

**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені І. І. МЕЧНИКОВА**

**МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК
з БІОЛОГІЧНОЇ ХІМІЇ**

для студентів біологічних спеціальностей:

014.05 "СЕРЕДНЯ ОСВІТА"

091 "БІОЛОГІЯ"

162 "БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОІНЖЕНЕРІЯ"

Одеса – 2022

УДК 577
М545

Рецензенти:

Шекк Павло Володимирович – доктор сільськогосподарських наук, професор, завідувач кафедри біоресурсів та аквакультури Одеського державного екологічного університету.

Грицук Олександр Іванович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фармакології та технології ліків Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Рекомендовано до друку Вченою радою біологічного факультету ОНУ імені І. І. Мечникова (протокол № 2 від 13 жовтня 2020р.)

Укладачі:

д.б.н., проф. *Петров Сергій Анатолійович*
к.б.н., доц. *Андрієвський Олександр Михайлович*
к.б.н., доц. *Федорко Наталія Леонідівна*
к.б.н., доц. *Чернадчук Сніжана Сергіївна*
к.б.н., доц. *Будняк Олександр Костянтинович*
к.б.н., доц. *Сорокін Андрій Вікторович*
стар.викл. *Кокошкіна Оксана Олександрівна*

М545 Методичний посібник з біологічної хімії: метод. посіб. для студентів біологічного факультету [електронний ресурс] / С.А. Петров, О.М. Андрієвський, Н.Л. Федорко, С.С. Чернадчук, О.К. Будняк, А.В. Сорокін, О.О. Кокошкіна. – Одеса, 2022. – 77 с.

Запропоновані методи біохімічних досліджень з супроводженням певної теорії, щодо спрямування необхідних навичок у виробничій практиці біолога-дослідника. Практикум з біологічної хімії рекомендований студентам біологічних спеціальностей для проведення лабораторних занять з Біохімії, Великого спеціального практикуму та при написанні кваліфікаційних робіт.

© С.А. Петров, О.М. Андрієвський, Н.Л. Федорко, С.С. Чернадчук,
О.К. Будняк, А.В. Сорокін, О.О. Кокошкіна, 2022

ЗМІСТ	
РОЗДІЛ 1. ОБМІН АМІНОКИСЛОТ ТА БІЛКІВ	9
Лабораторна робота № 1 АНАЛІЗ СКЛАДУ І ВЛАСТИВОСТЕЙ ШЛУНКОВОГО СОКУ	13
Лабораторна робота № 2 ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ	15
Лабораторна робота № 3 ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АСПАРТАТ- І АЛАНІНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ	16
Лабораторна робота № 4 ЕКСПРЕС-МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ПІДВИЩЕНОГО ВМІСТУ ФЕНІЛАЛАНІНУ В КРОВІ (ЗА ЛЕВІНИМ)	22
Лабораторна робота № 5 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГІДРОКСИПРОЛІНУ (ОКСИПРОЛІНУ) В СЕЧІ	23
Лабораторна робота № 6 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ В СЕЧІ ФЕРМЕНТАТИВНИМ УРЕАЗНИМ / ФЕНОЛ-ГІПОХЛОРИТНИМ МЕТОДОМ	24
Лабораторна робота № 7 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНІНУ В СЕЧІ	26
РОЗДІЛ 2. ОБМІН НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ	28
Лабораторна робота № 8 ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА СКЛАДОВІ ЧАСТИНИ НУКЛЕОПРОТЕЇНІВ	28
Лабораторна робота № 9 ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ РИБОНУКЛЕАЗИ ЗА КИСЛОТОРОЗЧИННИМИ ПРОДУКТАМИ РОЗПАДУ РНК МЕТОДОМ ШНЕЙДЕРА І ХОГЕБУМА	30
Лабораторна робота № 10 ТУРБІДИМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ РИБОНУКЛЕАЗИ	31
Лабораторна робота № 11 ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗИ ЗА КИСЛОТОРОЗЧИННИМИ ПРОДУКТАМИ РОЗПАДУ ДНК	31
Лабораторна робота № 12 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ	32
РОЗДІЛ 3. ФЕРМЕНТИ	34
Лабораторна робота № 13 ВИВЧЕННЯ ТЕРМОЛАБІЛЬНОСТІ ФЕРМЕНТІВ	39
Лабораторна робота № 14 ВПЛИВ рН НА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗИ	40
Лабораторна робота № 15	40

СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ	
Лабораторна робота № 16 ВПЛИВ АКТИВАТОРІВ І ІНГІБІТОРІВ НА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗИ	41
Лабораторна робота № 17 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМІЛАЗИ СЛИНИ ЗА ВОЛЬГЕМУТОМ	41
Лабораторна робота № 18 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В КРОВІ ЗА МЕТОДОМ БАХА - ЗУБКОВОЇ	42
РОЗДІЛ 4. ВІТАМІНИ	44
Лабораторна робота № 19 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ С ЗА МЕТОДОМ ТІЛЬМАНСА	44
Лабораторна робота № 20 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ Р ЗА МЕТОДОМ ЛЕВЕНТАЛЯ	45
Лабораторна робота № 21 ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ Е	46
Лабораторна робота № 22 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ Е	46
РОЗДІЛ 5. ГОРМОНИ	47
Лабораторна робота № 23 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АДРЕНАЛІНУ ЗА МЕТОДОМ ФОЛІНА	47
РОЗДІЛ 6. ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ	48
Лабораторна робота № 24 СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ РОЗПАДУ ВУГЛЕВОДІВ: АМІЛАЗИ І САХАРАЗИ	49
Лабораторна робота № 25 ВИЗНАЧЕННЯ ЦУКРУ В КРОВІ ЗА МЕТОДОМ ХАГЕДОРНА - ЙЕНСЕНА	50
Лабораторна робота № 26 ФЕРМЕНТАТИВНИЙ МЕТОД КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ В СИРОВАТЦІ АБО В ПЛАЗМІ КРОВІ	51
Лабораторна робота № 27 ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ СПИРТОВОГО БРОДІННЯ	52
Лабораторна робота № 28 АНАЕРОБНИЙ РОЗПАД ГЛІКОГЕНУ ДО МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ	53
Лабораторна робота № 29 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОВОИНОГРАДНОЇ КИСЛОТИ В СЕЧІ	55
Лабораторна робота № 30 ВИЗНАЧЕННЯ ПРОВОИНОГРАДНОЇ КИСЛОТИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ	57
РОЗДІЛ 7. ОБМІН ЛІПІДІВ	58

Лабораторна робота № 31 КІНЕТИКА ДІЇ ЛПАЗИ	62
РОЗДІЛ 8. ОБМІН МІНЕРАЛЬНИХ РЕЧОВИН	65
Лабораторна робота № 32 ЯКІСНЕ І КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРИДІВ	66
Лабораторна робота № 33 ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФОСФАТІВ	67
Лабораторна робота № 34 ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬФАТІВ І ЕФІРОСІРЧАНИХ КИСЛОТ	68
РОЗДІЛ 9. ІНТЕГРАЦІЯ І РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ШЛЯХІВ	69
ЛІТЕРАТУРА	75

ВСТУП

Біологічна хімія є однією з найважливіших дисциплін для підготовки в університетах біологів широкого профілю.

Біологічна хімія - це наука, що вивчає хімічну природу речовин, з яких побудовано організм, закономірності їхніх перетворень, виведення кінцевих продуктів обміну речовин, а також роль хімічних речовин, що регулюють ці процеси.

Практикум з біологічної хімії складено у відповідності до програми курсу «Біологічна хімія» та підготовлений з метою допомоги студентам у вивченні теоретичного матеріалу та набутті відповідних практичних навичок виконання основних біохімічних методів, що використовуються в практичній діяльності біолога-дослідника та у клінічній практиці.

Опису методів дослідження передують короткий виклад теоретичного матеріалу з відповідної теми, який є необхідним для розуміння і виконання лабораторних робіт. У кінці кожного розділу наведено контрольні запитання, відповіді на які мають допомогти студентам краще засвоїти навчальний матеріал.

Необхідною складовою Практикуму є опис інструкції з техніки безпеки та охорони праці в біохімічній лабораторії, яку повинні знати і суворо дотримуватись студенти. Студенти зобов'язані отримати інструктаж та зареєструватися в спеціальному журналі інструктажу з техніки безпеки та охорони праці.

Кожне завдання, що виконується, формули і розрахунки до нього оформляються у вигляді протоколу в спеціальному зошиті. Завдання вважається виконаним тільки після перевірки і підпису викладача.

Практикум з біологічної хімії сприятиме підвищенню якості підготовки біологів-дослідників.

КОРОТКА ІНСТРУКЦІЯ з техніки безпеки та охорони праці в біохімічній лабораторії

Перед початком виконання практичних робіт необхідно перевірити справність обладнання, вентиляції, газової мережі, водопроводу, системи електроживлення. У разі виявлення несправностей, що створюють підвищену небезпеку, роботу в лабораторії забороняється проводити до їх усунення.

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 використанні витяжної шафи, 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 проводити ніяких дослідів у нечистому посуді. Посуд мити одразу ж після досліду, використовуючі мийні засоби.

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

6. Перелік реактивів-прекурсорів:

Прекурси (лат. *prae* — попереду, перед + *cursus* — напрямок) — речовини та їх солі, класифіковані в міжнародних конвенціях як хімічні матеріали, що використовуються для приготування наркотичних і психотропних речовин, а також хімічні речовини та їх солі, що використовуються з аналогічною метою і віднесені Комітетом з контролю за наркотиками при МОЗ України до зазначеної категорії. КМУ затверджено перелік прекурсорів у вигляді таблиці (списку № 1 та списку № 2).

Список № 1. Прекурси, обіг яких обмежено і стосовно яких вжито певні заходи контролю

Міжнародна непатентована назва	Хімічна назва
N-Ацетил-антранілова кислота	2-Ацетиамінобензойна кислота
Ергометрин	Бета-пропаноламід лізергінової кислоти малеат, 9,10-дидегідро-N-[(S)-2-гідрокси-1-метилетил]-6-метилерголін-8β карбоксіамід малеат
Ерготамін	Ерготаман 3', 6', 18-тріон, 12'-гідрокси-2'метил-5'-(фенілметил)-(5'α),[R-R*,R*])-2,3-дигідроксибутандіоат
Ефедрин	[R-(R*,S)]-α-[1-(метиламіно)етил]-фенілметанол, 1-феніл-2-(метиламіно)-пропанол
Ізоафрол	3,4-метилендіокси-(1-пропеніл)бензол
Лізергінова кислота	9,10-Дидегідро-6-метилерголін-8β-карбонова кислота
3,4-Метиленді-оксифеніл-2-пропанон (3,4-МДФ-2П)	3,4-Метилендіокси-(пропіл-2-он)бензол
Піперональ	3,4-(Метилендіокси)бензальдегід, геліотропін
Псевдоефедрин	[S-(R*, R*)]-α-[1-(метиламіно)етил]-феніл-метанол, 1-феніл-2-(метиламіно)-пропанол
Сафрол	3,4-Метилендіоксіалілбензол
Фенілацетон	1-Феніл-2-пропанон; метилбензилкетон
Фенілпропаноламін (ФПА, норелефедрин)	(±)-2-Аміно-1-фенілпропанол-1

Список № 2. Прекурси, стосовно яких вживаються певні заходи контролю

Міжнародна непатентована назва	Хімічна назва
Ангідрид оцтової кислоти	Оцтовий ангідрид
Антранілова кислота	2-Амінобензойна кислота
Ацетон	2-Пропанон
Етиловий ефір	Діетиловий ефір

Міжнародна непатентована назва	Хімічна назва
Калію перманганат	Калій марганцевокислий
Метилетилкетон	2-Бутанон
Піпередин	Гексагідропіридин, пентаметиленімін
Сірчана кислота	Сульфатна кислота
Соляна кислота	Хлористоводнева кислота
Толуол	Метилбензол
Фенілоцтова кислота	Альфа-толуїлова кислота

Примітка. До цих списків також включають солі перелічених речовин у разі, коли утворення таких солей можливе, за винятком солей сірчаної та соляної кислот. Матеріали, що містять не менше ніж 10 % таких прекурсорів, як ацетон, етиловий ефір, метилетилкетон та толуол, підлягають тим же заходам контролю, що й прекурсори.

ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ ПРИ РОБОТІ З ЇДКИМИ РЕЧОВИНАМИ ТА РЕАКТИВАМИ-ПРЕКУРСОРАМИ

1. При змішуванні концентрованих сірчаної й азотної кислот користуватися тільки товстостінним хімічним чи порцеляновим посудом.
2. Щоб уникнути розбрикування при розведенні концентрованої сірчаної кислоти – слід 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 розбрикування і використовувати захисний спецодяг захисні і запобіжні окуляри.
5. Наповнення піпеток концентрованими кислотами, лугами та іншими рідинами шляхом всмоктування ротом категорично забороняється, для цього потрібно користатися сифонами, спеціальними піпетками з гумовою грушею або автоматичними піпетками.

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ З ГОРЮЧИМИ І ЛЕГКОЗАЙМИСТИМИ РЕЧОВИНАМИ

1. При роботі з горючими і легкозаймистими рідинами (сірковуглець, ефір, бензол і т.д.) 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 даліні 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 у бік, 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 вогненебезпечними речовинами;

в) прикрити полум'я мокрою ковдрою, а при потребі засипати піском;

г) вимикати вентиляційні прилади;

д) при необхідності використовувати вуглекислотний вогнегасник;

е) терміново повідомити пожежну охорону (тел. 101) 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 користування.

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 одна напроти другої. У разі забруднення гнізда ротора слід його ретельно очистити і висушити.

7. Після закінчення роботи необхідно виключити всі використані в роботі електроприлади.

Після вивчення і зрозуміння правил техніки безпеки та охорони праці при роботі в біохімічній лабораторії робиться відповідна відмітка у спеціальному журналі, де кожен студент ставить свій підпис і після чого допускається до виконання лабораторних робіт з біохімії.

РОЗДІЛ 1. ОБМІН АМІНОКИСЛОТ ТА БІЛКІВ

Протягом всього життя в організмі відбуваються одночасні руйнування та відновлення клітин і тканин. Ці протилежні, але тісно зв'язані між собою процеси – *асиміляція і дисиміляція* – складають основу життя. Отже, в організм повинні постійно надходити речовини, необхідні для побудови нових клітин. Головна роль у цьому належить білкам, тому що ні вуглеводи, ні жири не можуть їх замінити в утворенні основних структурних елементів органів і тканин. Серед різноманітних перетворень, властивих живій матерії, основне місце займає *білковий обмін*.

У зв'язку з тим, що білки є азотвмісними речовинами, одним з методів, що характеризують стан білкового обміну в організмі, може бути визначення *балансу нітрогену*. У здорової людини при нормальному харчуванні відзначається *стан білкової рівноваги*, коли надходження нітрогену компенсує його витрати. При *негативному азотистому балансі* кількість виведеного нітрогену перевищує його кількість, що надходить. Такий стан може спостерігатися при порушенні діяльності травної системи, білковому голодуванні і т.п.

Позитивний азотистий баланс буває в тих випадках, коли кількість виведеного азоту менше того, що надходить у складі білків. Це характерно для зростаючого організму, при вагітності, при підвищенні активності процесів біосинтезу білка (наприклад, при фізичних навантаженнях).

Для синтезу білків в організмі необхідні різні амінокислоти. Деякі з них, що утворюються в самому організмі, називаються *замінними*. Амінокислоти, що не синтезуються в організмі людини, називаються *незамінними*. Вони повинні регулярно надходити з їжею. Білки, до складу яких входять замінні і незамінні амінокислоти в співвідношеннях, що наближаються до таких в організмі, називають *повноцінними*. Серед харчових продуктів практично немає білків, що цілком відповідають цим вимогам. Більш близькі до повноцінного – білки материнського молока, курячого яйця. Отже, для повного забезпечення здорового організму повноцінними білками в добовий раціон повинні бути включені різні харчові продукти як тваринного, так і рослинного походження.

Для нормальної життєдіяльності людини необхідне надходження такої кількості повноцінного білка, що буде покривати всі потреби організму. Вони залежать від статі, віку, інтенсивності праці і т.д.

В організмі людини щодоби розпадається до амінокислот (АК) близько 400 г білків і стільки ж синтезується. Добова норма споживання білків становить близько 100 г.

Оскільки білки всіх організмів відрізняються суворою видовою і тканинною специфічністю, організм людини використовує білки їжі тільки після їх повного гідролізу до АК в шлунково-кишковому тракті під дією ряду протеолітичних ферментів – пептидгідролаз. Все пептидгідролази в залежності від місця розташування гідролізованого пептидного зв'язку поділяються на:

1) ендопептидази (протеїнази), які гідролізують пептидні зв'язки, віддалені від кінців пептидного ланцюга: пепсин, трипсин, хімотрипсин, еластаза;

2) екзопептидази, які гідролізують пептидні зв'язки, утворені N- і C-кінцевими амінокислотами: амінопептидаза, карбоксипептидаза, дипептидаза.

Шлункові і панкреатичні пептидази та протеїнази утворюються в неактивній формі, секретуються в місце дії, де активуються шляхом часткового протеолізу. Такий механізм утворення активних ферментів необхідний для захисту секреторних клітин шлунка і підшлункової залози від самоперетравлення.

Перетравлення білків починається в шлунку під дією шлункового соку. У його склад входить хлоридна кислота, що виробляється обкладковими клітинами слизової оболонки шлунка. Вона денатурує білок, що полегшує його наступне розщеплення. До складу шлункового соку входять кислі фосфати та деякі органічні кислоти. Хлорна кислота сприяє перетворенню проферменту *пепсиногену*, який секретується головними клітинами слизової оболонки шлунка, в активний протеолітичний фермент *пепсин*. Оптимальна концентрація водневих іонів для пепсину складає 1,5...2,5, що відповідає кислотності шлункового соку в процесі

травлення. Фермент каталізує розщеплення пептидних зв'язків у молекулі білка, утворених аміногрупами ароматичних і дикарбонових амінокислот. У результаті дії пепсину утворюються поліпептиди різної величини й окремі вільні амінокислоти. Крім пепсину, у шлунковому соку міститься протеолітичний фермент *гастриксин*, оптимальні значення рН якого знаходяться в межах 3,5...4,5. Гастриксин вступає в дію на останніх етапах перетравлення їжі в шлунку. У шлунку грудних дітей виявлений *сичуговий фермент – хімозин*. Оптимум дії цього ферменту відповідає рН 3,5...4,0. Під впливом хімозину в присутності солей кальцію казеїноген молока в ході гідролізу перетворюється в казеїн і молоко згортається. Подальший гідроліз поліпептидів відбувається у 12-палій кишці під впливом ферментів підшлункової залози – трипсина та хімотрипсина.

Трипсин знаходиться в соку підшлункової залози в неактивній формі, у вигляді проферменту *трипсиногену*. Його активація відбувається під дією ферменту кишкового соку – *ентерокінази*. Для процесу активування необхідні іони Ca^{2+} . Трипсин гідролізує як нерозщеплені в шлунку білки, так і високомолекулярні пептиди, діючи головним чином на пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами *аргініну або лізину та іншими амінокислотами*. Оптимум рН прояву активності для трипсину складає 7,0...8,0. Трипсин робить порівняно неглибокий гідроліз білка, утворює поліпептиди і невелику кількість вільних амінокислот.

Хімотрипсин – другий протеолітичний фермент підшлункової залози. Він також секретується в неактивній формі, у вигляді *хімотрипсиногену*. Під дією трипсину хімотрипсиноген переходить в активний фермент – хімотрипсин. Дія хімотрипсину подібна дії трипсину. Оптимум рН прояву активності для обох ферментів приблизно однаковий, хімотрипсин діє на білки і поліпептиди, що містять ароматичні амінокислоти (тирозин, фенілаланін, триптофан), а також на пептидні зв'язки, що не піддаються впливу трипсину (метіонін, лейцин).

Пептиди, що утворилися в результаті дії на білки пепсину, трипсину і хімотрипсину в нижніх відділах тонкої кишки, піддаються подальшому розщепленню. Цей процес здійснюють *карбоксипептидази та амінопептидази*. Ці ферменти відносяться до металоферментів. Вони активуються двовалентними іонами Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , що відіграють важливу роль у формуванні фермент-субстратного комплексу. Сік підшлункової залози містить фермент *еластазу*.

Еластаза – ендопептидаза, що також має широку субстратну специфічність, розщеплюючи пептидні зв'язки, що утворюються залишками амінокислот малого розміру – гліцину, аланіну, серину.

Таким чином, у результаті послідовної дії на білки протеолітичних ферментів у кишечнику утворюються вільні амінокислоти, що всмоктуються в кров через стінку кишечника.

Амінокислоти, що не всмокталися в кров через слизову оболонку тонкої кишки, піддаються впливу мікроорганізмів у товстому кишечнику. При цьому ферменти мікроорганізмів розщеплюють амінокислоти і перетворюють їх в аміни, жирні кислоти, спирти, феноли й інші речовини, нерідко отруйні для організму. Цей процес іноді називають *гниттям білків* у кишечнику. У його основі лежить декарбоксилювання амінокислот, при цьому з амінокислот утворюються біологічні аміни. Так, з амінокислоти *орнітину* утворюється *путресцин*, з *лізину* – *кадаверин*, які виводяться з організму з фекальними масами. У тих випадках, коли ці сполуки попадають у кров, вони виводяться із сечею в незміненому вигляді.

З тирозину утворюється крезол, а якщо процес йде далі, то і фенол; з триптофану – скатол і індол. Индол і скатол знешкоджуються в печінці при участі сірчаної і глюкуронової кислот. Однак вони попередньо окислюються: скатол у скатоксил, індол у індоксил і у вигляді парних кислот виводяться з організму із сечею.

При глибокому руйнуванні кишковими мікроорганізмами сірковмісних амінокислот – цистіну, цистеїну і метіоніну – утворюється сірководень (H_2S), меркаптан (CH_3SH) і інші сірковмісні сполуки.

Продукти гниття білків всмоктуються у венозну кров, потім потрапляють у печінку, де і знешкоджуються за допомогою сірчаної або глюкуронової кислоти.

Деякі отруйні речовини, наприклад бензойна кислота, що утворилася з фенілаланіну, знешкоджуються в печінці за допомогою гліцину. При цьому утворюється гіпурова кислота – нешкідлива сполука, що виділяється із сечею.

Знешкодження аміаку. У процесі перетворення амінокислот у тканинах утворюються їхні кінцеві продукти обміну – оксид карбогену, вода й аміак. Вода використовується організмом для забезпечення біохімічних процесів. Оксид карбогену частково виводиться з організму з видихуванням повітрям, інша його частина утилізується в процесах синтезу (наприклад, при синтезі жирних кислот, пуринових основ і т.д.). Аміак, що утворюється в результаті дезамінування амінокислот, є токсичною речовиною, збільшення його концентрації в крові й інших тканинах робить несприятливу дію, особливо на нервову систему. Токсичність аміаку обумовлена тим, що він сприяє відбудовному амінуванню α -кетоглутарової кислоти в мітохондріях. Це призводить до видалення її з циклу Кребса і, як наслідок, до падіння тканинного дихання і надлишкового утворення кетонових тіл з ацетил-КоА.

У процесі еволюції живі організми виробили різні ефективні механізми зі знешкодження токсичної дії аміаку, основними з яких є: утворення амінів – глутаміну або аспарагіну, відбудовне амінування, нейтралізація кислот, синтез сечовини.

Кінцевим результатом перетравлення білків є утворення вільних АК, що надходять в клітини слизової оболонки кишківника шляхом активного транспорту.

Велика частина вільних АК, що утворюються в результаті перетравлення білків, використовується для синтезу власних білків організму, частина – на синтез біологічно активних молекул: гормонів, біогенних амінів, а також нуклеотидів, гема, креатинфосфату і багатьох інших сполук, в тому числі глюкози в процесі глюконеогенезу.

Механізми всмоктування амінокислот у кишечнику. Всмоктування амінокислот через цитоплазматичну мембрану клітин тонкого кишечника відбувається за участю глутатіону (трипептиду γ -глутамініл-цистеїніл-гліцину) під дією ферменту γ -глутамілтрансферази, що міститься на клітинних мембранах слизової оболонки кишечника. Амінокислота утворює комплекс із глутатіоном, який проходить через мембрану; надалі цей комплекс розпадається на вільну амінокислоту і амінокислотопохідні глутатіону, з яких потім із залученням енергії трьох молекул АТФ регенерується глутатіон. Існує й інший механізм всмоктування амінокислот у тонкому кишечнику – а саме, їх симпорт із натрієм (вторинно-активний транспорт, який здійснюється за рахунок градієнту 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.

Найважливіший шлях перетворення АК в організмі – це реакції трансамінування з використанням α -кетокислот з утворенням нових (замінних) АК.

Ще один шлях метаболізму – декарбоксилювання АК з утворенням біологічно активних молекул – біогенних амінів. Основним коферментом обміну АК є піридоксальфосфат (ПФ).

Деградація АК відбувається шляхом їх дезамінування: безазотисті залишки можуть використовуватися для синтезу глюкози (глюконеогенез) або, перетворюючись в ацетил-КоА, окислюватися до вуглекислого газу і води з утворенням енергії (розрізняють глікогенні та кетогенні АК).

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 (рН = 1,5 – 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 їдкового натрію, що витрачається на нейтралізацію 100 мл відфільтрованого шлункового соку. Розрізняють наступні види кислотності: загальна кислотність, обумовлена сукупністю усіх кислореагуючих речовин (норма 40 – 60 титрувальних одиниць (титр. один.)); вільна НСІ, обумовлена наявністю вільної соляної кислоти (в нормі складає 20 – 40 титр. один.); зв'язана НСІ – соляна кислота, зв'язана з білками та продуктами їхнього перетравлення (в нормі складає 15 – 20 титр. один.). При підвищенні загальної кислотності і вільної НСІ кажуть про гіперацидний стан. Підвищена кислотність може вказувати на виразку шлунку і гіперацидний гастрит. Зниження загальної кислотності і вільної НСІ називають гіпоацидним станом, який зустрічається при гіпоацидному гастриті, а також при захворюванні на рак шлунку.

Лабораторна робота № 1 АНАЛІЗ СКЛАДУ І ВЛАСТИВОСТЕЙ ШЛУНКОВОГО СОКУ

1. Якісні реакції на вільну соляну кислоту в 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 звичайно користуються індикаторами: конго червоним (зони зміни забарвлення рН = 3,0 – 5,2), парадиметиламіноазобензолом (зона зміни забарвлення рН = 2,9 – 4,2).

Матеріальне забезпечення. 0,2 %-й розчин соляної кислоти, профільтрований шлунковий сік, 0,5 %-й спиртовий розчин парадиметиламіноазобензолу, пробірки, 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 ж реакцію виконують зі шлунковим соком. Синє забарвлення вказує на присутність вільної соляної кислоти. Кілька краплин 0,2 %-го розчину соляної кислоти наливають у пробірку та додають 1 – 2 краплини індикатора – 0,5 %-го спиртового розчину парадиметиламіноазобензолу. Спостерігається поява червоного забарвлення. Цю ж 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.

2. Якісна реакція на молочну кислоту у шлунковому соку.

Молочна кислота є патологічною складовою шлункового соку (наприклад, при захворювання на рак шлунку). Крім того, за відсутності соляної кислоти в шлунку розвиваються процеси бродіння (під дією мікроорганізмів), які також спричиняють утворення молочної кислоти. Реакція ґрунтується на взаємодії молочної кислоти з фенолятом заліза, який забарвлений у фіолетовий колір (фенолят заліза отримують впливом хлориду заліза (III) на фенол). В результаті реакції утворюється лактат заліза з зеленувато-жовтим кольором. Таке забарвлення з'являється лише тоді, коли в 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.

Матеріальне забезпечення. 1 %-й розчин молочної кислоти, профільтрований шлунковий сік, 0,2 %-й розчин соляної кислоти, 10%-й розчин хлорного заліза, 1 %-й розчин фенолу, штатив з пробірками, піпетки, крапельниці.

Хід роботи. До 15 мл 1 %-го розчину фенолу додають 4 – 5 краплин 10 %-го розчину хлорного заліза й 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.

3. Визначення загальної кислотності, вільної і 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.

Матеріальне забезпечення. Профільтрований шлунковий сік, 0,5 %-й спиртовий розчин парадиметиламіноазобензолу, 1 %-й спиртовий розчин фенолфталеїну, 0,1 н. розчин їдкого натру, колби, піпетки, крапельниці, бюретки для титрування.

Хід роботи. У колбу піпеткою наливають 10 мл відфільтрованого шлункового соку. Додають 1 – 2 краплини 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, рН = 2,9), далі продовжують титрування до лимонно-жовтого кольору (другий пункт, рН = 4,0), і, нарешті, продовжують титрування до появи рожевого забарвлення (третій пункт, рН = 8,0). Перший пункт відповідає вільній соляній кислоті, так як при рН = 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 мл 0,1 н. розчину їдкого натру, яку було витрачено на титрування, а по осі ординат – значення рН середовища. За графіком

знаходять числові значення для загальної кислотності, зв'язаної, вільної і загальної соляної кислоти. Потім перераховують отримані числа 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 пункту – 4,44 мл,

до третього пункту – 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 і зв'язаної соляної кислоти в дослідній пробі шлункового соку і отримані результати записують у зошит, роблять висновок про характер досліджуваного шлункового соку.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 2 ВИЗАЧЕННЯ 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.

Матеріальне забезпечення. 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, 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 в фосфатному буфері і 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 у 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 і дослідної проб, 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 і контрольної проб ($V_{\text{досл.}} - V_{\text{контр.}}$), у перерахунку на 1 мг ферменту:

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

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

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 3

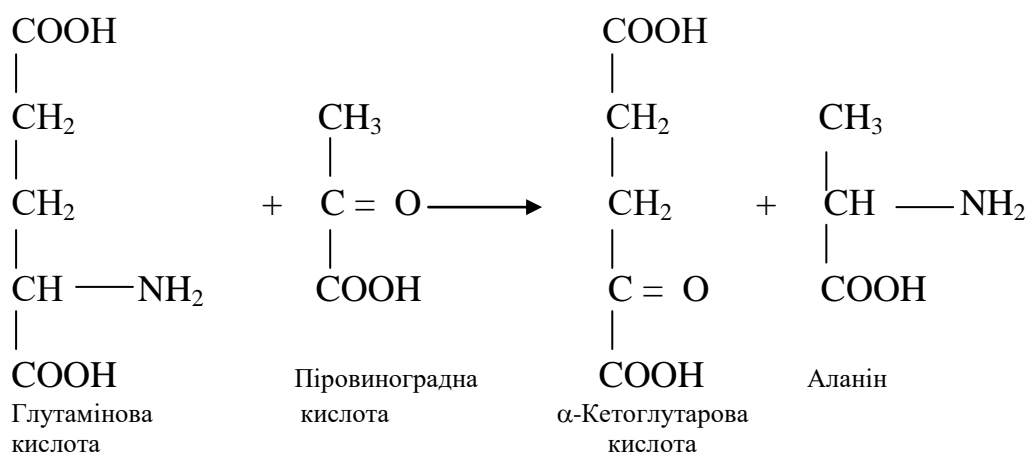
ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АСПАРТАТ- І АЛАНІНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

Трансамінування є одним з найважливіших шляхів перетворення амінокислот у тканинах тварин, рослин і в мікроорганізмів. Воно полягає в зворотному перенесенні аміногрупи від амінокислот на кетокислоту без проміжного звільнення аміаку. Реакції трансамінування протікають більш інтенсивно, коли одним із субстратів є дикарбонова аміно- чи кетокислота.

Процес переамінування каталізується ферментами, що одержали назву амінотрансфераз (трансаміназ), коферментом яких є піридоксальфосфат (фосфорне похідне вітаміну В₆). Оптимум дії амінотрансфераз лежить у слаболужному середовищі (рН = 7,5).

Переамінування протікає інтенсивно в печінці, м'язах, нирках, сім'яниках, серці й інших органах, де активність амінотрансфераз у нормі вище, ніж у крові. При ушкодженні деяких тканин ці ферменти вимиваються в кров, що призводить до різкого збільшення їхньої концентрації в крові.

Процес переамінування можна спостерігати на прикладі зворотнього перенесення аміногруп між глутаміноюю і піровиноградною кислотами. Реакція в цьому випадку протікає за наступною схемою:



Трансаміназні реакції між кетокислотами циклу трикарбонових кислот (2-оксоглутарова і оксалооцтова) і амінокислотами відіграють важливу роль у здійсненні взаємозв'язку між обміном амінокислот, ліпідів і вуглеводів.

Через трансамінування окислюється 80 % – 90 % глутамату в мітохондріях мозку і 70 % – у мітохондріях печінки. Найбільш вивченими і значущими є аспартатамінотрансфераза (L-аспартат: 2-оксоглутаратамінотрансфераза, КФ 2.6.1.1, АСТ) і аланін-амінотрансфераза (L-аланін: 2-оксоглутаратамінотрансфераза, КФ 2.6.1.2, АЛТ). Обидва ферменти є піридоксальфосфат-залежними і мають по дві форми, одна з яких знаходиться в цитоплазмі, інша – у мітохондріях.

Принцип методу: у результаті переамінування, що відбувається під дією аспартатамінотрансферази (чи аланінамінотрансферази), утворюються глутамінова і щавлевооцтова (відповідно, глутамінова і піровиноградна) кислоти. Щавлевооцтова кислота здатна в процесі ферментативної реакції перетворюватися в піровиноградну кислоту. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину в лужному середовищі в обох

випадках утворюється гідразон піровиноградної кислоти, інтенсивність кольору якого пропорційна активності ферменту.

Хід роботи. Визначення показників роблять, як правило, при використанні спеціальних тест-наборів відповідно до вказівок, що до них додаються. Тест-набори містять субстратно-буферні реактиви на аспартатамінотрансферазу (АСТ) і на аланінамінотрансферазу (АЛТ), розчин 2,4-динітрофенілгідрозина, розчин натрію піровинограднокислого для готування калібрувального розчину, розчин NaOH (останній у набори часто не входить). Підготовку, розведення і збереження робочих розчинів роблять за інструкцією, яка додається до даного тест-набору.

У випадку відсутності тест-наборів готуються наступні розчини:

1. Розчин субстрату для визначення АСТ, рН = 7,4. У мірну колбу на 100 мл вносять DL-аспарагінової кислоти – 2,66 мг; 2-оксоглутарової кислоти – 29,2 мг. Після розчинення в невеликому об'ємі дистильованої води, додають 1 Н розчин їдкого натру – 21 мл; двузаміщеного фосфорнокислого натрію ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) – 1,2 г; однозаміщеного фосфорнокислого калію (KH_2PO_4) – 0,2 г. Вміст колби доливають дистильованою водою до 2 / 3 її об'єму. Перевіряють рН за допомогою рН-метра. При даному способі готування субстратного розчину часто одержують більш кислі значення рН, ніж потрібно. У цьому випадку доводять рН до 7,4, додаючи по краплях 1 н. розчин NaOH. Потім об'єми доводять дистильованою водою до 100 мл.

2. Розчин субстрату для визначення АЛТ, рН = 7,4. У мірну колбу на 100 мл вносять DL-аланіну – 1,78 мг; α -кетоглутарової кислоти – 29,2 мг. Після розчинення в невеликому об'ємі дистильованої води, додають 1 Н розчин їдкого натру – 21 мл; двузаміщений фосфорнокислий натрій ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) – 1,2 г; однозаміщений фосфорнокислий калій (KH_2PO_4) – 0,2 г. Вміст колби доливають дистильованою водою до 2 / 3 її об'єму. Перевіряють рН за допомогою рН-метра. У разі потреби доводять рН до 7,4, додаючи по краплях 1 н розчин NaOH. Потім об'єми доводять дистильованою водою до 100 мл.

Приготовлені субстратні розчини для АСТ і АЛТ розливають по 5 – 10 мл у невеликі флакони і зберігають у замороженому стані в морозильній камері холодильника.

Примітка. Якщо замість DL-амінокислот беруть L – ізомерні сполуки, то їх наважки зменшують удвічі.

3. Розчин 2,4-динітрофенілгідрозина (2,4-ДНФГ). 19,8 мг 2,4-ДНФГ розчиняють у 8,5 мл концентрованої соляної кислоти при нагріванні на киплячій водяній бані під витяжною системою. Після остигання розчину його кількісно переносять у мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм дистильованою водою до мітки. Розчин готовий до використання на другий день після приготування. Зберігають розчин у посуді з темного скла в холодильнику. Придатний протягом 1 року.

4. 0,4 н. розчин їдкого натру. 16 г їдкого натру поміщають у хімічну склянку і розчиняють у невеликій кількості дистильованої води. Після остигання розчину його кількісно переносять у мірну колбу на 1 л і доводять об'єм водою до мітки.

5. Стандартний розчин піровинограднокислого натрію. 11 мг кристалічного пірувату натрію (білого кольору) поміщають у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у невеликій кількості дистильованої води, потім доводять обсяг розчину до мітки водою. 1 мл розчину містить 110 мкг пірувату натрію, що відповідає 88 мкг піровиноградної кислоти. Розчин використовується для побудови калібрувального графіка.

Проведення аналізу. Аналіз проводять у відповідності зі схемою, представленою в таблиці.

Відміряти в кювету	Макроаналіз		Мікроаналіз	
	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Субстратно-буферний реактив	0,4	0,4	0,1	0,1

Інкубують 5 хв при 37 °С

Сироватка крові	0,08	0,08	0,02	0,02
2,4-динітрофеніл-гідразин	-	0,4	-	0,1

Інкубують 60 хв при 37 °С

2,4-динітрофеніл-гідразин	0,4	-	0,1	-
---------------------------	-----	---	-----	---

Витримують 20 хв (АЛТ) або 60 хв (АСТ) при кімнатній температурі

Розчин NaOH, 0,4 н.	4	4	1	1
---------------------	---	---	---	---

Проби витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби проти холостої на фотоколориметрі (світлофільтр № 6) або спектрофотометрі при 500 – 560 нм (кювета з товщиною оптичного шару 10 мм).

Розрахунок активності фермента в сироватці крові роблять по калібрувальному графіку.

Побудова калібрувального графіка

Відміряти в пробірці	Калібрувальні точки					Конт-роль
	1	2	3	4	5	
Дист. вода, мл	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,60
Калібрувальний розчин пірвату натрія, мл	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	-
Р-н 2,4-динітрофенілгідразина, мл	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Витримують 20 хв при кімнатній температурі						
Р-н 0,4 н. NaOH, мл	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Проби витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби проти холостої на фотоколориметрі або спектрофотометрі при 500 – 560 нм (кювета з товщиною оптичного шару 10 мм).

Вміст пірвіноградної кислоти в калібрувальній пробі, мкмоль	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,0
Мкг	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	0,0
Активність в мкмольях пірвіноградної кислоти на 1 мл сироватки за 1 годину інкубації	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	0,0

Примітки:

1. Сироватка не повинна бути гемолізованою. При збереженні сироватки в холодильнику активність ферменту не знижується протягом 1 – 2 діб.

2. Лінійність калібрувального графіка зберігається до величини екстинкції 0,35. При одержанні більших значень екстинкції, сироватку необхідно розбавити інактивованою сироваткою або 3 % розчином альбуміну, приготовленому на фізіологічному розчині. Отримані результати помножити на коефіцієнт розведення.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

ШЛЯХИ ОБМІНУ АМІНОКИСЛОТ

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 N5-, N10-метилентетрагідрофолієву кислоту. Реакція є зворотною та 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).

Особливості обміну аргініну. Аргінін бере участь у біосинтезі тканинних білків, сечовини в печінці, агматину (ця реакція відбувається лише в кишечнику під дією декарбоксілаз 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 запасується у вигляді макроергічної сполуки креатинфосфату. Під час роботи м'язів у першу чергу використовується енергія макроергічного зв'язку креатинфосфату. Фосфорилування креатину каталізується ферментом креатинкіназою (КК). Молекула цього ензиму складається із 2-х субодиниць М- або В-типу (від muscle – м'яз, brain – мозок). В організмі наявні три ізоферменти КК: КК3 (або ММ) характерний для скелетних м'язів, КК2 (або МВ) – для міокарда, КК1 (або ВВ) – 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 годин), а ВВ-ізоформи – при важкому шоку, деяких карциномах, ураженнях мозку.

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 в реакціях трансметилування (синтез креатину, утворення холіну з етаноламіну, адреналіну з норадреналіну, метилування азотвмісних основ), але не у вільному вигляді, 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 – та коферменту піридоксальфосфату. Гомоцистинурія – захворювання, що проявляється розумовою

відсталістю – пояснюється вродженою недостатністю ферменту цистатіонін-β-синтази (рідше – гомоцистеїнметилтрансферази), а також нестачею вітамінів В₆, В₁₂ та фолієвої кислоти. Недостатність цистатіонін-β-ліази або надмірна активність цистатіонін-β-синтази є причинами іншого розладу – цистатіоніурії. Інші порушення обміну сірковмісних амінокислот спричинені ушкодженням функцій транспортних систем, що здійснюють їх реабсорбцію у ниркових канальцях. Так, за цистинурії цистин виділяється із сечею внаслідок повного блокування реабсорбції цистину та часткового – орнітину, лізину й аргініну. Оскільки цистеїн і його похідне 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 в канальцях нирок. За цього розладу цистинові камені не утворюються, проте кристали цистину накопичуються в тканинах (кістковому мозку, селезінці, печінці, рогівці, ретикуло-ендотеліальній системі тощо). Внаслідок посилення екскреції із сечею цистину і цистеїну (в 20 – 30 разів) та інших амінокислот (в 5 –10 разів) ці амінокислоти втрачаються, і порушується біосинтез білка. Цистеїн використовується в організмі на синтез тканинних білків, цистину, серину. Обмін цистеїну в організмі проходить за двома основними шляхами: по прямому окисному (цистеїнсульфінатному) та по шляху переамінування. В результаті утворюються:

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

Особливості обміну фенілаланіну та тирозину. У здорових людей майже весь фенілаланін, який не був використаний для синтезу білка, перетворюється у печінці на тирозин під дією 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 ДОФА-аміну стає попередником катехоламінів, при окисненні тирозиназою до ДОФА-хінону – попередником меланінів, а у щитоподібній залозі – тиреоїдних гормонів. 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 і ацетоацетату (фермент фумарилацетоацетатгідролаза). Таким чином, у результаті обміну фенілаланіну й тирозину утворюються:

- 1) пара-оксифенілаланін;
- 2) гомогентизинова кислота;
- 3) фумарилацетоацетатова кислота;
- 4) фумарат, який надходить до ЦТК;
- 5) ацетоацетат, що стає попередником ацетил-КоА, який надходить до ЦТК;
- 6) меланін;

7) катехоламіни: ДОФ-амін, норадреналін, адреналін.

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

Особливості обміну триптофану. Триптофан є попередником серотоніну і нікотинової кислоти, яка синтезується у вигляді НАД. 95 % триптофану метаболізується за кінуреніновим шляхом – спершу триптофан окиснюється (фермент триптофанпіролаза) до формілкінуреніну, з якого надалі утворюються кінуренін та 3-оксикінуренін. Далі під впливом кінуренінази (кофермент піридоксальфосфат) із 3-оксикінуреніну утворюються аланін і 3-оксиантранілова кислота; із останньої через низку реакцій синтезується НАД⁺. Через уроджену недостатність ферментів цього метаболічного шляху гальмується перетворення триптофану на формілкінуренін, внаслідок чого порушується синтез НАД⁺ із одночасним розвитком пелагроподібних станів та накопиченням проміжних сполук кінуренінового шляху. Деякі з них – 3-оксикінуренін, ксантуренова та 3-оксиантранілова кислоти – при підвищенні їх вмісту здійснюють патогенні впливи. Ксантуренова кислота сприяє розпаду глікогену та гіперглікемії; при тривалому підвищенні її вмісту спостерігаються дегенеративні зміни в β-клітинах підшлункової залози. Деякі з метаболітів 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 декарбоксілювання перетворюється на серотонін. Останній в організмі перетворюється на оксиіндолілацетат, що виділяється із сечею. При захворюванні на карциноїдну пухлину понад 60 % триптофану окиснюється за серотоніновим шляхом, що веде до підвищення екскреції із сечею оксиіндолілацетату, зменшення пулу триптофану і супроводжується пелагроподібними проявами – діареєю, дерматитами, деменцією (через послаблення кінуренінового шляху). Ще один шлях обміну триптофану відбувається виключно у товстому кишечнику, де під впливом ферментів кишкової мікрофлори в процесі гниття білків у кишечнику з нього утворюються токсичні сполуки індол і скатол. Хвороба Хартнупа – вроджене порушення всмоктування триптофану в кишечнику та реабсорбції його у нирках внаслідок 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. Таким чином, 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⁺.

Особливості обміну розгалужених амінокислот. Шлях обміну амінокислот із розгалуженими ланцюгами (лейцин, валін, ізолейцин) відбувається у три стадії. Внаслідок першої реакції – трансамінування (фермент – специфічна трансаміназа,

кофермент В₆) – утворюються відповідні кетокислоти; друга стадія – окисне декарбоксілювання – потребує залучення мультиферментного мітохондріального комплексу – дегідрогенази розгалуджених α -кетокислот і завершується утворенням ацил-КоА-тіоефірів. Внаслідок наступної реакції дегідрогенування, яку здійснюють ферменти, подібні до ФАД-залежної ацил-КоА-дегідрогенази нерозгалуджених жирних кислот, ацил-КоА-тіоефіри перетворюються на α -, β -еноїл-ацил-КоА-тіоефіри. Останні через низку перетворень стають попередниками ацетоацетату й ацил-КоА (у випадку метаболізму лейцину) або сукциніл-КоА (при перетвореннях валіну й ізолейцину). Спадковий дефект гену, що відповідає за синтез дегідрогенази розгалуджених α -кетокислот, викликає розвиток кетоацидурії кислот із розгалудженим ланцюгом. За цього розладу в крові й у внутрішніх органах накопичуються ці амінокислоти і відповідні їм кетокислоти; сеча набуває специфічного запаху кленового сиропу, з чим пов'язана інша назва цієї патології – хвороба кленового сиропу. Хвороба супроводжується затримкою загального розвитку та важкими психічними порушеннями.

Лабораторна робота № 4 **ЕКСПРЕС-МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ПІДВИЩЕНОГО ВМІСТУ** **ФЕНІЛАЛАНІНУ В КРОВІ (ЗА ЛЕВІНИМ)**

Метод заснований на хроматографічному визначенні підвищеного вмісту (від 0,07 г / л і вище) фенілаланіну в мінімальному об'ємі крові. Цей метод може використовуватися для ранньої діагностики фенілкетонурії, важкого спадкового захворювання, пов'язаного з порушенням обміну фенілаланіну. У нормі обмін фенілаланіна здійснюється шляхом його гідроксилювання з утворенням тирозину.

При фенілкетонурії порушене перетворення фенілаланіну в тирозин внаслідок відсутності в організмі специфічного ферменту – фенілаланінгідроксилази, обмін у цьому випадку йде побічним шляхом, зокрема, шляхом трансамінування, що призводить до утворення фенілпірвіноградної кислоти, яка виводиться із сечею у великих кількостях (до 1,5 г / л і вище).

Порушення обміну фенілаланіна, що спостерігається при уродженому слабоумстві (фенілпірвіноградна олігофренія), пов'язано з високим вмістом фенілаланіна в крові (0,15 – 0,4 г / л). Тому визначення фенілаланіну в крові є надійним діагностичним тестом, особливо для виявлення фенілкетонурії в немовлят і дітей перших 2 місяців. Метод радіальної хроматографії дозволяє розділити амінокислоти сироватки чи плазми крові значно швидше, ніж звичайна хроматографія на папері.

Хід роботи. У змочену розчином гепарину чи цитрату натрію мікропробірку вносять 3 – 4 краплі досліджуваної крові і центрифугують 2 хв при 2000 – 2500 об. / хв. Плазму, що утворилася (її можна одержати також відстоюванням), у кількості 0,02 мл наносять мікропіпеткою в центр диска з хроматографічного паперу і висушують на повітрі протягом 10 хв.

Диск поміщають у чашку Петрі, у яку попередньо наливають 10-15 мл розчинника (суміш: бутанол – уксусна кислота – вода у співвідношенні 1 : 1 : 2). Розподіл проводять поки фронт розчинника не пройде відстань, рівну приблизно 5 см. Потім хроматограму сушать у сушильній шафі при 80 °С, виявляють розчином нінгідрину, злегка підсушують на повітрі і знову поміщають у сушильну шафу на 10 хв.

Паралельно дослідній пробі ставлять 2 контрольних стандарти:

1) із плазмою (0,02 мл) свідомо здорової дитини, що містить приблизно 0,01 г / л фенілаланіну;

2) з цією ж плазмою, на висушену пляму якої наносять 0,02 мл стандартного розчину фенілаланіна з концентрацією 0,06 г / л. Концентрація цього стандарту відповідає, таким чином, 0,07 г / л фенілаланіну, і зразки досліджуваної плазми, що дають забарвлення такої ж чи більшої інтенсивності, вважаються позитивними.

У стандарті № 1 (норма) результат негативний, тому що вміст фенілаланіна тут нижче 0,07 г / л: забарвлюється тільки пляма нанесеної плазми і невелика навколишня його частина.

У стандарті № 2 і в пробах, узятих у хворих фенілкетонурією, виявляється чіткий ореол фенілаланіну, відділений просвітом від центрального ядра.

У випадку позитивної проби доцільно проводити ідентифікацію фенілаланіна повторним хроматографуванням. Найбільш близькі до фенілаланіну по рухливості амінокислоти – лейцин, валін, метіонін – забарвлюються нінгидрином у лілово-червоний колір, що при нагріванні хроматограми переходить в помаранчово-рожеві тони, у той час як фенілаланін має стійке синьо-фіолетове забарвлення.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 5 **КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГІДРОКСИПРОЛІНУ** **(ОКСИПРОЛІНУ) В СЕЧІ**

Гідроксипролін – це амінокислота білків сполучної тканини. Зокрема, вона складає 12 – 14 % амінокислотного складу колагену і 1 – 2 % – еластину. Вміст гідроксипроліну в сечі й крові характеризує інтенсивність катаболізму колагену. В нормі в людини віком 10 – 20 років виділяється із сечею 422 – 610 мкмоль/добу, а в людей 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 гідроксипроліноксидази, залученого у обміну 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.

Матеріальне забезпечення. 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), водяна баня, ФЕК, кювети завтовшки 10 мм, пробірки, піпетки, лійка, фільтрувальний папір.

Хід роботи. Беруть 3 пробірки: у першу відміряють 1 мл профільтрованої сечі (дослід), у другу – 1 мл стандартного розчину гідроксипроліну, у третю – 1 мл дистильованої води (контроль). У 3 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 при кімнатній температурі, після чого нагрівають протягом 3 хв на киплячій водяній бані для видалення

надлишку пероксиду водню, після чого пробірки охолоджують водою з крану. У пробірки додають по 4 мл 3 н. розчину сірчаної кислоти і по 2 мл реактиву Ерліха і ставлять на 5 хв у киплячу водяну баню, охолоджують водою з-під крану і колориметрують при довжині хвилі 500 – 560 нм (зелений світлофільтр) проби досліду й стандартного розчину проти контролю у кюветах завтовшки 10 мм.

Вміст гідроксипроліну розраховують за формулою:

$$X = C_{\text{ст}} \times E_{\text{досл}} \times V_{\text{доб}} / E_{\text{ст}} \times V_{\text{досл}},$$

де

X – вміст гідроксипроліну в добовій сечі, мг / добу

C ст – концентрація стандартного розчину гідроксипроліну;

E досл – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

E ст – оптична щільність стандартного розчину, од. опт. щільності;

V доб – добовий об'єм сечі, мл;

V досл – об'єм сечі, взятої для аналізу, мл.

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

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 6 **КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ В СЕЧІ** **ФЕРМЕНТАТИВНИМ УРЕАЗНИМ / ФЕНОЛ-ГІПОХЛОРИТНИМ** **МЕТОДОМ**

Сечовина – основний кінцевий продукт обміну білків в організмі людини. На частку сечовини доводиться 80 – 90 % азоту, що виділяється з сечею.

Біологічна роль синтезу сечовини в печінці (орнітиновий цикл сечоутворення Кребса) полягає в зв'язуванні утвореного при дезамінуванні амінокислот аміаку і переведенного в малотоксичну молекулу сечовини, яка потім виводиться із сечею.

Знаючи кількість екскретованої за добу сечовини і кількість азоту, що надходить з їжею, можна обчислити баланс азоту, який є важливим показником стану білкового і амінокислотного обміну.

Баланс азоту може бути:

- 1) позитивним – у дітей, у видужуючих після важкої хвороби;
- 2) негативним – при важких захворюваннях, в тому числі онкологічних, при голодуванні і в похилому віці;
- 3) рівним нулю (азотна рівновага) – у здорових дорослих людей (при нормальному харчуванні).

Будь-яке підвищення білкового обміну, процеси інтенсивного розпаду білка (пухлини, гіпертиреоз, діабет) супроводжуються посиленням сечоутворення і збільшенням кількості сечовини, що виділяється з сечею за добу.

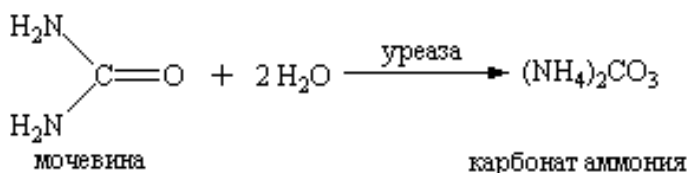
Патологічні зміни печінки, що призводять до її функціональної недостатності, а, отже, порушення синтезу сечовини, супроводжуються зниженням кількості сечовини в крові і сечі.

Функціональна недостатність нирок призводить до зниження кількості сечовини в сечі і одночасного підвищення її вмісту в крові (уремія).

Деякі форми діабету, які характеризуються підвищеним апетитом і прогресуючим схудненням хворого, супроводжуються підвищенням виділення сечовини з сечею за рахунок посиленого розпаду білків.

Мета роботи: визначити вміст сечовини в сечі.

Принцип методу: ферментативний метод заснований на реакції розщеплення молекули сечовини під дією високоспецифічного ферменту - уреази – до аміаку і вуглекислого газу, які у водному розчині утворюють карбонат амонію.



Іони амонію в присутності нітропрусида натрію реагують з фенолом і гіпохлоритом натрію. В результаті реакції утворюється індофенол (синього кольору), інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації іонів амонію (і, відповідно, сечовини).

Хід роботи. Для дослідження беруть такі проби (3 промарковані пробірки): дослід (розведена сеча), стандарт (стандартний розчин сечовини 0,03 г / л) і контроль (вода). Всі реактиви вносять, згідно з описом в таблиці:

Реактиви та етапи	Дослід	Стандарт	Контроль
Сеча 1 : 1000, мл	0,1	—	—
Стандарт 0,03 г / л, мл	—	0,1	—
Вода дистильована, мл	—	—	0,1
Розчин уреази, мл	0,1	0,1	0,1
Перемешують, інкубують 5 хвилин при 20°C.			
Фенол + нітропрусид натрію, мл	1,0	1,0	1,0
Лужний розчин гіпохлориту натрію, мл	1,0	1,0	1,0
Вода дистильована, мл	1,0	1,0	1,0
Перемешують, інкубують 15 хв при 37°C.			
Фотометрують проти H ₂ O (λ = 540 нм, товщина кювети 0,5 см). D ₅₄₀			
Dд - Dк			
Dс - Dк			

Розрахунок за стандартом сечовини

$$m(\text{сечовини}) = \frac{(Dд - Dк) \cdot 0,03 \cdot 1000 \cdot 1,5}{Dст - Dк} \text{ г (за добу)}.$$

Знаючи масову частку (ω) азоту в сечовині, $\omega(\text{N}) = \frac{2 \cdot 14}{60} = 0,47$,

де 60 – відносна молекулярна маса сечовини (Mr); 14 – відносна атомна маса азоту

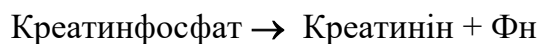
$$m(\text{N}) = m(\text{сечовини}) \cdot 0,47 \text{ г (за добу)}.$$

За нормальним станом маса азоту складає 12 – 17 г / добу, маса сечовини – 25 – 35 г / добу.

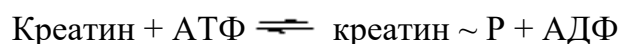
Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 7 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНІНУ В СЕЧІ

Креатинін є одним з кінцевих продуктів азотистого обміну (5 % від загального азоту сечі). Він утворюється в м'язовій тканині з креатинфосфату.



У свою чергу креатинфосфат синтезується з креатину в реакції, що каталізується креатинкіназою (креатинфосфокіназа, КФК) за участю АТФ.



Ця реакція оборотна і утворення АТФ в зворотній реакції є екстремим механізмом забезпечення енергією для м'язового скорочення.

У нормі з сечею виділяється лише креатинін. Поява креатину в сечі (креатинурія) свідчить про захворювання печінки, нирок, цукровому діабеті, ендокринних розладах (гіпертиреоз, адисонова хвороба, акромегалія та ін.), інфекційних захворюваннях. Винятком є поява креатину в сечі у підлітків і у вагітних жінок.

Гіперкреатинінурія з одночасною креатинурією має місце при патології поперечносмугастих м'язів: міозит, міастенія, дистрофія. Гіпокреатинінурія спостерігається при хронічному нефриті, м'язовій атрофії після перенесених інфекцій, в похилому віці.

Мета роботи: визначити вміст креатиніну в сечі.

Принцип методу: кількісне визначення креатиніну в сечі (за Фоліном) заснований на кольоровій реакції з пікриновою кислотою. Інтенсивність такого забарвлення пікрату креатиніну, що вимірюється на фотоелектроколориметрі з зеленим світлофільтром (540 нм), прямо пропорційна концентрації креатиніну, яку визначають за калібрувальним графіком.

Хід роботи.

Реактиви, етапи	Дослід
NaOH, 10 % розчин, мл	1,0
Пікринова кислота (насичений р-н), мл	1,5
H ₂ O дистильована, мл	—
Сеча, мл	1,0
Инкубують при 20°C 5 хв	
Доводять дистильованою водою до мітки в мірній колбі на 50 мл	
Перемішують	
Фотометрують дослідну і контрольну проби проти води ($\lambda=540$ нм, товщина кювети 1 см), D_{540}	
Dд – Dк	

Для побудови калібрувального графіка використовують стандартний розчин біхромата калію ($K_2Cr_2O_7$).

Дослідним шляхом знайдено, що оптична щільність 0,17 М розчину $K_2Cr_2O_7$ відповідає оптичній щільності продукту, що утворюється в результаті реакції взаємодії креатиніну (концентрація 2 мг / мл) з пікриною кислотою в лужному середовищі.

З вихідного розчину 0,17 М біхромату калію готують ряд розведень: в 4 мірні пробірки відбирають відповідно 1, 2, 3 і 5 мл вихідного розчину і всі проби доводять водою до кінцевого об'єму – 5 мл.

Визначають оптичну щільність отриманих розчинів при 540 нм в кюветі товщиною 1 см проти води. З отриманих значень оптичної щільності калібрувальних розчинів віднімають D_k і на підставі отриманих результатів будують графік залежності оптичної щільності від концентрації креатиніну. Для цього на осі абсцис відкладають кількість мілілітрів біхромату калію, відповідні концентрації креатиніну (0,4; 0,8; 1,2 і 2 мг / мл, відповідно). На осі ординат – величину оптичної щільності ($D_{540} - D_k$). Отриману величину ($D_d - D_k$) відкладають на графіку і знаходять концентрацію креатиніну в сечі (С мг / мл). Потім розраховують масу креатиніну в сечі:

$$m \text{ (креатиніну)} = \frac{C \text{ мг / мл} \cdot 1500}{1000} \text{ г / добу}$$

У нормі у чоловіків кількість креатиніну складає: 1 – 2 г / добу (8,8 – 17,6 ммоль / добу), у жінок – 0,6 – 1,5 г / добу (5,3 – 13,2 ммоль / добу).

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Контрольні питання

1. Як відбувається розщеплення білків у шлунково-кишковому тракті?
2. Надати характеристику ферментам, які беруть участь у перетравленні білків.
3. Які отруйні речовини утворюються в товстій кишці?
4. Як відбувається знешкодження отруйних речовин у печінці?
5. Яким перетворенням піддаються амінокислоти в тканинах?
6. Як і де утворюються біологічно активні аміни?
7. Назвіть кінцеві продукти білкового обміну, що містяться в тканинах.
8. Як відбувається знешкодження аміаку?
9. Поняття про біологічну цінність білків. Роль білка в харчуванні. Замінні і незамінні амінокислоти.
10. Які умови необхідні для перетравлення білків у шлунку?
11. Які ферменти і в яких умовах перетравлюють білки в пептиди?
12. Загальні шляхи перетворення амінокислот в тканинах.
13. Дезамінування амінокислот. Механізми окисного дезамінування.
14. Шляхи перетворення безазотистого залишку амінокислот. Глікогенні і кетогенні амінокислоти.
15. Трансамінування амінокислот. Ферменти і коферменти трансамінування.
16. Трансдезамінування і трансреамінування. Діагностичне значення визначення амінотрансфераз в сироватці крові.
17. Реакції гідроксилування і декарбоксілювання ароматичних амінокислот.

18. Що таке декарбоксілювання?
19. Яка хімічна природа ферментів, що беруть участь у декарбоксілюванні?
20. Декарбоксілювання амінокислот. Утворення біогенних амінів і їх біологічна роль. Розпад біогенних амінів. Моноамінооксидази.
21. Шляхи утворення аміаку в організмі. Біосинтез сечовини.
22. Особливості обміну гліцину і серину.
23. Особливості обміну сірковмісних амінокислот.
24. Особливості обміну аргініну.
25. Особливості обміну дикарбонових амінокислот.
26. Особливості обміну фенілаланіну і тирозину.
27. Синтез креатину. Креатинфосфат. Кількісне визначення креатиніну в сечі.

РОЗДІЛ 2. ОБМІН НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Нуклеїнові кислоти входять до складу клітин у вигляді складних нуклеопротеїнових комплексів. Останні можуть надходити в організм із продуктами харчування. У шлунку під дією соляної кислоти і пепсину вони розщеплюються на прості білки і нуклеїнові кислоти. Соляна кислота розриває зв'язки між нуклеїновою кислотою і білками (гістаміни і протаміни), а інші, більш стійкі зв'язки при рН шлункового соку (1,5...2,5), розщеплює, головним чином, пепсин.

Нуклеїнові кислоти під впливом ферментів підшлункової залози і тонкого кишечника – *нуклеаз* – розпадаються до *мононуклеотидів*. Останні під дією ферментів кишкового соку втрачають фосфорну кислоту і перетворюються в *нуклеозиди*. Далі нуклеозиди під дією *нуклеозидаз* розпадаються на складові частини – *азотвмісні основи і пентози*. Однак нуклеозидази тонкого кишечника недостатньо активні і не можуть забезпечити розщеплення всієї маси нуклеотидів. У зв'язку з цим у кров всмоктуються в основному мононуклеотиди і нуклеозиди, що піддаються специфічним перетворенням у тканинах.

Тканинні нуклеїнові кислоти під дією нуклеаз розщеплюються до мононуклеотидів, а потім до азотвмісних основ, пентоз і фосфорної кислоти.

Фосфорна кислота бере участь у фосфорилуванні, а також у буферних системах, синтезі фосфоліпідів, фосфопротейдів, АТФ і інших сполук. З організму виводиться переважно у виді кислих солей натрію разом із сечею.

Пентози можуть окислюватися до CO_2 і H_2O або використовуватися для синтезу глюкози, нуклеотидів.

Лабораторна робота № 8 ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА СКЛАДОВІ ЧАСТИНИ НУКЛЕОПРОТЕЇНІВ

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

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 нуклеопротейнів: поліпептиди, пуринові та піримідинові азотвмісні основи, рибозу, дезоксирибозу і фосфатну кислоту.

Біуретова проба на поліпептиди

Принцип методу. Біуретова реакція характерна для сполук, 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.

Срібна проба на пуринові основи

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

Матеріальне забезпечення. Гідролізат дріжджів, концентрований 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.

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 (аргентум, купрум, вісмут та інші). Метали у цій реакції відновлюються з одночасним розривом вуглеводного 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 $\text{Cu}(\text{OH})_2$, 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).

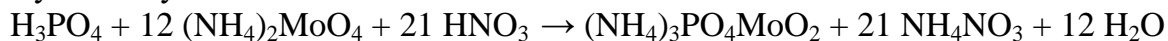
У висновку звертається увага на те, що рибоза окислюється, а гідрат окису міді відновлюється до закису міді.

Молібденова проба на фосфатну кислоту

Принцип методу. Фосфати у кислому середовищі утворюють з молібдатами забарвлені фосфатно-молібденові комплекси.

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'яють 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. Молібденова проба на фосфатну кислоту:



У висновку акцентується увага на утворенні комплексної сполуки амонію фосфатномолібденового.

Результати дослідження 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	

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 азотвмісних основ широко застосовуються у практичній медицині. Так, меркаптопурин має антилейкемічну активність, що зумовлена його біологічною активністю як антиметаболіта 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.

Лабораторна робота № 9 ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ РИБОНУКЛЕАЗИ ЗА КИСЛОТОРОЗЧИННИМИ ПРОДУКТАМИ РОЗПАДУ РНК МЕТОДОМ ШНЕЙДЕРА І ХОГЕБУМА

Активність РНК-ази в цьому методі визначається шляхом вимірювання екстинкції розчину продуктів ферментативного розпаду РНК. Таким чином можна виміряти активність РНК-ази у гомогенаті тваринної тканини.

Матеріальне забезпечення. 0,02 М розчин сукцинатного буферу (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, 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 буферу (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 і 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, в яку субстрат вносять після осадження. Різниця екстинкцій між дослідною і контрольною пробами є показником активності РНКаз за даних умов.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 10

ТУРБІДИМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ РИБОНУКЛЕАЗИ

Даний підхід базується на реакції між РНК, що є поліелектролітом, і підкисленим сироватковим альбуміном. При цьому утворюється каламуть, ступінь якої пропорційна довжині молекули РНК.

Матеріальне забезпечення. 0,04 – 0,06 %-й розчин дріжджової РНК в 0,13 М розчині хлориду натрію, гідрофосфат натрію, 0,3 мг сироваткового альбуміну, розчиненого в 1 мл 0,1 М розчину ацетатного буферу (рН = 4,0), желатина, кристалічний препарат РНКаз, 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 розчину альбуміну. Стабілізують каламуть додаванням до кожного 1 мл суміші 1 мг желатини. 2. Попередньо будують стандартну криву для кристалічного препарату РНК-ази, 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 РНКаз (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 про активність РНК-ази.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 11

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗИ ЗА КИСЛОТОРОЗЧИННИМИ ПРОДУКТАМИ РОЗПАДУ ДНК

Визначення активності ДНК-аз, як і у випадку з РНК-азами, проводять за кількістю кислоторозчинних продуктів гідролізу ДНК. Кількість цих олігонуклеотидних фрагментів можна визначити за фосфорним або дезоксирибозним компонентами.

Метод Шнейдера і Хогебума

Матеріальне забезпечення. 0,02 М розчин сукцинатного буферу (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, 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 буферу (рН = 4,5) додають 0,3 мл тканинного гомогенату в тому ж 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 ДНК-ази. Розрахунок ДНК-азної активності гомогенату тканини й отриманий результат записують у зошит.

Метод Алфрея і Мирського

Матеріальне забезпечення. Тканина для дослідження, холодний 0,14 М розчин хлориду натрію, розчин високополімерної ДНК (3 – 4 мг), 0,2 М розчин ацетатного буферу (рН = 5,0), 3,6 М розчин трихлороцетової кислоти (ТХО), реактиви для визначення вмісту кислоторозчинних продуктів за кольоровою реакцією на дезоксирибозу, 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 буферу (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. В 0,5 – 1,5 мл надосадової рідини визначають вміст кислоторозчинних продуктів за кольоровою реакцією на дезоксирибозу. Активність ДНКаз виражають у міліграмах дезоксирибози кислоторозчинних продуктів, які вивільнюються за час інкубації. Розрахунок ДНК-азної активності гомогенату тканини й отриманий результат записують у зошит.

Лабораторна робота № 12 **КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ** **В СИРОВАТЦІ КРОВІ**

Сечова кислота є кінцевим продуктом катаболізму аденозину і гуанозину (пуринового обміну). Виводиться з організму нирками з сечею і в меншій мірі через шлунково-кишковий тракт. Будучи слабкою кислотою, сечова кислота присутня в біологічних рідинах як в недисоційованій формі, так і у вигляді мононатрієвої солі. Погано розчиняється у воді.

Роль сечової кислоти в патології пов'язана з її низькою розчинністю. Сечова кислота осаджується у вигляді кристалів урату натрію. Відкладення цих кристалів в суглобах викликає подагру. Сечова кислота може відкладатися в нирках у вигляді каменів.

Гіперурекемія спостерігається при надмірному споживанні їжі, що містить нуклеотиди; при посиленому синтезі пуринових нуклеотидів; при вроджених порушеннях резервних «шляхів порятунку» аденіну і гіпоксантину (синдром Леша-Нихана і здебільшого внаслідок порушення ниркової екскреції з сечею.

Принцип методу базується на здатності сечової кислоти відновлювати фосфатно-вольфраматний реактив (реактив Фоліна) з утворенням сполук, інтенсивність забарвлення яких пропорційна концентрації цієї кислоти.

Хід роботи. У центрифужну пробірку вносять по 1,5 мл сироватки крові, води і 20 % розчину ТХО. Перемішують, через 5 хв центрифугують 10 хв при швидкості 3000 об. / хв. Беруть дві чисті градуйовані пробірки (дослідну і стандартну), додають у них реактиви відповідно до схеми:

	Дослід	Стандарт
Центрифугат, що відповідає 0,5 мл сироватки	1,5 мл	-
Стандартний розчин сечової кислоти, 0,2 мг / мл	-	0,5 мл
20 % ТХО	-	0,5 мл
Дистильована вода	-	0,5 мл
Насичений розчин натрію карбонату	0,7 мл	0,7 мл
Реактив Фоліна	1 крапля	1 крапля

Через 10 хв обидві проби фотометрують проти води на ФЕК при довжині хвилі 510 – 560 нм (зелений світлофільтр) у 5 мм кюветі. Вміст сечової кислоти (X) у ммоль/л в сироватці крові розраховують за формулою:

$$X = (E \text{ досл.} \times 0,01 \times 200) / (E \text{ ст.} \times 168),$$

де

E досл. – екстинкція дослідної проби;

E ст. – екстинкція стандартної проби;

0,01 – маса сечової кислоти в пробі стандартного розчину, взятого для реакції (мг);

200 – коефіцієнт перерахування на 1 л сироватки крові;

168 – молекулярна маса сечової кислоти.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Контрольні питання

1. На чому базуються методи визначення активності нуклеаз?
2. Порівняйте методи визначення рибонуклеаз та дезоксирибонуклеаз.
3. Яким чином визначають каламуть розчину при визначенні активності рибонуклеази турбідиметричним методом?
4. У чому полягає визначення активності ДНКаз за кількістю вивільнених кислоторозчинних продуктів?
5. Якими є кінцеві продукти катаболізму пуринових і піримідинових основ у людини?
6. Які сполуки є джерелами атомів азоту й вуглецю при біосинтезі пуринових і піримідинових нуклеотидів?
7. Які ферменти здійснюють біосинтез нуклеїнових кислот?
8. Чим можуть бути зумовлені гіперурикемія й гіперурикозурія?
9. З якою метою при визначенні сечової кислоти в сечі використовують фосфорновольфраматний реактив?

РОЗДІЛ 3. ФЕРМЕНТИ

Ферменти – специфічні білки, які відіграють роль біологічних каталізаторів.

Ферменти як білки мають всі властивості білків:

- 1) є амфотерними сполуками;
- 2) вступають в ті ж якісні реакції, що й білки (біуретову, ксантопротеїнову, Фоліна та ін.);
- 3) подібно білкам розчиняються у воді з утворенням колоїдних розчинів;
- 4) володіють електрофоретичною активністю;
- 5) гідролізуються до амінокислот;
- 6) схильні до денатурації під впливом фізичних та хімічних факторів: температури, зміни рН, солей важких металів, ультразвуку, іонізуючого випромінювання та ін.);
- 7) мають декілька рівнів організації макромолекул, що підтверджено даними рентгеноструктурного аналізу, ЯМР, ЕПР.

Основний напрям дії ферментів – збільшення швидкості хімічної реакції, знижуючи енергетичний бар'єр даної реакції. Ферменти мають специфічні властивості:

1. Залежність активності від величини рН;
2. Специфічність дії;
3. Термолабільність і температурний оптимум дії;
4. Залежність активності ферментів від дії різних речовин – активаторів і інгібіторів.

Біологічна роль ферментів полягає в тому, що вони каталізують контрольоване протікання всіх метаболічних процесів в організмі.

Ферменти по локалізації (компаратменталізації) ділять на 3 групи:

- загальні ферменти (універсальні),
- органоспецифічні,
- органелоспецифічні.

Загальні ферменти виявляються практично у всіх клітинах, забезпечують життєдіяльність клітини, каталізують реакції біосинтезу білка і нуклеїнових кислот, утворення біомембран і основних клітинних органел, енергообмін. Загальні ферменти різних тканин і органів, проте, відрізняються за активністю.

Органоспецифічні ферменти властиві тільки певному органу або тканини. Наприклад: для печінки – аргіназа, для нирок і кісткової тканини – лужна фосфатаза, для передміхурової залози - кисла фосфатаза, для підшлункової залози – α -амілаза, ліпаза та інші.

У середині клітин ферменти також розподілені нерівномірно. Одні ферменти знаходяться в колоїдно-розчиненому стані в цитозолі, інші вмонтовані в клітинних органелах (структурований стан).

Органелоспецифічні ферменти. Різним органелам притаманний специфічний набір ферментів, який визначає їх функції.

Органелоспецифічні ферменти це маркери внутрішньоклітинних утворень, органел:

1. Клітинна мембрана: ЛФ (лужна фосфатаза), АЦ (аденілатциклаза), $K-Na^+$ -АТФ-ази.
2. Цитоплазма: ферменти гліколізу, пентозного циклу.
3. ЕПР: ферменти забезпечують гідроксилювання (мікросомальне окислення).
4. Рибосоми: ферменти забезпечують синтез білка.
5. Лізосоми: містять гідролітичні ферменти – пртеази (кисла фосфатаза).
6. Мітохондрії: ферменти окислювального фосфорилування, ЦТК (цитохромоксидаза, сукцинатдегідрогеназа), β -окислення жирних кислот.
7. Ядро клітини: ферменти забезпечують синтез РНК, ДНК (ДНК-залежна-РНК-полімераза, ДНК-залежна-ДНК-полімераза, НАД-синтетаза).

В результаті в клітині утворюються компартменти, які відрізняються набором ферментів і метаболізмом.

НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТІВ

1. Тривіальна назва – назва, що склалася історично. Наприклад, пепсин, трипсин. Для деяких ферментів до назви субстрату додається закінчення «аза» - уреаза, амілаза, ліпаза.

2. Систематична назва – відповідно до сучасної класифікації. Як похідне систематичної назви у багатьох ферментів є одне або декілька робочих назв.

Відповідно до рекомендацій Міжнародного біохімічного союзу (1961 р.) усі ферменти розподілені на 6 класів:

I КЛАС – ОКСИДОРЕДУКТАЗИ

Ферменти каталізують окислювально-відновні реакції, що лежать в основі біологічного окислення. Клас налічує 22 підкласи. Коферментами цього класу є НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, убіхінон, глутатіон, ліпоева кислота.

Прикладом підкласів можуть служити ферменти, що діють на СН-ОН-групу донорів, на СН-СН-групу донорів, на СН-NH₂-групу донорів, на гем-вмісні донори.

Найбільш поширені такі робочі назви оксидоредуктаз:

1. Дегідрогенази – оксидоредуктази, що каталізують дегідрування субстрату з використанням в якості акцептора водню будь-яких молекул, крім кисню.

2. Якщо перенесення водню від молекули донора важко довести, то такі оксидоредуктази називають редуктази.

3. Оксидази – оксидоредуктази, що каталізують окислення субстратів з молекулярним киснем в якості акцептора електронів без включення кисню в молекулу субстрату.

4. Монооксигенази – оксидоредуктази, що каталізують впровадження одного атома кисню в молекулу субстрату з молекулярним киснем в якості донора кисню.

5. Діоксигенази – оксидоредуктази, що каталізують впровадження двох атомів кисню в молекулу субстрату з молекулярним киснем в якості донора кисню.

6. Пероксидази – оксидоредуктази, що каталізують реакції з пероксидом водню в якості акцептора електронів.

Наприклад систематична назва ферментів утворюється:

Донор електронів : акцептор електронів – оксидоредуктаза.

Наприклад:

Систематична назва	Характеристика ферменту
Робоча назва	Алкоголь:НАД-оксидоредуктаза
Клас	Алкогольдегідрогеназа
Підклас	1. Оксидоредуктази
Підпідклас	1.1. Діючі на СН-ОН-групу донорів
Класифікаційний номер	1.1.1. з НАД ⁺ або НАДФ ⁺ в якості акцептора
Кофактори	КФ 1.1.1.1. Нікотинамідаденіндинуклеотид. Залізо або цинк.

II КЛАС – ТРАНСФЕРАЗИ

Каталізують реакції перенесення різних груп (аміногруп, залишків фосфорної кислоти, метильних груп і т.д.) від одного субстрату (донор) до іншого (акцептор), беруть участь в реакціях взаємоперетворення різних речовин, знешкодження природних і чужорідних сполук. Коферментами є піридоксальфосфат, коензим А, тетрагідрофолієва кислота, метилкобаламін.

Клас розподіляється на 9 підкласів залежно від будови груп, які вони переносять. Прикладом підкласів є ферменти, які переносять одновуглецевий фрагмент, альдегідні або кетозалишки, ацильні залишки, азотвмісні групи, фосфатні групи.

Наприклад:

	Характеристика фермента
Систематична назва	АТФ:D-гексоза-6-фосфотрансфераза
Робоча назва	Гексокіназа
Клас	2. Трансферази
Підклас	2.7. Переносять фосфорвмісні групи
Підпідклас	2.7.1. Зі спиртовою групою в якості акцептора
Класифікаційний номер	КФ 2.7.1.1.
Кофактор	Магній

III КЛАС – ГІДРОЛАЗИ

Гідролази – каталізують реакції гідролітичного розпаду складних сполук на більш прості. До цього класу відносяться численні ферменти, що діють на складноєфірні зв'язки (естерази, ліпази), глікозильні сполуки (глікозидази), пептидні зв'язки (пептидази або пептидилгідролази), кислотнoангідридні зв'язки (поліфосфатази) і ін. Гідролази – ферменти, які здійснюють розрив внутрішньо молекулярних зв'язків в субстраті (за винятком С – С зв'язків) шляхом приєднання елементів Н₂О. Налічується 13 підкласів. Зважаючи на складність багатьох субстратів у ряду ферментів збережені тривіальні назви, наприклад, пепсин, трипсин. Коферменти відсутні. Гідролази представлені ферментами шлунково-кишкового тракту (пепсин, трипсин, ліпаза, амілаза та інші) і лізосомальними ферментами. Здійснюють розпад макромолекул, утворюючи мономери, що легко адсорбуються. Історично назви гідролаз склалися з назви субстрату з закінченням «аза» -

колагеназа, амілаза, ліпаза, ДНК-аза. Найбільш часто зустрічаються такі робочі назви гідролаз:

1. Естерази – гідроліз складноєфірних зв'язків.
2. Ліпази – гідроліз нейтральних жирів.
3. Фосфатази – гідроліз моноєфірів фосфорної кислоти.
4. Глікозидази – гідролізують О- і S-глікозидні зв'язки.
5. Протеази, пептидази – гідроліз білків і пептидів.
6. Нуклеази – гідроліз нуклеїнових кислот.

	Характеристика ферменту
Систематична назва	Триацилглицерол:ацилгідролаза
Робоча назва	ТАГ-ліпаза
Клас	3. Гідролази
Підклас	3.1. Діючі на складні ефіри
Підпідклас	3.1.1. Гідролази карбонових кислот
Класифікаційний номер	КФ 3.1.1.3.

IV КЛАС – ЛІАЗИ

Ліази – каталізують відщеплення від субстратів хімічних груп та розрив С-О, С-С, С-Н та інших зв'язків, а також зворотні реакції з утворенням подвійного зв'язку негідролітичним шляхом.

Виділяють 7 підкласів. Ліази є складними ферментами. Коферментами служать піридоксальфосфат, тіаміндіфосфат, бере участь магній, кобальт.

	Характеристика ферменту
Систематична назва	АТФ: фруктозо-6-фосфат-фосфотрансфераза
Робоча назва	Фосфотрансфераза
Клас	2. Трансферази
Підклас	2.7. Переносять фосфорвміщуючі групи
Підпідклас	2.7.1. Із спиртовою групою в якості акцептора
Класифікаційний номер	КФ 2.7.1.11.

V КЛАС – ІЗОМЕРАЗИ

Ізомерази – ферменти, що каталізують різноманітні реакції ізомеризації: перетворення цис-форми в транс-форму, взаємоперетворення альдоз і кетоз, внутрішньо-молекулярний перенос груп (в останньому випадку ферменти називаються мутазами) і т.д.

Ізомерази – складні ферменти. До їх коферментів відносяться піридоксальфосфат, дезоксиаденозилкобаламін, глутатіон, фосфати моносахаридів (глюкозо-1,6-дифосфат) і ін.

Виділяють 6 підкласів ізомераз в залежності від типу реакції. Наприклад, в перший клас виділяють рацемази (зворотне перетворення L- і D-стереоізомерів) і епімерази (перетворення D-, L-ізомерів, що мають більше одного центру асиметрії, наприклад, α -D-глюкозу в β -D-глюкозу), в інші підкласи – цис-транс-ізомерази, внутрішньо-молекулярні трансферази (мутази), далі внутрішньо-молекулярні оксидоредуктази.

	Характеристика ферменту
Систематична назва	D-гліцеральдегід-3-фосфат-альдозо-кетозо-ізомераза
Робоча назва	Триозофосфат-ізомераза
Клас	5. Ізомерази
Підклас	5.3. Внутрішньо-молекулярні оксидоредуктази
Підпідклас	5.3.1. Каталізують взаємоперетворення альдоз і кетоз
Класифікаційний номер	КФ 5.3.1.1.

V I КЛАС - ЛІГАЗИ

Лігази (синтетази) – ферменти, що каталізують реакції приєднання молекул одну до одної, спряжені з використанням енергії високоенергетичних зв'язків, що пов'язане з розривом пірофосфорного зв'язку в молекулі АТФ (або аналогічних трифосфатів). До цього класу відносяться ферменти, що утворюють зв'язки між молекулами вуглецю і кисню, сірки, азоту або між молекулами вуглецю.

Лігази – складні ферменти. Вони містять нуклеотидні (УТФ), біотинові, фолієві коферменти. Виділяють 6 підкласів, які формують зв'язки:

- 6.1. вуглець-кисень;
- 6.2. вуглець-сірка;
- 6.3. вуглець-азот;
- 6.4. вуглець-вуглець;
- 6.5. фосфор-кисень;
- 6.6. азот-метал.

Систематична назва утворюється: Субстрат 1 : субстрат 2 – лігаза.

	Характеристика ферменту
Систематична назва	Піруват:карбоксИ-лігаза (АДФ-утворююча)
Робоча назва	Піруваткарбоксилаза
Клас	6. Лігази
Підклас	6.4. Утворюючи зв'язки вуглець-вуглець
Підпідклас	6.4.1. Утворюючи зв'язки вуглець-вуглець
Кофактор	Біотин, Магній, Цинк
Класифікаційний номер	КФ 6.4.1.1.

Крім цієї класифікації існують і інші. За структурою ферменти класифікуються на два класи: однокомпонентні (протеїни), до яких відносяться більшість гідролаз, і двокомпонентні (протеїди, що складаються з білка апоферменту і коферментної групи), до яких відносяться дегідрогенази, трансферази і багато інших ферментів.

Одиниці ферментативної активності

Визначення активності ферментів має значення щодо контролю метаболічних процесів в організмі. Для точності результатів повинно дотримуватись стандартизації й оптимізації умов тестування. За оптимальних умов температури (25 °С), рН

середовища й повному насиченні ферменту субстратом швидкість реакції, що каталізується, пропорційна концентрації ферменту.

Більшість біохімічних аналізів є кількісними, хоча якісний і напівкількісний аналізи також мають місце при біохімічних дослідженнях.

Багато тестів вимірюють кількість аналізованої речовини в невеликому обсязі зразків, таких, як кров, плазма, сироватка, сеча або інші рідини і тканини.

Результати тестів виражаються в молярних одиницях. Моль будь-якої речовини містить 6×10^{23} молекул. Молярний вираз концентрації характеризує, скільки молекул аналізованої речовини знаходиться в зразку.

Молярні одиниці можуть бути переведені в масові одиниці: один моль - це молекулярна маса речовини в грамах.

Результати біохімічних досліджень зазвичай представляються як концентрації речовин – число молей в одному літрі (моль / л).

Результати ензимологічних досліджень зазвичай виражаються не в молях, а в одиницях ферментативної активності. Великі молекули (білки, нуклеїнові кислоти) вимірюються в грамах або міліграмах.

Комісія з ферментів Міжнародного біохімічного союзу для вираження концентрації ферменту й кількісної оцінки його активності в умовних одиницях рекомендувала використання стандартної міжнародної одиниці (позначається E або U).

За одиницю активності будь-якого ферменту приймається та кількість його, яка в оптимальних умовах каталізує перетворення 1 мікромоля субстрату або утворення 1 мікромоля продукту за хвилину.

$$1 \text{ E} = 1 \text{ мкмоль} / \text{хв.}$$

У відповідності до вимог Міжнародної системи одиниць запропоновано вираження активності ферменту в каталах (кат, kat): 1 кат – каталітична активність, здатна здійснювати реакцію зі швидкістю, рівною 1 молу за 1 секунду:

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль} / \text{с}$$

Для вираження активності в практичній роботі з ферментами часто користуються довільними поняттями питомої й молярної активності.

Питома активність ферменту це число одиниць ферментативної активності на 1 мг білка (або число каталів на 1 кг активного білка). Питома ферментативна активність є мірою чистоти ферменту.

Молярна активність (число оборотів ферменту) це кількість молекул субстрату, що перетворюються у процесі реакції однієї молекулою ферменту за одиницю часу при повному насиченні ферменту субстратом.

Визначення активності ферментів має значення в біологічних дослідженнях, в медицині з ціллю перевірки метаболічного стану організму, а також при застосуванні ферментів в технологічних та інших напрямках.

Лабораторна робота № 13

ВИВЧЕННЯ ТЕРМОЛАБІЛЬНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Ферменти відрізняються від інших каталізаторів здатністю руйнуватися під час нагрівання. Ця властивість називається термолабільністю.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 5 крапель слини і по 20 крапель дистильованої води (розведення 1 : 5). В одній пробірці розчин слини кип'ячать 2-3 хв і охолоджують під струмом водопровідної води, а в іншій – залишають без кип'ятіння. В обидві пробірки додають по 10 крапель 0,5 % розчину крохмалю; рідину в пробірці перемішують і залишають при кімнатній температурі. Через 5 хвилин вміст кожної пробірки поділяють на дві частини: з однією частиною роблять реакцію з йодом на крохмаль, з іншою – пробу Фелінга і Тромера на цукор (мальтоза, глюкоза).

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 14 ВПЛИВ рН НА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗИ

Активність ферментів виявляється в межах досить вузької зони реакції рідинного середовища, що називається оптимумом рН.

Хід роботи. У 7 пробірок наливають розчини 0,2 М двозаміщеного фосфорнокислого натрію і 0,1 М лимонної кислоти у кількостях, зазначених у таблиці:

№ проби	Кількість 0,2 М розчину двозаміщеного фосфату натрію, мл	Кількість 0,1 М розчину лимонної кислоти, мл	рН середовища	Кількість 0,5 % розчину крохмалю, краплі	Кількість розведеної 1 : 100 слини (амілази), краплі	Фарбування (реакція з йодом)
1	0,58	0,42	5,6	10	10	
2	0,63	0,37	6,0	10	10	
3	0,69	0,31	6,4	10	10	
4	0,77	0,23	6,8	10	10	
5	0,87	0,13	7,2	10	10	
6	0,94	0,06	7,6	10	10	
7	0,97	0,03	8,0	10	10	

Готують буферні розчини з рН від 5,6 до 8,0. У кожен пробірочку додають по 10 крапель 0,5 % розчину крохмалю і по 10 крапель слини, розведеної в 100 разів. Вміст пробірок перемішують і залишають при кімнатній температурі (або у водяній бані при 37 °С). Через 5 хв з четвертої пробірки, у якій рН середовища передбачається оптимальним для амілази, беруть краплинну пробу для реакції з йодом. Якщо одержують синє забарвлення, пробу повторюють через 5 хв. Коли в краплинній пробі буде отримано червоне або жовте забарвлення, в усі пробірки додають по 1 краплі 0,1 % розчину йоду; вміст пробірок перемішують і відмічають колір. Оптимум рН для дії амілази визначають по тій пробірці, у якій відбулося більш глибоке розщеплення крохмалю (при реакції з розчином йоду спостерігається червоний або жовтий колір).

Результати роботи фіксуються в таблиці.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 15 СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ

Специфічність полягає в тому, що кожен фермент діє на конкретний субстрат.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 10 крапель 0,5 % розчину крохмалю і додають у першу пробірочку 5 крапель розведеної в 5 разів слини (амілаза), у другу – 5 крапель витяжки з дріжджів, що містить β -фруктофуранозидазу (сахаразу) (0,5 г

дріжджів розтирають у порцеляновій ступці з 3 мл води, фільтрують; фільтрат – джерело сахарози), перемішують і залишають при кімнатній або температурі 38 - 40 °С. У 2 інші пробірки наливають по 10 крапель 0,5 % сахарози, у першу додають 5 крапель розведеної в 5 разів слини, у другу – 5 крапель витяжки з дріжджів і залишають за тих самих умов. Через 5 хв у перші дві пробірки із крохмалем додають по одній краплі 0,1 % розчину йоду і відзначають забарвлення. З вмістом 2 інших пробірок (дослід із сахарозою) проводять реакції Фелінга або Тромера. Дія ферментів виявляється або по зникненню субстрату, або по появі продуктів розщеплення (мальтоза, глюкоза, фруктоза).

Отримані результати заносять в таблицю:

№ п/п	Субстрат	Фермент	Реакція на крохмаль з йодом	Реакція Тромера	Висновок
1	Крохмаль	Амілаза			
2	Крохмаль	Амілаза			
3	Сахароза	Сахараза			
4	Сахароза	Сахараза			

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 16 ВПЛИВ АКТИВАТОРІВ І ІНГІБІТОРІВ НА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗИ

Активаторами і інгібіторами називають речовини, здатні прискорювати чи гальмувати дію ферментів.

Хід роботи. У три пробірки наливають: у першу – 10 крапель дистильованої води, у другу – 8 крапель води і 2 краплі 1 % розчину NaCl, а в третю – 8 крапель води і 2 краплі 1 % розчину CuSO₄. У кожен пробірку наливають по 10 крапель слини, розведеної 1 : 5, перемішують, додають 5 крапель 0,5 % розчину крохмалю, знову перемішують і залишають при кімнатній температурі. Через 5 хв у 3 пробірки з водою, підфарбованою краплею розчину йоду, відливають по 2-3 краплі вмісту кожної дослідної пробірки. У першій пробірці рідина забарвлюється у фіолетовий чи червоний, у другий – у червоний чи жовтий, у третій – у синій колір.

Отримані результати заносять в таблицю:

№ п/п	Варіант	Реакція з йодом	Висновки
1	Контроль		
2	+ NaCl		
3	+ CuSO ₄		

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 17 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМІЛАЗИ СЛИНИ ЗА ВОЛЬГЕМУТОМ

Цей метод ґрунтується на визначенні мінімальної кількості ферменту, що здатна за певних умов (37 °С, 30 хв) розщепити певну кількість крохмалю.

Амілазну активність виражають у кількості субстрату (крохмалю), що розщеплюється 1 мл слини за певний проміжок часу (30 хв).

Хід роботи.

1. Наливають з бюретки в 10 пронумерованих пробірок по 1 мл 0,85 % NaCl.
2. У першу пробірку відмірюють 1 мл слини, розведеної в 10 разів водою.
3. Перемішують вміст першої пробірки шляхом трикратного втягування піпеткою рідини з пробірки і наступного випускання з піпетки. 1 мл отриманого розчину переносять з першої пробірки в другу.
4. Перемішують у такий же спосіб вміст другої пробірки і переносять 1 мл із другої пробірки в третю і т.д. З десятої пробірки 1 мл рідини виливають як зайвий.
5. Далі наливають з бюретки в усі 10 пробірок (починаючи з десятої) – по 2 мл 0,1 % розчину крохмалю і перемішують вміст кожної пробірки.
6. Одночасно поміщають кожну пробірку в нагріту до 45 °С водяну баню.
7. Через 15 хв виймають пробірки з бані, швидко охолоджують їх струмом холодної води, перемішують вміст кожної пробірки і ставлять одну за одною в штатив.
8. Додають у кожну пробірку по 2 краплі йоду, перемішують і відзначають ту пробірку, у якій немає синього відтінку. Наприклад, якщо розщеплення крохмалю відбулося (жовтий колір з йодом) в пробірках 1, 2 та 3, то активність амілази розраховують за пробіркою 3, де слина розведена в 8 разів. Тобто, амілазна активність A_{15}^{45} дорівнює: $A_{15}^{45} = 2 \times 8 = 16$, де 2 – кількість 0,1 % крохмалю, мл.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 18 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В КРОВІ ЗА МЕТОДОМ БАХА - ЗУБКОВОЇ

Метод заснований на вимірюванні кількості пероксиду водню, розщепленого каталазою. Каталаза каталізує розкладання пероксиду водню на молекулярний кисень і воду:



За хімічною природою каталаза є гемоферментом, тому що до складу простетичної групи цього ферменту входить гем:

Кількісне визначення активності каталази - це визначення «каталазного числа» і «показника активності каталази». Каталазним числом називається кількість міліграмів H_2O_2 , що розкладається 1 мікролітром (1мм^3) досліджуваної крові. Принцип визначення каталазного числа ґрунтується на наступній реакції:



тобто про кількість зруйнованого пероксиду водню судять по різниці кількостей марганцевокислого калію, витраченого на титрування до і після дії каталази.

Показником активності каталази називають дріб, у якій чисельником є каталазне число, а знаменником - число мільйонів еритроцитів в одному мм^3 досліджуваної крові.

Хід роботи.

1. Вносять піпеткою 0,1 мл досліджуваної крові, попередньо протерши кінчик капіляра від крові.
2. Піпетку промивають шляхом втягування і випускання рідини з мірної колби на 100 мл, куди попередньо наливають 10 мл дистильованої води.

3. Доливають мірну колбу водою до мітки і відмічають час, коли кров була розведена. Цей розчин називають основним розчином крові (1 : 1000), що використовують для визначення каталазного числа.
4. У дві конічні колби наливають 7-8 мл дистильованої води і відмірюють у них по 1 мл основного розчину крові.
5. Вміст першої колби (контроль) відразу ж кип'ятять протягом двох хвилин для руйнування каталази, обидві колби залишають на 10 хв.
6. У кожному колбу вносять по 2 мл розчину перексиду водню (1 %) і залишають на 30 хв.
7. Доливають у кожному колбу по 5 мл 10 % розчину сірчаної кислоти й відтитровують вміст 0,1 н. розчином марганцевокислого калію до появи рожевого кольору.

Каталаза розкладає перексид водню, тому на титрування рідини другої колби піде менше розчину марганцевокислого калію, чим на титрування вмісту першої колби, де каталаза була зруйнована. Цю різницю помножують на 1,7 і одержують каталазне число досліджуваної крові. Принцип обчислення заснований на наступному. Грам-еквівалент перексиду водню дорівнює 17. Отже, у 1 мл 0,1 н. розчину міститься 1,7 мг перексиду водню. 1 мл 0,1 н. розчину марганцевокислого калію відповідає 1 мл перексиду водню. Таким чином, помноживши 1,7 на різницю між кількістю мілілітрів 0,1 н. розчину марганцевокислого калію, одержують кількість мл перексиду водню, що розкладається в 1 мм³ досліджуваної крові (каталазне число). Показник активності каталази тоді буде дорівнювати каталазному, числу поділеному на кількість еритроцитів в 1 мм³ досліджуваної крові.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Контрольні питання

1. Який критерій покладено в основу класифікації ферментів?
2. Як розподіляють ферменти за сучасною класифікацією і номенклатурою?
3. Що таке ферменти?
4. Яким шляхом фермент знижує енергію активації?
5. Яка ефективність ферментів порівняно з неорганічними каталізаторами?
6. Які основні механізми дії ферментів?
7. Що описує рівняння Міхаеліса-Ментен $v = \frac{v_{\max} [S]}{K_s + [S]}$?
8. Що характеризує константа Міхаеліса (K_m)?
9. Які основні функції апоферменту?
10. Охарактеризуйте активний центр ферменту.
11. Яка частина ферменту визначає його специфічність?
12. Охарактеризуйте каталітичну ділянку активного центру.
13. Охарактеризуйте контактну (якірну) ділянку активного центру?
14. В яких одиницях виражається швидкість ферментативної реакції?
15. Що таке питома активність ферменту?
16. Лінеоризація рівняння Міхаеліса-Ментен, його значення.
17. Вплив температури на ферментативні реакції. Термодинамічна суть величини енергії активації.
18. Типи регуляції активності ферментів.

РОЗДІЛ 4. ВІТАМІНИ

Вітаміни були відкриті в 1890 р. Миколою Івановичем Луніним. Він першим стверджував, що певна кількість захворювань, на які страждають моряки в довгих походах і не отримують в раціоні ані свіжих овочей, ані фруктів виникає в наслідок відсутності в організмі яких-то невідомих сполук. В 1900 році Казимір Функ спробував виділити і проаналізувати склад цих сполук. В результаті йому вдалося встановити лише те, що до складу цих сполук здебільшого входить аміногрупа. Це дало підстави Функу запропонувати для цих сполук загальний термін «вітаміни» – життєві аміни. Цей термін закріпився і існує і в теперішній час.

Сучасна класифікація поділяє вітаміни на три групи:

- 1) ензимовітаміни;
- 2) гормоновітаміни;
- 3) вітаміни-антиоксиданти.

До ензимовітамінів відносять вітаміни, які або в незмінному вигляді, або в якості коферментів входять до складу ферментів. Ці вітаміни є водорозчинними. Гормоновітаміни характеризуються гормоноподібною дією і є жиророзчинними. Вітаміни-антиоксиданти захищають клітини і тканини від оксидативного стресу. Серед них є як водорозчинні, так і жиророзчинні вітаміни.

Відсутність того чи іншого вітаміну в організмі називається авітаміноз. Недостатність вітаміну – гіповітаміноз, а надлишок – гіпервітаміноз. Всі ці стани небезпечні для організму. Тому визначення кількості вітамінів в тканинах має важливе значення.

Аналіз продуктів харчування на вміст вітамінів не завжди є достатнім. Справа в тім, що крім харчових (аліментарних) авітамінозів при яких людина отримує недостатньо вітамінів зустрічаються так звані ендогенні авітамінози, при яких з тих чи інших причин вітаміни не затримуються в організмі, а одразу виділяються з сечею.

Лабораторна робота № 19 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ С ЗА МЕТОДОМ ТІЛЬМАНСА

Метод кількісного визначення аскорбінової кислоти заснований на її здатності відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол, яким титрують досліджуваний розчин у кислому середовищі, що зберігає аскорбінову кислоту від руйнування. Точному кількісному визначенню аскорбінової кислоти можуть заважати інші речовини, що легко окислюються, такі, як глутатіон, цистеїн і ін.

Хід роботи. Точну наважку стиглих плодів шипшини чи хвої молодої ялини в кількості 0,5 г ретельно розтирають у порцеляновій ступці з 2 мл 2 % розчину соляної кислоти, потім без втрат переносять вміст ступки в мірну колбу місткістю 50 мл і доводять дистильованою водою до мітки. Вміст колби ретельно перемішують, фільтрують через паперовий фільтр і фільтрат використовують для визначення вітаміну С.

Титрування. У 2 конічні колби відмірюють піпеткою по 1 мл фільтрату, додають у кожену колбу по 4 мл 2 % розчину соляної кислоти і титрують з бюретки 0,001 н. 2,6-дихлорфеноліндофенолом до появи рожевого кольору, що не зникає

близько 30 с. Якщо готується витяжка з хвої, для титрування беруть 5 мл фільтрату і соляну кислоту не додають.

Розрахунок кількості аскорбінової кислоти в пробі роблять, виходячи з того, що 1 мл 0,001 н. 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти (молекулярна маса аскорбінової кислоти дорівнює 176, а грам-еквівалент – 88 г). При розрахунку на 100 г речовини необхідно враховувати також розведення і кількість вихідної речовини.

Якщо, наприклад, на титрування 1 мл витяжки із шипшини пішло 1,25 мл 0,001 н. 2,6-дихлорфеноліндофенолу, то в 1 мл витяжки міститься $0,088 \times 1,25 = 0,11$ мг аскорбінової кислоти, а в 100 мл витяжки буде міститися відповідно 11 мг.

При розрахунку кількості вітаміну С на 100 г шипшини необхідно врахувати, що наважка його в 0,5 г була поміщена в 50 мл, тобто у співвідношенні 1 г у 100 мл, де кількість вітаміну С нам уже відома, а саме – 11 мг. Відповідно 100 г шипшини будуть містити 1100 мг вітаміну С, чи 1,1 г, що складає 1,1 %.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 20 **КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ Р** **ЗА МЕТОДОМ ЛЕВЕНТАЛЯ**

В основу визначення катехінів покладено метод окислювання дубильних речовин перманганатом калію. Катехіни легко екстрагуються з листя чаю дистильованою водою. Водяний розчин титрують 0,1 н. KMnO_4 у присутності індикатора індигокарміну. Результати титрування порівнюють зі стандартним перерахунковим коефіцієнтом титрування за Левенталем, рівним 6,4, тому що експериментально встановлено, що 1 мл 0,1 н. KMnO_4 окислює 6,4 мкг рутину.

Хід роботи. Наважку листя чаю у кількості 0,25 г заливають 100 мл нагрітої до кипіння води і кип'ятять протягом 5 хв у колбі зі зворотним охолоджувачем. Отриманий екстракт охолоджують, відбирають 2 мл і переносять в іншу колбу, куди наливають ще 50 мл дистильованої води і 5 мл розчину індигокарміну. Після приливання індигокарміну, вміст колби забарвлюється в інтенсивний синій колір.

Ретельно перемішуючи рідину в колбі, вміст титрують розчином 0,1 н. KMnO_4 до появи жовтого кольору через перехідні тони – від синього до зеленого і зеленувато-жовтого. Для контролю титрують 52 мл води з внесенням у неї 5 мл розчину індигокарміну.

Різниця між дослідним і контрольним титруванням являє собою кількість мілілітрів 0,1 н. KMnO_4 , що витрачається на окислювання катехінів.

Для обчислення результатів аналізу користаються формулою:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 6,4 \cdot V_1 \cdot 100}{P \cdot V_2 \cdot 1000},$$

де x – вміст вітаміну Р в препараті, %;

a – кількість 0,1 н. KMnO_4 , що витрачається на титрування дослідного розчину препарату, мл;

b – кількість 0,1 н. KMnO_4 , що витрачається на контрольне титрування, мл;

6,4 – стандартний коефіцієнт титрування;

V_1 – об'єм, у якому розчинена узята для аналізу наважка, мл;

V_2 – об'єм розчину, узятото для титрування, мл;

P – наважка, мг.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 21 ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ Е

При дії концентрованої азотної кислоти на спиртовий розчин вітаміну Е, останній забарвлюється в червоний колір у результаті окислювання α -токоферолу до пофарбованих продуктів хіноїдного ряду.

Хід роботи. У сухій пробірці змішують при енергійному струшуванні 5 крапель 0,1 % спиртового розчину вітаміну Е і 10 крапель концентрованої азотної кислоти. Верхній масляний шар емульсії забарвлюється в червоний колір.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 22 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ Е

Метод заснований на колориметричному вимірюванні інтенсивності забарвлення, що виникає при окислюванні токоферолів азотною кислотою.

Хід роботи. У 2 мірні пробірки поміщають по 2,5 мл спиртового розчину вітаміну Е, доливають по 0,5 мл 70 % азотної кислоти і витримують у киплячій водяній бані 3 хв. Потім пробірки охолоджують і ставлять у темне місце на 15 хв. Об'єм рідини в кожній пробірці доводять абсолютним етиловим спиртом до 5 мл і перемішують. Розчини, забарвлені в результаті реакції в рожевий колір, фотометрують на фотоелектроколориметрі із синім світлофільтром (470 нм).

Концентрацію вітаміну Е в досліджуваному розчині знаходять за графіком, де кожному значенню знайденої екстинкції відповідає певний вміст вітаміну Е в 1 мл розчину.

Для побудови калібрувального графіку використовують препарат, що містить у 1 мл 100 мг α -токоферолацетату. Для цього 0,5 мл такого препарату розчиняють абсолютним спиртом у мірній колбі на 50 мл. У 4 мірні пробірки відмірюють по 0,5; 1; 1,5; 2 мл цього спиртового розчину, що містить на 1 мл – 1 мг α -токоферолацетату, і додають абсолютний спирт по 2; 1,5; 1; 0,5 мл відповідно, щоб загальний об'єм рідини складав 2,5 мл.

У пробірках проводять *визначення вітаміну Е*, як зазначено вище, і отримані дані оптичної щільності розчинів *використовують* для побудови *калібрувального графіку*. На вісь ординат наносять значення екстинкції, на вісь абсцис – відповідні концентрації вітаміну Е.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Контрольні питання:

1. Наведіть класифікацію вітамінів.
2. Напишіть формули тіаміну, аскорбінової кислоти, нікотинової кислоти, рибофлавіну, пантотенової кислоти.
3. Охарактеризуйте гіпо- та гіпервітамінози.
4. Які вітаміни мають коферментні форми і в яких реакціях вони приймають участь?

РОЗДІЛ 5. ГОРМОНИ

Гормони належать до біологічно активних органічних речовин, невеликі кількості яких викликають глибоку відповідну реакцію організму. Вони виробляються в залозах внутрішньої секреції. До залоз внутрішньої секреції звичайно відносять щитоподібну залозу, паращитоподібну залозу, надниркові залози, підшлункову залозу, статеві залози, гіпофіз, епіфіз, зобну залозу. Діяльність ендокринних залоз не автономна, а знаходиться під контролем центральної нервової системи.

За своєю хімічною природою гормони можна розділити на наступні основні групи: гормони поліпептидної, білкової природи та похідні деяких амінокислот, і на гормони стероїдної природи.

До гормонів поліпептидної і білкової природи відносяться гормони паращитовидної залози, передньої, середньої і задньої частки гіпофіза, підшлункової залози. До гормонів стероїдної природи відносяться гормони коркового шару надниркових і статевих залоз. Похідними амінокислот є гормони мозкового шару надниркових залоз, щитовидної залози, епіфізу. За останні десятиріччя була виділена в хімічно чистому вигляді велика кількість гормонів, вивчена їхня хімічна структура і розроблені методи синтезу. Механізми ж дії багатьох гормонів і зараз залишаються ще недостатньо вивченими.

Захворювання, що виникають на ґрунті порушення функцій тієї чи іншої залози, у більшості випадків можна розглядати як наслідок гіпофункції залози або її гіперфункції. При цьому треба мати на увазі, що окремі ендокринні залози через свої гормони впливають не тільки на функцію різних органів і тканин тіла, але і на функцію інших залоз внутрішньої секреції і на нервову систему. Таким чином, порушення функції однієї з залоз дуже часто впливає на діяльність інших.

Лабораторна робота № 23 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АДРЕНАЛІНУ ЗА МЕТОДОМ ФОЛІНА

Метод заснований на колориметричному визначенні інтенсивності синього забарвлення, що утворюється при взаємодії адреналіну з реактивом Фоліна.

Реактив Фоліна складається із солей фосфорновольфрамової і фосфорномолібденової кислот. Ці солі при взаємодії з адреналіном відновлюються з утворенням оксидів металів, комплекси яких забарвлюються в синій колір.

Хід роботи. У суху пробірку відмірюють піпеткою 1 мл дослідного розчину адреналіну, 4 мл 10 % розчину вуглекислого натрію і 0,5 мл реактиву Фоліна. Вміст пробірки струшують.

Через 5 хв інтенсивність отриманого синього забарвлення вимірюють на фотоелектроколориметрі з червоним фільтром проти контролю, що містить 1 мл дистильованої води, 4 мл 10 % розчину вуглекислого натрію і 0,5 мл реактиву Фоліна. Знаючи оптичну щільність випробуваного розчину, по калібрувальному графіку визначають невідому концентрацію адреналіну в грамах на літр. Калібрувальний графік будують за стандартними пробами, що містять 0,01; 0,02; 0,04 г / л адреналіну. На осі абсцис відкладають значення концентрацій стандартних розчинів адреналіну, на осі ординат — оптичні щільності відповідних концентрацій адреналіну.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів

Контрольні питання:

1. Що таке гормони?
2. Чим відрізняються гормони від вітамінів і ферментів?
3. Які гормони виробляються щитоподібною залозою?
4. Що таке кортикостероїди?
5. Що таке інсулін і яка його хімічна природа?
6. Яка хімічна природа жіночих та чоловічих статевих гормонів?
7. Які гормони виділяються передньою і задньою частками гіпофізу?
8. Який вплив здійснюють гормони на білковий, жировий і вуглеводний обмін?

РОЗДІЛ 6. ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

Метаболізм – сукупність процесів перетворення речовин і енергії в живому організмі і обмін організму речовинами і енергією з зовнішнім середовищем, внаслідок чого відбувається постійне оновлення самого організму. З точки зору фізики живий організм існує за рахунок збільшення ентропії зовнішнього середовища відповідно до другого закону термодинаміки: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, тобто (ΔS організму + ΔS середовища) > 0 , тоді $\Delta G < 0$ і в самому організмі можуть відбуватися впорядковані процеси.

Організм отримує енергію у вигляді харчових речовин, розщеплюючи які в окислювальних процесах катаболізму («метаболічна воронка») трансформує частину цієї енергії в високоенергетичні (макроергічні) сполуки (здебільшого в АТФ). Останні, в свою чергу, використовуються організмом у відновних процесах анаболізму в якості джерела енергії для синтезу власних високомолекулярних сполук.

Внутрішньоклітинний метаболізм основних класів поживних речовин – вуглеводів, білків і жирів – являє собою розгалужену метаболічну мережу, яка об'єднується в мітохондріях загальним амфіболічним шляхом – циклом трикарбонових кислот (ЦТК), метаболіти якого беруть участь в анаплеротичних реакціях, що зв'язують обмін різних класів сполук між собою.

Утворення АТФ з АДФ і фосфорильного залишку – ферментативний енергозалежний процес, який отримав назву фосфорилування АДФ. Залежно від джерела енергії і механізму утворення макроергічного зв'язку розрізняють два основних способи синтезу АТФ:

1) менший за обсягом, еволюційно більш ранній, який може здійснюватися в анаеробних умовах – субстратне фосфорилування за рахунок енергії інших макроергічних сполук (1,3-бісфосфогліцерат, фосфоенолпіруват, сукцинил-КоА, креатинфосфат);

2) поєднане з диханням окисне фосфорилування, здійснюване на внутрішній мембрані мітохондрій ферментом АТФ-синтази за рахунок енергії різниці електрохімічних потенціалів ΔH^+ , що виникає при роздільному перенесенні електронів і протонів у дихальному ланцюзі мітохондрій відновлювальних еквівалентів НАДН (H^+) або ФАДН₂ на молекулярний кисень в процесі біологічного окислення (хеміосмотична теорія П. Мітчелла).

Оскільки в організмі людини і тварин основна кількість відновлювальних еквівалентів утворюється в результаті окисного розпаду вуглеводів, доцільно почати знайомство з обміном речовин і енергії з вивчення хімії вуглеводів і їх метаболізму. Метаболізм вуглеводів складають катаболічні енергоутворюючі шляхи (гліколіз, глікогеноліз, петозофосфатний шлях окислення глюкози) і анаболічні енерговитратні шляхи (глікогеногенез і глюконеогенез – утворення глюкози з неуглеводних джерел: лактату, амінокислот або гліцерину).

Спрямованість, інтенсивність і узгодженість протікання метаболічних процесів регулюється ферментами під контролем гормональної та нервової систем за участю клітинних рецепторів і вторинних переносників сигналу. Порушення регуляції, як і онтогенетичні зміни ферментних систем, призводять до патології обмінних процесів і розвитку захворювань.

В даному розділі наводяться лабораторні роботи, що демонструють специфічність ферментів, що розщеплюють вуглеводи, методи кількісного визначення глюкози, активності ферменту ЦТК – сукцинатдегідрогенази і метаболіту гліколізу – пірувату.

Лабораторна робота № 24

СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ РОЗПАДУ ВУГЛЕВОДІВ: АМІЛАЗИ І САХАРАЗИ

Крохмаль і сахароза – звичайні вуглеводи їжі. Амілаза і сахараза - ферменти, що беруть участь в розщепленні цих вуглеводів. Амілаза слини розщеплює крохмаль до мальтози і, потім, мальтаза розщеплює останню до вільної глюкози. Сахараза кишкового соку розщеплює сахарозу до глюкози і фруктози. Джерелом ферментів можуть бути слина (для амілази) та пекарські дріжджі (для сахарази).

Мета роботи. Переконалися в специфічності дії амілази слини і сахарази дріжджів на відповідні субстрати.

Принцип методу. Стежать за розщепленням крохмалю і сахарози з утворенням глюкози, яку визначають пробую Троммера (модифікація проби «мідного дзеркала» на альдегідну групу). Крохмаль і сахароза не містять здатної окислюватися альдегідної групи і не дають позитивної проби Троммера при нагріванні.

Хід роботи. Зібрану слину розводять водою у співвідношенні 1 : 5 і отриманий розчин використовують як джерело амілази. Отримання сахарази здійснюють наступним чином: 10 г пекарських дріжджів ретельно розтирають у ступці, додають 15 мл води, перемішують, фільтрують через складчастий паперовий фільтр. Отриманий фільтрат використовують як джерело ферменту.

У 4 пробірки по краплях додають наступні реактиви:

№№ проб	Крохмаль	Сахароза	Амілаза	Сахараза	Забарвлення в реакції Троммера на наявність глюкози
1	10 крапель	-	5 крапель	-	
2	10 крапель	-	-	5 крапель	
3	-	10 крапель	5 крапель	-	
4	-	10 крапель	-	5 крапель	

Проби перемішують і інкубують при 40 °С протягом 10 хв, а потім проводять реакцію Троммера з вмістом кожної пробірки. Результати записують в таблицю.

Проба Троммера на наявність глюкози

До вмісту досліджуваного розчину додають рівний об'єм 30 % розчину NaOH і 1 краплю 7 % розчину CuSO₄, стежачи за тим, щоб краплі не розтікалися по стінках пробірки до появи в верхньому шарі незникаючої блакитної каламуті внаслідок утворення гідроксиду міді (II) Cu(OH)₂. Потім обережно, не струшуючи пробірку, нагрівають її на пальнику. При кип'ятінні випадає жовтий осад гідроксиду міді (I) CuOH або червоний осад Cu₂O. У разі надлишку CuSO₄ утворюється чорний осад CuO.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 25 ВИЗНАЧЕННЯ ЦУКРУ В КРОВІ ЗА МЕТОДОМ ХАГЕДОРНА - ЙЕНСЕНА

У безбілковому фільтраті крові глюкозу окислюють заліzosинеродистим калієм. Надлишок заліzosинеродистого калію, що не вступив у реакцію з глюкозою, відновлюють йодистим калієм. Вільний йод, що виділився в кількості, еквівалентній надлишку заліzosинеродистого калію, обчислюють за даними титрування за допомогою спеціальної таблиці Хагедорна.

Хід роботи.

Приготування гідроксиду цинку для осадження білка.

У чотири пронумеровані пробірки наливають з бюретки по 5 мл 0,45 % розчину сірчаноокислого цинку і по 1 мл 0,1 н. розчину їдкого натру. Утворюється студенистий осад гідроксиду цинку.

Узяття крові й осадження білка.

Кров (із щавелевокислим натрієм з розрахунку 0,1 г на 100 мл крові) набирають мікропіпеткою на 0,1 мл трохи вище верхнього нульового значення. Кінчик піпетки ретельно обтирають шматочком фільтрувального папера і надлишок узятої крові видаляють фільтрувальним папіром. Піпетку з кров'ю поміщають на дно в пробірку з гідроксидом цинку, обережно видувають кров і промивають піпетку 2-3 рази шляхом втягування і випускання рідини. У такий же спосіб сухою піпеткою набирають кров у другу пробірку. У третю і четверту пробірки кров не додають: вони служать для контролю техніки роботи і чистоти використаних реактивів. По закінченні узяття крові вміст перших двох пробірок ретельно перемішують. Усі чотири пробірки ставлять у киплячу водяну баню на 3 хвилини і по закінченні цього часу виймають і ставлять у штатив. У перших двох пробірках на поверхні плавають пластівки денатурованого білка.

Підготовка до фільтрування.

У чотири лійки поміщають невеликі шматочки вати і гарячою дистильованою водою промивають вату для видалення розчинних речовин, що заважають визначенню. Промивання повторюють 2-3 рази. Лійки з відмитою ватою поміщають у високі пронумеровані стаканчики.

Фільтрування. Вміст кожної пробірки переносять по паличці (кількісно без втрат) через приготовлений ватяний фільтр у відповідний за номером стаканчик (у кожній пробірці повинна бути скляна паличка). Пробірку і паличку промивають 1 мл

дистильованої води і промивну воду переносять на той же фільтр тільки після того, як профільтрується попередня. Цим досягається більш повне вимивання залишків глюкози з фільтра.

Окислювання глюкози заліzosинеродистим калієм.

До фільтрату в кожен стаканчик додають з мікробюреткі по 2 мл 1/200 н. заліzosинеродистого калію. Стаканчики занурюють у киплячу баню на 15 хв для окислювання глюкози, після чого виймають і охолоджують у бані з холодною водою.

Визначення надлишку заліzosинеродистого калію.

У стаканчики наливають з бюретки по 3 мл потрійного розчину (йодистий калій, сірчаноокислий цинк, хлористий натрій). Сірчаноокислий цинк додають для того, щоб вивести зі сфери реакції заліzosинеродистий калій у вигляді комплексної цинк-калієвої солі і тим самим запобігти зворотному ходу реакції. Хлористий натрій як електроліт сприяє кращому випадінню колоїдного осаду подвійної цинк-калієвої солі.

Далі додають по 2 мл 3 % розчину оцтової кислоти. Рідина здобуває жовтого кольору унаслідок появи вільного йоду. Йод утворюється в результаті взаємодії йодистого калію з надлишком заліzosинеродистого калію. Йод, який утворився, титрується 1/200 н. розчином гіпосульфїту в присутності 1-2 крапель 1 % розчину крохмалю. Титрування проводять повільно, до забезпечення синього кольору рідини. Чим більше цукру в крові, тим менше буде надлишок заліzosинеродистого калію, тим менше виділиться йоду, і тим менше гіпосульфїту буде витрачено на титрування. У контрольних пробах, де цукру немає, а можлива тільки присутність інших компонентів, здатних редукувати, на титрування повинно піти приблизно 2 мл розчину гіпосульфїту (2 мл 1/200 н. розчину еквівалентно 2 мл 1/200 н. розчину заліzosинеродистого калію).

Обчислення.

Для обчислення вмісту цукру в крові за даними титрування користуються спеціальною таблицею, складеною Хагедорном. У таблиці по вертикалі зазначена кількість мілілітрів гіпосульфїту, витраченого на титрування, виражена в цілих і десятих частках мл; по горизонталі зазначені соті частки мілілітру гіпосульфїту. На перетинанні горизонтальної і вертикальної лінії знаходять число, що відповідає кількості цукру в пробі (тобто в 0,1 мл крові), виражене в міліграмах. З кількості цукру, знайденого в дослідній пробі (середнє з двох визначень), віднімають ту кількість редукуючих речовин, що виявлено в контрольній пробі (середнє з двох визначень). Для визначення процентного вмісту цукру в крові отриманий результат помножують на 1000, якщо для аналізу було узято 0,1 мл крові. У нормі вміст цукру в крові коливається від 70 до 120 мг%.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 26

ФЕРМЕНТАТИВНИЙ МЕТОД КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ В СИРОВАТЦІ АБО В ПЛАЗМІ КРОВІ

Кількісне визначення глюкози в крові є одним з основних методів діагностики порушень вуглеводного обміну. Підвищення концентрації глюкози в сироватці крові (гіперглікемія) спостерігається найчастіше при недостатній секреції інсуліну, а також при гіперфункції щитоподібної залози і гіперсекреції гормонів, зокрема, при пухлинах коркового шару надниркових залоз і пухлинах гіпофізу.

Гіпоглікемія може спостерігатися при гіпофункції щитоподібної залози, гіпофізарної кахексії, Аддісонової хвороби, аденомі підшлункової залози, а також може бути викликана голодуванням, тривалою фізичною роботою або передозуванням інсуліну.

Мета роботи: визначити вміст глюкози в досліджуваній сироватці крові ферментативним методом.

Принцип методу: глюкоза окислюється киснем повітря в присутності високоспецифічного ферменту - глюкозооксидази з утворенням пероксиду водню. Потім пероксид водню в присутності ферменту пероксидази реагує з 4-аміноантипірином і фенолом. В результаті утворюється забарвлена сполука, оптична щільність якої при 510 нм пропорційна концентрації глюкози в аналізованому зразку.

Хід роботи.

Реагенти	Дослід	Стандарт	Контроль
Глюкозний реактив*, мл	3	3	3
Сироватка крові, мл	0,02	—	—
Стандартний розчин глюкози (10 ммоль/л), мл	—	0,02	—
H ₂ O, мл			0,02
інкубація 15 хв при 37 ° С			
Фотометруем проти H ₂ O при λ = 510 нм, товщина кювети 0,5 см)			
D _д – D _к = ΔD			

* 4-аміноантипірин, п-гідроксибензолсульфонат, пероксидаза і глюкозооксидаза, фосфатний буфер (рН 8,0).

Розрахунок вмісту глюкози в сироватці крові здійснюють за формулою:

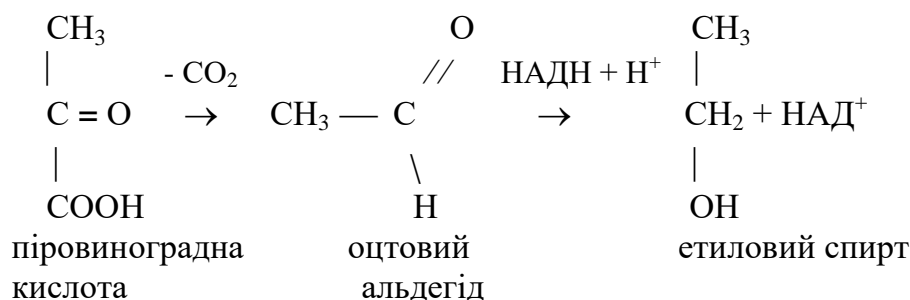
$$C = \frac{(D_d - D_k) \times 10 (\text{ммоль} / \text{л})}{D_c - D_k}$$

Нормальний вміст глюкози в сироватці і плазми крові складає 3,9 – 6,1 ммоль / л, в цільній крові – 3,3 – 5,5 ммоль / л.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 27 ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ СПИРТОВОГО БРОДІННЯ

Спиртовим бродінням називається процес перетворення глюкози в етиловий спирт і CO₂ в анаеробних умовах під впливом мікроорганізмів. За своїм механізмом цей процес дуже близький до гліколізу. До стадії утворення піровиноградної кислоти ці два процеси протікають аналогічно. У дріжджових клітинах піровиноградна кислота піддається декарбоксілюванню з утворенням оцтового альдегіду, який відновлюється в етиловий спирт за допомогою відновленого НАД.



В наслідок фосфорилування при бродінні відбувається зв'язування неорганічного фосфату і концентрація останнього знижується.

Хід роботи.

1. 1 г дріжджів розтирають у ступці з 1 г сахарози і 5 мл води, додаючи 5 мл фосфорнокислих солей (розчин, котрий містить 60 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 20 г KH_2PO_4 у 1 л).

2. Відбирають 2 мл отриманої суспензії й осаджують білки, додавши 3 мл 3 % розчину ТХО (проба № 1).

3. Іншу суспензію переносять в дві пробірки в однакових кількостях.

4. Доливають в одну пробірку 1 мл 1 % розчину фторида натрію, у другу 1 мл води.

7. Поміщають у водяну баню при 37 °С.

8. Через 30 хв, а далі ще через 30 хв відбирають з кожної пробірки по 1 мл суспензії (проби № 2, 3 і № 4, 5) і осаджують кожну пробу 3 мл ТХО.

9. Відфільтровують кожну пробу через складчастий фільтр, відбирають у мірні колбочки по 1 мл фільтрату і доливають з бюретки по 10 мл води.

10. Додають по 1 мл розчину молібденовокислого амонію (2,5 % розчин 5 н. H_2SO_4), по 0,5 мл 0,25 % розчину ейконогена чи 0,5 % розчину аскорбінової кислоти, доводять водою до мітки 25 мл, перемішують і залишають на 15 хв. Розвивається синє забарвлення. Інтенсивність кольору тим слабкіше, чим пізніше узята проба, що вказує на зменшення концентрації неорганічного фосфату в ході розвитку процесу бродіння.

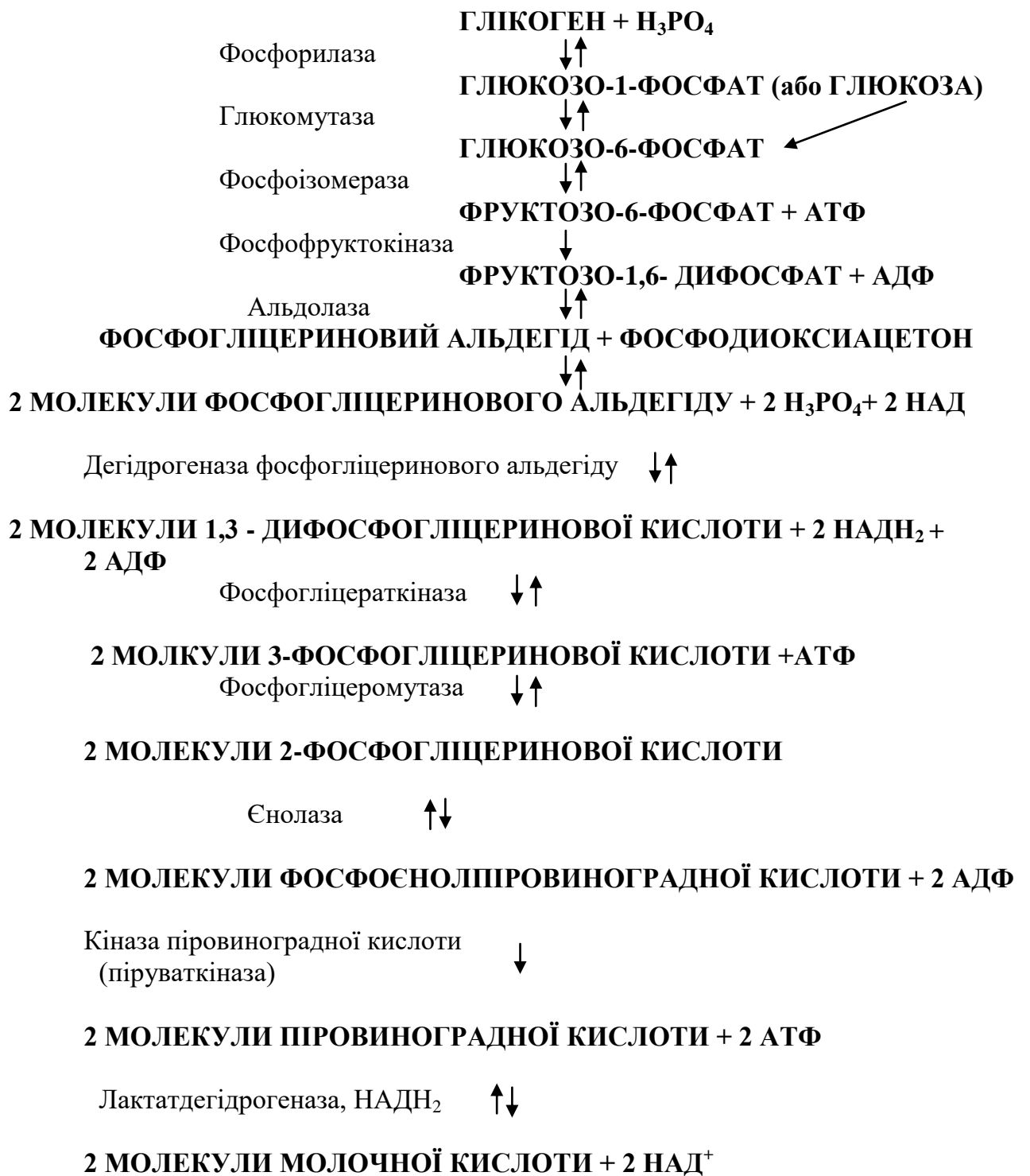
Концентрацію неорганічного фосфату визначають колориметрично.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 28 АНАЕРОБНИЙ РОЗПАД ГЛІКОГЕНУ ДО МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ

Якщо до м'язового гомогенату додати розчин глікогену чи крохмалю і створити сприятливі умови середовища (температура, анаеробіоз), то через якийсь час у суміші можна знайти молочну кислоту. Утворення молочної кислоти обумовлено наявністю в м'язовому гомогенаті гліколітичних ферментів, каталізуючих розщеплення крохмалю через ряд проміжних етапів до молочної кислоти.

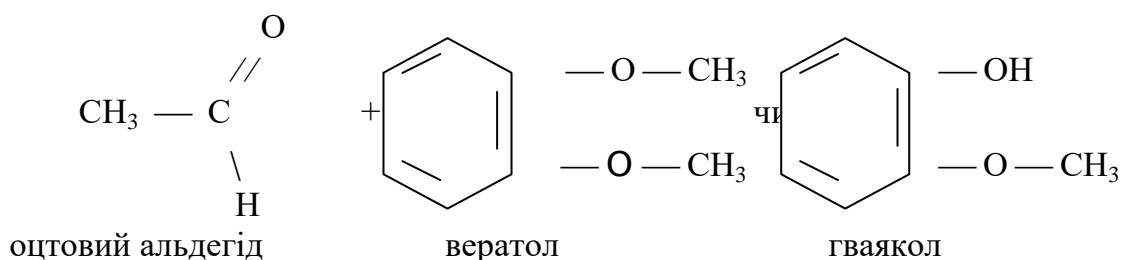
Схематичний процес анаеробного розщеплення вуглеводів у м'язах можна представити наступним чином :



Для виявлення молочної кислоти її переводять в оцтовий альдегід за допомогою концентрованої сірчаної кислоти:



Оцтовий альдегід відкривають кольоровою реакцією з вератолом (диметиловий ефір пірокатехіну). Можна використовувати розчин гваяколу (монометиловий ефір пірокатехіну).



Хід роботи. У дві пробірки (контрольну і дослідну) поміщають по 0,5 г свіжоприготованого м'язового гомогенату (зі свіжого м'яса) і 3 мл фосфатного буферу рН = 8,0. У першу (контрольну) пробірку додають 2 мл 5 % розчину метафосфорної кислоти для руйнування ферментів м'язової тканини і 1 мл дистильованої води. В другу пробірку (дослідну) додають 1 мл 0,5 % розчину глікогену чи крохмалю.

В обидві пробірки наливають по 10 крапель вазелінової олії для створення анаеробних умов. Пробірки поміщають у термостат при температурі 37 °С на 1 годину. Після інкубації в дослідну пробірку додають 2 мл 5 % розчину метафосфорної кислоти для припинення дії ферментів.

Вміст пробірок фільтрують через паперовий фільтр у дві чисті пронумеровані пробірки. До отриманого фільтрату додають 0,5 г гідроксиду кальцію і 1 мл напівнасиченого розчину сірчаної кислоти міді для осадження вуглеводів, що є присутніми у фільтратах. Пробірки треба часу від часу збовтувати. Через 15 хв осад вуглеводів відфільтровують і одержують два прозорих фільтрати: контрольний і дослідний.

З фільтратами проводять реакцію на присутність молочної кислоти. Для цього в дві чисті пронумеровані пробірки відбирають: у першу – 10 крапель фільтрату контрольної проби, у другу – 10 крапель фільтрату дослідної проби. Пробірки ставлять у крижану баню й обережно, по краплях, додають у кожен концентровану сірчану кислоту (приблизно 30-50 крапель). Сильне перегрівання може призвести до обвуглювання молочної кислоти. Для прискорення процесу окислювання молочної кислоти обидві пробірки переносять у киплячу баню на 4 – 5 хв, і потім швидко охолоджують у крижаній бані і додають по 3 краплі 0,2 % спиртового розчину вератролу чи гваяколу. Через деякий час у дослідній пробі, де під впливом ферментів м'язової тканини відбувається гліколіз, з'являється червоне забарвлення, а в контрольній пробі, де ферменти були зруйновані, – рожеве. Поява слабкого забарвлення в контрольній пробі обумовлена присутністю у самому м'язовому гомогенаті слідів молочної кислоти, що утворилася до початку досліду.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

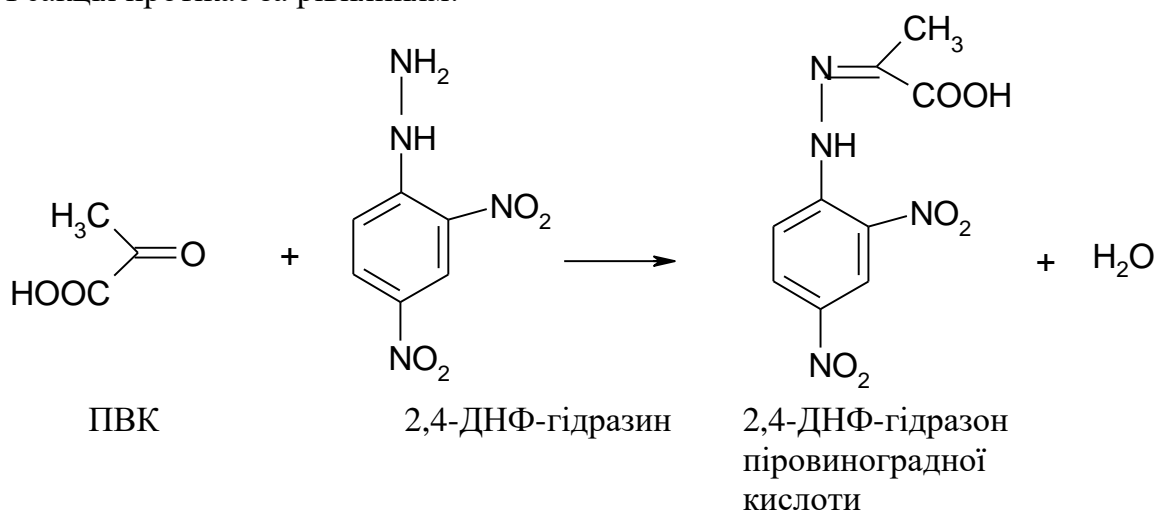
Лабораторна робота № 29 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОВІНОГРАДНОЇ КИСЛОТИ В СЕЧІ

Піровиноградна кислота (ПВК) є проміжним продуктом розпаду вуглеводів в організмі. Вона міститься в усіх органах і тканинах.

Вміст ПВК в крові і сечі зростає при цукровому діабеті, серцевій недостатності, гіперфункції гіпофізарно-адrenalової системи, токсикозах, при введенні деяких лікарських засобів, а також при недостатності тіаміну.

Мета роботи: визначити кількість піровиноградної кислоти в сечі.

Принцип методу: піровиноградна кислота, взаємодіючи з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФ-гідразин), в лужному середовищі утворює 2,4-динітрофенілгідразони піровиноградної кислоти жовто-оранжевого кольору, інтенсивність забарвлення яких пропорційна концентрації піровиноградної кислоти. Реакція протікає за рівнянням:



Хід роботи.

Реагенти, етапи	Дослід	Контроль
Сеча, мл	1	—
H ₂ O, мл	—	1
Спиртовий розчин КОН (2,5 %), мл	1	1
Перемішують протягом 1 хв		
2,4-ДНФГ (0,1 % розчин 2 М HCl), мл	0,5	0,5
Инкубують 15 хв при кімнатній температурі		
Фотометрують проти H ₂ O при λ = 490 нм, товщині кювети 0,5 см D ₄₉₀		
Dд – Dк		

Будують калібрувальний графік залежності D₄₉₀ від вмісту ПВК, використовуючи наступні дані:

ПВК, мкг	Dд- Dк
5	0,08
10	0,14
20	0,29
30	0,45
40	0,60
50	0,78

Розрахунок змісту ПВК в сечі (на діурез 1500 мл) здійснюють за формулою:

$$\frac{\text{мкг ПВК} \cdot 1500}{1000} = \text{мг / добу.}$$

Для перерахунку вмісту ПВК (в мг) в одиниці кількості речовини (мкмоль) треба помножити відповідні величини на 11,4 (коефіцієнт перерахунку).

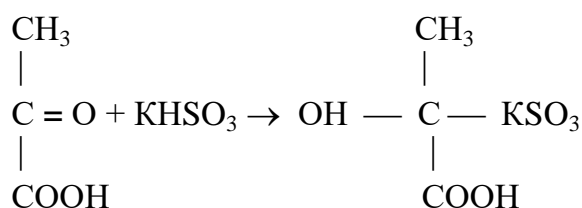
Нормальний вміст складає 10-25 мг / добу, або 114-284 мкмоль / добу пірвіноградної кислоти.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Лабораторна робота № 30 ВИЗНАЧЕННЯ ПІРВІНОГРАДНОЇ КИСЛОТИ В СІРОВАТЦІ КРОВІ

Пірвіноградна кислота – нормальна складова частина плазми крові (0,8-1,5 мг%). При нестачі вітаміну В₁ і викликаному внаслідок цього порушенні процесу декарбоксілювання кетокислот значно збільшується вміст пірвіноградної кислоти в крові, мозку й інших тканинах.

Пірвіноградна кислота в кислому середовищі утворює дисульфідну сполуку з кислотними солями сірчистої кислоти (бісульфітом калію чи натрію):



Сіль сірчистої кислоти беруть у деякому надлишку, що потім зв'язується йодом:



Бісульфітна сполука пірвіноградної кислоти руйнується в лужному середовищі, при цьому звільнюється бісульфіт, кількість якого еквівалентна вмісту пірвіноградної кислоти. Кількість бісульфіту, що звільнився, визначають титруванням йодом.

Хід роботи. У конічну колбу на 25 мл вносять піпеткою 1 мл сироватки крові, доливають 10 крапель розчину бісульфіту калію чи натрію, суміш збовтують і колбу ставлять у темне місце на 15 хв.

Після закінчення зазначеного часу надлишок бісульфіту зв'язують 0,1 н. розчином йоду, додаючи його краплями (у присутності крохмалю) до появи синього кольору. Для видалення надлишку йоду доливають по краплях 0,1 н. розчин тіосульфату натрію (гіпосульфіту) до знебарвлення вмісту колби, після чого додають (також по краплях) 0,01 н розчин йоду (для зв'язування надлишку тіосульфату) до появи синього забарвлення від останньої краплі розчину.

Потім доливають 10 крапель насиченого розчину двовуглекислого натрію (синє забарвлення зникає) і рідину колби титрують (з мікробюретки) 0,01 н. розчином йоду до відновлення синього кольору, що зберігається 20-30 секунд.

Вміст піровиноградної кислоти в мг% розраховується за формулою:

$$X = \frac{EA \times 0,01}{I} \times 100,$$

де

Е - грам-еквівалент піровиноградної кислоти;

А - кількість 0,01 н розчину йоду, витраченого на титрування, мл;

0,01 - нормальність розчину йоду;

І - кількість сироватки крові, яка взята для дослідження, мл.

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Контрольні питання

1. Загальні принципи обміну речовин і енергії. Катаболізм і анаболізм - основні процеси метаболізму. Роль НАДФН (Н⁺) і АТФ. «Метаболічна воронка».
2. Моносахариди, олігосахариди. Найважливіші представники моносахаридів і олігосахаридів тваринного організму. Хімічна будова, біологічна роль.
3. Полісахариди. Глікоген, його будова і властивості, поширення і роль в організмі. Синтез глікогену та його регуляція.
4. Анаеробне розщеплення вуглеводів в організмі, його біологічне значення. Енергетичний ефект. Поняття про субстратне фосфорилування.
5. Гліколіз. Регуляція. Енергетичний ефект анаеробного розпаду вуглеводів.
6. Глюконеогенез. Енергетичний ефект процесу. Регуляція.
7. Окислювальне декарбоксілювання піровиноградної кислоти. Ферменти і коферменти, що беруть участь в цьому процесі.
8. Цикл трикарбонових кислот. Його біологічне значення. Регуляція.
9. Зв'язок ЦТК з процесами біологічного окислення.
10. Окислювальне фосфорилування. Хеміосмотична теорія П. Мітчелла. Синтез АТФ.
11. Енергетичний ефект анаеробного і аеробного шляхів розпаду вуглеводів.
12. Пентозофосфатний шлях окислення глюкози в тканинах і його біологічна роль.
13. Механізми регуляції вмісту глюкози в крові. Явища гіпо- та гіперглікемії.
14. Синтез і розпад глікогену в печінці. Глікогеноліз в м'язах. Регуляція цих процесів.
15. Регулювання та порушення вуглеводного обміну.
16. Можливі шляхи перетворення глюкозо-6-фосфату в печінці.

РОЗДІЛ 7. ОБМІН ЛІПІДІВ

Ліпіди – це група різномірних за хімічною структурою органічних речовин, загальною властивістю яких є нерозчинність у воді.

Функції ліпідів в організмі:

- енергетична: запасає та зберігає енергію (нейтральні жири).
- захисна (ліпідний шар шкіри тварин захищає їх від механічних і температурних впливів);

- структурна (багато ліпідів є структурними компонентами клітинних мембран);
- регуляторна (деякі гормони мають ліпідну природу).

РОЗЩЕПЛЕННЯ ЛІПІДІВ У ТРАВНОМУ ТРАКТІ ЛЮДИНИ

Тріацилгліцериди, тобто жири, надходять в організм з їжею тваринного і рослинного походження. У великій кількості вони містяться в салі, рослинній олії і вершковому маслі, м'ясі, курячих яйцях, печінці.

Розщеплення ліпідів у травному тракті людини має кілька стадій. Для цього процесу необхідні ліполітичні ферменти (і відповідні умови для їхньої діяльності) і емульгатори (детергенти). За сучасною класифікацією ліполітичні ферменти відносяться до групи гідролаз, які каталізують розщеплення різних ліпідів. У травному тракті людини субстратами гідролітичного розщеплення є триацилгліцероли, фосфоліпіди, ефіри холестеролу.

Оптимальна умова для дії ліполітичних ферментів – рН 7,8...8,2. Гідролітичному розщепленню в шлунку піддаються тільки емульговані жири. Такі ліпіди містяться в молоці і молочних продуктах, яєчному жовтку, майонезах. Всі інші жири їжі мають потребу в емульгаторах, що знижують поверхневий натяг і перешкоджають склеюванню жирових крапель.

Емульгатори мають гідрофільні і гідрофобні групи, вони оточують кожную краплю жиру таким чином, що гідрофільні групи звертаються до води, а гідрофобні – до жиру. Основними емульгаторами жирів у травному тракті людини є солі жовчних кислот.

У порожнині рота переварювання ліпідів не відбувається через відсутність ліпаз. У шлунку йде незначний гідроліз емульгованих жирів під дією малоактивної ліпази шлункового соку. Основна кількість харчових жирів гідролізується в тонкому кишечнику під дією ліпази, що утворюється в підшлунковій залозі.

Емульгування жирів відбувається в порожнині кишечника під впливом дрібних пухирців вуглекислого газу, що рясно виділяються при нейтралізації соляної кислоти харчової кашки бікарбонатами підшлункового і кишкового соків. У процесі перистальтики кишечника жири роздрібнюються на дуже дрібні краплі, що емульгуються при участі парних жовчних кислот і моноацилгліцеролів. Основну роль при цьому грають солі жовчних кислот (мила), що виділяються з жовчю в просвіт кишечника. Вони адсорбуються на поверхні крапель жиру, утворюють на них найтоншу плівку, що перешкоджає злиттю крапельок у більш великі краплі. Разом з тим жовчні кислоти різко зменшують натяг на поверхні двох фаз – води і жиру, що сприяє дробленню його крапель на більш дрібні. При цьому утвориться тонка емульсія (діаметр часток не перевищує 0,5 мкм), що полегшує ферментативний гідроліз жиру. Одночасно жовчні кислоти активують ліпазу.

Велика частина емульгованого жиру піддається гідролітичному розщепленню під дією ліпаз з утворенням гліцеролу і вищих жирних кислот.

Ліпази бувають двох типів: одна розщеплює ефірні зв'язки триацилгліцеролів у положеннях 1 і 3, інша – у положенні 2. У розщепленні моноацилгліцеролів бере участь також ліпаза, що міститься в кишковому соку.

Гідроліз є першою фазою обміну жирів. Жирні кислоти, що виділилися з розщеплених гліцеролів, погано розчиняються у воді і всмоктуються ворсинками

кишечнику лише після взаємодії з жовчними кислотами з утворенням парних розчинних комплексів. В епітеліальних клітинах ворсинок кишечника відбувається їхнє розщеплення на жовчні і жирні кислоти. Жовчні кислоти знову безпосередньо надходять у просвіт кишечника або проходять більш складний шлях: кров – печінка – жовчний міхур – жовч.

Постійна циркуляція жовчних кислот забезпечує велику кількість всмоктуваних жирів при порівняно обмеженому виробленні печінкою жовчних кислот (2,8...3,5 г у добу).

Переварювання ліпідів відбувається як у порожнині кишок (порожнинне травлення), так і на слизовій оболонці тонкої кишки (пристінкове або контактне травлення). Зокрема, на поверхні клітин адсорбується ліпаза соку підшлункової залози (панкреатична), яка каталізує гідроліз жирів.

Хіломікрони утворюються в клітинах слизової оболонки кишечника. Вони забезпечують транспорт ліпідів (триацилгліцеролів) з кишечника в лімфу. Хіломікрони через грудну лімфатичну протоку надходять у кровоток і транспортуються в "жирові депо" і печінку.

Холестерол попадає в шлунково-кишковий тракт людини переважно з яєчним жовтком, м'ясом, печінкою, мізками. З їжею людина одержує щодня 0,1...0,3 г холестеролу у вільному виді або у виді його ефірів. Останні при участі ферменту панкреатичного соку – холестеролестерази розщеплюються на холестерол, що може всмоктуватися у виді комплексу з жовчними кислотами, і жирні кислоти.

Фосфоліпіди, зокрема лецитини, під впливом відповідних гідролаз, розщеплюються на гліцерол, вищі жирні кислоти, холін і фосфорну кислоту. Компоненти фосфоліпідів усмоктуються кишковою стінкою і надходять у кров (фосфорна кислота в основному у виді натрієвих і калієвих солей).

З продуктів гідролізу харчових ліпідів у клітинах кишкового епітелію ресинтезуються ліпіди, специфічні для певного виду тварин.

Важлива роль в обміні жирів належить печінці. Її ферментативні системи каталізують переважну більшість реакцій метаболізму ліпідів. У печінці синтезуються триацилгліцероли, що або затримуються в ній, або у виді ліпопротеїнів надходять у кров.

Обмін ліпідів у тканинах є біологічно найбільш важливим етапом їхнього перетворення. На цій фазі відбувається асиміляція ліпідів у виді пластичного матеріалу і розщеплення їх з вивільненням енергії. Головним ендogenousним джерелом ліпідів, що грають роль метаболічного палива, служить резервний жир, що міститься в протоплазмі клітин у виді крапельок. Для цієї мети використовуються також фосфоліпіди мембран.

У «жирових депо» при участі тканинних ліпаз відбувається гідроліз простих жирів на гліцерол і вільні жирні кислоти. Гліцерол фосфорилується за рахунок АТФ, через ряд проміжних реакцій перетворюється у фосфогліцероловий альдегід, що потім окисляється в процесі гліколізу до фосфогліцеролової і піровиноградної кислот. Остання, піддаючись окисному декарбоксілюванню, перетворюється в ацетил-КоА, що у циклі трикарбонових кислот окисляється до CO_2 і H_2O .

У виді комплексу з альбумінами вільні жирні кислоти зі струмом крові попадають в органи і тканини, де комплекс розпадається, а жирні кислоти або піддаються β -окислюванню, або використовуються в синтезі триацилгліцеролів, холестеролу, гліцерофосфоліпідів, сфінголіпідів і т.д.

β-окислення вищих жирних кислот відбувається в мітохондріях клітин при участі мультиферментного комплексу.

Енергетичний ефект β-окислення. Число циклів окислення, яким піддається вища жирна кислота, залежить від кількості карбогенових атомів у її молекулі. При окисленні однієї молекули жирної кислоти утвориться $n/2$ молекул ацетил-КоА, де n – кількість атомів Карбогену, а цикл повториться $(n/2 - 1)$ раз, тому що молекула бутирил-КоА відразу розщеплюється на дві молекули ацетил-КоА. У кожному циклі з'являються молекула ФАДН₂ і молекула НАДН₂. Молекула ФАДН₂ при окислюванні в дихальному ланцюзі і сполученого з ним фосфорилування дає дві молекули АТФ, а НАДН₂ – три молекули АТФ, тобто за один цикл β-окислювання утворюється п'ять молекул АТФ.

Кожна молекула ацетил-КоА включається в цикл трикарбонових кислот, поступово розщеплюється до СО₂ і Н₂О з виділенням 12 молекул АТФ. Як приклад розглянемо β-окислення пальмітинової кислоти.

При окисленні пальмітинової кислоти відбувається сім циклів β-окислювання – $(16/2 - 1)$, що веде до утворення 35 молекул АТФ. У результаті β-окислення цієї кислоти утворюється вісім молекул ацетил-КоА $(16/2)$, кожна з яких, окисляючись в циклі трикарбонових кислот, дає 12 молекул АТФ, тобто утворює 96 молекул АТФ. Таким чином, сумарний вихід енергії при окисленні однієї молекули пальмітинової кислоти складе: $35 + 96 = 131$ молекула АТФ. Оскільки одна молекула АТФ була витрачена на активізацію вищої жирної кислоти на початку процесу вихід енергії складе 130 молекул АТФ. Близько 45 % усієї потенційної енергії пальмітинової кислоти при її окисленні в організмі може бути використана для ресинтезу АТФ, інша утилізується у виді теплоти.

Окислення ненасичених жирних кислот відбувається так само, як і насичених, але має свої особливості, обумовлені положенням подвійних зв'язків. До початку β-окислення в молекулі жирної кислоти відбувається переміщення подвійного зв'язку з положення 3-4 у 2-3 і зміна конфігурації подвійного зв'язку з цис- у транс-положення.

Більшість природних ліпідів містить жирні кислоти з парним числом вуглецевих атомів. Однак у ліпідах рослин і деяких морських організмів виявляються жирні кислоти з непарним числом вуглецевих атомів. Вони також піддаються β-окисленню, у результаті якого з'являються ацетил-КоА і пропіоніл-КоА. Останній перетворюється в сукциніл-КоА – метаболіт циклу Кребса.

Процес β-окислення вищих жирних кислот за участю HS коензиму А активніше протікає в печінці, жировій тканині, серцевому і кістяковому м'язах, слабкіше – у нирках, підшлунковій залозі та інших органах.

Ліпідний обмін в організмі регулюється центральною нервовою системою. Кора головного мозку впливає на жирову тканину через симпатичну і парасимпатичну нервову систему і ендокринні залози. Кількість жиру в «жирових депо» зменшується при тривалому негативному емоційному стресі, що супроводжується збільшенням викиду гормону надниркових залоз адреналіну в кровоносне русло, що призводить до зменшення маси тіла. Цей ефект пояснюється тим, що жирова тканина рясно іннервована волокнами симпатичної нервової системи, а норадреналін, що виділяється, як і адреналін, збільшує швидкість ліполізу в жировій тканині. Крім того, адреналін через систему відповідних ферментів сприяє утворенню активної форми ліпази. Дія глюкагону і тироксину подібно впливу адреналіну і норадреналіну (катехоламінів): вони стимулюють ліполіз.

У нормі вміст загальних ліпідів у крові складає 400...800 мг/л. Він змінюється в залежності від статі, віку, характеру і режиму харчування, рівня фізичної активності.

Порушення ліпідного обміну можуть наставати вже в процесі переварювання й усмоктування жирів унаслідок захворювань травного тракту. Крім того, вони можуть бути зв'язані з недостатнім надходженням у кишечник ліпази соку підшлункової залози або жовчі.

При спадкоємному захворюванні, обумовленому недостатньою активністю ліпопротеїнліпази крові, порушується перехід жирних кислот з хіломікронів плазми в «жирові депо». У плазмі збільшується вміст хіломікронів, внаслідок чого вона здобуває молочний колір. Підвищення рівня ліпідів у крові (гіперліпемія) може бути викликано фізіологічними причинами, наприклад, прийомом їжі (аліментарна гіперліпемія). Гіперліпемії виникають нерідко при цукровому діабеті, захворюваннях підшлункової залози (панкреатити), печінки (гепатити), нирок (нефрози). У їхній основі лежать порушення енергетичного обміну, зв'язані з недостатнім використанням вуглеводів і посиленням окиснюванням жирів. При цьому активізуються процеси мобілізації жиру (триацилгліцеролів) з «жирових депо». Він надходить у кров (транспортна гіперліпемія) і доставляється до тих органів, що мають недолік в енергії.

Лабораторна робота № 31 **КІНЕТИКА ДІЇ ЛІПАЗИ**

Ліпаза – фермент підшлункової залози, що каталізує гідроліз складнофірних зв'язків в молекулі триацилгліцеролів (ТАГ) в тонкому кишківнику. Найбільш активно панкреатична ліпаза каталізує гідроліз першого і третього складнофірних зв'язків ТАГ з утворенням ди- і моноацилгліцеролів (ДАГ і МАГ), потім здійснюється гідроліз 2-моноацилгліцеролів. У кишківнику можуть всмоктуватися тільки продукти гідролізу ТАГ: гліцерин, вищі жирні кислоти, ДАГ і МАГ.

Істотно полегшують процес перетравлення і всмоктування ліпідів жовчні кислоти: холева і хенодезоксихолева, а також їх кон'югати з гліцином і таурином. Поєднання в хімічній структурі гідрофобної (стероїдна частина) і гідрофільної частин надає парним жовчним кислотам властивості поверхнево активних речовин (детергентів), які, утворюючи мікроемульсію, активують субстрат ліпази і дифузюю продуктів ліполізу в епітеліальні клітини ворсинок кишківника. При цьому фермент і субстрат знаходяться в різних фазах (не змішуються рідини) і взаємодіють тільки на границі розділу фаз.

Величина поверхні контакту ферменту і субстрату визначає швидкість гетерогенного каталізу: чим більша поверхня, тим вища швидкість ферментативної реакції. Детергентна дія жовчних кислот призводить до зменшення сили поверхневого натягу на межі поділу фаз і велика крапля жиру розпадається на безліч дрібних крапель, доступних дії ферменту.

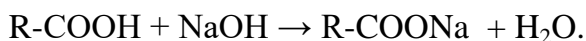
Дефіцит ліпази найчастіше пов'язаний із захворюваннями підшлункової залози і супроводжується панкреатичною стеатореєю (високий вміст ТАГ в калі без зміни його забарвлення). Втрата води і електролітів призводить до порушення всмоктування жиророзчинних вітамінів.

Порушення екскреторної функції підшлункової залози при перекритті її протоки (закупорка каменем, запальний процес), при панкреатитах або

безпосередньому пошкодженні тканини залози (пухлина, атеросклероз судин, крововилив та ін.) істотно позначається на жировому обміні.

Мета роботи. Оцінити кінетику дії ліпази, визначити характер впливу жовчі на активність панкреатичної ліпази.

Принцип методу. Як джерело нейтрального жиру (ТАГ) використовують молоко. Дію ферменту оцінюють за швидкістю утворення кислих продуктів розщеплення (вільних ВЖК). Для цього від загального обсягу суміші жиру з ліпазою через певні проміжки часу відбирають для титрування рівні частини. Титрування кислих продуктів гідролізу здійснюють розчином гідроксиду натрію (індикатор – фенолфталеїн):



Результати виражають у мілілітрах розчину лугу, який був витрачений на титрування і представляють у вигляді графіка залежності змісту ВЖК в пробі від часу інкубації проби.

Хід роботи. У два стаканчика наливають по 10 мл розведеного водою (1 : 1) молока. В один із стаканчиків вносять 1 мл жовчі (проба 1), в інший – 1 мл H_2O (проба 2).

З кожної проби відбирають в колбу для титрування по 2 мл утвореної суміші і титрують 0,01 М розчином NaOH в присутності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення.

Потім в кожному стаканчику додають по 1 мл розчину ліпази (витяжка з підшлункової залози), швидко перемішують струменем з піпетки і відзначають час початку реакції. Повторні титрування проводять через кожні 5 хв.

Значення титрування без ліпази (час реакції «0») враховують із величини наступного титрування. В цьому випадку отримані криві пройдуть через початок координат, так як віднімається вихідна кількість органічних кислот, присутніх в молоці (вихідна кислотність молока).

Отримані результати оформлюють у вигляді кривої, що показує динаміку відщеплення вільних ВЖК в часі під дією ліпази в присутності і під час відсутності жовчі.

Нижче наведена типова крива динаміки відщеплення вільних ВЖК в часі під дією ліпази в присутності (крива 1) і під час відсутності (крива 2) жовчі.

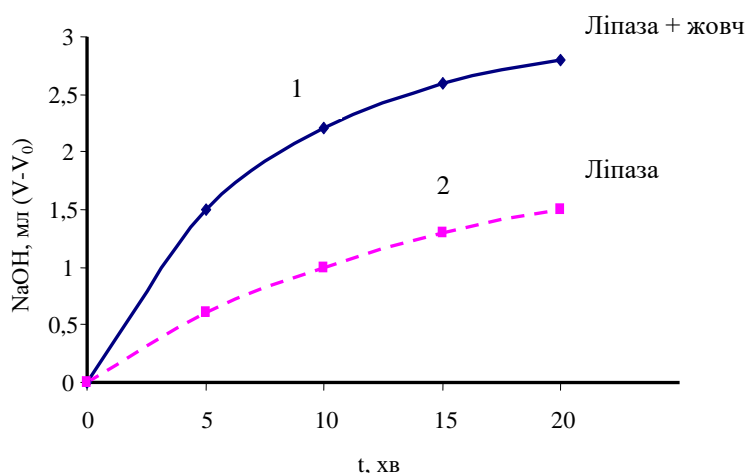


Схема визначення активності ліпази

I. Приготування вихідної суміші		
Реактиви та етапи	Проба 1	Проба 2
1. Молоко, розбавлене водою (1 : 1) 2. Вода 3. Жовч	10 мл - 1 мл	10 мл 1 мл -
II. Визначення вихідної кислотності молока		
	Колба для титрування 1	Колба для титрування 2
1. Вихідна суміш (відбирають аліквоту з стаканчика в колбу для титрування). 2. Фенолфталеїн (додають в кожну колбу) Титрують проби розчином NaOH (до рожевого кольору). Значення записують в таблицю результатів (V_0 і V_0').	2 мл 1-2 краплі	2 мл 1-2 краплі
III. Відбір суміші і титрування в присутності ліпази		
До залишиної вихідної суміші в обидва стаканчика швидко додають по 1 мл ліпази і відзначають час. Через кожні 5 хв відбирають аліквоти в колби для титрування.		
	Колба для титрування 1	Колба для титрування 2
1. Аліквота 2. Фенолфталеїн Швидко титрують розчином NaOH (до рожевого кольору). Значення записують в таблицю результатів (V і V'). Повторні титрування проводять через кожні 5 хв і результати заносять в наступну таблицю.	2 мл 1-2 краплі	2 мл 1-2 краплі

Оформлення результатів

t, хв	проба № 1 (з жовчю)		проба № 2 (без жовчи)	
	V (NaOH), мл	V-V ₀	V (NaOH), мл	V-V ₀
0 (визначення вихідної кислотності молока)	V ₀ =	0	V ₀ =	0
5	V =		V =	
10				
15				
20				
		за отриманими даними будують кінетичну криву № 1		за отриманими даними будують кінетичну криву № 2

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Контрольні питання

1. Механізм β-окислення вищих жирних кислот. Роль КоА, карнітину і АТФ в цьому процесі.
2. Особливості окислення вищих жирних кислот з непарним числом вуглецевих атомів.
3. Перетворення гліцерину. Енергетичний ефект повного аеробного окислення молекули гліцерину.
4. Біосинтез вищих жирних кислот.
5. Синтез фосфатидилхоліну.
6. Ацетонові (кетонові) тіла, синтез, біологічна роль.
7. Холестерин, його біологічна роль. Основні етапи синтезу. Кількісне визначення холестерину в сироватці крові.
8. Транспорт ліпідів в організмі. Ліпопротеїни сироватки крові.
9. Зв'язок обміну білків, ліпідів і вуглеводів.
10. Пероксидне окислення ліпідів. Роль цитохрому P₄₅₀ у мікросомальному окисленні гідрофобних сполук.

РОЗДІЛ 8. ОБМІН МІНЕРАЛЬНИХ РЕЧОВИН

Мінеральні речовини – неодмінна складова частина живого організму. Вони відіграють важливу роль в обміні речовин, побудові тканинних і клітинних структур.

У залежності від вмісту в організмі і продуктах харчування мінеральні речовини розподіляються на дві групи:

1. Мікроелементи.
2. Макроелементи.

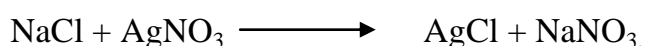
До макроелементів відносять кальцій, фосфор, калій, сірка, натрій, хлор, магній, залізо, фтор. Багато елементів виявлені в дуже невеликих кількостях (10^{-3} - 10^{-12} %), і тому їх називають мікроелементами. До них відносять йод, кобальт, цинк,

мідь, стронцій, марганець, молібден, нікель, калій і інші. Мікроелементи належать до біологічно активних речовин, а їх нестача викликає важкі захворювання.

Лабораторна робота № 32 ЯКІСНЕ І КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРИДІВ

Хлориди виділяються із сечею у вигляді хлористих солей калію, натрію, амонію, кальцію, магнію. З загальної кількості 15-25 г неорганічних сполук сечі на долю хлоридів припадає 10 – 15 г. Кількість хлоридів у сечі здорової людини приблизно відповідає вмісту повареної солі в їжі. При деяких захворюваннях (крупозна пневмонія, рак, поразка нирок і ін.) спостерігається затримка хлоридів в організмі, але після видужання виведення хлоридів із сечею збільшується. Визначення вмісту хлоридів у сечі важливо при призначенні хворим безсольової дієти.

Якісне визначення хлоридів. До 20 крапель сечі додають 2 краплі 1 % розчину азотнокислого срібла й 2 краплі 10 % розчину азотної кислоти. Випадає білий осад хлористого срібла, що темніє на світлі, нерозчинний в азотній кислоті, але розчинний в аміаку. Вміст пробірки перемішують, частину мутної рідини переливають в іншу пробірку і додають 1 – 2 краплі 10 % розчину аміаку; осад хлористого срібла розчиняється. До іншої частини рідини додають по краплях 10 % розчин азотної кислоти; розчинення осаду не відбувається:



Кількісне визначення хлоридів.

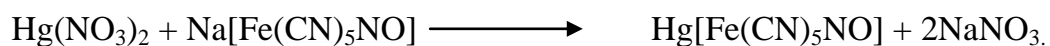
Метод Мора. Метод заснований на титруванні хлоридів сечі розчином азотнокислого срібла в нейтральному середовищі в присутності індикатора хромовокислого калію.

Хід роботи. Відмірюють 10 мл сечі в мірну колбу на 100 мл, додають 1-2 краплі фенолфталеїну і нейтралізують 0,1 н. розчином NaOH до слабо-рожевого кольору, потім доливають дистильованою водою до мітки. Перемішують, відбирають 10 мл, що містять 1 мл сечі, у конічну колбу, додають 2 краплі індикатора – хромовокислого калію і титрують 0,1 н. розчином азотнокислого срібла до цегляно-червоного кольору.

Розрахунок. Припустимо, що на титрування витрачено 1,5 мл азотнокислого срібла. Цю величину помножують на 5,85 (1 мл 0,1 н. розчину AgNO_3 відповідає 5,85 мг NaCl). Враховуючі, що за добу виділяється в середньому 1,5 л сечі, отримане число помножують на 1500; виходить 13,55 г / добу.

Метод Воточка. Метод заснований на титруванні хлоридів сечі розчином азотнокислої ртуті в присутності азотної кислоти і нітропрусиду натрію. При цьому іони хлору зв'язуються у вигляді слабо-дисоційованої хлорної ртуті (сулеми).

Поки іони ртуті зв'язані у вигляді хлорної ртуті, вони не можуть реагувати з нітропрусидом. Коли всі хлориди перейдуть у ртутну сіль, вільні іони ртуті утворять осад нітропрусиду ртуті, що і є показником кінця титрування:



Цей метод дозволяє замінити дороге срібло більш дешевою сіллю ртуті.

Хід роботи. Невелику порцію досліджуваної сечі, близько 7 – 8 мл, відфільтровують через сухий фільтр у суху колбу. У конічну колбу для титрування відмірюють 5 мл відфільтрованої сечі, додають 2-3 мл концентрованої азотної кислоти і 3 – 4 краплі 30 % розчину нітропрусиду натрію. Потім пробу відтитровують (титрувати краще на чорному фоні) 0,1 н. розчином азотнокислої ртуті до утворення муті, що не зникає протягом 1 хв.

Вміст хлористого натрію в сечі розраховують у такий спосіб: 1 мл 0,1 н. розчину азотнокислої ртуті зв'язує 0,00355 г хлору, що відповідає 0,00585 г хлориду натрію. Якщо, наприклад, на титрування 5 мл сечі витрачено 8,85 мл розчину азотнокислої ртуті, то у цьому обсязі сечі міститься $8,85 \times 0,00585 = 0,051$ г хлориду натрію, чи $8,85 \times 0,00355 = 0,031$ г хлору. Тому вміст хлориду натрію в добовій сечі складає:

$$0,051 \times 1500 / 5 = 15 \text{ г / добу,}$$

а вміст хлору, відповідно:

$$0,031 \times 1500 / 5 = 9 \text{ г / добу.}$$

Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

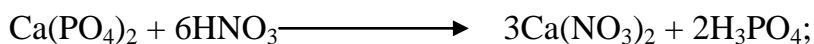
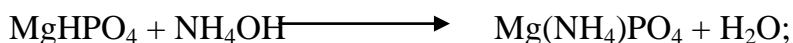
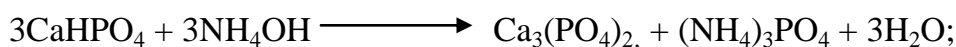
Лабораторна робота № 33 ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФОСФАТІВ

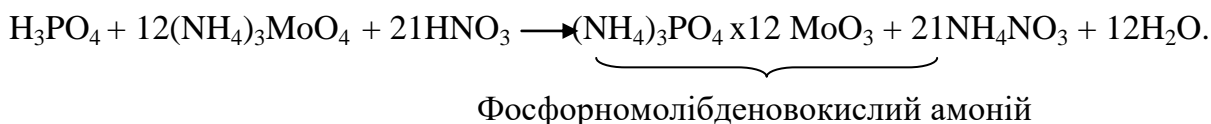
Фосфорнокислі солі утворюються в організмі в результаті розпаду органічних речовин, які містять фосфор: нуклеопротейдів, нуклеотидів, фосфопротейдів, фосфатидів, фосфорних ефірів і ін. Фосфор виділяється із сечею у вигляді однозаміщених та двоаміщених солей калію, натрію, амонію, кальцію та магнію.

Кількість солей фосфорної кислоти, виділених із сечею, відображає інтенсивність обміну сполук, що містять фосфор, і в нормі у дорослої людини в середньому складає 1,5 – 6,0 г на добу в розрахунок на P_2O_5 . Підвищений вміст фосфору в сечі буває при лейкемії, інфекційних захворюваннях; знижений – при рахіті.

Хід роботи. До 20 крапель сечі додають 2-3 краплі 10 % розчину аміаку. Утворюється осад фосфорнокислих солей кальцію і магнію. Осад відокремлюють фільтруванням і розчиняють на фільтрі в 2 – 3 краплях 10 % розчину азотної кислоти. До отриманого розчину додають 10 – 15 крапель молібденового реактиву і кип'ятять.

При нагріванні рідина забарвлюється в жовтий колір, а при охолодженні випадає кристалічний жовтий осад фосфорномолібденовокислого амонію. Реакції протікають за такими рівняннями:



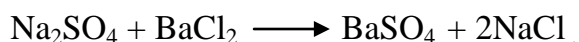


Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

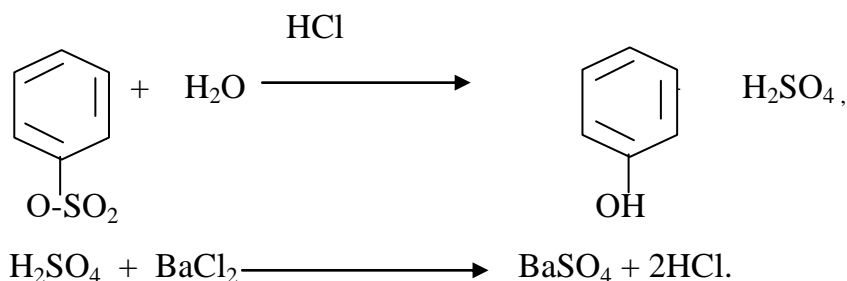
Лабораторна робота № 34 ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬФАТІВ І ЕФІРОСІРЧАНИХ КИСЛОТ

Речовини сечі, які вміщують сірку, утворюються головним чином внаслідок перетворення білків у тканинах і зокрема, перетворення амінокислот, які вміщують сірку. Сірка виділяється із сечею у вигляді неорганічних сульфатів, солей ефіросірчаних кислот і так званої нейтральної сірки (наприклад, цистеїну, роданістих солей і ін.). Кількість виділених сульфатів залежить головним чином від вмісту в їжі білків. У середньому за добу виділяється близько 2,5 г сірки у вигляді сульфатів. Кількість солей ефіросірчаних кислот збільшується за умов посилення гнильних процесів у кишечнику в зв'язку з утворенням фенолу, крезолу, індолу, скатолу, а також при отруєнні фенолом, бензином і ін. Усі ці отруйні речовини знешкоджуються в печінці шляхом перетворення в ефіри сірчаної або глюкуронової кислоти.

Хід роботи. До 20 крапель сечі додають 5 крапель 10 % розчину соляної кислоти і по краплях 5 % розчин хлористого барію до повного осадження, доти, поки наступна крапля хлористого барію не призведе до утворення змутнення. При цьому виділяється білий кристалічний осад сірчаноокислого барію, нерозчинний у кислотах і лугах:



Рідину фільтрують, кислий фільтрат ставлять у киплячу водяну баню. Через 5 – 10 хв вміст пробірки стає мутним у результаті вивільнення сірчаної кислоти при гідролізі ефіросірчаних кислот і утворенні нової порції сірчаноокислого барію; при цьому виділяються також продукти окислення фенолу, що додають рідині рожевий колір:



Висновки та пояснення щодо отриманих результатів.

Контрольні питання

1. Яка біологічна роль мінеральних солей?
2. Яка потреба організму в солях?
3. Механізм всмоктування мінеральних солей.
4. Шляхи виділення солей з організму.
5. Основні функції мінеральних речовин у клітині.

РОЗДІЛ 9. ІНТЕГРАЦІЯ І РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ШЛЯХІВ

1. Інтеграція клітинного метаболізму

Обмін речовин в живих організмах суворо інтегрований, завдяки чому підтримується постійність внутрішнього середовища та цілісність організму протягом всього онтогенезу. Процеси обміну білків, нуклеїнових кислот, ліпідів та вуглеводів тісно пов'язані і цей зв'язок полягає у взаємному перетворенні одних речовин в інші за фізіологічними потребами самого організму. Таким чином, всі перетворення складають цілісний процес метаболізму. Принципово важливим є те, що процеси анаболізму та катаболізму пов'язані між собою, в першу чергу, завдяки пірвіноградній кислоті, ацетил-КоА та проміжним сполукам циклу лимонної кислоти – оксалоацетату та кетоглутарату. Піруват знаходиться в точці перехрестя цілого ряду метаболічних шляхів. Він пов'язує гліколіз і глюконеогенез, а також обмін вуглеводів з обміном ліпідів, білків, ізопреноїдів, кетонів тіл. Утворюється піруват в клітині в основному при катаболізмі гексоз та окисленні лактату, який накопичується у м'язах за умов анаеробного гліколізу. Потрапляючи на шлях глюконеогенезу, піруват перетворюється в глюкозу (ця послідовність реакцій відома як цикл Корі). Аланін є продуктом трансамінування пірувату з амінокислотами, що утворюються в процесі протеолізу білків. В печінці аланін знову перетворюється в піруват, виконуючи роль переносника амонійного азоту, котрий включається в цикл утворення сечовини. Крім того, утворений з пірувату аланін може залучатися до складу пептидів.

Піруват приймає участь в реакціях карбоксилювання та декарбоксилювання. В першому випадку утворюється оксалоацетат (анаплеротична реакція), котрий може залучатися до циклу лимонної кислоти, або переутворення на фосфоенілпіруват, а далі – на глюкозу; в другому випадку піруват піддається окислювальному декарбоксилюванню з утворенням ацетил-КоА, котрий також є ключовим метаболітом для ще більш розгалужених метаболічних шляхів. Саме ацетил-КоА – активована форма оцтової кислоти – є пов'язуючою ланкою в обміні білків, ліпідів та вуглеводів. Жирні кислоти і практично всі амінокислоти перетворюються в ацетил-КоА, який конденсується з оксалоацетатом, забезпечує просування послідовних реакцій циклу Кребса. До цього циклу залучаються і деякі амінокислоти після перетворення їх в кетоглутарат, оксалоацетат, сукцинат та фумарат.

Коло лимонної кислоти – основний шлях, на якому відбувається окислювальний розпад білків, жирів та вуглеводів до вуглекислого газу та води. Всі інтермедіати цього кола є загальними проміжними продуктами перетворення білків, жирів і вуглеводів. Одночасно окремі інтермедіати можуть бути учасниками різноманітних процесів біосинтезу. Так, наприклад, оксалоацетат та кетоглутарат після переамінування утворюють відповідно аспартат і глутамат, які

використовуються для біосинтезу білків, беруть участь в детоксикації аміаку. Доля ацетил-КоА, як і інших кетонових метаболітів, залежить від потреб клітини: він може бути окислений, конденсуватися до попередника холестерину, перетворюватися в жирні кислоти, може приймати участь у синтезі аргініну, лейцину (рисунок 1).

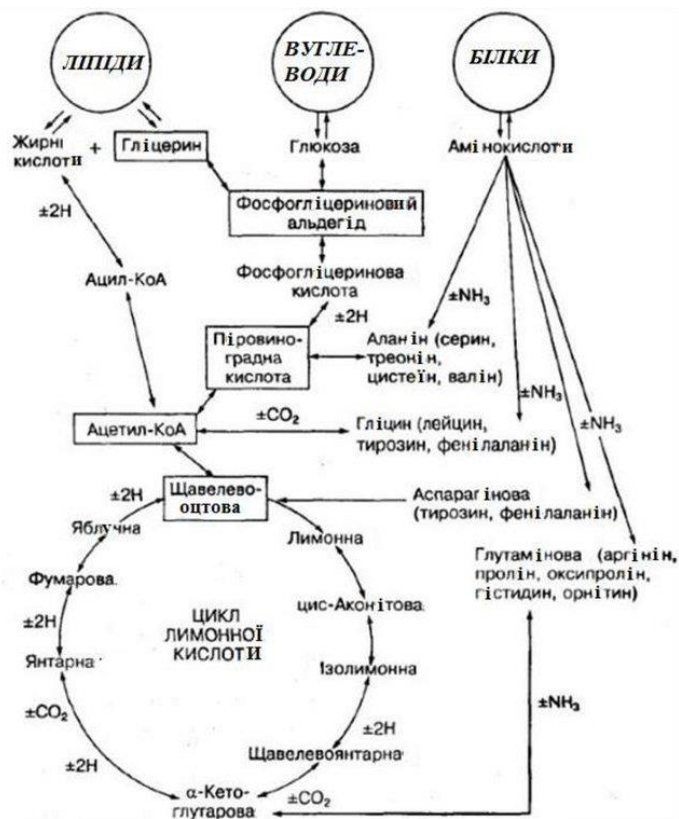


Рисунок 1. Інтеграція шляхів клітинного метаболізму.

Таким чином, всі метаболічні процеси, що відбуваються в клітині, тісно пов'язані між собою за допомогою проміжних метаболітів, які є продуктами одних метаболічних шляхів і субстратами інших. Такий взаємозв'язок і взаємозалежність метаболічних процесів дозволяє клітині координувати свої можливості з потребами і швидко налаштувати рівень обміну речовин у відповідності до умов оточуючого середовища, що постійно змінюється. І цілком зрозуміло, що інтеграція клітинного обміну речовин була б неможливою без функціонування спеціальних механізмів регуляції метаболічних шляхів.

2. Регуляція метаболічних шляхів

Перший рівень регуляції метаболічних шляхів визначається кількістю ферментів, які каталізують біохімічні реакції, періодом їх напіврозпаду та протеолітичною деградацією.

Другий рівень регуляції обміну визначається каталітичною активністю ферментів, яка контролюється алостеричними модуляторами, активаторами, конкурентними інгібіторами та посттрасляційною модифікацією, як то фосфорилування, ацетилювання та глікозилування під контролем гормонів, ростових факторів та нейротрансмітерів.

Третій рівень регуляції метаболізму пов'язаний з концентрацією субстратів, яка контролюється стаціонарними умовами та компартменталізацією. З останньою пов'язані різні форми транспорту речовин: проста дифузія, полегшений транспорт та активний транспорт.

Регуляція на рівні транскрипції

Транскрипційний рівень регуляції необхідний для зміни кількості мРНК, що визначають структуру ферментів, а також гістонів, рибосомальних та транспортних білків. В той же самий час транскрипційний процес залежить від індукції та репресії відповідних генів.

Алостерична регуляція активності ферментів

Алостерична регуляція є одним з найбільш швидкодіючих типів модуляції активності ключових метаболічних ферментів. Вона здійснюється за допомогою ефекторів, які взаємодіють з алостеричним центром ферменту. В будь-якому анаболічному або катаболічному процесі є хоча б одна лімітуюча реакція, яка каталізується ключовим ферментом. Ефекторами алостеричних ферментів можуть бути іони, субстрати та продукти метаболічних шляхів (наприклад, прості іони металів і складні молекули цАМФ та цГМФ). Вони можуть здійснювати активацію або інгібування ферментів. Яскравими прикладами алостеричної регуляції можуть слугувати фосфофруктокіназа (гліколіз), піруватдегідрогеназа (окислювальне декарбоксілювання пірувату), аспартаткарбомойлтрансфераза (синтез піримідинових нуклеотидів) та інші ферменти.

Ковалентна модифікація ферментів

Суть даного типу регуляції полягає в перетворенні активних форм ферментів в неактивні й навпаки. Здійснюється це шляхом ковалентного приєднання, наприклад, фосфорної кислоти, оцтової кислоти, АМФ та інших невеликих молекул до радикалів серину, тирозину або треоніну.

Модифікація ферментів може контролюватися гормонами. Наприклад, метаболізм глікогену визначається активністю глікогенфосфорилази (мобілізація глікогену) і активністю глікогенсинтази (глікогеногенез), які регулюються координовано: за умов прояву активності одного з ферментів інший переходить в неактивний стан.

Гормональна регуляція метаболізму

Ліпофільні гормони транспортуються в цитозоль клітини, де з'єднуються з білками-рецепторами, далі потрапляють в каріоплазму і створюють зі спеціальними ядерними білками потрійні комплекси, що здатні регулювати транскрипцію певних генів.

Гідрофільні гормони діють на клітини-мішені за рахунок зв'язування з рецепторами, розташованими на плазматичній мембрані. Крім гормонів аналогічно діють гормоноподібні та сигнальні речовини: медіатори, нейромедіатори, ростові фактори (гістамін, простагландіни та інші).

Зміна концентрації метаболітів

Концентрація субстратів є важливою умовою, яка забезпечує швидкість проходження того, чи іншого метаболічного шляху. В свою чергу набувають певного значення субстратна конкуренція та швидкість транспорту субстратів через плазматичні мембрани та мембрани органел. Крім того, швидкість метаболічних процесів визначається концентрацією кофакторів. Так, гліколіз та цикл Кребса регулюються вмістом АДФ на рівні зміни активності ключових алостеричних ферментів.

Компартменталізація метаболічних шляхів

У еукаріотів важливу роль в регуляції і інтеграції клітинного метаболізму відіграє компартменталізація, тобто розмежування шляхів метаболізму в просторово розподілених мембранами ділянках клітини (компартментах). Вибіркова проникність

мембран визначає долю цілої низки метаболітів. При цьому швидкість трасмембранного переносу речовин, їх взаємодія з компонентами мембрани слугують специфічним сигналом зміни стану клітини, спрямованості в ній метаболічних шляхів.

Що стосується компартменталізації метаболічних шляхів в еукаріотичній клітині, то вона виглядає наступним чином:

1) З цитозолем пов'язані:

- гліколіз;
- пентозофосфатний шлях;
- синтез жирних кислот;
- синтез триацилгліцеролів;
- синтез нуклеозидтрифосфатів;
- глюконеогенез;
- глікогеноліз;
- глікогеногенез;
- синтез протеїнів;

2) З мітохондріями пов'язані:

- окислювальне декарбоксілювання пірувату;
- коло лимонної кислоти;
- окислення жирних кислот;
- синтез кетонових тіл;
- окислювальне фосфорилування;

3) З цитозолем та мітохондріями пов'язані:

- глюконеогенез;
- синтез сечовини;
- синтез гему;

4) З ядром пов'язані:

- матричні синтези ДНК та РНК.

Мембранна регуляція метаболізму

Найважливішими функціями біомембран є: бар'єрна, транспортна, осмотична, електро-хімічна, структурна, біосинтетична, рецепторна, регуляційна та інші. Компоненти мембран чутливі до дії фізичних та хімічних факторів і як результат цього впливу формується адаптація органел і клітини в цілому до сигналів як внутрішнього, так і зовнішнього середовищ. Складові компоненти мембран синтезуються під контролем генетичного апарату клітини та в свою чергу контролюють його роботу.

В основі мембранної регуляції полягає нерівноважний стан, що підтримується в кожній клітині на певному стаціонарному рівні завдяки роботі іонних насосів. Наприклад, концентрація кальцію в цитоплазмі підтримується на дуже низькому рівні. Підвищення концентрації цього катіону впливає на активність Ca^{2+} -залежних протеїніназ, які фосфорилують білки, стан цитоскелету, скорочувальну активність актоміозинових комплексів цитоплазми, секреторну, мітотичну та мейотичну активність та інше. Ці процеси кальцій регулює, зв'язуючись з кальмодуліном та іншими білками. Найбільш складними є механізми регуляції метаболізму в клітинах з залученням гідрофільних гормонів, які контактують з відповідними рецепторами мембран. При цьому починають працювати такі механізми як аденілатциклазний,

гуанілатциклазний та фосфоліпазний, проміжним результатом яких є створення внутрішньоклітинних месенджерів та інших біологічно-активних сполук (рисунк 2).

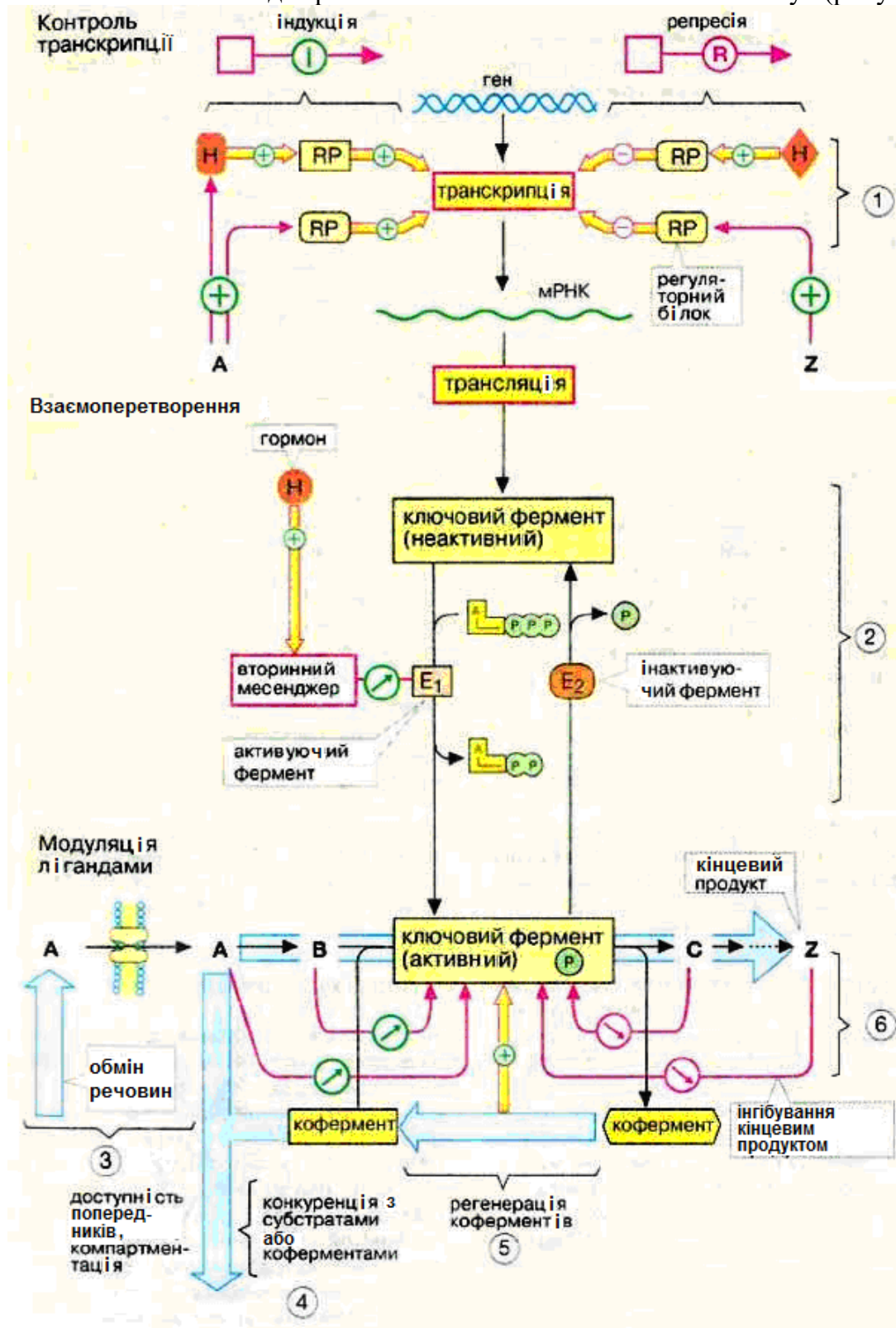


Рисунок 2. Механізми регуляції метаболічних шляхів.

Таким чином, сукупність реакцій, складаючих обмін речовин в живому організмі, суворо скоординована і пристосована до його потреб. Регуляція метаболізму через зміну концентрації і активності ферментів характерна для всіх клітин і реалізується за допомогою різноманітних механізмів. Це визначає й одну з

головних ознак клітини – ознаку її саморегуляції, яка в свою чергу скоординована з ознаками самоорганізації та самовідновлення.

Контрольні питання

1. В чому полягає транскрипційний механізм регуляції метаболізму?
2. В чому полягає механізм алостеричної регуляції активності ферментів?
3. Що собою являє ковалентна модифікація ферментів і як вона змінює напрями метаболічних шляхів?
4. В чому полягає механізм гормональної регуляції метаболізму?
5. Як працює регуляторний механізм зміни концентрації метаболітів?
6. Яким чином внутрішньоклітинна компартменталізація впливає на процеси метаболізму?
7. В чому полягає мембранний механізм регуляції метаболізму?
8. Яким чином окремі метаболічні шляхи об'єднуються в цілісну інтегровану систему?
9. Які найважливіші метаболіти забезпечують інтеграцію метаболічних шляхів?
10. В чому сенс інтеграції метаболічних шляхів в клітинах еукаріотів?

ЛІТЕРАТУРА

1. Биохимия / Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2006. – 784 с.
2. Біохімічні показники в нормі і при патології : довід. для студ. вищ. мед. навч. закл. IV рівня акредитації / Д. П. Бойків, Т. І. Бондарчук, О. Л. Іванків [та ін.]; за ред. О.Я. Склярова. – К.: Медицина, 2007. - 318 с.
3. Біохімія ензимів. Ензимодіагностика. Ензимопатологія. Ензимотерапія : посіб. для студ. вищ. мед. навч. закл. III-IV рівнів акредитації / О. Я. Скляров [та ін.]. – Львів: Кварт, 2008. – С. 99-107.
4. Будняк О. К., Сорокін А. В., Федорко Н. Л., Запорожченко О. В. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання з курсу біохімії. – Одеса, 2003. – 78 с.
5. Воронина Л. Н., Загайко А. Л., Кравченко В. Н., Кравченко А. Б., Набока О. И., Савченко Л. Г., Сахарова Т. С., Самохин А. А., Сенюк И. В., Стрельченко Е. В., Шоно Н. А., Филатова В. М. Биологическая химия: Методические рекомендации и контрольные задания – Х.: Изд-во НФаУ; Оригинал, 2004. – 32 с.
6. Гомбоева А. Ц. Биохимия: Метаболизм углеводов и липидов: учеб. пособие. – Чита: ИЦЦ ЧГМА, 2013. – 94 с.
7. Горячковский А. И. Справочное пособие по клинической биохимии. – Одесса: ОКФА, 1994. – 415 с.
8. Губський Ю. І. Біологічна хімія: – Вид 2-ге – Вінниця: Нова книга, 2009. – 664 с.
9. Губський, Ю. І. Біологічна хімія: підруч. для студ. вищ. мед. навч. закл. IV рівня акредитації / Ю. І. Губський. – 2-ге вид. - К., Вінниця: Нова книга, 2011. – 656 с.
10. Давыдов В. В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии: для студ. мед. вузов III-IV уровня аккредитации / В. В. Давыдов, В. Н. Швец. – Х. : Харьковский нац. ун-т. им. В. Н. Каразина, 2011. – 316 с.
11. Кишкун А. А. Руководство по лабораторным методам диагностики: руководство / А. А. Кишкун. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 800 с.
12. Кучеренко Н. Е., Бабенюк Ю. Д., Васильев А. Н. Биохимия (практикум). – Киев.: Вища школа, 1988. – 128 с.
13. Марченко М. М., Худа Л. В., Великий М. М., Остапченко Л. І. Біохімія ензимів: Підручник. – Чернівці: Чернівецький нац. ун-т, 2012. – 397 с.
14. Мельничук Д. О., Томчук В. А., Янчук П. І. та ін. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навч. посібник. – К: НУБіП України, 2015. – 416 с.
15. Методы клинических лабораторных исследований / Под. ред.. В. С. Камышникова. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 752 с.
16. Назаренко Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – 2-е изд., стер. – М.: Медицина, 2006. – 544 с.
17. Лелевич С. В. Клиническая лабораторная диагностика / С. В. Лелевич, В. В. Воробьев, Т. Н. Гриневиц. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – 167 с.

18. Остапченко Л. І., Синельник Т. Б., Компанець І. В. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації: теоретичні аспекти – К: ВПЦ «Київський університет», 2016. – 639 с.
19. Остапченко Л. І., Андрійчук Т. Р., Бабенюк Ю. Д. та ін. Біохімія: підручник. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2012. – 796 с.
20. Практикум по біохимии / Под ред. Н. П. Мешковой и С. Е. Северина. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979. – 430 с.
21. Скляр О. Я., Бондарчук Т. І., Фартушок Н. В. Біологічна хімія. – Тернопіль: ТДМУ Укрмедкнига. – 2015. – 702 с.

Навчальне видання

Петров Сергій Анатолійович
Андрієвський Олександр Михайлович
Федорко Наталія Леонідівна
Чернадчук Сніжана Сергіївна
Будняк Олександр Костянтинович
Сорокін Андрій Вікторович
Кокошкіна Оксана Олександрівна

Оригінал-макет розроблено в авторській редакції

Кафедра біохімії
Біологічний факультет
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Шампанський провулок 2, м. Одеса, 65058