироватка крові, стандартний розчин молочної кислоти, мета-фосфорна кислота, гідроксид кальцію, 25%-й розчин сульфату міді, 10%-й розчин сульфату міді, концентрована сірчана кислота, 20%-й спиртовий розчин гідрохінону.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, ступка з товчачиком, фільтрувальний папір, лійки для фільтрування, скляні палички, кипляча водяна баня, ФЕК для вимірювання довжин хвиль при синьому світлофільтрі (довжина хвилі 490 нм), ковчег завтовшки 5 або 10 мм.

Хід роботи. У три сухі пробірки наливають по 6 мл дистильованої води. Потім у першу додають 1 мл стандартного розчину молочної кислоти, у другу – 1 мл гомогенату тканини (наважку тканини (1 г) розтирають і додають 5 мл фізіологічного розчину) або сироватки крові, у третю – 1 мл води. Для осадження білків вносять у кожен пробірку по 1 мл метафосфornoї кислоти, струшують та залишають на кілька хвилин, після чого відфільтровують.

До фільтрату додають по 1 мл 25%-го розчину сульфату міді й 0,5 г гідроксиду кальцію. Проби перемішують скляною паличкою. Через 5 хв відфільтровують. Відміряють по 1 л фільтрату в пробірки з притертими пробками, додають по 0,1 мл 10%-го розчину сульфату міді та 4 мл концентрованої сірчаної кислоти. Поміщають на киплячу водяну баню на 1,5 хв. Після охолодження додають по 0,1 л 20%-го спиртового розчину гідрохінону, добре перемішують і кип'ятять 15 хв. Охолоджують та колориметрують на ФЕКу при синьому світлофільтрі (довжина хвилі становить 490 нм).

Розрахунок концентрації молочної кислоти в екстракті або сироватці крові, ммоль/л, проводять за формулою:

$$C_{\text{досл}} = \frac{E_{\text{досл}} \cdot C_{\text{станд}}}{E_{\text{станд}}},$$

де $C_{\text{досл}}$ і $C_{\text{станд}}$ – концентрації лактату в дослідній і стандартній пробах відповідно;

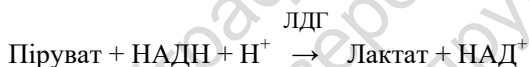
$E_{\text{досл}}$ і $E_{\text{станд}}$ – екстинція дослідного і стандартного розчинів відповідно.

Розрахунок визначення вмісту молочної кислоти в біологічному матеріалі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

Лабораторна робота № 2.6

Визначення загальної лактатдегідрогеназної активності сироватки крові (кінетичний УФ-метод із використанням набору реактивів)

УФ-метод базується на проведенні наступної реакції:



Піруват перетворюється на лактат із одночасним окисненням НАДН. Швидкість зменшення абсорбції при 340 нм, що зумовлено окисненням НАДН, прямо пропорційна лактатдегідрогеназній активності у пробі. Нормальні величини даного показника у дорослих наведено в табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Значення фізіологічної норми показника загальної лактатдегідрогеназної активності сироватки крові

Температура	25 °C	30 °C	37 °C
МОд/л	120–240	160–320	225–450
мккат/л	2–4	2,67–5,33	3,75–7,5

Матеріали та реактиви. Сироватка крові; буферний розчин (Р1) рН 7,4±0,2 (містить трис (62,5±3,125) ммоль/л, піруват (1,5±0,075) ммоль/л, ЕДТО (6,25±0,3125) ммоль/л); стабілізуючий розчин гідроксиду натрію (0,01 н.); субстрат НАДН.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, фотоелектроколориметр (довжина хвилі 334, 340 або 365 нм), кювети завтовшки 10 мм.

Хід роботи.

1. Приготування робочих розчинів.

Розчин субстрату (P2) – розчиняють вміст пробірки із НАДН у флаконі із стабілізуючим розчином. Монореактив (P1 + P2) – змішують 4 частини буферного розчину (P1) із 1 частиною розчину субстрату (P2).

2. Проведення аналізу.

Перед проведенням аналізу кювету й робочі розчини нагрівають до необхідної температури протягом 5 хв. При вимірюванні оптичної густини необхідно підтримувати постійну температуру ($\pm 0,5$ °C).

А) Запускаючи реакцію субстратом, дослід проводять за схемою, наведеною в табл. 2.5.

Таблиця 2.5

Схема проведення дослідів (запуск реакції субстратом)

Температура	25 °C або 30 °C		37 °C	
Піпетують, мкл	макро	мікро	макро	мікро
Буферний розчин (P1)	4000	1000	4000	1000
Інкубують 5 хв, потім додають				
Зразок	100	20	50	10
Перемішують, інкубують 1 хв, потім додають				
Розчин субстрату (P2)	1000	250	1000	250

Б) Запускаючи реакцію зразком, дослід проводять за схемою, наведеною у табл. 2.6.

Таблиця 2.6

Схема проведення дослідів (запуск реакції зразком)

Температура	25 °C або 30 °C		37 °C	
Піпетують, мкл	макро	мікро	макро	мікро
Монореактив (P1 + P2)	5000	1000	5000	1000
Інкубують 5 хв, потім додають				
Зразок	100	20	50	10

В обох випадках перемішують, через 1 хв вимірюють зміну екстинції з інтервалом 1 хв протягом 3 хв відносно повітря або дистильованої води. Розраховують середню зміну екстинції за 1 хв ($\Delta E/\text{хв}$), результати записують у таблицю (табл. 2.7).

Таблиця 2.7

Результати вимірювання екстинції при визначенні загальної лактатдегідрогеназної активності сироватки крові

Запуск реакції субстратом	
1 хв	E1 =
2 хв	E2 =
3 хв	E3 =
Середня	$\Delta E/\text{хв} = (E1 + E2 + E3)/3 =$
Запуск реакції зразком	
1хв	E1 =
2хв	E2 =
3хв	E3 =
Середня	$\Delta E/\text{хв} = (E1 + E2 + E3)/3 =$

3. Розрахунок.

А) Для отримання результатів у МО/л множать $\Delta E/\text{хв}$ на коефіцієнт (табл. 2.8.)

Таблиця 2.8

Коефіцієнти для розрахунку загальної лактатдегідрогеназної активності сироватки крові в МО/л

Запуск реакції субстратом	25 °C або 30 °C		37 °C	
Довжина хвилі, нм	макро	мікро	макро	мікро
340	8095	10080	16030	20000
334	8250	10275	16345	20390
365	15000	18675	29705	37060
Запуск реакції зразком	25°C або 30 °C		37 °C	
Довжина хвилі, нм	макро або мікро		макро або мікро	
340	8095		16030	
334	8250		16345	
365	15000		29705	

Б) Для отримання результатів у мккат/л множать $\Delta E/\text{хв}$ на коефіцієнт (табл. 2.9).

Таблиця 2.9

**Коефіцієнти для розрахунку загальної
лактатдегідрогеназної активності сироватки крові в мккат/л**

Запуск реакції субстратом	25 °C або 30 °C		37 °C	
Довжина хвилі, нм	макро	мікро	макро	мікро
340	134,92	168,0	267,17	333,33
334	137,50	171,25	272,42	339,83
365	250,00	311,25	495,08	617,67
Запуск реакції зразком	25 °C або 30 °C		37 °C	
Довжина хвилі, нм	макро або мікро		макро або мікро	
340	134,92		267,17	
334	137,50		272,42	
365	250,00		495,08	

Розрахунки загальної лактатдегідрогеназної активності сироватки крові та отримані результати записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

Лабораторна робота № 2.7

Визначення сіалових кислот у сироватці крові

N-ацетилпохідні нейрамінової кислоти – *сіалові кислоти* – складові компоненти глікопротеїнів міжклітинного матриксу. У реакціях катаболізму за дії гідролаз (*нейрамінідаз*) вони відщеплюються від молекули глікопротеїну. За патологічних процесів, що супроводжуються деструкцією сполучної тканини (ревматизмі, артрозі суглобів, деяких новоутвореннях тощо) вміст сіалових кислот у крові, який у нормі становить 0,62–0,73 г/л, значно підвищується. Тому визначення вмісту сіалових кислот у сироватці крові використовується у клінічній практиці для характеристики стану сполучної тканини, а також для оцінки активності патологічного процесу і ефективності лікування.

Дослід 1. Реакція Гесса на сіалові кислоти

Реакція між N-ацетилнейраміновою кислотою і оцтовосірчанним реактивом супроводжується забарвленням розчину в червоно-фіолетовий колір, інтенсивність котрого прямо пропорційна вмісту сіалових кислот.

Матеріали та реактиви. Сироватка крові, 10%-й розчин ТХО, оцтовосірчаний сульфатний реактив (5%-й розчин сірчаної кислоти в льодяній оцтовій кислоті).

Обладнання. Штатив із пробірками, центрифужні пробірки, піпетки, кипляча водяна баня, льодяна баня, годинник, центрифуга (1500 g), центрифужні ваги, ФЕК (довжина хвилі 540 нм), кювети завтовшки 10 мм.

Хід роботи. 1 мл сироватки крові вносять у центрифужну пробірку, доливають 1 мл 10%-го розчину ТХО, обережно струшують і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 5 хв. Після охолодження на льодяній бані суміш центрифугують 5 хв при 1500 g 0,4 мл супернатанту вносять до пробірки з 35 мл оцтовосірчаного сульфатного реактиву і повторно нагрівають на киплячій водяній бані протягом 30 хв. Після охолодження дослідну пробу фотометрують при $\lambda = 540$ нм (зелений світлофільтр) у кюветі товщиною 1 см відносно контрольної проби (оцтовосульфатний реактив).

Результат розраховують за формулою:

$$C = E \times 1000,$$

де C – вміст сіалових кислот, в умовних одиницях;

E – екстинкція дослідної проби.

Розрахунок вмісту сіалових кислот у пробі й отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами і роблять висновок.

Дослід 2. Визначення сіалових кислот за реакцією з резорцином

За взаємодії резорцину з нейраміновою кислотою утворюється продукт, який забарвлює розчин у синій колір, за інтенсивністю якого оцінюють вміст сіалових кислот.

Матеріали та реактиви. Сироватка крові, 5%-й розчин ТХО, резорциновий реактив (його готують у мірній колбі ємністю 100 мл: 200 мг резорцину розчиняють у 10 мл дистильованої води, доливають 80 мл концентрованої HCl ($\rho = 1,19$) і додають 0,25 мл 0,1 М розчину CuSO_4 ; об'єм доводять водою до мітки і зберігають у холодильнику протягом 1 місяця), бутилацетат, стандартний розчин N-ацетилнейрамінової кислоти (0,5 мг/мл).

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, кипляча водяна баня, годинник, фільтрувальний папір, лійки для фільтрування, ФЕК (довжина хвилі 575–590 нм (жовтий світло-фільтр)), кювети завтовшки 5 мм.

Хід роботи. У пробірку з 1,9 мл 5%-го розчину ТХО вносять 0,1 мл сироватки крові, перемішують і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 7 хв. Після гідролізу глікопротеїнів, що супроводжується відщепленням сіалових кислот, пробу охолоджують до кімнатної температури і фільтрують крізь складчастий паперовий фільтр.

0,5 мл прозорого фільтрату відбирають у пробірку і розводять 0,5 мл води; у другу пробірку наливають 1 мл води (контрольна проба). У кожну пробірку додають по 1 мл резорцинового реактиву і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 15 хв. Після охолодження у пробірки додають по 3 мл бутилацетату, проби струшують і залишають для екстракції на 15 хв. Після розшарування суміші верхній забарвлений у синій колір шар рідини відокремлюють і фотометрують при $\lambda = 575\text{--}590$ нм (жовтий світло-фільтр) у кюветі товщиною 0,5 см відносно контрольної проби.

Уміст сіалових кислот визначають за калібрувальною кривою в координатах E (екстинкція) – C (концентрація) за даними екстинкції проб, що вміщують 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 і 0,5 мл стандартного розчину N-ацетилнейрамінової кислоти (0,5 мг/мл). Загальний об'єм проб доводять до 1 мл водою, додають по 1 мл резорцинового реактиву, і стандартні проби обробляють аналогічно дослідній пробі. Для визначення концентрації сіалових кислот у досліджуваному зразку сироватки крові концентрацію стандартної проби помножують на 4 з урахуванням розбавлення досліджуваного зразка.

Розрахунок вмісту сіалових кислот у пробі й отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами і роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Дати назву і принципи методів кількісного визначення глюкози в біологічних рідинах (крові, гемолімфі, сечі).

2. У чому полягає сутність методу визначення пірувату за методом Умбрайта?

3. У чому полягає принцип методу визначення лактату за методом Бюхнера?

4. Яку реакцію здійснює лактатдегідрогеназа?

5. З якою метою на практиці визначають вміст сіалових кислот у сироватці крові?

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДО РОЗДІЛУ 2

Завдання 1

Знайдіть відповідність ферментів, що діють у шлунково-кишковому тракті та субстратів:

- | | |
|--------------------------|-----------------|
| 1) мальтаза; | а) крохмаль; |
| 2) ізомальтаза; | б) лактоза; |
| 3) лактаза; | в) сахароза |
| 4) сахараза; | г) ізомальтоза; |
| 5) панкреатична амілаза; | д) мальтоза; |
| 6) амілаза слини. | є) глікоген |

Завдання 2

Панкреатична амілаза розщеплює глікозидні зв'язки:

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1) α -1,2; | 4) α -1,4; |
| 2) α -1,6; | 5) β -1,6; |
| 3) β -1,2; | 6) β -1,4. |

Завдання 3

Оберіть відповідність продуктів гідролітичного розщеплення дисахаридів і ферментів, що каталізують ці реакції:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------|
| 1) мальтоза (мальтаза); | а) галактоза + глюкоза; |
| 2) ізомальтоза (ізомальтаза); | б) глюкоза + глюкоза; |
| 3) сахароза (сахараза); | в) глюкоза + фруктоза. |
| 4) лактоза (лактаза). | |

Завдання 4

В експерименті до розчину, що вміщує сахарозу, лактозу та крохмаль, додали сік підшлункової залози й інкубували за оптимальних умов. Визначте:

- 1) які вуглеводи будуть розщеплюватись?
- 2) які ферменти будуть каталізувати відповідні реакції?
- 3) які продукти будуть утворюватись?

Завдання 5

Оберіть, які сполуки є головними субстратами гліоконеогенезу:

- | | |
|--------------|-----------------------------|
| 1) піруват; | 4) гліцерин; |
| 2) глікоген; | 5) крохмаль; |
| 3) лактат; | 6) глікогенні амінокислоти. |

Завдання 6

Визначте, у яких реакціях гліколізу витрачається АТФ:

- 1) реакція, яка каталізується гексокіназою;
- 2) ізомеризація гексозо-6-фосфатів, що каталізується фосфоглюкомутазою;
- 3) утворення фруктозо-1,6-дифосфату;
- 4) утворення двох тріоз за дії ферменту альдолази;
- 5) утворення 1,3-дифосфогліцерату.

Завдання 7

АТФ утворюється в реакціях:

- 1) окиснення гліцеральдегід-3-фосфату за дії гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази;
- 2) утворення 3-фосфогліцерату в реакції, що каталізується фосфогліцераткіназою;
- 3) реакція дегідратації, у результаті якої утворюється фосфоенолпіруват, що каталізується енолазою;
- 4) реакція утворення енолпірувату за дії піруваткінази.
- 5) підготовка глюкози до її окиснення.

Завдання 8

Біологічне значення гліколізу:

- 1) генерація енергії за рахунок розщеплення глюкози;
- 2) синтез біологічно активних сполук;
- 3) постачання будівельних блоків для реакцій синтезу;
- 4) регуляція вміст глюкози – основного метаболічного "палива".

Завдання 9

Знайдіть відповідність процесів бродіння та сумарних реакцій, що їх описують:

- 1) глюкоза + $2F_n + 2ADP \rightarrow 2\text{етанол} + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O$;
- 2) глюкоза + $2ADP + 2F_n \rightarrow 2\text{лактат} + 2ATP + 2H_2O$.
 - а) молочнокисле бродіння;
 - б) спиртове бродіння.

Завдання 10

При гідролізі трегалози після її повного метилювання (тобто, усі OH -групи перетворюються на $OSCH_3$) утворюються продукти:

- 1) 2, 3, 4, 6-театраметилглюкоза;
- 2) 2, 3, 4-триметилглюкоза;
- 3) 2, 3-диметилглюкоза;
- 4) 2-метилглюкоза;
- 5) глюкоза.

Розділ 3. ОБМІН ЛІПІДІВ

ТЕМА І. ОБМІН ЛІПІДІВ У ШЛУНКОВО-КИШКОВОМУ ТРАКТІ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

Обмін ліпідів в організмі тварин і людини включає процеси їхнього перетравлення і всмоктування у шлунково-кишковому тракті, транспорту до інших тканин та внутрішньоклітинного катаболізму і анаболізму.

Ліпіди, що надходять з їжею (50–70 г у добовому раціоні людини), зазнають гідролітичного розщеплення головним чином у верхніх відділах тонкого кишечника за участю ліполітичних ферментів підшлункової залози – ліпази триацилгліцеролів, фосфоліпаз, холестеролестерази.

3.1.1. Роль жовчних кислот у розщепленні жирів

Ферментативному розщепленню жирів сприяють природні емульгатори ліпідів – жовчні кислоти, що синтезуються в печінці із холестеролу і виділяються з жовчю у дванадцятипалу кишку у вигляді кон'югатів холевої та хенодезоксихолевої кислот із гліцином і таурином (рис. 3.1).

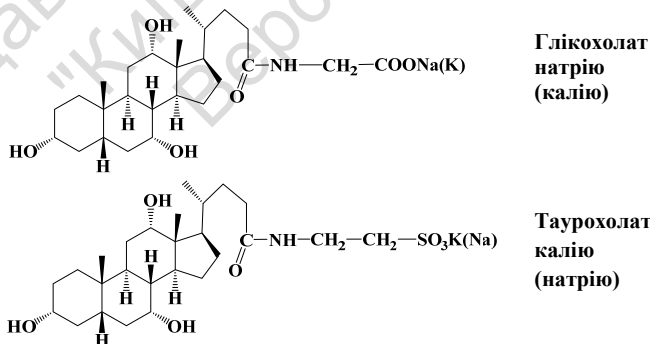
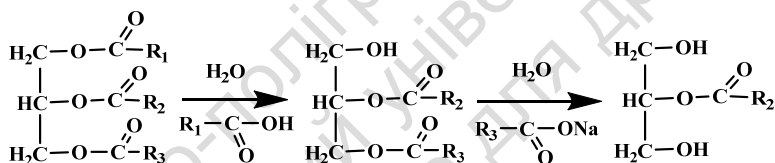


Рис. 3.1. Структурні формули кон'югатів жовчних кислот

Амфифільні властивості солей кон'югатів жовчних кислот при взаємодії з жирами забезпечують зменшення поверхневого натягу жирових крапель, завдяки чому вони розпадаються до дрібних міцел, на поверхні яких, власне, і здійснюється ферментативний гідроліз молекул ліпідів.

3.1.2. Особливості розщеплення у шлунково-кишковому тракті ліпідів різних класів

Ліпаза триацилгліцеролів, що активується в дванадцятипалій кишці шляхом приєднання до неї коферменту коліпази, каталізує відщеплення залишків жирних кислот біля першого та третього атомів вуглецю молекули триацилгліцеролу, унаслідок чого утворюється суміш 2-моноацилгліцеролів і натрієвих або калієвих солей жирних кислот (мил):



Розщеплення фосфоліпідів відбувається за участю *фосфоліпаз*. Специфічність дії деяких із них схематично зображено на прикладі молекули фосфатидилхоліну (рис. 3.2).

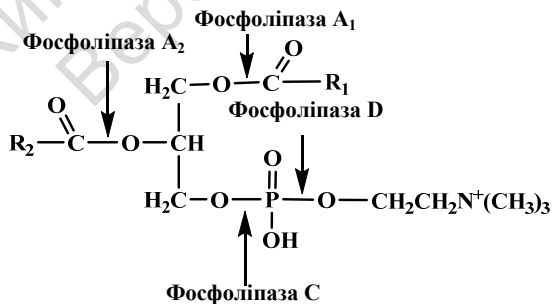


Рис. 3.2. Схема гідролізу фосфатидилхоліну фосфоліпазами

Сумісна дія фосфоліпаз A₁, A₂, C, D, призводить до розщеплення лецитину і звільнення жирних кислот, фосфорної кислоти, гліцеролу та аміноспирту холіну.

Етери холестеролу, що містяться в харчових продуктах, розщеплюються на холестерол і жирні кислоти за допомогою *холестеролестерази* (рис. 3.3):

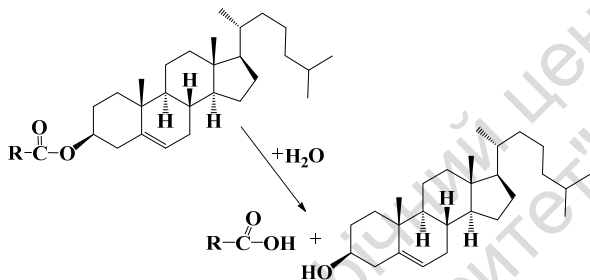


Рис. 3.3. Схема гідролізу ефіру холестеролу холестеролестеразою

У результаті перетравлення ліпідів їжі в кишечнику утворюється складна суміш різних продуктів (2-моноацилгліцероли, вільні жирні кислоти, фосфорна кислота, гліцерол, аміноспирти, холестерол).

3.1.3. Усмоктування продуктів травлення ліпідів у кишечнику. Ресинтез жирів у кишечнику

Водорозчинні продукти (фосфорна кислота, гліцерол, аміноспирти) вільно всмоктуються епітелієм ворсинок слизової, звідки вивільнюються у кров ворітної вени. Продукти ліпідної природи утворюють мішані міцели, які надходять до епітеліальних клітин ворсинок слизової оболонки кишки шляхом піноцитозу. В середині клітин слизової міцелярні комплекси розпадаються, жовчні кислоти продовжують свій рух по колу, який називається *ентерогепатичною циркуляцією жовчних кислот*, а інші компоненти міцел – 2-моноацилгліцероли та вільні жирні кислоти – беруть участь у створенні ліпопротеїнових комплексів – хіломікронів. Ліпідні компоненти цих комплексів, головним чином триацилгліцероли, а також деякі фосфоліпіди синтезуються на мембранах ендоплазматичного ретикулуму. Ресинтез триацилгліцеролів здійснюється за участю ферментів так званого *моноацилгліцеролового шунта*, схему якого наведено на рис. 1.4.

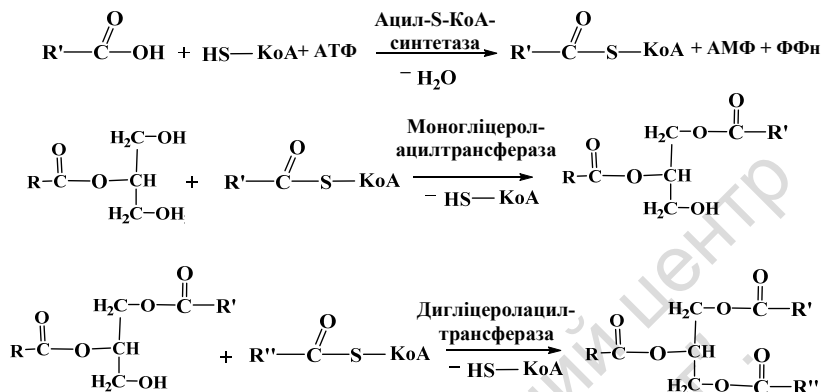


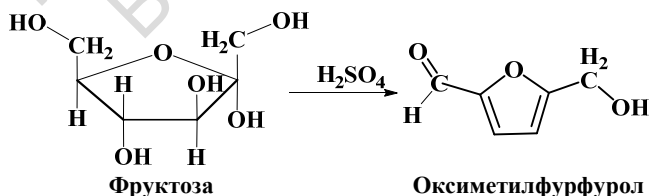
Рис. 3.4. Схема моноацилгліцеролового шунта

Ресинтезовані молекули триацилгліцеролів, фосфоліпідів і естерів холестеролу разом зі специфічними апопротеїнами утворюють транспортну форму екзогенних ліпідів – хіломікрони, за допомогою яких ці ліпіди досягають тканин, де вони асимілюються.

Лабораторна робота № 3.1

Виявлення жовчних кислот

За взаємодії жовчних кислот з оксиметилфурфуролом утворюються забарвлені в червоно-фіолетовий колір продукти їхньої конденсації. Фурфурол отримують із фруктози за дії концентрованої сірчаної кислоти:



Матеріали та реактиви. Жовч, розчин жовчних кислот, 5%-й розчин фруктози (або сахарози), концентрована сірчана кислота.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, скляні палички, льодяна водяна баня.

Хід роботи. У дві пробірки наливають: в одну 4 мл розведеної у разів жовчі, у другу – 2 мл розчину жовчних кислот і додають у кожен по 5–10 крапель 5%-го розчину фруктози (або сахарози). Після перемішування розчинів скляною паличкою обережно по стінці пробірки вносять по 2 мл концентрованої сірчаної кислоти. На межі між шарами двох рідин утворюється червоно-фіолетове кільце. При перемішуванні вмісту пробірок на льодяній бані через кілька хвилин спостерігають утворення червоного забарвлення, яке поступово змінюється на червоно-фіолетове.

Спостереження записують у зошит, роблять висновки.

Лабораторна робота № 3.2

Вплив жовчі на активність ліпази триацилгліцеролів

Активність ліпази визначають за кількістю вільних жирних кислот, що утворюються у результаті гідролізу жиру.

Матеріали та реактиви. Кип'ячене і розведене водою (1:1) молоко, панкреатин, жовч, розчин фенолфталеїну, 0,05 н. розчин NaOH.

Обладнання. Колби, піпетки, термостат, бюретки для титрування, годинник.

Хід роботи. У три колби наливають кип'яченого й розведеного водою (1:1) молока і додають реагенти згідно з табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Схема приготування дослідних проб для проведення дослідів з вивчення впливу жовчі на активність ліпази триацилгліцеролів

	Молоко, мл	Панкреатин, мл	Жовч, мл	Вода, мл
1.	8,5	–	–	1,5
2.	8,5	0,5	–	1,0
3.	8,5	0,5	1,0	–

Колби вміщують у термостат при 38 °С. Через 15 хв із кожної колби відбирають по 5 мл суміші (решту залишають у термостаті), додають по 1–2 краплі розчину фенолфталеїну і титрують 0,05 н. розчином NaOH до появи слабко-рожевого забарвлення, що не зникає протягом 30 с.

Через 45 хв проводять титрування сумішей, які залишались у термостаті. Про ферментативну активність ліпази судять за кількістю розчину луку, витраченого на титрування. Дані заносять у табл. 3.2, порівнюють активність ліпази у пробах за наявності й відсутності жовчі, висновки записують у зошит.

Таблиця 3.2

Кількість 0,05 н. розчину NaOH, витраченого на титрування дослідних проб

Умови досліджу	Кількість NaOH, мл	Кількість NaOH, мл
	15 хв	45 хв
Молочний жир – ліпаза – жовч		
Молочний жир + ліпаза – жовч		
Молочний жир + ліпаза + жовч		

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які властивості жовчних кислот зумовлюють важливу роль цих сполук у травленні?
2. На якій реакції ґрунтується якісне виявлення жовчних кислот?
3. У чому полягають особливості гідролізу фосфоліпідів за дії фосфоліпаз A₁, A₂, C, D?
4. Що таке ресинтез жирів? Де і як він відбувається?
5. У чому полягає принцип методу вивчення впливу жовчі на активність ліпази триацилгліцеролів?

ТЕМА 2. ТРАНСПОРТ ЛІПІДІВ У КРОВІ. ЛІПОПРОТЕЇНИ ТА ЇХНІЙ МЕТАБОЛІЗМ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

Більшість ліпідів крові (за винятком вільних жирних кислот) виявляються у складі ліпід-білкових комплексів: хіломікронів, ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ), ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ).

3.2.1. Особливості будови й функцій ліпопротеїнів різних класів

Ядро ліпопротеїну утворене жировою краплиною всередині ліпопротеїнової частинки і містить неполярні ліпіди (триацилгліцероли, етерифікований холестерол). Ядро оточене оболонкою, що містить фосфоліпіди, білки і вільний холестерол. Товщина цієї оболонки становить 2–2,5 нм, що становить половину товщини фосфоліпідного бішару клітинних мембран – тобто ліпопротеїни плазми крові мають фосфоліпідний моношар.

Білки, які входять до складу ліпопротеїнів, мають назву *апопротеїнів* і зв'язані з ліпідною частиною нековалентними (зокрема, іонними) зв'язками. Виділяють вісім типів апопротеїнів (апоА-I, апоА-II, апоВ (апоВ100 і апоВ48), апоС-I, апоС-II, апоС-III, апоD, апоЕ (багато ізоформ)). Уміст білка й наявність різних типів апопротеїнів у різних класах ліпопротеїнів сильно варіює; апобілки відіграють роль у збиранні ліпопротеїнових частинок, їхній секреції та метаболізмі, у регуляції активності ферментів, що діють на ліпопротеїни (так діє АпоС-II), у розпізнаванні ліпопротеїнів рецепторами клітин та наступному ендоцитозі ліпопротеїнових часток (лігандами таких рецепторів є АпоВ-100 і Апо-Е).

Склад і деякі фізичні властивості різних класів ліпопротеїнів крові наведені в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Склад і деякі властивості ліпопротеїнів плазми крові

Ліпопротеїни	Густина, г/мл	Маса, Д	Діаметр, нм	Загальні ліпіди, %	Білки, %	Уміст у крові, г/л
Хіломікрони	0,95	до 10^{10}	75–1000	98	2	1,0–2,0
ЛПДНЩ (пре-і β -ліпопротеїни)	0,95–1,00	5×10^7	30–75	88–95	5–12	1,0–1,5
ЛПНЩ (β -ліпопротеїни)	1,00–1,06	$2,5 \times 10^6$	21–25	78–80	20–22	2,0–4,0
ЛПВЩ (α -ліпопротеїни)	1,06–1,21	3×10^5	7–15	43–50	50–57	1,0–3,0

Кожний клас ліпопротеїнів крові виконує специфічні функції. Так, хіломікрони є транспортною формою екзогенних ліпідів, ліпопротеїни дуже низької щільності транспортують ендogenous ліпіди із печінки до периферійних тканин, за допомогою ліпопротеїнів низької та високої щільності здійснюється обмін холестеролу і його ефірами між печінкою та периферійними тканинами.

3.2.2. Метаболізм ліпопротеїнів

Метаболізм ліпопротеїнів залучає два цикли – ендogenousний і екзогенний, інтегрованим органом яких є печінка, і два ключові ферменти – *ліпопротеїніліпазу* (яка вивільнює гліцерол і жирні кислоти з хіломікронів і ЛПДНЩ у тканинах) та *лецитин-холестеролацилтрансферазу* (ЛХАТ), яка утворює ефіри холестеролу з вільного холестеролу і жирних кислот.

Екзогенний цикл починається утворенням у ентероцитах *хіломікронів* (із ресинтезованих жирів, гліцерофосфоліпідів, АпоВ48, АпоА-1, АпоА-2 і -4), які секретуються у лімфатичну систему. У лімфатичній системі відбувається перенесення апопротеїнів між ліпопротеїнами: хіломікрони отримують апоС-II і апоЕ з ЛПВЩ, на які від хіломікронів передаються апоА.

Ці видозмінені хіломікрони надходять у підключичні вени, а далі – у жирову тканину і скелетні м'язи. Там АпоС-II хіломікронів активує ліпопротеїніліпазу, локалізовану на ендотелії капілярів у цих тканинах, яка гідролізує триацилгліцероли хіломікронів до жи-

рних кислот і гліцеролу. За дії ліпопротейніліпази хіломікрони зменшуються в розмірі (через видалення триацилгліцеролів), а частина зовнішньої оболонки, що містить фосфоліпіди, вільний холестерол, апопротейни, відщеплюється і входить до складу ЛПВЩ.

Етерифікований холестерол не вивільнюється і становить більшу частину ліпідного ядра *залишків хіломікронів*. Ці залишки, використовуючи ліганд, що міститься на їхній поверхні – АпоЕ – зв'язуються з рецепторами на поверхні гепатоцитів. Жирні кислоти використовуються на синтез власних триацилгліцеролів або як джерело енергії, а гліцерол транспортується кров'ю до печінки, де перетворюється на глюкозу.

У процесі ендогенного циклу ліпіди, що синтезуються в печінці, транспортуються в периферійні тканини для утилізації. Під час цього процесу утворюються ЛПДНЩ, ЛППЩ і ЛПНЩ.

Ліпопротейни дуже низької щільності – структури, що утворюються в печінці із синтезованих там триацилгліцеролів, фосфоліпідів і холестеролу і здійснюють транспорт останніх до позапечінкових тканин. Їхніми білковими компонентами є АпоЕ і АпоС, які вони отримують від ЛПВЩ (подібно до хіломікронів), а також АпоВ-100, АпоС-2 і -3, АпоЕ. Руйнування ліпопротейнів цього класу здійснюється подібно до катаболізму хіломікронів через активацію ліпопротейніліпази. ЛПДНЩ переносять як ендогенний холестерол (синтезований гепатоцитами), так і екзогенний, що надходить до печінки у складі хіломікронів, тому ЛПДНЩ є первинними переносниками холестеролу до всіх тканин.

Після дії ліпопротейніліпази ЛПДНЩ перетворюються на *ліпопротейни проміжної щільності* (ЛППЩ) (інша назва – залишки ЛПДНЩ); останні в разі подальшої втрати триацилгліцеролів перетворюються на *ліпопротейни низької щільності* (ЛПНЩ). Також ЛППЩ можуть безпосередньо захоплюватися гепатоцитами шляхом рецептор-опосередкованого ендоцитозу – для розпізнання ЛППЩ рецепторами необхідні білки АпоВ-100 і АпоЕ, тому цей рецептор отримав назву АпоВ-100/АпоЕ-рецептор.

Ліпопротейни низької щільності як білковий компонент містять лише АпоВ-100. ЛПНЩ захоплюються клітинами шляхом рецептор-опосередкованого ендоцитозу при взаємодії рецептора саме із цим білком. Використання ЛПНЩ в основному здійсню-

ється в печінці, надниркових залозах і жировій тканині. У клітині холестерол вбудовується в мембрану в тих ділянках, де це необхідно, а надлишок внутрішньоклітинного холестеролу естерифікується (фермент *ацилКоА-холестерол ацилтрансфераза* (АХАТ)). Ефіри холестеролу можуть запасатися у клітині. Активність АХАТ у клітинах у присутності холестеролу зростає.

Ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ) утворюються *de novo* в печінці й тонкому кишечнику як протеїн-збагачені частки. Вміст холестеролу та його ефірів у них малий, а основними апопротеїнами є АпоС-1, АпоА-1, АпоС-2, АпоЕ та ін. Головною функцією ЛПВЩ є накопичення апопротеїнів. Крім того, через наявність лецитинхолестеролацилтрансферази, асоційованої з ЛПВЩ, вони залучаються в естерифікацію вільного холестеролу залишків хіломікронів і ЛППЩ.

Лабораторна робота № 3.3

Визначення загальних ліпідів у сироватці крові з використанням набору для клінічної діагностики

Продукти розпаду ненасичених жирних кислот, що утворюються після кислотного гідролізу ліпідів, взаємодіють з фосфорнованіліновим реактивом з утворенням забарвлених комплексів, які мають максимум поглинання при довжині хвилі 530 нм. Нормальні значення вмісту загальних ліпідів у сироватці крові становлять 4–8 г/л.

Матеріали та реактиви. Свіжа сироватка або плазма крові (гемоліз недопустимий), фосфорнованіліновий реагент (містить 10 мМ розчин ваніліну і 11,5 М розчин ортофосфорної кислоти), калібрувальний розчин ліпідів (8, 0 г/л), сірчана кислота з концентрацією не менше 95%.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, кипляча водяна баня, термостат, годинник, фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 530 нм, кювети товщиною 5 або 10 мм.

Хід роботи. Аналіз проводять за схемою, наведеною в табл. 3.4.

Схема проведення дослідів з визначення вмісту загальних ліпідів у сироватці крові

Відміряти у пробірку	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Холоста проба, мл
Сироватка крові	0,01	—	—
Сірчана кислота	1,00	1,00	1,00
Калібратор ліпідів	—	0,01	—
Змішують та розігрівують на киплячій водяній бані 10 хв, охолоджують пробірки холодною водою протягом 5 хв			
Фосфорнованіліновий реагент	2,00	2,00	2,00
Змішують, інкубують 25 хв при температурі 20–25 °С у темряві			

Вимірюють оптичну густину дослідної проби ($E_{\text{досл}}$) і калібрувальної проби ($E_{\text{калібр}}$) проти холостої проби за довжини хвилі 530 нм. Забарвлення розчинів є стабільним протягом 25 хв у темряві.

Розрахунок концентрації загальних ліпідів у пробі (C , г/л) здійснюють за формулою:

$$C = (E_{\text{досл}} / E_{\text{калібр}}) \times 8,0,$$

де 8,0 – концентрація загальних ліпідів у калібрувальній пробі, г/л.

Розрахунок вмісту загальних ліпідів у пробі й отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами й роблять висновок.

Лабораторна робота № 3.4

Визначення вмісту ліпопротеїнів у плазмі крові

Для виділення та ідентифікації різних форм ліпопротеїнів крові використовуються методи електрофорезу, ультрацентрифугування в градієнті сольових розчинів, а також хімічні методи, які найчастіше застосовуються у клінічній практиці. Хімічні методи базуються на утворенні комплексів між полісахаридом гепарином і ліпопротеїнами крові, які осаджуються із сироватки крові у присутності хлоридів кальцію і магнію, причому за дії хлориду кальцію осаджуються тільки β -ліпопротеїни, тоді як за наявності хлориду магнію в осад переходить вся фракція ліпопротеїнів сироватки крові. Вміст ліпопротеїнів визначають за даними фотометрування суспензій у дослідних пробах.

Матеріали та реактиви. Сироватка крові, 0,025 М розчин хлориду кальцію, 0,025 М розчин хлориду магнію, 1%-й розчин гепарину.

Обладнання. Фотометричні кювети товщиною 5 мм, фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 720 нм (червоний світлофільтр), годинник.

Хід роботи. У дві фотометричні кювети товщиною 0,5 см вносять по 2 мл 0,025 М розчину хлориду кальцію, додають 0,2 мл води в контрольну та 0,2 мл сироватки крові у дослідну кювету. Після перемішування дослідну пробу фотометрують при $\lambda = 720$ нм (червоний світлофільтр) проти контрольної; виміряну екстинцію позначають E_1 .

Після визначення екстинкції розчину в дослідну кювету вносять 0,04 мл 1%-го розчину гепарину (1000 од. у 1 мл), пробу перемішують, витримують точно 4 хв, знову перемішують і фотометрують за тих же умов; виміряну екстинцію позначають E_2 .

Вміст β -ліпопротеїнів розраховують за формулою:

$$C = (E_2 - E_1) \times 10,$$

де C – концентрація ліпопротеїнів, г/л;

Аналогічний дослід проводять у 0,025 М розчині хлориду магнію. Виміряні значення екстинції (E_1 та E_2) використовують для розрахунку загального вмісту ліпопротеїнів, який здійснюють за формулою, наведеною вище.

Вміст ліпопротеїнів високої щільності (α -ліпопротеїнів) можна визначити за різницею між вмістом загальної фракції ліпопротеїнів і концентрацією ліпопротеїнів низької щільності.

Розрахунки вмісту ліпопротеїнів різних класів у крові та отримані результати записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами і роблять висновок.

Дослідження ліпопротеїнів сироватки крові є важливими для діагностики порушень ліпідного обміну. Зокрема, збільшення вмісту ліпопротеїнів низької щільності в крові – *гіпер- β -ліпопротеїнемія* – спостерігається при аналізі крові хворих на діабет, атеросклероз, гіпотиреоз, мононуклеоз, при деяких формах гепатиту, різних гіпопротеїнеміях тощо.

Зменшення вмісту ліпопротеїнів високої щільності відмічається при цирозі печінки, гострих гепатитах, жовтяницях.

Підвищення рівня загальних ліпопротеїнів у крові (*гіперліпопротеїнемія*) найчастіше пов'язане зі зростанням концентрації холестеролу у фракції β -ліпопротеїнів. Внесок холестеролу в такому випадку оцінюють за окремим визначенням загального холестеролу в сироватці крові.

Лабораторна робота № 3.5

Визначення вмісту холестеролу в сироватці крові

Дослід 1. Визначення холестеролу в сироватці крові ферментативним методом з використанням набору для клінічної діагностики

Ефіри холестеролу за дії ферменту холестеролестерази гідролізуються до вільного холестеролу і вищих жирних кислот. Холестерол за дії ферменту холестеролоксидази і кисню окиснюється з виділенням пероксиду водню. Пероксид водню вступає в реакцію з 4-амінофеназоном за участю пероксидази з утворенням сполуки бузкового або червоно-рожевого кольору.

Матеріали та реактиви. Сироватка крові, ензимний реагент (містить ферменти в буферному розчині та 4-амінофеназон), калібрувальний розчин холестеролу (5,17 ммоль/л).

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, термостат, годинник, фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 500–550 нм, кювети товщиною 5 або 10 мм.

Хід роботи. Дослідження проводять у відповідності зі схемою, наведеною у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Схема проведення досліді з визначення вмісту холестеролу в сироватці крові

Відміряти у пробірці	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Холоста проба, мл
Ензимний реагент	1,00	1,00	1,00
Сироватка крові	0,01	-	-
Калібрувальний розчин холестеролу	-	0,01	-
Дистильована вода	-	-	0,01
Ретельно перемішують і витримують 10 хв у термостаті при 37 °С			

Вимірюють оптичну густину дослідної проби ($E_{\text{досл}}$) і калібрувальної проби ($E_{\text{калібр}}$) проти холостої проби при довжині хвилі 500–550 нм. Забарвлення розчинів стабільне протягом 60 хв за умови запобігання прямого сонячного світла.

Розрахунок концентрації холестеролу у пробі (C , ммоль/л) здійснюють за формулою:

$$C = (E_{\text{досл}} / E_{\text{калібр}}) \times 5,17,$$

де 5,17 – концентрація холестеролу в калібрувальній пробі, ммоль/л.

Розрахунок вмісту холестеролу в пробі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами й роблять висновок.

Дослід 2. *Визначення вмісту вільного й загального холестеролу в сироватці крові за Н. Станкевичене*

Вміст загального холестеролу в крові дорослої людини в нормі становить 1,5–2,5 г/л (3,88–6,46 ммоль/л), вміст вільного холестеролу – 0,4–0,9 г/л (1,25–2,20 ммоль/л). Значно покращує діагностику ліпідного обміну визначення вмісту різних фракцій холестеролу крові (загального, вільного і зв'язаного). Зокрема, установлення коефіцієнта етерифікації (відношення зв'язаного холестеролу до загального, у нормі 0,6–0,8) є важливим для оцінки функціональної здатності печінки утворювати ефіри холестеролу. Цей коефіцієнт зменшується за різних патологій печінки, наприклад, при гепатитах його значення пропорційно ступеню порушення функціонального стану печінки.

Метод прямого визначення вільного і загального холестеролу ґрунтується на взаємодії холестеролу з розчином хлориду заліза в льодяній оцтовій кислоті за різних температурних умов.

Матеріали та реактиви. Сироватка або плазма крові (гемоліз недопустимий), 0,1%-й розчин хлориду заліза ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) у льодяній оцтовій кислоті (при виготовленні розчину хлориду заліза 3 частини 0,1%-го розчину $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ в льодяній оцтовій кислоті змішують із 2 частинами концентрованої H_2SO_4 (х. ч.), охолоджують до кімнатної температури і зберігають у склянці з притертою пробкою. Реактив придатний до використання протягом 3 міс.), 0,2%-й розчин холестеролу в льодяній оцтовій кислоті (стандартний розчин).

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, термостат, годинник, фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 560 нм (зелений світлофільтр), кювети товщиною 5 мм, кипляча водяна баня.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 2 мл 0,1%-го розчину хлориду заліза ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) у льодяній оцтовій кислоті, після чого в першу обережно по стінці пробірки додають 0,02 мл негемолізованої сироватки (або плазми крові), у другу – 0,02 мл 0,2%-го розчину холестеролу в льодяній оцтовій кислоті (стандартний розчин). Проби добре перемішують і залишають на 1 годину при 20 °С.

Екстинкцію розчинів вимірюють при $\lambda = 560$ нм (зелений світлофільтр) у кюветі товщиною 5 мм проти контрольної проби (0,1%-й розчин $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$).

Після визначення екстинкції вільного холестеролу проби використовують для подальшого дослідження екстинкції загального холестеролу. Для цього пробірки з дослідною і стандартною пробами ставлять на киплячу водяну баню на 1 хв, після чого охолоджують до кімнатної температури і визначають екстинкцію дослідного розчину аналогічним способом.

Розрахунки вмісту холестеролу в пробах проводять за формулою:

$$C_{\text{досл}} = (E_{\text{досл}} / E_{\text{станд}}) \times 2,$$

де $C_{\text{досл}}$ – вміст холестеролу в дослідній пробі, г/л;

$E_{\text{досл}}$ і $E_{\text{станд}}$ – екстинкції відповідно дослідної і стандартної проб.

Розрахунки вмісту холестеролу в пробах і отримані результати записують у зошит, вираховують коефіцієнт етерифікації, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

Дослід 3. Визначення вмісту холестеролу ліпопротеїнів високої щільності в сироватці та плазмі крові прямим методом із використанням набору реактивів

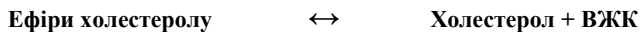
За рахунок наявності значного вмісту фосфоліпідів, а також специфічних апобіліків ЛПВЩ залучаються у взаємоперетворення ліпопротеїнів інших класів, сприяючи видаленню холестеролу із тканин, перенесенню його в печінку, де відбувається його трансформація у жовчні кислоти. Завдяки цьому ЛПВЩ володіють антиатерогенними властивостями, і, навпаки, знижений їх вміст є атерогенним фактором, тобто чинником, який може спричинити розвиток атеросклерозу – захворювання, яке, у свою чергу, є основною причиною ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда й інсульту.

Нормальний вміст холестеролу ЛПВЩ становить $> 1,42$ ммоль/л (чоловіки) і $> 1,68$ ммоль/л (жінки). Значення в межах $0,9$ – $1,42$ ммоль/л (чоловіки) й $1,16$ – $1,68$ ммоль/л (жінки) свідчать про високу ймовірність виникнення патології (група ризику), тоді як вміст холестеролу ЛПВЩ $< 0,9$ (чоловіки) і $< 1,16$ (жінки) указує на наявність патології.

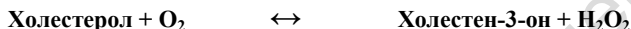
Сумісна дія полімерів і детергентів розчиняє холестерол з ЛПВЩ, тоді як холестерол з ЛПНЩ, ЛПДНЩ та хіломікронів лишається нерозчиненим.

Холестерол із ЛПВЩ за допомогою реакцій, наведених нижче, утворює забарвлений комплекс. Абсорбція, виміряна за довжини хвилі 600 нм, пропорційна концентрації холестеролу ЛПВЩ.

Холестеролестераза



Холестеролоксидаза



Пероксидаза



Матеріали та реактиви. Сироватка або гепаринізована плазма, фізіологічний розчин, маскувальний реагент (трис $(30,0 \pm 1,5$ ммоль/л), пероксидаза $(5,0 \pm 0,5$ КО/л), 4-амінофеназон $(0,900 \pm 0,050$ ммоль/л), стабілізатори, активатори), реагент на холестерол ЛПВЩ (трис $(30,0 \pm 1,5$ ммоль/л), холестеролестераза $(4000 \pm 15$ О/л), холестеролоксидаза $(10000 \pm 10$ О/л), каталаза $(10,0 \pm 0,5$ КО/л), стабілізатори, хромоген, активатори), калібрувальний розчин холестеролу з концентрацією $5,17 \pm 0,20$ ммоль/л.

Обладнання. Фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 600 нм, кювети товщиною 5 або 10 мм, термостат, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Аналіз проводять за схемою, наведеною в табл. 3.6.

Таблиця 3.6

Схема проведення дослідів з визначення вмісту холестеролу ЛПВЩ у сироватці (плазмі) крові

Відміряють в кювету	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Холоста проба, мл
Фізіологічний розчин	—	0,012	—
Аналізуємий розчин	0,024	—	—
Маскувальний реагент ЛПВЩ	2,400	2,400	2,400
Калібрувальний розчин холестеролу	—	0,012	—
Перемішують, витримують 5 хв при температурі 37 °С, вимірюють оптичну густину дослідної ($E_{\text{досл1}}$) і калібрувальної ($E_{\text{калібр1}}$) проб проти холостої проби, додають:			

Відміряють в кювету	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Холоста проба, мл
Перемішують, витримують 5 хв при температурі 37 °С, вимірюють оптичну густину дослідної ($E_{\text{досл1}}$) і калібрувальної ($E_{\text{калібр1}}$) проб проти холостої проби, додають:			
Реагент на холестерол ЛПВЩ	0,600	0,600	0,600
Розчин ретельно перемішують і витримують у термостаті при температурі 37 °С протягом 5 хв. Вимірюють оптичну густину дослідної ($E_{\text{досл2}}$) і калібрувальної ($E_{\text{калібр2}}$) проб проти холостої проби.			

Розрахунок проводять за формулами:

$$1) \Delta E_{\text{досл}} = E_{\text{досл2}} - E_{\text{досл1}},$$

$$\Delta E_{\text{калібр}} = E_{\text{кал2}} - E_{\text{калібр1}};$$

$$2) C = (\Delta E_{\text{досл}} / \Delta E_{\text{калібр}}) \times 2,585,$$

де C – концентрація холестеролу ЛПВЩ у дослідній пробі, ммоль/л;

$\Delta E_{\text{досл}}$ – різниця оптичних густин дослідної проби, од. оптич. густини;

$\Delta E_{\text{калібр}}$ – різниця оптичних густин калібрувальної проби, од. оптич. густини;

2,585 – концентрація калібрувального розчину холестеролу з урахуванням розведення, ммоль/л.

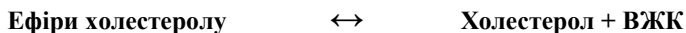
Перерахунок величин: $\text{мг}\% \times 0,02585 = \text{ммоль/л}$.

Розрахунок вмісту холестеролу ЛПВЩ у дослідній пробі й отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами і роблять висновок.

Дослід 4. Визначення вмісту холестеролу ліпопротеїнів низької щільності в сироватці та плазмі крові прямим методом із використанням набору реактивів

Маскувальний реагент захищає холестерол ЛПНЩ від дії холестеролестерази та холестеролоксидази. Після того, як прореагують інші форми ліпопротеїнів, пероксид водню руйнується каталазою.

Холестеролестераза



Холестеролоксидаза



Пероксидаза



Друга стадія вивільнює холестерол із ЛПНЩ та за допомогою реакцій, наведених нижче, утворює забарвлений комплекс. Абсорбція, виміряна при довжині хвилі 600 нм, пропорційна концентрації холестеролу ЛПНЩ.

Основною функцією ЛПНЩ є транспорт холестеролу в крові. Підвищений вміст холестеролу ЛПНЩ є атерогенним фактором, тобто чинником, який може спричинити розвиток атеросклерозу – захворювання, яке, у свою чергу, є основною причиною ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда та інсульту. Нормальний вміст холестеролу ЛПНЩ становить < 2,59 ммоль/л, гранично допустимий – 2,59–3,34 ммоль/л. Значення в межах 3,37–4,12 ммоль/л свідчать про високу ймовірність виникнення патології (група ризику), 4,14–4,90 – про наявність патології, а > 4,92 – про виражену патологію.

Матеріали та реактиви. Сироватка або гепаринізована плазма, маскувальний реагент (трис ($25,0 \pm 1,2$ ммоль/л), холестеролестераза (5000 ± 15 О/л), холестеролоксидаза (5000 ± 15 О/л), каталаза ($10,0 \pm 0,5$ КО/л), стабілізатори, хромоген, активатори), реагент на холестерол ЛПНЩ (трис ($25,0 \pm 1,2$ ммоль/л), 4-амінофеназон ($3,40 \pm 0,17$ ммоль/л), пероксидаза ($10,0 \pm 0,5$ КО/л), стабілізатори, активатори), калібрувальний розчин холестеролу з концентрацією $5,17 \pm 0,20$ ммоль/л.

Обладнання. Фотометричне обладнання, яке дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 600 нм, кювети товщиною 5 або 10 мм, термостат, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Аналіз проводять за схемою, наведеною в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

**Схема проведення дослідів з визначення
вмісту холестеролу ЛПНЩ у сироватці (плазмі) крові**

Відміряють у кювету	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба,	Холоста проба,
Розчин, що аналізується	0,024	—	—
Маскувальний реагент ЛПНЩ	2,400	2,400	2,400
Перемішують, витримують 5 хв при температурі 37 °С, вимірюють оптичну густину дослідної ($E_{\text{досл1}}$) і калібрувальної ($E_{\text{кал1}}$) проб проти холостої проби, додають:			
Реагент на холестерол ЛПНЩ	0,600	0,600	0,600
Калібрувальний розчин холестеролу	—	0,024	—
Розчин ретельно перемішують і витримують у термостаті при температурі 37 °С протягом 5 хв. Вимірюють оптичну густину дослідної ($E_{\text{досл2}}$) і калібрувальної ($E_{\text{кал2}}$) проб проти холостої проби.			

Розрахунок проводять за формулами:

$$1) \Delta E_{\text{досл}} = E_{\text{досл2}} - E_{\text{досл1}},$$

$$\Delta E_{\text{калібр}} = E_{\text{калібр2}} - E_{\text{калібр1}};$$

$$2) C = (\Delta E_{\text{досл}} / \Delta E_{\text{калібр}}) \times 5,17,$$

де C – концентрація холестеролу ЛПНЩ у дослідній пробі, ммоль/л;

$\Delta E_{\text{досл}}$ – різниця оптичних густин дослідної проби, од. оптич. густини;

$\Delta E_{\text{калібр}}$ – різниця оптичних густин калібрувальної проби, од. оптич. густини;

5,17 – концентрація калібрувального розчину холестеролу, ммоль/л.

Перерахунок величин: $\text{мг}\% \times 0,02585 = \text{ммоль/л}$.

Розрахунок вмісту холестеролу ЛПНЩ у дослідній пробі й отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

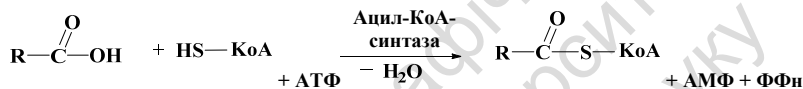
1. Чим різняться та чим схожі ліпопротеїни різних класів?
2. Як здійснюється метаболізм ліпопротеїнів в організмі людини?
3. Які ліпопротеїни належать до атерогенних?
4. У чому полягає принцип методу визначення вмісту холестеролу ліпопротеїнів високої та низької щільності у сироватці та плазмі крові прямим методом із використанням набору реактивів?
5. Які функції виконують білкові компоненти ліпопротеїнів?

ТЕМА 3. ОБМІН ЛІПІДІВ У ТКАНИНАХ

3.3.1. β -окиснення жирних кислот

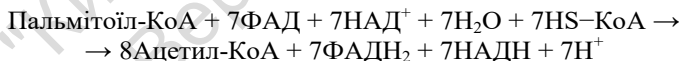
Вищі жирні кислоти, що вивільнюються, при ферментативному розщепленні екзогенних ліпідів у клітинах тканин метаболізуються шляхом їхнього окиснення за β -атомом вуглецю молекули жирної кислоти (β -окиснення).

Для насичених вищих жирних кислот із парним числом атомів вуглецю цей шлях починається у цитоплазмі клітин, де за участю *ацил-КоА-синтез* жирні кислоти активуються шляхом естерифікації з утворенням *ацил-КоА етерів*:



Потім активовані жирні кислоти за допомогою переносників (карнітину і транслокази) транспортуються крізь внутрішню мітохондріальну мембрану в матрикс, де і відбуваються реакції β -окиснення молекул ацил-КоА.

У результаті одного циклу β -окиснення з молекули жирної кислоти вивільнюється одна молекула ацетил-КоА і, відповідно, вихідна молекула вкорочується на два атоми вуглецю. Тому для повного розщеплення до ацетил-КоА будь-якої молекули насиченої жирної кислоти із парним числом атомів вуглецю $\text{C} = n$ необхідно $(n/2 - 1)$ циклів β -окиснення; при цьому утворюється $(n/2)$ молекул ацетил-КоА. Для пальмітинової кислоти ($\text{C} = 16$) сумарне рівняння має вигляд:



Окиснення ненасичених жирних кислот та жирних кислот із непарним числом атомів вуглецю відбувається за відмінними від цього механізмами.

Ацетил-КоА, що утворюється в процесі окиснення вищих жирних кислот, так саме, як і ацетил-КоА, утворений при окисненні глюкози (див. підрозд. 5.1.2), надходить до циклу трикарбонових кислот, де повністю окиснюється до двох молекул діоксиду вуглецю (див. підрозд. 5.1.3) Атоми водню, що відщеплюються при окисненні ацил-КоА і ацетил-КоА, у формі відновлених коферментів НАДН і

ФАДН₂ переносяться на дихальний ланцюг мітохондрій. За рахунок енергії, яка вивільнюється при перенесенні електронів від цих атомів водню по дихальному ланцюгу, за участю АТФ-синтази здійснюється фосфорилування АДФ з утворенням АТФ (див. підрозд. 5.2.3).

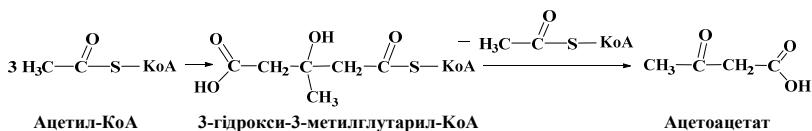
Більш високий ступінь відновлення атомів вуглецю в молекулах вищих жирних кислот порівняно з атомами вуглецю в молекулі глюкози (–CH₂–/–СНОН–) є причиною тому, що енергетичний вихід при окисненні жирних кислот, який оцінюється сумарною кількістю молекул АТФ при окисненні 1 г субстрату, удвічі перевищує цей показник при окисненні глюкози.

Частина ацетил-КоА, утвореного при β-окисненні жирних кислот, використовується на біосинтез холестеролу (відбувається головним чином у печінці) і його похідних – стероїдних гормонів, жовчних кислот тощо.

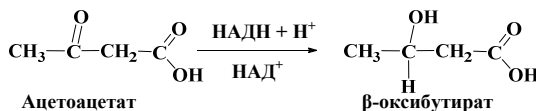
3.3.2. Утворення кетонових тіл

Характерною особливістю метаболізму ацетил-КоА в печінці є те, що частина ацетил-КоА, що утворюється при окисненні жирних кислот, перетворюється на *кетонові тіла* (ацетоацетат, β-оксибутират і ацетон) – альтернативне джерело метаболічної енергії. Кетонові тіла швидко надходять у кров і ефективно використовуються тканинами.

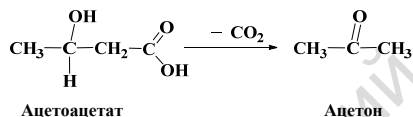
За нормальних умов більша частина ацетил-КоА, утвореного в організмі, використовується на процеси біосинтезу або стає субстратом циклу Кребса, унаслідок чого рівень генерації кетонових тіл є дуже низьким. Але за певних фізіологічних і патологічних станів (повне голодування, тяжка фізична праця, цукровий діабет тощо), що супроводжуються зменшенням внутрішньоклітинної концентрації другого субстрату циклу Кребса – оксалоацетату (через його використання на глюконеогенез) і, відповідно, гальмуванням швидкості циклу Кребса, значна кількість ацетил-КоА йде на утворення *ацетоацетату*:



За дії 3-гідроксибутиратдегідрогенази ацетоацетат відновлюється до β -оксибутирату:



У разі спонтанного неферментативного декарбоксилювання ацетоацетату утворюється ацетон:



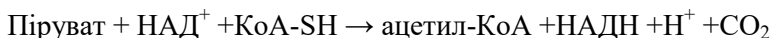
Ацетоацетат і β -оксибутират транспортуються кров'ю до інших тканин, де вони активуються, тобто перетворюються на ацетоацетил-КоА, який надалі розщеплюється на дві молекули ацетил-КоА.

У сечі людини в нормі кетонів тіла не виявляються, але при зростанні їхньої концентрації в крові (*кетонемія*), що має місце за наведених вище станів, кетонів тіла з'являються в сечі (*кетонурія*), і визначення їхнього вмісту в цій біологічній рідині стає важливим для діагностики кетозів (*кетоз* – збірний термін, під яким об'єднують кетонемію, кетонурію і таке порушення лужно-кислотної рівноваги, як *метаболічний кетоацидоз*).

3.3.3. Біосинтез насичених жирних кислот

Цей процес відбувається у *цитоплазмі* клітин (основна жирна кислота, яка утворюється в цитозолі – пальмітинова), а в *мітохондріях* і *ЕПР* здійснюється подовження вже синтезованих ланцюгів (тобто із пальмітинової кислоти або з жирних кислот екзогенного походження – тих, що надійшли з кишечника – утворюються С18-, С20- та С22-жирні кислоти). При цьому реакції синтезу вищих жирних кислот у мітохондріях є по суті зворотними реакціями процесу β -окиснення жирних кислот, а цитоплазматичний синтез (його ще звуть основним, або головним), навпаки, різко відрізняється від процесів окиснення.

Основою для синтезу вищих жирних кислот у цитоплазмі клітини є ацетил-КоА, який надходить із матриксу мітохондрій, де утворюється в реакції окисного декарбоксилювання пірувату під впливом мультиферментної системи – піруватдегідрогеназного комплексу (див. підрозд. 5.1.2):



Оскільки внутрішня мітохондріальна мембрана є непроникною для утвореного в мітохондріях ацетил-КоА, для його перенесення у цитоплазму використовується човникова система, яка передбачає взаємодію ацетил-КоА з оксалоацетатом, формування здатного перетинати мітохондріальну мембрану цитрату й розщеплення в цитозолі цитрату до оксалоацетату (який повертається до мітохондрії у вигляді малату із залученням іншої човникової системи) і цитозольного ацетил-КоА, котрий надходить у систему синтезу вищих жирних кислот.

Синтетаза жирних кислот – мультиферментний комплекс (6 ферментів і ацилпереносний білок (АПБ)), що здійснює наступні реакції синтезу вищих жирних кислот. АПБ має дві SH-групи (по одній від цистеїну й фосфопантотеїнового залишку, приєднаного до ОН-групи серину) і виконує функцію, аналогічну КоА – тобто перенесення ацильних груп.

Мононенасичені пальмітоолеїнова та олеїнова жирні кислоти синтезуються із пальмітинової та стеаринової кислот. Подвійний зв'язок утворюється в мікосомях клітин печінки і жирової тканини за участю цитохрому b5, молекулярного кисню, НАДФН та специфічної оксигенази. Поліненасичені жирні кислоти – лінолева, ліноленова – не синтезуються в організмі людини і мають надходити з їжею. Із лінолевої кислоти в організмі синтезується арахідонова кислота.

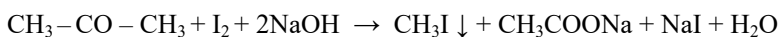
Надалі утворені вищі жирні кислоти у вигляді ацил-КоА використовуються на біосинтез інших ліпідів – триацилгліцеролів, гліцерофосфоліпідів, сфінгофосфоліпідів, сфінгогліколіпідів, ефірів холестеролу. Найпотужніше синтез цих сполук відбувається у печінці, жировій і нервовій тканинах.

Лабораторна робота № 3.6

Визначення кетонових тіл у сечі

Дослід 1. Проба Лібена на ацетон

При взаємодії ацетону з розчином йоду в лужному середовищі утворюється осад йодоформу, що має характерний запах:



Матеріали та реактиви. Сеча (до 100 мл сечі доливають 2 мл ацетону), 10%-й розчин NaOH, 10%-й розчин йоду в йодиді калію.

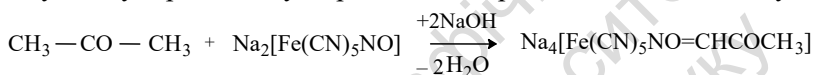
Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи. У пробірку вносять 2 мл сечі, додають 0,5 мл 10%-го розчину гідроксиду натрію і по краплях 10%-й розчин йоду в йодиді калію до слабо-жовтого забарвлення розчину. За наявності ацетону в сечі розчин стає каламутним унаслідок виділення жовтуватого кристалічного осаду йодоформу з характерним запахом. Присутність етанолу й ацетальдегіду в сечі заважає аналізу, оскільки йод також взаємодіє з цими сполуками з утворенням йодоформу.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 2. Проба Люголя на ацетон і ацетоацетат

У реакції між ацетоном і ацетоацетатом із нітропрусидом натрію в лужному середовищі утворюються забарвлені комплексні сполуки:



Матеріали та реактиви. Сеча, 10%-й розчин NaOH, 10%-й розчин нітропрусиду натрію, концентрована оцтова кислота.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи. У пробірку вносять 5 мл сечі, доливають 1 мл 10%-го розчину гідроксиду натрію, 1 мл 10%-го розчину нітропрусиду натрію і перемішують. За наявності в сечі ацетону або ацетоацетату розчин набуває рожево-червоного кольору, який переходить у темно-червоний після додавання в розчин 2 мл концентрованої оцтової кислоти.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 3. Проба Герхарда на ацетооцтову кислоту

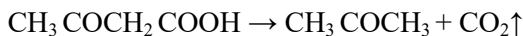
При взаємодії ацетоацетату з розчином хлориду заліза утворюється комплексна сполука, що забарвлює розчин у червоний колір.

Матеріали та реактиви. Сеча нормальна, сеча, яка містить ацетооцтову кислоту (у 100 мл сечі розчиняють, збовтуючи, 0,5 мл ацетооцтового ефіру), 10 %-й розчин FeCl₃.

Обладнання. Штатив із пробірками, крапельниці, піпетки, фільтрувальний папір, лійки для фільтрування.

Хід роботи. У пробірку з 5 мл сечі, що містить ацетооцтову кислоту, додають по краплях 10%-й розчин FeCl₃ до повного осадження фосфатів. Осад відфільтровують і до фільтрату додають

ще кілька крапель розчину хлориду заліза до появи винно-червоного забарвлення, яке поступово блідне і з часом зникає внаслідок спонтанного декарбоксилювання ацетooцтової кислоти:



Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 4. Проба на β-оксимасляну кислоту

У результаті окиснення пероксидом водню β-оксибутират здатний взаємодіяти з нітропрусидом натрію, утворюючи комплексні сполуки, які забарвлюють розчин у червоний колір.

Матеріали та реактиви. Сеча, концентрована оцтова кислота, 3%-й розчин H_2O_2 , 10%-й розчин нітропрусиду натрію, 25%-й розчин NH_4OH .

Обладнання. Колба хімічна термостійка, штатив із пробірками, газовий пальник, крапельниці, піпетки.

Хід роботи. У конічну колбу наливають 10 мл сечі, попередньо звільненої від ацетоацетату й ацетону, додають 10 мл води, підкидують кількома краплями оцтової кислоти і випаровують на водяній бані до половини об'єму. По 5 мл концентрованого розчину розливають у дві пробірки. До першої пробірки додають 1 мл 3%-го розчину пероксиду водню і обережно нагрівають для окиснення β-оксимасляної кислоти. Після охолодження розчину в обидві пробірки вносять по 10 крапель 10%-го розчину нітропрусиду натрію, енергійно струшують і нашаровують по 2 мл 25%-го розчину гідроксиду амонію. У пробірці, що містить сечу з β-оксибутиратом, через деякий час з'являється червоне кільце.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

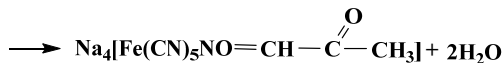
Дослід 5. Кількісне визначення кетонів тїл

Із сечею здорової людини виділяється 20–40 мг/добу кетонів тїл. Кетонурія спостерігається при цукровому діабеті, голодуванні, гіперпродукції гормонів-антагоністів інсуліну (кортикостероїдів, тироксину тощо). Зниження вмісту кетонів тїл у сечі клінічного значення не має.

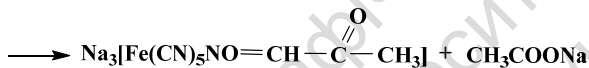
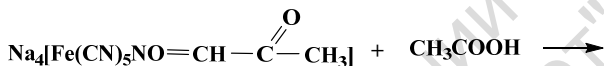
Ацетон має властивість утворювати фіолетове кільце у присутності нітропрусиду натрію ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) та концентрованої оцтової кислоти при нашаруванні аміаку.



Нітропрусид
натрію



Комплекс оранжево-червоного
кольору



Сполука червоно-фіолетового
або фіолетового кольору

Швидкість утворення кільця залежить від концентрації ацетону. Установлено, що поява кільця між 3 і 4 хв відповідає вмісту 0,0085 г/л ацетону.

Матеріали та реактиви. Сеча, 10%-й розчин нітропрусиду натрію, концентрована оцтова кислота, 10%-й розчин гідроксиду натрію, 50%-й розчин сульфату амонію, концентрований розчин аміаку.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи. Беруть 8 пробірок. В усі, крім першої, наливають по 1 мл дистильованої води. У першу та другу додають по 1 мл сечі. Отже, у першій пробірці сеча не розведена, а в другій – розведена у 2 рази. Із другої пробірки після перемішування відбирають 1 мл суміші і переносять у третю, із третьої – 1 мл суміші переносять у четверту і т. д. З останньої пробірки 1 мл суміші виливають для зрівнювання об'єму з іншими пробірками. Таким чином, сеча у пробірках, починаючи з другої, буде мати розведення у 2, 4, 8 і т.д. разів.

Потім у кожен пробірку додають по 8 крапель 50%-го сульфату амонію, по 8 крапель концентрованої оцтової кислоти й нітропрусиду натрію. Вміст пробірок перемішують і в кожен з них обережно по стінках, починаючи з останньої пробірки, на-

шаровують по 1 мл концентрованого аміаку (реактив відбирають обережно за допомогою гумової груші під витяжною шафою). Спостерігаючи за пробірками, відмічають ту з них, де при максимальному розведенні сечі між 3-ю і 4-ю хвилинами ще помітне фіолетове кільце на рідині.

Розрахунок здійснюють за формулою:

$$X = 0,85 \times a \times 15,$$

де X – концентрація ацетону в сечі (мг/добу);

0,85 – емпіричне число;

a – розведення сечі;

15 – перерахунок на добову сечу (1500 мл).

Розрахунок вмісту ацетону в сечі й отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які сполуки належать до кетонів тіл?
2. Який механізм β -окиснення насичених вищих жирних кислот із парним числом атомів вуглецю?
3. Про які стани може свідчити зростання вмісту кетонів тіл у крові й сечі?
4. У чому полягає принцип кількісного визначення вмісту кетонів тіл у сечі?
5. Як здійснюється синтез вищих жирних кислот?

ТЕМА 4. ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ

3.4.1. Активні форми кисню

Активні форми кисню (АФК) – збірний термін, що включає не лише радикали (супероксидний аніон ($O_2^{\bullet-}$), гідроксильний радикал ($HO^{\bullet}$) тощо), але й нерадикальні молекули з високою реакційною здатністю (зокрема, пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень, озон (O_3) тощо, які хоча й не є вільними радикалами, але легко спричиняють вільнорадикальні реакції в живому організмі.

Первинним окисником у реакціях метаболізму є O_2 ; у таких реакціях утворюється первинний радикал – супероксидний аніон. Джерелами утворення супероксиду в організмі є ензими (НАДФН-оксидаза, ліпоксигеназа й циклооксигеназа (ферменти обміну арахідонової кислоти), компоненти дихального ланцюга мітохондрій та електронотранспортувального ланцюга гладенького ЕПР, залучена в катаболізм пуринів ксантиноксидаза тощо) і такі неферментативні процеси, як аутоокиснення циклічних ненасичених сполук (катехоламінів, флавопротеїнів, гідрохінонів), глюкози та реакції глікування (взаємодії глюкози з протеїнами, ліпідами та нуклеїновими кислотами).

Більшість $O_2^{\bullet-}$ швидко перетворюється на H_2O_2 (спонтанно або за участю супероксиддисмутази) або сполучається з іншими реактивними молекулами, формуючи інші активні форми кисню. У присутності катіонів перехідних металів (реакція Фентона) або при взаємодії з пероксидом водню (реакція Хабера – Вейса) $O_2^{\bullet-}$ утворює високореактивні гідроксильні радикали $HO^{\bullet}$ (рис. 3.5).

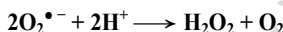
$HO^{\bullet}$ є одним із найтоксичніших радикалів відносно всіх типів біомолекул. Він спричиняє денатурацію білкових молекул, а окиснюючи SH-групи в їхньому складі, може викликати утворення між- і внутрішньомолекулярних зшивок, і, як наслідок, – агрегацію білків і (або) зміну їхньої третинної структури. Усе це веде до інактивації ферментів, порушення регуляторної, синте-

тичної, транспортної, структурної та інших функцій білків. Впливаючи на нуклеїнові кислоти, гідроксильний радикал руйнує водневі зв'язки між нуклеотидами і в т.ч. розриває ланцюги ДНК, що зумовлює мутації та загибель клітин або їхнє злоякісне переродження; сприяє окисненню основ, їхній модифікації.

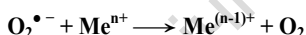
Відновлення молекулярного кисню до супероксидного радикала:



Дисмутація супероксидного радикала:



Реакція Фентона (у присутності перехідних металів):



Реакція Хабера – Вейса:

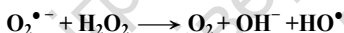


Рис. 3.5. Схема генерації в клітинах найважливіших активних форм кисню (Me – іон перехідного металу)

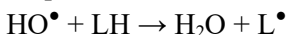
Діючи на ліпідні компоненти мембран, $\text{HO}^{\bullet}$ ініціює запуск реакцій *пероксидного окиснення ліпідів* (ПОЛ) із накопиченням ліпідних радикалів ($\text{L}^{\bullet}$), пероксидів ($\text{LOO}^{\bullet}$), гідропероксидів (LOOH), алкоксидів ($\text{LO}^{\bullet}$), які, у свою чергу, зумовлюють ушкодження мембран, порушення їх функцій і загибель клітин

3.4.2. Пероксидне окиснення ліпідів

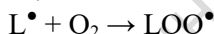
Активні форми кисню, що утворюються внаслідок метаболізму молекулярного кисню в клітинах, ініціюють вільнорадикальні ланцюгові реакції, які приводять до утворення вільних радикалів різних органічних макромолекул і, зокрема, ліпідів. Найчутливішими субстратами для вільнорадикальних реакцій є поліненасичені жирні кислоти, при окисненні яких утворюються перокси ($\text{ROO}^{\bullet}$) і гідроперокси (ROOH).

ПОЛ відбувається у чотири стадії: ініціація, продовження, розгалуження й обрив ланцюга.

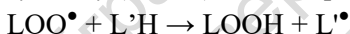
Ініціатором виступає $\text{HO}^\bullet$, який, будучи незарядженою малою часткою, вільно проникає у товщу гідрофобного ліпідного шару й вступає в хімічну взаємодію з поліненасиченими жирними кислотами у складі ліпідів (LH). При цьому в ліпідному бішарі утворюються *ліпідні радикали* $\text{L}^\bullet$:



$\text{L}^\bullet$ вступає в реакцію з розчиненим у водному середовищі молекулярним киснем – при цьому утворюється новий вільний радикал – *радикал ліпопероксиду* $\text{LOO}^\bullet$:



Продовження ланцюгової реакції полягає в тому, що радикал $\text{LOO}^\bullet$ атакує одну із сусідніх молекул фосфоліпиду ($\text{L}'\text{H}$) з утворенням *гідро пероксиду ліпиду* (LOOH) і *нового радикала* $\text{L}'^\bullet$:

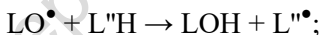


Чергування двох останніх реакцій і є *ланцюговою реакцією ПОЛ*.

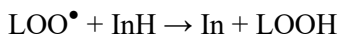
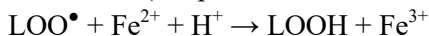
Розгалуження ланцюга потребує наявності невеликої кількості Fe^{2+} – тоді відбувається розгалуження ланцюгів через взаємодію Fe^{2+} із гідропероксидами ліпідів (реакція Фентона, див. підрозд. 3.4.1):



Утворені *алкоксильні радикали* $\text{LO}^\bullet$ ініціюють нові ланцюги окиснення ліпідів:



У біологічних мембранах ланцюги можуть мати понад 10 ланок. Але врешті-решт ланцюг обривається через взаємодію вільних радикалів з антиоксидантами (InH), іонами металів змінної валентності (наприклад, тими ж Fe^{2+}) або один з одним:



(ця реакція супроводжується світінням (хемілюмінесценцією)).

Основні реактивні продукти, утворені в процесі ПОЛ, можна віднести до одного з наступних трьох класів: *пероксили ліпідів* (наприклад, 13-гідроксиоктадекадієнова кислота), *реактивні ліпіди з електрофільними властивостями* (наприклад, 4-гідроксиноненаль, що поряд із малоновим діальдегідом є маркером ПОЛ) і *рецепторні агоністи* (зокрема, нітроліноленова кислота й лізофосфатидилхолін) (рис. 3.6).

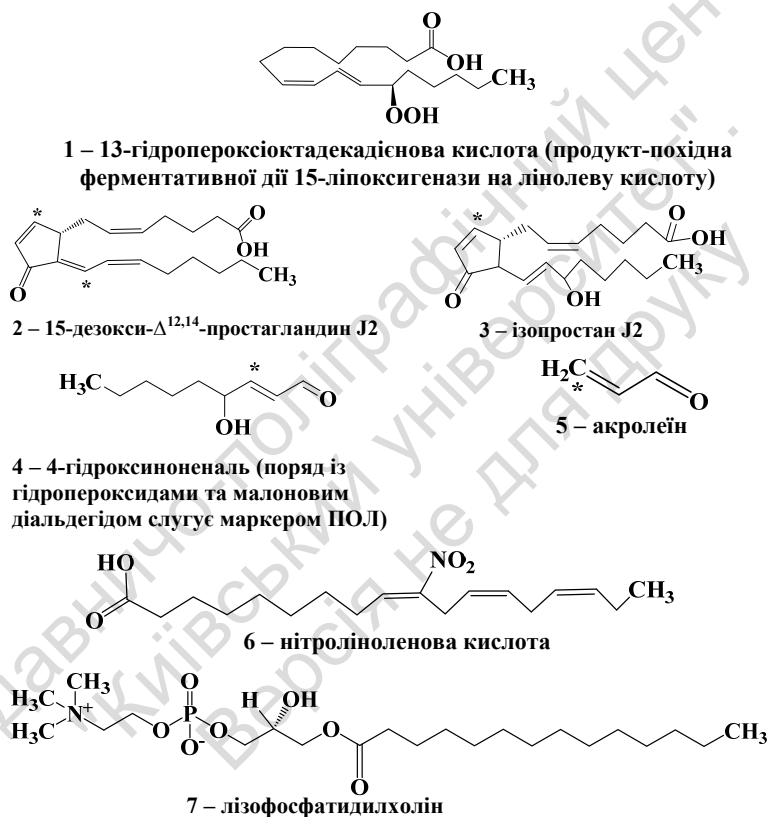


Рис. 3.6. Основні продукти пероксидного окиснення ліпідів

Продукти ПОЛ можуть формувати похідні з неліпідними сполуками – білками й ДНК, мають пряму токсичність (наприклад, 4-гідроксиноненаль), спричиняють порушення мембрано-асоційованих сигнальних шляхів, ушкодження ДНК та мутагенез.

За різноманітних фізіологічних і особливо патологічних станів має місце активація продукції активних форм кисню у клітинах тканин, зростання вільнорадикальних реакцій і, як наслідок, посилення ПОЛ. У разі недостатньої протидії з боку клітинних механізмів антиоксидантного захисту це призводить, у першу чергу, до порушень структури й функцій біомембран: зростанню їхньої проникності для води й іонів Na^+ і Ca^{2+} , набуханню й деградації клітинних органел і клітин тощо.

Стан процесів пероксидного окиснення ліпідів у тканинах тварин і людини оцінюють за накопиченням проміжних і кінцевих продуктів ПОЛ: пероксидів і гідропероксидів (на початкових етапах), малонового діальдегіду (на подальших етапах) і основ Шиффа (сполук, що утворюються при взаємодії малонового діальдегіду з вільними аміногрупами біологічних молекул) як кінцевих продуктів ПОЛ.

3.4.3. Антиоксидантні системи

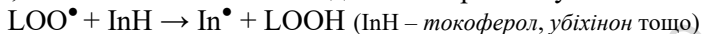
Загальна класифікація компонентів антиоксидантного захисту організму наведена на рис 3.7.

Деякі речовини, що належать до групи **неферментативних антиоксидантів**, мають рухливий атом водню і тому реагують з вільними радикалами і каталізаторами вільнорадикального окиснення (наприклад, іонами перехідних металів).



Рис. 3.7. Класифікація компонентів антиоксидантного захисту

Рухливість атома Н зумовлена нестійким зв'язком між атомами С–Н і S–H. У результаті виникають малоактивні радикали самого антиоксиданту, що нездатні до продовження ланцюгової реакції, є малоактивними й виводяться із організму:



Накопичення радикалів антиоксидантів у клітині небажане. У ряді випадків антиоксиданти не обривають, а уповільнюють ланцюгову реакцію. Такий антиоксидантний захист спрямований проти всіх видів радикалів, що утворюються у клітині.

Інші неферментативні антиоксиданти, наприклад *аскорбінова* та *ліпоєва кислоти*, можуть існувати в різних редокс-формах – при взаємодії з окисником вони переходять із відновленого стану в окиснений; для регенерації вихідної форми цих сполук необхідна активність відповідних ферментів (рис. 3.8).

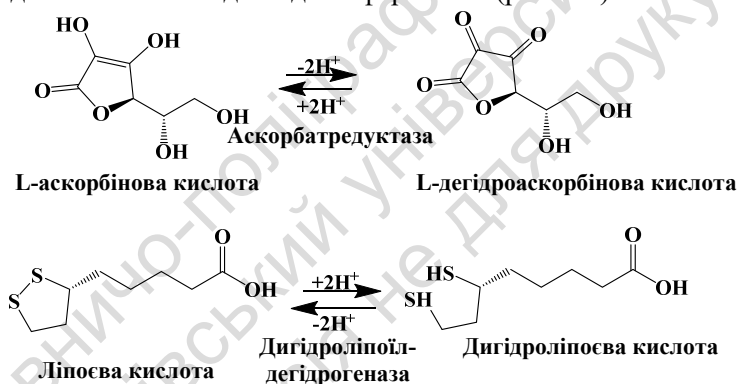


Рис. 3.8. Схема редокс-властивостей аскорбінової та ліпоєвої кислот

Найважливішою ланкою неферментативної антиоксидантної системи організму є і *хелатні сполуки* – феритин, гемосидерин, трансферин, сечова кислота та інші, що здатні зв'язувати іони металів перехідної валентності і таким чином нейтралізувати основні каталізатори вільнорадикального окиснення в організмі.

Жиророзчинні неферментативні антиоксиданти (наприклад, вітамін Е, вітамін А та каротиноїди, убихінон, естрогени) діють на рівні біологічних мембран, а водорозчинні (вітамін С, глута-

тіон, ліпоєва кислота, біофлавоноїди, трансферин, лактоферин, феритин, сечовина) – у цитоплазмі клітин, міжклітинній рідині, у плазмі крові та в лімфі.

В антиоксидантній системі особливо важливою є роль *глутатіону* – трипептиду (*L-γ-глутаміл-L-цистеїніл-L-гліцин*), який у клітині існує у 2-х формах (рис. 3.9):

- *відновлена* (GSH)
- *окиснена* (GS-SG, або глутатіондисульфід)

Крім залучення в роботу антиоксидантних систем клітин, глутатіон має цілу низку інших функцій в організмі. Так, він здійснює відновлення та ізомеризацію зв'язків $-S-S-$, через що впливає на активність ферментів (адже низка ферментів, наприклад аденілатциклаза, глюкозо-6-фосфатаза, піруваткіназа, Ca^{2+} -АТФаза, регулюються окисненням їхніх SH-груп).

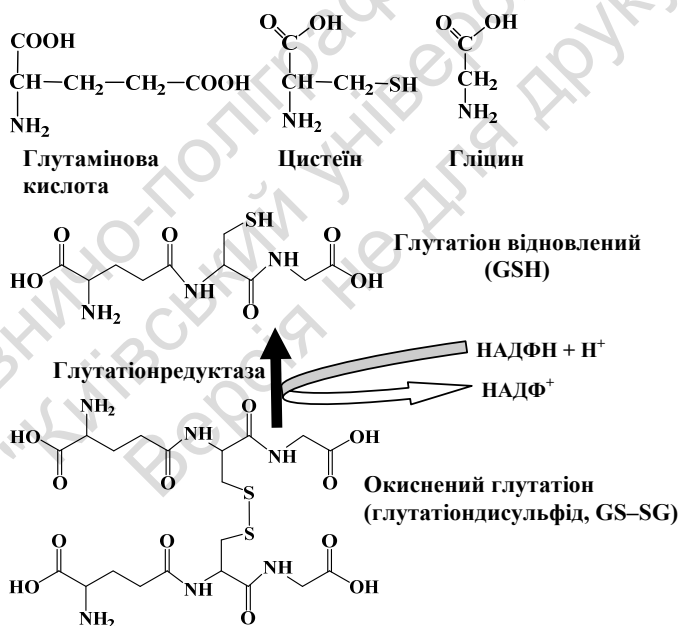
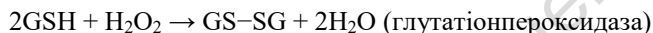
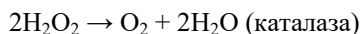


Рис. 3.9. Структурні формули амінокислот – складових глутатіону, відновленого й окисненого глутатіону

Ферментативні антиоксиданти класифікують у чотири рівні захисту клітини від дії активних форм кисню (рис. 3.10).

Першу лінію захисту клітин від дії ROS здійснює металофермент *супероксиддисмутаза* (СОД), що перетворює $O_2^{\cdot-}$ на H_2O_2 і O_2 .

Друга лінія захисту залучає кілька ферментів – *каталазу*, *глутатіонпероксидазу* і *пероксиредоксини*:



На третій лінії ферментативного антиоксидантного захисту здійснюється відновлення органічних гідропероксидів:

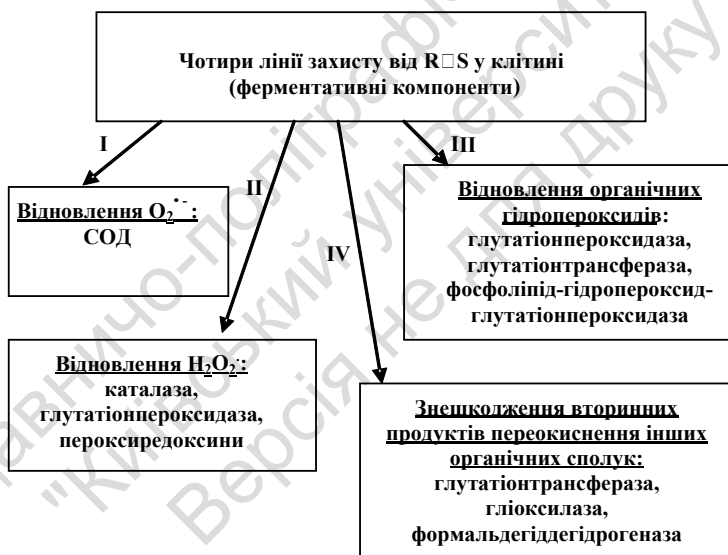


Рис. 3.10. Ферментативні антиоксиданти: чотири лінії захисту

Цю реакцію можуть каталізувати два ферменти – *глутатіонпероксидаза* і *глутатіонтрансфераза*. Остання, на відміну від глутатіонпероксидази, не здатна впливати на перексид водню, і відновлює лише ROOH.

Отже, три перші лінії захисту зменшують або навіть запобігають прогресуванню ПОЛ та окисній модифікації нуклеїнових кислот і білків, тоді як четверта лінія захисту необхідна для знешкодження вторинних метаболітів окисної модифікації. Зокрема, *глутатіонтрансфераза* кон'югує з відновленим глутатіоном низку окиснених сполук, у тому числі основні продукти ПОЛ – 4-гідроксіалкени та шкідливі епоксиди, а *альдегіддегідрогеназа* окиснює малоновий діальдегід.

Допоміжним ферментом трьох останніх ліній є *глутатіонредуктаза*, що регенерує GSH із GS-SG шляхом НАДФН-залежного відновлення:



Особливе значення в роботі антиоксидантної системи організму належить білкам *тіоредоксину* і *глутаредоксину*, які залучаються у відновлення внутрішньомолекулярних (P-S₂) і міжмолекулярних (PS-SP') дисульфідів. Ці білки в активному центрі містять два залишки цистеїну і тому можуть існувати у двох редокс-формах – окисненій (-S-S-) і відновленій (2SH-).

2SH-форми, взаємодіючи з дисульфідами, відновлюють їх до вільних тіолових груп, а самі при цьому переходять у -S-S- форми, які відновлюються до вихідного стану (2SH) за допомогою тіоредоксинредуктази й коферментів ФАДН₂ та НАДФН (для тіоредоксину, рис. 3.11) або відновленого глутатіону, глутатіонредуктази й НАДФН (для глутаредоксину). НАДФН для цих реакцій постачається пентозофосфатним шляхом.

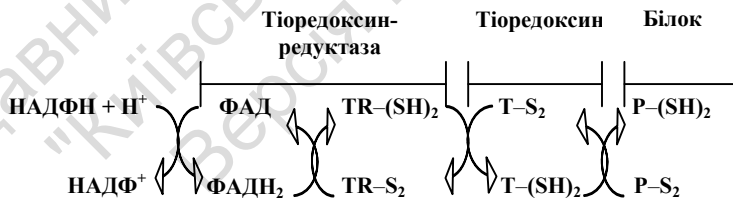


Рис. 3.11. Схема механізму відновлення дисульфідних зв'язків за участю системи тіоредоксину

Надійність антиоксидантної системи оцінюють за активністю супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, за вмістом відновленого і окисненого глутатіону, аскорбінової кислоти, ретинолу, токоферолу, вітаміну F, церулоплазміну тощо.

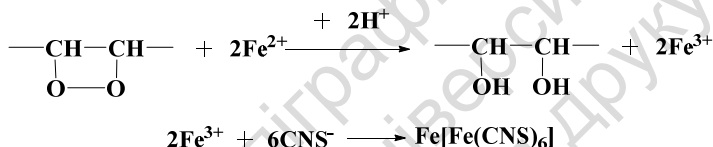
Лабораторна робота № 3.7

Визначення продуктів пер оксидного окиснення ліпідів у тканинах

Дослід 1. Визначення гідропероксидів ліпідів

Гідропероксиди ліпідів – первинні продукти ПОЛ є нестійкими і швидко руйнуються з утворенням альдегідів (у т.ч. й МДА), спиртів, кетонів і епоксидів – вторинних продуктів ПОЛ. Вміст гідропероксидів ліпідів характеризує ступінь впливу різних чинників на організм, у тому числі токсичних, і тому є важливим показником ліпопероксидаційних процесів.

Метод ґрунтується на здатності гідропероксидів ліпідів окиснювати Fe^{2+} до Fe^{3+} , який виявляється реакцією з тіоціанатом амонію:



Матеріали та реактиви. Ізольована печінка щура, льодяний 25 мМ розчин трис- HCl буфера (pH 7,4), що містить 0,175 М KCl , трис- HCl буфер (pH 7,4), 20 мМ розчин FeSO_4 , 50%-й розчин ТХО, 96%-й етанол, концентрована HCl , 25%-й розчин солі Мора $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2]$ у 3%-му розчині HCl , 20%-й розчин тіоціанату амонію (перекристалізованого).

Обладнання. Чашка Петрі, ножиці, пінцет, скляний гомогенізатор Поттера, центрифужні пробірки, центрифуга (600–4 000 g), рефрижераторна центрифуга (14000 g), льодяна баня, термостат, годинник, колби ємністю 50 мл, спектрофотометр для вимірювання довжини хвилі 480 нм, кювети 10 мм завтовшки.

Хід роботи. Ізольовану печінку щура двічі промивають холодним (0–2 °C) 25 мМ розчином трис- HCl буфера (pH 7,4), що містить 0,175 М KCl , швидко подрібнюють у чашці Петрі на льоду і знову двічі промивають льодяним буфером. Промиту подрібнену тканину гомогенізують у скляному гомогенізаторі Поттера в 15 мл буфера протягом 30 с. До гомогенату додають ще 25 мл буфера, перемішують, переносять у центрифужні пробірки і центрифугують 10 хв при 600 g (при 0 °C).

Після осадження ядерної фракції надосадову рідину двічі центрифугують при 14000 g протягом 10 хв у рефрижераторній центрифугі (при 0–4 °C). Осад мітохондріальної фракції ресуспендують у 10 мл трис-НCl буфера (pH 7,4) і залишають на льоду.

Отриману суспензію мітохондрій розливають по 2 мл у п'ять центрифужних пробірок і для стимулювання пероксидного окиснення ліпідів іонами Fe^{2+} у кожену вносять по 0,1 мл 20 мМ розчину FeSO_4 . Проби перемішують, першу пробірку залишають на льоду, інші ставлять у термостат при 37 °C. У першу пробу одразу, в другу, третю, четверту і п'яту відповідно через 5, 10, 15, 20 хв інкубації додають по 0,2 мл 50%-го розчину ТХО. Проби перемішують і осад білка відокремлюють центрифугуванням при 4000 g протягом 10 хв. По 2 мл надосадової рідини переносять у колби ємністю 50 мл, доливають по 25 мл 96%-го етанолу, 0,2 мл концентрованої HCl, 0,025 мл 25%-го розчину солі Мора $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2]$ в 3%-му розчині HCl і струшують протягом 30 с. Одразу після цього додають по 1 мл 20%-го розчину тіоціанату амонію (перекристалізованого) і малинове забарвлення розчинів, що з'являється, фотометрують, вимірюючи екстинкцію досліджуваних проб при $\lambda = 480$ нм у кюветі товщиною 1 см відносно контрольної проби, в котру замість надосадової рідини додають 96%-й етанол.

Відносний вміст гідропероксидів ліпідів у мітохондріальній фракції клітин печінки оцінюють за результатом вимірювання екстинкції досліджуваних розчинів і виражають в одиницях оптичної густини /1 г тканини.

Отриманий результат відносного вмісту гідропероксидів ліпідів у мітохондріальній фракції клітин печінки записують у зошит.

Дослід 2. Визначення малонового діальдегіду

Метод базується на реакції малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою, у якій за умов високої температури в кислому середовищі утворюється забарвлений триметиновий комплекс із молярним коефіцієнтом екстинкції $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

Матеріали та реактиви. Суспензія мітохондрій, отримана в попередньому досліді, 25 мМ розчин FeSO_4 , 250 мМ розчин FeSO_4 , 2,5 М розчин FeSO_4 , 17%-й розчин ТХО, 0,8%-й розчин 2-тіобарбітурової кислоти, буферний трис-НCl розчин, pH 7,4.

Обладнання. Центрифужні пробірки, термостат, годинник, центрифуга (4 000 g), рефрижераторна центрифуга (14 000 g), штатив із пробірками, кипляча водяна баня, колби ємністю 50 мл, спектрофотометр для вимірювання довжини хвилі 532 нм, кювети 10 мм завтовшки.

Хід роботи. У чотири центрифужні пробірки вносять по 2,5 мл суспензії мітохондрій, отриманої в попередньому досліді. У першу з них додають 0,1 мл води, у другу – 0,1 мл 25 мМ розчин FeSO_4 , у третю – 0,1 мл 250 мМ розчин FeSO_4 , у четверту – 0,1 мл 2,5 М розчин FeSO_4 . Проби витримують в термостаті при 37°C протягом 30 хв, інкубацію закінчують додаванням у кожну з них по 1 мл 17%-го розчину ТХО. Осад білка, що утворюється при цьому, відокремлюють центрифугуванням при 4000 g протягом 10 хв. По 2 мл надосадової рідини вносять у пробірки, додають по 1 мл 0,8%-го розчину 2-тіобарбітурової кислоти й нагрівають 10 хв на киплячій водяній бані.

Після забарвлення розчинів у рожевий колір проби охолоджують до кімнатної температури й фотометрують при $\lambda = 532 \text{ нм}$ у кюветі товщиною 1 см відносно контрольної проби, яка замість надосадової рідини містить буферний трис- HCl розчин, $\text{pH } 7,4$.

Концентрацію малонового діальдегіду у пробах (C) розраховують за даними їхньої екстинкції при 532 нм та величиною молярного коефіцієнта екстинкції за формулою:

$$C = \frac{E}{\epsilon \times d},$$

E – екстинція;

ϵ – молярний коефіцієнт екстинкції ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$);

d – товщина кювети у см.

Розрахунок вмісту малонового діальдегіду в мітохондріальній фракції клітин печінки й отриманий результат (у нмолях) записують у зошит.

Лабораторна робота № 3.8

Визначення супероксиддисмутази активності в біологічному матеріалі

Супероксиддисмутаза – компонент ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту, що здійснює нейтралізацію супероксид-аніона та запобігає його перетворенню на гідроксильний радикал та інші активні форми кисню. Про активність ферменту свідчить його здатність інгібувати відновлення нітротетразолію синього за присутності НАДН.

Матеріали та реактиви. Плазма крові, гомогенат печінки, хлороформ, етиловий спирт, 0,1 М фосфатний буфер ($\text{pH } 8,3$), нітротетразолій синій, феназинметасульфат, 0,2 М розчин НАДН.

Обладнання. Центрифуга, спектрофотометр, піпетки, мікропіпетки, центрифужні пробірки, спектрофотометр, кювети 10 мм завтовшки.

Хід роботи. У центрифужні пробірки наливають по 1 мл 10%-го гомогенату печінки у фосфатному буфері (рН 7,4) або плазми крові. Додають по 0,5 мл хлороформоспиртової суміші (співвідношення 1:2) і 300 мг дигідрофосфату калію. Осаджений білок відцентрифугуюють за швидкості 1200 об/хв протягом 15 хв при температурі 4 °С. Активність ферменту визначають у безбілковій надосадовій рідині (супернатанті). До 0,2 мл супернатанту (у контрольній пробі – 0,2 мл фосфатного буфера) додають 1,3 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,3), 1 мл розчину тетразолію синього (200 мкг/мл), 0,3 мл розчину феназинметасульфату (69 мкг/мл) і 2 мл 0,2 М розчину НАДН. Проби витримують у темряві протягом 10 хв і фотометрують на спектрофотометрі за довжини хвилі 540 нм проти контрольної пробі.

Відсоток інгібування редукції нітротетразолію синього визначають за формулою:

$$\frac{(E_{\text{контр}} - E_{\text{досл}}) \times 1/2}{E_{\text{контр}}} \times 100\%,$$

де $E_{\text{контр}}$ – екстинція контрольної пробі,

$E_{\text{досл}}$ – екстинція дослідної пробі,

Кількість ферменту, здатного інгібувати відновлення нітротетразолію синього на 50%, беруть за одну умовну одиницю активності.

Лабораторна робота № 3.9

Визначення каталазної активності сироватки крові

Каталаза – компонент ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту, що здійснює нейтралізацію пероксиду водню й запобігає його перетворенню на гідроксильний радикал та інші активні форми кисню.

Метод визначення каталазної активності ґрунтується на здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс.

Матеріали та реактиви. 4%-й розчин молібдату амонію, 0,03%-й розчин пероксиду водню.

Обладнання. Спектрофотометр, пробірки, штативи для пробірок, піпетки, дозатор на 100 мкдм³.

Хід роботи. 0,1 мл сироватки крові переносять у скляну пробір-ку. У другу пробірку (холоста проба) вносять 0,1 мл дистильованої води. В обидві пробірки додають 2 мл 0,03%-го розчину пероксиду водню. Через 10 хв зупиняють реакцію шляхом додавання до вмі-сту пробірок 1 мл 4%-го розчину молібдату амонію. Для вимірю-вання інтенсивності забарвлення комплексу проби розмішують у кюветі товщиною 1 см і вимірюють інтенсивність забарвлення до-слідної ($E_{\text{досл}}$) й холостої ($E_{\text{хол}}$) проб проти контролю, що містить замість пероксиду водню 2 мл дистильованої води.

Каталазну активність (мкат/л) розраховують за формулою:

$$A = (E_{\text{хол}} - E_{\text{досл}}) \times V \times t \times k,$$

де A – каталазна активність;

V – об'єм проби (0,1 мл);

t – час у секундах (10 хв = 600 с);

k – коефіцієнт екстинції ($22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$).

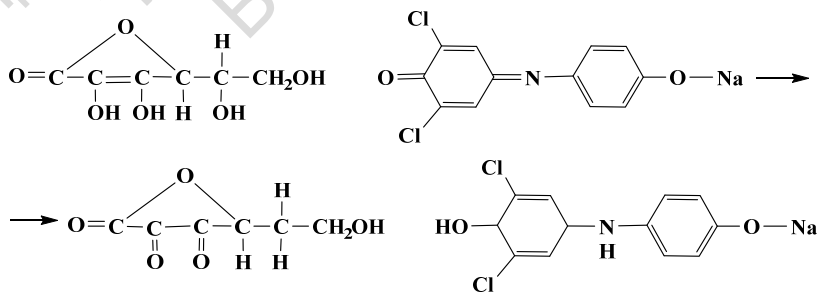
Розрахунок каталазної активності сироватки крові та отрима-ний результат записують у зошит.

Лабораторна робота № 3.10

Проба Ратнера (лінгвальна проба)

на вміст в організмі вітаміну С

Натрієва сіль 2,6-дихлорфеноліндофенолу в лужному середо-вищі дає синє забарвлення. Після відновлення барвника аскорбі-новою кислотою він перетворюється на безбарвну сполуку – лейкоформу 2,6-дихлорфеноліндофенолу (гідрохіноїдна форма).



Матеріали та реактиви. 0,6%-й розчин реактиву Тільманса (2,6-дихлорфеноліндофенол).

Обладнання. Голка, годинник.

Хід роботи. На кінчик язика тонкою голкою наносять невелику кількість 0,6%-го розчину реактиву Тільманса (2,6-дихлорфеноліндофенол) і спостерігають за знебарвленням барвника. У нормі час знебарвлення розчину становить 25–35 с. Більш тривалий час знебарвлення свідчить про недостатність в організмі вітаміну С.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які сполуки належать до активних форм кисню?
2. Який механізм генерування у організмі гідроксильних радикалів? У чому полягає його шкідливість?
3. Перерахувати етапи пероксидного окиснення ліпідів і назвати реактивні радикали, що утворюються на кожному етапі.
4. Які сполуки є продуктами пероксидного окиснення ліпідів? Які з них використовуються як маркери інтенсивності ПОЛ?
5. Які механізми дії неферментативних антиоксидантів?

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДО РОЗДІЛУ III

Завдання 1

Які продукти утворюються при повному гідролізі перерахованих ліпідів? Знайдіть відповідність цифр та літер:

- 1) фосфатидилхолін;
- 2) сфінгомієлін;
- 3) нейтральні жири;
- 4) воски;
- 5) цереброзиди.

- а) гліцерин + жирні кислоти;
- б) високомолекулярний спирт + жирна кислота;
- в) сфінгозин + жирна кислота + простий цукор;
- г) сфінгозин + жирна кислота + H_3PO_4 + холін;
- д) гліцерин + жирна кислота + H_3PO_4 + холін.

Завдання 2

Підберіть до кожного ліпиду та їхніх похідних відповідну функцію:

- 1) триацилгліцерили;
- 2) жирні кислоти;
- 3) сфінгомієліни;
- 4) простагландини;
- 5) таурохолева кислота;
- 6) вітамін Е;
- 7) вітамін К.

- а) джерело енергії, структурні компоненти інших ліпідів;
- б) запасна форма джерела енергії;
- в) структурний компонент мембран;
- г) регулятори тонуусу гладкої мускулатури;
- д) антигеморагічний фактор;
- е) емульгатор;
- ж) антиоксидант.

Завдання 3

Попередником у біосинтезі простагландинів є жирна кислота:

- 1) пальмітинова;
- 2) міристинова;
- 3) арахідонова;
- 4) стеаринова;
- 5) ліолева.

Завдання 4

Які з перерахованих процесів відбуваються за участю жовчних кислот:

- 1) емульгування жиру;
- 2) підвищення активності триацилгліцеролліпази;
- 3) всмоктування жовчних кислот і холестерину;
- 4) всмоктування гліцерину;
- 5) підвищення активності ліпогліцеролліпази.

Завдання 5

Один цикл β -окиснення жирних кислот включає 4 послідовні реакції. Оберіть вірну послідовність їхнього проходження:

- 1) окиснення, дегідратація, окиснення, розщеплення;
- 2) відновлення, гідратація, дегідрування, розщеплення;
- 3) дегідрування, гідратація, дегідрування, розщеплення.

Завдання 6

Скільки молекул ацетил-КоА утвориться за повного розщеплення шляхом β -окиснення пальмітинової кислоти?

- | | |
|------|------|
| 1) 2 | 4) 8 |
| 2) 7 | 5) 9 |
| 3) 6 | 6) 5 |

Завдання 7

Безпосередня недостатність якої сполуки при цукровому діабеті та голодуванні спричиняє посилене утворення кетонів тіл?

- | | |
|---------------------------|-----------------|
| 1) цитрат | 4) оксалоацетат |
| 2) малат | 5) ацетил-КоА |
| 3) α -кетоглутарат | 6) ацетон |

Завдання 8

Методи визначення яких сполук ґрунтуються на утворенні їхніх комплексів із полісахаридом гепарином, які надалі осаджуються із сироватки крові у присутності хлоридів кальцію і магнію?

- | | |
|-------------------------|------------------------|
| 1) малоновий діальдегід | 4) супероксиддисмутаза |
| 2) холестерол | 5) ліпопротеїни |
| 3) кетонів тіла | 6) гідропероксиди |

Завдання 9

На якій стадії процесу ПОЛ відбувається утворення алкоксильного радикала?

- 1) ініціація
- 2) продовження
- 3) розгалуження
- 4) обрив ланцюга

Завдання 10

Які ферментативні антиоксиданти здатні знешкоджувати пероксид водню?

- | | |
|-------------------------|------------------------|
| 1) супероксиддисмутаза | 5) пероксиредоксини |
| 2) глутатіонпероксидаза | 6) аскорбінова кислота |
| 3) глутатіон | 7) тіоредоксин |
| 4) каталаза | |

Розділ 4. ОБМІН НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

ТЕМА 1. ОБМІН НУКЛЕОПРОТЕЇНІВ І НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ У ШЛУНКОВО-КИШКОВОМУ ТРАКТІ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

В організмі зазнають розщеплення як внутрішньоклітинні нуклеїнові кислоти, так і нуклеїнові кислоти, що надходять в організм з їжею. Ферменти, які здійснюють розщеплення нуклеїнових кислот, називаються *нуклеазами*. Вони розщеплюють фосфодієфірні ланцюги між нуклеозидмонофосфатами в полінуклеотидних ланцюгах нуклеїнових кислот. Нуклеази відіграють важливу роль у регуляції синтезу й розпаду нуклеїнових кислот у клітинах, у процесах, пов'язаних з реплікацією і репарацією ДНК, у посттранскрипційних модифікаціях РНК, видаленні чужорідних нуклеїнових кислот у клітинах, а також у перетравлюванні у травному тракті екзогенних нуклеїнових кислот.

4.1.1. Ферменти розпаду нуклеїнових кислот

Ендонуклеази розщеплюють фосфодієфірні зв'язки в будь-якому місці полінуклеотидного ланцюга молекул РНК і ДНК, унаслідок чого він розпадається на фрагменти – олігонуклеотиди. *Екзонуклеази* атакують полінуклеотидний ланцюг тільки з кінців, відщеплюючи від нього кінцеві мононуклеотиди.

Існують нуклеази, які атакують одно- чи дволанцюгові молекули нуклеїнових кислот, або такі, що впізнають пуринові чи піримідинові азотисті основи у складі мононуклеотидів.

Ендонуклеази є специфічними до певного типу нуклеїнових кислот і поділяються на дезоксирибонуклеази (*ДНКаз*) і рибонуклеази (*РНКаз*). Залежно від розриву різних фосфодієфірних зв'язків ДНКаз і РНКаз поділяються на ДНКаз I, II тощо, РНКаз I, II та ін. Наприклад, ДНКаз I з підшлункової залози бика каталізує гідроліз зв'язків класу *a* між сусідніми пуриновим і піримідиновим нуклеотидами.

Рестриктази – ферменти ДНКазного типу дії, які каталізують розщеплення чужерідної ДНК, наприклад фагової, у строго визначених ділянках молекули, тобто є високоспецифічними. У біохімічних

дослідженнях і в молекулярній біології рестриктази застосовують для розшифровування послідовності нуклеотидних залишків у ДНК фагів і вірусів, а в генетичній інженерії – для "вирізання" певних фрагментів ДНК і вбудовування в їхній геном бактеріальної ДНК.

У реакціях відщеплення модифікованих пуринових і піримідинових основ беруть участь *ДНК-глікозидази*. Вони важливі також у процесах репарації.

Ферменти *нуклеотидази* каталізують розщеплення мононуклеотидів до нуклеозидів шляхом відщеплення неорганічного фосфату від 3'- або 5'-атомів вуглеводного залишку, а *нуклеозидази* здійснюють перенесення залишку рибози від нуклеозиду на вільну фосфорну кислоту з утворенням вільної азотистої основи і рибозо-1-фосфату.

4.1.2. Загальні принципи обміну нуклеопротейдів і нуклеїнових кислот у шлунково-кишковому тракті

У шлунку під впливом соляної кислоти та пепсину нуклеопротейни розщеплюються до нуклеїнових кислот і білків. Білки в тонкому кишечнику під впливом трипсину, хімотрипсину і пептидаз гідролізуються до амінокислот, які всмоктуються слизовою оболонкою тонкого кишечника (див. підрозд. 1.1.1, 1.1.2).

Нуклеїнові кислоти розщеплюються у дванадцятипалій кишці ендонуклеазами, які секретуються у складі соку підшлункової залози. *Панкреатична рибонуклеаза* (РНКаза) гідролізує тільки РНК, видаляючи з 3'-кінця піримідинові мононуклеотиди й олігонуклеотиди, 3'-ОН група яких має фосфатну групу. *Панкреатична ДНКаза II* видаляє з ДНК мононуклеотиди, фосфорильовані у 3'-положенні, активність ферменту залежить від іонів Mg^{2+} .

Олігонуклеотиди – продукти розпаду ДНК чи РНК – далі розщеплюються до 3'- і 5'-мононуклеотидів за дії *фосфодіестераз*, які, зокрема, секретуються підшлунковою залозою. За участю *фосфатаз* від мононуклеотидів відщеплюються фосфатні групи, унаслідок чого утворюються нуклеозиди. Ці сполуки гідролізуються *нуклеозидазами* до азотистих основ та рибози (чи дезоксирибози).

Кінцеві продукти – вільні пуринові й піримідинові основи, пентози і фосфорна кислота – усмоктуються в кишечнику у кров. Азотисті основи використовуються на біосинтез нуклеотидів або підлягають подальшому розпаду; фосфорна кислота йде на процеси обміну речовин та енергії; пентози – на біосинтез нуклеозидів і нуклеотидів.

Для визначення активності нуклеаз застосовується цілий ряд методичних прийомів. Наприклад, про активність як ДНКази, так і РНКази можна судити за утворенням продуктів розпаду – олігонуклеотидних фрагментів, кількість яких установлюється за їхніми складовими компонентами (фосфорним або вуглеводним). Існуючі спектрофотометричні методи визначення активності нуклеаз базуються на вимірюванні поглинання нуклеотидів у низькомолекулярних фрагментах ДНК чи РНК, утворених за дії нуклеази.

Лабораторна робота № 4.1

Визначення активності рибонуклеази за кислоторозчинними продуктами розпаду РНК методом Шнейдера і Хогебума

Активність РНКази в цьому методі визначається шляхом вимірювання екстинкції розчину продуктів ферментативного розпаду РНК. Таким чином можна виміряти активність РНКази в гомогенаті тваринної тканини.

Матеріали та методи. 0,02 М розчин сукцинатного буфера (рН = 5,0), тканинний гомогенат у сукцинатному буфері (у співвідношенні 1 : 10), розчин РНК (0,2 мг), 0,1 н. розчин сульфату магнію, 12%-й розчин хлорної кислоти.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, термостат, годинник, центрифужні пробірки, центрифуга, фотометричне обладнання (довжина хвилі 260 нм), кювети 5 або 10 мм завтовшки.

Хід роботи

1. До 0,4 мл 0,02 М розчину сукцинатного буфера (рН = 5,0) додають 0,3 мл тканинного гомогенату у тому самому буфері (у співвідношенні 1 : 10), 0,2 мл розчину РНК (0,2 мг) і 0,1 мл 0,1 н. розчину сульфату магнію. Суміш інкубують протягом 30 хв при 37 °С.

2. Після інкубації до проби додають 0,2 мл 12%-го розчину хлорної кислоти для припинення ферментативної реакції й осадження нерозщепленого субстрату (РНК), який відокремлюють центрифугуванням.

3. У надосадовій рідині визначають кількість продуктів розщеплення РНК за поглинанням ультрафіолетового світла при 260 нм. Контрольною є проба, у яку субстрат вносять після осадження. Різниця екстинкцій між дослідною і контрольною пробами є показником активності РНКази за даних умов.

Розрахунок РНКазної активності гомогенату тканини й отриманий результат записують у зошит.

Лабораторна робота № 4.2

Турбідиметричне визначення активності рибонуклеази

Даний підхід базується реакції між РНК, що є поліелектролітом, і підкисленим сироватковим альбуміном. При цьому утворюється каламуть, ступінь якої пропорційний довжині молекули РНК.

Матеріали та реактиви. 0,04–0,06%-й розчин дріжджової РНК в 0,13 М розчині хлориду натрію, гідрофосфат натрію, реактив, який спричиняє утворення каламуті (0,3 мг сироваткового альбуміну, розчиненого в 1 мл 0,1 М розчину ацетатного буфера, рН 4,0), желатин, кристалічний препарат РНКазі.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, термостат, годинник, спектрофотометр (довжина хвилі 400 нм), кювети 5 або 10 мм завтовшки.

Хід роботи

1. До 1 мл 0,04–0,06%-го розчину дріжджової РНК в 0,13 М розчині хлориду натрію, до якого додано гідрофосфат натрію до 0,02 М концентрації (рН = 7,6), додають 5 мл реактиву, який спричинює утворення каламуті (0,3 мг сироваткового альбуміну, розчиненого в 1 мл 0,1 М розчину ацетатного буфера, рН 4,0). Стабілізують каламуть додаванням до кожного 1 мл суміші 1 мг желатини.

2. Попередньо будують стандартну криву для кристалічного препарату РНКазі, каламуть розчину визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 400 нм. 0,5 мл розчину, який містить 500 мкг РНК, змішують з 0,5 мл фосфатно-сольового розчину, що містить різні концентрації кристалічної панкреатичної РНКазі (10–50 мкг) та інкубують протягом 5 хв при 37 °С.

За значенням екстинкції ферментативно обробленого розчину визначають вміст РНК за стандартною кривою і виражають його в мікрограмах. Різниця між знайденою величиною і вихідною (500 мкг РНК) свідчить про кількість розщепленого субстрату, тобто активність РНКазі.

Розрахунок РНКазної активності й отриманий результат записують у зошит.

Лабораторна робота № 4.3

Визначення активності дезоксирибонуклеази за кислоторозчинними продуктами розпаду ДНК

Визначення активності ДНКаз, як і у випадку з РНКазами, проводять за кількістю кислоторозчинних продуктів гідролізу ДНК. Кількість цих олігонуклеотидних фрагментів можна визначити за фосфорним або дезоксирибозним компонентами.

Дослід 1. Метод Шнейдера і Хогбума

Матеріали та реактиви. 0,02 М розчин сукцинатного буфера (рН = 5,0), тканинний гомогенат у сукцинатному буфері (у співвідношенні 1 : 10), розчин ДНК (0,2 мг), 0,1 н. розчин сульфату магнію, 12%-й розчин хлорної кислоти.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, термостат, годинник, центрифужні пробірки, центрифуга, фотометричне обладнання (довжина хвилі 260 нм), кювети 5 або 10 мм завтовшки.

Хід роботи

1. До 0,4 мл 0,02 М розчину сукцинатного буфера (рН = 4,5) додають 0,3 мл тканинного гомогенату в тому самому буфері (1 : 10), 0,2 мл розчину ДНК (0,2 мг), 0,1 мл 0,1 н. розчину сульфату магнію. Суміш інкубують протягом 30 хв при 37 °С, після чого вносять 0,2 мл 12%-го розчину хлорної кислоти для припинення ферментативної реакції і осадження нерозщепленого субстрату. Осад видаляють центрифугуванням.

2. Надосадову рідину зливають і визначають у ній кількість продуктів розпаду ДНК, вимірюючи оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 260 нм. Контрольною є проба, до якої субстрат вносять після хлорної кислоти. Різниця екстинкцій між дослідною і контрольною пробами за даних умов є показником активності ДНКаз.

Розрахунок ДНКазної активності гомогенату тканини й отриманий результат записують у зошит.

Дослід 2. Метод Алфрея і Мирського

Матеріали та реактиви. Тканина для дослідження, холодний 0,14 М розчин хлориду натрію, розчин високополімерної ДНК (3–4 мг), 0,2 М розчин ацетатного буфера (рН = 5,0), 3,6 М розчин ТХО, реактиви для визначення вмісту кислоторозчинних продуктів за кольоровою реакцією на дезоксирибозу (див. дод. 12).

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, термостат, годинник, центрифужні пробірки, центрифуга (10000 об./хв), фотометричне обладнання (довжина хвилі 260 нм), кювети 5 або 10 мм завтовшки.

Хід роботи

1. Тканинний гомогенат готують у холодному 0,14 М розчині хлориду натрію (співвідношення визначають залежно від активності ферменту) і до 0,5–1,0 мл такого гомогенату додають 0,5 мл розчину високополімерної ДНК (3–4 мг). Об'єм проби доводять 0,2 М розчином ацетатного буфера (рН = 5,0) до 3 мл. Суміш інкубують протягом 2 год при 37 °С, після чого реакцію зупиняють додаванням 0,8 мл 3,6 М розчину ТХО і центрифугують протягом 15 хв при 10000 об./хв.

2. Паралельно готують контрольну пробу, до якої додають 3,6 М розчин ТХО без попередньої інкубації. У 0,5–1,5 мл надносядової рідини визначають вміст кислоторозчинних продуктів за кольоровою реакцією на дезоксирибозу (див. дод. 12). Активність ДНКаз виражають у міліграмах дезоксирибози кислоторозчинних продуктів, які вивільнюються за час інкубації.

Розрахунок ДНКазної активності гомогенату тканини й отриманий результат записують у зошит.

Лабораторна робота № 4.4

Визначення активності дезоксирибонуклеази за утворенням кислотних груп методом Алфрея і Мирського

Метод базується на виявленні кислотних груп, які утворюються за дії дезоксирибонуклеази на ДНК. Активність ферменту визначають фотоелектроколориметричним методом за знебарвленням індикатору фенолового червоного при взаємодії з кислотними групами продуктів гідролізу ДНК.

Матеріали та реактиви. Тканина для дослідження, 0,14 моль/л розчин хлориду натрію, *субстратний розчин* (який готують у такий спосіб: змішують 1 мл (2 мг) розчину натрієвої солі ДНК, 1 мл розчину сульфату натрію (0,05 моль/л) і 0,4 мл розчину фенолового червоного. Для приготування індикатора фенолового червоного необхідно 10 мл фенолсульфоталеїну, 0,28 мл розчину гідроксиду натрію (0,2 моль/л),

3 мл 96%-го етанолу, 40 мл 0,02 моль/л розчину фосфатного буфера (pH 7,55). Суміш заливають водою до об'єму 100 мл, pH субстратного розчину (2,4 мл) доводять до 7,55, додаючи розчин гідроксиду натрію (0,01 моль/л) і доливають водою до об'єму 3 мл; pH субстратного розчину перевіряють шляхом порівняння із забарвленням стандартного розчину, який складається із 0,4 мл розчину фенолового червоного та 2,6 мл 0,02 моль/л розчину фосфатного буфера (pH 7,55)).

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, термостат, годинник, центрифужні пробірки, центрифуга (10000 об./хв), фотометричне обладнання (довжина хвилі 558 нм), кювети 5 або 10 мм завтовшки.

Хід роботи. Визначення активності дезоксирибонуклеази проводять таким чином.

1. Ретельно розтирають 15 мг тканини в 10 мл охолодженого 0,14 моль/л розчину хлориду натрію. Гомогенат центрифугують протягом 15 хв за 10000 об./хв.

2. До 3 мл субстратного розчину додають 1 мл одержаної на-досадової рідини ферментного розчину. Суміш відразу переливають у кювету й вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі при 25 °C і довжині хвилі 558 нм (зелений світло-фільтр) протягом 10–15 хв з інтервалом 1 хв.

3. Активність ферменту визначають за допомогою графіка. На осі абсцис відкладають час, на осі ординат – значення оптичної густини. Активність ферменту виражають у зниженні оптичної густини комплексу ДНК та барвника, який руйнується внаслідок гідролізу ДНК за перші 3 хв інкубації.

Результат визначення ДНКазної активності гомогенату тканини записують у зошит.

Лабораторна робота № 4.5

Спектрофотометричне визначення активності дезоксирибонуклеази за методом Куніца

В основу методу покладено вимірювання збільшення оптичної густини при 260 нм під час дії ДНКаз на високополімерну ДНК. За збільшенням екстинкції судять про активність ферменту.

Матеріали та реактиви. Розчин натрієвої солі ДНК (2 мг/мл), 0,05 М розчин сульфату магнію, 1 М розчин ацетатного буфера (pH = 5,0), ферментний розчин (містить 5–10 мкг дезоксирибонуклеази).

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, водяна баня, годинник, фотометричне обладнання (довжина хвилі 260 нм), кювети 5 або 10 мм завтовшки.

Хід роботи

1. Із вихідного розчину натрієвої солі ДНК, який містить 2 мг нуклеїнових кислот в 1 мл, готують робочий розчин, що складається із 2 мл вихідного, 10 мл 0,05 М розчину сульфату магнію, 10 мл 1 М розчину ацетатного буфера ($\text{pH} = 5,0$); об'єм суміші доводять водою до 100 мл. Такий розчин можна зберігати при 5°C протягом тижня і більше.

2. У кілька пробірок вносять по 3 мл такого розчину, занурюють їх на кілька хвилин у водяну баню при 25°C .

В одну із пробірок додають 1 мл води і переносять у кварцеву кювету спектрофотометра. Ця проба служить контролем.

В інші пробірки додають по 1 мл ферментного розчину, що містить 5–10 мкг дезоксирибонуклеази, фіксують час і переносять у кварцові кювети спектрофотометра. Оптичну густину вимірюють в інтервалах 0,5–1 хв протягом 5 хв.

Кут нахилу кривої залежності оптичної густини від часу до осі абсцис (час, хв) пропорційний активності ферменту. Специфічна активність ферменту, виражена в одиницях дезоксирибонуклеазної активності на 1 мг білка, г, показує кількість ферменту, яка здатна за 1 хв збільшувати величину оптичної густини при 260 нм на одну одиницю дезоксирибонуклеази за даних умов.

Результат визначення ДНКазної активності ферментного розчину записують у зошит.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які ферменти залучені у перетворення нуклеїнових кислот у шлунково-кишковому тракті?

2. На чому базуються методи визначення активності нуклеаз?

3. Порівняйте методи визначення рибонуклеаз та дезоксирибонуклеаз.

4. Яким чином визначають каламуть розчину при визначенні активності рибонуклеази турбідиметричним методом?

5. У чому полягає визначення активності ДНКаз за кількістю вивільнених кислоторозчинних продуктів?

ТЕМА 2. ОБМІН АЗОТИСТИХ ОСНОВ. БІОСИНТЕЗ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДІВ І НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

І Н Ф О Р М А Ц І Й Н И Й М А Т Е Р І А Л

Синтез азотистих основ відбувається у клітинах і включає в себе послідовні реакції. Вільні нуклеотиди утворюються переважно шляхом синтезу *de novo* або шляхом реутилізації азотистих основ – продуктів розщеплення екзогенних та ендогенних нуклеїнових кислот (*запасний шлях*). Розпад азотистих основ відбувається як у травному тракті за участю кишкової мікрофлори, так і в клітинах організму. У різних організмів кінцеві продукти розпаду азотистих основ є відмінними.

4.2.1. Біосинтез пуринових основ і рибонуклеотидів

Синтез пуринових основ *de novo* відбувається переважно в печінці. Їхніми попередниками є *гліцин* (дає атоми вуглецю в положеннях 4 і 5, атом азоту в положенні 7), *глутамін* (атоми азоту в положеннях 3 і 9), *аспарагінова кислота* (атом азоту в положенні 1), CO_2 (атом вуглецю в положенні 6), одновуглецеві групи, утворені з амінокислот за участю *тетрагідрофолієвої кислоти* (атоми вуглецю в положеннях 2 і 8) та *рибозо-5-фосфат*.

Загальну схему біосинтезу пуринових основ наведено на рис. 4.1.

Відмінністю синтезу пуринових азотистих основ від синтезу піримідинових є те, що в першому випадку спочатку утворюється рибозо-5-фосфат, на основі якого шляхом поступового включення попередників формується пуринове кільце. У випадку піримідинових основ спершу синтезується вільна азотиста основа, яка приєднується до залишку рибозо-5-фосфату (див. підрозд. 4.2.4).

Процес біосинтезу пуринових основ *de novo* включає 11 реакцій, в останній із яких утворюється перший пуриновий нуклеотид – *інозинова кислота* (ІМФ), яка є попередником пуринових нуклеотидів. Надалі із ІМФ утворюється ГМФ та АМФ.

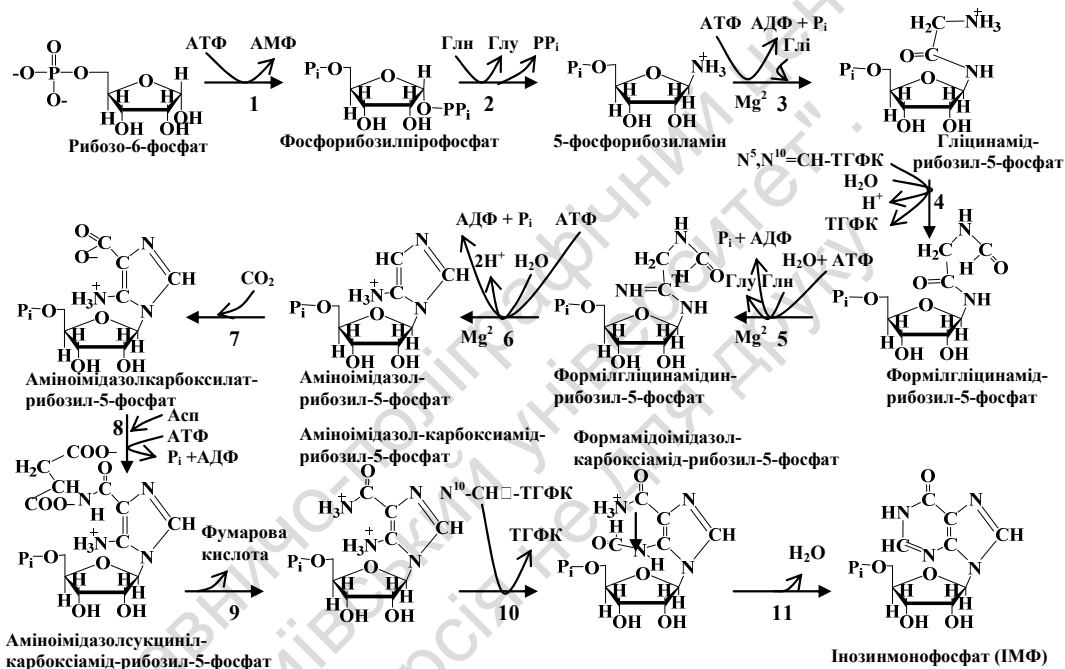
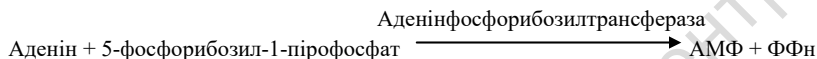


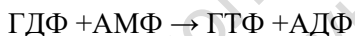
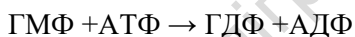
Рис. 4.1. Схема біосинтезу пуринових основ: 1 – фосфорибозилпірофосфатсинтаза; 2 – амідофосфорибозилтрансфераза; 3 – рибозофосфатгліцинамідсинтаза; 4 – гліцинамідрибонуклеотидтрансформілаза; 5 – N-формілгліцинамідрибонуклеотидамідолігаза; 6 – амідоімідазолрибонуклеотидсинтаза; 7 – амідоімідазолкарбоксирибонуклеотидкарбоксилаза; 8 – амідоімідазолсукцинілкарбоксіамідрибонуклеотидсинтаза; 9 – аденілоуксінатліаза; 10 – амідоімідазолкарбоксіамідрибонуклеотидтрансформілаза; 11 – інозиніказа

Запасний шлях відбувається переважно поза печінкою. Наприклад, у клітинах ембріональних, пухлинних, регенеруючих тканин. При цьому використовуються вільні пуринові основи, які утворилися при розпаді нуклеїнових кислот чи нуклеотидів:



Синтез ГМФ відбувається аналогічно за участю ферменту *гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази*. 5-фосфорибозил-1-пірофосфат (ФРПФ) утворюється із рибозо-5-фосфату (утвореного в пентозофосфатному шляху) з використанням АТФ, фермент – пірофосфорилаза, або *фосфорибозилпірофосфатсинтетаза*.

Утворення нуклеозидди- та нуклеозидтрифосфатів відбувається у цитоплазмі за схемою:



Утворення АДФ і АТФ відбувається аналогічно. Ферменти – *нуклеозидмонофосфаткіназа, нуклеозиддифосфаткіназа*.

4.2.3. Розпад пуринових основ

Сечова кислота є кінцевим продуктом катаболізму пуринів у деяких рептилій, птахів, приматів та людини, *алантоїн* – у деяких ссавців, черепах та комах. Сечова кислота є циклічною сполукою, – отже, при катаболізмі пуринів кільця не розкриваються (рис. 4.2).

Щоденно утворюється 0,5–1 г сечової кислоти, яка виводиться головним чином через нирки. Її солі – *урати* – як і сама кислота погано розчиняються у воді. Нормальний вміст сечової кислоти у крові становить 0,24–0,50 ммоль/л (у чоловіків) та 0,16–0,40 ммоль/л (у жінок). При підвищенні цього показника (*гіпер*

За походженням гіперурикемія може бути *спадковою* (первинною) – у вигляді подагри або хвороби Леша – Ніхана, або *набутою* (вторинною), наприклад, при захворюваннях крові, нирок, отруєннях свинцем. У разі надмірного вживання їжі, багатой на пурини – кави, чаю, дріжджів – розвивається *аліментарна* гіперурикемія.

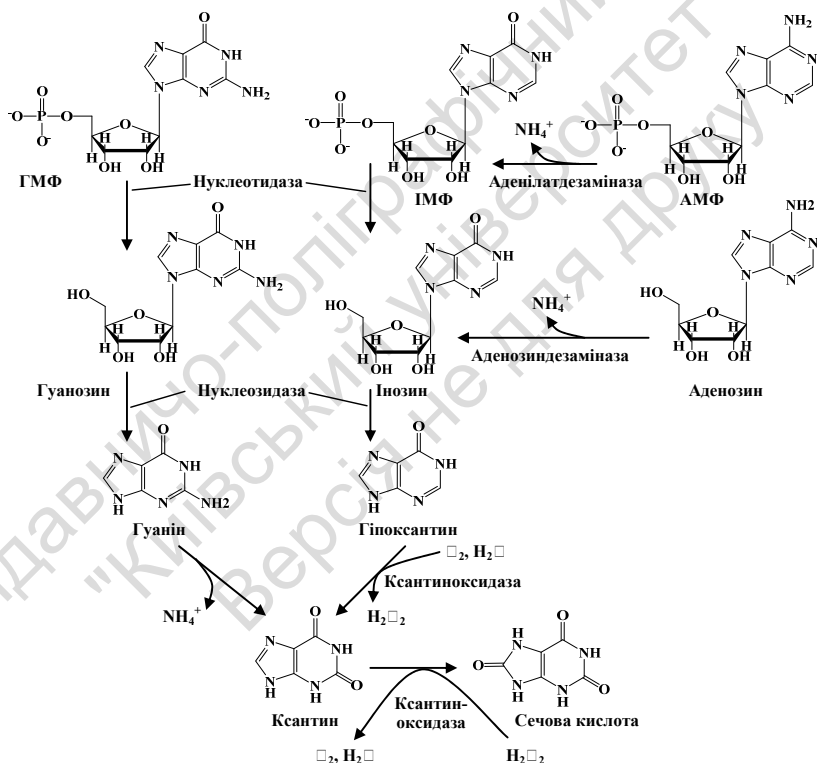


Рис. 4.2. Схема розпаду пуринових нуклеотидів

Визначення сечової кислоти в сечі є діагностичним тестом, який може надати інформацію про наявність порушень метаболізму нуклеїнових кислот. Зокрема, рівень даної сполуки в сечі підвищується при хворобах нирок, подагрі та отруєннях токсинами.

Розвиток *подагри* спричинений посиленням синтезу сечової кислоти внаслідок дефектів низки ферментів. Полегшують перебіг хвороби препарати, які знижують утворення сечової кислоти (*алопуринол*) або стимулюють її виділення нирками (*антуран*). *Синдром Леша – Ніхана* виникає через відсутність ферменту *гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази*, який каталізує реакції повторного використання гуаніну і гіпоксантину на запасному шляху біосинтезу пуринових нуклеотидів (див. підрозд. 4.2.1). Унаслідок цього гуанін і гіпоксантин повторно не утилізуються, а перетворюються на сечову кислоту. Для хвороби характерні подагричні симптоми, розумова відсталість, агресивність.

4.2.4. Біосинтез піримідинових основ і рибонуклеотидів

Шлях біосинтезу піримідинових основ *de novo* потребує наявності сполук-попередників – CO_2 , *глутаміну*, *аспарагіну* та *рибозо-5-фосфату*.

Спочатку утворюється шестичленне піримідинове кільце; потім до нього приєднується *рибозо-5-фосфат*. Перша циклічна проміжна сполука – *дигідрооротова кислота*, яка через стадію *оротової кислоти* перетворюється на УМФ. Із УМФ утворюються УДФ і УТФ, а з УТФ – ЦТФ (рис. 4.3).

Запасний шлях передбачає включення вільних піримідинових основ у склад нуклеотидів і здійснюється аналогічно до схеми, наведеної для пуринових основ (див. підрозд. 4.2.1).

Спадкове порушення синтезу піримідинів – *оротацидурія* (надлишкове утворення оротової кислоти) – пов'язане із низькою активністю *оротатфосфорибозилтрансферази* і *декарбоксилази* – ферментів, які каталізують дві останні реакції біосинтезу УМФ.

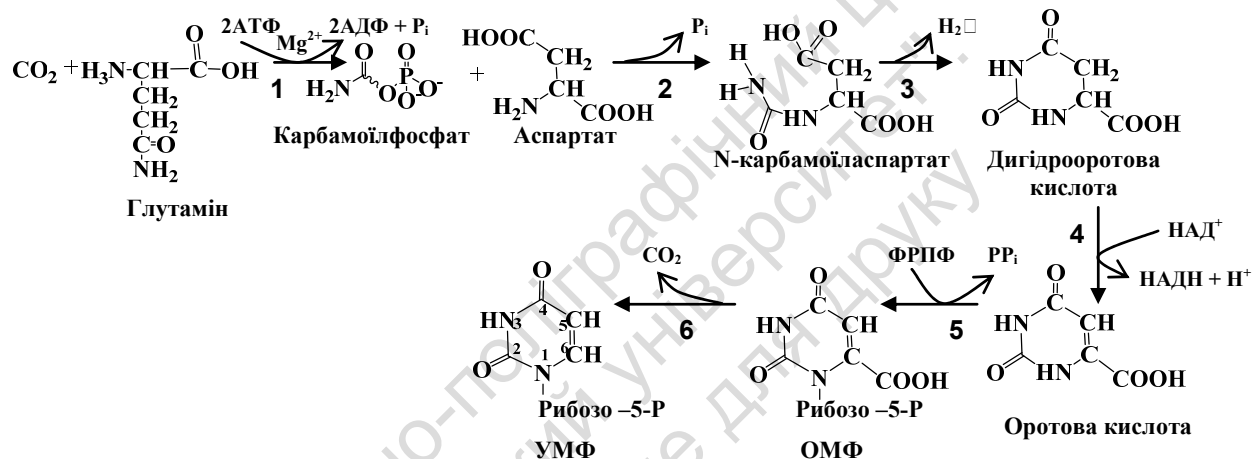


Рис. 4.3. Схема біосинтезу піримідинових основ: 1 – цитозольна карбамоїлфосфатсинтаза II; 2 – аспартаткарбамоїлтрансфераза; 3 – дигідрооротаза; 4 – НАД-залежна дигідрооротатдегідрогеназа; 5 – оротатфосфорибозилтрансфераза; 6 – ОМФ-декарбоксилаза

4.2.3. Катаболізм піримідинових основ

Загальна схема катаболізму піримідинів наведена на рис. 4.4.

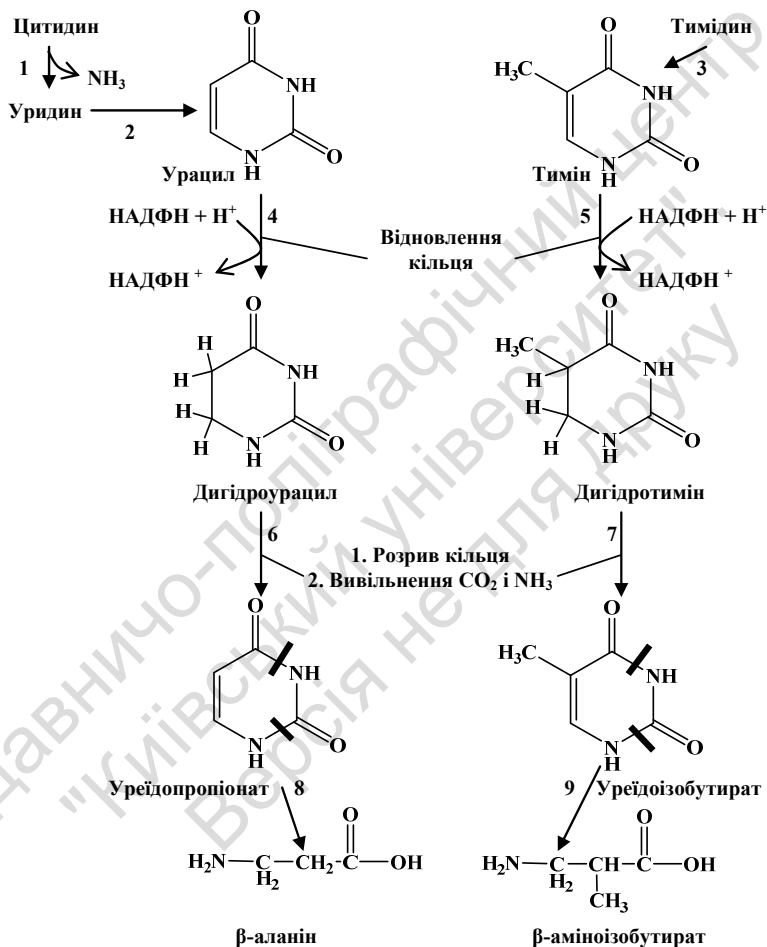


Рис. 4.4. Схема катаболізму піримідинових основ: 1 – цитидиндезаміназа; 2 – уридинфосфорилаза; 3 – тимідинфосфорилаза; 4, 5 – дигідроурацилдегідрогеназа; 6, 7 – дигідропіримідиназа; 8, 9 – β -уреїдопропіоназа

У процесі катаболізму піримідинові азотисті основи перетворюються на β -аміноізомасляну кислоту (тимін) та β -аланін (цитозин й урацил).

Із трьох піримідинових основ тільки цитозин має аміногрупу, тому шляхом гідролітичного дезамінування з нього утворюється урацил (фермент – *цитидиндезаміназа*). Подальший катаболізм піримідинів включає розкриття кільця. Урацил відновлюється до дигідроурацилу, потім кільце розщеплюється з утворенням CO_2 , аміаку і β -аланіну. Із тимідину аналогічним чином утворюється CO_2 , аміак та β -аміноізомасляна кислота. Утворені CO_2 і аміак використовуються на синтез сечовини,

β -аланін включається у КоА, а β -аміноізомасляна кислота перетворюється на сукциніл-КоА.

4.2.4. Біосинтез дезоксирибонуклеотидів і нуклеїнових кислот

Дезоксирибонуклеотиди утворюються із відповідних рибонуклеотидів за участю НАДФН і ферменту *рибонуклеотидредуктази* шляхом відновлення ОН-групи біля другого атому вуглецю рибозного залишку (при цьому рибоза перетворюється на 2-дезоксирибозу). Ця реакція також потребує наявності донора двох атомів водню – термостабільного білка *тіоредоксину*.

Відновлений тіоредоксин містить дві SH-групи, які здатні окиснюватися з утворенням дисульфідного місточка. Окиснений тіоредоксин повертається у відновлену форму за участю НАДФН і ферменту *тіоредоксинредуктази* (детальніше про тіоредоксин див. підрозд. 3.4.3). Так утворюються дАДФ, дГДФ, дУДФ і дЦДФ.

Під час синтезу дТДФ відбувається метилювання дУМФ, який утворюється шляхом гідролізу дУДФ (фермент – *тимідилатсинтетаза*). Донор метильної групи – N^5, N^{10} -метилентетрагідрофолієва кислота, яка в результаті реакції перетворюється на дигідрофолієву кислоту. Остання відновлюється до ТГФК (фермент – *дигідрофолатредуктаза*) (рис. 4.5).

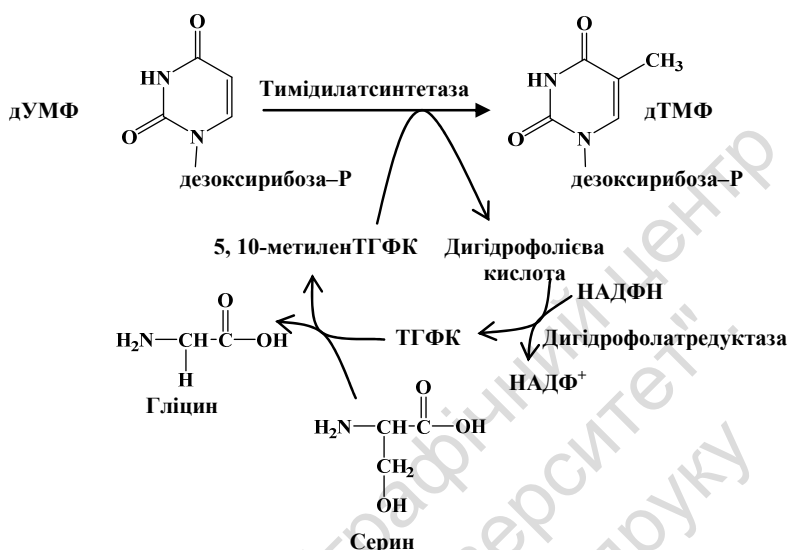


Рис. 4.5. Схема біосинтезу дТМФ

Із утвореного дТМФ надалі синтезуються дТДФ та дТТФ – це відбувається подібно до утворення нуклеозиди- та нуклеозидтрифосфатів пуринових основ (див. підрозд. 4.2.1).

Інгібітори синтезу нуклеотидів використовують у хіміотерапії злоякісних пухлин (напр., 5-фторурацил – інгібітор тимідилатсинтетази, антивітамін (структурні аналоги вітамінів) фолієвої кислоти аміноптерин і метотрексат є інгібіторами дигідрофолатредуктази).

Синтез нуклеїнових кислот здійснюється у клітинах із нуклеозидтрифосфатів. Для передачі спадкової інформації дочірнім клітинам є необхідним копіювання геному, яке відбувається під час *реплікації ДНК*. Молекула ДНК подвоюється з утворенням ідентичних їй дочірніх молекул. При реплікації кожного ланцюга ДНК утворюється комплементарний йому дочірній ланцюг, і в кожній з двох новосинтезованих дочірніх молекул міститься один ланцюг батьківської ДНК. Такий механізм називається *напівконсервативним*.

Ферменти, які здійснюють синтез дочірнього ланцюга ДНК на матриці одного з ланцюгів двоспіральної ДНК, називаються *ДНК-полімеразами*. Вони використовують як субстрат дезоксирибонуклеозидтрифосфати (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ) і каталізують реакцію з'єднання їхніх монофосфатних одиниць.

Синтез РНК на матриці ДНК називається *транскрипцією* і забезпечує реалізацію генетичної інформації з наступним синтезом відповідної молекули білка, що кодується певним геном. Транскрипція здійснюється за участю ферментів *РНК-полімераз*.

У клітинах за певних умов можуть реалізовуватися й інші механізми синтезу нуклеїнових кислот, а саме, *зворотна транскрипція* – синтез ДНК, нуклеотидна послідовність якої комплементарна послідовності молекули РНК (РНК→ДНК), що відбувається, зокрема, при розмноженні РНК-вмісних онковірусів, а також *реплікація РНК* – синтез молекул РНК на матриці вірусної РНК для утворення нових вірусних частинок (РНК→РНК). Ці механізми потребують специфічних ферментів – *РНК-залежної ДНК-полімерази (ревертази)* і *РНК-залежної-РНК-полімерази*, відповідно.

Лабораторна робота № 4.6

Визначення вмісту сечової кислоти в біологічному матеріалі з використанням набору реактивів

Сечова кислота є кінцевим продуктом розпаду пуринових азотистих основ, що вивільнюються із нуклеїнових кислот, які надходять з їжею, або власних нуклеїнових кислот клітин організму. Норма вмісту сечової кислоти в крові становить для дорослих 4,4–7,6 мг/100 мл, або 262–452 мкмоль/л (чоловіки) і 2,3–6,6 мг/100 мл, або 137–393 мкмоль/л (жінки), у сечі – в середньому 250–750 мг/добу, або 1,48–4,43 ммоль/добу. Значення даного показника може зростати за важкої фізичної роботи та при вживанні харчових продуктів, збагачених пуринами (печінка, нирки).

Метод базується на здатності сечової кислоти відновлювати фосфорновольфрамний реактив до фосфорновольфрамової сині. Інтенсивність забарвлення розчину синього кольору пропорційна вмісту сечової кислоти у пробі. Кількість утвореної фосфорновольфрамової сині визначають спектрофотометрично.

Даний метод дозволяє визначати концентрації сечової кислоти в межах від 80 мкмоль/л до 1200 мкмоль/л.

Гіперурикемія (зростання вмісту сечової кислоти у крові) та *гіперурикозурія* (зростання вмісту сечової кислоти в сечі) спостерігаються при захворюваннях, які супроводжуються посиленням розпадом нуклеїнових кислот у тканинах організму: нирковій недостатності, полікістозі нирок, токсикозі вагітних, запаленні легень, ревматизмі, отруєнням свинцем, пухлинах (міеломах, лімфомах), синдромі Дауна. Вона також може виявлятися при захворюваннях печінки, ожирінні, гіпертензії, зловживанні алкоголем, гіперпаратиреоїдизмі, акромегалії та при передозуванні цитотоксичних препаратів (наприклад, при лікуванні лейкемії). При подагрі вміст сечової кислоти у крові може бути підвищений, а в сечі – нормальний.

Гіпоурикемія (зниження вмісту сечової кислоти у крові) та *гіпоурикозурія* (зниження вмісту сечової кислоти в сечі) мають місце при прогресивній м'язовій атрофії, нефриті, хворобі Вільсона – Коновалова (гепатоцеребральна дистрофія), деяких злоякісних пухлинах (хвороба Ходжкіна, мієломна хвороба), ксантинурії, синдромі патологічної секреції антидіуретичного гормону, нестачі аденозиндезамінази, пуринів та нуклеозидфосфорилази, а також при дієті, бідній на пурини.

Матеріали та реактиви. Сироватка або добова сеча, калібрувальний розчин сечової кислоти (містить 5,04 мг%, або 300 мкмоль/л), розчин каталізатора, вольфрамат натрію (0,3 моль/л), фосфорновольфрамовий реактив (0,12 моль/л Na_2WO_4 , 0,47 моль/л H_3PO_4 , 0,29 моль/л Li_2SO_4), карбонат натрію (для приготування розчину карбонату натрію вміст флакона з карбонатом натрію переносять у мірну колбу місткістю 200 мл, додають 130–150 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, доводять об'єм до мітки дистильованою водою, за необхідності фільтрують).

Обладнання. Фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 650 (620–700) нм, кювети товщиною 10 мм, центрифуга, пробірки, піпетки, мірна колба місткістю 200 мл.

Хід роботи. Для визначення використовують сироватку плазми або добову неохолоджену сечу, розведену дистильованою водою у 10 разів.

1. У центрифужні пробірки ємністю 10 мл вносять дистильовану воду, сироватку або добову неохолоджену сечу, розведену дистильованою водою у 10 разів, калібрувальний розчин сечової кислоти (містить 5,04 мг%, або 300 мкмоль/л), розчин каталізатора (0,35 М сірчана кислота), 0,3 моль/л вольфрамат натрію в об'ємах, указаних у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Об'єми реактивів для приготування проб для визначення вмісту сечової кислоти в біологічних рідинах

Реагент	Проба, мл		
	Дослідна, мл	Калібрувальна, мл	Холоста, мл
Дистильована вода	4,00	4,00	4,50
Сироватка або розведена сеча	0,50	—	—
Калібрувальний розчин сечової кислоти	—	0,50	—
Розчин каталізатора	0,25	0,25	0,25
Вольфрамат натрію	0,25	0,25	0,25

2. Уміст пробірок перемішують, інкубують 10 хв при кімнатній температурі й центрифугують за швидкості 2000–5000 об/хв протягом 10 хв (замість центрифугування вміст пробірок можна профільтрувати).

3. Відбирають надосадову рідину чи фільтрат, додають насичений розчин карбонату натрію і фосфорновольфрамовий реактив (0,12 моль/л Na_2WO_4 , 0,47 моль/л H_3PO_4 , 0,29 моль/л Li_2SO_4). Указані реагенти вносять за схемою, наведеною у табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Об'єми реактивів для проведення реакції з фосфорновольфрамовим реактивом для визначення вмісту сечової кислоти в біологічних рідинах

Реагент	Проба, мл		
	Дослідна, мл	Калібрувальна, мл	Холоста, мл
Надосадова рідина (фільтрат)	2,0	2,0	2,0
Розчин карбонату натрію	1,0	1,0	1,0
Фосфорновольфрамовий реактив	0,6	0,6	0,6

4. Уміст пробірок перемішують, інкубують 30 хв при кімнатній температурі та вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 650 (620–700) нм дослідної ($E_{\text{досл}}$) і калібрувальної проб ($E_{\text{кал}}$) проти холостої проби. Забарвлення стабільне протягом 30 хв.

Вміст сечової кислоти в пробі розраховують за формулою:

$$C = (E_{\text{досл}}/E_{\text{калібр}}) \times 5,04 (300),$$

де C – концентрація сечової кислоти в пробі (мг% або мкмоль/л);

5,04 (300) – калібрувальна концентрація сечової кислоти (мг% або мкмоль/л, відповідно);

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{калібр}}$ – оптична густина калібрувальної проби.

Для розрахунку концентрації сечової кислоти в сечі отримане значення слід помножити на коефіцієнт розведення, який дорівнює 10.

Розрахунок вмісту сечової кислоти в сироватці крові або в сечі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними показниками й роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Якими є кінцеві продукти катаболізму пуринових і піримідинових основ у людини?

2. Які сполуки є джерелами атомів азоту й вуглецю при біосинтезі пуринових і піримідинових нуклеотидів?

3. Які ферменти здійснюють біосинтез нуклеїнових кислот?

4. Чим можуть бути зумовлені гіперурікемія й гіперурикозурія?

5. З якою метою при визначенні сечової кислоти в сечі використовують фосфорновольфрамовий реактив?

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДО РОЗДІЛУ 4

Завдання 1

Сечова кислота є:

а) похідним сечовини;

б) похідним пурину;

в) проміжним продуктом у циклі біосинтезу сечовини;

г) проміжним продуктом розпаду білків;

д) проміжним продуктом розпаду піримідинових азотистих основ.

Завдання 2

Чому ДНК є більш стійкою до лужного гідролізу, ніж РНК?

а) оскільки ДНК може утворювати стійкі комплекси з металами, що взаємодіють з її іонізованими фосфатними групами;

б) тому що ДНК є дволанцюговою молекулою, структуру якої стабілізують водневі зв'язки між комплементарними парами азотистих основ;

в) тому що ДНК містить модифіковані азотисті основи, які надають їй молекулі стійкості;

г) тому що залишки дезоксирибози в молекулі ДНК містять у положенні 2 водень замість ОН-групи;

д) оскільки ДНК має більшу кількість негативно заряджених хімічних груп на периферії молекули.

Завдання 3

Виберіть вірні твердження:

а) методи виділення рибонуклеїнових кислот та дезоксирибонуклеїнових кислот із біологічних тканин базуються на їхньому розчиненні в кислотах і осадженні шляхом нейтралізації в розчинах солей;

б) вуглеводний компонент у складі як ДНК, так і РНК можна визначити за реакцією з орцином за утворенням синьо-зеленого забарвлення;

в) кількісне визначення нуклеїнових кислот проводять виключно за поглинанням азотистих основ в ультрафіолетовій зоні спектра, вимірюючи оптичну густину при 270 і 290 нм;

г) метод вискозиметрії дозволяє з високою точністю визначити молекулярну масу нуклеїнових кислот та їхній конформаційний стан, оскільки розчини цих кислот мають низьку в'язкість;

д) методи визначення активності нуклеаз є спектрофотометричними й базуються на вимірюванні поглинання азотистих основ у низькомолекулярних продуктах розпаду нуклеїнових кислот.

Завдання 4

Які ферменти використовуються у генетичній інженерії для "вирізання" певних фрагментів ДНК і вбудовування в їхній генетичний матеріал бактеріальної ДНК?

а) РНКази;

г) ДНК-полімерази;

б) зворотна транскриптаза;

д) топоізомерази;

в) рестриктази;

є) Нуклеозидази.

Завдання 5

У результаті дії яких ферментів утворюються вільна азотиста основа й рибозо-1-фосфат?

- | | |
|----------------------------|-------------------|
| а) РНКазі; | г) нуклеотидази; |
| б) зворотна транскриптаза; | д) топоізомерази; |
| в) рестриктази; | є) нуклеозидази. |

Завдання 6

Які сполуки з наведених є попередниками в утворенні піримідинових основ *de novo*?

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| а) CO ₂ ; | |
| б) глютамінова кислота; | д) гліцин; |
| в) глютамін; | є) рибозо-5-фосфат; |
| г) аспарагін; | ж) рибулозо-5-фосфат. |

Завдання 7

Під час біосинтезу яких сполук із наведених утворюються такі проміжні метаболіти, як дигідрооротова та оротова кислоти?

- | | |
|---------|---------|
| а) УМФ; | г) ГМФ; |
| б) ЦТФ; | д) АМФ; |
| в) ІМФ; | є) ТТФ. |

Завдання 8

Для якого процесу із наведених є необхідним білок тіоредоксин?

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| а) синтез пуринових основ; | г) синтез дезоксирибонуклеотидів; |
| б) синтез піримідинових основ; | д) реплікація; |
| в) синтез рибонуклеотидів; | є) транскрипція. |

Завдання 9

Які сполуки із наведених використовуються при лікуванні подагри?

- | | |
|------------------|----------------|
| а) аміноптерин; | г) алопуринол; |
| б) метотрексат; | д) антуран; |
| в) 5-фторурацил; | є) вікасол. |

Завдання 10

Спадкове порушення синтезу піримідинів має назву:

- | | |
|---------------------------|--------------------|
| а) подагра; | г) гіперурикемія; |
| б) синдром Леша – Ніхана; | д) гіпоурикозурія; |
| в) оротацидурія; | є) порфірія |

Розділ 5. МЕТАБОЛІЧНІ ШЛЯХИ ПЕРЕТВОРЕННЯ ЕНЕРГІЇ

ТЕМА 1. ЦИКЛ КРЕБСА

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

Перетворення енергії є одним із найважливіших процесів, який визначає життєдіяльність організмів. Інтенсивність його перебігу зумовлює найрізноманітніші процеси: біосинтетичні, ріст і розвиток клітин, тканин, органів і організму в цілому, репараційні, транспортні, прояви м'язової і нем'язової рухомості, виникнення і проведення нервового імпульсу, люмінесценції та багато інших.

У центрі всіх перетворень енергії в живих організмах знаходиться *аденозинтрифосфорна кислота (АТФ)*, при гідролізі якої виділяється запасена у формі фосфатних зв'язків енергія.

Катаболізм білків, вуглеводів і ліпідів здійснюється у три етапи: 1) перетворення (дає приблизно 1% енергії); 2) специфічні шляхи катаболізму (29% енергії); 3) загальний кінцевий етап катаболізму – термінальне окиснення (70% енергії).

Специфічні шляхи катаболізму включають гліколіз, пентозофосфатний шлях перетворення глюкозо-6-фосфату, β -окиснення вільних жирних кислот, а також дезамінування, переамінування і декарбоксилування амінокислот.

Загальний кінцевий етап катаболізму білків, вуглеводів і ліпідів включає декарбоксилування піровиноградної кислоти, цикл трикарбонових кислот (цикл лимонної кислоти, цикл Кребса), окисне фосфорилування.

Енергетичний обмін відбувається у клітинах всіх тканин. Одна із тканин, де він найінтенсивніший – це скелетні м'язи.

5.1.1. Джерела ацетил-КоА для циклу Кребса

Цикл Кребса – це загальний кінцевий шлях для окиснення ацетильних груп, на які перетворюється у процесі катаболізму більша частина органічних молекул, які відіграють роль клітинного палива (вуглеводи, жирні кислоти, амінокислоти). Перш ніж ці речовини будуть включені в цикл Кребса, їхній вуглеводний скелет повинен зруйнуватися, а його фрагменти мають перетворитися на ацетильні групи ацетил-КоА, оскільки саме в цій формі цикл Кребса приймає більшу частину сполук.

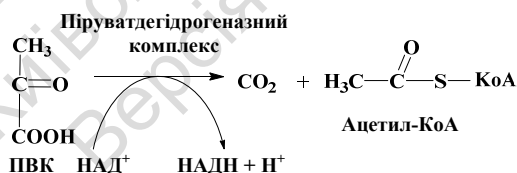
Основними джерелами ацетил-КоА є:

- *жирні кислоти* (які перетворюються на ацетил-КоА під час β -окиснення);
- *амінокислоти* (на ацетил-КоА перетворюються 10 амінокислот: п'ять (АЛА, ГЛІ, СЕР, ТРЕ, цистеїн) розщеплюються до ацетил-КоА через піруват, тоді як інші п'ять (ФЕН, ЛЕЙ, ТИР, ЛІЗ, ТРП) перетворюються спочатку на ацетоацетил-КоА, а останній – уже до ацетил-КоА;
- *вуглеводи* (вони спочатку в процесі гліколізу перетворюються на лактат, лактат – на піруват (фермент лактатдегідрогеназа), а піруват окиснюється до ацетил-КоА і CO_2 за участю піруватдегідрогеназного комплексу мітохондрій).

5.1.2. Піруватдегідрогеназна реакція

Піровиноградна кислота (піруват, ПВК) є одним із центральних метаболітів обміну вуглеводів. Вона утворюється у процесі розпаду глюкози, при окисненні лактату (молочної кислоти), а також у результаті перетворення ряду амінокислот.

Окисне декарбоксилювання ПВК приводить до утворення ацетил-КоА і каталізується *піруватдегідрогеназним комплексом*, який зв'язаний із внутрішньою мембраною мітохондрій. Сумарне рівняння декарбоксилювання ПВК:



До структури піруватдегідрогеназного комплексу входять три ферменти (*піруватдегідрогеназа* (Е1), *дигідроліпоатацетилтрансфераза* (Е2) і *дигідроліпоатдегідрогеназа* (Е3)) та п'ять кофакторів (тіамінпірофосфат (похідна вітаміну В₁), КоА (похідна пантотенової кислоти), ліпоєва кислота, НАДН (похідна вітаміну РР), ФАДН₂ (похідна вітаміну В₂)).

5.1.3. Цикл Кребса

Цикл трикарбонових кислот – це серія реакцій, які відбуваються у матриксі мітохондрій і здійснюють катаболізм ацильних груп (до CO_2) трикарбонових кислот з утворенням відновлених еквівалентів (НАДН і ФАДН₂) (рис. 5.1). Ці відновлені еквіваленти є донорами електронів для реакцій, котрі реалізуються в *дихальному (електроннотранспортному) ланцюзі* мітохондрій і є джерелом енергії для синтезу АТФ *протонною аденозинтрифосфат-синтетазою* (H^+ -АТФазою/АТФ-синтетазою) мітохондрій.

Основними функціями ЦТК є:

- 1) інтегруюча (об'єднує катаболізм білків, вуглеводів і ліпідів);
- 2) анаболічна (проміжні сполуки ЦТК включаються в наступні процеси біосинтезу);
- 3) катаболічна (постачає субстрати для дихального ланцюга мітохондрій, утворює дві молекули CO_2 , ізоцитрат, α -кетоглутарат, малат, сукцинат, по одній молекулі ГТФ і ФАДН₂, 3 молекули НАДН).

Крім того, за участю сполук, які утворюються у ЦТК, відбуваються такі процеси, як синтез вільних жирних кислот, ізопреноїдів і кетонових тіл; синтез порфіринів із сукциніл-КоА; синтез піримідинових і пуринових основ; синтез амінокислот у реакціях переамінування α -кетокислот; глюконеогенез та ін.

Центральним субстратом циклу Кребса є ацетил-КоА, який є спільним продуктом катаболізму білків, вуглеводів і ліпідів. Ця сполука може бути повністю окиснена за участю ЦТК і дихального ланцюга до CO_2 і H_2O , або ж використана як активна проміжна сполука для синтезу інших речовин.

Цикл Кребса включає вісім стадій і починається з того, що ацетил-КоА віддає свою ацетильну групу оксалоацетату (кількість атомів вуглецю (C) у молекулі оксалоацетату дорівнює 4), унаслідок чого утворюється цитрат (C = 6). Надалі цитрат перетворюється на ізоцитрат (C = 6), який дегідрується із втратою CO_2 та утворенням α -кетоглутарату (C = 5). Від α -кетоглутарату відщеплюється CO_2 й утворюється сукцинат (C = 4). Із сукцинату в результаті трьох ферментативних реакцій утворюється оксалоацетат (C = 4), із якого й розпочався цикл (рис. 5.1).

За кожний оберт ЦТК утворюється по 1-й молекулі ГТФ і ФАДН₂, 3 молекули НАДН, які в сукупності сприяють утворенню 12 молекул АТФ.

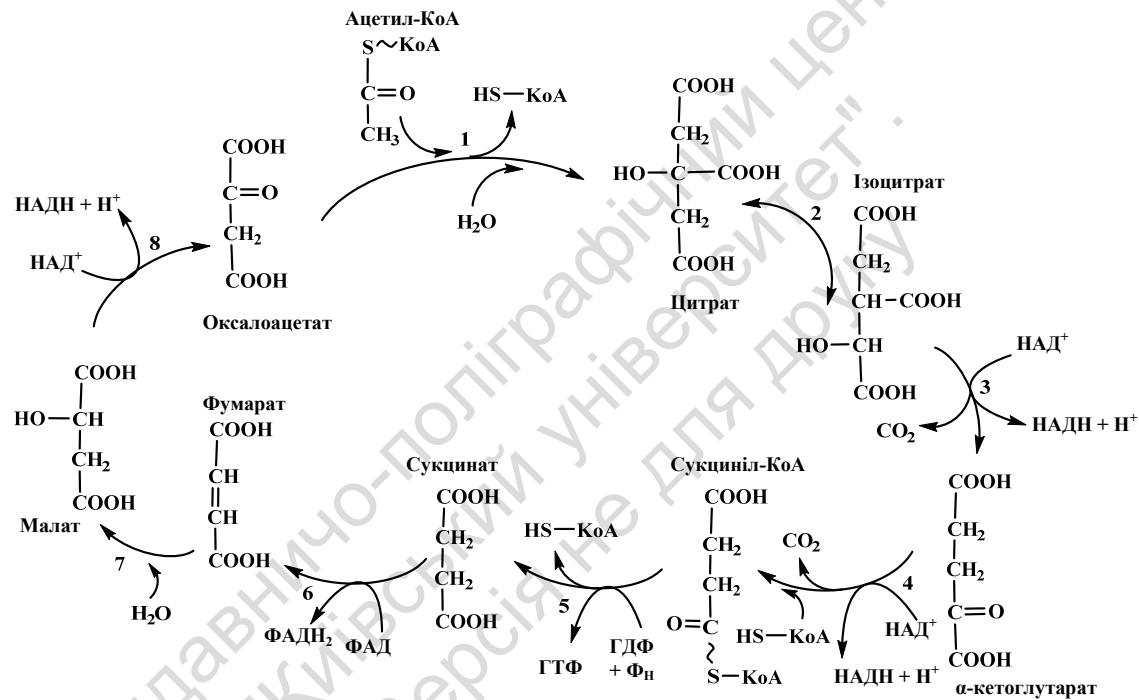


Рис. 5.1. Схема циклу Кребса: 1 – цитратсинтаза; 2 – аконітаза; 3 – ізоцитратдегідрогеназа; 4 – α-кетоглутаратдегідрогеназа; 5 – сукциніл-КоА-синтетаза; 6 – сукцинатдегідрогеназа; 7 – фумараза; 8 – малатдегідрогеназа.

Лабораторна робота № 5.1

Визначення вмісту проміжних метаболітів циклу **Кребса**

Дослід 1. Визначення вмісту цитрату у м'язовій тканині

Цитрат (цитринова кислота) – один із важливих компонентів ЦТК. Реакція його утворення при конденсації ацетил-КоА та оксалоацетату (щавлевооцтової кислоти) є основним шляхом введення в ЦТК вуглеводних компонентів, здатних до окиснення.

Значна частина цитрату в клітинах тварин зосереджена в мітохондріях. За участю спеціального переносника він може частково (до 10%) потрапляти в цитоплазму клітини. Крім участі в ЦТК, цитрат як алостеричний ефектор фосфоглюкокінази також бере участь у регулюванні швидкості гліколізу, може регулювати кількість ацетил-КоА тощо.

Кількість цитрату визначають у реакції тіосечовини з пентабромометаном, який утворюється із цитрату за дії бром у присутності Mg^{2+} у кислому середовищі.

Матеріали та реактиви. Скелетний м'яз щура, 10%-й розчин ТХО, 18 н. H_2SO_4 , бромний реактив (11,002 г KBr розчиняють у 100 мл бромної води), 5%-й розчин $KMnO_4$, 6%-й розчин H_2O_2 , петролейний ефір, 4%-й розчин тіосечовини, стандартні розчини цитрату, які містять від 0,05 до 0,25 мкмоль цієї речовини у пробі (від 0,5 до 2,5 мл).

Обладнання. Ступка з товкачиком, ножиці, центрифужні пробірки, піпетки, центрифуга (3000 g), пробірки з притертими пробками і міткою на рівні 0,4 мл, льодяна баня, годинник, водяна баня, піпетка Пастера, фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 430 нм, кювети товщиною 5–10 мм.

Хід роботи. Наважку (0,5 г) скелетного м'яза щура старанно подрібнюють ножицями, розтирають товкачиком у фарфоровій ступці й переносять у центрифужну пробірку, яка міститься на льоду і в яку попередньо вносять 2 мл 10%-го розчину ТХО. Пробу ретельно перемішують і додають до неї ще додатково 2,5 мл ТХО, перемішують і залишають стояти на льоду протягом 10 хв. Утворений осад білка відділяють центрифугуванням 10 хв при 3000 g.

Надосадову рідину (3 мл) переносять у пробірку з притертою пробкою і міткою на рівні 0,4 мл. До проби додають 2 краплі 18 н. H_2SO_4 , перемішують та упарюють на водяній бані до об'єму 0,4 мл. Після упарювання пробу охолоджують до кімнатної температури й додають 2 краплі бромного реактиву (11,002 г KBr розчиняють у 100 мл бромної води), а через 10 хв – 0,2 мл 5%-го розчину KMnO_4 . Пробу охолоджують на льоду 10 хв. Надлишок KMnO_4 вилучають охолодженим 6%-м розчином H_2O_2 , додаючи його краплями до знебарвлення при перемішуванні.

Утворений із цитрату пентабромацетон екстрагують петролейним ефіром. Для цього до проби додають 1,4 мл петролейного ефіру, закривають пробірку притертою пробкою та енергійно струшують протягом 5 хв. У подальшому до проби додають 3,5 мл 4%-го розчину тіосечовини. Пробу ретельно струшують і для розшарування фаз центрифугують 3 хв при 3000 г. Забарвлений у світложовтий колір нижній водний шар обережно відсмоктують за допомогою піпетки Пастера. Отриману фракцію спектрофотометрують при 430 нм проти контролю, для отримання якого замість 3 мл безбілкової надосадової рідини беруть 3 мл 10%-го розчину ТХО. Надалі контрольну пробу обробляють так само, як і дослідну.

Кількість цитрату в тканині розраховують за калібрувальною кривою. Для її побудови беруть стандартні розчини цитрату, які містять від 0,05 до 0,25 мкмоль цієї речовини у пробі (від 0,5 до 2,5 мл). Об'єм проби доводять до 3 мл 10%-ю ТХО й обробляють так само, як і дослідну пробу. Середнє значення оптичної густини проби, яка містить 0,1 мкмоль цитрату, становить 0,058.

Вміст цитрату (у мкмоль на 1 г тканини) розраховують за формулою:

$$X = \frac{m \times K}{V},$$

де m – кількість цитрату, визначена в дослідній пробі за калібрувальною кривою;

K – коефіцієнт розведення відносно 1 г тканини, який у даному випадку дорівнює 9,75 (розрахунок див. нижче);

V – об'єм безбілкової надосадової рідини (3 мл).

Розрахунок коефіцієнта розведення проводять наступним чином. При осадженні білків тканини до 0,5 г додано 4,5 мл розчину ТХО. Таким чином, якщо б використовували 1 г, то треба до-

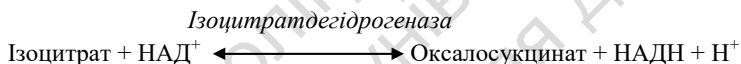
дати 9 мл цього розчину. Із урахуванням того, що середній вміст води в м'язовій тканині становить 75%, то 1 г тканини з доданою кількістю розчину ТХО відповідає 9,75 мл екстракту.

Розрахунок вмісту цитрату у м'язовій тканині й отриманий результат записують у зошит.

Дослід 2. Визначення кількості ізоцитрату у м'язовій тканині

Реакція окиснення *ізоцитрату* за дії ізоцитратдегідрогенази є першим етапом ЦТК, який постачає НАДН у дихальний ланцюг мітохондрій. У підтримці рівноваги між цитратом та ізоцитратом провідна роль належить аконітазі. Саме аконітазна реакція є основним шляхом утворення ізоцитрату із *цис*-аконітату, який, у свою чергу, утворюється із цитрату. Ще один шлях утворення ізоцитрату – реакція декарбоксилювання α -кетоглутарату.

Один із методів визначення кількості ізоцитрату (метод Зібберта) базується на тому, що за дії НАД⁺-ізоцитратдегідрогенази ізоцитрат перетворюється в еквівалентній кількості на оксалосукцинат:



Кількість ізоцитрату, що прореагував, еквімолярна кількості утвореного НАДН, який реєструють спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм.

Матеріали та реактиви. Скелетний м'яз щура, 6%-ва хлорна кислота, 24%-й розчин K₂CO₃, інкубаційна суміш (містить 2 мл 0,1 М трис-НСІ буфера з 1 мМ ЕДТО (рН 7,4); 0,4 мл 20 мМ MnCl₂; 0,1 мл 0,05 М розчину НАД⁺; 0,55 мл дистильованої води), свіжовиготовлений розчин НАД⁺-ізоцитратдегідрогенази (1 мл розведеного розчину ферменту містить приблизно 25 МО ферментативної активності).

Обладнання. Ступка з товкачиком, ножиці, центрифужні пробірки, піпетки, центрифуга (3000 g), крапельниці, термостат, льодяна баня, годинник, фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 430 нм, кювети товщиною 10 мм.

Хід роботи. Наважку (0,5 г) скелетного м'яза щура старанно подрібнюють ножицями і розтирають товкачиком у фарфоровій ступці та переносять у центрифужну пробірку, яка міститься на льоду і в

яку попередньо наливають 1 мл 6%-вої хлорної кислоти. Пробу ретельно перемішують і залишають пробірку на 10 хв на льоду. Утворений осад білка відділяють центрифугуванням 15 хв при 3000 g.

Безбілковий екстракт (надосадову рідину) переносять у центрифужну пробірку і для видалення надлишку хлорної кислоти в пробу додають краплями 24%-й розчин K_2CO_3 при постійному перемішуванні до припинення виділення CO_2 , що свідчить про завершення утворення перхлорату калію, який випадає в осад. Цей осад відділяють центрифугуванням 15 хв при 3000 g. Нейтралізований безбілковий тканинний екстракт (надосадову рідину) нагрівають до кімнатної температури і використовують для ферментативної реакції.

У спектрофотометричну кювету, ширина якої становить 1 см, наливають інкубаційну суміш. До цього інкубаційного середовища додають 0,05 мл свіжовиготовленого розчину $НАД^+$ -ізоцитратдегідрогенази. Утворену суміш перемішують і визначають величину екстинції при 340 нм (E_1).

Ферментативну реакцію ініціюють внесенням у спектрофотометричну кювету 0,2 мл екстракту м'язової тканини. Пробу ретельно перемішують і після припинення реакції (не збільшується оптична густина) визначають величину екстинції (E_2). Час перебігу реакції залежить від активності ферментативного препарату і зазвичай становить 3–5 хв.

Вміст ізоцитрату (у мкмоль на 1 г тканини) розраховують за формулою:

$$X = \frac{\Delta E \times V \times K}{6,22},$$

де ΔE – зміна оптичної густини проби за час реакції: $\Delta E = E_2 - (0,94 \times E_1)$, коефіцієнт 0,94 введено для того, щоб урахувати зміну об'єму реакційної суміші в кюветі – на початку реакції він становив 3,1 мл, а в кінці – 3,3 мл;

V – кінцевий об'єм проби (3,3 мл);

K – коефіцієнт розведення відносно 1 г тканини, який у випадку рівний 23,1;

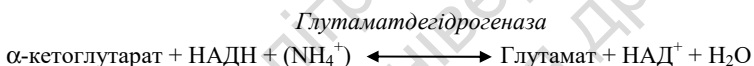
6,22 – коефіцієнт молярної екстинції НАДН при довжині хвилі 340 нм і ширині кювети 1 см.

Розрахунок вмісту ізоцитрату у м'язовій тканині та отриманий результат записують у зошит.

Дослід 3. Визначення кількості α -кетоглутарату у м'язовій тканині

Другим етапом ЦТК, який постачає НАДН у дихальний ланцюг мітохондрій, є реакція окиснення α -кетоглутарату (α -кетоглутарової кислоти). Ця сполука бере також участь у реакціях переамінування амінокислот, що сприяє залученню вуглецевого скелету амінокислот у реакції окиснення. Важливу роль відіграє взаємоперетворення α -кетоглутарату на глутамат, що пов'язано зі специфічними функціями глутамату і глутаміну. Основна кількість α -кетоглутарату зосереджена в матриксі мітохондрій, але певна його кількість є також у цитоплазмі, оскільки він здатний переноситися через мітохондріальні мембрани специфічною транслоказою.

У методі визначення вмісту α -кетоглутарату в тканинах, запропонованому Бергмейером і Бернатоном, у присутності надлишку іонів амонію (NH_4^+) за дії глутаматдегідрогенази α -кетоглутарат в еквімолярній кількості перетворюється на глутамат:



Зменшення кількості НАДН у цій реакції реєструється спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм.

Матеріали та реактиви. Скелетний м'яз щура, 0,6 М хлорна кислота, 1М K_3PO_4 , свіжовиготовлений 0,01 М розчин НАДН у 1%-му розчині NaHCO_3 , розчин глутаматдегідрогенази у 2,8 М розчині сульфату амонію.

Обладнання. Ступка з товкачиком, ножиці, центрифужні пробірки, піпетки, центрифуга (3000 g), термостат, льодяна баня, годинник, фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 430 нм, кювети товщиною 10 мм.

Хід роботи. Наважку (0,5 г) скелетної м'язової тканини щура старанно подрібнюють товкачиком у фарфоровій ступці, переносять у розміщену на льоду центрифужну пробірку, у яку попередньо наливають 4 мл 0,6 М хлорної кислоти. Після перемішування до проби додають ще 0,5 мл цієї кислоти, ретельно ще раз перемішують і залишають на 10 хв на льоду. Утворений осад білка відділяють центрифугуванням 10 хв при 3000 g.

Надалі в центрифужну пробірку переносять 4 мл безбілкового екстракту (надосадової рідини) і нейтралізують 0,8 мл 1М K_3PO_4 , при цьому рН проби досягає значення близько 7,6. Для повного вилучення хлорної кислоти пробу енергійно струшують, ставлять у лід на 10 хв. Осад відділяють центрифугуванням 5 хв при 3000 g. Надосадову рідину нагрівають до кімнатної температури. У спектрофотометричну кювету завширшки 1 см вносять 3,75 мл нейтралізованого екстракту тканини, додають 0,05 мл свіжовиготовленого 0,01 М розчину НАДН у 1%-му розчині $NaHCO_3$. Пробу ретельно перемішують і визначають величину екстинції (E_1) при довжині хвилі 340 нм. Потім у пробу додають 0,05 мл розчину глутаматдегідрогенази в 2,8 М розчині сульфату амонію. Вміст білка у ферментативному розчині повинний бути 1,5–2,0 мг/мл (ферментативний препарат розводять у 3–5 разів). Пробу ретельно перемішують і визначають величину екстинції при довжині хвилі 340 нм після припинення її зміни (E_2). Зазвичай це відбувається через 3–5 хв. Для врахування зміни величини екстинції проби за рахунок додавання препарату ферменту в кювету після закінчення реакції та вимірювання на цей момент величини екстинції (E_2) додатково вносять ще 0,05 мл розчину глутаматдегідрогенази, перемішують і одразу визначають величину екстинції (E_3).

Вміст α -кетоглутарату (мкмоль на 1 г тканини) розраховують за формулою:

$$X = \frac{\Delta E \times V \times K}{6,22},$$

де ΔE – змінна оптичної густини проби за час реакції:

$$\Delta E = (E_1 - E_2) - (E_3 - E_2);$$

V – кінцевий об'єм проби (3,88 мл);

K – коефіцієнт розведення відносно 1 г тканини, який у даному випадку рівний 3,12;

6,22 – коефіцієнт мікромолярної екстинції НАДН при довжині хвилі 340 нм і ширині кювети 1 см.

Розрахунок вмісту α -кетоглутарату в м'язовій тканині й отриманий результат записують у зошит.

Дослід 4. Визначення кількості сукцинату у м'язовій тканині

Одним із етапів ЦТК, який постачає електрони в дихальний ланцюг мітохондрій, є реакція окиснення сукцинату (бурштинової кислоти). Спряжено з цією реакцією окиснена форма флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) відновлюється до ФАДН₂, який постачає електрони на убіхінон (КоQ) дихального ланцюга.

Сукцинат здатний утворюватися декількома шляхами. За дії сукцинатдегідрогенази він перетворюється на сукциніл-КоА, який утворюється при окисному декарбоксилюванні α -кетоглутарату. Крім того, сукцинат може утворюватися із сукциніл-КоА при окисненні вільних жирних кислот з непарним числом атомів вуглецю. У деяких випадках за екстремальних станів сукцинат утворюється із фумарату й оксалоацету в оборотних реакціях ЦТК. Існують також інші шляхи утворення сукцинату, але їхня роль незначна.

Утворення сукцинату спряжене із синтезом ГТФ із ГДФ і неорганічного фосфату. У свою чергу, за участю ГТФ та АДФ може утворюватися АТФ і ГДФ.

В основі методу Зінгера й Керні визначення вмісту сукцинату в тканинах лежить здатність сукцинату в присутності сукцинатдегідрогенази окиснюватися до фумарату. Реакція спряжена з відновленням забарвленої сполуки фериціаніду калію [(K₃FeCN)₆] (червона кров'яна сіль) до безбарвного фероціаніду калію (жовта кров'яна сіль):

Сукцинатдегідрогеназа



Зменшення кількості фериціаніду калію в цій реакції реєструють спектрофотометрично при довжині хвилі 420 нм.

Матеріали та реактиви. Скелетний м'яз щура, 10%-ва хлорна кислота, 5 М розчин K₂CO₃, інкубаційна суміш (0,25 мл 12 мМ розчину фериціаніду калію; 0,1 мл 50 мМ розчину азиду натрію; 0,1 мл 1,3 мМ розчину амілази натрію; 0,85 мл 2,2 М буфера трис-HCl (pH 7,5)), розчин сукцинатдегідрогенази (препарат ферменту з активністю близько 1000 одиниць перед проведенням ферментативної реакції розводять 2,2 М буфером трис-HCl (pH 7,5) у 10 разів), 80 мМ свіжовиготовлений розчин малонату натрію (інгібітору сукцинатдегідрогенази), 40%-ва ТХО, стандартний розчин сукцинату (5 мМ).

Обладнання. Ступка з товкачиком, ножиці, центрифужні пробірки, піпетки, центрифуга (3000 g), термостат, льодяна баня, годинник, індикатор рН, фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 420 нм, кювети товщиною 10 мм.

Хід роботи. Наважку (0,5 г) скелетної м'язової тканини щура старанно подрібнюють ножицями і розтирають товкачиком у фарфоровій ступці, переносять у розміщену на льоду центрифужну пробірку, у яку попередньо наливають 2 мл 10%-вої хлорної кислоти. Пробу ретельно перемішують, до неї додають ще 2,5 мл цієї кислоти і залишають на 10 хв на льоду. Утворений осад білка відділяють центрифугуванням 15 хв при 3000 g і 2 мл безбілкового екстракту (надосадову рідину) переносять в іншу центрифужну пробірку. Надлишок хлорної кислоти в пробі видаляють, додаючи 0,1 мл 5 М розчину K_2CO_3 , пробу залишають на 10 хв на льоду. Після цього осад відділяють центрифугуванням 5 хв при 3000 g. Перед подальшим використанням нейтралізованого безбілкового екстракту (надосадової рідини) необхідно проконтролювати, використовуючи рН-індикатор (метилоранж або універсальний індикаторний папір) значення рН, яке має бути приблизно 7,5.

Для проведення ферментативної реакції готують інкубаційну суміш і в об'ємі 1,3 мл наливають її у дві пробірки, одна з яких дослідна, а інша – контрольна. У них додають по 0,5 мл нейтралізованого безбілкового тканинного екстракту та по 0,1 мл розчину сукцинатдегідрогенази (препарат ферменту з активністю близько 1000 одиниць перед проведенням ферментативної реакції розводять 2,2 М буфером трис-НСІ (рН 7,5) у 10 разів. У контрольну пробу перед внесенням ферменту додають ще 0,2 мл 80 мМ свіжовиготовленого розчину малонату натрію (інгібітору сукцинатдегідрогенази) та 1,9 мл дистильованої води. У дослідну пробу додають тільки 2,1 мл дистильованої води. Усі проби ретельно перемішують і поміщають у термостат (на водяну баню) на 30 хв при температурі 37 °С. Після закінчення цього часу ферментативну реакцію зупиняють, додаючи в кожную пробу по 0,2 мл 40%-вої ТХО. Проби на 10 хв розміщують на льоду, а потім відділяють осад центрифугуванням 10 хв при 3000 g. Для досліджень використовують надосадову рідину, інтенсивність забарвлення (екстинцію) якої визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 420 нм. За різницею у величинах екстинції контрольної ($E_{\text{контр}}$) і дослідної ($E_{\text{досл}}$) з використанням калібрувальної кривої визначають кількість сукцинату в тканині.

Калібрувальну криву будують із використанням стандартних розчинів сукцинату. Готують послідовно декілька розведень стандартного розчину сукцинату (5 мМ) таким чином, щоб у 0,5 мл робочого розчину містилося від 0,1 до 1,0 мкмоль сукцинату. Визначення екстинції цих розчинів сукцинату проводять так само, як описано вище для контрольної проби, замінюючи нейтралізований безбілковий екстракт 0,5 мл розведеного стандартного розчину сукцинату.

Вміст сукцинату (у мкмоль на 1 г тканини) розраховують за формулою:

$$X = \frac{m \times K}{V},$$

де m – кількість сукцинату в пробі (різниця між контрольною і дослідною пробамі), яка визначена за калібрувальною кривою (мкмоль);

K – коефіцієнт розведення по відношенню до 1 г тканини, який у даному випадку рівний 10,2;

V – об'єм нейтралізованого безбілкового тканинного екстракту (0,5 мл).

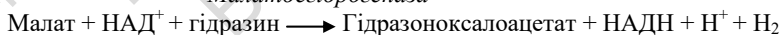
Розрахунок вмісту сукцинату в м'язовій тканині, отриманий результат записують у зошит.

Дослід 5. Визначення кількості малату у м'язовій тканині

Реакція окиснення малату (яблучної кислоти) спряжена з відновленням НАД⁺ до НАДН, що є завершальним (третім) етапом ЦТК постачання цієї сполуки в дихальний ланцюг мітохондрій.

В основу методу кількісного визначення малату в тканинах покладена здатність цієї сполуки перетворюватись на оксалоацетат (шавлевооцтову кислоту) у присутності НАД⁺-малатдегідрогенази. Зв'язування оксалоацетату гідрازیном сприяє повному окисненню малату:

Малатдегідрогеназа



Утворення НАДН, яке еквімолярно кількості окисненого малату, реєструють спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм.

Матеріали та реактиви. Скелетний м'яз щура, 6%-й розчин хлорної кислоти, 5 М розчин K₂CO₃, інкубаційне середовище (містить 2 мл гідразин-гліцинового буфера – 0,4 М розчин гідразину і 1 М розчин гліцину, рН 9,5), 0,05 М свіжовиготовлений розчин НАД⁺, розчин малатдегідрогенази.

Обладнання. Ступка з товкачиком, ножиці, центрифужні пробірки, піпетки, центрифуга (3000 g), термостат, льодяна баня, годинник, фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 340 нм, кювети товщиною 10 мм.

Хід роботи. Наважку (0,5 г) скелетного м'яза щура старанно подрібнюють ножицями, розтирають товкачиком у фарфоровій ступці та переносять у центрифужну пробірку, поміщену в лід і куди попередньо додають 1 мл 6%-го розчину хлорної кислоти. Після перемішування до проби додатково додають ще 1 мл цієї кислоти, ретельно перемішують і залишають на 10 хв на льоду. Утворений осад відділяють центрифугуванням 15 хв при 3000 g. Для видалення надлишку хлорної кислоти до безбілкового тканинного екстракту (надосадової рідини) додають 5 М K_2CO_3 з розрахунку 0,05 мл на 1 мл, ретельно перемішують і пробу поміщають на лід до повного припинення виділення CO_2 , що свідчить про завершення утворення перхлорату калію, який випадає в осад. Цей осад відділяють центрифугуванням 10 хв при 3000 g.

Нейтралізований безбілковий тканинний осад нагрівають до кімнатної температури. У спектрофотометричну кювету (шириною 1 см) додають 2,2 мл інкубаційного середовища, яке містить 2 мл гідразин-гліцинового буфера; 0,2 мл нейтралізованого безбілкового тканинного екстракту; 0,2 мл 0,05 М свіжовиготовленого розчину НАД⁺. Вимірюють екстинцію проби при 340 нм (E_1). Потім до проби додають 0,05 мл розчину малатдегідрогенази (препарат ферменту активністю близько 700 од/мг розводять безпосередньо перед використанням дистильованою водою так, щоби вміст білка становив приблизно 5 мг/мл). Пробу ретельно перемішують і після завершення ферментативної реакції, про що свідчить припинення зміни оптичної густини (через 3–5 хв), вимірюють кінцеве значення екстинції (E_2). Для внесення виправлень на зміну величини екстинції, яка пов'язана з додаванням препарату ферменту, у контрольну пробу замість 0,2 мл нейтралізованого безбілкового тканинного екстракту вносять 0,2 мл дистильованої води й визначають значення величини екстинції в ній (E_k).

Вміст малату (у мкмоль на 1 мг тканини) розраховують за формулою:

$$X = \frac{\Delta E \times V \times K}{6,22},$$

де ΔE – змінна оптичної густини проби за час реакції:
 $\Delta E = (E_2 - E_1) - E_k$;

V – кінцевий об'єм проби в кюветі (2,45 мл);

K – коефіцієнт розведення проби відносно 1 г тканини, який у даному випадку рівний 22,5;

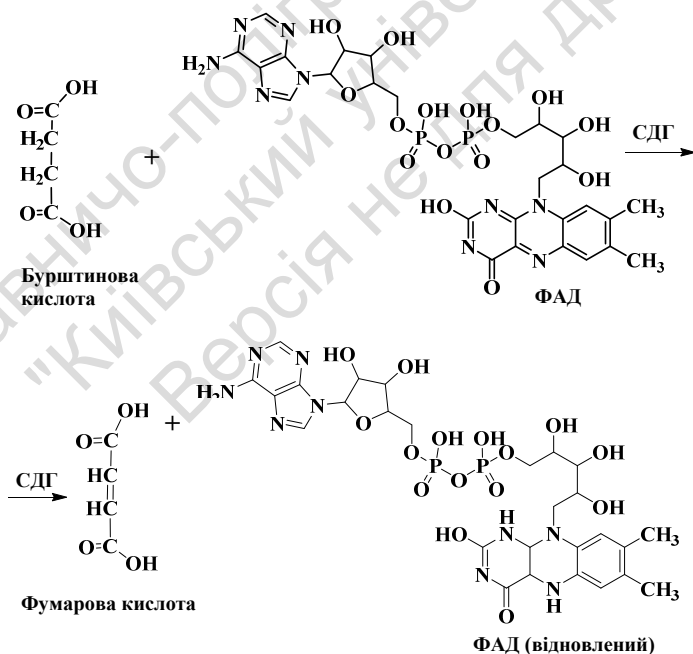
6,22 – коефіцієнт мікромольної екстинції НАДН при довжині хвилі 340 нм і ширині кювети 1 см.

Розрахунок вмісту малату в м'язовій тканині й отриманий результат записують у зошит.

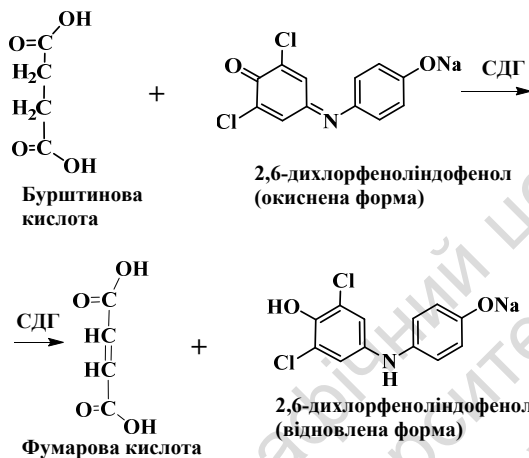
Лабораторна робота № 5.2

Вивчення дії сукцинатдегідрогенази

Сукцинатдегідрогеназа (СДГ, дегідрогеназа бурштинової кислоти) каталізує окиснення бурштинової кислоти у фумарову. Коферментом цього ферменту є флавінаденідинуклеотид:



Як акцептор можна використати 2,6-дихлорфеноліндофенол або його натрієву сіль:



У водному розчині окиснена форма натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу забарвлена в синій колір, відновлена форма – безбарвна. Сукцинатдегідрогеназна активність визначається за зміною інтенсивності забарвлення розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу.

Матеріали та реактиви. Тканина (поперечносмугасті м'язи), фосфатний буфер із рН 7,4 (змішують 81 мл 0,2 моль/л розчину Na_2HPO_4 , 19 мл 0,2 моль/л NaH_2PO_4 і загальний об'єм розчину доливають дистильованою водою до 200 мл), 5%-й розчин бурштинової кислоти, 0,1%-й розчин гідроксиду натрію, 0,001 моль/л розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, набір інструментів для декапітації тварини та препарування м'язів, термостат, годинник.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 3 мл фосфатного буфера. В одну з них (досліджувана проба) додають 0,5 мл розчину бурштинової кислоти та 0,5 мл розчину гідроксиду натрію для нейтралізації, у другу (контрольна проба) вливають 1 мл води. У пробірки вносять по 1 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, по 50 мг старанно подрібнених м'язів щойно забитої тварини й ставлять на 20 хв у термостат при температурі 38 °С. Порівнюють інтенсивність забарвлення в обох пробірках.

Результат спостережень записують у зошит, роблять висновки.

Лабораторна робота № 5.3

Вивчення інгібуючої дії малонової кислоти на активність сукцинатдегідрогенази

За наявності сполук, які структурно схожі на бурштинову кислоту (малонова, щавлева, глутарова, фенілпропіонова), але нездатних дегідруватися, може блокуватися активний центр сукцинатдегідрогенази, а отже, і гальмуватися проходження нормальної реакції. Це приклад конкурентного інгібування.

Матеріали та реактиви. Тканина (поперечносмугасті м'язи), 1%-й розчин малонової кислоти, 1%-й розчин метиленового синього, вазелінове масло.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, крапельниці, термостат, годинник.

Хід роботи. У три пробірки вносять по 3–4 г старанно подрібненої тканини. У першу додають 0,4 мл дистильованої води, у другу – 0,2 мл розчину малонової кислоти та 0,2 мл води, а в третю – 0,4 мл розчину малонової кислоти. В усі пробірки доливають по 1 мл розчину бурштинової кислоти і по дві-три краплі розчину метиленового синього. Вміст пробірок перемішують, додають по три-чотири краплі вазелінового масла й витримують у термостаті за температури 38 °С. Через 5–10 хв спостерігають майже повне зникнення блакитного забарвлення в першій пробірці, деяке зменшення інтенсивності забарвлення у другій та повне збереження його в третій.

Результат спостережень записують у зошит, роблять висновки.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Назвати джерела ацетил-КоА для циклу Кребса
2. Перерахувати основні ферменти реакцій циклу трикарбонних кислот.
3. Які компоненти входять до складу піруватдегідрогеназного комплексу?
4. Яка роль циклу Кребса?
5. Яку реакцію здійснює фермент аконітаза?

ТЕМА 2. ДИХАЛЬНИЙ ЛАНЦЮГ І ОКИСНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

Як уже відмічалось, ЦТК є основним постачальником електронів у дихальний ланцюг мітохондрій, який локалізований у внутрішній мембрані мітохондрій. У цій самій мембрані локалізована Н⁺-АТФаза/АТФ-синтетаза, яка використовує енергію окисно-відновних реакцій для синтезу АТФ із АДФ і неорганічного фосфату.

5.2.1. Компоненти й комплекси дихального ланцюга

Елементами дихального ланцюга є відновлений нікотинамідаде-ндинуклеотид (НАДН), флавопротеїни НАДН-залежна дегідрогеназа (містить ФМН) і сукцинатдегідрогеназа (містить ФАД), негемові залізовмісні протеїни (Fe-S білки), убіхінон (КоQ), цитохроми (a_1 , a_3 , b , c , c_1). Кінцевим продуктом дихального ланцюга є Н₂O.

При перенесенні пари електронів по дихальному ланцюгу від НАДН до кисню ($1/2 \text{ O}_2$) виділяється енергія, яка забезпечує синтез трьох молекул АТФ. Це зумовлено існуванням трьох ланок спряження (рис. 5.2):

1) НАДН:КоQ-оксидоредуктази (або комплексу I – це НАДН-дегідрогеназа, що містить ФМН і кілька Fe-S білків та каталізує перенесення електронів від НАДН на убіхінон);

2) КоQ:цитохром c-оксидоредуктази (або комплексу III, що має цитохроми b , c_1 та один Fe-S-білок, каталізує транспорт електронів із відновленого убіхінону на цитохром c);

3) цитохром c:O₂-оксидоредуктази (або комплексу IV, який має цитохромоксидазу й каталізує транспорт електронів від цитохрому c на кисень).

У додатковому шляху перенесення електронів із сукцинату через ФАДН₂ до КоQ беруть участь сукцинат:КоQ-оксидоредуктаза (або комплекс II, що має сукцинат-дегідрогеназу з ФАД, 2–3 Fe-S білки і каталізує транспорт електронів від сукцинату на убіхінон), а також друга і третя ланки спряження. У цьому випадку – при перенесенні пари електронів по дихальному ланцюгу від сукцинату до кисню в окисно-відновних реакціях – виділяється енергія, яка забезпечує синтез двох молекул АТФ.

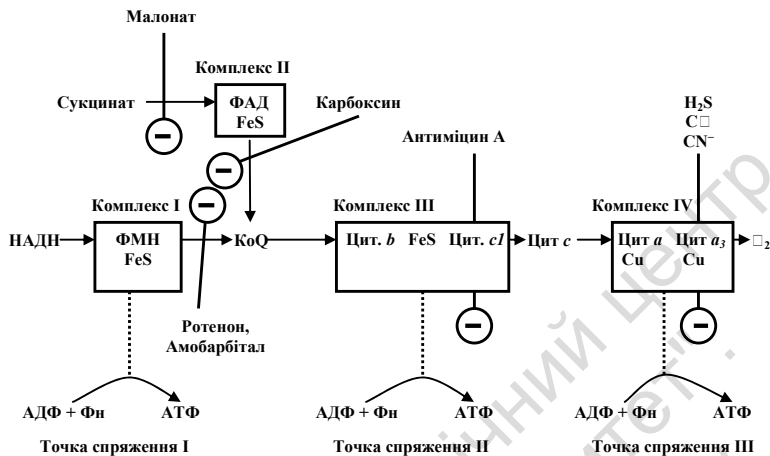


Рис. 5.2. Розташування комплексів дихального ланцюга, ланок спряження та місць дії інгібіторів дихального ланцюга

5.2.2. Інгібітори дихального ланцюга

Блокаторами дихального ланцюга (рис. 5.2) є:

- 1) барбітурати і ротенон (НАДН : КоQ);
- 2) антиміцин (цитохром *b* : цитохром *c1*);
- 3) теноїлфторацетон (сукцинатдегідрогеназа : КоQ);
- 4) ціаніди, азиди, оксид вуглецю (II), сірководень (цитохромоксидаза).

5.2.3. Механізм окисного фосфорилування

Спряженість процесів перенесення електронів по дихальному ланцюгу й окисного фосфорилування залучає два рівні – *енергетичний* (під час окисного фосфорилування для синтезу АТФ використовується енергія, яка виділяється під час руху протонів за градієнтом їхньої концентрації, створеним під час перенесення електронів по дихальному ланцюгу) і *просторовий* (внутрішня мембрана мітохондрій містить як компоненти дихального ланцюга, так і ферменти синтезу АТФ).

Фермент, що здійснює синтез АТФ – H^+ -АТФаза/АТФ-синтетаза – локалізований у внутрішній мембрані мітохондрій і складається із двох компонентів – F_0 і F_1 . Трансмембранною частиною F_0 (індекс “o” – від “олігоміцин”, оскільки цей антибіотик зв’язує молекулу АТФ-синтази в указаній ділянці та є її потужним інгібітором, а отже, і інгібітором окисного фосфорилування) фермент фіксується у мембрані; позамембранна частина F_1 звернена у бік мітохондріального матриксу.

Серед існуючих гіпотез спряження дихання і окисного фосфорилування загальноприйнятою є *хеміосмотична гіпотеза*, або *теорія Мітчела*. Згідно з нею, під час перенесення електронів протони викачуються із матриксу через внутрішню мембрану у водне середовище міжмембранного простору (рис. 5.3). Унаслідок цього по обидва боки внутрішньої мітохондріальної мембрани виникає градієнт концентрації іонів H^+ , і синтез АТФ, який потребує затрати енергії, здійснюється за рахунок осмотичної енергії цього градієнта. Створення такого градієнта стає можливим тому, що завдяки високій концентрації особливого гліцерофосфоліпиду – *кардіоліпіну* – внутрішня мітохондріальна мембрана є непроникною для H^+ .

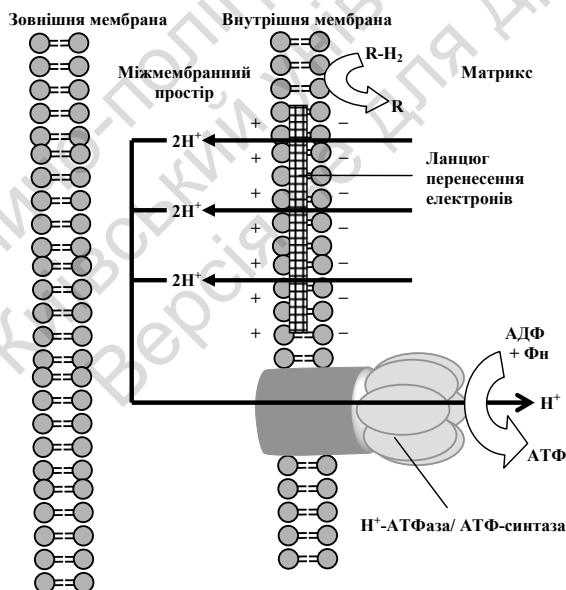


Рис. 5.3. Принцип спряження електронотранспортувального ланцюга мітохондрій та окисного фосфорилування

Протони, що виділилися в міжмембранний простір під час перенесення електронів, повертаються в мітохондріальний матрикс через спеціальні канали для цих іонів у молекулах АТФ-синтетази. Вони переміщуються за градієнтом концентрації, і під час їхнього переходу через молекули АТФ-синтетази виділяється вільна енергія, яка використовується на синтез АТФ із АДФ і фосфату. Надалі специфічний білок-переносник (*транслоказа аденілових нуклеотидів*) переносить синтезований АТФ із матриксу в цитоплазму в обмін на АДФ.

Є речовини, що роз'єднують перенесення електронів і синтез АТФ – наприклад, 2,4-динітрофенол, дикумарин, вільні жирні кислоти, похідні саліцилової кислоти. Вони мають назву *роз'єднувальних агентів* і пригнічують фосфорилування АДФ до АТФ, не впливаючи на перенесення електронів у мітохондріях. У їхній присутності вільна енергія переходить у тепло, а не запасасться у вигляді АТФ. Ці ліпофільні сполуки різко підвищують проникність внутрішньої мітохондріальної мембрани для іонів H^+ , оскільки мають здатність зв'язувати іони H^+ з одного боку мембрани і переносити їх через мембрану на інший бік – туди, де їхня концентрація є нижчою.

Лабораторна робота № 5.4

Вивчення окисного фосфорилування

Як уже знаємо, у внутрішній мембрані мітохондрій локалізований дихальний (*електронотранспортувальний*) ланцюг, який містить переносники електронів. У ході окисно-відновних реакцій електрони досягають кисню; їхнім джерелом в основному є атоми водню, що утворилися в результаті перетворення продуктів метаболізму білків, вуглеводів і ліпідів. Енергія окиснення використовується H^+ -АТФазою/АТФ-синтетазою, яка локалізована в тій же внутрішній мембрані мітохондрій для синтезу АТФ із АДФ і неорганічного фосфату.

Дослід 1. Отримання суспензії мітохондрій

Матеріали та реактиви. Скелетний м'яз щура, середовище виділення (містить 0,1 М KCl; 0,05 М трис-HCl (pH 7,4); 1 mM $MgCl_2$), реактиви для визначення вмісту білка в пробі за методом Лоурі або з використанням біуретового реактиву (див. дод. № 10 і 11), альбумін.

Обладнання. Стакан, чашка Петрі, ступка з товкачиком або гомогенізатор Понтера – Ельвегейма, льодяна баня, ваги для вимірювання маси тканини, фільтрувальний папір, ножиці, центрифужні пробірки, піпетки, центрифуга (600–11 000 g), годинник, марля для фільтрування, скляні палички.

Хід роботи. Наважку (5 г) скелетного м'яза задніх кінцівок свіжозабитого декапітацією щура звільняють від жиру, сухожил'я і нервів, поміщають у стакан (50 мл) із охолодженням до 0 °С середовищем виділення. Через 5 хв м'язи переносять у чашку Петрі або у фарфорову чашку на льоду. М'язову тканину обсушують фільтрувальним папером, ретельно подрібнюють ножицями і розтирають товкачиком у фарфоровій ступці або гомогенізують у гомогенізаторі Понтера – Ельвегейма тефлоновим товкачиком до отримання однорідної маси. Визначають чисту масу тканини. Додають середовище виділення в такій кількості, щоб його загальний об'єм у 4 рази перевищував об'єм тканини. Отриманий розведений гомогенат м'язової тканини переносять у центрифужні пробірки і центрифугують при 0–4 °С 7 хв при 600 g. Надосадову рідину центрифугують додатково ще 2 хв при 2000 g для більш повного видалення міофібрил. Отриману надосадову рідину (супернатант) фільтрують через 4 шари марлі й центрифугують ще один раз 20 хв при 11000 g для осадження мітохондрій.

Поверхню отриманого осаду мітохондрій обережно ополіскують 2 мл середовища виділення для видалення верхнього пухкого шару, який містить домішки саркоплазматичного ретикулуму.

Осад мітохондрій ресуспендують середовищем виділення із розрахунку 5 мл на 2 г тканини й обережно розтирають скляною паличкою до стану суспензії. Проводять визначення вмісту білка в пробі мітохондрій за методом Лоурі або з використанням біуретового реактиву (див. дод. № 10 і 11).

До суспензії мітохондрій із міоцитів скелетного м'яза додають альбумін до кінцевої концентрації 0,1% (подовжує термін зберігання) і поміщають у холодильник при 0–4 °С. Термін зберігання мітохондрій – до трьох діб.

Дослід 2. Отримання субмітохондріальних фрагментів

Фрагменти внутрішньої мембрани мітохондрій, які не містять ферментів ЦТК, але містять весь набір переносників дихального ланцюга, отримали назву *субмітохондріальних фрагментів (СМФ) або препарат Кейліна – Харти*.

Принцип отримання СМФ полягає в екстракції подрібненої тканини сольовими буферними розчинами, руйнуванні її за допомогою абразивних матеріалів і фракціонування центрифугуванням.

Матеріали та реактиви. М'язова тканина, 0,1 М фосфатний буфер (рН 7,4) (див. дод. № 5), 0,02 М охолоджений (0–4 °С) фосфатний буфер, кварцевий пісок, фосфатно-боратний буфер (див. дод. № 5).

Обладнання. Великий стакан чи емальована каструля, ножиці, годинник, марля для фільтрування, велика фарфорова ступка, льодяна баня, фільтрувальний папір, центрифужні пробірки, піпетки, центрифуга (2500 g), скляні палички.

Хід роботи. Препарат отримують із м'язової тканини, яку (приблизно 200 г) нарізають шматочками 3 × 3 см, опускають у великий стакан чи емальовану каструлю і заливають 5 л холодної водопровідної води, ретельно перемішують протягом 20 хв. Після перемішування воду зливають, а масу, яка залишилася, фільтрують через чотири шари марлі й ретельно віджимають. Описану процедуру повторюють 5–6 разів, поки подрібнена м'язова тканина не стане жовто-рожевого кольору. Потім цю м'язову тканину заливають 5 л 0,1 М фосфатного буфера (див. дод. № 5), охолоджують до 4 °С і залишають на 2 год при неперервному перемішуванні. Екстракт зливають, а м'язову масу, яка залишилася, двічі промивають 5 л дистильованої води і сильно віджимають. Віджати м'язовий препарат поміщають у велику фарфорову ступку, яка розташована на льоду, додають 100 мл фосфатного буфера (рН 7,4) і 20 г кварцевого піску. Суміш ретельно розтирають товчачиком до отримання гомогенної маси. До неї додають 200 мл 0,02 М охолодженого (0–4 °С) фосфатного буфера й ретельно перемішують.

Отриманий препарат центрифугують при 0–4 °С 30 хв при 2500 g. Надосадову рідину зливають, а до осаду додають 2 мл фосфатно-боратного буфера (див. дод. № 5), суміш ресуспендують, обережно розтирають скляною паличкою.

Отриманий препарат СМФ можна зберігати при 0 °С протягом декількох діб.

Дослід 3. Отримання субмітохондріальних частинок із використанням ультразвуку

Один із методів отримання замкнених фрагментів внутрішньої мембрани мітохондрій – субмітохондріальних частинок (СМЧ) – це обробка ультразвуком попередньо виділених мітохондрій. Отримані

за цих умов СМЧ мають таку орієнтацію мембрани, що внутрішня поверхня (обернена до матриксу) внутрішньої мембрани мітохондрії стає зовнішньою, оберненою до середовища інкубації.

Матеріали та реактиви. Суспензія мітохондрій, отримана в лабораторній роботі № 5.4, досліді 1, середовище інкубації (містить 0,15 М сахарозу та 1 мМ ЕДТО (pH 7,5)), 1 н. розчин NH_4OH , середовище переосадження СМЧ (0,25 М KCl ; 75 мМ сахароза; 30 мМ трис- SO_4 ; 2 мМ ЕДТО (pH 8,0)), 0,25 М сахароза, рідкий азот.

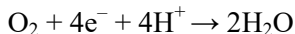
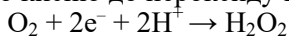
Обладнання. Скляний стаканчик, годинник, льодяна баня, крапельниці, паперовий універсальний індикатор pH, ультразвуковий дезінтегратор УЗДН-1 (УЗДН-2), центрифужні пробірки, рефрижераторна центрифуга (26000–40000 g), піпетки, скляні палички.

Хід роботи. Суспензію мітохондрій за кімнатної температури суспендують у середовищі інкубації, яке містить 0,15 М сахарозу, 1 мМ ЕДТО (pH 7,5) до концентрації білка 20 мг/мл. До отриманої суспензії мітохондрій, яку поміщають у скляний стаканчик на льоду, додають краплями 1 н. розчин NH_4OH , доводячи pH до значень 9,1–9,2 (перевіряють універсальним паперовим індикатором). Надалі цю суспензію обробляють на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН-1 (УЗДН-2) або подібному при 22 кГц на максимальній потужності протягом 2 хв (по 1 хв з перервою 30 с), ретельно охолоджуючи. Після цього оброблену ультразвуком суспензію центрифугують 10 хв при 26000 g (0–4 °C). Надосадову рідину ще раз центрифугують 1,5 год при 40000 g (0–4 °C). Осад СМЧ суспендують у середовищі переосадження СМЧ: 0,25 М KCl ; 75 мМ сахароза; 30 мМ трис- SO_4 ; 2 мМ ЕДТО (pH 8,0). Отриманий осад СМЧ ресуспендують у мінімальному об'ємі 0,25 М сахарози й обережно розтирають скляною паличкою до стану суспензії. Зберігати СМЧ найкраще в рідкому азоті (до кількох місяців).

Дослід 4. Визначення ступеню спряження процесів окиснення і фосфорилування

Одним із основних показників, які характеризують функціональний стан мітохондрій, є їх здатність до поглинання кисню, а також залежність цього процесу від спряження з фосфорилуванням (синтез АТФ із АДФ і неорганічного фосфату).

Одним із широковживаних методів виміру концентрації кисню є полярографічний. Він базується на електрохімічній реакції відновлення розчинного кисню до пероксиду водню і води:



При розрахунку полярограм ідентифікують метаболічні стани мітохондрій за Чансом і розраховують швидкість дихання в цих станах. На рис. 5.4 наведено типову криву споживання кисню мітохондріями.

Стан 1 реалізується за відсутності субстратів дихання та фосфорилування, що додаються ззовні, переносники електронотранспортувального ланцюга частково відновлені; додавання субстрату окиснення переводить мітохондрії в стан 2; стан 2 – “вільний” (до мітохондрій доданий екзогенний субстрат (S), за відсутності акцептора фосфату; швидкість дихання (V_4^S) незначна, фосфорилування не відбувається); стан 3 – “активний” (мітохондрії із субстратом окиснення і доданий у момент t_1 АДФ; швидкість дихання (V_3) значно зростає, процес дихання супроводжується фосфорилуванням); стан 4 – “контрольований” (у момент часу t_2 в системі вичерпується доданий акцептор фосфату, але концентрація субстратів окиснення продовжує залишатися високою; швидкість поглинання кисню ($V_4^{\text{АТФ}}$) порівняно зі станом 3 падає); стан 5 – стан анаеробіозу (мітохондрії перебувають в умовах відсутності O_2), у якому всі переносники електронотранспортувального ланцюга відновлені.

Функціональний стан мітохондрій визначають за декількома показниками. Одним із них є коефіцієнт дихального контролю (ДК):

$$\text{ДК} = V_3/V_4^{\text{АТФ}},$$

де V_3 – швидкість дихання (мктом $\text{O}_2/\text{хв} \times \text{мг білка}$) у стані 3 (за присутності АДФ);

$V_4^{\text{АТФ}}$ – швидкість дихання (мктом $\text{O}_2/\text{хв} \times \text{мг білка}$) у стані 4 (весь АДФ перейшов у АТФ).

Ще одним із найважливіших показників є відношення АДФ/О (або P/O), яке характеризує кількість молекул АДФ, котрі перетворилися на АТФ, у розрахунку на один атом спожитого кисню. Теоретичне значення відношення АДФ/О при окисненні таких субстратів, як ізоцитрат, α -кетоглутарат і малат, де в ролі відновного еквівалента виступає НАДН, дорівнює 3. Для такого субстрату як сукцинат, для якого відновним еквівалентом є ФАДН₂, це відношення дорівнює 2. На практиці експериментальні значення відношення

АДФ/О завжди дещо нижчі, ніж розрахункові величини, що пояснюють частковим роз'єднанням дихального ланцюга й окисного фосфорилування, а також функціонуванням H^+ -АТФази.

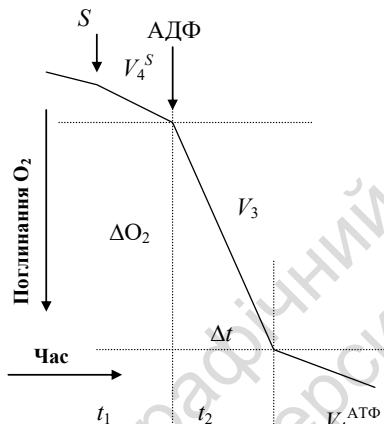


Рис 5.4. Схематичне зображення полярографічної реєстрації дихання мітохондрій

Відношення $V_3/V_4^{АТФ}$ характеризує активність АТФ-гідролазних реакцій мітохондрій, які регенерують АДФ після його фосфорилування. Величина відношення $АДФ/\Delta t$ (М/хв×мг білка) відповідає швидкості фосфорилування.

Матеріали та реактиви. Середовище інкубації для мітохондрій із скелетних м'язів (містить 0,1 М КСІ; 0,02 М фосфат калію; 5 мМ $MgCl_2$ (рН 7,4)), густий розчин суспензії мітохондрій, виділених із скелетних м'язів (див. лабораторну роботу № 5.4, дослід 1), реактиви для визначення вмісту білка за методом Лоурі або із застосуванням біурету (див. дод. № 10 і 11), субстрат окиснення (кінцева концентрація сукцинату, або малату, або α -кетоглутарату – 10 мМ), АДФ у кінцевій концентрації 200 мкМ, 100 мкМ 2,4-динітрофенол.

Обладнання. Полярограф з платиновим електродом (типу LP-7), термостатована (25 °С) полярографічна кювета, годинник, піпетки.

Хід роботи. Величину дифузійного струму, який виникає при полярографічному вимірі концентрації кисню, визначають на полярографі з платиновим електродом (типу LP-7) із використанням термо-

статованої (25 °С) полярографічної кювети. У цю кювету додають 2 мл середовища інкубації для мітохондрій із скелетних м'язів: 0,1 М КСl; 0,02 М фосфату калію; 5 мМ MgCl₂ (рН 7,4). Електроди (платиновий і хлор-срібний порівняння) занурюють у середовище інкубації і виставляють перо самописця у вихідне положення. Реакцію ініціюють додаванням у середовище інкубації 0,05 мл густого розчину суспензії мітохондрій, виділених із скелетних м'язів (див. лаб. роботу № 5.4, дослід 1), яка містить 5–7 мг білка (визначення вмісту білка здійснюють методом Лоурі або із застосуванням біурету – див. дод. № 10 і 11). Через 30–40 с у полярографічну кювету додають субстрат окиснення: кінцева концентрація сукцинату, або малату, або α -кетоглутарату – 10 мМ. Реєструють постійну швидкість дихання і через 40–60 с додають ще АДФ у кінцевій концентрації 200 мкМ. Після послідовного вимірювання швидкостей дихання ($V_4^S \rightarrow V_3 \rightarrow V_4^{ATF}$) через 1–2 хв додають 100 мкМ 2,4-динітрофенол. Реєструють зменшення кисню в кюветі до стану анаеробіозу.

Ураховують той факт, що за описаних вище стандартних умов 1 мл середовища містить 500 нг атомів кисню. Швидкість дихання розраховують на 1 мг білка мітохондрій за 1 хв. Визначають значення коефіцієнтів дихального контролю (ДК), і фосфорилювання (АДФ/О), швидкість фосфорилювання (АДФ/ Δt), відношення V_4^S/V_4^{ATF} .

Результати досліджень заносять у табл. 5.1 і роблять висновки стосовно перебігу процесу окисного фосфорилювання за субстратів сукцинату, малату і α -кетоглутарату.

Таблиця 5.1

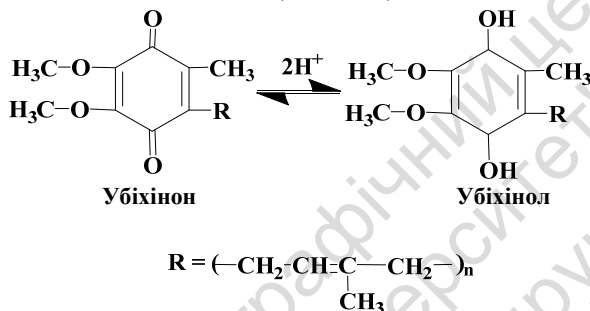
**Показники інтенсивності дихальної
та фосфорилюючої здатності мітохондрій скелетних м'язів**

Субстрат	Показники							
	V_4^S , мкатом О ₂ /хв·мг білка	V_3 , мкатом О ₂ /хв·мг білка	V_4^{ATF} , мкатом О ₂ /хв·мг білка	Δt , хв	ДК	АДФ/О М/мкатом О	V_4^S/V_4^{ATF}	АДФ/ Δt , М/хв·мг білка
Сукцинат								
Малат								
α -Кетоглутарат								

Дослід 5. Визначення кількості та редокс-стану убіхінону в мітохондріях

Убіхінон (коензим Q, CoQ) є одним із переносників електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій. Для його відновлення електрони потрапляють із НАДН:КоQ-оксидоредуктази (першої ланки спряження) та сукцинатдегідогеназного комплексу.

Убіхінон відновлюється до убіхінолу:



В убіхіноні кількість ізопренових ланок (n) у боковому ланцюзі варіює від шести (у деяких дріжджів і бактерій) до десяти (у ссавців). Наявність довгого бокового вуглецевого ланцюга визначає гідрофобність молекул убіхінону.

Убіхінон може бути екстрагований із внутрішньої мембрани мітохондрій без суттєвого змiну його редокс-стану (вміст у відсотках окисненої форми убіхінону до його загальної кількості в мітохондріях). Це дає можливість оцінити функціональну активність дихального ланцюга.

Матеріали та реактиви. Суміш пентану з 95%-м метанолом (1:1), суспензія мітохондрій, отримана у досліді 1 лабораторної роботи № 5.4, реактиви для визначення вмісту білка за методом Лоурі або за допомогою біуретового реактиву (див. дод. № 10 і 11), 95%-й метанол, розчин FeCl_3 в абсолютному етанолі (5 мг/мл), абсолютний етанол, сухий боргідрид натрію (NaBH_4).

Обладнання. Пробірки з притертими пробками, піпетки, годинник, морозильна камера, рефрижераторна центрифуга (2000 g), центрифужні пробірки, роторний водострумний насос, спектрофотометр для вимірювання за довжини хвилі 275 нм, кювети завтовшки 10 мм.

Хід роботи. У пробірку з притертою пробкою наливають 10 мл суміші пентану з 95%-м метанолом (1:1) і охолоджують у морозильній камері (-20°C). У пробірку додають по 1 мл суспензії мітохондрій (виділення мітохондрій див. дослід 1, лабораторну роботу № 5.4 цього розділу). Концентрація білка в суспензії мітохондрій має бути 15–20 мг/мл (визначення вмісту білка здійснюють методом Лоурі або за допомогою біуретового реактиву – див. дод. №10 і 11). Пробірку енергійно струшують протягом 5 хв. Потім суміш залишають при -20°C на 1 год. За цей час екстрагуються речовини, які здатні поглинати ультрафіолетове випромінювання, що перешкоджає подальшому визначенню вмісту убіхінону. Через 1 год пробу знову енергійно струшують і центрифугують 5 хв при 2000 g за температури -20°C (у рефрижераторній центрифугі) для розшарування пентанової та метанолової фаз. Верхній шар (пентановий екстракт) обережно відсмоктують піпеткою. Із метанолової фази ще двічі екстрагують убіхінон, додаючи кожний раз по 5 мл охолодженого пентану і центрифугують суміш пентану і метанолу. Об'єднаний пентановий екстракт додатково ще три рази промивають 5 мл 95%-го метанолу (розділяють пентанову і метанолову фази центрифугуванням 5 хв при 2000 g за -20°C). Після кожного центрифугування верхній пентановий шар обережно відсмоктують піпеткою. Потрібне промивання метанолом пентанового екстракту необхідне для вилучення сполук, які здатні поглинати в ультрафіолетовій області.

Пентановий екстракт убіхінону ділять на дві рівні частини. До однієї з них додають 3 мл розчину FeCl_3 в абсолютному етанолі (5 мг/мл), а до другої – 3 мл абсолютного етанолу. Проби залишають за кімнатної температури на 2 год. У першій пробі відбувається окиснення всієї кількості убіхінону FeCl_3 , а в другій пробі редокс-стан убіхінону залишається незмінним.

Через 2 год до проб додають по 2 мл дистильованої води для розшарування фаз пентану і етанолу, струшують і залишають при -20°C на 1 год. Потім відбирають піпеткою верхню пентанову фазу, випарюють досуха під вакуумом (на роторному водоструминному насосі) і сухий залишок розчиняють абсолютним етанолом. Цей розчин спектрофотометрують при 275 нм і визначають екстинцію для повністю окисненого убіхінону (E_1) і убіхінону в незмінному редокс-стані (E_2). Потім до обох проб додають декілька кристалів сухого боргідрида натрію (NaBH_4), що спричиняє повне відновлення убіхінону. Екстинцію відновленого убіхінону (KoQH_2) вимірюють при 275 нм (E_3).

Вміст убіхінону в мітохондріях виражають у мкмоль/мг білка мітохондрій, а редокс-стан – у відсотковому відношенні окисненої форми до загальної кількості убіхінону. Ураховують, що коефіцієнт молярної екстинції ($\Delta E^{275}_{\text{м}}$ окиснена-відновлена форма) дорівнює $12,25 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

Розрахунок вмісту убіхінону в мітохондріях та його редокс-стану проводять за формулами:

$$A_1 = (E_1 - E_3) \times V / 12,25 \times a,$$

$$A_2 = (E_2 - E_3) \times V / 12,25 \times a,$$

$$B = A_2 / A_1 \times 100\%$$

де A_1 – загальна кількість убіхінону в пробі (мкмоль/мг білка);

A_2 – кількість окисненої форми убіхінону (мкмоль/мг білка);

B – редокс-стан убіхінону в мітохондріях (%);

V – об'єм етанолового екстракту в пробі (4 мл);

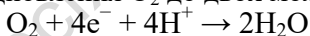
E_1, E_2, E_3 – відповідні значення екстинції окисненої, за незмінного редокс-стану та відновленої форми убіхінону;

a – вміст білка в пробі, мг.

Розрахунок вмісту убіхінону в мітохондріях та його редокс-стану й отриманий результат записують у зошит.

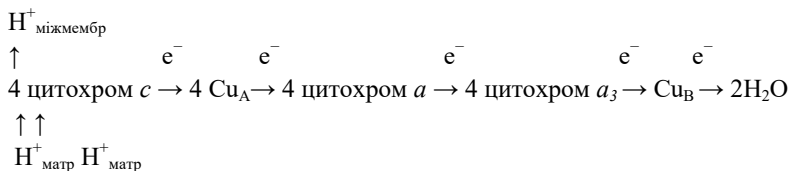
Дослід 6. Визначення активності цитохромоксидази

Цитохромоксидаза (цитохром *c*-оксидоредуктаза) є кінцевою ділянкою дихального ланцюга мітохондрій (третя ланка спряження дихального ланцюга). До її складу входять цитохроми a і a_3 , а також два мідьвмісні протеїни (Cu_A і Cu_B). Цитохромоксидаза каталізує відновлення O_2 до двох молекул H_2O :



Джерелом електронів для цитохромоксидазного комплексу є відновлений цитохром *c* (фероцитохром *c*), аскорбат (за участю феназинметасульфату або N,N,N',N' -тетраметилпарафенілдіаміну, які переносять електрони від аскорбату через зовнішню мембрану) і розчинний цитохром *c* (міститься у міжмембранному просторі).

Електрони від цитохрому *c* до O_2 переносяться відповідно до схеми:



Спряжено з перенесенням електронів між компонентами цитохромоксидази відбувається трансмембранний транспорт H^+ , що приводить до утворення *градієнта електрохімічного потенціалу іонів водню* ($\Delta\mu_{H^+}$), який використовується для енергозабезпечення при синтезі АТФ з АДФ та неорганічного фосфату H^+ -АТФазою/АТФ-синтетазою мітохондрій.

Матеріали та реактиви. Фосфатний буфер із рН 7,2 (див. дод. № 5), суспензія субмітохондріальних частинок, яка містить 0,2 мг/мл білка (див. лабораторну роботу № 5.4, дослід 3), 25 мкМ цитохром *c*.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, годинник, спектрофотометр для вимірювання за довжини хвилі 550 нм, кювети завтовшки 10 мм.

Хід роботи. У пробірку наливають 2 мл фосфатного буфера з рН 7,2 (див. дод. № 5) і додають суспензію субмітохондріальних частинок, яка містить 0,2 мг/мл білка (див. лабораторну роботу № 5.4, дослід 3), об'єм проби доводять до 3 мл фосфатним буфером.

Реакцію ініціюють внесенням у пробу 0,5 мл 25 мкМ цитохрому *c* та інкубують 3 хв. Після завершення інкубації розчин спектрофотометрують (кювета шириною 1 см) при довжині хвилі 550 нм (визначають значення екстинції E_1). У контрольну пробу замість суспензії СМЧ додають 0,1 мл дистильованої води (екстинція E_2).

Активність (A) цитохромоксидази (ммоль окисненої форми цитохрому *c*/хв $\times$ мг білка) розраховують за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \times V}{a \times \xi \times t},$$

де ΔE – різниця значення оптичної густини дослідної та контрольної проби ($E_1 - E_2$);

V – об'єм проби (3,5 мл);

a – вміст білка у пробі (2 мг);

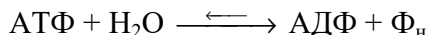
ξ – коефіцієнт молярної екстинції відновленої форми цитохрому *c*, який дорівнює $21,0 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$;

t – час інкубації (3 хв).

Розрахунок активності цитохромоксидази в мітохондріях і отриманий результат записують у зошит.

Дослід 7. Визначення АТФазної активності мітохондрій

H^+ -АТФаза/АТФ-синтетаза мітохондрій каталізує реакцію гідролізу АТФ до АДФ і неорганічного фосфату (Φ_n). Ця ферментативна система є оборотною, тобто за певних умов може синтезувати АТФ з АДФ та Φ_n :



Специфічним інгібітором H^+ -АТФази є олігоміцин.

АТФазна реакція служить зручним об'єктом для вивчення механізму окисного фосфорилування. Функціонування H^+ -АТФази потребує присутності Mg^{2+} . Цей фермент локалізований, як і дихальний ланцюг, у внутрішній мембрані мітохондрій, тому зручним об'єктом для його вивчення є субмітохондріальні частинки.

Матеріали та реактиви. Середовище інкубації (містить 0,1 М KCl ; 5 мМ трис- HCl , 2 мМ MgCl_2 , 50 мкМ ЕДТО (рН 7,4)), 0,025 М розчин АТФ (рН 7,4), суспензія субмітохондріальних частинок (див. лабораторну роботу № 5.4, дослід 3), реактиви для визначення вмісту білка методом Лоурі чи реакцією з біуретовим реактивом (див. дод. №10 і 11), 25 мкМ цитохром *c*, стандартні розчини KH_2PO_4 , які містять від 0,2 до 2,0 мкмоль фосфату в пробі, молібденовий реактив (суміш рівних об'ємів 2,5%-го розчину $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ і 5 н. розчину H_2SO_4), розчин ейконогена (250 мг ейконогена, 15 г NaHSO_4 і 0,5 г Na_2SO_3 розчиняють у 100 мл дистильованої води).

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, годинник, спектрофотометр для вимірювання за довжини хвилі 625 нм, кювети завтовшки 10 мм.

Хід роботи. У пробірку наливають 5 мл середовища інкубації, яке містить 0,1 М KCl ; 5 мМ трис- HCl , 2 мМ MgCl_2 , 50 мкМ ЕДТО (рН 7,4). Безпосередньо перед виміром додають ще 0,1 мл 0,025 М розчину АТФ (рН 7,4). Реакцію ініціюють внесенням у пробу суспензії СМЧ (див. лаб. роботу № 5.4, дослід 3) із розрахунку 5 мг білка на пробу (вміст білка у пробі визначають методом Лоурі чи реакцією з біуретовим реактивом – див. дод. № 10 і 11). Через 10 хв інкубації в пробі визначають $\text{Ф}_\text{н}$, кількість якого розраховують за калібрувальним графіком (у мкмоль $\text{Ф}_\text{н}$ за 1 хв на 1 мг білка). Для його побудови використовують стандартні розчини KH_2PO_4 , які містять від 0,2 до 2,0 мкмоль фосфату в пробі.

Для визначення $\text{Ф}_\text{н}$ використовують метод Фіске – Субароу. У пробірку до досліджуваного розчину, який містить від 0,2 до 2,0 мкмоль неорганічного фосфату, додають до 2 мл дистильованої води і 1,5 мл молібденового реактиву. Об'єм проби – до 4,8 мл. Отриману суміш ретельно перемішують. Потім до проби додають 0,2 мл розчину ейконогена, все знову ретельно перемішують

і ставлять у термостат при 37 °С на 10–15 хв або залишають при кімнатній температурі на 30–40 хв. Після цього розчин охолоджують і спектрофотометрують при 625 нм (визначають величину екстинції). За значеннями екстинції стандартних розчинів KN_2PO_4 будують калібрувальний графік залежності екстинції розчинів від вмісту в них фосфату (мкмоль). За графіком знаходять кількість фосфату, що відповідає виміреній екстинції досліджувальної проби. Враховуючи кількість утвореного Φ_n , час інкубації (10 хв) і кількість білка у пробі (5 мг), розраховують АТФазну активність мітохондрій (мкмоль $\Phi_n/\text{хв} \times \text{мг}$ білка). Розрахунки й отриманий результат записують у зошит.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Сучасні уявлення про механізми окисного фосфорилування.
2. Які комплекси можна виділити в дихальному ланцюзі?
3. На яких етапах переносу електронів здійснюється спряження дихального ланцюга й окисного фосфорилування?
4. Яка роль кардіоліпіну в процесах окисного фосфорилування?
5. Як працюють роз'єднувачі окисного фосфорилування та інгібітори дихального ланцюга?

ТЕМА 3. ОСОБЛИВОСТІ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ У М'ЯЗАХ І В НЕРВОВІЙ СИСТЕМІ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

Енергетичний обмін у м'язах і в нервовій тканині має свої особливості через високу метаболічну активність даних структур, а також внаслідок того, що фізіологічні функції, які вони здійснюють, потребують високих енерговитрат.

5.3.1. Особливості енергетичного обміну у м'язах. Джерела АТФ для роботи м'язів

Залежно від типу роботи, яку виконує м'яз, можливі різні джерела постачання АТФ для його скорочень:

- *окисне фосфорилування* – аеробний процес, джерело АТФ при легкій і помірній роботі;

- *субстратне фосфорилування* – здійснюється в процесі анаеробного гліколізу, є джерелом АТФ за тяжкої фізичної праці, супроводжується утворенням молочної кислоти);

- *аденілаткіназна реакція:*



- *креатинфосфат*, який утворюється з АТФ та креатину в реакції:

Креатинкіназа



Екстреним механізмом ресинтезу АТФ є креатинкіназний шлях (до 6–10 с інтенсивної роботи м'язів), посилення гліколізу починається з 20-ї с (максимум – на 40-й), а за більш тривалої роботи найважливішим стає окисне фосфорилування.

5.3.2. Роль креатину та його похідних у функціонуванні м'язів

Креатин – це азотиста сполука, що у вигляді креатинфосфату відіграє важливу роль в енергозабезпеченні функції м'язів. Попередниками в біосинтезі креатину, схему якого наведено на рис. 5.5, виступають амінокислоти гліцин, аргінін і метіонін. У цьому процесі беруть участь два ферменти – *гліцинамідинонотрансфераза* нирок (реакція 1, рис. 5.5) і *гуанідинацетатметилтрансфераза* печінки (реакція 2, рис. 5.5; цей фермент потребує залучення донора метильної групи S-аденозилметіоніну).

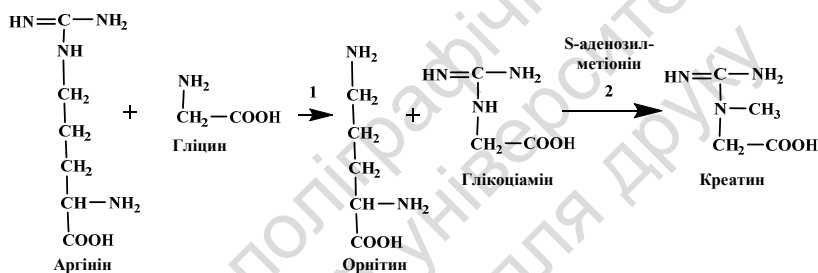


Рис. 5.5. Схема біосинтезу креатину (1 – гліцинамідинонотрансфераза, 2 – гуанідинацетатметилтрансфераза)

Формування макроергічної сполуки *креатинфосфату*, який виступає джерелом термінової регенерації АТФ при м'язовому скороченні, здійснюється в реакції фосфорилування креатину із залученням ферменту *креатинкінази* (реакція 3, рис. 5.6; детальніше про фермент креатинкіназу та його ізоформи див. підрозд. 1.12).

При необоротній неферментативній дегідратації та дефосфорилюванні креатинфосфату (реакція 4, рис. 5.6) формується *креатинін*. За наявності АДФ креатинфосфат не перетворюється на креатинін, а віддає на АДФ фосфатну групу, унаслідок чого генерується АТФ.

Креатину в сечі слідові кількості. При м'язових дистрофіях, міастенії (м'язова слабкість з ознаками паралічу), міозиті (запалення скелетних м'язів) порушується утворення і виведення креатиніну, і спостерігається *креатинурія* з одночасним зменшенням утворення

креатинфосфату. Аналогічні зміни – при зменшенні маси тіла через голодування, діабет, гіпертиреоз; при порушеннях функцій нирок (зниження ниркового порогу для креатину); при інфекційних ушкодженнях, що порушують функції нирок і печінки.

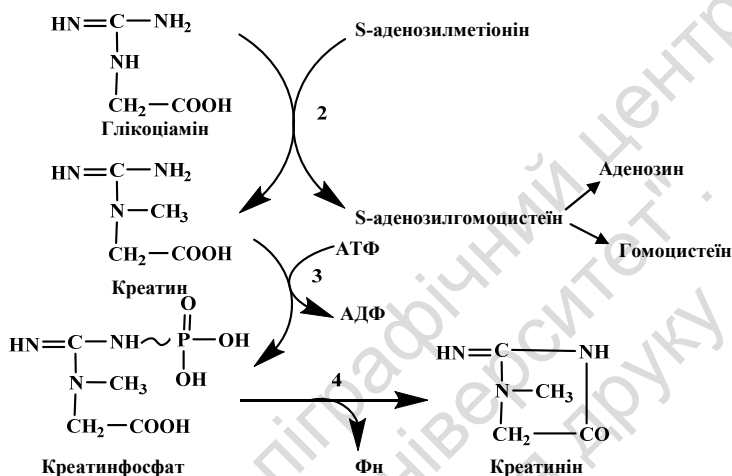


Рис. 5.6. Схема перетворення глікоціаміну до креатину та креатиніну

Фізіологічні креатинурії можуть спостерігатися у дітей через посилений синтез креатину, який випереджує розвиток м'язів (дитяча креатинурія), у людей похилого віку внаслідок атрофії м'язів і неповне використання креатину, у вагітних (через нейроендокринні зміни); при вживанні продуктів харчування, багатих на креатин, може розвинутися аліментарна креатинурія.

Креатинін у ниркових каналцях не реабсорбується і повністю виходить із сечею; у вигляді креатиніну з організму людини виділяється із сечею значна частина азоту амінокислот; у здорової людини виділення креатиніну пропорційне масі м'язової тканини (чоловіки – 18–32, жінки – 10–25 мг/кг маси тіла). *Креатинінемія* свідчить про порушення видільної функції нирок (підвищення вмісту креатиніну в сироватці крові вдвічі супроводжується зниженням ниркової фільтрації на 50%), а також може бути ознакою порушення відтоку сечі через нирковий камінь, кишкову непрохідність тощо.

5.3.3. Особливості енергетичного обміну в нервовій тканині

Рівень метаболічних процесів у різних ділянках нервової системи є неоднаковим. Найменша інтенсивність метаболізму характерна для спинного мозку і периферійних нервів, найвища – для головного мозку (за використанням кисню і глюкози цей орган посідає перше місце: 20–25% кисню, що надходить до організму, і до 70% глюкози, яка виділяється із печінки в артеріальну кров, спрямовуються саме сюди). Для нейронів рівень обмінних процесів є вищим, ніж для гліальних клітин.

Основним субстратом окиснення, який постачає мозку енергію, є глюкоза. Власні глікогенні резерви мозку незначні, тому цей орган є найчутливішим до гіпоксії та гіпоглікемії. Як другорядні енергетичні субстрати клітини НС можуть використовувати глутамат і аспартат, в умовах голодування і в ранній постнатальний період – жирні кислоти й кетонові тіла.

5.3.4. Енерговитратні процеси нервової системи

Висока інтенсивність енергетичного обміну є фактором, що забезпечує перебіг таких специфічних функцій нервової системи, як:

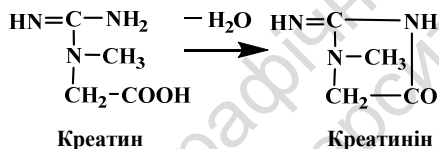
- *передача нервового імпульсу* – для створення електрохімічного градієнта за рахунок функціонування Na^+, K^+ -АТФази та його відновлення після проходження нервового імпульсу;
- *процеси збереження і переробки інформації* – синтез специфічних білків, нейропептидів, компонентів ліпо- і глікопротеїнових комплексів, що залучені в окремі етапи цих процесів;
- *синаптична передача* – енергетичнозалежне фосфорилування синаптичних білків забезпечує вихід низки нейромедіаторів у синаптичну щілину та їхнє зворотне поглинання; заповнення синаптичних везикул нейромедіатором здійснюється шляхом вторинно-активного транспорту;
- *аксональний і ретроградний транспорт* – функціонування білків динейну, кінезину тощо;

▪ підтримання певної конформації білків нейрофіламентів за рахунок їх фосфорилування/дефосфорилування, що важливо для певної просторової локалізації нервових відростків, а отже, і для здійснення нейрональних контактів, організації функціональних ансамблів нейронів і для інтегративної функції мозку.

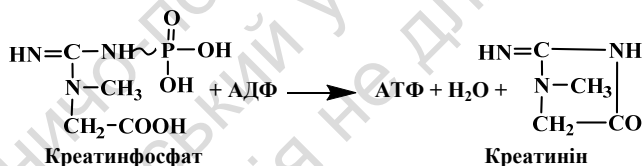
Лабораторна робота № 5.5

Виявлення креатиніну у м'язах і в сечі

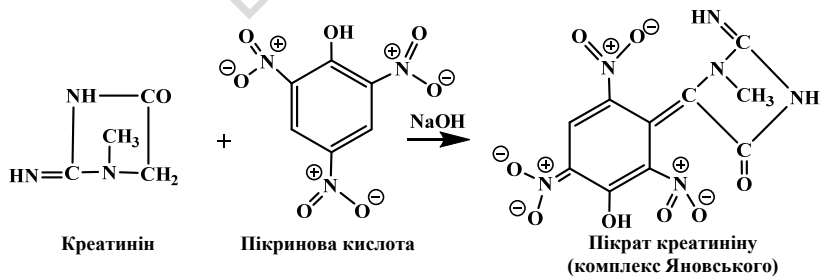
При нагріванні в кислому середовищі креатин втрачає молекулу води і перетворюється в креатинін:



Найбільша кількість креатиніну утворюється у м'язах під час дефосфорилування креатинфосфату:



Креатинін може бути виявлений у специфічних для нього реакціях, зокрема з пікриновою кислотою (реакція Яффе) або нітропрусидом натрію:



Матеріали та реактиви. М'язи щурів, сеча, 20%-й розчин сульфосаліцилової кислоти, 10%-й розчин соляної кислоти (або 10%-й розчин сірчаної кислоти), 10%-й розчин гідроксиду натрію, насичений розчин пікринової кислоти (або її 10%-й розчин), 5%-й свіжовиготовлений розчин нітропрусиду натрію.

Обладнання. Складні палички, пробірки, піпетки, скляні лійки, ступка з товкачиком, штатив для пробірок, ножиці, водяна баня, годинник.

Хід роботи. Для виявлення креатиніну у м'язах 1 г подрібнених м'язів розтирають 15–20 хв із 5 мл дистильованої води. Потім 5 мл отриманої суміші переносять у пробірку й додають 5 мл розчину сульфосаліцилової кислоти для осадження білків. Через 10 хв суміш фільтрують.

Для перетворення креатину на креатинін можна використати два способи:

А) у пробірку наливають 1–2 мл одержаного безбілкового фільтрату, таку саму кількість 10%-го розчину соляної кислоти й кип'ятять на водяній бані протягом 1,5–2 год, перетворюючи креатин на креатинін.

Б) у пробірку додають 1 мл одержаного безбілкового фільтрату м'язової тканини і 2 краплі 10%-го розчину H_2SO_4 . Пробірку закривають корком, у який вставлена як холодильник скляна трубка довжиною 25–30 см. Пробірку в штативі поміщають на азбестову сітку і кип'ятять 30 хв на слабкому вогні газового пальника. Це приводить до перетворення креатину на креатинін. Рідину охолоджують, нейтралізують 2–3 краплями 10%-го розчину питної соди й використовують для проведення реакцій на визначення креатиніну.

Надалі проводять якісні реакції на наявність креатиніну:

1) *Реакція з пікриновою кислотою.* До 10 крапель утвореного розчину креатиніну додають 5 крапель 10%-го розчину пікринової кислоти і 5 крапель 10%-го розчину NaOH (за іншим способом – у пробірку з утвореним розчином креатиніну додають 2 мл насиченого розчину пікринової кислоти та 3 мл 10%-го розчину гідроксиду натрію), ретельно перемішують. Розчин забарвлюється у помаранчево-червоний колір, який обумовлений утворенням пікрату креатиніну (похідного 2,4,6-тринітроциклогексادیєну).

2) *Реакція з нітропрусидом натрію* $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$. До 10 крапель одержаного розчину креатиніну додають 1 краплю 5%-го свіжовиготовленого розчину нітропрусиду натрію і 1 краплю 10%-го розчину NaOH . Рідина забарвлюється у червоний колір, який швидко переходить у жовтий. Забарвлення розчину обумовлене утворенням нестійкого нітрозокреатину.

Для виявлення креатиніну в сечі у пробірку додають 1 мл профільтрованої сечі, 5 мл дистильованої води, 0,5 мл 10%-го розчину гідроксиду натрію та 1 мл насиченого розчину пікринової кислоти. Суміш після ретельного перемішування набуває оранжевого забарвлення.

Спостереження записують у зошит, роблять висновки.

Лабораторна робота № 5.6

Визначення вмісту креатиніну і креатину в сечі

В основі методу лежить кольорова реакція креатиніну в лужному середовищі з пікриною кислотою (див. лабораторну роботу № 5.3) За інтенсивностями забарвлення стандартного розчину біхромату калію (забарвлення якого відповідає розчину 2,5 мг креатиніну у 250 мл розчину) і досліджуваної проби, які визначаються колориметрично, можна розрахувати масову концентрацію креатиніну в суміші.

Для знаходження масової концентрації креатиніну в сечі спочатку визначають вихідний вміст наявного в ній креатиніну (власне креатинін сечі). Потім креатин перетворюють на креатинін кип'ятінням сечі в кислому середовищі й визначають загальний вміст креатиніну (який відповідає сумі власне креатиніну сечі та креатиніну, що утворився із креатину). За різницею результатів двох визначень з урахуванням коефіцієнта переведення креатину в креатинін розраховують кількість креатину в сечі.

Матеріали та реактиви. Сеча, 10%-й розчин гідроксиду натрію, насичений розчин пікринової кислоти, стандартний 1%-й розчин біхромату калію, забарвлення якого відповідає розчину 2,5 мг креатиніну у 250 мл розчину.

Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, лійки скляні, мірні колби (об'єм 250 мл), конічні колби, штатив для пробірок, водяна баня, фотоколориметр, годинник.

Хід роботи. Масову концентрацію креатиніну та креатину в сечі визначають у двох порціях.

В одній із них одразу визначають вміст креатиніну (власне креатинін сечі). Із цією метою в мірну колбу додають 2 мл профільтрованої сечі, 5 мл насиченого розчину пікринової кислоти, 2 мл 10%-го розчину гідроксиду натрію й ретельно перемішують. Паралельно готують контрольну пробу (для чого в іншу

мірну колбу на 250 мл відміряють 2 мл дистильованої води, 5 мл насиченого розчину пікринової кислоти та 2 мл 10%-го розчину гідроксиду натрію). Через 10 хв вміст обох колб доводять дистильованою водою до об'єму 250 мл і колориметрують дослідну пробу та стандартний розчин біхромату калію проти контрольної проби (зелений світлофільтр, довжина хвилі 530 нм, товщина кювети 10 мм). Вміст креатиніну в сечі, мг/мл, розраховують за формулою:

$$C_1 = E_1 \times Q / E_2 \times V,$$

де E_1 і E_2 – значення оптичної густини стандартного розчину біхромату калію та досліджуваного розчину;

Q – маса креатиніну у 250 мл розчину, забарвлення якого відповідає забарвленню 1%-го стандартного розчину біхромату калію (2,5 мг);

V – об'єм профільтрованої сечі, який узяли для аналізу (2 мл).

В іншій порції сечі наявний креатин перетворюють на креатинін і визначають загальну кількість креатиніну (яка відповідає сумі власне креатиніну сечі та креатиніну, що утворився із креатину). Для цього в колбу об'ємом 250 мл вносять 2 мл досліджуваної сечі та 5 мл насиченого розчину пікринової кислоти. Фіксують рівень рідини в колбі, додають ще 100 мл дистильованої води та кип'ятять протягом години. Якщо внаслідок кип'ятіння рівень рідини в колбі буде нижчим за позначку, доливають дистильовану воду, якщо вищим – рідину упарюють до позначки.

Після охолодження в колбу вносять 2 мл розчину гідроксиду натрію, через 10 хв переливають у мірну колбу об'ємом 250 мл, додають дистильованої води до позначки 250 мл і колориметрують проти контрольної проби.

Масову концентрацію креатиніну в другій порції сечі (C_2) розраховують за такою ж формулою, як і в першій.

Різниця значень у другій і першій порціях з урахуванням коефіцієнта переведення креатину в креатинін дорівнює вмісту масової концентрації креатину в досліджуваній сечі:

$$C = (C_2 - C_1) \times K,$$

де C_1 і C_2 – масова концентрація креатиніну в першій та другій порціях сечі;

K – коефіцієнт переведення креатину в креатинін (1,16).

Розрахунок вмісту креатину й креатиніну в сечі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

Лабораторна робота № 5.7

Визначення креатиніну в сироватці крові й сечі із застосуванням набору реактивів (метод Поппера)

Креатинін – кінцевий продукт розпаду креатину (фосфокреатину). Кількість креатиніну, яка щоденно утворюється в організмі, залежить від стану розвитку м'язової системи людини. Для дорослої людини нормальні показники вмісту креатиніну в крові становлять 80–115 мкмоль/л для чоловіків і 53–97 мкмоль/л – для жінок; у дитячому віці – 44–88 мкмоль/л.

Креатинін вільно фільтрується у клубочках нирках і додатково секретується нирковими канальцями із залучення специфічних транспортних систем. Реабсорбції креатиніну в нирках не відбувається. Визначення вмісту креатиніну в крові використовують для оцінки функціонального стану нирок (точніше – стану процесів фільтрації в ниркових клубочках). При зниженні швидкості клубочкової фільтрації на кожні 50% уміст креатиніну в сироватці подвоюється. Також креатинінемія може бути ознакою порушення відтоку сечі через нирковий камінь.

Метод Поппера ґрунтується на кольоровій реакції з пікриновою кислотою, яка в лужному розчині утворює з креатиніном продукт жовто-червоного кольору – пікринат-креатинін (див. лаб. роботу № 5.3).

Інтенсивність забарвлення дослідного розчину прямо пропорційна вмісту креатиніну в пробі. У сироватці крові креатинін досліджується після депротейнування розчином ТХО, у сечі – після розведення.

Матеріали та реактиви. Сеча або сироватка крові (сечу необхідно розвести водою у 100 разів), розчин пікринової кислоти ($0,040 \pm 0,002$ моль/л), розчин ТХО ($1,220 \pm 0,061$ моль/л), 2,3 н. розчин гідроксиду натрію (перед проведенням аналізу вміст флакона переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, доливають до мітки й перемішують – отримують розчин гідроксиду натрію біля 4,6% (1,15 н.)), ліофілізований креатинін для приготування 8 мл калібрувального розчину ($442,5 \pm 22,0$ мкмоль/л) або 8 мл готового розчину креатиніну ($442,5 \pm 22,0$ мкмоль/л) (якщо набір містить ліофілізований (сухий) креатинін, до нього вносять піпеткою рівно 8 мл дистильованої води і отримують розчин $442,5 \pm 22,0$ мкмоль/л (50 мг/л)).

Обладнання. Фотометричне обладнання, що дозволяє вимірювати оптичну густину розчинів за довжини хвилі 505 (490–520) нм, кювети товщиною 5 або 10 мм, центрифуга для пробірок (2000–5000 об/хв), мірна колба місткістю 100 мл, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Сечу перед аналізом розводять у 100 разів (1 мл сечі + 99 мл дистильованої води), сироватку крові використовують без розведення.

Аналіз сироватки проводять згідно зі схемою, наведеною в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Схема проведення дослідів з визначення вмісту креатиніну в сироватці крові за методом Поппера

Відміряти у пробірці	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Холоста проба, мл
Сироватка	0,5	–	–
Дистильована вода	1,0	1,0	1,5
Калібрувальний розчин	–	0,5	–
Розчин ТХО	0,5	0,5	0,5
Перемішати, центрифугувати 5 хв при 3000 об/хв			
Надосадова рідина	1,0	1,0	1,0
Розчин гідроксиду натрію	0,5	0,5	0,5
Розчин пікринової кислоти	0,5	0,5	0,5
Перемішати, витримати 20 хв за кімнатної температури й фотометрувати дослідну й калібрувальну проби проти холостої проби.			

Аналіз сечі проводять за схемою, наведеною в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Схема проведення дослідів з визначення вмісту креатиніну в сечі за методом Поппера

Відміряти у пробірці	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Холоста проба, мл
Дистильована вода	–	2,0	–
Калібрувальний розчин	–	1,0	–
Розчин ТХО	–	1,0	–
Перемішати, центрифугувати 5 хв при 3000 об/хв. (якщо в калібрувальній пробі при додаванні розчину ТХО осад не утворився, центрифугувати не треба)			

Закінчення табл.5.3

Відміряти у пробірку	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Холоста проба, мл
Надосадова рідина	–	2,0	–
Розведена сеча	1,0	–	–
Розчин ТХО	0,5	–	0,5
Дистильована вода	0,5	–	1,5
Розчин гідроксиду натрію	1,0	1,0	1,0
Розчин пікринової кислоти	1,0	1,0	1,0
Перемішати, витримати 20 хв за кімнатної температури й фотометрувати дослідну та калібрувальну проби проти холостої проби			

Розрахунок концентрації креатиніну в пробі здійснюють за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{калібр}}} \times 5,0 \quad (442,5),$$

де C – концентрація креатиніну в пробі, мг% (мкмоль/л);

5,0 (442,5) – калібрувальна концентрація сечовини, мг% (мкмоль/л);

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби, од. оптич. густини;

$E_{\text{калібр}}$ – оптична густина калібрувальної проби, од. оптич. густини.

У випадку сечі отриманий результат помножують на коефіцієнт розведення (50).

Кількість креатиніну в добовій сечі визначають за формулою

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

де KK – кількість креатиніну в добовій сечі, мг;

C – концентрація креатиніну в сечі, мг%;

A – добова кількість сечі, мл;

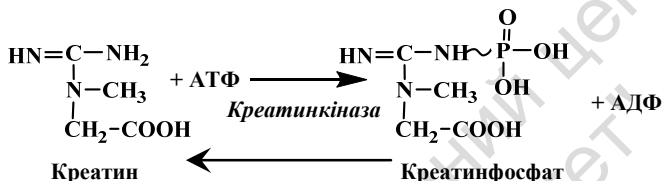
B – кількість сечі, узятої для аналізу, мл.

Розрахунок вмісту креатиніну в сироватці крові (сечі) та отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами й роблять висновок. При визначенні показника в сечі вираховують вміст креатиніну як у пробі, так і в добовій сечі.

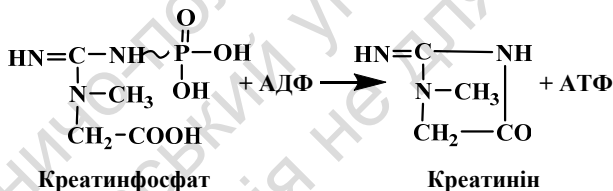
Лабораторна робота № 5.8

Визначення активності креатинкінази у м'язовій тканині

Креатинкіназа (КК), або креатинфосфокіназа, каталізує оборотне перетворення креатину у креатинфосфат:



Креатинфосфат служить одним із джерел енергії (АТФ) при м'язовому скороченні. Перебіг наведеної вище реакції у зворотному напрямку сприяє ресинтезу АТФ. Один із шляхів утворення АТФ із АДФ за участю креатинфосфату – це реакція перетворення цієї сполуки на креатинін:



Визначенню креатинкіназної активності відведено особливе місце в клінічній діагностиці як ферментативному тесту на інфаркт міокарда, порушення діяльності скелетних м'язів (м'язова дистрофія, міопатії) і нервової системи (черепно-мозкові травми, пухлини, інсульт тощо).

У міоцитах креатинкіназа у найбільшій кількості міститься в міофібрилах, мітохондріях і мікросомах.

Матеріали та реактиви. Скелетні м'язи щурів, 0,1 М розчин трис-НСl буфера (рН 7,2) (див. дод. 5), розчин креатинфосфату, реактиви для визначення вмісту білка методом Лоурі або біуретовою реакцією (див. дод. № 10 і 11), 1 мМ розчин АДФ, 160 мМ розчин гідроксиду барію, 310 мМ розчин сульфату цинку, 70 мМ

свіжовиготовлений розчин α -нафтолу (100 мг α -нафтолу розчиняють у 10 мл лужного розчину, який містить 1,5 М розчин карбонату натрію та 0,25 мл 6,05 М свіжовиготовленого розчину діацетилю), стандартні розчини креатину (від 1,0 до 15,0 мкг у пробі).

Обладнання. Ступка з товкачиком, ножиці, льодяна баня, центрифужні пробірки, центрифуга (3000 g), годинник, водяна баня, штатив із пробірками, спектрофотометр для вимірювання за довжини хвилі 536 нм, кювети завтовшки 5 мм.

Хід роботи. Наважку (0,5 г) скелетної м'язової тканини щура поміщають на холод (лід) у фарфорову ступку, старанно подрібнюють ножицями і перетирають товкачиком з 2,5 мл дистильованої води. Гомогенат центрифугують при 3000 g протягом 10 хв. У дослідях використовують надосадову рідину (супернатант). У центрифужну пробірку вносять 0,25 мл 0,1 М розчину (рН 7,2) трис-НСІ буфера (див. Дод. 5), 0,25 мл дистильованої води, 0,1 мл розчину креатинфосфату і додають 0,1 мл надосадової рідини, у якій попередньо визначають концентрацію білка (методом Лоурі або біуретовою реакцією – див. дод. № 10, 11). У контрольну пробу замість надосадової рідини додають 0,1 мл дистильованої води.

Пробірки, які містять дослідну та контрольну проби, ставлять на водяну баню при 37 °С на 3 хв, потім додають по 0,2 мл 1 мМ розчину АДФ та інкубують протягом 30 хв. Реакцію зупиняють додаванням по 0,2 мл 160 мМ розчину гідроксиду барію та 310 мМ розчину сульфату цинку (осаджуються білки). Через 20 хв проби центрифугують при 3000 g протягом 10 хв. До 1 мл надосадової рідини додають 1 мл 70 мМ свіжовиготовленого розчину α -нафтолу.

Пробірки з контрольною та дослідною пробами тримають у темряві протягом 20 хв для прояву забарвлення. Після цього дослідну пробу спектрофотометрують у порівнянні з контрольною (максимум пропускання при 536 нм, кювета товщиною 0,5 см).

Для визначення активності креатинкінази попередньо будують калібрувальну криву зі стандартними розчинами креатину (від 1,0 до 15,0 мкг у пробі). Активність ферменту (А) виражають у мікрограмах креатину за годину на 1 мг білка (мкг/год×мг) і вираховують за формулою:

$$A = \frac{K \times 60}{a \times t_{\text{інк}}},$$

де K – кількість креатину в дослідній пробі, знайдений за калібрувальною кривою (мкг);

a – вміст білка у пробі (мг);

$t_{\text{інк}}$ – час інкубації (30 хв).

Розрахунок креатинкіназної активності у м'язовій тканині та отриманий результат записують у зошит, порівнюють із нормальними величинами і роблять висновок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які процеси і за яких умов можуть використовуватися як джерело енергії для скорочення скелетних м'язів?
2. Яка роль креатину в енергетичному обміні у скелетних м'язах?
3. Що може спричинити виникнення креатинурії та креатинінемії?
4. Охарактеризуйте особливості енергетичного обміну в нервовій тканині.
5. Які специфічні функції нервової системи потребують енерговитрат?

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДО РОЗДІЛУ 5

Завдання 1

Цитрат утворюється при конденсації ацетил-КоА з:

- | | |
|--------------------|------------------------------|
| 1) цис-аконітатом; | 4) малатом; |
| 2) оксалоацетатом; | 5) α -кетоглутаратом; |
| 3) орнітином; | 6) Цитратсинтазою. |

Завдання 2

У циклі трикарбонових кислот α -кетоглутарат перетворюється на:

- | | |
|------------------|------------------|
| 1) сукцинат; | 4) цис-аконітат; |
| 2) сукциніл-КоА; | 5) оксалоацетат; |
| 3) фумарат; | 6) ацетил-КоА. |

Завдання 3

Утворення сукцинату спряжено із синтезом:

- | | |
|---------|---------------|
| 1) ГТФ; | 4) АТФ; |
| 2) АДФ; | 5) аденозину; |
| 3) АМФ; | 6) ГДФ. |

Завдання 4

Процес окисного фосфорилування відбувається за участю:

- 1) зовнішньої мембрани мітохондрій;
- 2) внутрішньої мембрани мітохондрій;
- 3) на мембранах гладенького ЕПР;
- 4) на мембранах шорсткого ЕПР;
- 5) у матриксі мітохондрій;
- 6) у міжмембранному просторі.

Завдання 5

Субмітохондріальні везикули – це:

- 1) замкнені фрагменти внутрішньої мембрани мітохондрій із "правильною" (як у мітохондріях) орієнтацією;
- 2) такі ж фрагменти із "оберненою" орієнтацією;
- 3) замкнені фрагменти зовнішньої мембрани мітохондрій із "правильною" орієнтацією сторін;
- 4) такі ж фрагменти із оберненою орієнтацією.

Завдання 6

Коефіцієнт дихального контролю характеризує:

- 1) спряження окиснення і фосфорилування;
- 2) ефективність окиснення субстрату;
- 3) активність АТФазної реакції;
- 4) швидкість синтезу АТФ
- 5) інтенсивність процесів ПОЛ у мітохондріях.

Завдання 7

За використання сукцинату як субстрату теоретичні значення коефіцієнту АДФ/О дорівнюють:

- 1) 4;

- | | |
|-------|-------|
| 2) 3; | 4) 1; |
| 3) 2; | 5) 0. |

Завдання 8

Які з наведених сполук належать до роз'єднувачів окисного фосфорилування?

- 1) ротенон;
- 2) дикумарин;
- 3) вільні жирні кислоти;
- 4) барбітурати;
- 5) ціаніди, азиди, оксид вуглецю (II), сірководень;
- 6) 2,4-динітрофенол.

Завдання 9

У реакції з якою сполукою в лужному середовищі креатинін утворює забарвлену в оранжевий колір сполуку?

- 1) червона кров'яна сіль;
- 2) жовта кров'яна сіль;
- 3) пікринова кислота;
- 4) нітропрусид натрію;
- 5) реактив Несслера;
- 6) реактив Фоліна.

Завдання 10

Які амінокислоти з наведених залучені в утворення креатину?

- 1) гліцин, аргінін і метіонін;
- 2) гліцин, аспарагін і метіонін;
- 3) глутамат, аргінін і метіонін;
- 4) глутамін, аргінін і метіонін;
- 5) гліцин, аргінін і серин;
- 6) гліцин, аргінін і орнітин.

Розділ 6

ГОРМОНИ

ТЕМА 1. ГОРМОНИ ЯК БІОРЕГУЛЯТОРИ. МЕХАНІЗМИ ДІЇ ГОРМОНІВ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

Для нормального функціонування багатоклітинного організму необхідний взаємозв'язок між окремими клітинами, тканинами і органами. Такий зв'язок здійснюють чотири основні системи регуляції:

- *центральна й периферична нервова система* через нервові імпульси й нейромедіатори.
 - *ендокринна система* через ендокринні залози й гормони, які секретуються в кров і впливають на метаболізм різноманітних клітин-мішеней.
 - *паракринна й аутокринна системи* через різні речовини, які секретуються в міжклітинний простір і взаємодіють із рецепторами, розташованими на сусідніх клітинах або на тій клітині, що їх секретувала (ейкозаноїди, гормони шлунково-кишкового тракту, гістамін, цитокіни тощо).
 - *імунна система* через специфічні білки (антитіла, Т-рецептори, білки головного комплексу гістосуміщення).
-

6.1.1. Принципи гормональної регуляції

Гормони – інтегруючі регулятори, що зв'язують різноманітні регуляторні механізми та метаболізм у різних органах. Гормони функціонують як хімічні посередники, що переносять сигнали, які виникають у різних органах і ЦНС.

Відповідь клітини на дію гормону дуже різноманітна й визначається як хімічною будовою гормону, так і типом клітини, на яку спрямована ця дія. Концентрація гормонів у крові дуже низька й може швидко змінюватися. Це забезпечується, по-перше, регуляцією їхнього синтезу й секреції та, по-друге, великою швидкістю інактивації циркулюючих гормонів.

Синтез і секреція гормонів стимулюються зовнішніми і внутрішніми сигналами, які надходять із ЦНС. Ці сигнали по нервових шляхах надходять до гіпоталамуса, де стимулюють синтез пептидних гормонів (так званих *рилізинг-гормонів*) – *ліберинів* і *статинів* (кортиколіберин, тіроліберин, соматоліберин, соматостатин та ін.).

Ліберини і статини транспортуються в передню частку гіпофіза, де стимулюють або гальмують синтез тропних гормонів. *Тропні гормони* гіпофіза стимулюють синтез і секрецію гормонів периферійних ендокринних залоз, які надходять до загального кровотоку. Деякі гіпоталамічні гормони зберігаються в задній частині гіпофіза, а потім надходять у кров (вазопресин, окситоцин).

Зміна концентрації метаболітів у клітинах-мішенях за механізмом від'ємного зворотного зв'язку пригнічує синтез гормонів, діючи або на ендокринні залози, або на гіпоталамус. Синтез і секреція тропних гормонів пригнічується гормонами периферичних залоз.

6.1.2. Механізми дії гормонів

За хімічною структурою гормони можуть бути *амінами* (адреналін), *пептидами* (вазопресин), *йодотиронінами* (тироксин), *білками* (інсулін), *глікопротеїнами* (тиреотропін), *стероїдами* (статеві гормони, гормони кори надниркових залоз). Взаємодія гормонів із рецепторами високоспецифічна. Рецептори більшості гормонів (зокрема, адреналіну, інсуліну, глюкагону) розташовані в плазматичній мембрані, тоді як рецептори стероїдних і тиреоїдних гормонів містяться всередині клітини.

Рецептори *адреналіну* і *глюкагону* не мають ферментативної активності і є *метаботропними*, тобто поєднаними з G-білками (рис. 6.1, Б). Наслідком активації цих рецепторів стає опосередкована G-білком активація ферменту (*аденілатциклаза*, *фосфоліпаза С*), залученого в утворення вторинного месенджера (*цАМФ*, *інозитол-1,4,5-трифосфату* або *діацилгліцеролу*).

Вторинний месенджер виконує свою дію, активуючи серин/треонінові протеїнкінази (*протеїнкіназа А, С, кальцій/кальмодулін-залежні протеїнкінази*), які, у свою чергу, фосфорилують білки-мішені за залишками серину й треоніну. Фосфорильований білок змінює свої властивості (активність (білок-фермент), локалізацію (напр., деякі транскрипційні фактори), стабільність, здатність взаємодіяти з іншими білками тощо).

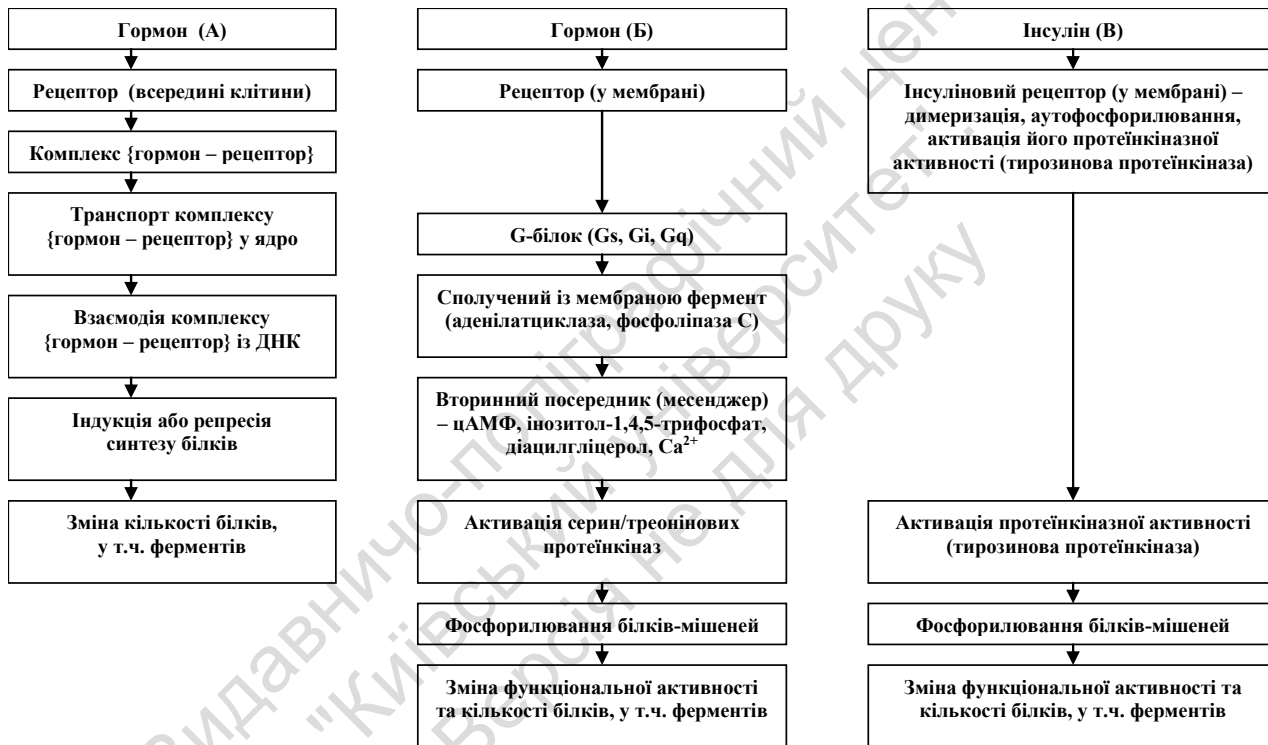


Рис. 6.1. Схеми дії стероїдних і тиреоїдних гормонів (А), більшості водорозчинних гормонів (Б) та інсуліну (В)

Рецептори *інсуліну* теж розташовані в плазматичній мембрані, але володіють ферментативною активністю (є трансмембранними тирозиновими протеїнкіназами). Після зв'язування інсуліну вони активуються і набувають здатності безпосередньо фосфорилувати білки-мішені за залишками тирозину – тому сигнальні шляхи інсуліну для впливу на функціональну активність білків-мішеней не потребують G-білка, ферменту, що синтезує вторинний посередник, самого вторинного посередника і додаткових протеїнкіназ (рис. 6.1, В).

Стероїдні й тиреоїдні гормони вільно перетинають плазматичну мембрану і в цитозолі сполучаються зі своїми рецепторами. Надалі гормон-рецепторний комплекс прямує до ядра і за допомогою ДНК-зв'язувальної ділянки у структурі рецептора сполучається із ядерною ДНК (рис. 6.1, А). Наслідком цього стає стимуляція або пригнічення експресії ряду генів (експресія гена – це сукупність процесів, які починаються транскрипцією (синтезом іРНК на матриці ДНК) і завершуються трансляцією – біосинтезом білка, амінокислотна послідовність якого кодується цим геном).

Отже, під впливом гормонів у клітинах-мішенях швидкість метаболізму змінюється в результаті зміни або активності, або кількості ряду білків (головним чином ферментів).

Лабораторна робота № 6.1

Доведення білкової природи інсуліну

Інсулін вступає в реакції, характерні для білків: біуретову (на пептидні зв'язки), Мілона (на тирозин), Фоля (на слабкозв'язану сірку цистеїну).

Матеріали та реактиви. Розчин інсуліну в ампулах, 10%-й розчин гідроксиду натрію, 1%-й розчин CuSO_4 , реактив Фоля (до 10%-го розчину ацетату свинцю додають 10%-й розчин гідроксиду натрію до розчинення осаду, що утворився), реактив Мілона (40 г ртуті розчиняють у 57 мл концентрованої азотної кислоти й розводять двома об'ємами води, дають відстоятися й використовують надосадову рідину).

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, крапельниця.

Хід роботи. У три пробірки вносять по 10 крапель розчину інсуліну.

У першу додають 5 крапель 10%-го розчину NaOH і краплю 1%-го розчину CuSO_4 (біуретова реакція). Розчин забарвлюється у фіолетовий колір.

У другу додають 10 крапель реактиву Фоля і кип'ятять. Утворюється бурий осад сульфиду свинцю.

У третю вносять 2–3 мл реактиву Мілона й обережно нагрівають. Утворюється червоний осад.

Спостереження записують у зошит, роблять висновки.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Як гормони класифікуються за хімічною будовою?
2. Що таке ліберини та статини?
3. Який механізм дії пептидних гормонів?
4. Що таке вторинний месенджер?
5. У чому полягає регуляторна роль фосфорилування білків?

ТЕМА 2. РОЛЬ ГОРМОНІВ ТА ЇХ ВИЗНАЧЕННЯ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

6.2.1. Гормони гіпоталамуса

Гіпоталамічні гормони виробляються *нейросекреторними клітинами* (ліберини і статини – сполуки, що регулюють секреторну діяльність гіпофіза) і *клітинами великоклітинних ядер передньої гіпоталамічної ділянки* – *супраоптичним* (вазопресин, або антидіуретичний гормон, що регулює водно-сольовий обмін на рівні ниркових каналців) і *паравентрикулярним* (окситоцин – стимулятор скорочень гладеньких м'язів матки). Загальні відомості про гіпоталамічні гормони наведено на рис. 6.2.

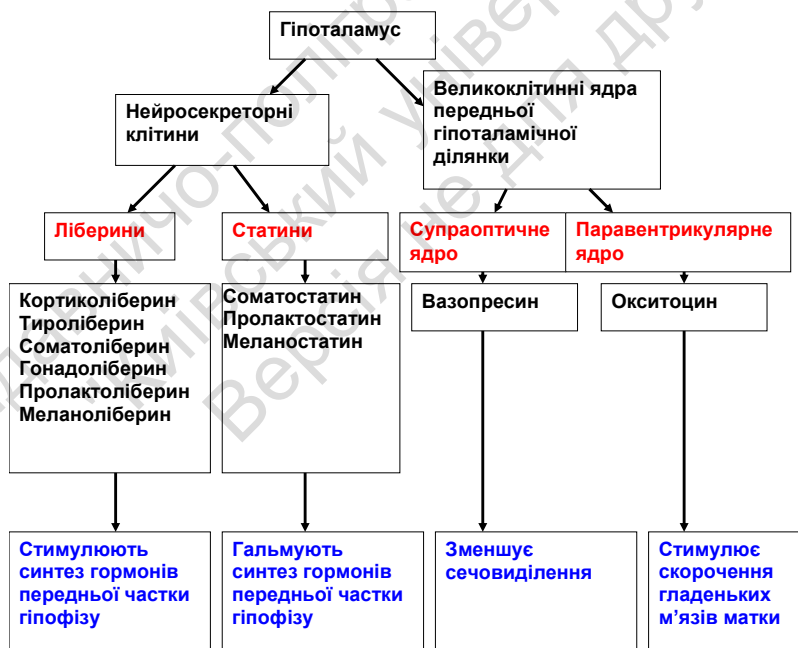


Рис. 6.2. Гормони гіпоталамуса

Вазопресин і окситоцин, синтезуючись у гіпоталамусі, аксональним транспортом переносяться у задню частку гіпофіза (*нейрогіпофіз*), яка здійснює їхню секрецію. Стимулом для синтезу й секреції *вазопресину* є збільшення осмотичного тиску крові або зниження об'єму плазми крові. На ці зміни реагують осмо- і волюморорецептори, розташовані в передсерді й дузі аорти. Утворені молекули вазопресину сполучаються з рецепторами, розташованими в мембранах клітин кінцевих відділів дистальних звивистих каналців та збирних трубок нефронів нирок, наслідком чого стає активація аденілатциклази, синтез цАМФ, активація протеїнкінази А і фосфорилування білків, які відповідають за стимуляцію синтезу водних каналів (аквапоринів) та їхнє вбудовування у мембрани клітин ниркових каналців. У результаті дія вазопресину спричиняє потужний транспорт води із просвіту ниркового каналця в його клітини, тобто її реабсорбцію, зниження об'єму утвореної вторинної сечі (антидіуретичний ефект), підвищення об'єму плазми та зниження осмотичного тиску крові.

6.2.2. Гормони передньої частки гіпофіза

Гормони аденогіпофіза класифікують за будовою. *Соматотропний гормон* (СТГ) та *пролактин* є простими білками і складаються з одного поліпептидного ланцюга. До родини глікопротеїнових гормонів включають *фолікулоstimуючий гормон* (ФСГ), *лютеїнізуючий гормон* (ЛГ) та *тиреотропний гормон* (ТТГ), які складаються із двох субодиниць: α -субодиниці гормонів ідентичні, тоді як β -субодиниці мають різну структуру й визначають біологічну специфічність.

Деякі пептидні гормони аденогіпофіза є продуктами загального гена та походять від одного попередника проопіомеланокортину (ПОМК). Це *кортикотропін* (АКТГ), *меланотропіни* (МСГ), *ліпотропіни*, *ендорфіни*.

6.2.3. Гормони щитоподібної залози

Утворення йодтиронінів стимулюється ТТГ гіпофіза. Йодтироніни синтезуються у складі білка тиреоглобуліну. Тиреоглобулін – глікопротеїн, містить 115 залишків тирозину, утворюється в базальній частині клітини і зберігається в позаклітинному колоїді, де відбувається йодування залишків тирозину й утво-

рення йодтиронінів. За дії *тиреопероксидази* окиснений йод реагує із залишками тирозину з утворенням монойодтиронінів і ди-йодтиронінів (ДІТ) (рис. 6.3).

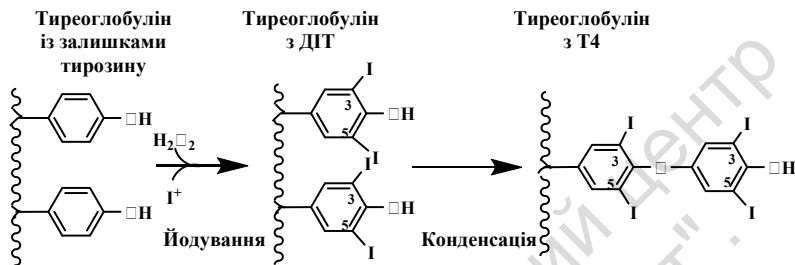


Рис. 6.3. Утворення гормонів щитоподібної залози

Дві молекули дийодтироніну конденсуються з утворенням тироксину (T_4), а монойодтиронін і дийодтиронін – з утворенням трийодтироніну (T_3). Йодтиреоглобулін транспортується у клітину шляхом ендоцитозу й гідролізується ферментами лізосом із вивільненням T_3 і T_4 .

У крові йодтироніни перебувають у зв'язаній формі в комплексі з тироксинзв'язувальним білком. Тільки 0,03% T_4 і 0,3% T_3 містяться у вільному стані. Біологічна активність йодтиронінів обумовлена незв'язаною фракцією. Транспортні білки служать своєрідним депо, яке може забезпечити додаткову кількість вільних гормонів. Синтез і секреція йодтиронінів регулюються гіпоталамо-гіпофізарною системою.

Йодтироніни регулюють ріст і диференціювання тканин та енергетичний обмін. Гіперфункція щитоподібної залози виявляється у двох основних формах: дифузійний токсичний зоб (базедова хвороба) та аутоімунний тиреоїдит.

Для базедової хвороби характерне збільшення розмірів щитоподібної залози й зростання швидкості синтезу йодтиронінів. Основними симптомами є м'язова слабкість, зниження маси тіла, підвищений апетит, підвищення температури тіла, екзофтальм.

При аутоімунному тиреоїдиті у більшості хворих у крові виявляється імуноглобулін, який взаємодіє з рецепторами тиреотропного гормону в щитоподібній залозі й імітує його дію, стимулюючи синтез йодтиронінів.

Гіпотиреозизм може бути результатом недостатнього надходження йоду в організм, що є причиною розвитку ендемічного зоба. Зрідка гіпотиреозизм виникає в результаті вроджених дефектів ферментів, що беруть участь у синтезі йодтиронінів, або як ускладнення інших захворювань, при яких ушкоджуються гіпоталамус, гіпофіз або щитоподібна залоза.

Гіпофункція щитоподібної залози в ранньому дитячому віці приводить до затримки фізичного й розумового розвитку – *кретинізму*. У дорослих гіпофункція виявляється *мікседемою* (слизуватим набряком), спричиненою надлишковим нагромадженням у шкірі протеогліканів і води. Основні симптоми гіпотиреозу: сонливість, зниження толерантності до холоду, збільшення маси тіла, зниження температури тіла.

6.2.4. Гормони-регулятори обміну кальцію

Паратиреоїдний гормон (паратгормон, ПТГ) і *кальцитонін* разом з активною формою вітаміну D (*1,25-діоксихолекальциферол*, або *кальцитріол*) є основними регуляторами обміну кальцію і фосфору, впливаючи на рівнях кісткової тканини, нирок і тонкого кишечнику (рис. 6.4).

Синтез і секреція ПТГ стимулюється зниженням вмісту Ca^{2+} у плазмі крові. Його дія спрямована на відновлення рівнів кальцію крові й реалізується шляхом:

- стимуляції резорбції кісткової тканини;
- зниження екскреції кальцію в нирках;
- посилення всмоктування кальцію в тонкому кишечнику

Вплив паратгормону на рівні кишечнику опосередкований дією вітаміну D – ПТГ стимулює синтез у нирках 1,25-діоксихолекальциферолу, який є головним стимулятором усмоктування кальцію в кишечнику).

Кальцитонін синтезується у парафолікулярних С-клітинах щитоподібної залози і є антагоністом ПТГ (на рівні кишечнику не діє). Секреція кальцитоніну стимулюється при підвищенні вмісту Ca^{2+} у плазмі крові.

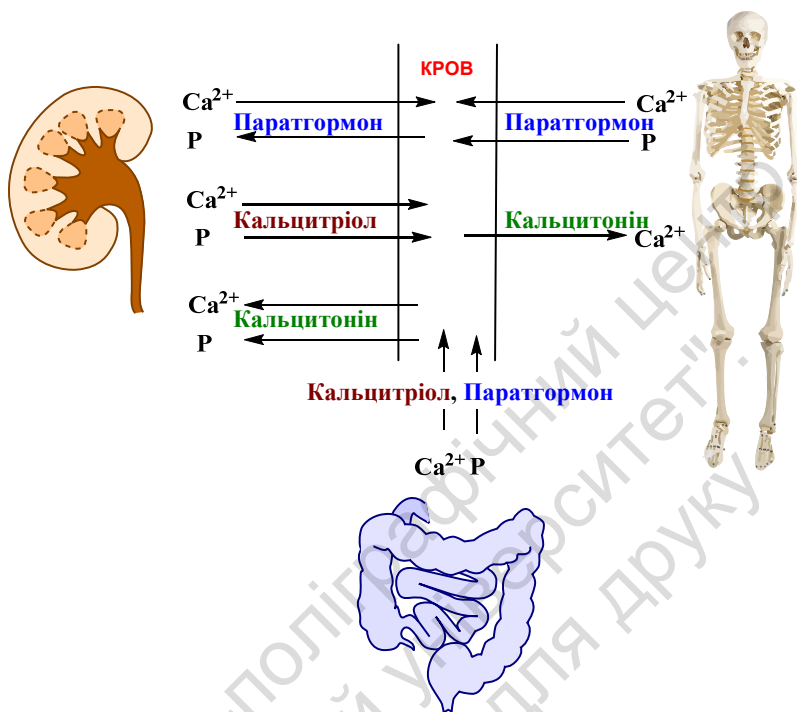


Рис. 6.4. Напрямки дії гормонів-регуляторів обміну кальцію та фосфору

6.2.5. Гормони кори надниркових залоз

Загальним попередником усіх кортикостероїдів є холестерол. При синтезі кортикостероїдів утворюється понад 40 метаболітів, які різняться за структурою і біологічною активністю.

На першому етапі синтезу кортикостероїдів (рис. 6.5) відбувається перетворення холестеролу на *прегненолон* шляхом відщеплення 6-вуглецевого фрагмента від бічного ланцюга холестеролу й окиснення C_{20} -вуглецевого атома (1).

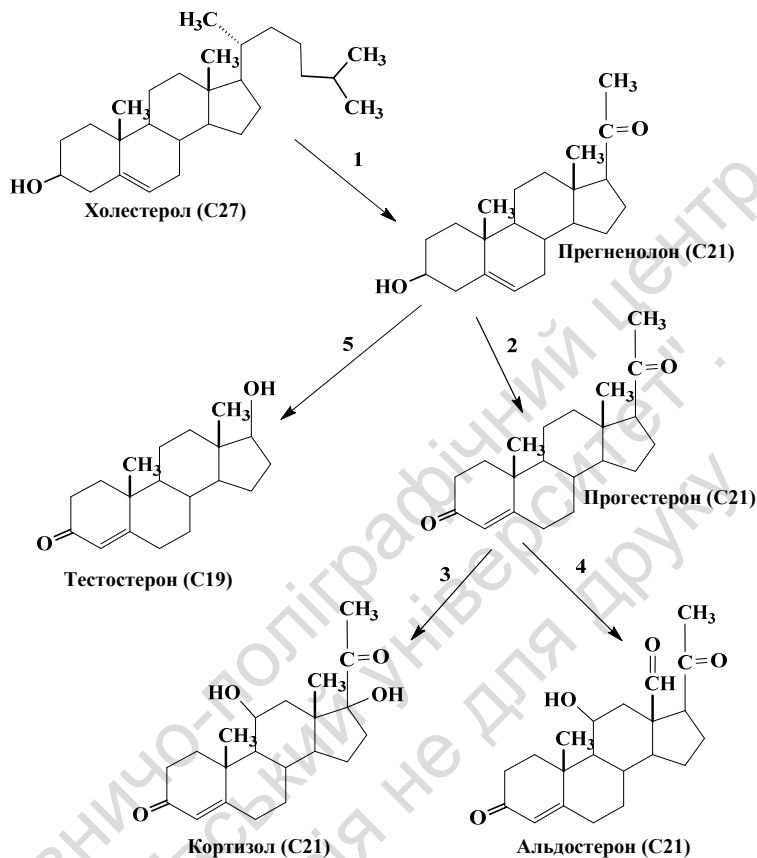


Рис. 6.5. Схема синтезу альдостерону й кортизолу

Прегненолон перетворюється на *прогестерон*, попередник C₂₁-стероїдів – кортизолу й альдостерону (2), і на *тестостерон*, попередник андрогенів (5). Яким саме стероїдом виявиться кінцевий продукт, залежить від набору ферментів у клітині та послідовності реакцій гідроксилювання.

Первинне гідроксилювання прогестерону 17-гідроксилазою, а потім 21- і 11-гідроксилазою приводить до синтезу кортизолу (3). Реакції утворення альдостерону включають гідроксилювання прогестерону спочатку 21-гідроксилазою, а потім 11-гідроксилазою (4).

Стероїдні гормони транспортуються кров'ю в комплексі зі специфічними транспортними білками.

Джерелом холестеролу для синтезу кортикостероїдів служать його ефіри, що надходять у клітину у складі ЛПНЩ чи депоновані в клітині. Вивільнення холестеролу із його ефірів і синтез кортикостероїдів стимулюються кортикотропіном.

Реакція синтезу кортизолу проходить у різних компартментах клітин кори надниркових залоз. Швидкість синтезу й секреції кортизолу регулюється гіпоталамо-гіпофізарною системою за механізмом негативного зворотного зв'язку.

Катаболізм гормонів кори надниркових залоз відбувається насамперед у печінці. Тут ідуть реакції гідроксилювання, окиснення й відновлення гормонів. Продукти катаболізму кортикостероїдів (крім кортикостерону й альдостерону) виводяться із сечею у формі *17-кетостероїдів* (17-КС). Ці продукти метаболізму виділяються переважно у вигляді кон'югатів із глюкуроною і сірчаною кислотами. У чоловіків 2/3 17-КС утворюються за рахунок кортикостероїдів і 1/3 – за рахунок тестостерону (усього 12–17 мг/добу). У жінок 17-КС утворюються переважно за рахунок кортикостероїдів (7–12 мг/добу).

Надлишкове утворення кортикостероїдів, головним чином кортизолу, – гіперкортицизм – часто є результатом порушення регуляторних механізмів синтезу кортизолу: при пухлині гіпофіза й підвищеній продукції кортикотропіну (хвороба Іценко – Кушінга); при пухлинах надниркових залоз, які виробляють кортизол (синдром Іценко – Кушінга). Головні прояви гіперкортицизму: зниження толерантності до глюкози, гіперглюкоземія та гіпертензія.

При успадкованій адреногенітальній дистрофії в 95% випадків виявляється дефіцит 21-гідроксилази. При цьому виявляється підвищена секреція 17-ОН-прогестерону, збільшення продукції андрогенів, раннє статеве дозрівання у хлопчиків і розвиток чоловічих статевих ознак у дівчат. За часткової недостатності 21-гідроксилази у жінок може порушуватися менструальний цикл.

Набута недостатність надниркових залоз може розвиватися в результаті туберкульозного чи аутоімунного ушкодження. Часто це є наслідком пригнічення гіпоталамо-гіпофізарної системи регуляції за механізмом зворотного зв'язку при тривалому застосуванні кортикостероїдних препаратів. Утрата регуляторного контролю з боку

надниркових залоз приводить до підвищення секреції кортикотропіну. У цих випадках у хворих відмічається посилення пігментації шкіри і слизових оболонок (*хвороба Аддісона*), що обумовлено підвищеною продукцією кортикотропіну та інших похідних ПОМК, зокрема меланоцитостимулювального гормону. Основні клінічні прояви надниркової недостатності: гіпотензія, м'язова слабкість, гіпонатріємія, втрата маси тіла, непереносимість стресу.

6.2.6. Гормони мозкової частини надниркових залоз

Гормони мозкової частини надниркових залоз представлені катехоламінами – біогенними амінами, у молекулі яких є діоксифенільне кільце. Схему біосинтезу катехоламінів наведено на рис. 6.6. Деякі катехоламіни (дофамін, норадреналін) також синтезуються в нервовій системі, де виконують функцію нейромедіаторів.

Дія адреналіну на різні типи адренорецепторів спричиняє:

- глікогеноліз у печінці з наступною гіперглікемією,
- активацію ліполізу з мобілізацією вільних жирних кислот,
- посилення серцевої діяльності,
- звуження судин внутрішніх органів,
- розширення судин скелетних м'язів,
- ріст артеріального тиску

Адреналін разом із кортикостероїдом кортизолом належать до так званих *адаптаційних*, або *стресових*, гормонів, оскільки вони утворюються у великих кількостях за умов адаптації організму до змін, які викликав стресор, і відповідають за розвиток в організмі *адаптивної (стресової) відповіді* на дію *стресового фактора*.

При цьому дія кортизолу спричиняє поступове руйнування лімфатичних органів (лімфатичних вузлів і тимусу), втрату лімфоцитів та еозинофілів, гіпертрофію кори надниркових залоз (через порушення зворотної регуляції), появу виразок у шлунково-кишковому тракті, тоді як адреналін стимулює діяльність серцево-судинної системи, розщеплення глікогену й ліполіз.

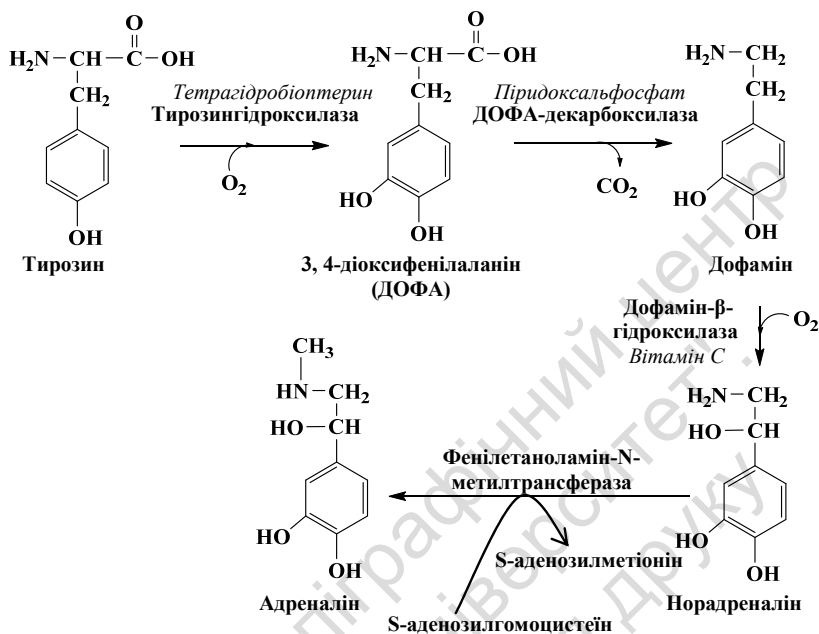


Рис. 3.6. Схема біосинтезу катехоламінів

6.2.7. Статеві гормони

Статеві гормони синтезуються в основному в статевих залозах жінок (яєчниках) і чоловіків (сім'яниках). Існує дві групи жіночих статевих гормонів: *естрогени* (основний представник – естрадіол) та *прогестини* (основний представник – прогестерон). Естрадіол синтезується переважно у фолікулах. Попередником цих гормонів також є холестерол.

Секреція естрогенів та прогестерону носить циклічний характер. Головну роль у регуляції синтезу, який починається з настанням статевої зрілості, відіграють гонадотропні гормони гіпофіза. Основна біологічна роль естрогенів та прогестерону полягає в забезпеченні репродуктивної функції організму жінки.

Біосинтез *андрогенів* відбувається головним чином у сім'яниках, а також частково в надниркових залозах та яєчниках, і регулюється гонадотропними гормонами гіпофіза. Їхня біологічна роль пов'язана з диференціюванням та функціонуванням репродуктивної системи. Андрогени, на відміну від естрогенів, впливають на диференціювання чоловічих статевих залоз ще в ембріональний період. Розпад андрогенів здійснюється головним чином у печінці шляхом утворення 17-КС.

6.10. Гормони підшлункової залози

Внутрішньосекреторна функція підшлункової залози пов'язана з функціонуванням острівців Лангерганса, які складаються із клітин різного типу. А-, або α -клітини продукують глюкагон; В-, або β -клітини – інсулін; D-, або δ -клітини – соматостатин.

Інсулін є простим поліпептидом із молекулярною масою близько 6000, який складається із двох лінійних ланцюгів: А (21 амінокислота) і В (30 амінокислот), які сполучені двома дисульфідними містками. У ланцюзі А є ще один “зовнішній” дисульфідний місток. Структура інсуліну різних тварин в основному збігається.

Сьогодні вірною вважається думка, відповідно до якої спочатку синтезується один ланцюг амінокислот із наступним згортанням молекули й утворенням дисульфідних зв'язків. У цьому процесі бере участь так званий сполучний пептид, або пептид С, що складається із 33 амінокислот і з'єднує ланцюг А та В. Після згортання утворюється попередник інсуліну, або проінсулін, із молекулярною масою понад 9000. Проінсулін має близько 10% біологічної активності інсуліну. Сполучний пептид С відщеплюється від інсуліну в гранулах β -клітин перед секрецією в кров і надходить до неї в кількості, яка є еквімолекулярною інсуліну. Визначення рівня пептиду С є більш надійним індикатором секреції β -клітин, ніж визначення власне інсуліну, оскільки останній, на відміну від С-пептиду, частково затримується в печінці, де може підлягати дії циркулюючих протиінсулінових антитіл та іншим впливам, що спотворюють дійсну картину. Роз'єднання ланцюгів А та В призводить до повної інактивації інсуліну.

Домінуючу роль у регуляції синтезу інсуліну відіграє концентрація глюкози в крові. Унаслідок абсолютного або часткового дефіциту інсуліну виникає *цукровий діабет*, що має дві основні форми: *інсулінозалежний* (ІЗЦД) та *інсулінонезалежний* (ІНЦД). Перший тип виникає внаслідок руйнування β -клітин острівців у результаті автоімунних реакцій, а другий – через ушкодження механізмів передачі сигналу в клітини-мішені або порушення секреції інсуліну. Характерні симптоми цукрового діабету: гіперглікемія, глюкозурія, кетонурія, поліурія, полідипсія (спрага). Сукупність патологічних процесів може зумовити розвиток коми.

Одним із основних механізмів пошкодження тканин при цукровому діабеті є неферментативне глікозування (глікозилювання) білків, що призводить до розвитку ускладнень. *Діабетичні макроангіопатії* проявляються зниженням еластичності артерій, *мікроангіопатії* – у формі нефро- та ретинопатії.

Лабораторна робота № 6.2

Якісні реакції для визначення гормонів

Дослід 1. Реакція на гормони щитоподібної залози

Унаслідок руйнування тироксину, який є йодовмісною сполукою, утворюється KI, що в кислому середовищі взаємодіє з KIO_3 з виділенням молекулярного йоду:



I_2 + крохмаль $\rightarrow$ синє забарвлення

Матеріали та реактиви. Висушена тканина щитоподібної залози, 10%-й розчин NaOH, 10%-й розчин H_2SO_4 , 1%-й розчин крохмалю, 2%-й розчин KIO_3 , лакмус.

Обладнання. Фарфорова ступка з пестиком, пальник, піпетки, колба, крапельниця.

Хід роботи. У фарфоровій ступці ретельно розтирають 100–200 мг подрібненої та висушеної тканини щитоподібної залози. Одержану масу переносять у колбу для гідролізу, додають по 5 мл 10%-го розчину NaOH і води й кип'ятять протягом 10–15 хв. До 3 мл охолодженого гідролізату додають 10%-й розчин сірчаної

кислоти до кислої реакції на лакмус. Після підкислення вносять 5 крапель 1%-го розчину крохмалю та 1 мл 2%-го розчину KIO_3 . Йод, що виділився, дає синє забарвлення з крохмалем.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 2. Реакція на адреналін із хлоридом заліза (III)

При взаємодії адреналіну з хлоридом заліза (III) утворюється сполука типу феноляту заліза, що має смарогово-зелене забарвлення.

Матеріали та реактиви. 1%-й розчин FeCl_3 , 10%-й розчин NaOH , 0,1%-й розчин адреналіну.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, крапельниця.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл 0,1%-го розчину адреналіну, додають краплю 1%-го розчину хлориду заліза і перемішують. З'являється смарогово-зелене забарвлення. До суміші додають краплю 10%-го розчину NaOH , спостерігають вишнево-червоне забарвлення.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 3. Реакція на адреналін із діазореактивом

Унаслідок взаємодії адреналіну з діазореактивом утворюється складна сполука, що має червоний колір.

Матеріали та реактиви. Розчин адреналіну (1 : 1000), 1%-й розчин сульфанілової кислоти, 5%-й розчин азотистокислого натрію, 10%-й розчин Na_2CO_3 .

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл 1%-го розчину сульфанілової кислоти, 1 мл 5%-го розчину азотистокислого натрію (утворюється діазореактив), 1,5 мл розчину адреналіну та 1 мл 10%-го розчину Na_2CO_3 . Суміш перемішують і спостерігають забарвлення розчину.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Лабораторна робота № 6.3

Кількісні реакції визначення вмісту гормонів

Дослід 1. Кількісне визначення адреналіну методом Фоліна

В основу методу покладено колориметричне визначення інтенсивності забарвлення з реактивом Фоліна. До складу реактиву Фоліна входять солі фосфорновольфрамової та фосфорномо-

лібденової кислот. Ці солі під час взаємодії з адреналіном відновлюються з утворенням оксидів металів з нижчими валентностями, комплекси яких забарвлюються в синій колір.

Матеріали та реактиви. Стандартний розчин адреналіну (у мірну колбу об'ємом 25 мл вливають 1 мл розчину адреналіну (1 : 1000) й додають води до позначки – 1 мл такого розчину містить 0,04 мг адреналіну), 10%-й свіжовиготовлений розчин Na_2CO_3 , реактив Фоліна (див. дод. № 6, А).

Обладнання. Фотоколориметр, штатив із пробірками, піпетки, мірні колби об'ємом 25 мл.

Хід роботи. Готують дві сухі пробірки (мірні) об'ємом 10 мл. У першу вносять 1 мл стандартного розчину адреналіну, в другу – 1 мл досліджуваного розчину, потім доливають по 4 мл розчину Na_2CO_3 , по 0,5 мл реактиву Фоліна й перемішують. Рідина поступово забарвлюється в синій колір. Через 5 хв об'єми рідини у пробірках доливають до позначки 10%-м розчином Na_2CO_3 . Вміст пробірок інтенсивно перемішують і порівнюють забарвлення досліджуваного розчину зі стандартним розчином адреналіну в колориметрі.

Масову концентрацію адреналіну в досліджуваному розчині, мг/мл, розраховують за формулою:

$$C = C_0 \times \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{станд}}},$$

C_0 – масова концентрація адреналіну в стандартному розчині (0,04 мг/мл);

$E_{\text{досл}}$ і $E_{\text{станд}}$ – екстинкції досліджуваного та стандартного розчинів адреналіну.

Розрахунок вмісту адреналіну в досліджуваній пробі та отриманий результат записують у зошит.

Дослід 2. Визначення 17-оксикортикостероїдів (17-ОКС) у плазмі крові

Глюкокортикоїдні гормони та їхні метаболіти, що мають гідроксильні групи в положенні 17 і 10 та кетогрупу в положенні 20 (наприклад, гідрокортизон) утворюють при нагріванні з фенілгідразином у суміші сірчаної кислоти та спирту жовті сполуки, що мають максимум поглинання при 410 нм. Метод включає екстракцію плазми крові хлороформом, випарювання екстракту і ви-

лучення з нього стероїдів фенілгідразиним реактивом, видалення хлороформу, інкубацію з фенілгідразиним реактивом при 60 °С і вимір оптичної густини утворених фенілгідразинів.

Матеріали та реактиви. Кров, хлороформ, 0,2 н. розчин Na_2CO_3 , фенілгідразиний реактив, стандартний розчин гідрокортизону.

Приготування реактивів. *Хлороформ* необхідно попередньо очистити. 1 л хлороформу струшують протягом доби зі 100 мл концентрованої сірчаної кислоти; цю операцію повторюють двічі. Потім хлороформ промивають водою (струшуючи протягом 1–2 год), концентрованим аміаком, потім знову водою, розведеною в 3 рази сірчаною кислотою і насиченою розчином соди, висушують над безводною содою й відганяють із дефлегматором. Усі реактиви беруть для промивання в кількості, у 10 разів меншій, ніж кількість хлороформу. Обробку проводять у повній темряві (у скляному посуді, обгорненому чорним світлонепроникним папером). Термін зберігання 1 місяць.

Фенілгідразиний реактив: 65 мг перекристалізованого фенілгідразину розчиняють у суміші зі 100 мл розведеної сірчаної кислоти (190 мл води змішують із 310 мл концентрованої сірчаної кислоти) і 50 мл етилового спирту. Реактив готують безпосередньо перед використанням.

Стандартний розчин гідрокортизону (0,5 мкг гідрокортизону в 1 мл). 1 мг гідрокортизону розчиняють у 5 мл метанолу водою до 2 л.

Отримання зразків крові. 20 мл крові з вени збирають натщесерце вранці у пробірку, що містить гепарин або який-небудь інший коагулянт. Плазму крові відокремлюють від еритроцитів, центрифугуючи при 3000 об./хв протягом 20 хв. Плазму можна зберігати в холодильнику протягом 2–3 днів.

Обладнання. Ділильна лійка ємністю 100 мл, піпетки, годинник, мірний циліндр, круглодонна колба ємністю 100 мл, водяна баня, мірна пробірка ємністю 3 мл, шприц або інший пристрій для відсмоктування хлороформного шару, спектрофотометр (для вимірювання при довжинах хвиль 370, 410 і 450 нм), спектрофотометричні кювети завтовшки 5 або 10 мм.

Хід роботи. У ділильну лійку ємністю 100 мл наливають 25 мл хлороформу, додають 5 мл досліджуваної плазми або 5 мл стандартного розчину, що містить 0,5; 1 або 1,5 мкг гідрокортизону. Суміш енергійно струшують протягом хвилини. Через 20–

30 хв після розшарування хлороформний екстракт зливають у циліндр так, щоб при цьому трішки хлороформу (0,5 мл) залишилося над краєм ділильної лійки.

Хлороформний екстракт очищують, енергійно струшуючи з 2,5 мл 0,2 н. розчину Na_2CO_3 протягом 10–15 с. Після розшарування верхній шар відкидають, а нижній, який містить хлороформ, знову промивають протягом 10–45 с 2,5 мл дистильованої води.

Через півгодини 20 мл хлороформного екстракту відганяють до 1–2 мл у круглодонній колбі ємністю 100 мл у вакуумі при температурі водяної бані не вище 40 °С. Вміст колби переносять у мірну пробірку ємністю 3 мл, а колбу обмивають 1–2 мл хлороформу, який теж переносять у пробірку так, щоб загальний об'єм хлороформу становив 3 мл.

До цього екстракту додають по 0,2 мл фенілгідазинового реактиву і після збовтування протягом хвилини залишають на 10–15 хв, а після повторного збовтування – на 20 хв.

Хлороформовий шар (нижній) обережно відсмоктують, не захоплюючи фенілгідазиновий екстракт.

Пробірки з фенілгідазиновим реактивом, що залишився, поміщають на півгодини на водяну баню при 60 °С, потім охолоджують 2–3 хв у водопровідній воді й фотометрують на спектрофотометрі при трьох довжинах хвиль – 370, 410 і 450 нм відносно фенілгідазинового реактиву, який прогривають так само, як і дослідну пробу.

Запропонований метод дозволяє визначити 17-ОКС плазми при вмісті їх у пробі від 0,1 до 5 мкг; 1 мкг гідрокортизону, доданий до 5 мл плазми з периферичної крові людини, виявляється на 91–93 %.

Розрахунок. Вміст 17-ОКСу пробі для аналізу (5 мл плазми) розраховують зі співвідношення:

$$\frac{X}{E_{410} - \frac{E_{370} + E_{450}}{2}} = \frac{C_T}{E'_{410} - \frac{E'_{370} + E'_{450}}{2}},$$

де X – вміст 17-ОКСу пробі, мкг;

E – оптична густина пробі при відповідних довжинах хвиль;

C_T – вміст гідрокортизону в стандартній пробі, мкг;

E' – оптична густина стандартної пробі при відповідній довжині хвилі.

Позначивши через Q величину, яка є сталою для даного досліджу, розраховують вміст 17-ОКС у 100 мл плазми:

$$Q = \frac{C_T}{E'_{410} - \frac{E'_{370} + E'_{450}}{2}},$$

$$a = (E_{410} - \frac{E_{370} + E_{450}}{2}) \times Q \times \frac{100}{V},$$

де a – вміст 17-ОКС у 100 мл плазми, мкг;

V – об'єм плазми, взятої для аналізу, мл.

Розрахунок вмісту 17-ОКС у плазмі крові (мкг/100 мл) та отриманий результат записують у зошит.

Дослід 3. Визначення рівня 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) у плазмі крові

Кортикостероїди, що мають гідроксили біля 11 та 21 атомів вуглецю та Δ^4 -3-кетогрупу в кільці А (наприклад, кортикостерон), мають здатність до флуоресценції після обробки сумішшю концентрованої сірчаної кислоти та етилового спирту. У плазмі периферійної крові міститься у нормі 21,4 мкг/дл (0,59 мкмоль /л) 11-ОКС; межі коливань становлять 13–23 мкг/дл (0,358–0,635 мкмоль/л).

Матеріали та реактиви. Гепарин, цільна кров, гексан, метилендихлорид або хлороформ (для наркозу), 0,2 н. розчин карбонату натрію, пробірка на 15–20 мл із притертим корком, суміш концентрованої сірчаної кислоти та етилового спирту (3:1), стандартні розчини з концентрацією гідрокортизону та кортикостерону 250 мкг/л і 500 мкг/л.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, центрифужні пробірки, центрифуга (3000 об./хв), годинник, мірна пробірка з притертим корком, пастерівська піпетка, сполучена з водоструминним насосом, водяна баня, флуориметр, що забезпечує збудження при довжині хвилі 475 нм, а флуоресценції – 530–550 нм, кювети для вимірювання інтенсивності флуоресценції.

Хід роботи. У пробірку, що містить гепарин, збирають 2,0–2,5 мл крові. Плазму відокремлюють центрифугуванням при 3000 об./хв протягом 20 хв. У мірну пробірку з притертим корком вносять 1 мл плазми, доливають 3 мл гексану та енергійно струшують протягом 1 хв. Гексан відсмоктують пастерівською

піпеткою, сполученою з водострумним насосом, а залишок гексану видаляють відгонкою на водяній бані при 40 °С. До плазми додають 10 мл метилендихлориду або хлороформу (для наркозу) і струшують протягом 1 хв. Плазму відсмоктують пастерівською піпеткою. Екстракт промивають 0,5 мл 0,2 н. розчину карбонату натрію (1 хв), а потім 0,5 мл дистильованої води (1 хв), які також видаляють за допомогою пастерівської піпетки. Метилендихлоридний (хлороформний) екстракт – 8 мл – переносять у чисту пробірку на 15–20 мл із притертим корком і доливають 2,5 мл суміші концентрованої сірчаної кислоти та етилового спирту (3:1), приготовленої перед визначенням. Після струшування протягом 1 хв метилендихлорид видаляють і через годину вимірюють флуоресценцію (475 нм збудження, 530–550 нм флуоресценція).

Паралельно виконують стандартні проби, використовуючи замість плазми крові по 1 мл відповідних стандартних розчинів з концентрацією гідрокортизону та кортикостерону 250 мкг/л і 500 мкг/л.

Для контрольної проби замість плазми крові беруть воду й виконують усі процедури, або використовують чисту кислотно-етанольну суміш.

Концентрацію 11-ОКС визначають за формулою:

$$X = \frac{\Phi_{\text{досл}} \times C_{\text{станд}}}{\Phi_{\text{станд}}},$$

де $\Phi_{\text{досл}}$ і $\Phi_{\text{станд}}$ – флуоресценція дослідної та стандартної проб;

$C_{\text{станд}}$ – концентрація 11-ОКС в одній із двох стандартних проб, мкг/л.

Коефіцієнт перерахунку мкг/дл у мкмоль/л – 0,0276.

Розрахунок вмісту 11-ОКС у досліджуваній пробі та отриманий результат записують у зошит, порівнюють з нормальними величинами, роблять висновки.

Дослід 4. Визначення 17-кетостероїдів у сечі

Ефіри 17-кетостероїдів (17-КС) із глюкуроною та сірчаною кислотою гідролізують нагріванням у кислому середовищі в присутності формальдегіду. Кетостероїди (у т. ч. андростерон та дегідроепіандростерон) екстрагують ефіром і визначають за кольоровою реакцією з метадинітробензолом у лужному середовищі.

Матеріали та реактиви. Добова сеча, ізотонічний розчин NaCl, концентрована HCl, льодяна оцтова кислота, розчин формальдегіду (змішують 50 мл 40%-го розчину формаліну з 250 мл води), діетиловий ефір (для наркозу), 10%-й розчин NaOH, 5 н. розчин КОН у метанолі, абсолютний етанол, 2%-й спиртовий розчин *m*-динітробензолу, 50%-й етанол, хлороформ, основний стандартний розчин, що містить 50 мкг андростерону або дегідроепіандростерону, стандартний розчин андростерону (дегідроепіандростерону) – 100 мкг/мл абсолютного етанолу.

Обладнання. Колба зі скляною пробкою, піпетки, кипляча водяна баня, витяжна шафа, шприц або інший пристрій для відсмоктування, ділильна воронка або колбочки, магнітні розмішувачі, фотометр (для вимірювання при довжині хвилі 500–560 нм), фотометричні кювети завтовшки 0,5 см з кришками,

Хід роботи. Добову сечу збирають у чистий посуд, відбирають 5–20 мл залежно від вмісту кортикостероїдів. Об'єм доводять ізотонічним розчином NaCl до 20 мл, додають 3 мл концентрованої HCl, 1 мл льодяної оцтової кислоти і 0,2 мл розчину формальдегіду. Колбу закривають скляною пробкою, що не прилягає щільно, і ставлять на 15 хв на киплячу водяну баню. (Працювати під витяжною шафою!).

Після охолодження вміст колби двічі екстрагують порціями по 10 мл діетилового ефіру (для наркозу) протягом 1–2 хв. Нижній шар сечі видаляють. Ефірні екстракти зливають разом, промивають трьома порціями по 10 мл 10%-го розчину NaOH (по 3 хв). Водну лужну фазу відкидають і промивають екстракт 10 мл води. Екстракцію та промивання можна проводити в ділильній воронці або колбочках, використовуючи магнітні розмішувачі.

Воду ретельно відділяють, промитий ефірний екстракт невеликими порціями переносять у пробірку і випарюють на водяній бані при температурі не більше 50 °C, струшуючи під струменем повітря або азоту. Сухий екстракт можна залишити на декілька днів у холодильнику.

У пробірку із сухим залишком додають 0,2 мл 5 н. розчину КОН у метанолі, 0,2 мл абсолютного етанолу і 0,2 мл 2%-го спиртового розчину *m*-динітробензолу, ретельно перемішують і залишають у темряві при кімнатній температурі на 1 год для розвитку забарвлення. По закінченні інкубації додають 3 мл

50%-го етанолу та 2 мл хлороформу, енергійно струшують. Забарвлені у фіолетовий колір продукти переходять у нижній хлороформовий шар, а продукти неспецифічного кольору (жовто-коричневого) залишаються у верхньому спиртовому. Через 1–2 хв після розшарування суміші верхній водно-спиртовий шар, що містить забруднення, обережно відсмоктують, а в нижній шар фіолетового кольору додають 1 мл абсолютного етанолу. Інтенсивність забарвлення вимірюють на фотометрі в кюветах завтовшки 0,5 см відносно контрольної проби за довжини хвилі 500–560 нм (кювети закривають кришками). У контролі замість сухого екстракту беруть чисту пробірку, у яку вносять по 0,2 мл абсолютного етанолу, 5 н. КОН у метанолі та 2%-го *m*-динітробензолу, перемішують і обробляють як дослідну пробу. Забарвлення стабільне протягом 1 год, але інтенсивність знижується приблизно на 10–15%.

Розрахунок проводять за формулою або калібрувальним графіком. Для розрахунку за формулою паралельно до дослідних проб проводять процедуру з 0,5 мл основного стандартного розчину, що містить 50 мкг андростерону або дегідроепіандростерону. Екскрецію 17-КС із сечею розраховують за формулою:

$$X = \frac{A_{\text{досл}} \times D \times 50}{A_{\text{станд}} \times 20 \times 1000},$$

де $A_{\text{досл}}$ і $A_{\text{станд}}$ – показання фотометра для дослідної проби та стандартного розчину;

D – діурез, мл за добу;

50 – вміст андростерону в стандартній пробі, мкг;

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

1000 – коефіцієнт перерахунку мкг у мг.

Для одержання даних калібрувального графіка через всі етапи аналізу проводять стандартний розчин андростерону (дегідроепіандростерону) – 100 мкг/мл абсолютного етанолу – у кількості від 0,1 до 1,0 мл.

Для переведення отриманих за формулою значень із міліграмів у мікромолі їх помножують на коефіцієнт 3,467. Якщо концентрація 17-КС вища 100 мкг у пробі, сечу необхідно розвести фізіологічним розчином.

Розрахунок вмісту 17-КС у добовій сечі та отриманий результат записують у зошит.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які функції виконують гормони гіпофіза?
2. Які гормони регулюють обмін вуглеводів?
3. Як синтезуються тиреоїдні гормони?
4. За якими механізмами паратгормон підвищує рівні кальцію в крові?
5. У чому різниця між цукровим діабетом I і II типу?

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДО РОЗДІЛУ 6

Завдання 1

Визначте, які з перерахованих гормонів є пептидами:

- 1) кортизол;
- 2) норадреналін;
- 3) прогестерон;
- 4) гормон росту;
- 5) фолікулостимулювальний гормон;
- 6) кальцитріол;
- 7) тироксин;
- 8) кальцитонін;
- 9) інсулін;
- 10) глюкагон.

Завдання 2

Визначте, які з перерахованих гормонів є стероїдами:

- 1) естрадіол;
- 2) трийодтиронін
- 3) норадреналін;
- 4) адренокортикотропний гормон;
- 5) кортизол;
- 6) кальцитріол;
- 7) прогестерон;
- 8) тиреотропний гормон;

- 9) тестостерон;
- 10) альдостерон.

Завдання 3

Визначте, які з перерахованих гормонів є похідними амінокислот:

- 1) адреналін;
- 2) альдостерон;
- 3) пролактин
- 4) норадреналін;
- 5) трийодтиронін;
- 6) тироксин;
- 7) прогестерон;
- 8) кортизон;
- 9) соматотропін.

Завдання 4

Оберіть вірне визначення ліберинів:

- 1) невеликі пептиди;
- 2) взаємодіють із цитоплазматичними рецепторами;
- 3) активують секрецію тропних гормонів;
- 4) передають сигнал на рецептори передньої частини гіпофіза;
- 5) викликають секрецію інсуліну.

Завдання 5

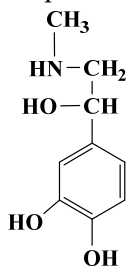
Визначте відповідність місця синтезу (літери) перерахованих гормонів (цифри):

- 1) адреналін;
- а) гіпофіз;
- 2) глюкагон;
- б) підшлункова залоза;
- 3) інсулін;
- в) щитоподібна залоза;
- 4) тироксин.
- г) надниркові залози.

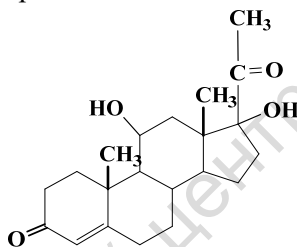
Завдання 6

Підберіть до структурних формул гормонів відповідні назви:

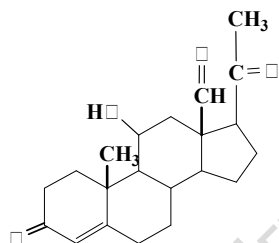
1)



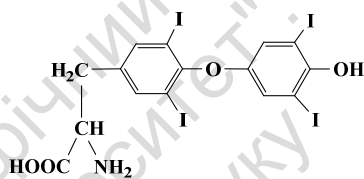
2)



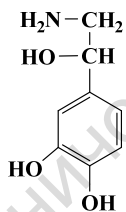
3)



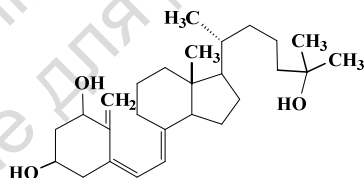
4)



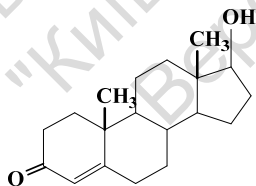
5)



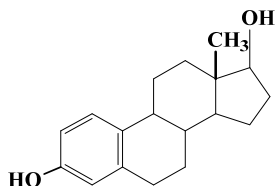
6)



7)



8)



- а) адреналін;
- б) альдостерон;
- в) норадреналін;
- г) кальцитріол;

- д) естрадіол;
- е) тетраодтиронін;
- ж) тестостерон;
- з) кортизон.

Завдання 7

Укажіть положення, які вірно відображають функцію глюкокортикоїдів:

- 1) підвищують швидкість надходження глюкози до клітин м'язів та жирової тканини;
- 2) зменшують швидкість надходження амінокислот до клітин м'язової тканини;
- 3) стимулюють синтез специфічних білків у лімфоїдній і сполучній тканинах;
- 4) стимулюють глюконеогенез;
- 5) стимулюють синтез глікогену в печінці;
- 6) підсилюють швидкість катаболізму амінокислот у печінці та м'язах;
- 7) стимулюють ліполіз у жировій тканині.

Завдання 8

Виберіть твердження, які вірно характеризують дію паратгормону:

- 1) підсилює мобілізацію кальцію із кісток;
- 2) стимулює затримку натрію в організмі;
- 3) підсилює реабсорбцію кальцію;
- 4) підсилює реабсорбцію води;
- 5) активує аденілатциклазу в клітинах-мішенях;
- 6) знижує реабсорбцію фосфатів.

Завдання 9

Визначте вірну послідовність подій, які відбуваються при передачі гормонального сигналу в клітинах жирової тканини за участю глюкагону (використовуйте цифрові позначення):

- 1) взаємодія гормону зі специфічним рецептором;
- 2) активація протеїнкінази А;
- 3) утворення цАМФ;
- 4) активація аденілатциклази;
- 5) гідроліз триацилгліцеролів (ТАГ);
- 6) фосфорилування ТАГ-ліпази.

Завдання 10

Розподіліть перераховані гормони по групах (А–В) відповідно до їхньої хімічної будови:

- 1) паратгормон;
- 2) прогестерон;
- 3) трийодтиронін;
- 4) інсулін;
- 5) кортизол;
- 6) тиреотропін;
- 7) соматотропін;
- 8) кортикотропін

- А) білки;
Б) стероїди;
В) похідні амінокислот.

Розділ 7

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ТА ПРОТИПОЖЕЖНІ ЗАХОДИ В БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Точність і достовірність біохімічних досліджень залежить від високоточних сучасних приладів, спеціальних реактивів із відповідним ступенем кваліфікації очищення тощо. Однак існує багато чинників, які також значною мірою можуть вплинути на результати досліджень. Це, насамперед, якість підготовки посуду, правильність і точність відмірювання об'ємів і відважування реактивів, дбайливе ставлення до приладів та вміле користування ними, правильність обробки одержаного експериментального матеріалу та ін. Треба чітко усвідомлювати, що в основі техніки лабораторних робіт лежать певні наукові принципи.

Дослідник, який працює в біохімічній лабораторії, має бути максимально уважним, акуратним і відповідальним. Будь-яке порушення основних вимог щодо проведення досліджень може призвести до викривлення результатів, для одержання яких було витрачено багато праці, часу і коштів.

Практичні роботи з біохімії проводяться в спеціалізованих лабораторіях. Залежно від характеру та об'єму роботи біохімічні лабораторії можуть мати різне обладнання, але обов'язково повинні відповідати санітарно-гігієнічним вимогам. Стіни лабораторії мають бути облицьовані кахлем або наполовину зафарбовані олійною фарбою, а підлога – застелена лінолеумом. У лабораторії необхідно мати припливно-витяжну (або, принаймні, витяжну) вентиляцію, протипожежне обладнання (пінний та вуглекислотний вогнегасники, ящик із піском, просякнуту вогнезахисною речовиною ковдру), засоби індивідуального захисту (окуляри, гумові рукавиці, протигази або респіратори), аптечку для надання першої допомоги при різних травмах. Лабораторія має бути забезпечена гарячою та холодною водою, електроенергією, природним газом. У спеціально відведеному місці під витяжною обов'язково встановлюють окремі

ємкості для зливання залишків кислот, лугів, органічних рідин, а також лотки для складання використаного посуду. У лабораторії робочим місцем є хімічний стіл, обов'язково покритий кахельною плиткою або кислототривким пластиком.

Крім основного приміщення, у кожній лабораторії повинні бути допоміжні кімнати – мийна, вагова, апаратна й підсобна.

Робота в біохімічній лабораторії пов'язана з певними небезпечними та шкідливими факторами. Вона проводиться, як правило, з малою кількістю хімічних речовин, що знижує небезпеку й можливість нещасних випадків, але не виключає їх повністю. Категорично забороняється в лабораторії вживати їжу, пити воду з хімічного посуду, палити, користуватися косметикою. Забороняється пробувати на смак будь-які речовини, а також використовувати їх у роботі, якщо на посуді, де вони зберігаються, немає написів.

Виконуючий роботу повинен знати правила техніки безпеки й протипожежні заходи, а також місцезнаходження аптечки з медикаментами та засобів пожежогасіння; вміти надати першу допомогу при різних травмах. Необхідно знати властивості використовуваних речовин і тих, що утворилися внаслідок реакцій, і додержуватися правил безпеки під час роботи з ними. При виконанні роботи обов'язково слід дотримуватися вказівок щодо використання всіх необхідних індивідуальних засобів захисту. Особливу увагу й обережність треба проявляти при роботі зі скляними приладами та посудом. Якщо, наприклад, необхідно вставити в скляну трубку термометр або піпетку в шланг чи корок, їх попередньо змочують водою або змащують гліцерином, а потім прокручують при слабкому натискуванні; руки при цьому обмотують ганчіркою.

У біохімічних дослідженнях скляний посуд є найуживанішим, хоча часто його замінюють посудом з інших матеріалів, зокрема з полімерів. Скло належить до крихких матеріалів. Основна кількість нещасних випадків при роботі зі скляним посудом кваліфікується як мікротравми і легкі травми. У першу чергу, це порізи рук та їх опіки у разі необережного поводження з нагрітим до високої температури скляним посудом.

Необхідно суворо стежити за тим, щоб марка скла відповідала характеру здійснюваної роботи – нагрівання можна проводити тільки в термостійкому посуді, а роботи під вакуумом або за під-

вищеного тиску – тільки в спеціально для цього призначених скляних приладах. При проведенні подібних робіт не можна користуватися скляним посудом, який має навіть ледь помітні дефекти.

Пробірки з розчином слід нагрівати поступово, безперервно обертаючи їх і час від часу струшуючи. При цьому пробірки мають знаходитися в нахиленому положенні для того, щоб бризки розчину ударилися об стінки і не вихлюпувались назовні. Ні в якому разі не можна нагрівати рідини в закупореному посуді, який не має сполучення з атмосферою. Не можна нахилятися над посудом із рідиною, що підігрівається, спрямовувати отвір такого посуду на себе або інших працюючих. Узагалі, при нагріванні хімічного скляного посуду треба уникати різких змін температури, а також нерівномірного його нагрівання в різних частинах. Крім того, нагрівати скляний посуд слід тільки на азбестовій сітці або азбестовому картоні й у жодному разі – на полум'ї.

Скляний посуд великих розмірів і скляні прилади переносять тільки обома руками. Великі (понад 5 л) сулії з рідиною необхідно переносити вдвох у спеціальних кошиках або ящиках з ручками. Забороняється піднімати сулії за шийку. Роботу з їдкими, отруйними або з різким запахом речовинами слід проводити у витяжній шафі. Визначати запах речовин треба обережно, спрямовуючи пару до себе легким рухом долоні й не вдихаючи повітря на повні груди. Затягувати їдкі рідини в піпетку треба тільки за допомогою гумової груші або спеціальних пристроїв і в жодному разі не робити це ротом.

Забороняється виливати в раковину залишки кислот, лугів, легкозаймистих та горючих рідин, викидати туди тверді речовини (папір, пісок, сірники тощо).

За правилами безпеки, забороняється працювати одному в приміщенні лабораторії, а також залишати без нагляду працюючі лабораторні пристрої, газові пальники та ввімкнуті електроприлади.

Не дозволяється зберігати в приміщенні лабораторії вогнебезпечні речовини масою понад 1 кг кожної та 3–4 кг загальною масою.

При використанні легкозаймистих рідин (ефіри, спирти, бензин, бензол, ацетон) необхідно стежити за тим, щоб на відстані до 2 м не було відкритого вогню. Нагрівати легкозаймисті рідини слід тільки на банях, заповнених відповідними теплоносіями. Забороняється нагрівати рідинні бані на відкритому вогні (запалені пальники, сірники тощо), а також на джерелах тепла з nere-

гульованим тепловим потоком. Зберігати легкозаймисті рідини належить у товстостінних склянках у місцях, віддалених від відкритого вогню і джерел тепла, у ящиках викладених азбестом і з написом “Вогнебезпечні речовини”. Ці реактиви необхідно надійно закупорювати. Горючі матеріали слід зберігати на відстані 1 м від електрощитів, електророзеток і електрокабелів, від світильників – не менше 0,5 м, від приладів опалення – на 0,25 м.

Усі працівники повинні вміти користуватися наявними вогнегасниками, внутрішніми пожежними кранами та іншими первинними засобами пожежогасіння та знати місце їхнього розміщення. При виникненні пожежі слід негайно повідомити викладача, пожежну охорону. За необхідності вжити заходів щодо евакуації людей і розпочати гасіння пожежі наявними засобами, організувати зустріч пожежних підрозділів. Якщо виникла в приміщенні локальна пожежа, то вогонь слід швидко накрити протипожежною ковдрою (шматком азбестової тканини). Якщо рідина (ефір, бензин тощо), що спалахнула, розтеклася, її гасять піском, якщо ж загорілись розчинні у воді речовини (спирти, ацетон тощо), їх гасять водою. Людину, на якій зайнявся одяг, швидко і щільно закутують у протипожежну ковдру, щоб загасити полум'я. Вуглекислотними вогнегасниками необхідно користуватися обережно, щоб від різкого перепаду температури не потіскалися скляні частини приладів і скляний посуд.

У сучасних біохімічних дослідженнях використовується велика кількість електроприладів різної потужності. Необхідний рівень електробезпеки може бути досягнутий за умови проведення комплексу заходів, спрямованих на вдосконалення засобів із захисту, підвищення надійності електрообладнання, глибокого засвоєння працівниками правил безпечної роботи з електроприладами.

При роботі з електроприладами необхідно постійно перевіряти стан заземлення, надійність ізоляції, проводити своєчасно профілактику пошкоджень. Усі струмопровідні частини приладів незалежно від напруги, під якою вони перебувають, мають бути захищені.

У лабораторії можна одночасно вмикати таку кількість приладів, сумарна потужність яких не перевищує потужності електромережі або її відгалужень.

Забороняється влаштовувати тимчасові електромережі, застосовувати саморобні некалібровані запобіжники, прокладати електромережу всупереч протипожежним нормам і правилам, вико-

ристовувати саморобні подовжувачі та ті, які не відповідають експлуатації для даних електроприладів. Користуватися побутовими електрокип'ятильниками, чайниками можна тільки у спеціально відведених та обладнаних для цього приміщеннях. Забороняється залишати без нагляду увімкнуті в електромережу комп'ютери, кондиціонери, лічильники, сушильні шафи тощо.

При гасінні полум'я пінним вогнегасником необхідно вимкнути електричний струм в усіх приміщеннях за допомогою загального рубильника. До розмикання електричного ланцюга забороняється торкатися голими руками (без гумових рукавиць тощо) оголених частин тіла потерпілого.

При роботі з вакуумними пристроями, у яких використовуються водоструминні або масляні насоси (вакуумексикатори, вакуумне фільтрування тощо) вакуумний посуд обов'язково слід загорнути в ганчірку. Очі слід захистити окулярами або маскою, котру знімають тільки після охолодження приладу і впускання в нього повітря.

Необхідно ретельно стежити за станом газопровідної системи (сполучні муфти, крани) і не допускати несправностей. Після закінчення роботи всі крани треба закривати. Якщо у приміщенні виявлено запах газу, приміщення слід негайно провітрити, утворюючи в ньому протяг. При цьому в жодному разі не можна запалювати вогонь або вмикати (чи вимикати) електричний струм. Для пошуку місця витоку газу треба користуватись мильною піною.

У разі використання стисненого або скрапленого газу насамперед необхідно пересвідчитись, що балон і редуктор є справними і що термін придатності балона не закінчився. Балони треба оберегати від поштовхів, механічних пошкоджень та нагріву. Їх слід уміщувати в ящики, які знаходяться поза приміщенням, а газ підводиться в лабораторію спеціальним трубопроводом.

При роботі з лужними металами, карбідом кальцію та деякими іншими речовинами в присутності води може статися вибух. Зважаючи на це, треба працювати в захисних окулярах або масці, користуватися тільки сухим інструментом за цілковитої відсутності води.

Дуже небезпечним є необережне поводження з кислотами та лугами. Навіть слабкі кислоти (наприклад, оцтова) за високих концентрацій здатні спричинити хімічні опіки. Потрапляння розчинів кислот або лугів в очі може призвести до ураження рогівки і втрати зору. Особливо небезпечні луги та аміак. Тому всі роботи з кислотами й

лугами проводяться у витяжній шафі, надягнувши захисні окуляри та гумові рукавиці, а при переливанні кислот із великої ємності в малу необхідно надягати гумовий фартух і використовувати сифон або спеціальний штатив з нахилом. Для розведення кислоти слід вливати тоненьким струменем у воду, постійно перемішуючи, не допускаючи таким чином перегріву. Нейтралізацію кислот або лугів необхідно проводити тільки після розведення їх.

При подрібненні твердих лугів великі грудки загортають у щільну тканину і розбивають молотком, а маленькі – розтирають у ступці, яку закривають ганчіркою. Причому цю роботу виконують у головному уборі, оскільки випадкове потрапляння твердого лугу у волосся може залишитись поза увагою і згодом спричинити його випадання.

Деякі органічні сполуки – ароматичні (анілін), аліфатичні аміни, ароматичні вуглеводні (бензол, толуол, діоксан тощо), похідні галогенних вуглеводневих сполук (хлорбензол, чотирихлористий вуглець та ін.) – токсичні, тому з цими речовинами слід поводитися обережно, запобігати потраплянню їх на шкіру та в очі й не вдихати їхньої пари. Пара бензилхлориду й бензалдегіду, а також деякі інші речовини виявляють подразнювальну дію на слизові оболонки очей і верхніх дихальних шляхів. Етиленгліколь може всмоктуватися крізь шкіру і є особливо небезпечним при пероральному надходженні до організму.

У біохімічній лабораторії слід працювати в халаті з бавовняної тканини.

Перша допомога при травмах і отруєннях. У лабораторії опіки можуть бути спричинені вогнем, парою, гарячими або розжареними речовинами, лугами, кислотами, а також речовинами, які мають дуже низьку температуру (рідкий кисень, рідка вуглекислота, рідкий азот тощо).

При термічних опіках не дозволяється змочувати обпечене місце водою. У жодному разі не можна проривати утворені пухирі і перев'язувати опік бинтом. На обпечені місця накладають складений декілька разів бинт або марлю, змочену 3%-м розчином перманганату калію, 5%-м розчином таніну, етиловим спиртом або змащену спеціальним кремом від опіків. При складніших опіках слід накладати стерильну пов'язку і звернутися до лікаря.

При потраплянні кислоти (сірчаної, соляної, азотної, фосфорної) уражене місце промивають спочатку великою кількістю проточної води, потім 3–5%-м розчином гідрокарбонату натрію або 10%-м розчином вуглекислого амонію і знову промивають водою. При опіках лугами після промивання великою кількістю води шкіру змочують 2–3%-м розчином оцтової кислоти або 1–2%-м розчином соляної кислоти і потім знову промивають водою.

При опіках порожнини рота (або очей) лугами необхідно прополоскати (промити) великою кількістю води, а потім прополоскати (промити) 3%-м розчином оцтової кислоти або 2%-м розчином борної кислоти. При ураженні слизової оболонки рота або очей кислотою їх обробляють 3–5%-м розчином гідрокарбонату натрію.

Якщо кислота потрапила в дихальні шляхи треба дихати розпиленням за допомогою пульверизатора 10%-м розчином гідрокарбонату натрію, а при потраплянні луку – розпиленням 3%-м розчином оцтової кислоти.

Якщо на тіло потрапили органічні речовини, нерозчинні у воді, їх змивають великою кількістю розчинника цієї речовини, а потім промивають етиловим спиртом і змащують кремом. При опіках рідким фенолом необхідно розтирати уражене місце гліцерином доти, поки не відновиться нормальний колір шкіри. Після цього шкіру промивають водою і накладають на уражене місце серветку або марлевий тампон, змочений гліцерином.

При ударах для зменшення болю і запобігання підшкірному крововиливу біля забитого місця накладають стискаючу пов'язку, а поверх неї – лід.

При ураженні тканин (пораненні), особливо при порізах битим скляним лабораторним посудом, рану насамперед очищають від уламків скла стерильним пінцетом або стерильною марлею, зупиняють кровотечу, очищають поверхню шкіри навколо рани від бруду й обробляють її краї антисептиком (розчином йоду тощо). При раптовому виникненні кровотечі заливають рану (безпосередньо) 3%-м розчином пероксиду водню або водним розчином хлориду заліза (III), а потім накладають стерильну серветку або марлевий тампон (ватою в даному випадку користуватися не слід, щоб її волокна не потрапили в рану) і щільно забинтовують, після чого потерпілого відправляють до медичної уста-

нови. У випадку суттєвіших уражень і сильної кровотечі накладають стискаючу пов'язку (джгут) вище рани для припинення кровотечі, накривають рану стерильним перев'язувальним матеріалом і викликають лікаря.

При пораненнях із одночасним ураженням кислотою або лугом рану ретельно очищають від скалок, промивають її відповідно 3–5%-м розчином гідрокарбонату натрію або 3%-м розчином оцтової кислоти, потім обробляють краї рани антисептиком і забинтовують стерильним бинтом або марлею.

При отруєннях газом потерпілого треба негайно вивести на свіже повітря, напоїти великою кількістю молока (у деяких випадках слід напоїти його кавою) і надати спокою.

При електротравмах потерпілому до прибуття лікаря забезпечують повний спокій і надходження свіжого повітря. Потерпілий не повинен робити зайвих рухів. Якщо наявне порушення дихання і серцевої діяльності, необхідно негайно вдатися до штучного дихання та непрямого масажу серця і не припиняти ці дії до повного відновлення функцій або до прибуття медичних працівників. Штучне дихання роблять тільки в тому випадку, якщо людина дихає неритмічно або не дихає взагалі.

ДОДАТКИ

Додаток 1

СПІВВІДНОШЕННЯ ОДИНИЦЬ ВИМІРУ

Фізичні величини	Одиниці виміру
Довжина	$1 \text{ см} = 10^{-2} \text{ м} = 10 \text{ мм} = 10^4 \text{ мкм} = 10^7 \text{ нм} = 10^8 \text{ Å} = 0,3937 \text{ дюйма}$ $1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м} = 10^{-6} \text{ мм} = 10^{-3} \text{ мкм} = 1 \text{ мілімікрон (мμ)}$ $1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м} = 10^{-3} \text{ мм} = 1000 \text{ нм} = 1 \text{ мікрон (μ)}$ $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ м} = 10^{-8} \text{ см} = 10^{-4} \text{ мкм} = 10^{-1} \text{ нм}$
Маса	$1 \text{ г} = 10^{-3} \text{ кг} = 10^{-3} \text{ мг} = 10^6 \text{ мкг} = 3,527 \cdot 10^{-2} \text{ унцій}$ $1 \text{ Дальтон (Д)} = 1,661 \cdot 10^{-24} \text{ г, що дорівнює } \frac{1}{2} \text{ маси атому вуглецю (}^{12}\text{C)}$
Об'єм	$1 \text{ см}^3 = 10^{-6} \text{ м}^3 = 10^3 \text{ мм}^3 = 6,1 \cdot 10^{-2} \text{ дюйм}^3 = 3,53 \cdot 10^{-5} \text{ фут}^3$ $1 \text{ мкл} = 1 \text{ мм}^3 = 10^{-9} \text{ м}^3$ $1 \text{ мл} = 1 \text{ см}^3 = 10^{-3} \text{ л} = 10^3 \text{ мкл}$ $1 \text{ л} = 1 \text{ дм}^3 = 10^{-3} \text{ м}^3$
Температура	$K = ^\circ\text{C} + 273,15$
Енергія	$1 \text{ Дж} = 10^7 \text{ ерг} = 0,239 \text{ кал} = 1 \text{ Вт} \cdot \text{с}$
Тиск	$1 \text{ тор} = 1 \text{ мм рт. ст. (0 } ^\circ\text{C)} = 1,333 \cdot 10^2 \text{ Н/м}^2 = 1,316 \cdot 10^{-3} \text{ атм.}$

ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ
НЕОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ І ЛУГІВ

Кислота	Концентрація		Густина г/см ³	Спосіб виготовлення
	Моль/л	% (мас.)		
HNO ₃	15,7 (конц.)	69,8	1,42	385 мл HNO ₃ (конц.) розвес- ти до 1 л
	6	31,6	1,195	128 мл HNO ₃ (конц.) розвес- ти до 1 л
	2	11,8	1,067	6,5 мл перегнаної HNO ₃
	0,1	0,36	1,00	(конц.) розвести до 1 л
H ₂ SO ₄	18,0 (конц.)	95,6	1,84	112 мл H ₂ SO ₄ (конц.) влити в 0,5 л H ₂ O, охолодити, розве- сти до 1 л
	2	17,5	1,123	а) 2,8 мл H ₂ SO ₄ (конц.) вли- ти в 0,5 л H ₂ O, охолодити,
	0,05	0,49	1,00	розвести до 1 л б) 25 мл H ₂ SO ₄ (4 н.) розвес- ти до 1 л
HCl	12,14 (конц.)	37,23	1,19	494 мл HCl (конц.) розвести до 1 л
	6	20,0	1,100	164 мл HCl (конц.) розвести до 1 л
	2	7,05		8,23 мл HCl (конц.) розвести
	0,1	0,36	1,00	до 1 л
KOH	6	26,9	1,26	340 г KOH розчинити в H ₂ O та розвести до 1 л
	2	10,3	1,09	112 г KOH розчинити в H ₂ O та розвести до 1 л
	0,1	0,56	1,00	5,6 г KOH розчинити в H ₂ O та розвести до 1 л
NaOH	6	19,7	1,22	240 г NaOH розчинити в H ₂ O, охолодити та розвести до 1 л
	2	7,4	1,08	80 г NaOH розчинити в H ₂ O, охолодити та розвести до 1 л

Додаток 3

РОЗЧИННІСТЬ ДЕЯКИХ СОЛЕЙ У ВОДІ ЗА РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР

(у грамах безводної речовини на 100 г води)

Назва солі	Температура, °С			
	0	20	50	100
Хлористий натрій (NaCl)	35,7	36,0	37,0	39,8
Хлористий калій (KCl)	27,6	34,0	42,6	56,7
Азотнокислий калій (KNO ₃)	13,3	31,6	85,5	246
Хлористий амоній (NH ₄ Cl)	29,4	37,2	50,4	77,3
Азотнокисле срібло (AgNO ₃)	122	222	455	952
Сірчанокисла мідь (CuSO ₄ 5H ₂ O)	14,3	20,7	33,3	75,4

Додаток 4

КОНЦЕНТРАЦІЯ І ГУСТИНА КОНЦЕНТРОВАНИХ КИСЛОТ

Речовина	М	Концен-трація, %	Молярна концент-рація, М/л	Кількість кислоти, яка необхідна для приготування 1л 1М розчину, мл	Густи-на, г/см ³
Оцтова кислота	60,05	99,6	17,4	57,5	1,050
Мурашина кислота	46,03	90,0; 98,0	23,6; 25,9	42,4; 38,5	1,205; 1,220
Соляна кислота	36,46	36,0	11,6	85,9	1,180
Азотна кислота	63,01	70,0	15,7	63,7	1,420
Хлорна кислота	100,46	60,0; 72,0	9,2; 12,2	108,8; 82,1	1,540; 1,700
Фосфорна кислота	98,00	85,0	14,7	67,8	1,700
Сірчана кислота	98,07	98,0	18,3	54,5	1,835

БУФЕРНІ РОЗЧИНИ

1. Розчини за Кларком – Лабсом, pH 1,0 ÷ 2,2 (25 °C)

Склад: 25 мл 0,2 М КСІ (14,919 г/л) + X мл 0,2 М НСІ;

розвести H₂O до 100 мл

pH	НСІ, мл	Буферна ємність	pH	НСІ, мл	Буферна ємність
1,00	67,0	0,310	1,70	13,0	0,060
1,10	52,8	0,240	1,80	10,2	0,049
1,20	42,5	0,190	1,90	8,1	0,037
1,30	33,6	0,160	2,00	6,5	0,030
1,40	26,6	0,130	2,10	5,1	0,026
1,50	20,7	0,100	2,20	3,9	0,022
1,60	16,2	0,077			

2. Буферні розчини на основі гліцин-НСІ, pH 2,2 ÷ 3,6 (25 °C)Гліцин C₂H₅NO₂; М 75,07

Склад: 25 мл 0,2 М гліцину (15,01 г/л) + X мл 0,2 М НСІ;

розвести H₂O до 100 мл

pH	НСІ, мл	pH	НСІ, мл
2,2	22,0	3,0	5,7
2,4	16,2	3,2	4,1
2,6	12,1	3,4	3,2
2,8	8,4	3,6	2,5

3. Буферні розчини на основі системи "цитринова кислота – цитрат натрію", pH 3,0÷6,2 (25 °C)Моногідрат цитринової кислоти C₆H₈O₇·H₂O; М 210,14;
0,1 М розчин містить 21,01 г/лДигідрат тринатрієвої солі цитринової кислоти
C₆H₅O₇Na₃·2H₂O; М 294,12; 0,1 М розчин містить 29,41 г/л

Склад: X мл 0,1 М цитринової кислоти + Y мл 0,1 М тринатрієвої солі цитринової кислоти

рН	0,1 М цитринова кислота, мл	0,1 М тринатрієва сіль цитринової кислоти, мл	рН	0,1 М цитринова кислота, мл	0,1 М тринатрієва сіль цитринової кислоти, мл
3,0	82,0	18,0	4,8	40,0	60,0
3,2	77,5	22,5	5,0	35,0	65,0
3,4	73,0	27,0	5,2	30,5	69,5
3,6	68,5	31,5	5,4	25,2	74,5
3,8	63,5	36,5	5,6	21,0	79,0
4,0	59,0	41,0	5,8	16,0	84,0
4,2	54,0	46,0	6,0	11,5	88,5
4,4	49,5	50,5	6,2	8,0	92,0
4,6	44,5	55,5			

4. Буферні розчини на основі системи "ацетат натрію – оцтова кислота", рН 3,7÷5,6 (18 °С)

Тригідрат ацетата натрію $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$, М 136,09; 0,2 М розчин містить 27,22 г/л

Склад: X мл 0,2 М CH_3COONa + Y мл 0,2 М CH_3COOH

рН	0,2 М CH_3COONa , мл	0,2 М CH_3COOH , мл	рН	0,2 М CH_3COONa , мл	0,2 М CH_3COOH , мл
3,7	10,0	90,0	4,8	59,0	41,0
3,8	12,0	88,0	5,0	70,0	30,0
4,0	18,0	82,0	5,2	79,0	21,0
4,2	26,5	73,5	5,4	86,0	14,0
4,4	37,0	63,0	5,6	91,0	9,0
4,6	49,0	51,0			

5. Буферні розчини на основі системи "кислий малеат натрію" – Na^+H^- ; рН 5,2÷6,8 (25 °С)

Кислий малеат натрію $\text{NaHC}_4\text{H}_2\text{O}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$; М 192,11; 0,2 М розчин одержується розчиненням 23,2 г малеїнової кислоти в H_2O , додаванням 200 мл 1 М NaOH і розчиненням H_2O до 1 л

Склад: 25 мл 0,2 М NaH -малеата + X мл 0,1 М NaOH ;

розвести H_2O до 100 мл

pH	0,1M Na□H, мл	pH	0,1 M Na□H, мл
5,2	7,2	6,2	33,0
5,4	10,5	6,4	38,0
5,6	15,3	6,6	41,6
5,8	20,8	6,8	44,0
6,0	26,9		

6. Буферні розчини на основі системи "трис(гідроксиметил)амінометан – малеат"; pH 5,4÷8,4 (23 °C)

Склад: 25 мл 0,2 М трис-малеата (на 1 л розчину 24,2 г трис + 23,2 мл малеїнової кислоти) + X мл 0,2 М NaOH;
розвести H₂O до 100 мл

pH	0,2 M Na□H, мл	pH	0,2 M Na□H, мл
5,4	5,40	7,0	24,00
5,6	7,75	7,2	25,50
5,8	10,25	7,4	27,00
6,0	13,00	7,6	29,00
6,2	15,75	7,8	31,75
6,4	18,50	8,0	34,50
6,6	21,25	8,2	37,50
6,8	22,50	8,4	40,50

7. Буферні розчини на основі системи "2-(ІМ-морфоліно)-етансульфонова кислота (MES) – Na□H", pH 5,4÷6,8

Склад: 25 мл 0,1 М MES (19,523 г/л) + X мл 0,1 М NaOH; розвести H₂O до 50 мл

pH	0,1 M Na□H, мл		pH	0,1 M Na□H, мл	
	21 °C	37 °C		21 °C	37 °C
5,4	–	4,4	6,2	10,3	12,0
5,6	4,6	5,7	6,4	12,9	14,9
5,8	6,2	7,3	6,6	15,3	16,9
6,0	8,0	9,4	6,8	17,4	–

8. Розчини за Кларком – Лабсом, pH 5,9 ÷ 8,0 (25 °C)

Склад: 50 мл 0,1 М KH₂PO₄ (13,60 г/л) + X мл 0,1 М NaOH;
розвести H₂O до 100 мл

pH	0,1 M NaHCO ₃ , мл	pH	0,1 M NaHCO ₃ , мл
5,90	4,6	7,00	29,1
6,00	5,6	7,10	32,1
6,10	6,8	7,20	34,7
6,20	8,1	7,30	37,0
6,30	9,7	7,40	39,1
6,40	11,6	7,50	40,9
6,50	13,9	7,60	42,4
6,60	16,4	7,70	43,5
6,70	19,3	7,80	44,5
6,80	22,4	7,90	45,3
6,90	25,9	8,00	46,1

9. Буферні розчини на основі системи "бікарбонат натрію – 5 %CO₂", pH 6,0÷8,0 (37 °C)

pH	Концентрація NaHCO ₃ (M 84,02) у рівновазі з газовою фазою, яка містить 5% CO ₂ , моль/л	pH	Концентрація NaHCO ₃ (M 84,02) у рівновазі з газовою фазою, яка містить 5% CO ₂ , моль/л
6,0	$5,86 \times 10^{-4}$	7,2	$9,29 \times 10^{-3}$
6,2	$9,29 \times 10^{-4}$	7,4	$1,47 \times 10^{-2}$
6,4	$1,47 \times 10^{-3}$	7,6	$2,33 \times 10^{-2}$
6,6	$2,33 \times 10^{-3}$	7,8	$3,70 \times 10^{-2}$
6,8	$3,70 \times 10^{-3}$	8,0	$5,86 \times 10^{-2}$
7,0	$5,86 \times 10^{-3}$		

10. Буферні розчини на основі системи "імідазол (глюкса-лін) – HCl", pH 6,2÷7,8 (25 °C)

Імідазол C₃H₄N₂; M 68,08

Склад: 25 мл 0,2 М імідазола (13,62 г/л) + X мл 0,2 М HCl;
розвести H₂O до 100 мл

pH	0,2 М HCl, мл	pH	0,2 М HCl, мл
6,2	21,45	7,2	9,30
6,4	19,90	7,4	6,80
6,6	17,75	7,6	4,65
6,8	15,20	7,8	3,00
7,0	12,15		

11. Буферні розчини на основі системи "2,4,6-триметил-піридин (2,4,6-колідін) – HCl", pH 6,4÷8,3

2,4,6-триметилпіридин C₈H₁₁N; M 121,18

Склад: 25 мл 0,2 М 2,4,6-триметилпіридину (24,24 г/л) +
+ X мл 0,2 М HCl; розвести H₂O до 100 мл

pH		0,2 М HCl, мл	pH		0,2 М HCl, мл
23 °C	37 °C		23 ⁰ C	37 °C	
6,4	6,4	22,50	7,5	7,4	11,25
6,6	6,5	21,25	7,6	7,5	10,00
6,8	6,7	20,00	7,7	7,6	8,75
6,9	6,8	18,75	7,8	7,7	7,50
7,0	6,9	17,50	7,9	7,8	6,25
7,1	7,0	16,25	8,0	7,9	5,00
7,2	7,1	15,00	8,2	8,1	3,75
7,3	7,2	13,75	8,3	8,3	2,50
7,4	7,3	12,50			

12. Буферні розчини на основі системи "морфолінопропан-сульфонова кислота (MOPS) – K□H", pH 6,6÷7,8

Склад 25 мл 0,1 М MOPS (20,93 г/л) + X мл 0,1 М KOH;

розвести H₂O до 50 мл

pH	0,1 М K□H, мл		pH	0,1 М K□H, мл	
	22 ⁰ C	37 ⁰ C		22 ⁰ C	37 ⁰ C
6,4	–	5,8	7,2	11,5	16,4
6,6	4,8	7,8	7,4	15,0	19,3
6,8	6,7	10,1	7,6	18,0	21,8
7,0	8,7	13,0	7,8	20,6	–

13. Буферні розчини на основі системи "трис (гідроксиметил)амінометан) – HCl", pH 7,1÷8,9 (25 °C)

C₄H₁₁NO₃; M 121,14.

Склад: 50 мл 0,1 М триса (12,114 г/л) + X мл 0,1 М HCl;

розвести H₂O до 100 мл

pH	0,1 М HCl, мл	pH	0,1 М HCl, мл
7,10	45,7	8,10	26,2
7,20	44,7	8,20	22,9
7,30	43,4	8,30	19,9
7,40	42,0	8,40	17,2
7,50	40,3	8,50	14,7
7,60	38,5	8,60	12,4
7,70	36,6	8,70	10,3
7,80	34,5	8,80	8,5
7,90	32,0	8,90	7,0
8,00	29,2		

14. Буферні розчини на основі системи "N-2-гидроксиетилпіперазин-N'-етансульфонова кислота (HEPES)-NaOH", pH 7,2÷8,2

Склад: 25 мл 0,1 М HEPES (23,83г/л) + X мл 0,1 М NaOH;
розвести H₂O до 50 мл

pH	0,1 М NaOH, мл		pH	0,1 М NaOH, мл	
	21°C	37°C		21°C	37°C
7,0	—	7,4	7,8	13,7	17,1
7,2	6,6	9,9	8,0	16,3	19,5
7,4	8,7	12,3	8,2	18,8	
7,6	11,2	14,6			

15. Буферні розчини на основі системи

"N, N-біс (2-гідроксиметил)гліцин (BICINE)- NaOH",
pH 7,9÷8,9 (22 °C)

Склад: 25 мл 0,1 М BICINE (16,317г/л) + X мл 0,1 М NaOH;
розвести H₂O до 50 мл

pH	0,1 М NaOH, мл		pH	0,1 М NaOH, мл	
	22 °C	37 °C		22 °C	37 °C
7,7		6,5	8,5	12,7	17,0
7,9	5,7	8,6	8,7	15,8	19,4
8,1	7,8	11,0	8,9	18,3	
8,3	10,0	13,9			

16. Розчини за Кларком – Лабсом, рН 8,0÷10,2 (25 °С)

Склад: 50 мл 0,1 М КСl + Н₃ВО₃ (на 1 л розчину 7,455г КСl + 6,184 г Н₃ВО₃) + Х мл 0,1 М NaOH;
розвести Н₂О до 100 мл

рН	0,1 М NaOH, мл	рН	0,1 М NaOH, мл
8,00	3,9	9,20	26,4
8,10	4,9	9,30	29,3
8,20	6,0	9,40	32,1
8,30	7,2	9,50	34,6
8,40	8,6	9,60	36,9
8,50	10,1	9,70	38,9
8,60	11,8	9,80	40,6
8,70	13,7	9,90	42,2
8,80	15,8	10,00	43,7
8,90	18,1	10,10	45,0
9,00	20,8	10,20	46,2
9,10	23,6		

17. Буферні розчини на основі системи "гліцин-NaOH", рН 8,6÷10,6 (25 °С)

Гліцин С₂Н₅NO₂; М 75,07

Склад: 25 мл 0,2 М гліцину (15,01 г/л) + Х мл 0,2 М NaOH;
розвести Н₂О до 100 мл

рН	0,2 М NaOH, мл	рН	0,2 М NaOH, мл
8,6	2,00	9,6	11,20
8,8	3,00	9,8	13,60
9,0	4,40	10,0	16,00
9,2	6,00	10,4	19,30
9,4	8,40	10,6	22,75

18. Буферні розчини на основі системи "карбонат натрію – бікарбонат натрію", рН 9,2÷10,8

Na₂CO₃×10Н₂О; М 286,2; 0,1 М розчин містить 28,62 г/л

NaHCO₃; М 84,0; 0,1 М розчин містить 8,40 г/л

Склад: Х мл 0,1 М Na₂CO₃ + Y мл 0,1 М NaHCO₃

рН		0,1 М Na_2CO_3 , мл	0,1 М NaHCO_3 , мл
20 °C	37 °C		
9,2	8,8	10	90
9,4	9,1	20	80
9,5	9,4	30	70
9,8	9,5	40	60
9,9	9,7	50	50
10,1	9,9	60	40
10,3	10,1	70	30
10,5	10,3	80	20
10,8	10,6	90	10

19. Буферні розчини на основі системи "борат- NaOH ",

рН 9,3÷10,7 (25 °C)

Склад: 50 мл 0,025 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (9,525 г/л) + X мл 0,1 М NaOH ; розвести H_2O до 100 мл

рН	0,1 М NaOH , мл
9,30	3,6
9,40	6,2
9,50	8,8
9,60	11,1
9,70	13,1
9,80	15,0
9,90	16,7
10,00	18,3
10,10	19,5
10,20	20,5
10,30	21,3
10,40	22,1
10,50	22,7
10,60	23,3
10,70	23,8

20. Буферні розчини на основі системи "карбонат- NaOH ",

рН 9,7÷10,9 (25 °C)

Склад: 50 мл 0,05 М NaHCO_3 (4,20 г/л) + X мл 0,1 М NaOH ;
розвести H_2O до 100 мл

рН	0,1 М NaOH, мл
9,70	6,2
9,80	7,6
8,90	9,1
10,00	10,7
10,10	12,2
10,20	13,8
10,30	15,2
10,40	16,5
10,50	17,8
10,60	19,1
10,70	20,2
10,80	21,2
10,90	22,0

21. Буферні розчини на основі системи "фосфат-NaOH",
рН 11,0÷11,9 (25 °С)

Склад: 50 мл 0,05 М Na₂HPO₄ (7,10 г/л) + X мл 0,1 М NaOH;
розвести H₂O до 100 мл

рН	0,1М NaOH, мл
11,00	4,1
11,10	5,1
11,20	6,3
11,30	7,6
11,40	9,1
11,50	11,1
11,60	13,5
11,70	16,2
11,80	19,4
11,90	23,0

22. Буферні розчини на основі системи "гідроксид натрію-хлорид калію", рН 12,0÷13,0 (25 °С)

Склад: 25 мл 0,2 М KCl (14,91 г/л)+X мл 0,2 М NaOH;
розвести H₂O до 100 мл

рН	0,2М NaOH, мл
12,00	6,0
12,10	8,0
12,20	10,2
12,30	12,8
12,40	16,2
12,50	20,4
12,60	25,6
12,70	32,2
12,80	41,2
12,90	53,0
13,00	66,0

Додаток 6

Виготовлення реактиву Фоліна

А) Для визначення адреналіну. 100 г вольфрамату натрію і 25 г молібдату натрію розчиняють у 700 мл дистильованої води в колбі на 1,5 л і при постійному помішуванні додають у нього 50 мл ортофосфорної кислоти (850 г/л) та 100 мл концентрованої соляної кислоти. Після цього колбу закривають оберненим холодильником і вміст колби кип'яють протягом 10 год.

Під кінець нагрівання додають 150 г сульфату літію, 50 мл води і кілька крапель бром (1–2 краплі). Якщо бром буде в надлишку, то для його видалення розчин необхідно прокип'ятити протягом 10–15 хв. З колби суміш переливають у мірну колбу на 1 л і загальний об'єм суміші доводять дистильованою водою до 1 л.

Б) Для визначення вмісту білка методом Лоурі. Фосфорно-вольфрамовий натрій (20 г) і фосфорно-молібденовий натрій (5 г) розчиняють у 140 мл дистильованої води, додають 10 мл 80%-го розчину ортофосфорної кислоти та 20 мл концентрованої соляної кислоти. Одержану суміш кип'яють у колбі зі зворотним холодильником Лібіха протягом 10 год. Потім додають 30 г сульфату літію, 10 мл дистильованої води, дві-три краплі бром й без зворотного холодильника кип'яють у витяжній шафі для видалення бром. Розчин охолоджують, його об'єм доводять дистильованою водою до 200 мл і фільтрують. Перед роботою суміш розводять удвічі дистильованою водою.

Метод кількісного визначення фосфору за Фіске – Суббароу

Метод ґрунтується на властивості фосфорної кислоти та її солей у кислому середовищі за наявності розчину молібдату амонію утворювати фосфомолібдат амонію, який за дії того чи іншого відновника перетворюється на забарвлену в синій колір сполуку, інтенсивність забарвлення якої прямо пропорційна вмісту фосфатів.

Матеріали та реактиви. Тканина або її безбілковий фільтрат, концентрована сірчана кислота, фенолфталеїн, 10%-й розчин їдкого натру, 0,2%-й розчин аскорбінової кислоти, висушений в ексикаторі KH_2PO_4 , молібденовий реактив (2,5%-й розчин молібдату амонію у 5 н. розчині сірчаної кислоти – 1,2 г чистого молібдату амонію розчиняють у 250 мл води, фільтрують і змішують із 250 мл 10 моль/л розчину сірчаної кислоти).

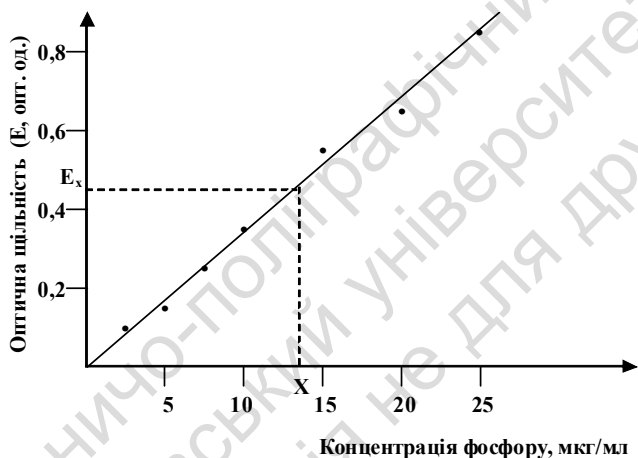
Обладнання. Фарфорова ступка, мірні пробірки місткістю 10 мл, піпетки, годинник, фотоелектроколориметр (довжина хвилі 680 нм), кювети завтовшки 5 мм або 10 мм.

Хід роботи. 100–200 мг тканини або 1–2 мл її безбілкового фільтрату попередньо мінералізують (спалюють при наявності певного об'єму концентрованої сірчаної кислоти). Мінералізатор доводять до певного об'єму водою. Аліквотну його частину переносять у мірні пробірки місткістю 10 мл, нейтралізують за фенолфталеїном 10%-м розчином їдкого натру і додають 1,25 мл молібденового реактиву. Потім до суміші додають 0,5 мл 0,2%-го розчину аскорбінової кислоти (відновник, готують безпосередньо перед роботою) і доводять водою до 10 мл. Перемішують і через 10–20 хв. фотоелектроколориметрують із червоним світлофільтром проти контролю, що містить замість мінералізатору дистильовану воду. Вміст фосфору в досліджуваній пробі розраховують за заздалегідь побудованою стандартною кривою.

Для побудови калібрувальної кривої готують стандартні розчини, що містять 2–25 мкг фосфору. Для цього зважують 0,1099 г KH_2PO_4 , висушеного в ексикаторі, та розчиняють

у 100 мл води. 1 мл такого розчину містить 250 мкг неорганічного фосфору. Розливають розчин у пробірки таким чином, щоб у 1 мл містилося (у мкг) 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25.

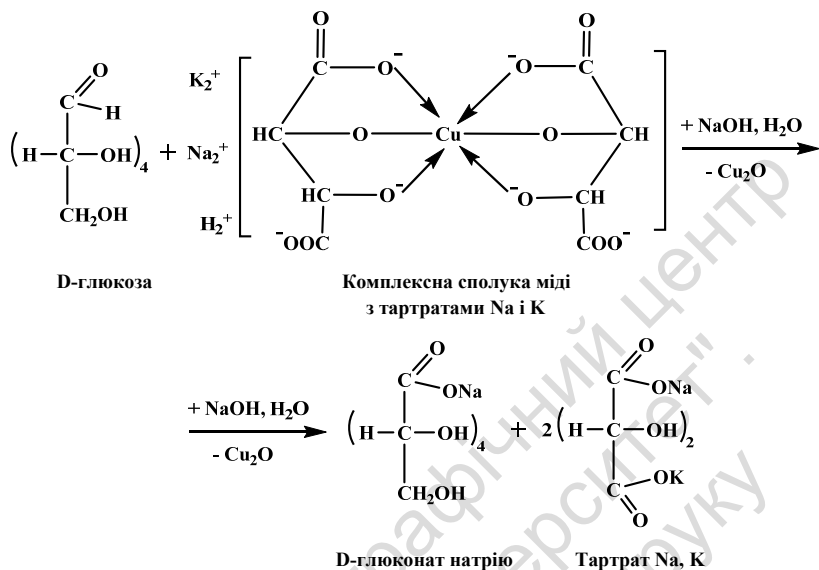
Надалі у мірні пробірки об'ємом 10 мл наливають стандартні розчини у кількості, що відповідає об'єму мінералізату, внесеного в досліджувану пробу, і додають усі потрібні для кольорової реакції реактиви. Одночасно готують контрольну пробу. Вміст пробірок перемішують і через 10–20 хв фотометрують проти контролю. Потім будують калібрувальну криву залежності екстинцій від концентрації фосфору в стандартних розчинах:



Додаток 8

Реакція з реактивом Фелінга

За механізмом реакція моносахаридів із фелінговою рідиною подібна до реакції Троммера (див. дод. 13), але в реактиві Фелінга іон Cu^{2+} існує у вигляді комплексної сполуки з тартратами, тому при надлишку міді не осаджується з розчину у вигляді CuO :



Матеріали та реактиви. Розчин глюкози (5%-й), реактив Фелінга, який складається з двох розчинів. Для виготовлення першого розчину 200 г сегнетової соді (тартрат $\text{K}^+\text{-Na}^+$) та 150 г гідроксиду натрію розчиняють у дистильованій воді до об'єму 1 л. Для виготовлення другого розчину 40 г перекристалізованого сульфіді міді розчиняють у дистильованій воді до об'єму 1 л. Рівні об'єми першого та другого розчинів змішують перед роботою. Інший спосіб виготовлення реактиву Фелінга: змішують рівні об'єми лужного розчину сегнетової солі (34,6 г $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \times 4\text{H}_2\text{O}$ і 14,0 г NaOH у 100 мл води) та розчину мідного купоросу (6,928 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл води).

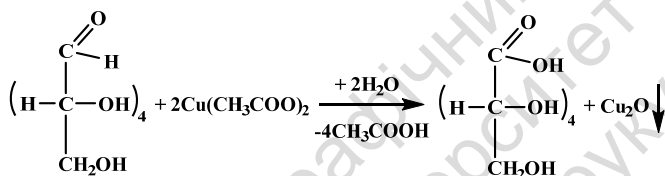
Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, штатив для пробірок, пальник.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл 5%-го розчину глюкози і додають 1 мл фелінгової рідини. Вміст пробірки перемішують, і нагрівають у полум'ї пальника до кипіння. Спостерігають утворення червоного осаду гемі оксиду міді (Cu_2O), що вказує на позитивну реакцію з реактивом Фелінга.

Реакція Барфедда

У реакції гексоз із ацетатом міді окиснення відновлювальних цукрів перебігає не в лужному, а в близькому до нейтрального середовищі, у якому редукуючі дисахариди, на відміну від моноз, практично не окиснюються.

Глюкоза та інші гексози реагують з ацетатом міді з утворенням Cu_2O :



Матеріали та реактиви. Розчин глюкози (5%-й), реактив Барфедда (13,3 г ацетату міді розчиняють у 200 мл гарячої води за температури 70 °С. Суміш фільтрують і до фільтрату додають 1,9 мл льодяної оцтової кислоти).

Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, штатив для пробірок, пальник.

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл 5%-го розчину глюкози, додають 1 мл реактиву Барфедда, перемішують і нагрівають до кипіння у полум'ї пальника. Спостерігають випадіння осаду геміоксиду міді (Cu_2O) червоного кольору.

Визначення білка в біологічному матеріалі за методом Лоурі

В основі визначення білка за методом Лоурі лежить реакція відновлення реактиву Фоліна мідними похідними білка з утворенням забарвлених продуктів реакції. Максимальне забарвлен-

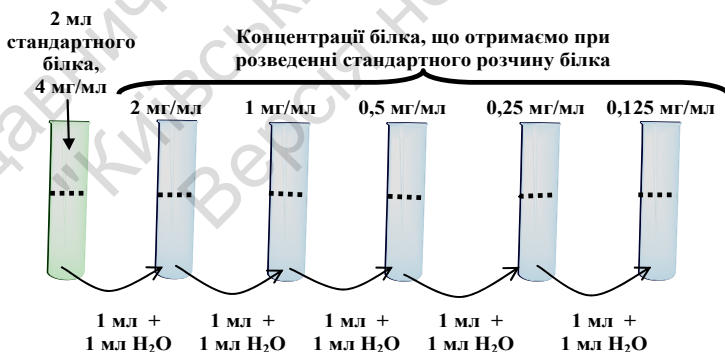
ня розвивається при $\text{pH} = 10$. При цьому реактив Фоліна є реакційноздатним кілька секунд, тому при додаванні його до пробки потрібне негайне перемішування суміші. Виготовлення реактиву Фоліна див. у дод. № 6 (Б). Метод є чутливим, специфічним і зручним. Чутливість методу Лоурі – 0,2 мкг в 0,05 мл.

Матеріали та реактиви. Досліджуваний розчин білка (0,25–0,5 мг білка в 1 мл), стандартний розчин білка (4 мг/мл), свіжовиготовлений лужний розчин міді (реактив В; готується із реактивів А і Б (реактив А – 2%-й розчин карбонату натрію в 0,1 моль/л розчині гідроксиду натрію; реактив Б – 0,5%-й розчин сульфату міді в 1%-му розчині тартату натрію-калію), які змішують безпосередньо перед проведенням дослідів в співвідношенні 50:1 (50 мл реактиву А і 1 л реактиву Б), реактив Фоліна.

Обладнання. Скляні палички, пробірки, градуйовані піпетки та мікропіпетки, штатив для пробірок, годинник, фотоелектроколориметр.

Хід роботи.

1. Розведення стандартного розчину білка для побудови калібрувальної кривої. Для побудови калібрувальної кривої використовують стандартний розчин білка (4 мг/мл). Беруть 6 пробірок і здійснюють розведення стандартного білка за наступною схемою:



2. Проведення реакції

Готують ще 8 пробірок, у які вносять реактиви згідно з таблицею:

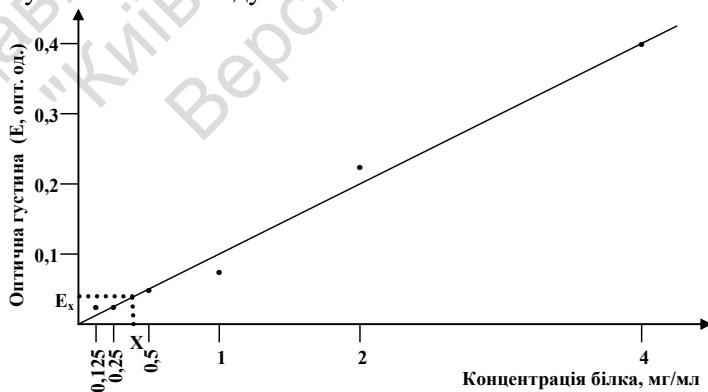
№	Концентрація білка, мг/мл	Кількість, мл		Реактив В, мл	Ретельно перемішують і залишають на 10 хв за кімнатної температури	Реактив Фоліна	Ретельно перемішують і залишають на 30 хв за кімнатної температури (розчин набуває синього кольору)	Оптична густина, Е
		Н ₂ О	Білок					
1	0 (КОНТР.)	0,4	–	2				
2	X (ДОСЛІД)	0,3	0,1	2				
3	4	0,3	0,1	2				
4	2	0,3	0,1	2				
5	1	0,3	0,1	2				
6	0,5	0,3	0,1	2				
7	0,25	0,3	0,1	2				
8	0,125	0,3	0,1	2				

УВАГА!!! Пробірка № 1 є контролем для подальшого визначення оптичної густини розчинів на фотоелектроколометрі, пробірка № 2 – досліджуваною пробою – містить розчин білка з невідомою концентрацією, пробірки № 3–8 містять розчини білка з відомими концентраціями, отримані при розведенні стандартного розчину білка.

Інтенсивність забарвлення (оптичну густина) вимірюють на фотоелектроколометрі чи спектрофотометрі за довжини хвилі ≈ 750 нм відносно контролю (пробірка № 1). Отримані показники (Е) записують у таблицю.

3. Побудова калібрувального графіка

За значеннями Е для пробірок № 3–8 будують графік залежності оптичної густини від концентрації білка у розчині, який має бути такого вигляду:



4. Визначення концентрації білка в досліджуваному розчині

Відкладаючи по осі ординат значення оптичної густини досліджуваного розчину (E_x), за калібрувальним графіком знаходять відповідне значення концентрації білка в розчині (X).

Додаток 11

Визначення білка в біологічному матеріалі за біуретовою реакцією

Білки реагують у лужному середовищі із сірчаною кислотою міддю з утворенням сполук, забарвлених у фіолетовий колір. Інтенсивність забарвлення при цьому пропорційна концентрації білка. Розвиток забарвлення обумовлений наявністю в білків пептидних зв'язків.

Матеріали та реактиви: біуретовий реактив (до 250 мл дистильованої води додають 0,75 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ і 3 г виннокислого калію-натрію, потім 150 мл 10%-го NaOH і 1 г KI ; загальний об'єм доводять дистильованою водою до 1 л), досліджуваний розчин білка, стандартний розчин білка (10 мг/мл)

Обладнання. Скляні палички, пробірки, градуйовані піпетки та мікропіпетки, штатив для пробірок, годинник, фотоелектроколориметр.

Хід роботи:

1. Беруть 7 пробірок, у які вносять реактиви згідно з таблицею:

№	Концентрація білка, мг	Стандартний білок, мл	H_2O , мл	Біуретовий реактив, мл	Ретельно перемішують і залишають на 30 хв за кімнатної температури (розчин набуває фіолетового кольору)	Оптична густина, E
1	0 (КОНТРОЛЬ)	0	1	4		
2	X (ДОСЛІД)	1	0	4		
3	10	1	0	4		
4	8	0,8	0,2	4		
5	6	0,6	0,4	4		
6	4	0,4	0,6	4		
7	2	0,2	0,8	4		

1 мл

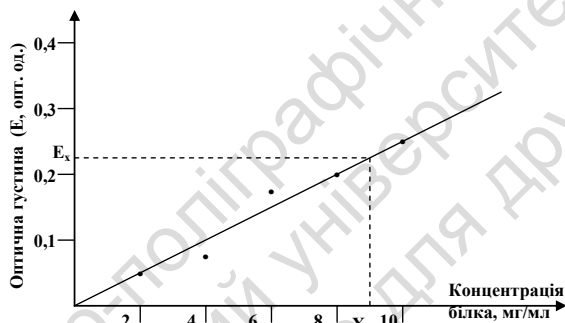
5 мл

УВАГА!!! Пробірка № 1 є контролем для подальшого визначення оптичної густини розчинів на фотоелектроколориметрі, пробірка № 2 – досліджуваною пробою – розчином білка із невідомою концентрацією, у пробірках № 3–7 здійснюють розведення стандартного розчину білка (10 мг/мл) для побудови калібрувальної кривої.

Інтенсивність забарвлення (оптичну густину) вимірюють на фотоелектроколориметрі чи спектрофотометрі за довжини хвилі 540–650 нм відносно контролю (пробірка № 1). Отримані показники (E) записують до вищенаведеної таблиці.

2. Побудова калібрувального графіка

За значеннями E для пробірок № 3–7 будують графік залежності оптичної густини від концентрації білка у розчині, який має бути такого вигляду:



3. Визначення концентрації білка в досліджуваному розчині

Відкладаючи по осі ординат значення оптичної густини досліджуваного розчину (E_x), за калібрувальним графіком знаходять відповідне значення концентрації білка в розчині (X).

Додаток 12

Визначення вмісту ДНК за дезоксирибозою (реакція з дифеніламіном за Діше)

Метод базується на реакції між дифеніламіном і дезоксирибозою, що відщеплюється від пуринових нуклеотидів у результаті кислотного гідролізу. N-глікозидний зв'язок у піримідинових нуклеотидах при цьому не руйнується й унаслідок цього

можна визначити лише близько половини вуглеводу, що входить до складу ДНК; тому рекомендується як стандарт використовувати гідролізат ДНК, концентрацію якого попередньо визначають спектрофотометричним методом.

Матеріали та реактиви. Розчин ДНК (50–500 мкг/мл), реактив Діше (1 г дифеніламіну, перекристалізованого з 70%-м етиловим спиртом, розчиняють у 100 мл льодяної оцтової кислоти й додають 2,75 мл концентрованої H_2SO_4), стандартний розчин ДНК (0,5 мг/мл), 0,5 н. HClO_4 .

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, водяна баня, годинник, фотоелектроколориметр або спектрофотометр (для вимірювання при довжині хвилі 590 нм), кювети завтовшки 5–10 мм.

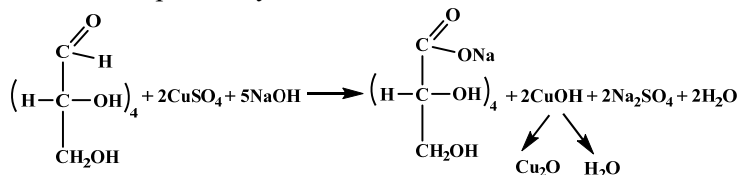
Хід роботи. До розчину ДНК (50–500 мкг/мл) додають подвійний об'єм реактиву Діше. Суміш нагрівають протягом 10 хв на водяній бані при 90 °С й охолоджують. Одночасно проводять реакцію зі стандартним розчином ДНК (0,5 мг/мл), що містить від 50 до 500 мкг ДНК у пробі (для його отримання наважку комерційного препарату ДНК розчиняють у 0,5 н. HClO_4 і нагрівають 15 хв при 70 °С; для визначення точної концентрації гідролізат розводять у 50 разів 0,5 н. розчином HClO_4 і вимірюють поглинання на спектрофотометрі).

Під час проведення досліду при нагріванні розвивається стійке синє забарвлення. Вимірюють поглинання розчинів на колориметрі при 590 нм. Вміст ДНК у тканині розраховують за графіком, побудованим за стандартним розчином ДНК, з урахуванням усіх розведень. Виходячи із вмісту фосфату при спектрофотометричному визначенні, перерахунковий коефіцієнт для ДНК становить 10,1, для РНК – 10,5.

Додаток 13

Реакція Троммера

Розчини моносахаридів у лужному середовищі відновлюють при нагріванні гідроксид міді (II) до геміоксиду міді. Гексози окиснюються при цьому до солей альдегидних кислот:



Матеріали та реактиви. Розчини глюкози, гідроксиду натрію, сульфату міді (усі 0,5%-ві або 5%-ві).

Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив для пробірок, пальник.

Хід роботи. У пробірку до 3 мл розчину глюкози (або фруктози чи галактози) додають розчини гідроксиду натрію (1 мл) і сульфату міді (п'ять крапель). Випадає осад гідроксиду міді (II), який унаслідок перемішування або струшування пробірки розчиняється, а розчин набуває блакитного забарвлення. Пробірки обережно нагрівають до кипіння на водяній бані до утворення жовтого осаду CuOH , який з часом унаслідок перетворення CuOH на Cu_2O змінює забарвлення на червоне, що вказує на позитивну реакцію Троммера.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Бабенюк Ю. Д. Біохімія: терміни і номенклатура ферментів / Ю. Д. Бабенюк, Л. І. Остапченко, О. В. Скопенко. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2005. – 356 с.

Берегова Т. В. Цитофізіологія й біохімія травлення. Практикум : навч. посібник / Т. В. Берегова, Г. В. Островська, Т. В. Рибальченко та ін. – ВПЦ "Київський університет", 2006. – 272 с.

Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М. : Медицина, 1988. – 752 с.

Босчко Л. Ф. Основні біохімічні поняття, значення та терміни / Л. Ф. Босчко, Л. О. Босчко. – К. : Вища шк., 1993. – 528 с.

Бойків Д. П. Практикум з біологічної хімії / Д. П. Бойків, О. Л. Іванків, Л. І. Кобилянська та ін. – К. : Здоров'я, 2002. – 298 с.

Варфоломеев С. Д. Биокинетика: практический курс / С. Д. Варфоломеев, К. Г. Гуревич. – М. : ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.

Гонський Я. І. Біохімія людини / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук, М. Ф. Калинський. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 736 с.

Гринштейн Б. Наглядная биохимия / Б. Гринштейн, А. Гринштейн. – М. : ГЭОТАР "Медицина", 2000. – 119 с.

Губський Ю. І. Біоорганічна хімія / Ю. І. Губський. – Вінниця : Нова книга, 2004. – 462 с.

Зайчик А. Ш. Основы общей патологии. Т. 2. Основы патохимии / А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов. – СПб. : Элби-СПб, 2000. – 687 с.

Ісаєнко В. М. Екологічна біохімія / В. М. Ісаєнко, В. М. Войціцький, Ю. Д. Бабенюк та ін. – К : НАУ, 2005. – 437 с.

Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : В 2 т. Т. 2. / В. С. Камышников. – Мн. : Беларусь, 2000. – 463 с.

Кнорре Д. Г. Биохимическая химия / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызгина. – М. : Высшая школа, 2000. – 479 с.

Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К. Рем. – М. : Мир, 2000. – 469 с.

Кучеренко М. Є. Біохімія. Практикум / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войціцький, В. І. Гаврилей. – К. : Либідь, 1995. – 136 с.

Кучеренко М. Є. Сучасні методи біохімічних досліджень / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войціцький. – К. : Укрфіто-соціологічний центр, 2001. – 424 с.

Кучеренко М. Є. Біохімія : підручник / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, О. М. Васильєв та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2002. – 480 с.

Ленинджер А. Основы биохимии: У 3-х т. / А. Ленинджер. – М. : Мир. 1985 с. – 1056 с.

Марри Р. Биохимия человека: В 2-х т. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – М. : Мир, 1993. – 795 с.

Мельничук Д. О. Біологічна хімія з основами фізичної та колоїдної хімії. Лабораторно-практичні заняття / Д. О. Мельничук, П. В. Усатюк, М. І. Цвіліховський та ін. – К. : Вид-во УААН, 1998. – 147 с.

Мельничук Д. О. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи : навч. посібник / Д. О. Мельничук, В. А. Томчук, П. І. Янчук та ін. – К. : НУБіП України, 2015. – 416 с.

Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. – М. : Мединформагенство, 1990. – 496 с.

Остапченко Л. І. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації: теоретичні аспекти / Л. І. Остапченко, Т. Б. Синельник, І. В. Компанець. – ВПЦ "Київський університет", 2016. – 639 с.

Остапченко Л. І. Біохімічні механізми апоптозу : навчальний посібник / Л. І. Остапченко, Т. Б. Синельник, Т. В. Рибальченко, В. К. Рибальченко. – К. : ВПЦ "Київський університет". – 2010. – 310 с.

Остапченко Л. І. Біохімія у схемах і таблицях / Л. І. Остапченко, О. В. Скопенко. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2004. – 128 с.

Остапченко Л. І. Біохімія : підручник / Л. І. Остапченко, Т. Р. Андрійчук, Ю. Д. Бабенюк та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2012. – 796 с.

Практикум з біологічної хімії / за ред. О. Я. Склярова. – К. : Здоров'я, 2002. – 298 с.

Практикум по биохимии / под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – М. : Из-во МГУ, 1989. – 509 с.

Пустовалова Л. М. Практикум по биохимии / Л. М. Пустовалова. – Ростов н/Д. : Феникс, 1999. – 544 с.

Рыбальченко В. К. Физиология и биохимия пищеварения животных и человека / В. К. Рыбальченко, Т. В. Береговая, М. Ю. Клевещ и др. К. : Фитосоциоцентр, 2002. – 366 с.

Рыбальченко В. К. Цитофізіологія травлення / В. К. Рыбальченко, Т. В. Береговая, Рыбальченко Т. В. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2004. – 244 с.

Рыбальченко В. К. Структура и функции мембран. Практикум / В. К. Рыбальченко, М. М. Коганов. – К.: Вища шк. 1989. – 312 с.

Рыбальченко В. К. Медична біологія. Практикум / В. К. Рыбальченко, Г. В. Островська, Рыбальченко Т. В. та ін. – Луганськ : Елтон-2, 2003. – 488 с.

Скляр О. Я. Обмін вуглеводів. Біохімічні та клітинні аспекти / О. Я. Скляр, О. О. Сергієнко, Н. В. Фартушок та ін. – Львів : Світ, 2004. – 110 с.

Сорокин А. В. Протеасомная система деградации и процессинга белков / А. В. Сорокин, Е. Р. Ким, Л. П. Овчинников // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 3–76.

Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л. А. Даниловой. – СПб. : Питер, 2003. – 733с.

Хмелевский Ю. В. Биологическая химия. Практикум / Ю. В. Хмелевский, Ю. И. Губский, С. Д. Зайцева и др. – К. : Вища шк., 1985. – 207 с.

Филиппович Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович. – М. : Мединформагенство, 1999. – 387 с.

Навчальне видання

Остапченко Л. І. ,
Компанець І. В. ,
Скопенко О. В.,
Синельник Т.Б.,
Кравченко О. О.,
Береговий С. М.

БІОХІМІЯ

Практикум

Редактор *В. Філь*

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"



Формат 60x84^{1/16}. Ум. друк. арк. **14,9**. Наклад 100. Зам. № **218-8777**. Вид. № **Фл50**.
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний. Друк офсетний.
Підписано до друку **20.09.18**

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"

01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43

☎ (044) 239 32 22; (044) 239 31 72; тел./факс (044) 239 31 28

e-mail: vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua

<http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідectво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02