

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

О. В. Устянська, А. М. І. Шкодовська

БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ

**Робочий зошит
для виконання лабораторних робіт
ЧАСТИНА II:
МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ.
БІОХІМІЯ МІЖКЛІТИННИХ КОМУНІКАЦІЙ
ТА ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ**

(Прізвище, ім'я та по-батькові студента)

ОДЕСА
ОНУ
2022

УДК 573.7:612.603

Укладачі:

О. В. Устянська, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова;

А. М. І. Шкодовська, аспірант кафедри органічної та фармацевтичної хімії ОНУ імені І. І. Мечникова.

Рекомендовано вченою радою
факультету хімії та фармації ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 7 від 12.04.2022 р.

Рецензенти:

А. О. Цісак, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова;

І. М. Радаєва, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова.

О. В. Устянська

Біологічна хімія. Частина II : робочий зошит для виконання лабораторних робіт : метод. рекомендації / О. В. Устянська, А. М. І. Шкодовська. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. – 52 с.

Робочий зошит для лабораторних робіт з курсу «Біологічна хімія» призначений для опанування методами якісного і кількісного аналізу. Лабораторні роботи містять класичні біохімічні методи і нові методики, також є контрольні питання і завдання за програмою «Біологічна хімія» (для здобувачів вищої освіти спеціальності 226 «Фармація. Промислова фармація.»), що дозволяє студентам глибоко засвоїти теоретичний матеріал.

УДК 573.7:612.603

ЗМІСТ

ВСТУП	4
Заходи безпеки під час виконання лабораторної роботи	6
Лабораторне заняття 7. «Дослідження біохімічного складу пуринових та піримідинових нуклеотидів. Біохімічні функції нуклеотидів та нуклеїнових кислот»	9
Лабораторне заняття 8. «Загальне поняття про гормони. Класифікація, механізми дії гормонів на клітини-мішені. гормональна регуляція гомеостазу кальцію»	14
Лабораторне заняття 9. Дослідження молекулярно-клітинних механізмів дії стероїдних та тиреоїдних гормонів на клітини-мішені	18
Лабораторне заняття 10. Дослідження функціональної ролі водорозчинних (коферментних) та жиророзчинних вітамінів у метаболізмі та реалізації клітинних функцій	23
Лабораторне заняття 11. Дослідження згортальної, антизгортальної та фібринолітичної систем крові. дослідження біохімічних закономірностей реалізації імунних процесів. Імунодефіцитні стани	28
Лабораторне заняття 12. Дослідження процесів м'язового скорочення	34
Лабораторне заняття 13. Сечоутворювальна функція нирок. Нормальні та патологічні компоненти сечі	39
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	50

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Біохімія» вивчає метаболічні процеси у цілому організмі на основі системних знань про хімічну будову живих організмів і фізико-хімічні процеси, що забезпечують їх життєдіяльність; загальні закономірностей ферментативного каталізу, біохімічної динаміки перетворення основних класів біомолекул; молекулярних механізмів спадковості та реалізації генетичної інформації, гормональної регуляції метаболізму та біологічних функцій клітин, біохімії спеціальних фізіологічних функцій.

Мета: оволодіння знаннями про біохімічні властивості та обмін основних біомолекул в організмі людини в нормі та за умови патології. Проведення біохімічних досліджень в біологічних рідинах та оцінювання результатів з інтерпретацією клініко-діагностичного значення.

Завдання:

- вивчення теоретичних основ біохімії;
- вивчення основних хімічних перетворень, які полягають у основі життєдіяльності;
- розуміння логіки процесів, які відбуваються в організмі та їх регуляції;
- оволодіння знаннями та навичками проводити біохімічні дослідження на виявлення нормальних та патологічних компонентів в біологічних рідинах;
- аналізувати результати біохімічних досліджень для діагностики найпоширеніших захворювань людини;
- аналізувати біохімічні процеси обміну речовин та його регуляції в забезпеченні функціонування органів та систем організму людини.

В результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен знати теоретичний матеріал: аналізувати реакційну здатність вуглеводів, ліпідів, амінокислот, що забезпечує їх функціональні

властивості та метаболічні перетворення в організмі; пояснювати основні механізми біохімічної дії та принципи спрямованого застосування різних класів фармакологічних засобів; біохімічні та молекулярні основи фізіологічних функцій клітин, органів і систем організму людини; знати та розуміти основні терміни, концепції, теорії і закони біохімії на межі предметних галузей, будову, процеси життєдіяльності та функцій живих організмів. А також застосовувати у навчальній та практичній діяльності методи визначення структурних та функціональних характеристик біологічних систем; застосовувати біохімічні методи дослідження.

Згідно з цими вимогами і було розроблено робочий зошит для проведення лабораторних робіт з курсу «Біологічна хімія» (II частина) для студентів спеціальності 226 «Фармація. Промислова фармація».

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

Хімічні речовини при невмілому і неправильному використанні можуть стати причиною отруєння осіб, які працюють, викликати пожежу, вибух чи хімічний опік.

З метою виключення випадків травматизму при роботах у хімічних лабораторіях необхідно виконувати наступні вимоги:

1. Кожен студент до початку досліду повинен добре ознайомитися з властивостями речовин, з якими прийдеться стикатися і необхідними умовами безпечного проведення роботи з урахуванням можливих побічних реакцій.

2. При роботі у витяжній шафі, з метою більш ефективної дії вентиляції, слід підняти дверцята витяжної шафи на $1/3 - 1/4$ її підйому. Після закінчення роботи необхідно щільно прикрити дверцята шафи.

3. У випадку перерви дії вентиляції всі роботи у витяжних шафах, які пов'язані з виділенням шкідливих газів, парів, треба негайно припинити.

4. Не залишати ніяких речовин у посуді без етикеток. Не робити ніяких дослідів у нечистому посуді. Посуд мити одразу ж після досліду.

5. Не залишати включених нагрівальних приладів, пальників, що горять, відкритих газових і водопровідних кранів.

Запобіжні заходи при роботі з їдкими речовинами

1. При змішуванні концентрованих сірчаної й азотної кислот користатися тільки тонкостінним хімічним чи порцеляновим посудом.

2. Щоб уникнути розбризування при розведенні концентрованої сірчаної кислоти – приливати кислоту у воду, а не навпаки.

3. При попаданні кислот чи лугів на поверхню шкіри їх необхідно негайно змити сильним струменем води.

4. Їдкі луги дають опіки всіх ступенів. Тому при роботі з зазначеними розчинами необхідно застосовувати міри проти розбризкування і використовувати захисний спецодяг і запобіжні окуляри.

5. Наповнення піпеток концентрованими кислотами, лугами шляхом всмоктування ротом категорично забороняється, для цього потрібно користатися сифонами чи спеціальними піпетками з гумовою грушею.

Заходи безпеки при роботі з горючими і легкозаймистими речовинами

1. При роботі з горючими і легкозаймистими рідинами (сірковуглець, етер, бензол тощо) необхідно виконувати такі правила:

- а) не користуватися відкритим полум'ям для нагрівання;
- б) не тримати ці сполуки на столах у великих кількостях;
- в) переливати у далині від вогню, а при переливанні великих кількостей усі нагрівачі (газові й інші пальники) у приміщенні згасити;
- г) не виливати ці речовини в раковину;
- д) не гріти на відкритому вогні, а тільки на водяній бані.

2. При роботі з масляними банями користатися термометром і не перевищувати температуру займання горючих сполук.

3. Не нахилятися над судиною, у якій що-небудь кипить чи у яку наливається яка-небудь рідина (особливо їдка), тому що бризки можуть потрапити в очі.

4. Пробірку, у якій нагрівається рідина, тримати отвором убік, а не до себе чи до поруч працюючого, тому що рідина внаслідок нагрівання нерідко викидається з пробірки.

5. У випадку займання горючих рідин:

- а) негайно погасити всі пальники, виключити електронагрівальні прилади;
- б) відставити судини з вогнебезпечними речовинами;

- в) прикрити полум'я мокрою ковдрою, а при потребі засипати піском;
- г) виключити вентиляційні установки;
- д) при необхідності використовувати вуглекислотний вогнегасник;
- е) терміново повідомити пожежну охорону і керівництво факультету.

Правила роботи з електричними приладами

1. Перед початком роботи слід перевірити справність електроприладу.
2. Перед включенням прилади повинні бути заземлені, якщо цього вимагають їхні інструкції.
3. Працювати з електронагрівальними приладами, що мають відкриту спіраль, у хімічній лабораторії категорично заборонено.
4. Перед включенням приладу необхідно перевірити справність розетки і цілісність шнурів, особливо від електроплиток.
5. При роботі з приладами, що генерують високу напругу, необхідно ретельно перевірити їх заземлення, а також не торкатися електронесучих вузлів.
6. При роботі з центрифугами центрифужні пробірки попарно врівноважувати на центрифужних вагах і поміщати в гнізда ротора друг напроти друга. При розливі проб гнізда ретельно очистити і висушити.
7. Після закінчення роботи необхідно виключити всі використані в роботі електроприлади.

Увага! Після вивчення даної інструкції у спеціальному журналі робиться відповідна відмітка, де кожен студент ставить свій підпис.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 7

Тема: ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНОГО СКЛАДУ ПУРИНОВИХ ТА ПІРИМІДИНОВИХ НУКЛЕОТИДІВ. БІОХІМІЧНІ ФУНКЦІЇ НУКЛЕОТИДІВ ТА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Мета: сформувати знання про хімічну будову складових частин нуклеопротейдів, будову і функціонування нуклеїнових кислот, їх роль у матричних синтезах; навчитись проводити якісні реакції на складові частини нуклеопротейдів.

Актуальність теми. Нуклеопротейди – це складні білки, в яких небілкова частина представлена нуклеїновими кислотами (ДНК і РНК). ДНК, що локалізується в ядрі, зберігає генетичну інформацію про особливості будови всього організму. Різні види РНК відіграють важливу роль у біосинтезі білка.

Навчальний час: 4 години

Практична робота

Якісні реакції на складові частини нуклеопротейдів

Принцип методу. Для вивчення хімічного складу нуклеопротейдів зручно користуватися дріжджовими клітинами. Продукти гідролізу можна виявити в гідролізаті реакціями, специфічними для компонентів нуклеопротейдів.

Матеріальне забезпечення: 500 мг пекарських дріжджів або 100 мг сухих дріжджів, 10 % розчин H_2SO_4 , пробірки, піпетки, фільтрувальний папір, водяна баня.

Хід роботи: У велику широку пробірку (15 x 1,5 см) кладуть 500 мг пекарських дріжджів або 100 мг сухих дріжджів, заливають 4 мл 10 % розчину H_2SO_4 . Пробірку закривають корком, у який вставлена трубка довжиною 25-30 см, яка служить холодильником, збовтують і ставлять у киплячу водяну баню.

Через 1-1,5 год після початку кипіння рідину охолоджують і фільтрують. У фільтраті виявляють продукти гідролізу

нуклеопротейдів: поліпептиди, пуринові та піримідинові азотисті основи, рибозу, дезоксирибозу і фосфатну кислоту.

Дослід 1. Біуретова проба на поліпептиди

Принцип методу. Біуретова реакція – характерна на сполуки, що містять у своєму складі не менше двох пептидних зв'язків. Такі речовини у лужному середовищі утворюють з $CuSO_4$ комплекс рожево-фіолетового забарвлення. В утворенні цього комплексу беруть участь пептидні зв'язки поліпептидів і білків.

Матеріальне забезпечення: гідролізат дріжджів, 10 % розчин $NaOH$, 30 % розчин $NaOH$, 1 % розчин $CuSO_4$, пробірки, піпетки.

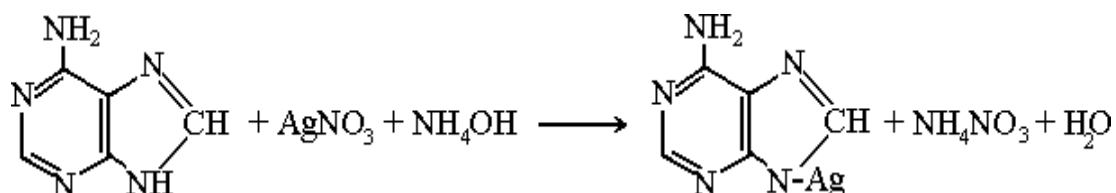
Хід роботи: До 5 крапель гідролізату додають 10 крапель 10 % розчину $NaOH$ і 1 краплю 1 % розчину $CuSO_4$. Рідина забарвлюється в рожево-фіолетовий колір.

У висновку пояснити, що в даній реакції виявляються пептидні зв'язки, якими амінокислоти сполучаються між собою.

Висновок _____

Дослід 2. Срібна проба на пуринові основи

Принцип методу. Пуринові основи з аміачним розчином аргентуму нітрату утворюють осад, що забарвлюється у світло-коричневий колір. Реакція відбувається за рівнянням:



Матеріальне забезпечення: гідролізат дріжджів, конц. розчин NH_4OH , 1 % розчин $AgNO_3$, пробірки, піпетки.

Хід роботи: 10 крапель гідролізату нейтралізують концентрованим аміаком і додають 5 крапель 1 % розчину $AgNO_3$.

При стоянні через 3-5 хв випадає невеликий пухкий осад світло-коричневого кольору срібних солей пуринових основ (аденіну, гуаніну). Зробити висновок.

Висновок _____

Дослід 3. Проба Тромера на рибозу і дезоксирибозу

Принцип методу. Моно- і дисахариди, які мають у своєму складі вільний півацетальний гідроксил, здатні у лужному середовищі відновлювати метали (срібло, мідь, вісмут тощо). Метали у цій реакції відновлюються з одночасним розривом вуглеводневого ланцюга цукрів та полімеризацією.

Матеріальне забезпечення: гідролізат дріжджів, 30 % розчин $NaOH$, 1 % розчин $CuSO_4$, 7 % розчин $CuSO_4$, пробірки, піпетки.

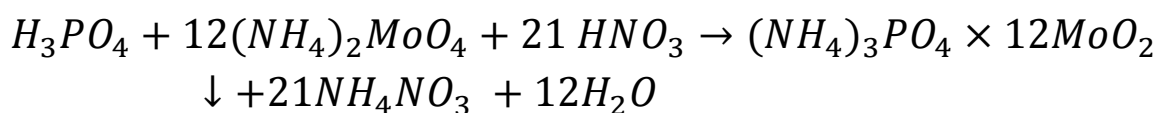
Хід роботи: До 5 крапель гідролізату додають 10 крапель 30 % розчину $NaOH$ і 5-10 крапель 7 % розчину $CuSO_4$ до появи муті $Cu(OH)_2$, яка не зникає. Рідину змішують і верхній її шар нагрівають до кипіння. Випадає червоний осад закису міді (внаслідок окиснення рибози і відновлення гідрату окису міді до закису).

У висновку звертається увага на те, що рибоза окислюється, а гідрат окису міді відновлюється до закису міді.

Висновок _____

Дослід 4. Молібденова проба на фосфатну кислоту

Принцип методу. Фосфати у кислому середовищі утворюють з молібдатами забарвлені фосфатно-молібденові комплекси. Молібденова проба на фосфатну кислоту:



Матеріальне забезпечення: гідролізат дріжджів, молібденовий реактив, пробірки, піпетки.

Хід роботи: До 10 крапель молібденового реактиву (розчин молібденового амонію в нітратній кислоті) додають 5 крапель гідролізату і кип'ятять декілька хвилин на відкритому вогні. В присутності фосфатної кислоти рідина забарвлюється в лимонно-жовтий колір. При охолодженні випадає жовтий кристалічний осад комплексної сполуки амонію фосфатномолібденового.

У висновку акцентується увага на утворенні комплексної сполуки амонію фосфатномолібденового.

Висновок _____

Результати досліджень оформляють у вигляді таблиці:

Назва реакції	Продукти гідролізу нуклеопротейдів, компоненти нуклеопротейдів	Колір кінцевих продуктів
Біуретова	Поліпептиди	
Срібна проба	Пуринові основи	
Проба Тромера	Цукри з відновлюючими властивостями	
Молібденова проба	Фосфатна кислота	

Клініко-діагностичне значення. Аналіз ДНК є стандартним дослідженням для діагностики спадкових захворювань. Він може бути використаний для генотипування фетальної тканини в пренатальній діагностиці, яку застосовують для виявлення потенційних батьків.

Похідні азотистих основ широко застосовуються у практичній медицині. Так, меркаптопурин має антилейкемічну активність, що зумовлена його біологічною активністю як антиметаболіту пуринів. Фторурацил і фторофур, як структурні аналоги піримідинів, мають протипухлинну активність, що пов'язана з перетворенням їх у 5-фтор-2-дезоксидуридин-5'-монофосфат, який є конкурентним інгібітором тимідилатсинтази.

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 8

Тема: ЗАГАЛЬНЕ ПОНЯТТЯ ПРО ГОРМОНИ. КЛАСИФІКАЦІЯ, МЕХАНІЗМИ ДІЇ ГОРМОНІВ НА КЛІТИНИ-МІШЕНІ. ГОРМОНАЛЬНА РЕГУЛЯЦІЯ ГОМЕОСТАЗУ КАЛЬЦІЮ

Мета: вивчити молекулярні механізми дії гормонів білково-пептидної природи та похідних амінокислот (на прикладі катехоламінів) на клітини-мішені за участю сигнальних молекул-посередників; засвоїти методи якісного визначення інсуліну, адреналіну в біологічних рідинах; сформулювати явлення про механізми гормональної регуляції гомеостазу кальцію: розподіл Ca^{2+} в організмі, форми кальцію в плазмі крові людини, вклад кісткової тканини, тонкої кишки та нирок у гомеостаз кальцію.

Актуальність теми. Розуміння біохімічних механізмів впливу гормонів білково-пептидної природи на активність внутрішньоклітинних систем дозволяє проаналізувати причини, які лежать в основі розвитку порушень, викликаних розладами у функціонуванні ендокринних залоз, що здійснюють синтез цих гормонів, а також формує у студентів підходи до можливості корекції патологічних станів, що виникають при гіпо- або гіперфункції відповідних залоз внутрішньої секреції.

Навчальний час: 4 години

Практична робота

Реакції, що виявляють особливості хімічної структури гормонів інсуліну та адреналіну

Гормони – біологічно активні органічні речовини різної хімічної природи. Інсулін є простим білком, що містить сірковмісні амінокислоти; адреналін – похідний амінокислоти тирозину.

Дослід 1. Біуретова реакція

Принцип методу. Інсулін є простим білком і дає характерні кольорові реакції на білок.

Матеріальне забезпечення: 10 % розчин $NaOH$, $CuSO_4$, інсулін.

Хід роботи: До 10 крапель інсуліну додають 5 крапель 10 %-го розчину $NaOH$ і краплю розчину $CuSO_4$. Рідина забарвлюється у фіолетовий колір.

Висновок _____

Дослід 2. Реакція Фоля

Принцип методу. Сірковмісні амінокислоти, особливо цистеїн і цистин, при кип'ятінні з лугом втрачають сірку, яка відщеплюється у вигляді сірководню. Сірководень, взаємодіючи з лугом, утворює сульфіді, які можна виявити при додаванні плюмбуму ацетату (реактиву Фоля). Сульфіді утворюють з ним коричневий або чорний осад плюмбуму сульфідіду.

Матеріальне забезпечення: реактив Фоля, інсулін.

Хід роботи: До 5 крапель інсуліну додають 5 крапель реактиву Фоля і кип'ятять. Через 1-2 хвилини після відстоювання утворюється бурий або чорний осад сульфідіду свинцю.

Висновок _____

Дослід 3. Реакція з хлорним залізом

Принцип методу. Адреналін легко окислюється на повітрі з утворенням адренохрому, який дає смарагдово-зелене забарвлення з ферумом хлоридом.

Матеріальне забезпечення: хлорне залізо, аміак, адреналін.

Хід роботи: До 3 крапель розчину адреналіну додають 1 краплю розчину хлорного заліза. Рідина забарвлюється в смарагдово-зелений

колір. Якщо додати аміаку спостерігається зміна забарвлення у червоне, а потім – коричневе.

Висновок _____

Клініко-діагностичне значення. Вивчення метаболізму гормонів і медіаторів має велике значення для діагностики ендокринних розладів, а також оцінки функціонального стану організму при багатьох інших формах патологій, які пов'язані з порушенням центральної, вегетативної нервової систем, серця, печінки, нирок та інших паренхіматозних органів.

Будь-які порушення в системі гіпоталамус – гіпофіз – кора наднирникових залоз безпосередньо приводять до зміни продукції гормонів наднирників.

При інтерпретації результатів потрібно пам'ятати, що виділення адреналіну у мужчин і жінок майже однакове, за винятком дітей 12-15 років (у хлопчиків більше виділяється ніж у дівчаток) і в 41-50 років (у чоловіків більше, ніж у жінок).

Виділення норадреналіну до віку 8-11 років однакове у дівчат і хлопців, а в наступні періоди екскреція його у жінок вища, ніж у чоловіків. Виділення адреналіну і норадреналіну у різні періоди доби неоднакове. Так, в день воно становить $7,5 \pm 1,1$ і $30,9 \pm 3,5$, а вночі $1,9 \pm 0,84$ і $11,3 \pm 4,2$ мг/хв.

Паління, фізичне навантаження, емоційний стрес викликають екскрецію катехоламінів із сечею. Збільшення екскреції катехоламінів спостерігається при цирозах печінки, при загостреннях виразкової хвороби шлунка і 12-типалої кишки. Порушення екскреції спостерігається в патогенезі уремії.

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 9

Тема: ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛІТИННИХ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ СТЕРОЇДНИХ ТА ТИРЕОЇДНИХ ГОРМОНІВ НА КЛІТИНИ-МІШЕНІ

Мета: навчитись аналізувати зміни обміну речовин та біохімічних показників, які характеризують обмін вуглеводів, білків і ліпідів при порушеннях функціонування ендокринних залоз, що відповідають за синтез стероїдних та тиреоїдних гормонів та узагальнювати прогностичну оцінку цих порушень.

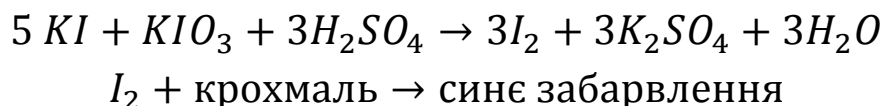
Актуальність теми. Стероїдним та тиреоїдним гормонам належить важлива роль у механізмі підтримки гомеостазу організму. Шляхом впливу на генетичний апарат клітини вони здатні змінювати інтенсивність обміну речовин в клітинах-мішенях і в організмі в цілому. Усвідомлення механізмів нейрогуморальної регуляції обміну речовин стероїдними та тиреоїдними гормонами дає основу для діагностики правильної та раціональної терапії при ендокринопатіях.

Навчальний час: 4 години

Практична робота

Дослід 1. Якісна реакція на йод в розчині тироксину

Принцип методу. При руйнуванні молекули тироксину утворюється йодистий калій, з якого йод легко витісняється йодноватим калієм. Йод, який виділився, дає синє забарвлення з крохмалем.



Матеріальне забезпечення: тироксин, 10 % розчин H_2SO_4 , 10 % розчин йодноватого калію, крохмаль, лакмус.

Хід роботи: До 24 крапель охолодженого гідролізату тироксину додають 10 % розчину H_2SO_4 до кислої реакції на лакмус. Після підкиснення додають 3 краплі 10 % розчину йодноватого калію (не

потрібно додавати надлишок). При цьому виділяється йод, наявність якого виявляють, додаючи до реакційної суміші декілька крапель розчину крохмалю. За наявності йоду спостерігають утворення сполуки синього забарвлення.

Висновок _____

Клініко-діагностичне значення. При дефіциті йоду у питній воді та продуктах харчування розвивається захворювання ендемічний зоб, який спостерігається у місцевостях, що знаходяться високо над рівнем моря. Гіпофункція щитоподібної залози при ендемічному зобі усувається додаванням солей йоду до кухонної солі або інших харчових продуктів.

Дослід 2. Якісна реакція на 17-кетостероїди сечі

Принцип методу. 17-кетостероїдами називають усі стероїди, які мають кето-групу біля 17-го вуглецевого атома, такі як андростерон. Вони утворюються із стероїдів, які мають *ОН*-групу в 17-му положенні (кортизол, кортизон тощо). Метод визначення базується на реакції 17-кетостероїдів з *m*-динітробензолом у лужному середовищі з утворенням продуктів конденсації фіолетово-рожевого кольору (максимум поглинання в межах 530 нм). Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості 17-кетостероїдів у сечі.

Максимальна екскреція 17-кетостероїдів у чоловіків та жінок спостерігається в 25-річному віці, після чого починається поступове її зниження.

Клініко-діагностичне значення. При стресових станах кількість 17-кортикостероїдів в крові і сечі збільшується. При патології вміст у крові 17-кетостероїдів змінюється в залежності від гіпо- чи гіперфункції наднирників. При хворобі Аддісона (гіпофункції) екскреція 17-кетостероїдів низька (1/3-1/5 норми), їх вміст зменшується при гіпертиреозі, важких формах хвороб печінки (цироз), пухлинах наднирників (синдром Іценко-Кушінга).

Паралельне визначення вільних 17-кетостероїдів у сечі дає можливість більш повно оцінити функціональний стан кори наднирників.

Контрольні питання

1. Механізм дії (цитозольний) тироїдних гормонів щитоподібної залози та стероїдних гормонів (цитозольні та ядерні рецептори).

1.1. Представити схеми механізму дії тироїдних та стероїдних гормонів.

Механізм дії тироїдних гормонів:

Механізм дії стероїдних гормонів:

2. Тиреоїдні гормони щитоподібної залози.

2.1. Охарактеризувати біологічні ефекти T_4 та T_3 ; особливості порушень метаболічних процесів за умов гіпер- та гіпотиреозу.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 10

Тема: ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ РОЛІ ВОДОРОЗЧИННИХ (КОФЕРМЕНТНИХ) ТА ЖИРОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ У МЕТАБОЛІЗМІ ТА РЕАЛІЗАЦІЇ КЛІТИННИХ ФУНКЦІЙ

Мета: засвоїти будову, загальні принципи класифікації, функціональну роль вітамінів, вітаміноподібних сполук, антивітамінів, біологічно активних добавок; оволодіти методами якісного та кількісного визначення водорозчинних та жиророзчинних вітамінів.

Актуальність теми. Водорозчинні та жиророзчинні вітаміни беруть участь в обміні речовин як коферменти і активатори багатьох ферментативних та неферментативних процесів. Порушення засвоєння та надходження вітамінів в організм або патологія їх обміну, знижує інтенсивність енергетичного та пластичного обмінів, що супроводжується порушенням функцій ряду органів, зниженням імунітету до вірусних та інфекційних захворювань, втратою організмом здатності адаптуватись до різних несприятливих факторів.

Навчальний час: 4 години

Практична робота

Дослід 1. Відновлення метиленового синього аскорбіноювою кислотою.

Принцип методу. Аскорбінова кислота здатна відновлювати метиленовий синій, який переходить при цьому у безколірну лейкосполуку.

Матеріальне забезпечення: 0,01 % розчин метиленового синього, 10 % розчин Na_2CO_3 , 1 % витяжка з шипшини, дистильована вода, пробірки.

Хід роботи: У дві пробірки додають по одній краплі 0,01 % розчину метиленового синього і 10 % розчину Na_2CO_3 . В першу пробірку додають 5 крапель 1 % витяжки з шипшини, в другу –

стільки ж дистильованої води. Пробірки одночасно нагрівають. У пробірці з витяжкою з шипшини рідина знебарвлюється.

Зробити висновок. Пояснити отриманий результат.

Висновок _____

Дослід 2. Реакція з ферумом хлоридом на виявлення вітаміну E

Принцип методу. Спиртовий розчин α -токоферолу окислюється ферумом хлоридом до токоферилхінону червоного кольору.

Матеріальне забезпечення: токоферол (0,1 % спиртовий розчин), 1 % розчин феруму хлориду, пробірки.

Хід роботи: В суху пробірку вливають 4-5 крапель 0,1 % спиртового розчину токоферолу, додають 0,5 мл 1 % феруму хлориду, інтенсивно перемішують, гріють на відкритому вогні до зміни кольору. Вміст пробірки набуває червоного забарвлення.

Зробити висновок. Пояснити отриманий результат, вказати на причини появи червоного кольору.

Висновок _____

Клініко-діагностичне значення. За сучасними уявленнями головна функція токоферолів полягає в тому, що вони служать антиоксидантами по відношенню до ненасичених ліпідів. Завдяки наявності в молекулі лабільного атому водню α -токоферол взаємодіє з пероксидними радикалами ліпідів, відновлюючи їх в гідро пероксиди і перериваючи таким чином ланцюгову реакцію пероксидації.

Більшість проявів недостатності токоферолу залежить, мабуть, від припинення здійснюваної вітаміном інгібуючої дії на аутоокиснення ненасичених жирних кислот, що входять у склад клітинних і субклітинних мембран: гемолітична анемія у

недоношених дітей; атрофія сім'яників і безплідність; розсмоктування плоду на ранніх стадіях вагітності; м'язова дистрофія, що супроводжується втратою внутрішньоклітинних азотистих компонентів та білків м'язів. Безпосередня причина м'язової дистрофії – вивільнення лізосомальних гідролаз внаслідок дефекту мембрани лізосом.

Добова потреба для дорослої людини 20-30 мг, концентрація в сироватці крові 3500-8000 нмоль/л.

З мембранною патологією, мабуть, пов'язані ділянки некрозу, що спостерігаються при авітамінозі Е в печінці, тканині мозку, особливо мозочка.

Найбільш багаті на вітамін Е рослинні олії: соняшникова, кукурудзяна, бавовняна, оливкова. Особливо високий його вміст у олії, отриманій із зародків пшениці, вівса, зеленого горошку. Випускають препарат синтетичного α -токоферолу ацетату в рослинній олії для внутрішнього прийому і для внутрішньом'язових ін'єкцій. Застосовують в якості антиоксиданту при м'язовій дистрофії, порушенні репродуктивної функції у жінок і чоловіків, гемолітичній анемії у новонароджених, в комплексній терапії серцево-судинних захворювань, очних та печінкових захворювань тощо.

Контрольні питання

1. Вітаміни як незамінні біологічно-активні компоненти харчування, що необхідні для організму людини. Історія відкриття вітамінів. Розвиток вітамінології в Україні.

1.1. Представити загальну класифікацію вітамінів, їх роль та значення для живих організмів, історію їх відкриття та вивчення. Вчені, які займались вивчення вітамінів в Україні.

2. Екзо- і ендogenous гіпо- та авітамінози

2.1. Представити причини та наслідки розвитку ендо- та екзогенних гіпо- та авітамінози, гіпервітамінозів

3. Заповніть таблицю, вказавши недостатність яких вітамінів призводить до розвитку вказаних патологічних станів:

Недостатність вітаміну	Патологічний стан
	Цинга
	Пелагра
	Рахіт
	Нічна сліпота
	Геморагії
	Невиношування вагітності
	Бері-бері

	Мегалобластна анемія
--	----------------------

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 11

Тема: ДОСЛІДЖЕННЯ ЗГОРТАЛЬНОЇ, АНТИЗГОРТАЛЬНОЇ ТА ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ СИСТЕМ КРОВІ. ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ РЕАЛІЗАЦІЇ ІМУННИХ ПРОЦЕСІВ. ІМУНОДЕФІЦИТНІ СТАНИ

Мета: сформулювати знання про роль компонентів згортальної, антизгортальної та фібринолітичної систем в підтриманні агрегатного стану крові; навчитись давати характеристику біохімічним компонентам імунної системи; вивчити біохімічні механізми виникнення імунодефіцитних станів.

Актуальність теми. Згортання крові є складним фізіологічно-біохімічним процесом, захисною реакцією організму на крововтрату. Знання біохімічної характеристики згортальної, антизгортальної та фібринолітичної систем крові є необхідними для розуміння механізмів підтримання агрегатного стану крові за умов норми та при численних захворюваннях, а також для їх своєчасної корекції фармпрепаратами.

Навчальний час: 4 години

Практична робота

Дослід 1. Реакція з цистеїном на вікасол

Принцип методу. Розчин вікасолу в лужному середовищі за присутності цистеїну забарвлюється в лимонно-жовтий колір.

Матеріальне забезпечення: 0,05 % розчин вікасолу, 0,025 % розчин цистеїну (зберігають у холодильнику), 20 % розчин їдкого натру, пробірки, піпетки.

Хід роботи. У пробірку наливають 5-10 крапель 0,05 % спиртового розчину вікасолу, додають 5-10 крапель 0,025 % розчину цистеїну та 2,5 мл розчину їдкого натру. Спостерігають утворення лимонно-жовтого кольору.

Зробити висновок. Пояснити отриманий результат.

Висновок _____

Клініко-діагностичне значення. Основною активною формою вітаміну К є менахінон МК-4, що утворюється з нафтохінонів рослинного і бактеріального походження в тканинах.

Найбільш вивчена функція вітаміну К – його зв'язок з процесом згортання крові. Він необхідний для синтезу в печінці білкових чинників коагуляції: протромбіну (чинник II), проконвертину (чинник VII), чинника Крістмаса (IX), чинника Стюарта (X). Вітамін К сприяє включенню додаткових карбоксильних груп у залишки глутамату попередників протромбіну. Таким чином завершується синтез «повної» молекули протромбіну, тобто її посттрансляційна модифікація. Приєднання додаткових груп $-COO$ – необхідне для оптимального зв'язування Ca^{2+} , що активує перетворення протромбіну в тромбін.

Його роль у цьому процесі зводиться або до транспорту HCO_3^- -іонів, що включаються в γ -положення залишку **глутамінової кислоти**, або до активації водню γ -вуглецевого атому глутамінової кислоти, або до активації одного з ензимів реакції карбоксилування.

Сучасні дані дозволяють вважати, що вітамін К, подібно до інших жиророзчинних вітамінів, впливає на стан мембран клітин і субцелюлярних структур, будучи складовою частиною ліпопротеїдів цих мембран.

Добова потреба для дорослої людини 1-2 мг, концентрація в сироватці крові 400-600 нмоль/л.

Нестача даного вітаміну частіше розвивається як ендогенна, викликана порушенням утворення його в кишечнику (стерилізація кишечника сульфаніламідними препаратами або антибіотиками), або порушенням всмоктування (недостатня продукція жовчі або непрохідність жовчовивідних шляхів, захворювання печінки). До недостатності може призводити і застосування препаратів із властивостями антивітамінів К (наприклад, антикоагулянтів

посередньої дії). Основні ознаки недостатності – кровотечі при невеликих пошкодженнях, коагулопатії у новонароджених (до появи мікрофлори в кишечнику).

Нафтохінони поступають в організм людини, головним чином, з їжею рослинного походження: шпинат, коренеплоди, фрукти, а також синтезуються бактеріями тонкої кишки. Вміст вітаміну К в продуктах харчування значно перевищує мінімальні щоденні потреби і тому, недостатність цього вітаміну при нормальному живленні і фізіологічних умовах всмоктування ліпідів, явище рідкісне.

У медичній практиці використовуються препарати вітаміну К і його синтетичний водорозчинний аналог – вікасол. Призначають їх при патологічних станах, що супроводжуються гіпопротромбінемією і кровотечами.

Дослід 2. Визначення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК)

Принцип методу. Метод ґрунтується на преципітації великоглобулярних імунних комплексів, які циркулюють у крові, високомолекулярним поліетиленгліколем (ПЕГ) з подальшим обліком результатів прямим спектрофотометруванням при довжині хвилі $\lambda = 450\text{нм}$.

Матеріальне забезпечення: сироватка крові, 0,1 М боратний буфер ($pH = 8,4$), 4 % розчин поліетиленгліколю-6 000, спектрофотометр, пробірки.

Хід роботи. У контрольну пробірку вносять 2,7 мл 0,1 М боратного буферу ($pH 8,4$) і 0,3 мл розведеної в три рази боратним буфером сироватки крові; у дослідну – 0,3 мл розведеної сироватки та 2,7 мл 4 % розчину поліетиленгліколю-6 000. Обидві пробірки витримують 1 год при кімнатній температурі, вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі $\lambda = 450 \text{ нм}$. Отриманий показник оптичної густини множать на тисячу і виражають в умовних одиницях.

Зробити висновок.

Висновок _____

Клініко-діагностичне значення. Визначення циркулюючих імунних комплексів є важливим тестом для дослідження ступеня тяжкості та активності патологічного процесу. У нормі їх рівень коливається в межах 30-100 ум. од. Розміри ЦІК впливають на їх імунобіологічну активність і роль у патогенезі захворювань. ЦІК великих і середніх розмірів є найбільш патогенними, оскільки можуть взаємодіяти з системою комплементу, згортальною, калікреїн-кініновою й іншими регуляторними системами організму та чинити цитопатогенний вплив на клітинні мембрани.

Контрольні питання

1. Загальна характеристика системи гемостазу в організмі людини

1.1. Дати визначення поняттям:

Гемостаз – це _____

2. Згортальна система крові; характеристика компонентів (факторів) згортання

3. Роль вітаміну К у реакціях коагуляції (карбоксилювання глутамінової кислоти, роль у зв'язуванні іонів кальцію)

4. Антисвертальна система крові

5. Імуноглобуліни: структура, біологічні функції, механізми регуляції синтезу імуноглобулінів. Біохімічна характеристика окремих класів імуноглобулінів людини

5.1. Дати визначення поняттям:

Імунна система – це _____

Антигени – це _____

Антитіла – це _____

6. Біохімічні механізми імунодефіцитних станів: первинні (спадкові) та вторинні імунодефіцити

6.1. Дати визначення поняттям:

Первинні імунодефіцитні стани – це _____

Вторинні імунодефіцитні стани – це _____

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 12

Тема: ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ М'ЯЗОВОГО СКОРОЧЕННЯ

Мета: сформулювати знання про склад і біохімічні особливості метаболізму м'язової тканини, її функціонування в нормі і при деяких патологіях; навчитись кількісно визначати креатинін і креатин у сечі для діагностики захворювань.

Актуальність теми. У м'язовій тканині є специфічні риси метаболізму в залежності від віку людини, патологічних станів в них, викликаних як ендогенними, так і екзогенними факторами. Тому в клініці особливе місце займають біохімічні методи діагностики її функціонування.

Навчальний час: 4 години

Практична робота

Дослід 1. Кількісне визначення креатиніну в сечі за методом Фоліна

Принцип методу. Метод базується на кольоровій реакції (реакція Яффе) креатиніну з пікриновою кислотою в лужному середовищі з подальшим визначенням інтенсивності забарвлення на фотоелектроколориметрі (ФЕК). Концентрацію креатиніну в сечі знаходять за калібрувальним графіком.

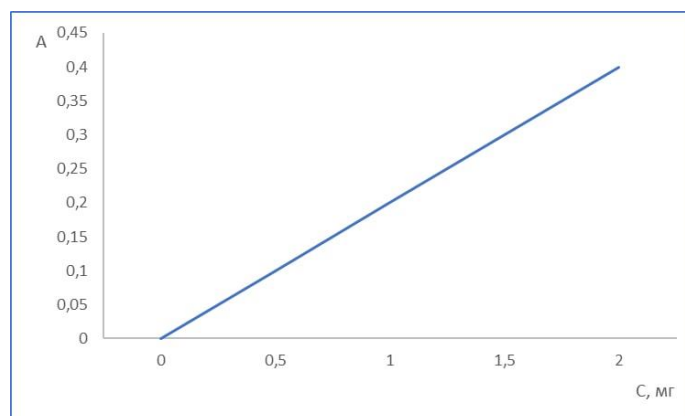


Рис. 1. Крива залежності оптичної густини розчину креатиніну від його концентрації

Матеріальне забезпечення: насичений розчин пікринової кислоти, 10 % розчин гідроксиду натрію, ФЕК, мірні циліндри на 100 мл, мірні піпетки, скляні палички.

Хід роботи. В один мірний циліндр відміряють 0,5 мл сечі (дослід), а в другий – 0,5 мл дистильованої води (контроль). В обидва циліндри додають по 0,2 мл 10 % гідроксиду натрію і по 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти, перемішують вміст циліндрів, залишають на 5 хв, потім доводять дистильованою водою до 100 мл, перемішують скляною паличкою і вимірюють на ФЕК екстинкцію досліду проти контролю в кюветах товщиною шару 1 см із зеленим світлофільтром.

Знаючи екстинкцію, за калібрувальним графіком визначають вміст креатиніну в досліді і розраховують кількість креатиніну, виділеного з сечею за добу за формулою:

$$X = \frac{a \times V_{\text{доб}}}{V_{\text{досл}}};$$

де a – кількість креатиніну, знайдена за калібрувальним графіком;

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

$V_{\text{досл}}$ – об'єм сечі, взятий для аналізу, мл; (коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (ммоль/доб) дорівнює 8,84).

Зробити висновок. Пояснити отриманий результат.

Висновок _____

Клініко-діагностичне значення. В середньому за добу з сечею виділяють креатиніну у чоловіків 8,8-17,7 ммоль/добу (1,0-2,0 г/добу), а у жінок – 7,1-15,9 ммоль/добу (0,8-1,8 г/добу). Збільшення виділення креатиніну спостерігається при надмірному вживанні м'ясної їжі (екзогенний креатинін), при розпаді білків

протоплазми, при посиленій фізичній роботі, акромегалії, при цукровому і нецукровому діабетах, інфекційних та інших захворюваннях (ендогенний креатинін). Виділення креатиніну значно зменшується при захворюваннях нирок, м'язовій дистрофії, гіпертиреозі, анемії, лейкемії, у старшому віці, при хронічному нефриті з уремією (при цьому вміст його в крові збільшується). Креатинін, на відміну від багатьох інших низькомолекулярних речовин, не реабсорбується і через те за його екскрецією з сечею можна оцінювати стан клубочкової фільтрації.

Дослід 2. Кількісне визначення креатину в сечі

Креатин у сечі визначають тим самим методом, що й креатинін, попередньо перетворивши креатин у креатинін у кислому середовищі при нагріванні. Нормальна екскреція креатину з сечею становить у чоловіків 0-0,3 ммоль/добу, у жінок 0-0,61 ммоль/добу. У сечі здорової дорослої людини при нормальному фізичному навантаженні креатину, як правило, немає. Поява його в сечі – креатинурія – спостерігається при підвищеному м'язовому навантаженні, у період росту дітей (до 14-17 років), у період вагітності, у ранньому післяродовому періоді, при вуглеводному і білковому голодуванні, у осіб похилого віку, при загоюванні значних переломів, оперативних втручаннях. Креатинурія спостерігається при посиленому розпаді тканин (опіки, рак, туберкульоз), авітамінозі Е, цукровому діабеті, паренхіматозному гепатиті.

Зробити висновок:

Контрольні питання

1. Роль іонів Ca^{2+} в регуляції скорочення та розслаблення скелетних і гладеньких м'язів

2. Написати реакції утворення креатинфосфату із зазначенням їх клітинної локалізації

3. Біохімічні зміни при інфаркті міокарда

3.1. Описати метаболічні зміни при інфаркті міокарда

4. Патобіохімія м'язів – міопатії. Метаболічні міопатії

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 13

Тема: СЕЧОУТВОРЮВАЛЬНА ФУНКЦІЯ НИРОК. НОРМАЛЬНІ ТА ПАТОЛОГІЧНІ КОМПОНЕНТИ СЕЧІ

Мета: сформулювати знання про фізико-хімічні властивості сечі; основні біохімічні показники нормальних і патологічних компонентів та шляхи їх проникнення в сечу; навчитись проводити біохімічний аналіз сечі та інтерпретувати отримані результати.

Актуальність теми. Біохімічний аналіз сечі є обов'язковим в амбулаторних і клінічних умовах у діагностуванні ряду захворювань.

У клінічній практиці для аналізу сечі досить широко використовують автоматичні біохімічні аналізатори, які дають змогу за відносно короткий проміжок часу і в невеликому об'ємі біологічного матеріалу визначити кілька десятків біохімічних параметрів. Для експрес-діагностики захворювань різні фірми випускають індикаторні тест-смужки, які містять сухі реактиви (ферменти або інші речовини), що призводять до утворення або зміни забарвлення в результаті їх взаємодії з деякими метаболітами досліджуваних біологічних рідин, наприклад, сечі.

Навчальний час: 4 години

Практична робота

Для лабораторних досліджень використовують ранішню сечу. Забір сечі повинен проводитись в стерильних умовах, щоб уникнути попадання бактерій та грибів. Забір сечі, особливо добовий, вимагає консервації такими речовинами, як тимол, толуол, формальдегід, хлороформ. Сеча для дослідження ферментів не має містити консервантів; її потрібно охолодити або заморозити. Для наших досліджень проводимо забір середньої порції сечі під час першого ранкового сечовипускання.

Аналіз сечі проводять, починаючи з оцінки фізико-хімічних властивостей: кількість, колір, запах, прозорість, реакція (pH) і густина сечі.

Дослід 1. Фізико-хімічні властивості сечі

Матеріальне забезпечення: сеча, мірний циліндр, колбочки, набір урометрів, індикаторний папір «Ріфан», піпетки, пробірки.

Визначення кількості сечі. Виділення сечі за певний проміжок часу (за день, ніч або повністю за добу) називається діурезом. Об'єм сечі вимірюють мірним циліндром по нижньому меніску.

Клініко-діагностичне значення: У нормі доросла людина за добу виділяє в середньому 1100-1800 мл сечі. Відхилення від норми називаються поліурія, олігурія і анурія. **Поліурія** – збільшення виділення сечі (більше 2000 мл) – може бути фізіологічною (за рахунок вживання великої кількості рідини або при нервовому збудженні) і патологічною (при цукровому і нецукровому діабетах, захворюваннях нирок, при вживанні сечогінних і серцевих лікарських засобів). **Олігурія** – зменшення виділення сечі (600 мл і менше) – може бути фізіологічною (при обмеженому вживанні рідини, втраті рідини з потом) і патологічною (при запаленні нирок, частих проносах, гарячкових захворюваннях, блюванні, пороках серця). **Анурія** – повне припинення виділення сечі – часто спостерігається при закупорці сечоводів (нирковий камінь, пухлина). Така анурія називається неістинною. Істинна анурія виникає при порушенні сечовидільної функції нирок (гостра ниркова недостатність, важкі форми гострого гломерулонефриту, отруєння ртуттю, свинцем).

1.1. Колір сечі. Колір сечі визначають у склянці з безбарвного скла у відбитому світлі на білому фоні.

Клініко-діагностичне значення. У нормі колір сечі у дорослої людини солом'яно-жовтий завдяки таким пігментам, як урохром, уробілін, уроеритрин та ін. У новонароджених сеча майже безбарвна.

При патологічних станах можуть відбуватися як якісні, так і кількісні зміни у забарвленні сечі.

Якісні зміни кольору сечі залежать від наявності в ній білірубіну і гемоглобіну. При гематуріях ниркового походження сеча набуває кольору «м'ясних помиїв», при жовтяниці – кольору «пива», при вживанні деяких ліків (амідопірин, ацетилсаліцилова кислота) і при отруєнні карболовою кислотою колір сечі стає рожево-червоним.

Червоний колір сечі спостерігається при порфіринурії.
Розрізняють:

- первинна порфінурія виникає внаслідок ензимопатії, наприклад, спадкова хвороба Гюнтера, при якій з сечею виділяється багато уропорфіринів і копропорфіринів I;
- вторинна порфінурія виникає при інтоксикаціях з подальшим ураженням печінки.

При збільшенні діурезу змінюється інтенсивність кольору сечі. Інтенсивне забарвлення спостерігається при олігуріях або при посиленому виділенні пігментів, зокрема білірубину (гемолітична жовтяниця). Слабке забарвлення сечі буває при поліуріях (нефросклероз, нецукровий і цукровий діабети, швидке розсмоктування набряків та ін.).

При вживанні буряків, моркви, суниць сеча забарвлюється різними пігментами, що містяться в цих продуктах.

Молочно-білий колір сечі спостерігається при хілурії внаслідок розриву лімфатичних капілярів нирки, великому вмісту ліпідів, фосфатів і домішок гною.

1.2. Запах сечі. У нормі свіжа сеча має специфічний запах летких речовин, що в ній містяться. Аміачний запах свіжа сеча має при запаленні сечового міхура (цистити), гнильний – при гангренозних процесах, плодовий або винний, ацетону – у хворих на діабет. Запах сечі пов'язаний також з характером їжі (часник, спаржа) або вживанням деяких медикаментів (запах валеріани, ментолу, тощо).

1.3. Прозорість сечі. Прозорість сечі визначають у склянці з безбарвного скла після збовтування.

У нормі свіжа сеча завжди прозора. З часом у ній починається лужне бродіння і сеча стає каламутною.

Причиною каламутності різної інтенсивності може бути наявність у сечі солей (у лужному середовищі фосфатів, а в кислій сечі – уратів), слизу, кліткових елементів і бактеріальної флори (цистопієліти). Дуже рідко каламутність спричинюють жири (при переломах великих кісток). Щоб відрізнити патологічне походження

каламутності (осаду) сечі від звичайної сольової каламуті, треба провести відповідні хімічні і мікроскопічні дослідження.

1.4. Хімічне дослідження на розрізнення організованих осадів від неорганізованих

Всі елементи сечових осадів поділяють на дві великі групи: організовані і неорганізовані елементи осаду. Неорганізований осад складається з солей та кристалічних утворень, що наявні як у нормальній, так і в патологічній сечі. Солі осаду різні в залежності від реакції сечі. До неорганізованих елементів осаду в кислій сечі належать аморфні урати, сечова кислота, оксалати, у лужній – аморфні фосфати, трипельфосфати, амонію урат. До організованих елементів осаду сечі належать всі клітинні елементи: еритроцити, лейкоцити, епітеліальні клітини (плоскі, циліндричні і круглі).

Матеріальне забезпечення: пробірки, 10 % розчин ацетатної кислоти, 5 % розчин гідроксиду натрію.

Хід роботи: У 2 пробірки наливають по 5 мл сечі і додають у першу пробірку 1 мл 10 % ацетатної кислоти, а у другу – 1 мл 5 % гідроксиду натрію і нагрівають.

За результатами проведеного експерименту зробити висновки.

Висновок _____

Неорганізовані осадки (фосфати, карбонати, оксалати) розчиняються у кислотах, а урати – в лугах. Якщо в лужному середовищі каламуті не зникає навіть після додавання 3-5 крапель концентрованого розчину $NaOH$, тоді ця каламуті зумовлена наявністю клітинних елементів (епітелій, лейкоцити, еритроцити, слизь).

Організовані елементи відрізняються від неорганізованих тим, що вони дуже повільно зсідаються і не розчиняються при нагріванні і додаванні кислот.

Зробити висновок. Пояснити отриманий результат.

Висновок _____

1.5. Реакція сечі. Визначення pH сечі за допомогою індикаторного паперу

На середину індикаторного папірця «Ріфан» наносять 1-2 краплі свіжої сечі і за зміною забарвлення одної із забарвлених смужок, яка співпадає з кольором контрольної смуги, визначають pH сечі.

За результатами проведеного експерименту зробити висновки. Точніше визначають pH сечі потенціометричним методом.

Висновок _____

Клініко-діагностичне значення. Реакція сечі (pH) у здорової людини коливається в нормі від 4,5 до 8,0. На неї може впливати склад їжі і патологічні стани. Наприклад, лужна реакція сечі спостерігається при блюванні, фосфатурії, запаленні сечового міхура (цистит) і ниркових мисок (в останніх двох випадках бактеріальна флора розкладає сечовину на аміак), вагітності, вживанні лужних мінеральних вод. Більш кисла реакція сечі буває при цукровому діабеті і голодуванні (внаслідок нагромадження у сечі кетонових тіл), тяжкій нирковій недостатності внаслідок порушення функції нирок і зменшення вмісту аміаку, що нейтралізує сечу. Дуже кисла реакція спостерігається при подагрі і гарячковому стані.

Великий вплив на реакцію сечі має характер харчування. При посиленому білковому харчуванні (м'ясо) сеча стає більш кислою, якщо переважає рослинна їжа – більш лужною.

1.6. Густина сечі. Сечу наливають у вузький циліндр на 100 мл і стежать, щоб не утворилась піна. Якщо ж піна утворилася, то її знімають фільтрувальним папером. Утворенню піни можна запобігти, якщо наливати сечу у циліндр по його стінці. У циліндр обережно

опускають урометр і, коли він перестане коливатися, визначають густину по нижньому меніску. Урометр при цьому повинен вільно плавати в циліндрі і не торкатися його стінок.

Якщо досліджуваної сечі мало, її треба розвести дистильованою водою, визначити питому вагу і добутий показник (дві останні цифри) помножити на розведення.

Наприклад, якщо для аналізу взяли 20 мл сечі, то її розводять в циліндрі дистильованою водою у 2 рази (до 40 мл) і вимірюють густину. Якщо вона рівна 1,006, тоді істинна густина дорівнює 1,012. Такий спосіб визначення густини сечі дуже важливий для педіатричної практики.

Кожний урометр калібрований для певної, вказаної на ньому температури. Якщо визначення роблять при іншій температурі, тоді вносять поправку: на кожні 3 °С вище вказаної температури до показника урометра додають по 0,001, якщо температура нижче, тоді на кожні 3 °С – віднімають по 0,001.

За результатами проведеного експерименту зробити висновки.

Висновок _____

Клініко-діагностичне значення. У нормі густина сечі при температурі 15 °С коливається від 1,014 до 1,025 кг/л. Густина сечі характеризує концентраційну здатність нирок, тому що вона дає уявлення про концентрацію речовин, розчинених у сечі (у першу чергу сечовини і солей натрію). Густина сечі протягом доби може змінюватися, нічна сеча у нормі більшої густини, ніж денна. Вона змінюється як від кількості спожитої рідини, так і від кількості рідини, виділеної з потом і калом.

При нецукровому діабеті густина сечі коливається від 1,001 до 1,004, а при цукровому діабеті досягає 1,030-1,040 і більше. На кожний 1 % цукру в сечі вноситься поправка в густину на 0,004. Протеїнурія також впливає на густину сечі – 3 г/л збільшує її на 0,001.

Підвищення густини спостерігається при гарячкових захворюваннях, блюванні, проносах, деяких хворобах нирок.

Низька густина буває при тяжких розладах функції нирок, нервових захворюваннях, нецукровому діабеті.

Виділення протягом тривалого часу сечі зі стабільною густиною, показник якої дорівнює густині первинної сечі (1,010-1,011), називається ізостенурією.

Гіпостенурія – часткова втрата нирками здатності концентрувати і розбавляти сечу – спостерігається при тривалому виділенні сечі, густина якої 1,007-1,015. При цьому функціональна здатність нирок частково зберігається, але прогноз також несприятливий.

Дослід 2. Виявлення патологічних компонентів сечі

2.1. Кількісне визначення вмісту білка у сечі за методом Робертса-Стольнікова-Брандберга

Принцип методу. Метод базується на реакції осадження білків концентрованою нітратною кислотою (осад не розчиняється в надлишку кислоти), яка дає позитивний результат при наявності у сечі не менш як 0,033 г/л сечі білка (проба Геллера).

Матеріальне забезпечення: нормальна сеча і патологічна сеча, 50 % розчин нітратної кислоти (або розбавлена водою концентрована нітратна кислота 1 : 1), піпетки, пробірки.

Хід роботи: В 6 пробірок наливають по 2 мл води. В першу добавляють 2 мл сечі, рідину перемішують і 2 мл її переносять у другу пробірку. Із другої пробірки 2 мл суміші переносять у третю пробірку тощо. Із останньої (шостої) 2 мл суміші виливають. Таким чином одержують розведення сечі в 2, 4, 8, 16, 32, 64 рази. У 6 інших пробірок наливають по 1 мл 50 % нітратної кислоти. Потім піпеткою нашаровують (додають по стінках нахиленої пробірки, щоб не перемішувалась рідина) 1 мл розбавленої сечі із першої пробірки в пробірку з нітратною кислотою. Визначають час появи кільця. Аналогічно проводять дослід з наступними пробірками з розведеною сечею. Проба, в якій біле кільце з'являється між другою і третьою

хвилинами, містить 0,033 г/л білка. Показник розведення множать на 0,033 г/л і дістають показник кількості білка в сечі. Наприклад, при розведенні сечі у 4 рази концентрація білка складає 0,132 г/л ($0,033 \times 4 = 0,132$).

За результатами проведеного експерименту зробити висновки.

Висновок _____

Клініко-діагностичне значення. Сеча здорової людини практично не містить білка (звичайними хімічними реакціями він не виявляється).

Розрізняють справжню альбумінурію і несправжню. При справжній або нирковій протеїнурії білки сироватки крові проникають в сечу через нирки при порушенні фільтраційної мембрани. Несправжня протеїнурія спостерігається при попаданні в сечу слизу, крові, гною не з нирок, а з сечовивідних шляхів.

Білок появляється у сечі також при серцевій декомпенсації, інколи при вагітності, гіпертонії та інфекційних захворюваннях, тощо.

2.2. Виявлення білка в сечі

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

2.3. Виявлення цукру у сечі

Усі моно- і дисахариди, які мають у своєму складі вільний напівацетальний гідроксил, здатні в лужному (проба Фелінга) і в кислому (проба Барфедда) середовищах відновлювати катіони металів (мідь, срібло тощо).

2.4. Виявлення крові в сечі (Бензидинова проба)

Принцип методу. Реакція базується на окисненні бензидину до п-хінондиіміну киснем, який утворюється внаслідок розкладу гідрогену пероксиду за присутності крові.

Клініко-діагностичне значення. Сеча при гематурії каламутна і має червоний відтінок, інтенсивність якого залежить від кількості формених елементів крові. В осаді під мікроскопом виявляються

еритроцити і лейкоцити. Гемоглобінурія спостерігається при захворюваннях, пов'язаних з гемолізом (розпадом) еритроцитів. Сеча при цьому буває червоного або кофейно-бурого кольору.

2.5. Виявлення жовчних кислот (Проба Петтенкофера)

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

Клініко-діагностичне значення. При механічній жовтяниці внаслідок закупорки загальної жовчної протоки каменем або пухлиною жовчні капіляри переповнюються жовчю. Внаслідок цього печінкові клітини стискаються і жовч проникає у кров. У цих випадках відбувається посилене виділення жовчних пігментів (білірубін, білівердин) і жовчних кислот з сечею.

Контрольні питання

1. Роль нирок в регуляції об'єму, електролітного складу та *pH* рідин організму

2. Гормональні механізми регуляції водно-сольового обміну та функцій нирок; антидіуретичний гормон; альдостерон

2.1. Представити схему калікреїн-кінінової системи нирок

3. Навести значення біохімічних показників в сечі в нормі та при патології та вказати їх клініко-діагностичне значення

4. Патологічні компоненти сечі – кров, гемоглобін, креатин

4.1. Вказати причини появи патологічних компонентів сечі та шляхи їх проникнення

5. Вказати причину появи у сечі кетонових тіл, жовчних кислот і жовчних пігментів та клініко-діагностичне значення їх визначення

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна

1. Біологічна хімія. Навчально-методичний посібник для студентів фармацевтичного факультету (другий магістерський рівень): Білецька Л. П., Гринчишин Н. М., Кобилінська Л. І. та ін. / за редакцією О. Я. Склярова. – ЛНМУ ім. Д. Галицького. – Львів. – 2019. – 126 с.

2. Біологічна і біоорганічна хімія: у 2 кн.: підручник. Кн. 2. Біологічна хімія / Ю. І. Губський, І. В. Ніженковська, М. М. Корда та ін.; за ред. Ю. І. Губського, І. В. Ніженковської. – К.: ВСВ «Медицина», 2016. – с. 231 - 247.

3. Губський Ю. І. Біологічна хімія. – Київ-Вінниця: Нова книга, 2009. – с. 328 - 343.

4. Гонський Я. І., Максимчук Т. П. Біохімія людини. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – с. 448 - 462.

5. Скляров О. Я., Фартушок Н. В., Бондарчук Т. І. Біологічна хімія. – Тернопіль: ТДМУ, 2015. – с. 274 - 291.

6. Біологічна хімія. Тести та ситуаційні задачі. / За ред. О. Я. Склярова. – Львів.: Вид-во ЛНМУ, 2015. – с. 197 - 204.

7. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О. Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.

8. Практикум з біологічної хімії. / За ред. О. Я. Склярова. – К.: Здоров'я, 2002. – 180 - 189 с.

9. Скоробогатова З. М. Атлас метаболічних шляхів. – К.: Академперіодика, 2017. – С. 52 - 57.

10. Будняк О. К., Сорокін А. В., Федорко Н. Л., Запорожченко О.В., Петров С.А. Метод. вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання із курсу біохімії, 2003. – 63 с.

11. Murray R., Bender D., Botham K. M., Kennelly P. J., Rodwell V., Weil A. «Harper's Biochemistry» 29-th edition. – McGraw Hill Professional. – 2012. – 818 p.

12. Nelson D. L., Cox M. M. «Lehninger Principles of Biochemistry» fifth edition. – New York. – W.H. Freeman and Company. – 2005. – 1010 p.

13. Satyanarayana U. Biochemistry / U. Satyanarayana, U. Chakrapani. – 4d ed. – Kolkata : Books and Allied ltd, 2014. – P. 387 - 402.

14. Swanson T. A., Kim S. I., Glucksman M.J., Lieberman M. A. «Biochemistry, Molecular Biology, and Genetics» 5-th edition. – Lippincott Williams & Wilkins. – 2010. – 380 p.

Додаткова

1. Кольман Я., Рем К.-Г. Наочна біохімія. – М.: Мир, 2000. – с. 188 - 193.

2. Маррі Р., Греннер Д., Мейєс П., Родуелл В. Біохімія людини. Т.2. – М.: Мир; Біном. Лабораторія знань, 2009. – с. 15 - 34.

3. Основи біохімії за Ленінджером / Девід Л. Нельсон, Майкл М. Кокс. – Львів : вид-во «БаК», 2015. – с. 898 - 916.

Навчальне видання

Устянська Ольга Володимирівна
Шкодовська Анна Марія Ігорівна

БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ
РОБОЧИЙ ЗОШИТ
ДЛЯ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
ЧАСТИНА II: МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ.
БІОХІМІЯ МІЖКЛІТИННИХ КОМУНІКАЦІЙ ТА ФІЗІОЛОГІЧНИХ
ФУНКЦІЙ

Методичні рекомендації

В авторській редакції

Підп. до друку 08.12.2022. Формат 60x84/16.

Ум.-друк. арк. 2,77. Наклад 10.

Зам. № 2535.

Видавець і виготовлювач

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
,Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12
Тел.: +38 (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua