

**ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ім. М.І.Пирогова**

**кафедра загальної та біологічної хімії**

**Практикум  
з біохімії  
та методичні матеріали  
для студентів II курсу**

**Вінниця – 2009**

## 1. ПЕРЕДМОВА

Практикум та методичні рекомендації складені у відповідності до Програми з біологічної хімії для студентів фармфакультетів медичних вузів. Містять як традиційні так і новітні методи лабораторних досліджень найважливіших хімічних компонентів організму. При підготовці до практикуму та оформленні протоколів досліджень студенти мають приділити основну увагу таким аспектам: принцип методу роботи, хід роботи, розрахунки та висновки. Посібник призначений також для кращого засвоєння теоретичного матеріалу, оскільки в кожному розділі наведені списки основної та додаткової літератури, контрольні питання для підсумкового заняття.

В процесі самопідготовки студент може скористатися спеціальною кімнатою на кафедрі, де до його послуг є навчальні таблиці, записи лекцій та інші посібники. З незрозумілих питань студенту допомагає одержати консультацію черговий викладач в день відробок.

## 2. Загальні відомості

### 2.1. Порядок проведення відробок лабораторно-практичних занять та лекцій.

- Всі пропущені, або незараховані практичні заняття рекомендують студентам відробити на протязі двох тижнів.

- Відробки проводяться один раз на тиждень, в суботу, (під час канікул - щоденно) з 9 до 15 години згідно розкладу ( I, II, III пара) черговими викладачем та лаборантом. Студенту надається право відпрацювати за день три заняття.

-Студент з'являється на відробку не пізніше 13 години, маючи на руках:

- а) дозвіл з деканату,
- б) посвідчення особи з фотокарткою,
- в) зошит для протоколів практичних робіт.

- У випадку, коли студент бажає відпрацювати практичне заняття за попередній семестр, він повинен записатися на відробку за два дні, оскільки лаборантам необхідний час для приготування відповідних реактивів, посуду та обладнання.

- Заняття вважається відпрацьованим, якщо під час відробки виявлено, що студент:

- а) володіє теоретичним матеріалом з теми заняття,
- б) знає принцип методу та хід роботи,
- в) задовільно виконав практикум.

Якщо практична робота не виконана під час відробки, і не підписаний протокол з виконаних практичних робіт, то таке заняття вважається не відпрацьованим.

- Факт відробки фіксується за підписом викладача та лаборанта в трьох документах:

- а) кафедральному журналі відробок,

- б) протоколі практичних робіт,
- в) на зворотній стороні "дозволу".

- Відробку самостійних, підсумкових робіт та пропущених лекцій проводить викладач групи під час проведення занять.

## **2.2. Техніка безпеки при роботі в хімічній лабораторії та надання першої допомоги.**

1. Під час роботи в хімічній лабораторії необхідно дотримуватись чистоти, тиші, порядку та правил техніки безпеки.
2. Кожний працюючий повинен знати, де знаходяться в лабораторії засоби протипожежного захисту та аптечка.
3. Категорично забороняється палити, приймати їжу, пити воду в лабораторії.
4. Не можна приступати до роботи, доки працюючий не засвоїть принцип та хід її виконання.
5. Досліди потрібно проводити тільки в чистому посуді. Не можна користуватись реактивами з не підписаних склянок. Після закінчення роботи посуд відразу вимити.
6. В процесі роботи необхідно слідкувати, щоб речовини не потрапляли на шкіру обличчя та рук, особливо в очі.
7. Ніяких речовин в лабораторії не коштувати на смак, нюхати речовини можна лише обережно, направляючи на себе пари або газу, легкими рухами руки.
8. На всіх банках та іншому посуді, де зберігаються реактиви, повинні бути назви реактивів.
9. Під час нагрівання рідких та твердих речовин в пробірках та колбах забороняється направляти їх отвір на себе або сусіда.
10. Після закінчення роботи необхідно вимкнути газ, воду, напругу.
11. Забороняється виливати в раковину концентровані розчини кислот та лугів.
12. При роботі з отруйними речовинами, кислотами та лугами, фенолом та ін., необхідно користуватись захисними окулярами, протигазами та респіраторами.
13. Досліди з легкозапальними речовинами проводити якомога далі від полум'я та електроприладів.
14. При виникненні пожежі негайно відключити газ та електроприлади у всій кімнаті. Полум'я загасити вогнегасником, піском або використати протипожежну ковдру.
15. Якщо на комусь займеться одяг, необхідно потерпілого покласти на підлогу та накрити ковдрою.
16. При термічних опіках терміново роблять примочки спиртовим розчином таніну, етиловим спиртом або розчином  $\text{KMnO}_4$ .
17. При опіках їдкими лугами добре промити уражене місце проточною водою, потім 3% розчином борної кислоти.

18. При попаданні кислоти на шкіру потрібно зразу ж добре промити водою на протязі 3-5 хв., потім промити розчином натрій гідрокарбонату.
19. При попаданні їдких речовин в очі, необхідно швидко промити очі великою кількістю води або іншого нейтрального розчинника, потім потерпілого доставити в медпункт.
20. З метою запобігання інфікування студентів СНІД'ом, гепатитом чи венеричними захворюваннями, забір крові у студентів для визначення тих чи інших біохімічних показників **не проводиться**. Всі біохімічні показники визначаються на практичному занятті тільки в штучній сироватці крові або в донорській крові, взятій на станції переливання крові.

**2.3. Список основної літератури**, якою рекомендовано користуватись студентам при підготовці до практичних, самостійних, підсумкових занять та до іспитів:

1. Лекції, що читаються на кафедрі.
2. Л.М.Вороніна, В.Ф.Десенко, Н.М.Мадієвська. "Біологічна хімія", Харків, 2000.
3. Е.А.Строев, "Биологическая химия", Москва, 1986.
4. Ю.І.Губський, "Біологічна хімія", Київ-Тернопіль, 2000.
5. Я.І.Гонський, Т.П.Максимчук, М.І.Калинський "Біохімія людини", Тернопіль, "Укрмедкнига", 2002.
6. Т.Т.Березов, Б.Ф.Коровкин "Биологическая химия" - М.: Медицина.- 1990, 1998.

**Додаткова література:**

1. Калинин Ф.Л. «Основы молекулярной биологии». -К. Вища школа, 1978.
2. Мецлер Д. «Биохимия» - М.: Мир, 1980. - Т.1.-3
3. Ленинджер А. «Основы биохимии» - М. : Мир, 1985. - Т.1 - 3.
4. Страйер Л. «Основы биохимии» – М. Мир, 1985. – т. 1-3.
5. «Биохимия человека». Под ред Марри. – М. Мир, -1995. – т.1-2.

## 2.4. Методи біохімічних досліджень.

### **1. ФОТОМЕТРИЯ ТА ФОТОМЕТРИЧНА АПАРАТУРА.**

Біохімічні аналітичні методи частіше всього закінчуються кольоровою реакцією, в результаті якої прозорий розчин набуває забарвлення, тобто здатність вибірково поглинати (адсорбувати) світло з певною довжиною хвилі. Для аналізу використовують тільки ті кольорові реакції, в яких розвивається забарвлення, пропорційне концентрації досліджуваної речовини. За допомогою фотометрії визначають екстинкцію, або оптичну густину розчину. Більшість фотометричних приладів побудовано так, що вони безпосередньо вказують на цю величину.

Фотометричні прилади поділяються на 2-і великі групи: фотометри і спектрофотометри.

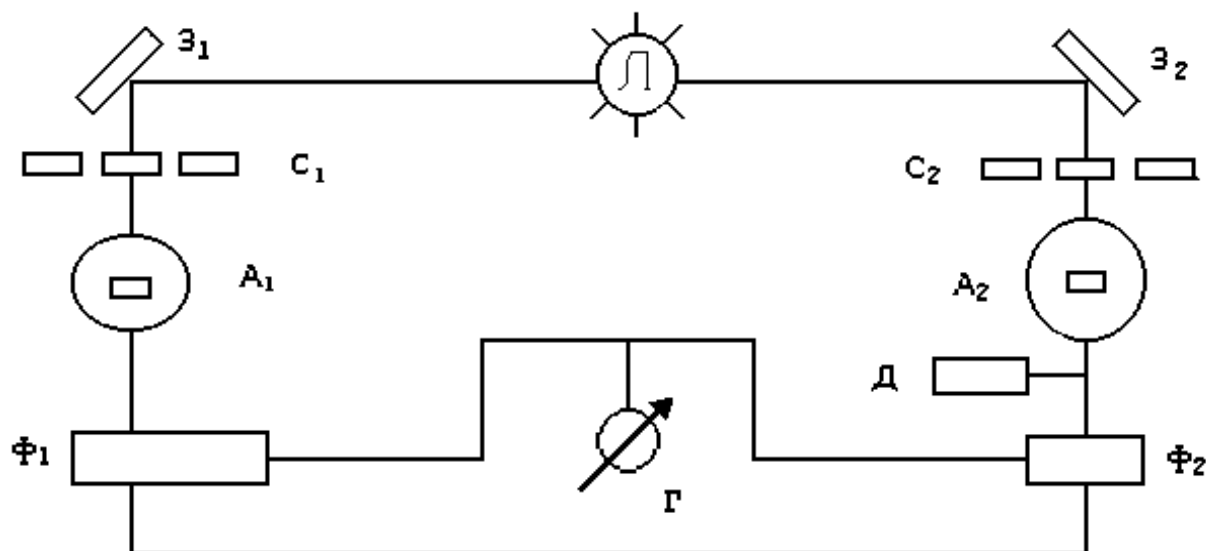
В фотометрах необхідні спектральні діапазони виділяються за допомогою світлофільтрів, тому число ділянок спектра, в якому може проводитись вимірювання, дорівнює числу світлофільтрів.

В спектрофотометрах ділянки спектра виділяються за допомогою призм або дифракційних ґрат, тому можна встановити любую довжину хвилі в заданому діапазоні. Зазвичай спектрофотометри – це прилади більш високого класу, ніж фотометри, в них можна виділити більш вузьку (більше монохроматичну) ділянку спектра, проте все залежить від конкретної конструкції приладу.

#### **Принцип роботи ФЕК**

Фотоелектроколориметр застосовується для визначення концентрації забарвлених розчинів по їх здатності до світлопропускання (оптична густина). Прилад працює від сітки перемінного струму через спеціальний постачальний пристрій. В якості джерела світла в приладі використовують лампу “Л” нажарювання (для роботи у видимій частині спектру) та ртутно-кварцеву лампу високого тиску (для вимірювання в ультрафіолетовій частині спектру).

Принципова схема будови приладу:



В основу роботи приладу покладено принцип порівняння інтенсивності двох пучків світла при допомозі щілинної діафрагми "Д". Світлові пучки від лампи "Д" відображуються від дзеркала "З<sub>1</sub>" і "З<sub>2</sub>", проходять через світлофільтри "С<sub>1</sub>" та "С<sub>2</sub>", що забезпечують таку довжину хвилі, до якої фотоелементи найбільш чутливі, кювети "А<sub>1</sub>" та "А<sub>2</sub>" з досліджуваним забарвленим розчином і розчинником, а потім потрапляють на фотоелементи "Ф<sub>1</sub>" та "Ф<sub>2</sub>". Останні підключені до гальванометра. Внаслідок поглинання світла забарвленим досліджуваним розчином, що знаходиться в кюветі "А<sub>2</sub>", на фотоелемент "Ф<sub>2</sub>" буде потрапляти пучок світла меншої інтенсивності, ніж на фотоелемент "Ф<sub>1</sub>", і стрілка гальванометра буде відхилятися. Величину послаблення світлового потоку показує зв'язаний з щілинною діафрагмою "Д" відрахунковий барабан. Виражається вона в одиницях оптичної густини (екстинкціях), величина яких прямо пропорційна концентрації досліджуваної речовини в розчині.

Користуючись калібрувальним графіком, по екстинкції відрахункового барабану визначають невідому концентрацію речовини в досліджуваному розчині.

Для побудови калібрувальної кривої вимірюють оптичну густину ряду розчинів досліджуваної речовини з відомими концентраціями.

## **2. ФЛЮОРОМЕТРІЯ**

Ефект флюоресценції полягає в тому, що досліджуваний об'єкт світиться під впливом опромінення світлом з більш короткою довжиною хвилі. Світло, що випромінюється, називається світлом флюоресценції або вторинним випромінюванням. Те світло, яким об'єкт опромінюється, називається світлом збудження флюоресценції або первинним.

Форма спектра флюоресценції звичайно дзеркально відображає форму спектра збудження, при цьому спектр збудження флюоресценції наближується до спектру поглинання розчину і тому характерний для даного флюорофора, в той час, як спектр флюоресценції малоспецифічний.

Під час флюорометрії довжина хвилі вторинного випромінювання, звичайно, встановлюється на максимум інтенсивності, так як цей вид випромінювання малоспецифічний, в той час як довжина хвилі первинного світла (збудження флюоресценції) повинна приходиться на найбільш специфічну для досліджуваної речовини ділянку спектру, що співпадає з максимумом (речовини, що заважають, можуть бути причиною хибного максимуму).

Фізичний ефект флюоресценції полягає в тому, що молекула речовини, яка досліджується, поглинає квант світла і при цьому переходить в більший енергетичний стан; через деякий проміжок часу вона випромінює надлишкову енергію у вигляді кванту світла флюоресценції (емісії). В зв'язку з тим, що енергія кванта світла обернено пропорційна довжині хвилі, довжина хвилі збуджуючого світла завжди коротша, ніж та, що випромінюється. Проміжок часу між поглинанням світла і його випромінюванням дуже малий, і в

звичайних флуоресцентних методах на нього не звертають уваги, але він достатній, щоб на молекулярному рівні встигли пройти деякі зміни, зокрема, щоб молекула могла змінити своє розташування в просторі. На цьому заснований метод молекулярної віскозиметрії шляхом вимірювання зміни поляризації світла флюоресценції.

### **3. ПОЛУМ'ЯНА ФОТОМЕТРІЯ ТА АТОМНА АБСОРБЦІОМЕТРІЯ.**

Солі металів, потрапляючи в полум'я, здатні забарвлювати його. Це відбувається тому, що, при високій температурі полум'я, молекули розкладаються на окремі іони, електрони яких безперервно переходять із одного квантового стану в інший, що спряжено з випроміненням чи поглинанням кванта світла. Мінімальна температура, яка необхідна для того, щоб ці процеси проходили достатньо інтенсивно, залежить від природи досліджуваного елемента і в меншій мірі від того, в склад якої сполуки в розчині воно входить. Деякі елементи, наприклад, калій і натрій, починають інтенсивно випромінювати світло, потрапляючи в полум'я з відносно низькою температурою, яке утворюється при згоранні метану в повітрі (так зване метаново-повітряне полум'я), а інші, наприклад кальцій, починають інтенсивно випромінювати світло і поглинати його лише при значно вищій температурі, яка утворюється при згоранні ацетилену. При згоранні метану (тобто побутового газу) на повітрі можна визначити кальцій лише після його попереднього виділення, але ця методика є складною, ненадійною і практично не використовується.

Метод, в якому вивчається забарвлення полум'я, тобто випромінення, яке виникає в результаті переходу атома із енергетично більш високого стану в низький, називається полум'яною фотометрією. Можна вивчати і зворотній процес, тобто вимірювати поглинання світла при переході атома з більш низького на більш високий енергетичний рівень; цей метод називається атомною абсорбціометрією.

Апаратура, яка необхідна для полум'яної фотометрії, відносно проста і дешева, але метод виправдовує себе лише при дослідженні найбільш легкозбудливих лужних елементів – літію, натрію, калію, так як можливо працювати з легкодоступним низькотемпературним полум'ям, яке утворюється при згоранні побутового газу. Хімічні методи визначення цих елементів складні і неточні, тому калій і натрій визначають в клінічних лабораторіях практично лише шляхом полум'яної фотометрії.

### **4. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ**

Для фракціонування білкових сумішей, що знаходяться в розчині, широке застосування отримали методи дрібного осадження, засновані на змінненні розчинності білків в присутності розчинів солей і органічних розчинників. При фракціонуванні солями частіше всього використовують сірчанокислий амоній,

що дозволяє створювати високу іонну силу розчину при низькій температурі, а з органічних розчинників – етиловий спирт і ацетон. На відмінностях в розчинності білків засноване також ізоелектричне осадження, що досягається за рахунок мінімальної розчинності глобулярних білків в ізоелектричній точці. В останній час для фракціонування білків все частіше використовують центрифугування, вибірккову адсорбцію, різні види хроматографії та електрофорезу.

### **Електрофоретичне розділення білків.**

Метод заснований на тому, що молекули білка мають електричний заряд, величина і знак якого визначаються амінокислотним складом білка, рН та іонною силою оточуючого середовища. Під впливом зовнішнього електричного поля заряджені молекули пересуваються в розчині до протилежно зарядженого полюсу. Швидкість переміщення білкових частин пропорційна величині їх заряду і зворотно пропорційна розміру частинок і ступеню їх гідратації.

Широке розповсюдження в теперішній час отримав так званий “зональний електрофорез” – електрофорез на твердому носії ( на паперових смугах, агарі, крохмалі, акриламіді), що просякнутий буферним розчином з потрібним значенням рН. Розташування білків на папері або гелі визначають шляхом фіксації і наступного забарвлення тим чи іншим барвником ( звичайно бромфеноловим синім, амідовим чорним або кумасі синім). Кількість білка в кожній фракції можна орієнтовно визначати за інтенсивністю забарвлення зв'язаного барвника. Таке визначення не дає строго кількісного співвідношення білкових фракцій, так як кількість барвника, зв'язаного різними білками неоднакова.

Виділяють:

- електрофорез на папері,
- електрофорез в агаровому гелі,
- електрофорез в поліакриламідному гелі.

Апарат для електрофорезу на плівці з ацетату целюлози (ЕПАУ – 20 – 50) призначений для розділення білків сироватки крові на плівках із ацетату целюлози. Апарат дозволяє виконувати електрофорез у мікріваріанті, що забезпечує значну економію реактивів і електроенергії. Устаткування складається із електрофоретичної камери, яка зроблена з органічного скла і джерела постійного струму. Експериментальний завод науково-дослідного інституту синтетичних смол виготовляє ацетатцелюлозні плівки необхідних розмірів; найзручніше використовувати плівки розміром 9×9см, що дає можливість наносити послідовно від 4 до 7 зразків. Плівки витримують в розчині буферу, який застосовується для електрофорезу. Для одержання 5 фракцій рекомендується веронал-медіналовий буфер чи медінал-цитратний буфер рН=8,6. Для візуальної оцінки електрофореграм, а також прямого денситометрування, достатньо 1-2мкл сироватки; елюювання фракцій з наступним фотометруванням потребує 3-4мкл сироватки. Електрофоретичне розділення проводять при напрузі 200V на протязі 20хв. з подальшим виміром



на денситометрі. Денситометр ДМ-1 призначений для фотометрування забарвлених фореграм, одержаних методом диск-електрофорезу.

## **5.ХРОМАТОГРАФІЯ.**

Хроматографія – метод розділення газів, парів, рідин і розчинних речовин на межі двох фаз – рухомої і нерухомої.

За механізмами розділення хроматографію поділяють на адсорбційну(газову або рідинну),осадову, іонообмінну, розподільчу, гель-фільтраційну(гель-хроматографію) і біоспецифічну (афінну) ; по формі проведення – на колонкову, хроматографію на папері і тонкошарову. Для фракціонування білків застосовується головним чином хроматографія на колонках.

Хроматографія на папері – один із видів розподільної хроматографії. Метод базується на різниці коефіцієнтів рухливості роздільних речовин між двома погано змішуваними розчинниками. В якості носія нерухомої фази використовують спеціальний хроматографічний папір. Він повинен бути хімічно чистим, однорідним по густині і забезпечувати визначену швидкість руху розчинника. Досліджувану речовину, що знаходиться в розчині, наносять у вигляді крапель на деякій відстані від краю на листок хроматографічного паперу. Папір розміщують в герметично закриту камеру і занурюють край листка, де був нанесений досліджуваний розчин, в кювету, що містить органічний розчинник. Лінія старту з нанесеними на неї пробами не повинна занурюватись в розчинник.

За силами капілярності органічний розчинник буде рухатись вздовж листка хроматографічного паперу. Нанесена на папір речовина рухається за розчинником. Ступінь сорбції досліджуваної речовини на гідратованих волокнах паперу (повітряно-сухі листки фільтрувального паперу в камері, насиченої парами водонасиченого органічного розчинника, містить до 20% води) визначає швидкість його руху. Речовини, що гірше сорбуються на гідратованих волокнах паперу, будуть рухатися швидше. Після проходження фронтом розчинника певної відстані папір висушують і обробляють тою чи іншою проявляючою речовиною. Паралельно з дослідним розчином на цей листок паперу наносять стандартний розчин досліджуваної речовини (свідок), який буде вказувати місце знаходження речовини, що визначається. Для ідентифікації речовини можна також користуватися величиною  $R_f$ , яка являється відношенням відстані, яку дана речовина пройшла, до відстані, яку пройшов фронт розчинника. Величина  $R_f$  залежить від розчинника. Розрізняють висхідну (розчинник піднімається по паперу вгору) і низхідну (розчинник рухається вниз) хроматографію.

### **Загальні прийоми хроматографічного розділення на колонках.**

Найпростіший пристрій для хроматографічного розділення має наступну будову : колонки – порожні скляні трубки, розмір яких залежить від мети роботи і способу розділення . В основі колонки вмонтовано пористу скляну

пластинку або перфорований диск. Необхідно слідкувати за тим, щоб “мертвий” простір під диском, між ним і основою колонки, а також внутрішній діаметр шлангів, по яких елюат, що виходить із колонки, потрапляє в колектор фракцій, був мінімальним. В зворотному випадку відбувається змішування вже розділених речовин. Комерційні колонки оснащені спеціальними пристосуваннями – кінцевими адаптерами перемінної довжини, які дозволяють регулювати довжину колонки і зводять до мінімуму перемішування фракцій, що підлягають елююванню.

### **Метод тонкошарової хроматографії**

Принцип: ванілін – мигдальну кислоту(ВМК) екстрагують із сечі етилацетатом, екстракт випарюють і піддають тонкошаровій хроматографії на силікагелі. Для виявлення на хроматограмах і кількісного визначення використовують кольорову реакцію з діазотованим п-нітроаніліном.

Для проявлення пластин, їх після висушування обприскують проявляючим діазореактивом. При цьому у самого фінішу видно пляму гомованілінової кислоти, пляма ВМК знаходиться приблизно на 4 см вище лінії старту, вона забарвлюється в світлофіолетовий колір. Плями зіскоблюються в пробірки, куди додають по 2мл метанольного луку і 0.1 мл підсилюючого діазореактиву. Ретельно перемішують і через 20 хв. центрифугують, надосадову рідину фотометрують при трьох довжинах хвиль: 350нм; 520нм і 590нм супроти екстрактів із зіскобів пластинок в ділянках, де немає ВМК.

Одночасно з дослідними пробами через всю процедуру аналізу пропускають калібровані проби, що містять 4; 6 і 8мкг ВМК. Для цього 0,04-0,08мл каліброваного розчину, що містить ВМК в концентрації 100мкг/мл, виливають в порції по 1мл ацетатного буферу рН=1,96, потім екстрагують етилацетатом так само, як і дослідні проби. Для розрахунку спочатку вираховують виправлену величину екстинції з поправкою на неспецифічне поглинання по формулі:

$$E = E_{520} - 1/2 \cdot (E_{350} + E_{590})$$

як для дослідних, так і для калібрувальних проб. За цими даними будують графік, який служить для безпосереднього розрахунку вмісту ВМК в сечі в мікрограмах в 1мл.

## **6. ІМУНОФЕРМЕНТАТИВНИЙ МЕТОД**

Відзначається надзвичайною чутливістю. Застосовується для кількісного визначення тих низькомолекулярних речовин, які знаходяться в біологічних об'єктах в дуже низьких концентраціях ( гормони, вітаміни В<sub>8</sub>, В<sub>9</sub>, В<sub>12</sub>, отруйні речовини і т.п.), та для проведення фармакокінетичного аналізу лікарських препаратів. Наводимо один із варіантів методу на прикладі визначення в сироватці крові кількості вітаміну В<sub>12</sub>. На поверхню поліетиленової лунки міцно пришивають антитіла до вітаміну В<sub>12</sub>. Далі в лунку вносять досліджувану рідину, що містить вітамін В<sub>12</sub>. Цей вітамін зв'язується з антитілами до нього,

але частина антитіл залишається вільними. Вміст лунки відмивають фізрозчином від сторонніх речовин, потім в цю ж лунку додають стандартний розчин, в якому вітамін  $B_{12}$  зв'язаний з ферментом, найчастіше з дуже активним ферментом - пероксидазою. Комплекс  $B_{12}$  - пероксидаза зв'язується з антитілами до вітаміну  $B_{12}$ , які залишилися вільними, разом з вітаміном адсорбується і фермент. Після відмивання від надлишку комплексу  $B_{12}$  -пероксидаза процедура визначення вітаміну  $B_{12}$  в досліджуваній рідині полягає у визначенні активності ферменту пероксидази, яка з'явилася на поверхні полістиролових лунок. Чим більше ферменту адсорбувалося в лунці, тим менше вітаміну  $B_{12}$  знаходилося в досліджуваній рідині. Для контролю використовують стандартні розчини вітаміну  $B_{12}$  відомої концентрації.

## 7.БІОХІМІЧНІ АНАЛІЗАТОРИ

В наш час в клінічних лабораторіях широко використовуються біохімічні автоматичні та напівавтоматичні аналізатори. Вони дозволяють одночасно визначати десятки різних біохімічних показників: загальний білок та його фракції, глюкозу,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ , холестерин, загальні ліпіди, тригліцериди, сечовину, сечову кислоту, білірубін, креатин, активність ферментів: АСТ, АЛТ, ЛДГ, креатинфосфокіназу, лужну фосфатазу, альфа-амілазу та ін. В аналізаторах використовуються відповідні готові комплекти хімічних реактивів.

Відомі такі біохімічні аналізатори: "KONE SPECIFIC BASIC", селективний біохімічний автоаналізатор "SUPER Z-818 Mitsubishi Corporation" (Японія), автоматичний біохімічний аналізатор "BTS-370" фірми Biosystems (Іспанія), напівавтоматичний біохімічний аналізатор "EPOLL-20". Аналізатор "Ексан-Г" призначений для експрес-аналізу глюкози в пробах цільної крові та інших біологічних рідинах. Принцип дії вказаного аналізатора оснований на електрохімічному амперометричному визначенні продуктів ферментативної реакції окислення глюкози під впливом глюкозооксидази.

## РОЗДІЛ I

### Хімія амінокислот та простих білків

#### А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу

1. Біохімія як наука, загальнобіологічне та медичне значення. Значення біохімії в підготовці сучасного спеціаліста з фармації.
2. Біохімічні методи дослідження. Принципи організації і функціонування живої матерії.
3. Поняття про білки, їх елементарний склад, вміст в органах та тканинах. Значення та функції білків.
4. Класифікація білків: прості та складні.
5. Типи зв'язків в білкових молекулах.
6. Рівні структурної організації білків.
7. Фізико-хімічні властивості білків.
8. Методи визначення білків.
9. Амінокислоти як мономери білків: визначення, номенклатура. Види ізомерії.
10. Класифікація амінокислот.
11. Фізико-хімічні властивості амінокислот.
12. Білки та амінокислоти як лікарські препарати.
13. Принципи методів визначення білка та його фракцій в сироватці крові.

#### Б. Література:

1. Л.М.Вороніна та співавтор. "Біологічна хімія", Х., «Основа», 2000, С.4-56.
  2. Е.А.Строев. "Биологическая химия", М.1986, С.3-15,24-60.
  3. Ю.І.Губський. "Біологічна хімія", 2000, С.7-13,18-40.
- Лекції, що читаються на кафедрі.
4. Я.І.Гонський та співавтори "Біохімія людини", Тернопіль, "Укрмедкнига", 2002, С.7-52.

#### В. Опис лабораторних робіт

##### *Реакції осадження білків*

#### **Робота 1.1** Осадження білків при нагріванні

**Принцип** Майже всі білки денатурують при нагріванні до 56°C та вище. Механізм теплової денатурації пов'язаний зі зміною структури білкової молекули, в результаті якої білок втрачає свої нативні властивості, зменшується його розчинність (зменшення гідрофільних властивостей веде до руйнування гідратної оболонки).

Найбільш повне та швидке осадження проходить в ізоелектричній точці білка, тобто при значенні рН, коли колоїдні частинки білка електронейтральні і є найменш стійкі. Для більшості білків ізоелектрична точка знаходиться в слабко кислому середовищі.

В сильно кислих розчинах (за виключенням розчинів нітратної, трихлорацетатної кислот) при нагріванні білок не випадає в осад, тому що частинки білка перезаряджаються (або відбувається посилення існуючого заряду), що підвищує їх стійкість в розчині. Але в сильно кислих розчинах

білки при нагріванні можуть осаджуватись, якщо додати достатню кількість будь-якої нейтральної солі електроліту. Іони солі адсорбуються на частках білка, нейтралізують заряд, і білок випадає в осад.

**Хід роботи.** В 5 пронумерованих пробірок наливають по 1 мл 1% розчину білка. Вміст першої пробірки нагрівають на кип'ячій водяній бані. Випадає осад. В другу пробірку додають 2 краплі 3% розчину ацетатної кислоти і вміст нагрівають. Випадає осад білка.

В третю пробірку наливають 3 краплі 10% розчину ацетатної кислоти і вміст нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кип'ятінні. В четверту пробірку приливають 3 краплі 10% розчину ацетатної кислоти та декілька кристалів натрію хлориду. Кип'ятять. Утворюється осад білка. В п'яту пробірку додають 3 краплі 10% розчину натрію гідроксиду та нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кип'ятінні.

### **Робота 1.2. Осадження білків солями важких металів**

**Принцип.** При дії солей важких металів на розчини білка відбувається денатурація білкової молекули. Осадження денатурованого білка обумовлено адсорбцією важкого металу на поверхні білкової молекули та утворенням нерозчинних комплексів.

**Хід роботи.** В три пробірки наливають по 1 мл 1 % розчину білка і по 2 краплі: в першу пробірку - 10% розчину аргентум(I)нітрату срібла, в другу - 5% розчину плюмбум(II)ацетату, в третю - 5 % розчину купрум(II) сульфату. В усіх пробірках утворюється осад. Потім в кожен пробірку доливають надлишок (5-10 крапель) того ж реактиву і відмічають, в якій пробірці пройшла пептизація білка, тобто його розчинення.

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

Властивість білків зв'язувати важкі метали використовується медичною практикою. Білки застосовуються як протиотрута при отруєнні солями ртуті, свинцю, міді та іншими металами. Білок обмежує всмоктування важкого металу, утворюючи з ним нерозчинні комплекси. Слід відзначити, що при осадженні білків деякими солями важких металів (плюмбум(II)ацетату, купрум(II)сульфату), відбувається пептизація (розчинення) утвореного осаду, що пов'язано з надлишковою адсорбцією важкого металу на поверхні колоїдної частинки та появою позитивного заряду на молекулі білка. При умові надлишку солей срібла та ртуті пептизація не спостерігається.

### **Робота 1.3. Осадження білків реактивами на алкалоїди**

**Принцип.** Осадження білків реактивами на алкалоїди зумовлено наявністю в молекулі білка гетероциклічних груп, аналогічних тим, які знаходяться в молекулі алкалоїдів (пірольних, індольних, імідазольних та інших). Більш повне осадження спостерігається при перезарядженні білкової молекули на позитивний заряд (підкислення), що полегшує взаємодію білка з від'ємно-зарядженими іонами осаджувача.

**Хід роботи.** В три пробірки наливають по 1 мл 1 % розчину білка і по 2 краплі 2% розчину ацетатної кислоти. В першу пробірку додають 3 краплі 5% розчину таніну, в другу - 5 крапель 10% розчину пікринової кислоти, в третю - 3 краплі 5% розчину залізистосинеродистого калію. В усіх пробірках білок випадає в осад.

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

При лікуванні опіків застосовують обробку цими реактивами уражених областей, що веде до денатурації білків та утворення захисного шару, що перешкоджає зневодненню тканин та проникненню інфекції.

### **Робота 1.4. Осадження білків концентрованими мінеральними кислотами**

**Принцип.** Осадження білка концентрованими мінеральними кислотами (крім фосфатної кислоти) відбувається в результаті дегідратації білкових часток та нейтралізації їх зарядів.

**Хід роботи.** В пробірку наливають 16 крапель концентрованої нітратної кислоти. Потім, нахиливши пробірку під кутом 45°, обережно по стінці нашаровують 8-10 крапель 1% розчину білка. На межі розділу двох шарів рідини виникає осад білка.

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

Реакція осадження білка нітратною кислотою (реакція Геллера) використовується в клінічних дослідженнях сечі на наявність та кількісний вміст в ній білка за методом Стольнікова.

### **Робота 1.5 Осадження білків органічними кислотами**

**Принцип.** Білки з розчину можуть осаджуватись органічними кислотами, проте різні органічні кислоти діють по-різному. Механізм осадження білків органічними кислотами пояснюється дегідратацією білкової молекули та нейтралізацією заряду.

**Хід роботи.** В дві пробірки наливають по 1мл 1% розчину білка. В першу пробірку додають 3 краплі 10% розчину трихлорацетатної кислоти, а в другу - 3 краплі 10% розчину сульфосаліцилової кислоти. В пробірках утворюється осад білка.

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

Трихлорацетатна і особливо сульфосаліцилова кислоти є дуже чутливими реактивами на білок і тому широко використовуються в клінічній практиці для доказу наявності білка в біологічних рідинах.

За допомогою сульфосаліцилової кислоти можна виявити білок в сечі в концентрації 0,0015%.

### **Робота 1.6. Висолювання білків**

**Принцип.** Висолюванням називається процес осадження білків з їх водних розчинів нейтральними розчинами концентрованих солей лужних та лужноземельних металів: натрій сульфатом, амоній сульфатом, магній

сульфатом, натрій хлоридом і т.д. При додаванні досить великих кількостей цих солей до розчину білка відбувається дегідратація білкової молекули і нейтралізація заряду.

Висолювання білків є зворотним процесом: після виведення солі шляхом діалізу або розведенням водою білок знову розчиняється і володіє нативними властивостями.

**Хід роботи.** В пробірку наливають 1 мл 1% розчину білка і декілька крапель 80% розчину амоній сульфату (до утворення осаду). Через 2-3 хвилини до отриманого осаду доливають 3-4 мл води, осад розчиняється.

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

Метод висолювання білків використовують в клінічній практиці для визначення окремих фракцій білків сироватки крові.

### **Робота 1.7. Осадження білків органічними розчинниками**

**Принцип.** Білки осаджуються в багатьох органічних розчинниках (спирт, ацетон, ефір і т. д.). Органічні розчинники дегідратують частинки білка і тим самим знижують їх стійкість в розчині.

Короткочасна дія органічного розчинника зберігає білок в його природному стані, тривала - веде до денатурації білка.

**Хід роботи.** В пробірку наливають 5 крапель розчину білка і додають 1 мл спирту – розчин мутніє.

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

Реакція має практичне значення: використовується в клінічній лабораторній практиці для розділення білків сироватки крові за методом Кона.

### **Робота 1.8. Адсорбція білків на високодисперсному кремнеземі (аеросилі)**

**Принцип.** Аеросил є білим легким порошком з розміром часточок від 4 до 40 нм, які мають велику активну поверхню. Загальна формула аеросилу -  $(\text{SiO}_2)_n$ . Механізм дії аеросилу пов'язаний із здатністю швидко та міцно адсорбувати великі кількості білка, у тому числі токсинів білкової природи. При змішуванні водних розчинів з аеросилом білкові молекули адсорбуються на поверхні часток аеросилу і разом з ним випадають в осад.

**Хід роботи.** Беруть дві пробірки, в кожную наливають по 3 мл 0,1% розчину білка. В одну пробірку вносять попередньо заготовлену наважку аеросилу (15 мг), вміст пробірки перемішують протягом 1 хвилини. Далі вміст кожної пробірки фільтрують через паперовий фільтр. З обома фільтратами виконують якісну реакцію на білок з сульфосаліциловою кислотою (див. роботу 1.5.). Фільтрат з пробірки, куди було внесено аеросил, дає негативну якісну реакцію на білок, що говорить про повне осадження білка аеросилом; а фільтрат з пробірки, куди не було внесено аеросил, дає позитивну якісну реакцію на білок.

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

З аеросилу виготовляють сучасні високоефективні сорбенти медичного призначення (полісорб, сілард та інші).

### ***Кольорові реакції на білки***

#### **Робота 1.9. Біуретова реакція**

**Принцип.** В лужному середовищі, в присутності солей купруму, розчин білка набуває фіолетового кольору. Біуретова реакція обумовлена наявністю в молекулі білка пептидних груп, які в лужному середовищі утворюють комплексні сполуки міді.

**Хід роботи.** В пробірку наливають 1мл 1% розчину білка, 5 крапель 10% розчину натрій гідроксиду і 1-2 краплі 1% розчину купрум(II)сульфату. В пробірці з'являється фіолетове забарвлення.

#### **Робота 1.10. Нінгідрінова реакція**

**Принцип.** Білки, поліпептиди, а також вільні  $\alpha$ -амінокислоти дають синє або фіолетове забарвлення з нінгідрином. Реакція характерна для аміногрупи в  $\alpha$ -положенні та обумовлена наявністю  $\alpha$ -амінокислот в молекулі білка. При нагріванні білка з водним розчином нінгідрину амінокислоти окислюються і розщеплюються, утворюючи карбону діоксид, аміак і відповідний альдегід. Відновлений нінгідрин конденсується з аміаком та окисленою молекулою нінгідрину, утворюючи барвник типу мурексиду фіолетово-синього забарвлення.

**Хід роботи.** На фільтрувальний папір наносять 1 краплю 1% розчину білка і висушують над електроплиткою. Потім наносять на теж саме місце краплю 0,1% розчину нінгідрину і знову висушують. З'являється фіолетове забарвлення.

#### **Робота 1.11. Діазореакція**

**Принцип.** Білки дають оранжово-червоне забарвлення з діазореактивом (сульфанілова кислота, розчинена в концентрованій хлоридній кислоті). Забарвлення залежить від утворення азосполук з залишком амінокислот - тирозину, триптофану, гістидину, що входять до складу білкової молекули.

**Хід роботи.** В пробірку доливають 0,5 мл 1% розчину білка, 8 крапель 10% розчину натрій карбонату і 16 крапель діазосуміші. Через 10 хвилин утворюється оранжово-червоне забарвлення.

#### **Робота 1.12. Реакція Фоля**

**Принцип.** При добавленні до розчину білка 30% розчину натрій гідроксиду, плюмбум(II)ацетату з наступним кип'ятінням розчин починає темніти. Реакція обумовлена присутністю в молекулі білка сірковмісних амінокислот – цистеїну та цистину. Ці амінокислоти при нагріванні в присутності натрій гідроксиду руйнуються і утворюють натрій сульфід ( $\text{Na}_2\text{S}$ ).



Плюмбум(II)ацетат реагує з натрій гідроксидом з утворенням натрій плюмбіту. Натрій сульфід взаємодіє з натрій плюмбітом і утворюється чорний осад плюмбум(II)сульфіду (PbS).

**Хід роботи.** В пробірку наливають 2 краплі 5% розчину плюмбум(II)ацетату і додають по краплям 30% розчин натрій гідроксиду до повного розчинення утвореного осаду. Потім додають рівний об'єм 1% розчину білка та кип'ятять. Випадає осад чорного кольору.

### **Робота 1.13. Ксантопротеїнова реакція**

**Принцип.** При додаванні до розчину білка концентрованої нітратної кислоти білок спочатку випадає в осад, а потім при нагріванні розчиняється, і рідина забарвлюється в жовтий колір. Поява забарвлення зумовлена утворенням нітропохідних ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину, триптофану). Нітропохідні амінокислот в лужному середовищі утворюють солі хіноїдної структури, що забарвлені в оранжевий колір.

**Хід роботи.** В пробірку вносять 1 мл 1% розчину білка, додають 5 крапель концентрованої нітратної кислоти і (обережно!) нагрівають. Рідина забарвлюється в жовтий колір. Пробірку охолоджують, після чого додають 10 крапель концентрованого розчину аміаку.

Жовте забарвлення переходить в оранжеве.

### **Робота 1.14. Реакція Міллона**

**Принцип.** При додаванні до розчину білка реактиву Міллона (розчин ртуті в нітратній кислоті, що містить нітритну кислоту) білок випадає в осад, який при нагріванні набуває червоно-коричневого забарвлення.

Реакція зумовлена наявністю в молекулі білка амінокислоти тирозину, що має фенольне ядро, яке при взаємодії з реактивом Міллона утворює забарвлену сіль свого нітропохідного. Реакцію Міллона дають всі білки, за виключенням тих, які не містять тирозин (желатин, клупеїн та інші).

**Хід роботи.** В пробірку наливають 1 мл 1% розчину білка, додають 2-3 краплі реактиву Міллона, кип'ятять. Утворюється осад рожевого кольору.

### **Робота 1.15 Розділення альбумінів та глобулінів сироватки крові та їх кількісне визначення**

**Принцип.** Розділення білків проводиться методом висолювання (див. роботу 1.6.). Для розділення білків цим методом широко використовується амоній сульфат. Глобуліни випадають в осад в напівнасиченому розчині солей, альбуміни - в насиченому. Концентрацію окремих фракцій білків визначають колориметрично по інтенсивності біуретової реакції.

**Хід роботи.** В пробірку наливають 2 мл сироватки крові (розведеної в 2 рази) і додають 2 мл насиченого розчину амоній сульфату (50 % насичення розчину). Перемішують і залишають на 5 хвилин. В напівнасиченому розчині амоній сульфату в осад випадає фракція глобулінів, які мають відносно велику молекулярну масу і невеликий заряд. Осад відфільтровують. Осад глобулінів на

фільтри поступово змивають в чисту мірну пробірку 4 мл дистильованої води, а потім доводять вміст пробірки водою до мітки 5 мл. З цього об'єму відбирають 2 мл розчину в другу пробірку, додають 5 крапель 30% розчину натрій гідроксиду і використовують для кількісного визначення глобулінів (проба А).

До фільтрату, що залишився після відокремлення глобулінів, які осадилися, додають кристалічний амоній сульфат до повного насичення розчину. Фракцію альбумінів, що осадилися, відокремлюють фільтруванням. Відсутність білка в фільтраті перевіряють реакцією з сульфосаліциловою кислотою (див. роботу 1.5).

Для визначення вмісту білка в досліджуваній сироватці крові в пробірку наливають 0,25 мл сироватки (розведеної в 2 рази) і додають 1,75 мл дистильованої води (проба Б).

В пробірку, що є контролем, вносять 2 мл дистильованої води. До проби А, Б і в контроль одночасно додають по 2 мл біуретового реактиву. Вміст всіх пробірок перемішують і залишають на 10 хвилин для розвитку забарвлення. Інтенсивність забарвлення проб А і Б визначають на фотоелектроколориметрі (ФЕК) при зеленому світлофільтрі в кюветі товщиною 0,5 см проти контролю. Кількість білка (в мг) визначається за калібрувальним графіком.

Розрахунок маси глобулінів - (X) проводиться згідно з формулою:

$$X = \frac{C \cdot 5 \cdot 2 \cdot 1000}{2 \cdot 2 \cdot 1000} \quad \text{г/л, де}$$

в чисельнику:

C - маса білка в мг, знайдена за калібрувальною графіком;

5 - об'єм розчину глобулінів в мл;

2 - розведення сироватки крові;

1000 - перерахунок мл в л;

в знаменнику:

2 - об'єм, взятої для дослідження сироватки в мл;

2 - об'єм фільтрату глобулінів, взятого для колориметрування;

1000 - перерахунок мг в г.

Розрахунок загальної кількості білка - (Y) здійснюються за формулою:

$$Y = \frac{C \cdot 2 \cdot 1000}{0,25 \cdot 1000} \quad \text{г/л, де}$$

в чисельнику:

C - маса білка в мг, знайдена за калібрувальним графіком;

2 - розведення сироватки крові;

1000 - перерахунок мл в л;

в знаменнику:

0,25 - об'єм взятої для дослідження сироватки в мл;

1000 - перерахунок мг в г.

Маса альбумінів визначається по різниці між масою загального білка і глобулінів.

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

Метод висолювання використовують в клінічній практиці для розділення білків сироватки крові на фракції: альбуміни, глобуліни, фібриноген.

В нормі в сироватці крові міститься: альбумінів - 40-50 г/л; глобулінів - 20-30 г/л; загальна кількість білка - 60-80 г/л.

Зниження загальної кількості білка (гіпопротеїнемія) та альбумінів (гіпоальбумінемія) виникає внаслідок: недостатнього надходження в організм білка (голодування); захворюваннях нирок; крововтратах; пухлинах; захворюваннях печінки, що супроводжуються порушенням синтезу білка.

Підвищення загальної кількості білка (гіперпротеїнемія), а також альбумінів (гіперальбумінемія) виникає при: дегідратації (травми, опіки, холера); появі патологічних білків.

Вміст  $\alpha$ -глобулінів підвищується при різних хронічних інфекційно-запальних захворюваннях; пухлинах; травмах; інфарктах; ревматизмі.  $\beta$ -глобуліни збільшуються при атеросклерозі, цукровому діабеті, гіпотиреозі, нефротичному синдромі.  $\gamma$ -глобуліни збільшуються при інфекційних захворюваннях, а зменшуються при виснаженні імунної системи.

### **Робота 1.16 Звільнення біологічних рідин від білка**

***Принцип та клінічне значення.*** В практичній роботі біохімічних лабораторій іноді виникає необхідність визначати в крові та інших біологічних рідинах різні низькомолекулярні речовини. Присутність білків заважає такого роду досліджень. Тому попередньо звільняють рідину від білків. В даній роботі необхідно визначити реактив, який найбільш повно осаджує білки.

***Хід роботи.*** В 5 пробірок доливають по 1 мл 1% розчину білка. В першу пробірку доливають 10 крапель 8% розчину трихлорацетатної кислоти. В другу пробірку доливають 10 крапель 5% розчину метафосфатної кислоти. В третю - 10 крапель 8% розчину натрій вольфрамату і 10 крапель розчину сульфатної кислоти з  $C_n=1/3$ . В четверту - 1 краплю 10% розчину ацетатної кислоти та кип'ятять. В п'яту – 5 мл 0,45% розчину цинк сульфату і 1 мл 0,1М розчину натрій гідроксиду та кип'ятять. Після утворення осаду білка вміст кожної пробірки фільтрують. З кожним фільтратом проводять якісну реакцію на білок з сульфосаліциловою кислотою (див. роботу 1.5). Від'ємна реакція на білок говорить про повне осадження білка даним реактивом.

### **Робота 1.17. Розділення суміші амінокислот методом хроматографії на папері**

***Принцип.*** Метод хроматографії на папері заснований на різниці в коефіцієнті рухливості ( $R_f$ ) амінокислот чи інших речовин між органічною та водною фазами.

$$R_f = \frac{A}{B},$$

де: А - відстань, пройдена амінокислотою,  
В - відстань, пройдена фронтом розчинника.

Коефіцієнт рухливості є характерною величиною для кожної амінокислоти і постійний за даних умов досліду.

Значення  $R_f$  амінокислот при радіальній хроматографії для Н - бутанового розчинника:

Амінокислоти	Величина $R_f$
1. Цистеїн	0,30
2. Лізин	0,34
3. Аспарагінова кислота	0,46
4. Глутамінова кислота	0,51
5. Аланін	0,61
6. Пролін	0,64
7. Валін	0,82
8. Метионін	0,84
9. Лейцин	0,98

Хроматографічне визначення амінокислот на папері проводять в чашці Петрі за допомогою паперового диску, де розчинник переміщується по радіусу. Досліджувані амінокислоти наносять в центр паперового диску, розчинник захоплює амінокислоти, які розподіляються концентричними колами. Після висушування над електроплиткою та проявлення нінгідрином, на хроматограмі з'являються плями різного кольору. Кожна пляма відповідає окремій амінокислоті. Співставляючи положення плям досліджуваного розчину з положенням плям відомих амінокислот - "свідків", визначають наявність тих або інших амінокислот у досліджуваній суміші.

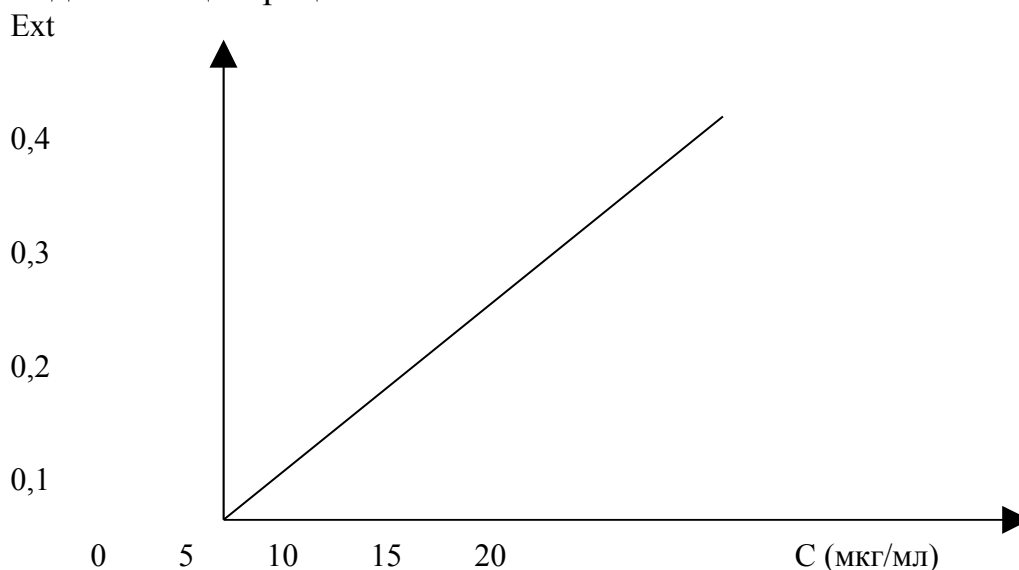
**Хід роботи.** На паперовому диску на відстані 2 см від центру проводять простим олівцем коло - лінію старту та відмічають на ній 4 крапки А, Б, В, Г на рівній відстані одна від одної. В центрі диску роблять невеликий отвір. На крапку А наносять скляним капіляром 0,5 % розчин досліджуваних амінокислот, а на крапку Б, В, Г наносять 0,5 % розчин відповідних амінокислот – "свідків": проліну, лейцину та аспарагіновою кислоти. Після чого паперовий диск висушують над електроплиткою. В отвір диску вставляють трубочку довжиною 1,5см зроблену з хроматографічного паперу. Накладають паперовий диск на край чашки Петрі, в яку попередньо наливають розчинник, що складається з бутанолу, ацетатної кислоти і води у співвідношенні 8:3:1. Паперова трубочка при цьому повинна бути занурена в розчинник. Чашку Петрі накривають кришкою і залишають при кімнатній температурі на 30-50 хвилин. Після цього відмічають олівцем відстань, на яку просунувся фронт розчинника. Диск висушують над електроплиткою. На хроматограму наносять 0,25% розчин нінгідрину в ацетоні в горизонтальному положенні за допомогою пульверизатора і знову висушують над електроплиткою. Проявляються забарвлені плями, які відповідають нанесеним на хроматограму амінокислотам. Ідентифікують невідомі амінокислоти, що

були нанесені в точку А по забарвлених плямах амінокислот - ”свідків” або вираховуючи для кожної амінокислоти коефіцієнт рухливості (Rf).

### **Робота 1.18. Кількісне визначення білка за методом Лоурі**

**Принцип:** Заснований на властивості білків утворювати забарвлені комплекси синього кольору при сумісній дії двох кольорових реакцій - біуретової і реакції Фоліна (відновлення білками суміші фосфатно-вольфрамислової та фосфатно-молібденової кислот - реактиву Фоліна). Метод відзначається високою чутливістю (виявляє до 10 – 100 мкг білка в пробі). Інтенсивність забарвлення комплексів вимірюють на фотоелектроколориметрі (ФЕК) при довжині хвилі 750 нм чи на спектрофотометрі.

Вміст білка в досліджуваній пробі визначають за калібрувальним графіком, побудованим шляхом вимірів оптичної густини (екстинкції) ряду розчинів з відомою концентрацією білка. По осі ординат відкладають екстинкцію, по осі абсцис - відомі концентрації білка



**Хід роботи.** Для аналізу беруть дві пробірки (дослідну і контрольну). В дослідну вносять 0,4 мл розведеної в 1000 разів сироватки крові, а в контрольну – 0,4 мл фізіологічного розчину. В обидві пробірки доливають по 2 мл біуретового реактиву. Через 10 хв. додають по 0,2 мл реактиву Фоліна і через 30 хвилин вимірюють інтенсивність забарвлення, що з'явилося в дослідній пробірці проти контролю на ФЕК.

Вміст білка визначають за формулою:

$$X = \frac{C \cdot 1000 \cdot 1000}{0,4 \cdot 1000000} = \dots \quad (\text{г/л}), \quad \text{де:}$$

C - маса білка за калібрувальним графіком, мкг/мл;

0,4 – кількість сироватки крові, взятої для дослідження, мл;

1000, 1000, 1000000 – коефіцієнти перерахунку мкг/мл в г/л.

**Клініко-діагностичне значення**

Дивись роботу 1.15.



### **Робота 1.19** Визначення ізоелектричної точки білків

**Принцип:** Внаслідок наявності здатних до іонізації функціональних груп амінокислот (-COOH, -NH<sub>2</sub>) молекули білка володіють електричним зарядом: позитивним (якщо переважають NH<sub>3</sub><sup>+</sup> заряди), негативним (якщо переважають COO<sup>-</sup> заряди) і рівним “нулю” (якщо сума NH<sub>3</sub><sup>+</sup> дорівнює сумі COO<sup>-</sup> зарядів). В кислому середовищі білки мають сумарний позитивний заряд: в лужному середовищі - негативний.

При певному значенні рН середовища позитивний і негативний заряди стають однаковими і сумарний заряд молекули дорівнює нулю. Значення рН, при якому білок електронейтральний (заряд рівний “нулю”), називають ізоелектричною точкою (ІЕТ). В цьому стані білок володіє найменшим значенням в'язкості, розчинності, ступеня гідратації та електропровідності, не спроможний пересуватися в електричному полі. Кожен білок має свої значення ІЕТ: казеїн - 4,6 -4,7; сироваточний глобулін - 5,4; протаміни - 10-12 і т.д. Існує цілий ряд засобів визначити ІЕТ білків.

**Хід роботи:** В кожну пробірку з 8 пронумерованих згідно означеної схеми (табл.1) вносять відповідні розчини.

В тій пробірці, де спостерігається максимальне помутніння вмісту (візуально або нефелометрично), рН розчину буде відповідати ізоелектричній точці білка.

Таблиця 1

Об'єм, мл	Номера пробірок							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Вода	8,40	7,75	8,75	8,50	8,00	7,00	5,00	1,00
0,01N розчину CH <sub>3</sub> COOH	0,60	1,25	-	-	-	-	-	-
0,1N розчину CH <sub>3</sub> COOH	-	-	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0
розчину білка	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
рН	5,9	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8

### **Робота 1.20.** Визначення вмісту аргініну в біологічному матеріалі

**Принцип:** Метод заснований на реакції Сакагуті, що полягає в утворенні забарвленої комплексної сполуки аргініну з  $\alpha$ -нафтолом. Даний метод дозволяє визначати вміст як вільного аргініну, так і зв'язаного в білках.

**Хід роботи.** 1 г паростків розтирають з кварцевим піском або товченим склом та додають 5 мл 80% етанолу, центрифугують 5 хв. при 3000 об/хв. До 1 мл супернатанту (або розчину яєчного білка, або плазми крові) додають 1 мл спиртового розчину  $\alpha$ -нафтолу, 1 мл 10% розчину КОН, змішують і додають 1 мл 5% розчину сечовини. Після перемішування при безперервному збовтуванні швидко приливають 2 мл розчину KBrO. Суміш

залишають на 20 хв. Оптичну густину вимірюють при 520 нм супроти контролю, в якому екстракт або розчин білка замінені 1 мл дистильованої води. Концентрацію аргініну розраховують за калібрувальним графіком, побудованим з використанням стандартного розчину, що містять 1 мкМ аргініну в 1 мл.

### **Робота 1.21. Виділення фібриногену з плазми**

Фібриноген міститься в плазмі (2-4 г/л). Його молекулярна маса біля 330000. Молекули фібриногену мають видовжену форму з відношенням осей 20:1. Розчини фібриногену дуже в'язкі, що зумовлено формою молекул. У процесі згортання крові фібриноген перетворюється у фібрин. На відміну від фібриногену фібрин не розчиняється у воді і володіє значно більшою молекулярною масою.

**Принцип:** При добавленні до плазми крові натрію хлориду до концентрації 10% в осад випадає практично тільки фібриноген, а всі інші білки плазми залишаються в розчині.

**Хід роботи:** Точно відмірюють піпеткою і наливають в центрифужну пробірку 2 мл плазми крові. Зважують 200 мг сухого натрій хлориду, висипають в пробірку з плазмою і старанно перемішують до повного розчинення. Спостерігають утворення осаду. Центрифужну пробірку з розчином урівноважують з центрифужною пробіркою, в яку наливають дистильовану воду. Пробірку центрифугують 15 хвилин при 3500 об/хв. Супернатант зливають в стакан. Осад являє собою щільну масу з добре вираженою волокнистою структурою.

### **Робота 1.22. Кількісне визначення білка біуретовим методом**

**Принцип:** В основі лежить кольорова реакція з біуретовим реактивом: білки в лужному середовищі реагують із купрум сульфатом, при цьому утворюються сполуки, забарвлені у фіолетовий колір.

**Хід роботи.** Для досліду беруть три пробірки. У першу (контрольну) пробірку вносять 1 мл 0.9% розчину натрій хлориду, у другу (дослідну) – 0,1 мл стандартного розчину білка (50 г/л), у третю (дослідну) пробірку – 0,1 мл досліджуваної сироватки крові. В усі пробірки добавляють по 5 мл біуретового реактиву, перемішують вміст пробірок. Через 30 хвилин визначають екстинкцію ФЕК дослідних пробірок (кювета 10 мм, червоний світлофільтр 750 нм) проти контрольної пробірки.

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{a \cdot b}{c}, \text{ де}$$

X – концентрація білка в досліджуваній сироватці крові, г/л;

a – концентрація білка стандартного розчину білка;



- b – екстинкція досліджуваної сироватки крові ;
- c – екстинкція стандартного розчину білка.

***Кількісно загальний білок можна визначати в сироватці або плазмі крові за допомогою тестового набору реактивів напіноматичним біохімічним аналізатором “ State Fax 1904 plus “ та іншими.***

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

У здорової людини вміст білків становить 60- 85г/л. Зменшення вмісту білків нижче 60 г/л - гіпопротеїнемія, а збільшення білків більше ніж 85 г/л - гіперпротеїнемія.

Гіпопротеїнемію спостерігають при: нефротичному синдромі, ентериті, хронічному панкреатиті, опіках, екземі, масивних крововтратах, хронічних захворюваннях нирок, під час голодування, при сецевій декомпенсації.

Гіперпротеїнемію спостерігають при: маглобулінемії Вальденстрема, ревматоїдному артриті, колагенозах, цирозі печінки, згущенні крові ( при діареї, блюванні, цукровому діабеті, важких травмах), гострих інфекційних захворюваннях.

## РОЗДІЛ II ФЕРМЕНТИ. КОФЕРМЕНТИ. ВІТАМІНИ

### **А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:**

1. Поняття про ферменти, їх значення в процесах життєдіяльності, історія ферментології.
2. Номенклатура та класифікація ферментів.
3. Поняття про активний та алостеричний центри ферментів. Алостеричний ефект. Регуляторні ферменти.
4. Клітинна організація ферментів. Мембранозалежні ферменти.
5. Властивості ферментів як біокатализаторів: специфічність дії, термолабільність, залежність ферментативної активності від рН середовища.
6. Активатори та інгібітори ферментів. Типи гальмування ферментативних реакцій. Застосування інгібіторів ферментів як лікарських препаратів в медичній практиці.
7. Принципи визначення та одиниці ферментативної активності.
8. Хімічна природа та структура ферментів.
9. Поняття про коферменти, їх значення, класифікація коферментів.
10. Вітаміни-попередники коферментів, їх класифікація. Загальні поняття вітамінології (вітаміни, антивітаміни, провітаміни, гіпо-, гіпер- та авітамінози, вітаміноподібні речовини).
11. Коферменти I-ї групи (переносники електронів та протонів), їх представники.  
Характеристика вітамінів РР, В<sub>2</sub>, С як попередників вітамінних коферментів цієї групи.
12. Коферменти II-ї групи (переносники окремих хімічних груп), їх представники  
Характеристика вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>8</sub>, В<sub>9</sub>, та В<sub>12</sub> як попередників коферментів II групи.
13. Жиророзчинні вітаміни, їх участь в обміні речовин.
14. Ізоферменти та мультиферментні комплекси. Клінічне значення визначення ізоферментів у крові.
15. Механізм дії ферментів, поняття про енергетику та кінетику ферментативних реакцій.
16. Види регуляції ферментативної активності.
17. Основні напрямки медичної ензимології: ензимопатологія, ензимодіагностика, ензимотерапія.
18. Ферменти, інгібітори ферментів, коферменти, вітаміни як лікарські препарати, їх клінічне застосування.
19. Принципи визначення активності  $\alpha$ -амілази та аскорбінової кислоти у сечі.

### **Б. Література:**

1. Лекції, що читаються на кафедрі.

- 2.Л.М.Вороніна, В.Ф.Десенко, Н.М.Мадієвська. "Біологічна хімія", Харків, 2000.С.:109-161, 426-463.
- 3.Е.А.Строев, "Биологическая химия",Москва,1986.С.:122-163, 339-370.
- 4.Ю.І.Губський, "Біологічна хімія", Київ-Тернопіль, 2000. С.:86-115, 399-411.
- 5.Я.І.Гонський, Т.П.Максимчук, М.І.Калинський, "Біохімія людини", Тернопіль "Укрмедкнига", 2002.С. 66-153.

## **В.Опис лабораторних робіт**

### **Робота 2.1. Специфічність дії ферментів**

**Принцип.** Амілаза(3.2.1.1.)слини прискорює гідроліз тільки полісахаридів (крохмалю), не впливає на дисахариди. Сахараза (3.2.1.26.), що міститься в дріжджовому екстракті, розщеплює тільки сахарозу. Продуктами гідролізу полі- і дисахаридів є моносахариди, зокрема, глюкоза, яка може бути відкрита реакцією Тромера. Позитивна реакція Тромера свідчить про повний гідроліз крохмалю та сахарози під впливом відповідних ферментів. Позитивна реакція з йодом вказує на відсутність гідролізу крохмалю.

**Хід роботи.** Взяти 4 пробірки. У першу та другу пробірки наливають по 5мл 1% розчину крохмалю, в третю і четверту пробірки доливають по 5 мл 2% розчину сахарози. Потім у першу і третю пробірки додають по 1 мл слини, що містить амілазу, в другу і четверту пробірки – по 1 мл дріжджового екстракту, що містить фермент сахаразу. Вміст пробірок старанно перемішують і ставлять у термостат на 20 хвилин при температурі 38-40°C.

Після закінчення цього строку вміст кожної пробірки ділять на дві частини: з однією частиною проводять реакцію на крохмаль (з йодом), з другою - реакцію Тромера на глюкозу (додають 10 крапель 10% розчину натрій гідроксиду та 2-3 краплі 1% розчину купрум(II) сульфату, нагрівають). Отримані результати заносять в таблицю.

№ пробірок	Вміст пробірок				Реакція з йодом ("+" чи "-")	Реакція Тромера ("+" чи "-")
	Розчин крохмалю, мл	Розчин сахарози, Мл	Слина, мл (амілаза)	Екстракт дріжджів, мл (сахараза)		
1	5	-	1	-		
2	5	-	-	1		
3	-	5	1	-		
4	-	5	-	1		

### **Робота 2.2. Залежність ферментативної активності від температури**

**Принцип.** Температура, при якій спостерігається максимальна швидкість ферментативної реакції, називається оптимальною і частіше дорівнює 37-40°C. При підвищенні температури швидкість більшості ферментативних процесів починає зменшуватись. Це пояснюється тепловою денатурацією білкової молекули ферменту і втратою каталітичної активності.

**Хід роботи.** У дві пробірки наливають по 1 мл 1% розчину крохмалю. В одну з них вносять 0,2 мл звичайної, а в другу - прокип'яченої слини. Вміст перемішують, ставлять в термостат при температурі 37°C на 10 хвилин. Потім у пробірки вносять по 1 краплі розчину йоду. У пробірці з нерозщепленим крохмалем з'являється синє забарвлення.

### **Робота 2.3. Вплив рН середовища на активність ферментів**

**Принцип.** Вплив рН на активність ферментів пояснюється тим, що білкова молекула ферменту є амфотерним поліелектролітом і його каталітична активність залежить від ступеня іонізації функціональних груп, які входять в його активний центр. Зміщення рН від оптимуму порушує зв'язок між білковою частиною ферментів та їх простетичними групами, що гальмує зв'язок субстрату з ферментом. Робота полягає у дослідженні активності амілази слини при різних значеннях рН.

**Хід роботи.** У 3 пронумеровані пробірки наливають по 5 мл 0,5% розчину крохмалю та по 1 мл фосфатного буфера з відповідним значенням рН: в першу - з рН 5,6; в другу - з рН 6,8; в третю – з рН 8,1. У кожену пробірку додають по 1мл слини, перемішують і ставлять в термостат при температурі 38°C. Через 20 хвилин у кожену пробірку доливають 1-2 краплі йоду.

Результати записують у таблицю і роблять висновки.

№ пробірок	рН середовища	Забарвлення
1	5,6	Синє
2	6,8	Жовте
3	8,1	Фіолетове

За результатами роботи вказують оптимум рН для амілази слини.

### **Робота 2.4. Вплив прозерину на гідроліз ацетилхоліну холінестеразою (3.1.1.8)**

**Принцип.** Гальмування дії ферментів може відбуватися в тому випадку, якщо з активним центром ферменту замість специфічного субстрату зв'язується його структурний аналог. Таке явище називається конкурентним гальмуванням. Прикладом конкурентного гальмування може бути вплив прозерину на гідроліз ацетилхоліну холінестеразою. Холінестераза - фермент, що розщеплює ацетилхолін (медіатор парасимпатичної нервової системи) на холін і ацетатну кислоту. Утворену ацетатну кислоту можна виявити індикатором - бромтимоловим синім (у кислому середовищі дає жовте забарвлення). Конкурентне гальмування ферментативного гідролізу ацетилхоліну можна викликати прозериним, який є структурним аналогом ацетилхоліну.

**Хід роботи.** У дві пробірки наливають по 2,5 мл сироватки крові і по 8 крапель розчину бромтимолового синього. Потім у першу пробірку додають 2 краплі розчину прозерину. Вміст пробірок старанно перемішують. У кожену пробірку додають по 8 крапель розчину ацетилхоліну, перемішують,

відмічають забарвлення в обох пробірках (воно повинно бути темно-зелене, в обох пробірках однакове). Потім пробірки залишають при кімнатній температурі на 1 годину. Під час досліду можна спостерігати, як поступово, в міру накопичення оцтової кислоти в результаті гідролізу ацетилхоліну забарвлення суміші в другій пробірці переходить у зелене, а потім у жовте, тоді як гідроліз у першій пробірці, де був прозерин, практично не відбувається і забарвлення суміші не змінюється.

### **Робота 2.5. Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази (3.2.1.1) слини**

**Принцип.** Активатором амілази є натрій хлорид (NaCl), інгібітором – купрум (II) сульфат (CuSO<sub>4</sub>). Дію цих речовин на активність амілази виявляють за ступенем гідролізу крохмалю під впливом ферментів у їх присутності.

**Хід роботи:** Беруть 3 пробірки. У першу наливають 1 мл води, в другу – 1мл 1% розчину NaCl, в третю – 1 мл 1% розчину CuSO<sub>4</sub>. В усі пробірки додають по 1 мл слини. Вміст перемішують і додають по 0,5 мл 1% розчину крохмалю, потім знову перемішують і залишають при кімнатній температурі на 5 хвилин. Далі в усіх пробірках проводять реакцію з йодом і спостерігають за характером забарвлення. Для більшої наочності забарвлення в кожен пробірку доливають по 2-3 мл води. Результати роботи заносять в таблицю і роблять висновки.

Вміст пробірок	Пробірки		
	1	2	3
Вода	+	-	-
NaCl, 1% розчин	-	+	-
CuSO <sub>4</sub> , 1% розчин	-	-	+
Слина (амілаза)	+	+	+
Крохмаль, 1% розчин	+	+	+
Забарвлення після додавання йоду			
Висновки			

### **Робота 2.6. Кількісне визначення активності α-амілази (3.2.1.1) в сечі за методом Вольгемута**

**Принцип.** Метод кількісного визначення активності амілази сечі за методом Вольгемута полягає в тому, що знаходять найменший вміст ферменту, який повністю розщеплює всю кількість доданого крохмалю, потім роблять перерозрахунок на 1 мл сечі.

**Хід роботи.** У 10 пробірок наливають по 1 мл 0,85% розчину натрій хлориду. В першу пробірку наливають 1 мл досліджуваної сечі, перемішують, 1мл суміші переносять у 2 пробірку, з другої пробірки 1 мл суміші переносять у 3-ю пробірку і т.д. З десятої пробірки 1 мл суміші виливають. У кожен пробірку наливають по 2 мл 0,1% розчину крохмалю, перемішують і ставлять на 30 хвилин у термостат при температурі 38°C, після чого додають у кожен

пробірку по 1 краплі розчину йоду. Враховують розведення сечі в останній пробірці з жовтим забарвленням.

**Приклад розрахунку:** якщо остання пробірка, в якій з'явилося жовте забарвлення, - третя, то розведення сечі в ній дорівнює 1:8. 1мл нерозведеної сечі може розщепити в 8 раз більшу кількість крохмалю, тобто  $A = 2 \times 8 = 16$ , де 2 - кількість 0,1% розчину крохмалю в мл, що використовується в досліді. Амілазна активність сечі в нормі коливається від 16 до 64 одиниць.

### **Робота 2.7. Конкурентне гальмування малоновою кислотою сукцинатдегідрогенази (1.3.99.1) м'язів**

**Принцип.** У присутності малонової кислоти знижується активність ферменту сукцинатдегідрогенази.

**Хід роботи.** У три пробірки вносять по 2-3 мл м'язевої кашки і додають: у першу - 0,4 мл води, в другу - 0,2 мл 1% розчину малонової кислоти та 0,2 мл води, в третю - 0,4 мл 1% розчину малонової кислоти. В усі три пробірки додають по 1мл 1% розчину янтарної кислоти, по 2-3 краплі 1% розчину метиленового синього і після перемішування - по 3-4 краплі вазелінового масла. Пробірки ставлять у термостат при температурі 38°C. Через 5-10 хвилин пробірки виймають і спостерігають зміну забарвлення. Результати заносять у таблицю, роблять висновки.

Вміст пробірок	Пробірки		
	1	2	3
М'язева кашкиця	+	+	+
Вода	+	+	-
Малонова кислота, 1% розчин	-	+	+
Янтарна кислота, 1% розчин	+	+	+
Метиленова синь, 1% розчин	+	+	+
Зміна забарвлення			
Висновки			

### **Робота 2.8. Визначення активності $\alpha$ -амілази (3.2.1.1.) в сироватці крові та сечі за методом Каравея**

**Принцип.**  $\alpha$ -амілаза розщеплює крохмаль з утворенням продуктів, що не дають кольорової реакції з йодом. Метод полягає в колориметричному визначенні залишку нерозщепленого крохмалю за ступенем інтенсивності його реакції з йодом.

**Хід роботи.** У дві колби ємкістю 50 мл (дослідну і контрольну) вносять по 2 мл розчину крохмалю. Дослідну пробу нагрівають при 37°C на протязі 5 хвилин, після чого в неї доливають 0,1 мл сироватки крові або профільтрованої сечі. Вміст колби перемішують і ставлять у термостат на 7,5 хвилин при 37°C. Після нагрівання дослідної колби в обидві колби додають по 5 мл робочого розчину йоду. Об'єм реактивів у колбах доводять дистильованою водою до 50

мл і негайно визначають екстинкцію розчинів на фотоелектроколориметрі при червоному світлофільтрі (довжина хвилі – 630 - 690нм) в кюветі товщиною шару 1см (контроль - дистильована вода).

**Розрахунок:** активність  $\alpha$ -амілази виражають в мг крохмалю, гідролізованого 1 мл біологічної рідини за 1 годину інкубації при 37°C. Розрахунок проводять за формулою:

$$A = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 2 \cdot 8 \cdot 10 \cdot K = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 160 \cdot K, \text{ де}$$

$E_1$  - екстинкція контрольної проби;

$E_2$  - екстинкція дослідної проби;

2 - кількість мг крохмалю, введеного в дослідну і контрольну проби;

8 - коефіцієнт перерахунку на 1 годину інкубації;

10 - коефіцієнт перерахунку на 1мл біологічної рідини;

K - коефіцієнт розведення біологічної рідини.

Пробірка	Склад проби			Екстинкція
	Кількість субстрату, мл	Кількість сироватки, мл	Кількість робочого розчину йоду, мл	
1	2,0	-	5,0	
2	2,0	0,1	5,0	
Розрахунок та висновки				

Нормальні показники активності ферменту: сироватка крові - 12-32 мг, сеча – 20 – 160 мг, дуоденальний вміст – 6 – 16 мг крохмалю, гідролізованого 1 мл біологічної рідини за 1 год. інкубації при 37°C. Результати дослідження заносять у таблицю.

### Ультрамикровариант

Хід визначення дослідної та контрольної проб той же, що і при мікроваріанті, але об'єм усіх реактивів і досліджуваної біологічної рідини зменшують у 5 разів. Визначення проводять у пробірках об'ємом 10 мл. Активність  $\alpha$ -амілази виражають у мг крохмалю, гідролізованого 1 мл біологічної рідини за 1 годину інкубації при 37°C. Активність  $\alpha$ -амілази розраховують за формулою:

$$A = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 2 \cdot 8 \cdot 10 \cdot K = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 160 \cdot K, \text{ де}$$

$E_1$  - екстинкція контрольної проби;

$E_2$  - екстинкція дослідної проби;

2 - кількість мг крохмалю, введеного в дослідну і контрольну проби;

8 - коефіцієнт перерахунку на 1 год. інкубації;

10 - коефіцієнт перерахунку на 1мл біологічної рідини;

K - коефіцієнт розведення біологічної рідини.

### **Робота 2.9. Відкриття дії ферменту пепсину (3.4.4.1)**

**Принцип.** Протеолітичну активність пепсину можна спостерігати, додавши до його підкисленого розчину невелику кількість фібрину. Фібрин, нерозчинний у воді, під дією пепсину гідролізується до розчинених пептидів, що підтверджується біуретовою реакцією.

**Хід роботи.** У три пробірки наливають по 1 мл 0,2% розчину пепсину в 0,2% розчині хлоридної кислоти. В другу пробірку додають 10% розчин натрій карбонату до лужної реакції середовища на лакмус, а вміст третьої пробірки кип'ятять 1-2 хвилини, потім охолоджують. У кожен пробірку додають маленький шматочок фібрину (величиною з просяне зернятко), пробірки ставлять у термостат на 30 хвилин при температурі 38°-40°С.

Після цього відзначають зміни, які пройшли з фібрином (його розчинення). Потім проводять з вмістом кожної пробірки біуретову реакцію (див. роботу 1.9.), попередньо підлуживши вміст першої пробірки. Відзначають результати.

### **Робота 2.10. Відкриття дії ферменту ліпази (3.1.1.3)**

**Принцип.** Ліпазу можна виявити, додавши розчин ферменту до молока, підлуженого розчином натрій карбонату до блідо-рожевого кольору по фенолфталеїну. В присутності ліпази проходить гідролітичне розщеплення жиру молока на гліцерин та жирні кислоти, реакція середовища зсувається у кислу сторону, і рожеве забарвлення зникає.

**Хід роботи.** У дві пробірки наливають по 10 крапель молока. У першу пробірку додають 5 крапель витяжки з підшлункової залози або 3% розчин панкреатину, що містить ліпазу. В другу пробірку додають таку ж кількість води. В обидві пробірки вносять по одній краплі 1% розчину фенолфталеїну і краплями 1% розчин натрій карбонату до появи блідо-рожевого забарвлення (не можна добавляти надлишок розчину натрій карбонату). Пробірки ставлять у термостат при температурі 38°С на 30 хвилин. Спостерігають зміну забарвлення.

### **Робота 2.11. Кількісне визначення активності пептидаз панкреатину**

**Принцип.** Метод ґрунтується на здатності пептидаз гідролізувати пептидні зв'язки, що призводить до зростання кількості вільних аміно- та карбоксильних груп.

Після блокування аміногруп формаліном карбоксильні групи підвищують кислотність середовища, приріст якого визначають шляхом титрування лугом за методом Зеренсена в присутності індикатора фенолфталеїну.

**Хід роботи.** У дві пробірки додають по 5мл 6% розчину казеїну і по 2мл фосфатного буфера з рН 7,6. В одну з пробірок додають 0,5г панкреатину, старанно перемішують і ставлять в термостат при температурі 37° С разом з контрольною пробіркою.



Через 30 хв. пробірки виймають з бані, охолоджують. Їх вміст переливають у колбочки для титрування. Додають у кожен по 2-3 краплі фенолфталеїну і підлужують з піпетки 0,2М розчином натрій гідроксиду до утворення слабкорожевого забарвлення (рН 8,3).

За такої рН кількість аміногруп у розчині дорівнює кількості карбоксильних груп. Далі в обидві колбочки додають по 5 мл формолової суміші (рН 8,3). Формалін зв'язує аміногрупи, а карбоксильні групи зсувають значення рН розчину до кислих значень.

Розчин знебарвлюється. Обидві проби титрують з бюретки 0,02М розчином натрію гідроксиду до утворення слабкорожевого забарвлення (рН 8,3) і додають ще декілька крапель 0,02М розчину натрій гідроксиду до утворення яскраво-червоного кольору (рН 9.1.).

**Розрахунок.** Вираховують різницю між даними титрування досліджуваного і контрольного розчинів. Активність пептидаз виражають в умовних одиницях. Одна умовна одиниця відповідає 1 мл 0,02М розчину натрій гідроксиду, використаного на титрування дослідної проби.

**Клініко-діагностичне значення визначення активності ферментів.** Амілаза /3.2.1.1./ гідролізує крохмаль і декстрини. В організмі вона переважно синтезується в слинних і підшлунковій залозах, хоч її активність реєструється і в печінці, нирках, кишках, легенях.

Підвищення активності амілази спостерігають при панкреатиті, перитоніті, тромбозі судин, розриві маткової труби при позаматковій вагітності, скороченні сфінктера Одді, внаслідок введення в організм морфіну, кодеїну, АКТГ та кортизолу.

Підвищення активності амілази слинних залоз спостерігають при нирковій недостатності, стоматиті, невралгії лицевого нерва, паркінсонізмі. Зниження активності амілази спостерігають при психічних захворюваннях, які супроводжуються збудженням або депресією, при анацидних порушеннях.

Пептидази - це група гідролітичних ферментів, які розщеплюють білки до амінокислот. В організмі пептидази локалізовані як в окремих клітинах, так і секретуються екзокринними залозами в травний тракт. Найбільш активні пептидази підшлункової залози: трипсин, хімотрипсин, карбоксипептидаза.

У нормі активність пептидаз сироватки крові становить 0,2-1,7 мкмоль/мл/год. Збільшення вмісту пептидаз у сироватці крові та зростання їх активності спостерігають, перш за все, під час розпаду окремих ділянок органів і тканин. Це стосується, у першу чергу, гострого панкреатиту, виразкової хвороби, обширних опіків, гострого гепатиту. При цих захворюваннях активність пептидаз у сироватці крові може збільшуватись у десятки і сотні разів. Зниження активності пептидаз можна спостерігати при емфіземі легенів, цирозі печінки.

## **Робота 2.12. Якісні реакції на вітаміни**

### **2.12.1. Реакція на вітамін А**

В пробірку вносять 2 краплі розчину вітаміну А та доливають 2 краплі концентрованої сульфатної кислоти. З'являється фіолетове забарвлення, що переходить в буре.

### 2.12.2. Реакція на вітамін В<sub>1</sub>

До 3 крапель 5% розчину вітаміну В<sub>1</sub> (тіаміну) доливають 10 крапель 10% розчину натрій гідроксиду та 2 краплі 5% розчину калій гексаціано(III)ферату. З'являється жовте забарвлення в результаті окислення тіаміну в тіохром, яке при опромінюванні ультрафіолетовими променями дає синю флуоресценцію.

### 2.12.3. Реакція на вітамін В<sub>2</sub>

**Принцип.** Реакція заснована на властивості вітаміну В<sub>2</sub> легко відновлюватися. Розчин вітаміну В<sub>2</sub>, що володіє жовтим забарвленням, при відновленні набуває спочатку рожевого кольору за рахунок утворення родофлавіну, а потім знебарвлюється.

**Хід роботи.** В пробірку наливають 10 крапель розчину вітаміну В<sub>2</sub>, потім доливають 5 крапель концентрованої хлоридної кислоти і опускають зернину металевого цинку. Починається утворення пухирців водню. Рідина поступово рожевіє, а потім знебарвлюється.

### 2.12.4. Реакція на вітамін В<sub>6</sub>

**Принцип.** Вітамін В<sub>6</sub> з ферум(III)хлоридом утворює сполуку типу ферум феноляту, яка забарвлена в червоний колір.

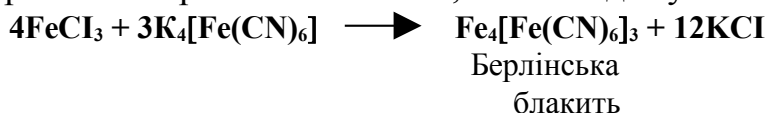
**Хід роботи.** До 5 крапель 1% розчину вітаміну В<sub>6</sub> доливають 1 краплю 1% розчину ферум(III)хлориду. З'являється червоне забарвлення.

### 2.12.5. Реакція на вітамін РР

В пробірку вносять 8 крапель розчину вітаміну РР, доливають 2 краплі 5% розчину кристалогідрату купрум(II) сульфату(CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O) і нагрівають на кип'ячій водяній бані. З'являється синій осад мідної солі нікотинової кислоти.

### 2.12.6. Реакція на вітамін С (аскорбінову кислоту)

**Принцип.** Аскорбінова кислота в лужному середовищі може відновлювати калій гексаціано(III)ферату(червону кров'яну сіль-іК<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] ) до калій гексаціано(II)ферату (жовтої кров'яної солі - К<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] ); останній можна відкрити, додаючи розчин ферум (III) хлориду. В кислому середовищі утворюється берлінська блакить, яка випадає у вигляді темно-синього осаду.



**Хід роботи.** До 5 крапель 1% розчину вітаміну С прибавляють 1 краплю 10% розчину натрій гідроксиду і 1 краплю 5% розчину калій гексаціано(III)ферату, перемішують і доливають 3 краплі 10% розчину

хлоридної кислоти, і 1 краплю 1% розчину ферум (III) хлориду. Випадає осад берлінської блакиті.

### **Робота 2.12.7. Йодна проба на аскорбінову кислоту**

**Принцип.** Аскорбінова кислота відновлює молекулярний йод до безбарвної йодводневої кислоти.

**Хід роботи.** В дві пробірки наливають по 10 крапель дистильованої води, додають по 1-2 краплі 0,1% розчину йоду в калій йодиді. В першу пробірку додають 10 крапель екстракту з шипшини, в другу таку ж кількість дистильованої води. В першій пробірці розчин йоду знебарвлюється.

### **Робота 2.12.8. Виявлення вітаміну Е реакцією з ферум (Ш) хлоридом**

**Принцип.** Спиртовий розчин альфа-токоферолу окиснюється ферум хлоридом до токоферілхінону червоного кольору.

**Хід роботи.** В суху пробірку вливають 4-5 крапель 0,1% розчину токоферолу, додають 0,5 мл 1% розчину ферум хлориду, перемішують, нагрівають до появи червоного кольору.

### **Робота 2.12.9. Виявлення вітаміну К реакцією з аніліном**

**Принцип.** Спиртовий розчин 2-метил-1,4-нафтохінону за наявності аніліну забарвлюється в червоний колір, що зумовлено утворенням 2-метил-3-феніламіно-1,4-нафтохінону.

**Хід роботи.** В пробірку наливають 16 крапель 0,05% спиртового розчину вікасолу і додають 2 краплі 0,05% розчину аніліну, струшують. Рідина забарвлюється в червоний колір.

## **Робота 2.13. Кількісне визначення аскорбінової кислоти**

**Принцип.** Метод кількісного визначення аскорбінової кислоти заснований на її здатності окислюватися в дегідроаскорбінову кислоту і відновлювати 2,6-діхлорфеноліндофенол, який при відновленні забарвлюється.

### **2.13.1. Визначення аскорбінової кислоти в сечі**

**Хід роботи.** В колбочку наливають 10 мл сечі, 10мл води і 16 крапель концентрованої ацетатної кислоти. Титрують 0,001М розчином індикатору 2,6-діхлорфеноліндофенолу до рожевого забарвлення, яке не зникає на протязі 30 секунд.

Проводять розрахунок аскорбінової кислоти в добовій сечі, беручи до уваги, що 1 мл 0,001М розчину індикатору відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти.

### **2.13.2. Визначення аскорбінової кислоти в молоці**

**Хід роботи.** В колбочку наливають 5 мл розведеного в 3 рази молока, додають 16 крапель 2% розчину хлоридної кислоти і 10 мл води. Вміст титрують 0,001М розчином індикатору 2,6-діхлорфеноліндофенолу до рожевого забарвлення. Розрахунок аскорбінової кислоти (X) проводять за формулою:

$$B \cdot 3 \cdot 0,088 \cdot 100$$

$$X = \frac{\quad}{5} \text{ мг \% , де}$$

V – об'єм індикатору в мл, що пішов на титрування ;

3 - розведення молока;

0,088 - титр індикатору 2,6-дихлорфеноліндофенолу;

100 - перерахунок на 100мл молока;

5 - об'єм молока в мл, взята для титрування.

В нормі добове виділення аскорбінової кислоти із сечею 20-30мг.

Концентрація аскорбінової кислоти в молоці корови біля 1мг%.

### **Клініко-діагностичне значення**

При деяких захворюваннях органів травної системи (виразкова хвороба, гастрит, ентерит, холецистит тощо) порушується всмоктування вітамінів через стінку кишок у кров і посилюється процес розпаду вітамінів у травному тракті. Внаслідок цього можуть виникнути гіповітамінози, тобто недостатня вітамінна забезпеченість організму.

Для оцінки С-вітамінної забезпеченості організму в клінічній практиці визначають вміст вітаміну С у крові та сечі. В нормі в крові дорослої людини вміст вітаміну С становить 39,7 – 113,6 мкмоль/л. У здорової людини за добу із сечею виводиться 20 – 30 мг або 113,55 – 170,33 мкмоль вітаміну С.

Авітаміноз С призводить до виникнення такого захворювання , як цинга, що супроводжується ціанозом губ, нігтів, кровоточивістю ясен, блідістю і сухістю шкіри, точковими підшкірними крововиливами, розгойдуванням і випаданням зубів, болем у суглобах, повільним загоєнням ран.

### **Робота 2.13.3 Визначення вітаміну С в харчових продуктах (шипшині).**

**Хід роботи.** Зважують 1 г шипшини. Наважку старанно подрібнюють ножицями і розтирають у фарфоровій ступці з кварцевим піском. До розтертої маси додають 9 мл 2% розчину хлоридної кислоти. Відстоюють 10 хв. Вміст перемішують декілька разів і фільтрують. Для кількісного визначення беруть 3мл витяжки, поміщають її в конічну колбу і титрують 0,001М розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке не зникає на протязі 30 секунд.

**Розрахунок.** Кількість вітаміну С (у відсотках) розраховують за формулою:

$$X = \frac{a \cdot 0,088 \cdot 10 \cdot 100}{3 \cdot 1} \text{ , де:}$$

a – об'єм індикатору, що пішов на титрування, мл;

0,088 - кількість аскорбінової кислоти, відповідна 1мл 0,001М розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфенолуіндофенолу, г;

10 - об'єм фільтрату, мл ;

100 - коефіцієнт для перерахунку відсотки;

3 – об'єм витяжки для титрування, мл ;

1 - наважка харчового продукту, г.



### **Робота 2.14. Кількісне визначення рутину (вітаміну Р) в чаї**

**Принцип.** Визначення основане на здатності рутину окислюватися калій перманганатом. В ролі індикатору застосовується індигокармін, який вступає в реакцію з калій перманганатом після того, як окислюється весь рутин. Експериментально встановлено, що 1мл розчину калій перманганату ( $C_n=0,05$ моль/л) окислює 3,2 мкг рутину.

**Хід роботи.** До 0,1 г чаю доливають 50мл гарячої води і проводять екстракцію 5 хв.; 10 мл екстракту чаю відмірюють в колбочку, доливають 10 мл дистильованої води і 10 крапель індикатору індигокарміну, титрують розчином калій перманганатом ( $C_n=0.05$  моль/л) до появи стійкого жовтого забарвлення. Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{3,2 \cdot A \cdot 50 \cdot 100}{10 \cdot 0,1 \cdot 100}, \text{ мг \%}, \text{ де}$$

3,2 – маса рутину в мкг, яка відповідає 1мл розчину калій перманганату( $C_n=0,05$  моль/л);

A - об'єм розчину калій перманганату( $C_n= 0,05$  моль/л), що пішов на титрування;

50 – загальний об'єм витяжки, мл;

100 - перерахунок на 100 г чаю;

10 - об'єм екстракту, що взятий для титрування, мл;

0,1 – маса речовини в г , що взята для аналізу;

1000- перерахунок в мг.

В нормі в чаї міститься 30-50 мг% рутину.

### **Робота 2.15 Визначення стійкості вітаміну С при нагріванні в різних умовах**

**Принцип.** Вітамін С легко руйнується при нагріванні. Для виявлення умов, що сприяють або гальмують окислення (руйнування), спостерігають результати дії високої температури на вітамін С в присутності різних речовин.

**Хід роботи.** В три колбочки відміряють по 5 мл настою шипшини (або по 10 мл настою хвої). Потім доливають в першу колбочку 5 мл 1М розчину НСІ, в другу - 10 крапель 3%  $H_2O_2$ , в третю - 0,5 мл 10% розчину  $CuSO_4$  . Всі колбочки кип'ятять на електричній плитці на протязі 2 хв. Після охолодження в першу, другу і третю колбочки доливають по 5 мл 1М НСІ і по 20 крапель крохмалю в кожен пробу. Титрують кожен пробу розчином йоду з  $C_n=0,01$ моль до стійкого на протязі 30 секунд синього, або бурого кольору.

Порівнюють цифри титрування після нагрівання в різних умовах з вихідними цифрами титрування настою шипшини або хвої. Роблять висновки, при яких умовах вітамін С зберігається в найбільшому ступені. Отримані результати записують в протокол у вигляді наступної таблиці:

### Стійкість вітаміну С при нагріванні в різних умовах.

	Умови нагрівання		
	HCl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CuSO <sub>4</sub>
Об'єм в мл 0,01М розчину йоду, що пішло на титрування.			
Висновки:			

#### Г. Контрольні питання з теми "Ферменти, коферменти, вітаміни"

1. Історія розвитку ферментології та значення ферментів у процесах життєдіяльності.
2. Номенклатура та класифікація ферментів.
3. Властивості ферментів як біокаталізаторів, умови їх дії.
4. Хімічна природа та структура ферментів.
5. Центри ферментів. Регуляторні ферменти.
6. Клітинна організація ферментів. Мембранозалежні ферменти.
7. Активатори та інгібітори ферментів.
8. Типи гальмування ферментативних реакцій. Застосування інгібіторів ферментів в медичній практиці.
9. Принципи визначення та одиниці ферментативної активності.
10. Поняття про коферменти, їх значення і класифікації.
11. Вітаміни - попередники коферментів, їх класифікація.
12. Загальні поняття вітамінології (вітаміни, антивітаміни, провітаміни, гіпо-, гіпер-, та авітамінози, вітаміноподібні речовини).
13. Будова та механізм дії коферментів: переносників електронів і протонів та окремих хімічних груп.
14. Характеристика водорозчинних вітамінів як попередників вітамінних коферментів.
15. Характеристика жиророзчинних вітамінів (А, D, E, K). Їх участь в обміні речовин та коферментні функції.
16. Ізоферменти, клінічне значення визначення спектру ізоферментів в крові.
17. Мультиферментні комплекси, їх значення, приклади.
18. Види регуляції ферментативної активності.
19. Механізм дії ферментів, поняття про кінетику та енергетику ферментативних реакцій.
20. Основні напрямки медичної ензимології: ензимопатологія, ензимодіагностика, ензимотерапія.
21. Ферменти, коферменти, вітаміни - як лікарські препарати.
22. У чому полягають принципи визначення активності  $\alpha$ -амілази та вітаміну С у сечі?



## РОЗДІЛ ІІІ

### БІОЛОГІЧНЕ ОКИСНЕННЯ. МЕТАБОЛІЗМ КСЕНОБІОТИКІВ ТА МІКРОСОМАЛЬНЕ ОКИСНЕННЯ

#### А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:

1. Поняття про обмін речовин в організмі гетеротрофів.
2. Поняття про обмін енергії в організмі гетеротрофів.
3. Центральні метаболічні шляхи проміжного (внутрішньоклітинного) обміну.
4. Центральні метаболіти та стадії катаболізму, що дають енергію.
5. Цикл трикарбонових кислот Кребса (ЦТК) - визначення, локалізація, значення. Хімізм.
6. Енергетичний баланс та регуляція ЦТК.
7. Історія розвитку вчення про біологічне окиснення (роботи М.О.Баха, В.І.Палладіна та ін.).
8. Сучасні уявлення про біологічне окиснення. Ферменти та коферменти дихального ланцюга. Структура комплексів дихального ланцюга (I, II, III, IV), їх склад та значення. Редокспотенціал, його значення.
9. Утворення  $H_2O_2$  та  $CO_2$  в тканинах. Допоміжні ферменти тканинного дихання.
10. Інгібітори тканинного дихання.
11. Окисне фосфорилування. Основні положення хеміосмотичної теорії Мітчелла. Генерація  $\Delta\mu H^+$ .
12. Коефіцієнт окисного фосфорилування P/O, та його значення. Макроергічні сполуки. Будова АТФ та її значення.
13. Роз'єднувачі окисного фосфорилування та тканинного дихання. Патологія.
14. Уявлення про ксенобіотики, мікросомальне окиснення та фармакокінетику.
15. Шляхи введення, механізм абсорбції, розподіл лікарських речовин в організмі, шляхи введення.
16. Доля ксенобіотиків в організмі, види локалізації біотрансформації лікарських речовин в організмі.
17. Мікросомальні електронотранспортні ланцюги. Характеристика та значення цитохрому P-450, індукція монооксигенази.
18. Реакції катаболізму ксенобіотиків: кон'югації, гідроліз, гідроксилування, деалкілування.
19. Вплив екзогенних та ендогенних факторів на метаболізм лікарських речовин.
20. Шляхи обміну етанолу, окиснення до кінцевих продуктів. Механізм біологічної дії етанолу (реакції взаємодії ацетальдегіду з різними речовинами і значення утворених продуктів). Ендогенний етанол та його значення.
21. Принципи методу визначення АТФ, каталази, пероксидази.

#### Б. Література:

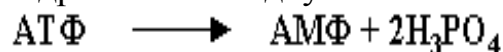
- 1.Л.М.Вороніна «Біологічна хімія»,Харків,2000.С.172-224, 257-265.
- 2.Ю.І. Губський «Біологічна хімія»,Київ-Тернопіль, 2000.С. 115-143.
- 3.Е.А.Строев «Биологическая химия»,Москва,1986.С. 115-122, 190-193.
- 4.Я.І.Гонський та співавтори ”Біохімія людини”, Тернопіль, 2002, С. 244-255, 257-286, 311-319.
- 4.Лекції , що читаються на кафедрі.

## **В. Опис лабораторних робіт**

### **Робота 3.1. Кількісне визначення АТФ в біологічних рідинах**

**Принцип.** АТФ-аденозинтрифосфорна кислота – основна макроергічна сполука організму, яка синтезується в мітохондріях в процесі окислювального фосфорилування. Значна кількість АТФ міститься в еритроцитах (в нормі 0,9-1,5 мМ/л фільтрату еритроцитів).

Кількісне визначення АТФ проводять фотоколориметрично по збільшенню неорганічного фосфату ( $H_3PO_4$ ) після 7 хвилинного гідролізу з 1М НСІ за кольоровою реакцією з амоній молібдатом, в присутності відновлювача аскорбінової кислоти, при  $\lambda=590$  нм (червоний світлофільтр), в кюветі 0,3см , проти дистильованої води. Гідроліз АТФ відбувається за схемою:



#### ***Хід роботи.***

1 - Визначення неорганічного фосфату у фільтраті еритроцитів до гідролізу.

В пробірку №1 вносять 0,5 мл фільтрату еритроцитів, додають 1 мл дистильованої води, 0,25 мл 2,5% розчину амоній молібдату та 0,25 мл свіжовиготовленого 1% розчину аскорбінової кислоти. Після 5 хв. інкубації пробу фотометрують при довжині хвилі 590 нм в кюветі 0,3 см проти дистильованої води. Концентрацію ( $C_1$ ) знаходять за калібрувальним графіком.

2 - Визначення неорганічного фосфату у фільтраті еритроцитів після гідролізу.

В пробірку №2 вносять 0,5 мл фільтрату еритроцитів, додають 1 мл дистильованої води та 7 крапель 1М розчину НСІ .Проводять кислотний гідроліз – пробу кип'ятять на водяній бані рівно 7 хвилин, після чого додають 0,25 мл 2,5% розчину амонію молібдату та 0,25 мл 1% розчину аскорбінової кислоти і після 5 хвилинної інкубації знову фотометрують. Концентрацію ( $C_2$ ) знаходять за калібрувальним графіком.

**Розрахунок.** Кількість АТФ у фільтраті еритроцитів розраховується по формулі:

$$X = \frac{(C_2 - C_1) \cdot 0,5 \cdot 2000}{2 \cdot 10 \cdot 1000}, \text{ де}$$

$C_2$ - маса АТФ у фільтраті еритроцитів, знайдена за калібрувальним графіком (після гідролізу) в мкм;

$C_1$ - маса АТФ у фільтраті еритроцитів, знайдена за калібрувальним графіком (до гідролізу);

2- коефіцієнт перерахунку неорганічного фосфату в АТФ;

10, 1000, 2000- коефіцієнти переведення в мМ;

0,5- об'єм фільтрату еритроцитів.

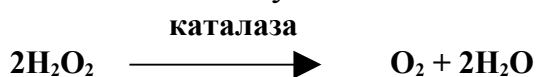
В нормі 1л фільтрату еритроцитів містить 0,9-1,5 ммоль АТФ.

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

Відомо, що концентрація АТФ збільшується в фільтраті еритроцитів при гіпоксії, а знижується при спадкових гемолітичних анеміях.

## **Робота 3.2. Кількісне визначення активності каталази (1.11.1.6) крові (за методом Баха і Зубкової)**

**Принцип.** Фермент каталаза міститься у великій кількості в еритроцитах, а також в усіх тканинах і рідинах організму. Біологічна роль каталази полягає в знешкодженні гідроген пероксиду ( $H_2O_2$ ) шляхом його розпаду на молекулярний кисень і воду:



Активність каталази виражають за допомогою числа і показника каталази. Каталазним числом називають кількість мг гідроген пероксиду, яка розкладається одним мкл крові за певний проміжок часу. Про кількість розкладеного гідроген пероксиду судять по різниці кількості калій перманганату, яка пішла на титрування контрольної та дослідної проб.

Показником каталази називають відношення каталазного числа до числа мільйонів еритроцитів в мкл досліджуваної крові.

**Хід роботи. Готують лаборанти:** у мірну колбу на 100 мл наливають 10 мл дистильованої води, туди ж вносять мікропіпеткою 0,1 мл крові. Піпетку промивають декілька разів тим же розчином. Воду додають у колбу до мітки та отримують основний розчин крові (1:1000), який використовується для визначення каталазного числа.

**Виконують студенти:** у дві колби для титрування наливають по 7 мл води і додають по 1мл основного розчину крові. У кожену колбу вносять точно по 2 мл 1% розчину гідроген пероксиду. У контрольну колбочку вносять 3 мл 10% розчину сульфатної кислоти для розкладання каталази. Обидві колби залишають при кімнатній температурі на 30 хвилин. Потім у дослідну колбу доливають 3 мл 10% розчину сульфатної кислоти для розкладання каталази. Обидві колби залишають при кімнатній температурі на 30 хвилин. Потім у дослідну колбу наливають 3мл 10% розчину сульфатної кислоти та відтитровують вміст обох колб 0,1М розчином калій перманганату до появи рожевого забарвлення. Різницю між результатами дослідів і контролю множать на 1,7 і отримують каталазне число крові.

Приклад розрахунку: моль-еквівалент  $H_2O_2$  рівний 17г. Отже, в 1 мл 0,1М розчину міститься 1,7 мг  $H_2O_2$ ; перемноживши 1,7 на різницю між кількістю мл 0,1М розчину калій перманганату, що пішов на титрування вмісту контрольної і дослідної колб, отримують кількість мг гідроген пероксиду, яке розкладається 1мкл досліджуваної крові, тобто отримують

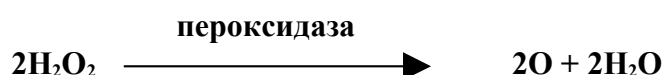
одразу каталазне число. В нормі каталазне число коливається від 10 до 15 одиниць.

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

При кількісному визначенні активності каталази необхідно порівнювати показники каталази, а не каталазні числа, тому що фермент міститься майже виключно в еритроцитах. Вміст каталази в крові знижується при ряді захворювань, таких як: рак, анемія, туберкульоз та інші.

### **Робота 3.3. Визначення активності пероксидази (1.11. 1.7.) крові**

**Принцип.** Пероксидаза міститься в усіх рослинних клітинах. Гемоглобіну, міоглобіну і цитохромам також властива слабка пероксидазна активність. Пероксидаза перетворює гідроген пероксид на воду і атомарний кисень:



**Хід роботи.** У пробірку вносять 2 мл ацетатного буфера, 3мл розведеної крові (1:1000), 2 мл дистильованої води і 8 крапель з  $C_n = 0,001$  моль/екв розчину індигокарміну. Потім додають 2 мл 0,2 моль/екв розчину гідроген пероксиду і перемішують. Час додавання розчину гідроген пероксиду фіксують як початок реакції вмиканням секундоміру. Реакцію вважають завершеною, як тільки синє забарвлення індигокарміну перейде в жовте. В нормі пероксидазна активність крові коливається між 30-50 секунд.

### **Робота 3.4. Співставлення редокспотенціалу рибофлавіну та метиленової сині**

Напрямок та послідовність переносу електронів залежать від величини редокспотенціалу. Редокспотенціал (РОП) - це електричний заряд, що виникає на платинових електродах, занурених у розчин окисненої та відновленої форми однієї і тієї ж речовини. Речовини з більшим РОП окиснюють речовину з меншим РОП, тобто транспорт електронів відбувається від меншого потенціалу до більшого. Таким чином, порядок переносу гідрогену ферментними системами в дихальному ланцюгу не випадковий. Він обумовлений величиною РОП їх коферментів.

**Принцип.** Відновлення метиленової сині гідрогеном, який добувають взаємодією цинку з хлоридною кислотою, відбувається раніше, ніж відновлення рибофлавіну, тому що її РОП ( $E_0 = +0,11\text{В}$ ) більше, ніж у рибофлавіну ( $E_0 = -0,02\text{В}$ ). При відсутності гідрогену спочатку окиснюється відновлений рибофлавін, а потім починається окиснення лейкометиленової сині.

**Хід роботи.** У пробірку вносять 4-6 крапель дистильованої води, 2 краплі рибофлавіну і по краплях розчин метиленової сині до синього або зеленувато-синього забарвлення розчину. Потім у пробірку вносять шматочок цинку і краплю концентрованої хлоридної кислоти. При цьому починається виділення пухирців гідрогену. По мірі насичення розчину гідрогеном, РОП постійно знижується, і відбувається відновлення рибофлавіну і метиленової сині. Але

відновлення метиленової сині (E<sub>0</sub> = +0,11В) відбувається раніше, ніж відновлення значної частини внесеного в пробірку рибофлавіну (E<sub>0</sub> = -0,02В), тому колір рідини поступово переходить в зелений, жовто-зелений, жовтий, безбарвний. Жовтий колір рибофлавіну при його відновленні змінюється спочатку на рожевий: утворюється проміжний продукт відновлення - родофлавін. Після відновлення рибофлавіну розчин знебарвлюється. Безбарвну рідину зливають в іншу пробірку і спостерігають перехід забарвлення в жовто-зелене, синє.

Гідроген у рідину більше не поступає, а розчинений гідроген переноситься через рибофлавін та метиленову синь на кисень повітря. Після втрати гідрогену починається окиснення відновленого рибофлавіну; він передає свій гідроген через індикатор - метиленову синь на кисень і жовтіє (частина гідрогену поступає на кисень, обминаючи індикатор). Після цього починається окиснення лейкоформи метиленової сині - розчин стає спочатку зеленим, потім синім.

### **Робота 3.5. Визначення активності сукцинатдегідрогенази (1.3.99.1)**

**Принцип.** Сукцинатдегідрогеназа каталізує дегідрування янтарної кислоти (сукцинату), при якому остання перетворюється на фумарову кислоту, а сукцинатдегідрогеназа відновлюється. При додаванні в середовище окисненої форми метиленової сині відновлена сукцинатдегідрогеназа передає гідроген на метиленову синь, яка переходить в лейкоформу. Критерієм активності сукцинатдегідрогенази є час знебарвлення метиленової сині в присутності янтарної кислоти в анаеробних умовах.

**Хід роботи.** У фарфоровій ступці розтирають 1 г тканини печінки щура з 20 мл дистильованої води для отримання гомогенату. Потім у 2 пробірки (дослідну і контрольну) поміщають по 2 мл отриманого гомогенату. В обидві пробірки наливають по 1 мл фосфатного буфера (рН=6,8), по 2 мл нейтралізованого розчину янтарної кислоти (з C<sub>н</sub>=0,01М) і додають по 2 краплі 0,05% розчину метиленової сині. У контрольну пробірку додають 5 крапель концентрованої хлоридної кислоти. Вміст обох пробірок перемішують і заливають підігрітим агар-агаром на висоту приблизно 1 см. Пробірки поміщають в стаканчики з кригою для застигання агар-агару. Потім пробірки ставлять в термостат при температурі 37°C. Дослід вважають закінченим, якщо в дослідній пробірці рідина буде майже безбарвна. У контрольній пробірці рідина не змінює забарвлення, бо фермент, при додаванні хлоридної кислоти, денатурується і не відновлює метиленову синь.

### **Робота 3.6. Кількісне визначення пірувату (піровиноградної кислоти) в біологічних рідинах**

**Принцип.** Піровиноградна кислота (ПВК) є одним з центральних метаболітів обміну речовин. Для кількісного визначення ПВК використовується кольорова реакція з 2,4-днітрофенілгідразином. В результаті взаємодії утворюється продукт червоного кольору. Інтенсивність забарвлення

пропорційна вмісту ПВК в дослідній пробі і визначається фотоколориметрично на ФЕКА при  $\lambda=490$  нм, в кюветі 0,5 см проти контролю.

**Хід роботи.** Для дослідження беруть дві пробірки (дослідну і контрольну). В дослідну пробірку вносять 0,2 мл досліджуваної біологічної рідини, 0,1 мл 0,2% розчину 2,4-дінітрофенілгідразину. В контрольну – 0,2 мл дистильованої води і 0,1 мл 0,2% розчину 2,4-дінітрофенілгідразину. Проби залишають на 20 хвилин при кімнатній температурі. Потім в обидві пробірки наливають по 0,5 мл 5% розчину натрій гідроксиду. Повторно залишають пробірки на 15 хвилин при кімнатній температурі, після чого додають по 1,8 мл дистильованої води. Проби фотоколориметрують.

**Розрахунок** проводять за формулою:

$$C = 46 \bullet \Delta D \text{ (мкМ/л), де}$$

$\Delta D$  – екстинкція ФЕКА;

46 – коефіцієнт перерахунку.

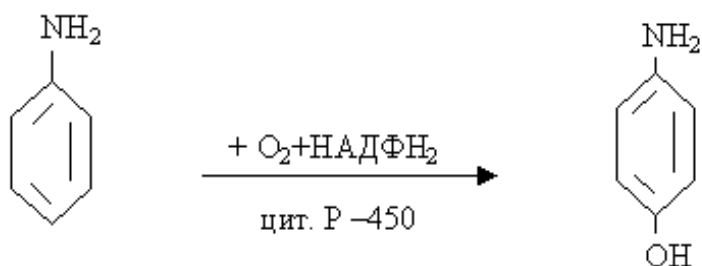
#### **Клініко-діагностичне значення**

В крові здорової людини міститься 45-115 мкМ/л піровиноградної кислоти, із сечею за добу її виділяється 15-25 мг.

Вміст ПВК підвищується в крові при В<sub>1</sub>-вітамінній недостатності, захворюваннях печіни, інсулінзалежному цукровому діабеті, респіраторному алкалозі, гіперфункції гіпофізарно-адrenalової та симпатико-адrenalової систем. Крім того, вміст ПВК різко підвищується в спинномозковій рідині при травмах ЦНС і запальних процесах мозку (менінгіт, абсцес).

### **Робота 3.7. Виявлення метаболітів аніліну в сечі**

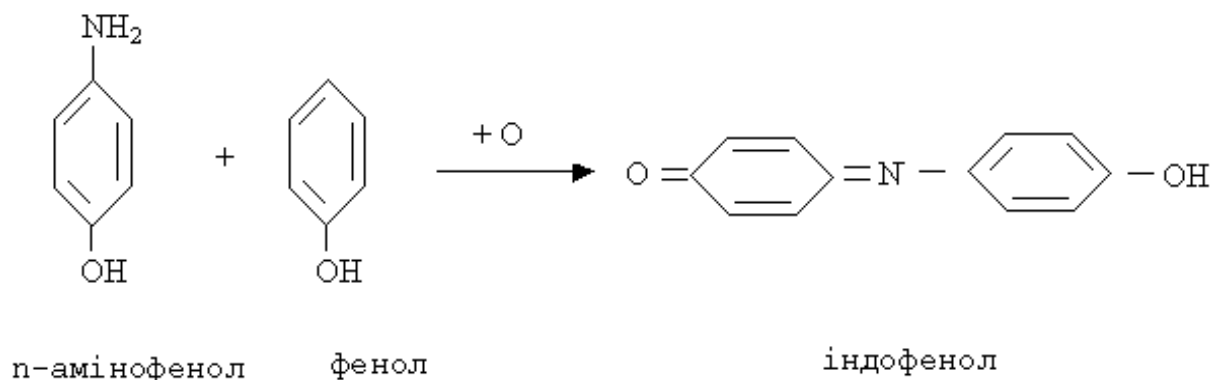
Виявлення ксенобіотиків та продуктів їх обміну в крові, сечі та інших біологічних рідинах має важливе значення, тому що свідчить про надходження ксенобіотиків у внутрішнє середовище організму людини та про можливість їх токсичної дії. Анілін, що потрапив у організм людини або тварини, гідроксилується в параамінофенол при участі цитохрому Р-450.



**анілін**

**п - амінофенол**

**Принцип.** Робота заснована на утворенні забарвленого в синій колір індофенолу при взаємодії параамінофенолу з фенолом у присутності окисника.



**Хід роботи.** Беруть дві пробірки, в дослідну вносять 1 мл сечі, а в контрольну – 1 мл дистильованої води. В обидві пробірки послідовно додають: 0,5 мл 10% розчину натрій карбонату, 1 мл свіжовиготовленого розчину фенолу (2% розчин на 0,2М розчині натрій гідроксиду) і 0,1 мл 1% розчину калій гексациано (III) ферату (червоної кров'яної солі).

Проби фотоколориметрують при червоному світлофільтрі в кюветі 0,5см. Розрахунок роблять за пропорцією, виходячи з того, що 0,1мкМоль параамінофенолу відповідає 0,29 одиницям оптичної густини.

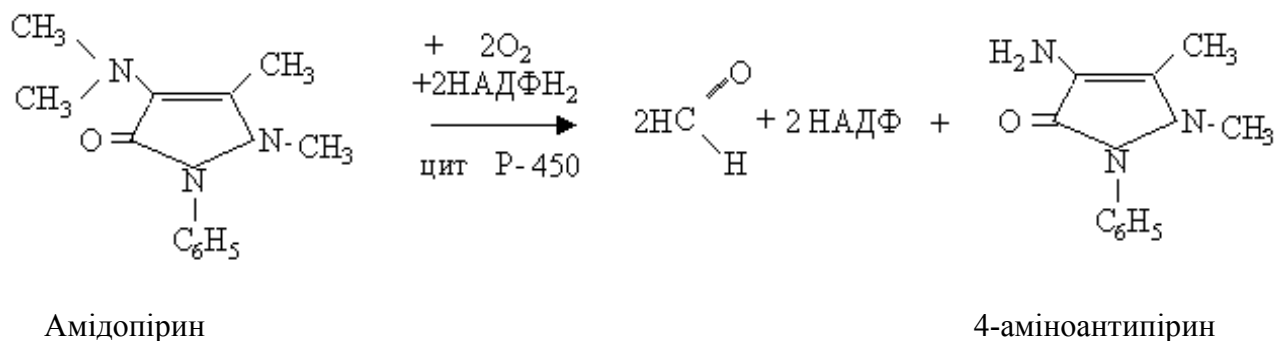
Підрахувавши кількість параамінофенолу, який виділила людина за добу з сечею, можна визначити, скільки аніліну проникло в організм.

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

Виявлення параамінофенолу в сечі людини, яка перебуває на хімічному виробництві, свідчить про те, що анілін потрапив в організм людини, і про недостатність засобів охорони праці на цьому підприємстві.

### **Робота 3.8. Визначення здатності організму людини до окисного деалкілювання ксенобіотиків (амідопіриновий тест)**

**Принцип.** Здатність організму до перетворення ксенобіотиків можна вивчати на прикладі амідопірину. Амідопірин в організмі людини піддається окисному деметилуванню з утворенням 4-аміноантипірину (4-ААП) за участю цитохрому Р-450 згідно схеми реакції:



Визначивши в сечі кількість 4-аміноантипірину, можна вирахувати частину амідопірину, що перетворюється в метаболіт 4-аміноантипірин. Звичайна тест-



доза амідопіріну – 250 мг (1000 мкМоль). У людини, яка її прийняла, з сечею виділяється 15-30 % продукту - 4-аміноантипірину.

**Хід роботи.** Беруть дві пробірки: в дослідну додають 1 мл сечі, 0,5 мл 2,5% розчину амоній гідроксиду, 2 мл 0,02% розчину фенолу та 0,5 мл 1% розчину калій гексациано (III) ферату. Контрольну пробу готують так, як і дослідну, але замість розчину фенолу додають 2 мл дистильованої води.

Проби фотометрують в кюветі 1 см при зеленому світлофільтрі проти контролю. Розрахунок кількості 4-аміноантипірину здійснюють, виходячи з того, що 0,5мкмоль 4-аміноантипірину відповідає 0,7 одиницям оптичної густини.

Приклад розрахунку : хворий прийняв 250 мг (1000 мкМоль) амідопіріну. Об'єм сечі, зібраної за добу, дорівнює 1350 мл. Фотоколориметруванням встановлена екстинкція – 0,5.

1. 0,5 мкМ 4-ААП - 0,70 показник екстинкції  
X - 0,50 показник екстинкції досліду

тоді  $X = 0,357$  мкМоль 4-ААП в 1 мл сечі,

2.  $0,357 \cdot 1350 = 482$  мкМ за добу

3. 1000 мкМоль - 100 %  
482 мкМоль - X  $X = 48,2\%$

Висновок: 48,2 % введеного амідопіріну перетворилося в 4-аміноантипірин.

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

При порушенні функції печінки спостерігається сповільнення перетворення амідопіріну в 4-аміноантипірин.

Якщо ж людина тривалий час приймає ліки або зловживає алкоголем, то швидкість деметилювання амідопіріну може підвищуватися.

### **Г. Контрольні питання з теми:**

#### **”Біологічне окиснення. Метаболізм ксенобіотиків. Мікросомальне окиснення”**

1. Обмін речовин в організмі гетеротрофів: катаболізм, анаболізм, внутрішньоклітинний обмін, амфіболічні процеси.
2. Біоенергетика. Уявлення про обмін енергії.
3. Центральні метаболічні шляхи проміжного (внутрішньоклітинного) обміну.
4. Етапи катаболізму та вивільнення енергії з органічних речовин. Значення центральних метаболітів.
5. Окисне декарбоксілювання пірувату. Структура мультиферментного комплексу.
6. Цикл трикарбонових кислот Кребса: механізм, ферменти та коферменти процесу.
7. Енергетичний баланс, значення, регуляція та поповнення метаболітів циклу Кребса.

8. Поняття про біологічне окиснення. Історія розвитку вчення про біологічне окиснення (роботи О.М.Баха, В.І.Паладіна, Віланда, Варбурга, В.О.Енгельгардта, Мітчелла).
9. Структура та біологічне значення мітохондрій.
10. Тканинне дихання: сучасні уявлення про тканинне дихання, ферменти та коферменти дихального ланцюга.
11. Структура комплексів дихального ланцюга (I, II, III, VI), їх склад та значення.
12. Редокспотенціал, його значення в тканинному диханні.
13. Утворення  $H_2O_2$  та  $CO_2$  в тканинах. Допоміжні ферменти тканинного дихання.
14. Інгібітори тканинного дихання.
15. Окисне фосфорилування. Основні положення хеміосмотичної теорії Мітчелла.
16. Принципи накопичення енергії біомембранами: генерація  $\Delta\mu H^+$ . Структура і функціонування  $H^+$  АТФ-синтетази.
17. Коефіцієнт окисного фосфорилування P/O, та його значення. Макроергічні сполуки. Будова АТФ та її значення.
18. Роз'єднувачі окисного фосфорилування.
19. Човниковий механізм транспорту водню з цитоплазми в мітохондрії.
20. Поняття про ксенобіотики – чужорідні речовини. Значення ксенобіології для фармації та медицини.
21. Основні шляхи перетворення ксенобіотиків в організмі.
22. Уявлення про фармакокінетику: шляхи введення, абсорбція, розподіл та виведення лікарських речовин.
23. Біотрансформація лікарських речовин. Види метаболізму в залежності від локалізації лікарських речовин в організмі.
24. Вплив екзогенних та ендогенних факторів на метаболізм лікарських речовин.
25. Мікросомальне окиснення. Мікросомальні електронно-транспортні ланцюги: будова і функціонування.
26. Цитохром P-450: функції, значення, ізоформи та індукція.
27. Поняття про метаболічну активацію. Утворення електрофільних метаболітів.
28. Реакції катаболізму ксенобіотиків: гідроксилювання, деалкілювання, кон'югації, гідролізу.
29. Шляхи обміну етанолу, окиснення до кінцевих продуктів.
30. Механізм біологічної дії та токсичності етанолу (реакції взаємодії ацетальдегіда з різними речовинами та значення продуктів, що утворилися). Значення ендогенного етанолу.
31. У чому полягають принципи методів визначення АТФ, каталази та пероксидази крові ?

## РОЗДІЛ IV

### ОБМІН АМІНОКИСЛОТ ТА ПРОСТИХ БІЛКІВ

#### **A. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:**

1. Значення білків для життєдіяльності організму. Вміст білків в харчових продуктах. Біологічна цінність білків. Добова потреба людини в білках.
2. Азотистий баланс, його види Коефіцієнт зношування.
3. Перетравлення білків в травному тракті (ентеральний обмін). Перетравлення простих білків у шлунку, ферменти, роль HCl, муцину. Кінцеві продукти травлення білків в шлунку.
4. Перетравлення білків в кишечнику. Протеолітичні ферменти підшлункової залози та кишкового соку.
5. Кінцеві продукти травлення білків. Всмоктування амінокислот.
6. Гниття білків у товстій кишці. Знешкодження токсичних продуктів гниття. Клінічне значення визначення тваринного індикану.
7. Фармпрепарати, що регулюють ентеральний обмін.
8. Пул (фонд) амінокислот: шляхи його поповнення, та використання амінокислот в організмі.
9. Проміжний обмін амінокислот в організмі. Трансамінування: ферменти, коферменти. Клінічне значення визначення трансаміназ в сироватці крові.
10. Дезамінування: види, механізм, ферменти, коферменти, значення. Непряме дезамінування. Роль глутамінової та  $\alpha$ -кетоглутарової кислот в азотистому обміні.
11. Декарбоксілювання амінокислот. Утворення та біологічна роль біогенних амінів, їх знешкодження. Фармпрепарати – інгібітори MAO.
12. Джерела аміаку в організмі. Способи знешкодження та шляхи виведення аміаку.
13. Сучасні уявлення про синтез сечовини, вміст у крові і добовій сечі в нормі та патології.
14. Поняття про глюконеогенез, глікогенні та кетогенні амінокислоти.
15. Особливості обміну та біологічне значення окремих амінокислот (гліцин, серин, цистеїн, метіонін, аланін, треонін, аспартат, глутамат, гістидин, фенілаланін, тирозин, триптофан, аргінін, валін, лейцин, ізoleyцин).
16. Поняття про ферментні блоки та молекулярні (спадкові) хвороби: фенілпіровиноградна олігофренія, кретинізм, алкаптонурія, альбінізм, хвороба кленового сиропу, аміноацидурія та інші.
17. Роль печінки в білковому обміні. Гепатопротектори.
18. Біохімічні показники стану білкового обміну.
19. Принципи методів визначення: білка в сироватці крові та сечі, сечовини в крові, активності трансаміназ, кислотності шлункового соку.

#### **Б. Література**

1. Л.М.Вороніна, «Біологічна хімія», Харків, 2000. С. 341-348.

2. Ю.І. Губський. «Біологічна хімія», Київ-Тернопіль, 2000. С. 390-395, 234-263.
3. Е.А. Строев «Биологическая химия», Москва, 1986. С. 173, 178-181, 274-292.
4. Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук, М.І. Калинський "Біохімія людини", Тернопіль, "Укрмедкнига", 2002. С. 397-435.
5. Лекції, що читаються на кафедрі.

### **В. Опис лабораторних робіт**

#### **Робота 4.1. Визначення ступеню гідролізу білка методом формольного титрування (по Серенсену)**

В організмі в процесі перетравлювання постійно відбувається гідроліз білків. При гідролізі простих білків утворюються амінокислоти. Гідролізати білка (отримані штучно шляхом нагрівання з кислотою чи лугом) застосовують у медицині в ролі лікарських препаратів для парентерального харчування. Метод формольного титрування дозволяє слідкувати за ходом гідролізу білка, вивчати дію протеолітичних ферментів, а також визначати кількість білка, наприклад, в молоці.

**Принцип.** Кількість карбоксильних, отже і еквівалентну їм кількість аміногруп, визначають титруванням 0,1М розчином натрій гідроксиду в присутності формальдегіду; формальдегід хімічно зв'язує аміногрупи, що мають лужні властивості, в результаті чого розчин стає кислим (через наявність у амінокислот і білків карбоксильних груп). Білковий гідролізат отримують нагріванням білка з сірчаною кислотою (**заздалегідь виконується лаборантом**).

**Хід роботи.** Визначають азот аміногруп в 4-х пробах: 1) в розчині білка до гідролізу; 2) в гідролізаті білка, отриманого через 10 хвилин після гідролізу; 3) в гідролізаті білка, отриманого через 40 хвилин; 4) в розчині після повного гідролізу (1 годину). Для цього в колбочку наливають 5 мл відповідного розчину, додають 3 мл 20% нейтрального розчину формаліну і 2-3 краплі 1% розчину фенолфталеїну. Титрують з бюретки 0,1М розчином натрій гідроксиду до утворення рожевого забарвлення.

Проводять розрахунок ступеню гідролізу, віднімаючи від кожного значення титрування кількість мл натрій гідроксиду, що пішла на титрування розчину білка до гідролізу (1-а проба).

**Приклад розрахунку:** на титрування 5 мл 1-ої проби пішло 0,2 мл 0,1М розчину натрій гідроксиду, 2-ої проби – 1 мл, 3-ої проби – 2 мл, 4-ої проби – 4мл. Віднімаючи від кожного результату титрування кількість мл натрій гідроксиду, що пішла на титрування 1-ої проби (0,2мл), будемо мати наступні цифри: на титрування другої проби пішло 0,8мл; 3-ої проби -1,8мл; 4-ої проби - 3,8мл. Кількість мл натрій гідроксиду, що пішла на титрування 4-ої проби, становить 100%. Звідси ступінь гідролізу дорівнює: 1) для гідролізату, отриманого через 10 хвилин:

$$\begin{array}{l} 3,8 \quad - \quad 100\% \\ 0,8 \quad - \quad X \end{array} \qquad X = 21\%$$

2) для гідролізату, отриманого через 40 хвилин:

3,8 - 100% ;

1,8 - X                      X=47,4%

## **Робота 4.2. Кількісне визначення білка в сечі**

### **4.2.1. Метод Стольнікова**

**Принцип.** Метод заснований на утворенні білого кільця на межі між концентрованою нітратною кислотою і розчином білка (реакція Геллера).

Експериментально встановлено, що розчини, що містять 0,033 г/л білка, утворюють біле кільце в кінці другої - на початку третьої хвилин після нашарування на нітратну кислоту.

**Хід роботи.** Розводять досліджувану сечу 1:10; 1:20; 1:30; 1:40; 1:50; і т. д. Для цього готують у пробірці початкове розведення сечі 1:10 (в пробірку вносять 1 мл досліджуваної сечі і додають 9 мл дистильованої води). Потім готують 8 розведень сечі згідно зі схемою:

№ пробірки, розведення	1 1:10	2 1:20	3 1:30	4 1:40	5 1:50	6 1:60	7 1:70	8 1:80
Об'єм сечі, мл розведеної 1:10	1	1	1	1	1	1	1	1
Об'єм води, мл	-	1	2	3	4	5	6	7

З вмістом кожної пробірки здійснюють реакцію з нітратною кислотою. Для цього в 8 інших пробірок наливають 16 крапель концентрованої нітратної кислоти, куди обережно по стінці, трохи нахиливши пробірку, нашаровують піпеткою 1мл відповідного розведення сечі і відмічають ту пробірку, в якій з'являється біле кільце між другою і третьою хвилинами. Помножують 0,033 на розведення сечі в цій пробірці (наприклад, для третьої пробірки - на 30). Отримують вміст білка в патологічній сечі в г/л (у цьому випадку  $0,033 \cdot 30 = 0,99$  г/л).

### **4.2.2. Колориметричний метод визначення білка**

**Принцип.** Білки з купрум(II)сульфатом в лужному середовищі утворюють біуретовий комплекс, забарвлений у фіолетовий колір. Інтенсивність забарвлення комплексу, яка залежить від кількості білка в досліджуваному розчині, вимірюється на ФЕК.

**Хід роботи.** В пробірку наливають 1 мл профільтрованої сечі, потім 4мл 20% розчину натрій хлориду і 1 краплю льодової ацетатної кислоти. Поміщають пробірку в кип'ячу водяну баню на 5-10 хвилин для повного осадження білка. Потім фільтрують, осад на фільтрі розчиняють 1мл фізрозчину та 4 мл реактиву Вебера (купрум(II)сульфат, калій-натрій тартрат, натрій гідрокарбонат, йодид калію у воді). Розчин знову фільтрують і через 30 хвилин фотоколориметрують на ФЕК при зеленому світлофільтрі проти

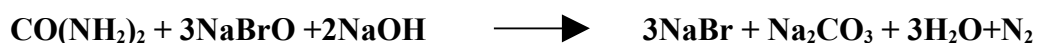
контролю: 1мл фізрозчину і 4мл реактиву Вебера. За калібрувальним графіком знаходять процент білка в сечі.

### **Клініко-діагностичне значення**

Білок в нормальній сечі знаходиться у вигляді слідів, які не визначаються звичайними методами, що застосовуються в клінічній лабораторії. Поява білка в сечі носить назву протеїнурії або альбумінурії, бо сеча містить, в основному, альбумін сироватки крові. Протеїнурія може бути дійсною і хибною. При дійсній протеїнурії білок сироватки крові потрапляє в сечу через нирки. Випадкова або хибна протеїнурія спостерігається, якщо в сечу потрапляє слиз, кров, гній з сечовивідних шляхів. Білок з'являється в сечі при нефриті, серцевий декомпенсації, при деяких формах підвищення кров'яного тиску, при вагітності. Сеча, що містить білок, стає каламутною.

### **Робота 4.3.1. Кількісне визначення сечовини в сечі за методом Бородіна**

**Принцип.** Метод Бородіна є газометричним, в основі його лежить розщеплення сечовини бромноватистим лугом з виділенням вільного азоту



За об'ємом газоподібного азоту, що виділяється, вираховують вміст сечовини.

**Хід роботи.** Апарат Бородіна промивають і наповнюють насиченим розчином натрій хлориду. Верхню бюретку наповнюють 6-ма мл сечі, розведеної в 10 разів і переводять 5 мл сечі в нижню бюретку. Внаслідок значної різниці в питомій вазі сеча буде знаходитись над розчином натрій хлориду, не змішуючись з ним. Залишок сечі з верхньої бюретки виливають через боковий хід крана. Промивають верхню частину бюретки дистильованою водою і наливають у верхню частину бюретки 5-8 мл бромноватистого лугу і порціями переводять в нижню частину бюретки до припинення виділення азоту. Розраховують, якій кількості сечовини еквівалентна кількість азоту, зібраного в апараті Бородіна, користуючись таблицею Мальчевського, беручи до уваги температуру та тиск. Розрахунок вмісту сечовини в добовій сечі (X) може бути проведений за формулою:

$$X = \frac{a \bullet b \bullet 10 \bullet 1500}{5 \bullet 60}, \text{ де}$$

a – маса сечовини (в мг), еквівалентна 1 мл азоту за певного тиску та температури (знаходять за таблицею);

b - об'єм азоту (мл), зібраного в апараті;

10 – величина, де враховано розведення сечі ;

1500 - кількість мл добової сечі;

5 – об'єм (в мл) сечі (розведеної), взятої для аналізу;

60 - коефіцієнт перерахунку мг в мМ.

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

В нормі в добовому об'ємі міститься 330-580 мМ сечовини. Виділення сечовини підвищується при:

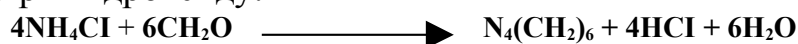
- вживанні їжі з високим вмістом білків;
- при захворюваннях, що супроводжуються розпадом тканин.

Зменшення виділення сечовини характерно для захворювань печінки та при порушенні фільтраційної здатності нирок.

### **Робота 4.3.2. Визначення вмісту аміаку в сечі**

Вміст амонієвих солей у сечі визначають титрометричним методом після реакції з формальдегідом.

**Принцип.** Метод базується на взаємодії солей амонію з формальдегідом, у результаті чого утворюється гексаметилентетрамін (уротропін) і вивільняється еквівалентна кількості аміаку кількість хлоридної кислоти, яку відтитрують розчином натрій гідроксиду:



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

$$X = \frac{a \cdot 0,0017 \cdot D}{10}, \text{ де}$$

X-кількість аміаку в добовій сечі, г;

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

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

D- діурез;

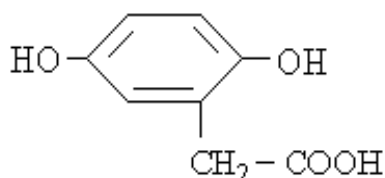
10-об'єм сечі, взятої для аналізу, мл.

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

Азот аміака в сечі становить 35,7-71,4 мМ за добу в сечі. Збільшення вмісту аміаку в сечі свідчить про порушення знешкоджуючої функції печінки, а саме синтезу сечовини (уреогенезу).

### **Робота 4.4. Визначення гомогентизинової кислоти в сечі**

**Принцип:** Визначення гомогентизинової кислоти ґрунтується на її відновлювальних властивостях (гомогентизинова кислота за будовою є дигідрохіноном), при окисленні, наприклад, фосфорно-молібденовим реактивом (утворюється зелене забарвлення).



**Хід роботи.** До 1 мл сечі додають 1 мл 0,5М розчину  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , перемішують, додають 1 мл 5,0% розчину молібдату амонію на 5N розчину  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , перемішують і залишають на 20 хвилин при кімнатній температурі для розвитку забарвлення. Фотометрують при довжині хвилі 670нм в кюветі 1см (в контролі замість сечі – 1 мл дистильованої води).

Розрахунок вмісту гомогентизинової кислоти проводять за формулою:

$$C = 41,8 \bullet D \text{ (мкг/мл в пробі), де}$$

**D**-екстинкція ФЕК;

41,8- коефіцієнт перерахунку;

В сечі в середньому може міститись до 28 мкг/мл гомогентизинової кислоти.

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

Гомогентизинова кислота є продуктом окислювального катаболізму амінокислоти тирозину. Високий вміст цієї речовини спостерігається при спадкових захворюваннях (алкаптонурія - відсутність оксидази гомогентизинової кислоти) та може підвищуватись при деяких інших патологічних станах (колагенози- ревматизм, тонзиліт та ін.)

#### **Робота.4.5. Визначення триптофану в сечі**

(Демонстрація. Методика Мусіна Р.А.)

**Принцип.** Триптофан є незамінною амінокислотою, надходить в організм людини з їжею, використовується в синтезі білка, для синтезу медіатора нервової системи серотоніну, вітаміну  $\text{B}_5$ . Для визначення триптофану використовують фотометричну реакцію з тіоацеталями (на першій стадії відбувається утворення тіоацеталю при взаємодії глюкози та цистеїну в присутності сірчаної кислоти, а на другому етапі триптофан взаємодіє з тіоацеталем вуглеводу) і утворюється червоне забарвлення.

**Хід роботи:** В пробірку послідовно добавляють:

0,25 мл робочого розчину глюкози (містить 200 мкг глюкози)

+1,5 мл концентрованої  $\text{H}_2\text{SO}_4$

+0,1 мл 2% розчину цистеїну (спостерігається утворення тіоацеталю цистеїну жовтого кольору).

+0,4 мл дистильованої води (забарвлення може зникнути)

+0,2 мл сечі.

Залишають на 30 хвилин. Фотометрують при 540нм в кюветі 0,5см проти води.

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком, який описується рівнянням:

$$C = 55,3 \bullet D \text{ (мкг триптофану в пробі), де}$$

**D**- екстинкція ФЕК,

55,3- коефіцієнт перерахунку.

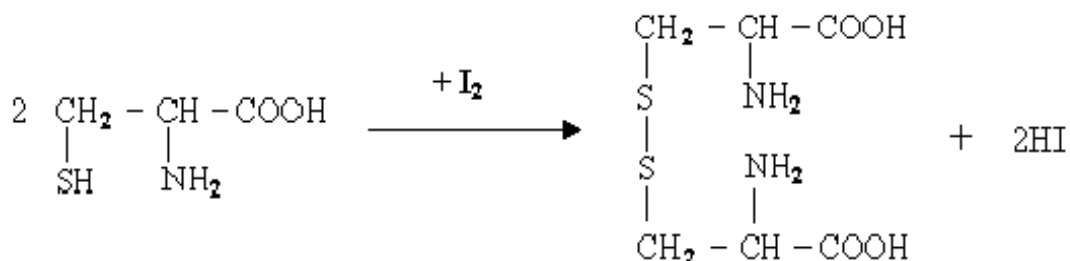
Реакція визначення триптофану досить специфічна, але можуть реагувати також і похідні триптофану (індометацин, триптамін, індол, рауседил та ін.)





#### **Робота 4.6.: Визначення сумми відновленого глутатіону і цистеїну**

**Принцип** : SH-група цистеїну та глутатіону має відновлювальні властивості і може під впливом окислювачів перетворюватись на дисульфідну форму. За кількістю окислювача, що був використаний у окисно-відновній реакції, можна розрахувати вміст тіолових сполук в біологічній рідині.



Цистеїн

Цистін

**Хід роботи.** В колбу для титрування вносять 0,5мл ТХ

А (трихлорацетат)-фільтрата крові ( відповідає 1мл цільної крові) додають 2мл 0,1М розчину НСІ, 2 краплі 1% розчину крохмалю і титрують 0,0005М розчином  $\text{I}_2$  до стійкого синього забарвлення і записують об'єм розчину йоду що був використаний для титрування. Розрахунки проводять виходячи з того що 1 моль йоду окислює 2 моля цистеїну (1мл 0,0005М  $\text{I}_2$  витрачається на 0,001 ммоль цистеїну).

**Розрахунок:**

$$X = \frac{A \cdot 0,001 \cdot 1000 \text{ мг}}{1 \text{ мл}} = \text{ммоль/л, де:}$$

А- кількість мл 0,0005М розчину  $\text{I}_2$ , затраченого на титрування;

0,001 і 1000 - коефіцієнти перерахунку;

1мл - кількість цільної крові, взятої для дослідження.

В нормі вміст тіолових сполук (глутатіону та цистеїну) в крові 0,9 – 1,50 ммоль/л.

#### **Робота. 4.7. Визначення активності аланінамінотрансферази (2.6.1.2.) в сироватці крові динітрофенілгідразиновим методом**

**Принцип.** В результаті переамінування амінокислоти аланіну, що проходить під дією аланінамінотрансферази (АлАТ), утворюється піровиноградна кислота, яка при додаванні 2,4-динітрофенілгідразину в лужному середовищі перетворюється в гідразон піровиноградної кислоти. Інтенсивність забарвлення утвореної сполуки пропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти.

**Хід роботи.** В дві пробірки (дослідну і контрольну) вносять по 0,5 мл субстратної суміші (аланін та  $\alpha$ -кетоглутарова кислота) і поміщають у термостат при 37°C на 5 хвилин. Потім у дослідну пробірку приливають 0,1 мл сироватки крові здорової чи хворої людини, а в контрольну - 0,1 мл води та 0,5 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину і ставлять на інкубацію обидві пробірки в термостат при температурі 37°C на протязі 30 хвилин. Виймають пробірки з термостату і приливають в дослідну пробірку 0,5 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину і обидві пробірки залишають на 20 хвилин при кімнатній температурі. Потім додають по 5 мл 0,4N розчину NaOH в кожен пробірку, старанно змішують, залишають при кімнатній температурі на 10 хвилин, після чого фотометрують ФЕК в кюветі товщиною 1 см при зеленому світлофільтрі супроти контролю.

**Розрахунок:** активності ферменту в сироватці крові проводять за калібрувальною таблицею. Перерахунок активності ферментів (X)мМ пірвіноградної кислоти, що утворилась при інкубації 1 л сироватки крові на протязі 1 години при 37°C, проводять за формулою:

$$X = \frac{C \cdot 2 \cdot 10000}{88000}, \text{ де}$$

10000 – коефіцієнт перерахунку на 1л сироватки;

C - пірвіноградна кислота в мкг, знайдена за калібрувальною таблицею;

88000 - вага 1мМ пірвіноградної кислоти в мкг;

2 - коефіцієнт перерахунку на 1 год. інкубації, тому що час інкубації становить 30 хвилин.

У нормі активність аланінамінотрансферази становить 0,1-0,68мМ пірвіноградної кислоти на 1л сироватки крові за 1 год.інкубації при 37°C (0,1 - 0,68мМ л/год)

Калібрувальна таблиця.

Екстинкція	Активність АлАТ в мкг ПВК в 0,1мл сироватки
0,01	0,31
0,02	0,63
0,03	0,94
0,04	1,25
0,05	1,56
0,06	1,87
0,07	2,20
0,08	2,51
0,09	2,82
0,10	3,13
0,11	3,44
0,12	3,75
0,13	4,06
0,14	4,37
0,15	4,68

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

Аланінамінотрансфераза є цитозольним ферментом, активність АЛАТ підвищується при інфекційному гепатиті. Аспартатамінотрансфераза (АсАТ) є мітохондріальним ферментом і її активність підвищується при інфаркті міокарда.

### **Робота 4.8. Дослідження кислотності шлункового соку**

**Принцип.** Визначення кислотності шлункового соку полягає в титруванні вільної хлоридної (соляної) кислоти та кислореагуючих речовин 0,1М розчином натрій гідроксиду. В тій самій пробі шлункового соку визначається як загальна кислотність в присутності індикатора фенолфталеїна, так і вміст вільної хлоридної кислоти в присутності індикатора диметиламіноазобензолу. Вільну хлоридну кислоту і загальну кислотність шлункового соку прийнято виражати кількістю мл 0,1М розчину натрій гідроксиду, що пішла на титрування 100 мл шлункового соку в присутності відповідних індикаторів. Зона переходу двохкольорового індикатору диметиламіноазобензолу знаходиться в межах рН 2,9-4,0. Фенолфталеїн набуває забарвлення при рН=8,5. Визначення кислотності шлункового соку проводиться в трьох пробах шлункового соку (№1, №2, №3).

**Хід роботи.** В колбочки для титрування відмірюють по 5 мл шлункового соку, доливають 1-2 краплі диметиламіноазобензолу і 2 краплі фенолфталеїну. Титрують 0,1М розчином натрій гідроксиду до появи оранжевого забарвлення і відмічають кількість лугу, що пішла на титрування вільної хлоридної кислоти (перша відмітка). Далі продовжують титрування до появи лимонно-жовтого забарвлення (друга відмітка) і знову відмічають кількість лугу, що пішла на титрування до другої відмітки. Потім продовжують титрувати до появи рожевого забарвлення (третья відмітка). Відмічають кількість лугу, що пішла на титрування від початку до третьої відмітки. На основі отриманих значень титрування проводять розрахунок загальної кислотності, вільної та зв'язаної хлоридної кислоти в шлунковому соці. Перша відмітка відповідає кількості вільної хлоридної кислоти, середнє арифметичне між другою та третьою – загальній хлоридній кислоті, третя відмітка – загальній кислотності шлункового соку. Наприклад, на титрування шлункового соку 0,1М розчином натрій гідроксиду затрачено до першої відмітки (оранжевий колір) – 1 мл, до другої (лимонний колір) – 2 мл, до третьої (рожевий колір) – 3 мл. Середнє арифметичне між другою та третьою відміткою –  $(2+3)/2=2,5$ . Отже, вільна НСІ :  $1 \times 20=20$ , загальна хлоридна кислота –  $2,5 \times 20=50$ , зв'язана хлоридна кислота  $50-20=30$ , загальна кислотність –  $3 \times 20=60$ .

В нормі зв'язана хлоридна кислота дорівнює 15-20, вільна хлоридна кислота- 20-40, загальна кислотність шлункового соку- 40-60 титраційних одиниць.

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

Визначення секреторної функції шлункових залоз проводять за допомогою аспіраційного зондування. При цьому оцінюють секреторну функцію шлунку натще, базальну секрецію, та секрецію після введення стимулятора. Найбільш поширеним стимулятором шлункової секреції є гістамін (вводять у дозі 0,008 мг/кг підшкірно), який стимулює до 45% парієтальних клітин.

При захворюваннях шлунку кислотність може бути нульовою, підвищеною і зниженою. При виразковій хворобі шлунка та гіперацидному гастриті збільшується вміст хлоридної (соляної) кислоти, загальна кислотність (гіперхлоргідрія) та виділення пепсину. При гастриті із зменшеною секреторною активністю і при виникненні пухлин шлунка спостерігається зменшення вмісту вільної хлоридної кислоти, загальної хлоридної кислоти (гіпохлоргідрія), що може спричинити припинення виділення соляної кислоти і зниження загальної кислотності (ахлоргідрія). При злякисній анемії, розвитку злякисних пухлин шлунка може бути повна відсутність хлоридної кислоти та пепсину (ахілія) в шлунковому соці.

#### **Робота 4.9. Реакція ідентифікації гістаміну солями кобальту**

**Принцип.** Гістамін реагує із солями кобальту з утворенням забарвлених комплексних солей.

**Хід роботи.** 0,01-0,02 г гістаміну розчиняють в 1 мл дистильованої води, додають 2-3 краплі розчину кобальта нітрату або кобальта хлориду й краплю натрій гідроксиду, випадає осад червоно-фіолетового кольору.

### **Г. Контрольні питання з теми**

#### **“Хімія та обмін амінокислот і простих білків”**

1. Амінокислоти: класифікація, будова, властивості (замінні і незамінні, умовно незамінні; гідрофобні та гідрофільні; заряджені, незаряджені).
2. Елементарний склад білків. Функції білків. Методи виділення та очищення білків. Якісне та кількісне визначення білків. Біуретова реакція. Амінокислоти та білки як фармпрепарати.
3. Рівні структурної організації білкової молекули (первинна, вторинна, третинна, четвертинна, доменна), типи хімічних зв'язків в білкових молекулах.
4. Фізико-хімічні властивості білків (молекулярна маса, розчинність амфотерність, гідрофільність, денатурація, осаджування, висолювання, ІСТ).
5. Класифікація простих білків (за будовою та властивостями), характеристика окремих класів білків, їх біологічне значення (альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони).
6. Азотистий баланс, його види. Добова потреба людини в білках. Харчове значення білків. Динамічний стан білків організму. Норма білків в харчуванні. Білковий мінімум та оптимум. Коефіцієнт зношування. Повноцінні та неповноцінні білки. Біологічна цінність білків.
7. Перетравлення (ентеральний обмін). Перетравлення простих білків в шлунку, ферменти, механізм їх активації, ендо- та екзопептидази. Роль HCl. Роль

муцину. Кінцеві продукти травлення білків в шлунку. Перетравлення білків в тонкому кишечнику. Всмокування амінокислот. Фармпрепарати, що регулюють ентеральний обмін.

8. Гниття білків в товстій кишці (продукти гниття лізину, орнітину, фенілаланіну, тирозину, триптофану). Механізм знешкодження токсичних продуктів гниття. Знешкодження індолу. Клінічне значення визначення тваринного індикану.
9. Пул (фонд) амінокислот: поповнення та використання амінокислот в організмі. Проміжний обмін простих білків. Трансамінування: ферменти, коферменти, механізм, значення. Амінотрансферази та механізм їх дії, клінічне значення визначення трансаміназ.
10. Дезамінування: види, механізм, ферменти, коферменти, значення. Механізм окислювального дезамінування глутамінової кислоти. Роль глутамінової та  $\alpha$ -кетоглутарової кислот в азотистому обміні. Декарбокซิлювання амінокислот. Утворення та біологічна дія біогенних амінів, їх знешкодження. Фармпрепарати – інгібітори MAO.
11. Джерела аміаку в організмі. Шляхи знешкодження аміаку (попереднє і остаточне). Транспортні форми аміаку (утворення АЛА, ГЛУ і ГЛН, АСП і АСН). Роль глутамінази і аспарагінази. Орнітиновий цикл синтезу сечовини. Цикл фумарової кислоти та його значення. Сечовина як кінцевий продукт азотистого обміну, вміст в крові і сечі.
12. Поняття про глюконеогенез, глюкогенні та кетогенні амінокислоти; шляхи використання пірувату. Особливості обміну та біологічне значення амінокислот ( Глі, Сер, Цис, Ала, Тре, Глу, Асп, Арг, Гіс, Три, Фен, Тир). Особливості обміну Met, значення гомоцистеїну.
13. Поняття про ферментні блоки та молекулярні (спадкові) хвороби (фенілпіровиноградна олігофренія, кретинізм, альбінізм, алкаптонурія, хвороба кленового сиропу).
14. Роль печінки в білковому обміні, гепатопротектори. Біохімічні показники білкового обміну.
15. Яким методом можна визначити в біологічних рідинах: сечовину, білок, активність трансаміназ та кислотність шлункового соку?

## РОЗДІЛ V

### СКЛАДНІ БІЛКИ. НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ. ЕТАПИ ПЕРЕДАЧІ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ

#### А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу.

1. Класифікація та характеристика складних білків.
2. Класифікація та характеристика хромопротеїнів.
3. Гемоглобін: хімічна будова, значення, види та сполуки гемоглобіну.
4. Гемоглобінози.
5. Перетравлювання гемоглобіну.
6. Біосинтез гему, гемоглобіну.
7. Катаболізм гемоглобіну (пігментний обмін).
8. Види жовтяниць. Біохімічна діагностика жовтяниць.
9. Нуклеопротейіни: визначення, значення, будова, характеристика компонентів.
10. Нуклеїнові кислоти: визначення, значення, історія вивчення, мононуклеотиди, нуклеозиди. Види структурної організації нуклеїнових кислот. Правила Чаргаффа. Модель ДНК за Кріком та Уотсоном.
11. Перетравлювання нуклеопротейінів в шлунково-кишковому тракті.
12. Проміжний обмін нуклеопротейінів. Катаболізм нуклеопротейінів в тканинах.
13. Біосинтез пуринових мононуклеотидів de novo. Джерела атомів пуринового ядра.
14. Біосинтез піримідинових мононуклеотидів de novo. Джерела атомів піримідинового ядра. Біосинтез дезоксирибози та d-ТМФ.
15. Катаболізм пуринових мононуклеотидів в тканинах. Сечова кислота та її характеристика.
16. Патологія пуринового обміну.
17. Катаболізм піримідинових мононуклеотидів в тканинах.
18. Характеристика геному людини. Молекулярні основи генетичного коду та його характеристика.
19. Напівконсервативний механізм біосинтезу ДНК (реплікація): визначення, біологічне значення, фактори, механізм.
20. Пошкодження та репарація ДНК.
21. Транскрипція: визначення, біологічне значення, фактори та механізм. Значення промоторів та паліндромів. Поняття про процесінг.
22. Трансляція (біосинтез білка): визначення, біологічне значення, фактори, механізм.
23. Посттрансляційні зміни білків (protein only).
24. Нематричний синтез олігопептидів та білків.
25. Особливості регуляції біосинтезу білка у прокаріотів за Жакобо і Моно.  
Регуляція білкового синтезу еукаріотів на генетичному рівні, на рівні транскрипції та трансляції. Особливості регуляції біосинтезу білка у людини.
26. Механізми дії лікувальних препаратів та токсинів на біосинтез білка: антибіотиків, інтерферону, протипухлинних препаратів, дифтерійного токсину та амантіну.

- 27.Точкові мутації: визначення, види, причини, значення, молекулярні хвороби.
- 28.Генна інженерія в фармації.
- 29.Принципи методів визначення: білірубину, сечової кислоти в сироватці крові; уробіліну, сечової кислоти та фенілпіровиноградної кислоти в сечі.

### **Б.Література**

- 1.Л.М.Вороніна, «Біологічна хімія», Харків, 2000. С. 57-109, 348-426.
- 2.Ю.І.Губський, «Біологічна хімія», Київ-Тернопіль, 2000. С. 41-57, 270-326, 419-423, 462-468.
- 3.Е.А.Строев «Биологическая химия», Москва, 1986. С. 69-84,292-339.
- 4.Я.І.Гонський та співавтори "Біохімія людини", Тернопіль, 2002, С. 52-62, 435-506, 553-566.

### **В.Опис лабораторних робіт**

#### **Робота 5.1 Виділення казеїну з молока**

**Принцип.** Фосфопротеїн казеїноген в молоці знаходиться у вигляді розчиненої кальцієвої солі, тобто у вигляді аніонів. Вільний казеїноген у формі електронейтральних молекул характеризується малою стабільністю у розчині. Тому при підкисленні молока (рН=4,7) казеїноген випадає в осад у вигляді казеїну (молоко "згортається").

**Хід роботи.** До 2 мл молока додають 2 мл дистильованої води і 2 краплі 10% розчину ацетатної кислоти. Утворюється осад казеїну, який відфільтровують, а осад знімають з фільтру скляною паличкою та поміщають в чисті пробірки.

Для доказу білкової природи казеїну з осадом здійснюють кольорові реакції на білки: біуретову, нінгідринову та Фоля (див роб. 1.9; 1.10; 1.12)

#### **Робота 5.2 Виділення глікопротеїну (муцину) з слини та нафтолова проба на вуглеводний компонент**

При підкисленні слини муцин випадає в осад. Для доказу наявності в муцині глюкози виконують нафтолову пробу.

**Принцип.** При дії концентрованої сульфатної кислоти з глюкози утворюється оксиметилфурфурол, який конденсується з  $\alpha$ -нафтолом і утворює сполуку фіолетового кольору.

**Хід роботи.** В пробірку збирають 2 мл слини і по краплям приливають концентровану ацетатну кислоту (4-5 крапель) до утворення осаду муцину. Рідину обережно зливають, затримують згусток муцину скляною паличкою. Зі згустком муцину виконують нафтолову пробу на його вуглеводний компонент. Для цього до згустку добавляють 1-2 краплі 1% спиртового розчину  $\alpha$ -нафтолу, змішують і обережно по стінці нашаровують концентровану сульфатну кислоту (в об'ємі, рівному вмісту пробірки). На межі розділу двох шарів рідини поступово з'являється фіолетово-червоне кільце, добре помітне на білому фоні.

#### **Робота 5.3 Специфічні реакції на гем гемоглобін**



**Принцип:** При додаванні до розведеного розчину крові розчину бензидину та гідроген пероксиду, проходить окислення бензидину з утворенням забарвлених продуктів реакції (бензидинова проба на кров). Бензидин окислюється в дифенохінондимін, що має синє забарвлення, яке через деякий час переходить у червоне. Гемоглобін виконує роль каталізатора реакції.

**Хід роботи.** До 5 крапель розведеної крові додають 2 краплі 0,2% спиртового розчину бензидину та 2 краплі 3% гідроген пероксиду. Рідина набуває синього забарвлення, яке через деякий час переходить у червоне.

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

Проба застосовується в судово-медичній практиці для доказу наявності кров'яних плям, в клініці - для знаходження малих кількостей крові в біологічних об'єктах: шлунковому соці, калі і т.д.

### **Робота 5.4 Якісне визначення уробіліну в сечі**

Проба Флоранса на уробілін

**Принцип.** Уробілін з концентрованою хлоридною кислотою утворює рожеве забарвлення.

**Хід роботи.** До 5 мл сечі додають 6 крапель концентрованої сульфатної кислоти, 3 мл ефіру, закривають корком, обережно збовтують. Дають рідині відстоятися. В наступну пробірку наливають 2-3 мл концентрованої хлоридної кислоти, на неї нашаровують ефірну витяжку. В присутності уробіліну на межі розділу двох рідин через кілька хвилин утворюється рожеве або червоне кільце. Інтенсивність забарвлення залежить від вмісту уробіліну.

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

Визначення уробіліну в сечі застосовується для біохімічної діагностики жовтяниць. У здорових людей уробіліноген (уробілін) міститься в сечі в малих кількостях. Уробілінурія спостерігається: при паренхіматозній жовтяниці, гемолітичних анеміях, при отруєнні свинцем. Уробілін не міститься в сечі при механічній жовтяниці.

### **Робота 5.5 Кількісне визначення загального білірубіну в сироватці крові (за методом Йєндрашика)**

**Принцип.** Зв'язаний білірубін утворює з діазореактивом (діазотована сульфанілова кислота) рожево-фіолетовий розчин азобарвника. За інтенсивністю забарвлення, яку досліджують фотоколориметрично, визначають концентрацію прямого білірубіну. В присутності кофеїнового реактиву (непрямий) білірубін переходить в розчинений дисоційований стан, завдяки чому він дає рожево-фіолетове забарвлення з сумішшю діазореактиву. За інтенсивністю цього забарвлення фотоколориметрично визначають концентрацію загального білірубіну. Різниця між загальним та зв'язаним білірубіном дорівнює вмісту вільного білірубіну, який не дає пряму реакцію.

**Хід роботи.** В чотири пробірки (дві дослідні та дві контрольні) для визначення загального білірубіну вносять реактиви за таблицею:

Реактиви	Загальний білірубін	Контроль	Загальний білірубін	Контроль
Сироватка здорової людини, Сироватка хворої людини <sup>xx</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50
Кофеїновий реактив	1,75	1,75	1,75	1,75
Фізіологічний розчин	-	0,25	-	0,25
Діазосуміш	0,25	-	0,25	-
Висновки				

Сироватка крові здорової людини – донорська.

<sup>xx</sup> Сироватка крові хворої людини – штучна.

Для визначення загального білірубіну пробу залишають на 20 хвилин для розвитку стійкого забарвлення. Фотоколориметрують при зеленому світлофільтрі (довжина хвилі 500–560 нм) в кюветі товщиною 5мм.

Розрахунок проводять за калібрувальною таблицею. Від показника екстинкції загального білірубіну віднімають показник екстинкції контролю. В нормі кількість загального білірубіну становить від 8,5 до 20,5 мкМ/л (75% від цієї кількості припадає на непрямий білірубін, а 25% - на прямий).

**Приклад розрахунку:** Значення екстинкції дослідної пробірки (загальний білірубін) 0,20, що відповідає за калібрувальною таблицею 35,1 мкМ/л; а значення екстинкції контролю – 0,12, що відповідає за калібрувальною таблицею 15,4 мкМ/л. Різниця складає:  $35,1 - 15,4 = 19,7$  мкМ/л – кількість загального білірубіну що відповідає нормі.

Таблиця перерахунку білірубіну (світлофільтр №6; кювета №10)

Показник екстинкції	Концентрація білірубіну мкмоль/л	Показник Екстинкції	Концентрація білірубіну Мкколь/л	Показник екстинкції	Концентрація білірубіну мкмоль/л
0,05	0	0,25	51,3	0,49	101,8
0,06	1,71	0,23	53,9	0,50	106,0
0,07	3,40	0,29	56,4	0,51	108,6
0,08	6,00	0,30	59,9	0,52	111,2
0,09	8,60	0,31	61,6	0,53	112,9
0,10	11,10	0,32	64,1	0,54	115,5
0,11	12,80	0,33	65,8	0,55	117,2
0,12	15,40	0,34	68,4	0,56	118,9
0,13	17,1	0,35	71,0	0,57	122,3
0,14	21,4	0,36	73,0	0,58	124,9
0,15	23,1	0,37	75,2	0,59	125,6
0,16	25,7	0,38	78,7	0,60	129,1
0,17	28,2	0,39	80,4	0,61	130,8
0,18	29,9	0,40	83,0	0,62	133,4
0,19	33,4	0,41	85,5	0,63	135,1
0,20	35,1	0,42	87,2	0,64	139,4
0,21	37,6	0,43	88,8	0,65	142,0
0,22	40,2	0,44	91,5	0,66	143,7

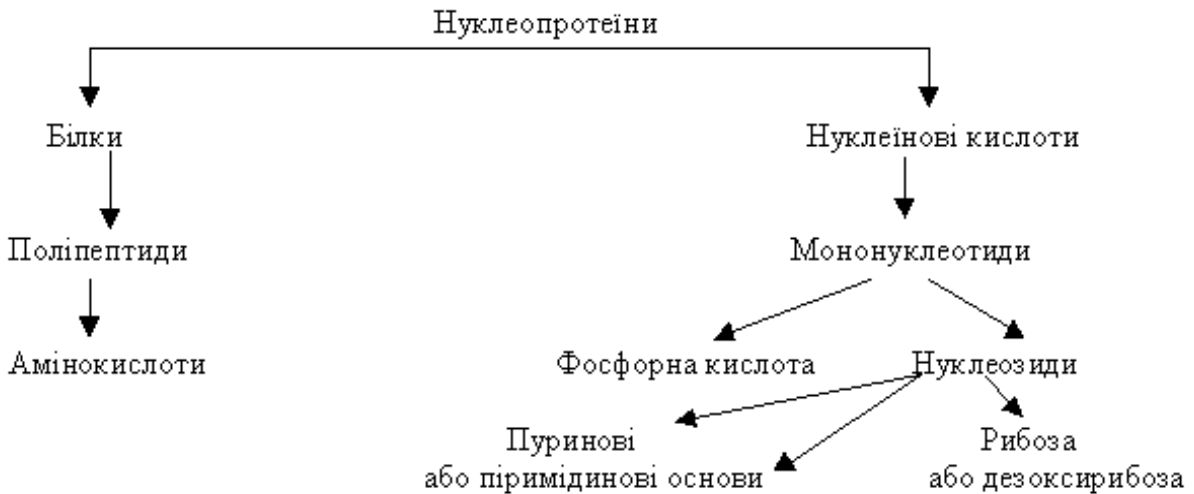
0,23	41,9	0,45	93,2	0,67	146,2
0,24	44,5	0,46	95,6	0,68	148,0
0,25	47,0	0,47	97,5	0,69	150,5
0,26	48,7	0,48	100,1		

**Клініко-діагностичне значення.**

Проба застосовується в медичній практиці для біохімічної діагностики жовтяниць. Підвищення вмісту загального білірубіну спостерігається при обтураційній, паренхіматозній та гемолітичній жовтяницях. При паренхіматозній та обтураційній жовтяницях підвищення вмісту загального білірубіну відбувається в основному за рахунок прямого білірубіну, при гемолітичній жовтяниці – в основному за рахунок непрямого білірубіну.

**Робота.5.6. Якісний аналіз нуклеопротейнів, отриманих з дріжджів**

**Принцип.** Якісний аналіз нуклеопротейнів, заснований на визначенні речовин, що входять до їх складу і звільняються при гідролізі. Схема повного гідролізу нуклеопротейнів може бути подана таким чином:



Біуретовою реакцією відкривають поліпептиди, пуринові основи - за утворенням осаду солей аргентуму, фосфатну кислоту - за реакцією з амоній молібдатом, пентозу – за реакцією Фелінга.

**Хід роботи: I етап:** кислотний гідроліз нуклеопротейнів дріжджів (виконується завчасно лаборантом).

1 г дріжджів поміщають у плоскодонну колбу на 100 мл, додають 20 мл 10% розчину сульфатної кислоти та 20 мл дистильованої води. Колбу закривають корком з довгою трубкою та кип'ятять під тягою на азбестовій сітці при слабкому нагріванні. Через годину після початку кип'ятіння колбу охолоджують, вміст переносять в мірний циліндр, доводять до 100мл, потім фільтрують. З фільтратом проводять якісний аналіз.

**II етап:** якісні реакції на складові частини гідролізату нуклеопротейнів дріжджів (виконується студентами).

а) Біуретова реакція на поліпептиди (див.роботу 1.9)

б) Срібна проба на пуринові основи. До 5 крапель гідролізату додають 5 крапель 2% аміачного розчину аргентум нітрату. Через 3-5 хвилин випадає крихкий осад бурого забарвлення, обумовленого утворенням срібних сполук пуринових основ.

в) Проба Фелінга на рибозу чи дезоксирибозу. До 5 крапель гідролізату додають 5 крапель 7% розчину купрум(II)сульфату та 5 крапель лужного розчину калій, натрій тартрату. Рідину перемішують (на кип'ячій водяній бані). Випадає червоний осад купрум(I)оксиду.

г) Молібденова проба на фосфатну кислоту.

До 5 крапель гідролізату доливають 10 крапель молібденового реактиву, що являє собою розчин амоній молібдату в нітратній кислоті, кип'ятять кілька хвилин. При охолодженні випадає жовтий кристалічний осад комплексної сполуки амоній фосфомолібдату.

### **Робота 5.7. Якісна реакція на сечову кислоту**

**Принцип.** Сечова кислота володіє відновлюючими властивостями і при нагріванні відновлює окиси металів до їх закисів, наприклад  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  в  $\text{Cu}_2\text{O}$ , осад цегельно-червоного кольору.

**Хід роботи.** Пучку сечової кислоти розчиняють в 2 мл розчину 10%  $\text{NaOH}$  та додають 16 крапель розчину 1%  $\text{CuSO}_4$ , до утворення слабкої каламуті  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , що не зникає при збовтуванні, а потім кип'ятять, утворюється цегельно-червоний осад  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

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

Сечова кислота є кінцевим продуктом обміну пуринових нуклеотидів. З сечею за добу виділяється біля 0,5г сечової кислоти, що складає 1-3% від азоту сечі. Кількість виділеної з сечею сечової кислоти залежить від кількості пуринів їжі. При харчуванні їжею, багатою на пурини, виділення сечової кислоти з сечею підвищується. Сечова кислота входить до складу сечових камінців у вигляді кислого натрій урату, є головною складовою частиною подагричних відкладень в сполучній тканині. Сечова кислота може існувати у вигляді таутомерних форм.

### **Робота 5.8. Кількісне визначення сечової кислоти в сечі**

**Принцип.** Сечова кислота відновлює фосфатовольфраматний реактив, у результаті утворюється вольфрам оксид синього кольору; інтенсивність забарвлення прямопропорційна кількості речовини.

**Хід роботи.** В контрольну пробірку (мірну) наливають 1,5 мл дистильованої води, в дослідну (мірну) - 1,5 мл розведеної в 50 разів сечі. В обидві пробірки доливають по 0,7 мл насиченого розчину натрій карбонату і по 0,05 мл реактиву Фоліна, що складається з натрій вольфрамату, орто-фосфатної кислоти та дистильованої води. Розчин синіє. Об'єм рідини в обох пробірках доводять водою до 10 мл. Колориметрують на ФЕК з червоним світлофільтром супроти контролю в кюветах товщиною 10 мм. Розрахунок вмісту сечової кислоти (X) проводять за формулою:

$$X = \frac{a \cdot b \cdot V}{1,5 \cdot 1000}, \text{ мМ/добу} \quad \text{де:}$$

a - кількість сечової кислоти в пробі в мкМ, що знайдена за калібрувальною таблицею;

b - розведення сечі (в даному випадку в 50 разів);

V – кількість сечі в мл, виділеної за добу;

1,5 – кількість розведеної сечі, що взята для дослідження;

1000 - коефіцієнт перерахунку мкМ в мМ.

В нормі людина виділяє від 1,2 до 7,1 мМ сечової кислоти за добу.

Калібрувальна таблиця для визначення сечової кислоти.

Екстинкція	Кількість сечової кислоти в мкМ	Екстинкція	Кількість сечової кислоти в мкМ
0,01	0,012	0,07	0,143
0,02	0,024	0,08	0,167
0,03	0,048	0,09	0,190
0,04	0,071	0,10	0,211
0,05	0,095	0,12	0,238

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

Сечова кислота є кінцевим продуктом обміну пуринових азотистих основ. Гіперурикурія – збільшення концентрації сечової кислоти в сечі спостерігається при усіх захворюваннях, які супроводжуються розпадом нуклеопротеїнів: подагра, лейкози, променева хвороба, опіки, крупозне запалення легенів, ревматизм, гемолітична анемія, серпоподібно-клітинна анемія, вірусний гепатит В, синдром Леша-Ніхана, отруєння свинцем, токсикози.

Гіпоурикурія – зменшення концентрації сечової кислоти в сечі спостерігається при нефриті, нирковій недостатності, прогресивній м'язовій атрофії, ксантинурії, інтоксикації свинцем.

#### **Робота 5.9 Якісна реакція на фенілпіровиноградну кислоту (проба Фелінга)**

***Принцип.*** Фенілпіровиноградна кислота утворює з іонами тривалентного феруму комплексну сполуку, забарвлену в синьо-фіолетовий колір.

***Хід роботи.*** Для дослідження беруть 2 пробірки. В одну пробірку вносять 2 мл свіжофільтрованої сечі здорової дитини, в другу – 2 мл патологічної сечі (штучної) хворої дитини на фенілпіровиноградну олігофренію. В кожену пробірку додають по 2 краплі 10% розчину FeCl<sub>3</sub>.

В пробірці з патологічною сечею з'являється синьо-фіолетове забарвлення, що підтверджує наявність в ній фенілпіровиноградної кислоти.

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

Спадкова відсутність у дітей в печінці ферменту фенілаланінгідроксилази приводить до того, що фенілаланін не гідроксильється і не перетворюється у тирозин. Накопичення фенілаланіну та продуктів його аномального розщеплення, зокрема фенілпіровиноградної кислоти, в крові та тканинах приводить до порушення нормального розвитку мозку та появи тяжких порушень психіки дитини. Доказом даного спадкового захворювання - фенілпіровиноградної олігофренії (недоумства) є виявлення підвищеного вмісту фенілаланіну в крові та наявності фенілпіровиноградної кислоти в сечі.

### **Робота 5.10. Визначення сечової кислоти в сироватці крові**

**Принцип.** Сечова кислота відновлює фосфатвольфраматний реактив Фоліна з утворенням сполуки блакитного кольору, екстинкція якої за довжини хвилі 670 нм є пропорційною концентрації сечової кислоти у сироватці крові.

**Хід роботи.** У центрифугальну пробірку вміщують 0,5 мл сироватки крові та 4 мл дистильованої води. Вміст пробірки перемішують і додають 0,35М розчину сульфатної кислоти та 0,25 мл 10% розчину натрій вольфрамату. Вміст пробірки перемішують і через 5хв. центрифугують протягом 10хв. із швидкістю 3000 об/хв.

Проводять визначення вмісту сечової кислоти за таблицею:

Реактиви	Контрольна проба, мл	Стандартна проба, мл	Дослідна проба, мл
Надосадова рідина	-	-	2
Стандартний розчин сечової кислоти	-	2	-
Вода дистильована	2	-	-
Розчин натрій карбонату	1	1	1
Фосфатвольфраматний реактив Фоліна	0,5	0,5	0,5

Вміст пробірок перемішують. Через 30 хв. визначають екстинкцію стандартної та дослідних проб на ФЕК за довжини хвилі 670 нм (590-700 нм червоний світлофільтр) проти контрольної проби у кюветі завтовшки 10 мм. Забарвлення є стабільним протягом 30 хв.

Розрахунок вмісту сечової кислоти проводять за формулою:

$$C = D_0 / D_c \cdot 30 \cdot 10, \quad \text{де:}$$

C - вміст сечової кислоти у дослідній пробі, мкмоль/л;

D<sub>0</sub> - екстинкція дослідної проби;

D<sub>c</sub> - екстинкція контрольної проби;

30 - вміст сечової кислоти у стандартному розчині, мкмоль/л;

10 - величина розведення сироватки.

У чоловіків вміст сечової кислоти у сироватці крові за цим методом становить 240-500 мкмоль/л, у жінок – 160-400 мкмоль/л.

Наведеним методом можна визначати кількість сечової кислоти у сечі, однак її попередньо необхідно розвести у 10 разів дистильованою водою.

### **Клініко-діагностичне значення**

Рівень сечової кислоти в крові підвищується внаслідок порушення її продукції, руйнування, виведення і перерозподілу в організмі у разі посиленого розпаду клітин, порушення виведення цього метаболіту з сечею, змін ендокринної регуляції обміну пуринових основ, а також при подагрі. Гіперурикемію (збільшення концентрації сечової кислоти в крові) можна також спостерігати при довготривалій терапії салуретиками, сечогінними препаратами, при лікуванні лейкозів цитотоксичними препаратами. Гіпоурикемію (зменшення концентрації сечової кислоти в крові) спостерігають при: гепатоцеребральній дистрофії (хвороба Коновалова-Вільсона), деяких злякисних новоутвореннях (лімфогранульомі, бронхогенних новоутвореннях), а також при вживанні саліцилатів, кортикотропіну, піперазину, атофану.

### **Робота 5.11** Визначення вмісту ДНК в гідролізаті щитовидної залози за методом Діше

**Принцип.** Метод ґрунтується на реакції між дифеніламіном і дезоксирибозою (реактив Діше), яка відокремлюється від нуклеотидів в результаті повного кислотного гідролізу.

**Хід роботи.** Беруть дві пробірки (контрольну та дослідну). В контрольну вносять 2 мл дистильованої води, а в дослідну – 2 мл гідролізату щитовидної залози, який отриманий за делегідь лаборантами з 0,25 г наважки щитовидної залози. В кожену пробірку додають по 2 мл реактива Діше. Пробірки залишають на 10 хвилин при кімнатній температурі. В дослідній пробірці з'являється синє забарвлення, інтенсивність якого вимірюють на ФЕК при  $\lambda = 670$  нм, в кюветі 1 см проти контролю. Значення екстинкції, отримане на ФЕК, переводять в концентрацію за калібрувальним графіком. Отриманий результат підставляють в формулу, за якою розраховують вміст ДНК в гідролізаті.

#### **Формула розрахунку:**

$$X = \frac{a \cdot 4}{0,25 \cdot 2 \cdot 1000} \quad \text{мг/г, де}$$

в чисельнику:

a - кількість ДНК в мкг, знайдена за калібрувальним графіком;  
4 - об'єм розчину в мл;

в знаменнику:

0,25 – наважка щитовидної залози, г;  
2 – об'єм гідролізату, взятого для дослідження, мл.  
1000 - перерахунок мг в г.

### **Робота 5.12** Визначення вмісту РНК в біологічному матеріалі (гідролізаті дріжджів) за методом Мейбаума

**Принцип.** Кількісне визначення РНК основане на взаємодії рибози з орцином. Рибоза утворюється в результаті повного гідролізу РНК, отриманої з дріжджів. При взаємодії останньої з хлоридною кислотою утворюються похідні фурфурола, які при нагріванні з орцином дають продукт, забарвлений в синьо-зелений колір.

**Хід роботи.** Беруть 2 пробірки (контрольну і дослідну). В контрольну вносять 2 мл дистильованої води, в дослідну – 2 мл гідролізату дріжджів, отриманого заздалегідь лаборантами з 0,25 г наважки дріжджів. Обидві пробірки нагрівають 5 хвилин на водяній бані при температурі 60° С. Потім в кожну пробірку додають по 2 мл розчину орцину. З'являється синьо-зелене забарвлення, інтенсивність якого вимірюють на ФЕК при  $\lambda = 670$  нм в кюветі 1 см проти контролю.

Значення екстинкції, отримане на ФЕК, переводять в концентрацію за калібрувальним графіком. Отриманий результат підставляють в формулу, за якою розраховують вміст РНК в гідролізаті дріжджів.

#### Формула розрахунку:

$$X = \frac{a \cdot 4}{0,25 \cdot 1000 \cdot 2} \quad \text{мг/г,} \quad \text{де}$$

a - кількість РНК в мкг, знайдена за калібрувальним графіком;

4 - об'єм розчину в мл;

1000 - перерахунок мг в г;

0,25 - наважка дріжджів в г;

2 – об'єм гідролізату, взятого для дослідження, мл.

#### **Робота 5.13. Визначення ДНК за фосфором**

**Принцип методу.** Метод ґрунтується на отриманні вільних нуклеїнових кислот із наступним визначенням кількості ДНК за фосфором, що утворюється у формі фосфату після мінералізації ДНК. Виявлення фосфору проводять фотоколориметрично реакцією з амоній молібдатом за присутності відновника (аскорбінова кислота). Інтенсивність забарвлення продукту реакції (молібденової сині) є пропорційною кількості фосфору в пробі.

**Хід роботи. I етап – приготування мінералізату (готується завчасно лаборантом).**

1.1. Оброблення тканин основою. Наважку тканини печінки масою 100 мг нагрівають з одним мл 1М розчину натрій гідроксиду в центрифугальній пробірці протягом 15 хв. на кип'ячій водяній бані.

1.2. Послідовне осадження білків і ДНК. Пробу поступово охолоджують до 0°С (лід). До охолодженого гідролізату додають 0,5 мл насиченого розчину NaCl в 20 % розчині ацетатної кислоти. Утворений осад білка видаляють центрифугуванням протягом 5 хвилин при швидкості 5000 об/хв. До центрифугату додають 6 мл етилового спирту і витримують протягом однієї години на холоді до повного осадження ДНК. Ще раз центрифугують протягом



5 хвилин при швидкості 5000 об/хв. Утворений осад ДНК відмивають 5 мл 5 % розчину трихлорацетатної кислоти.

### 1.3. Приготування мінералізату ДНК.

Осад ДНК кількісно переносять в колбу К'ельдаля, додають 1,5мл концентрованої сульфатної кислоти і мінералізують на піщаній бані до повного освітлення розчину. Для прискорення мінералізації до розчину обережно додають декілька крапель 30 % розчину гідроген пероксиду (по 1 краплі). Після закінчення мінералізації рідину з колби К'ельдаля кількісно (вимірюючи об'єм) переносять у колбу Ерленмеєра. Розчин нейтралізують 30 % розчином натрій гідроксиду за допомогою універсального індикатору. Отриманий мінералізація переносять кількісно у мірну колбу на 50 мл і доводять до позначки дистильованою водою.

### **II етап – визначення ДНК за фосфором. Виконують студенти.**

В пробірку відбирають 5 мл мінералізату ДНК, додають 0,5 мл 2,5 % розчину амоній молібдату, 0,5 мл 1 % розчину аскорбінової кислоти і 4 мл дистильованої води. Через 10 хвилин вимірюють оптичну густину розчину проти води при червоному світлофільтрі (довжина хвилі 670 нм) у кюветах завтовшки 5 мл. Вміст фосфору визначають у мкг за калібрувальною кривою. Для побудови калібрувального графіка використовують стандартні розчини калій дигідрогенфосфату, які містять відповідно 1, 2, 3, 4 мкг фосфору в 1 мл проби. На осі абсцис відкладають значення концентрації стандартних розчинів, а на осі ординат – відповідні їм значення оптичної густини. Вміст ДНК виражають у мг на 100 г тканини. Нормальний вміст ДНК у тканині печінки щурів становить 25-35 мг %.

### **Г.Контрольні питання з теми: «Хімія і обмін складних білків»**

- 1.Складні білки: визначення , класифікація, стисла характеристика окремих класів.
- 2.Хромопротеїни: визначення, класифікація, біологічне значення. Хімічна будова і значення гемоглобіну.
- 3.Види і сполуки гемоглобіну.
- 4.Патологія Нв. Гемоглобінози.
- 5.Перетравлювання гемоглобіну в шлунково-кишковому тракті.
- 6.Біосинтез гемоглобіну.
- 7.Катаболізм Нв в тканинах (пігментний обмін). Біохімічна діагностика жовтяниць.
- 8.Коротка характеристика нуклеопротеїнів.
- 9.Історія вивчення нуклеїнових кислот. Сучасні дослідження молекулярної біології та генетики.
- 10.Нуклеїнові кислоти: визначення, види, біологічне значення.
- 11.Склад і структура нуклеотидів і нуклеозидів (азотисті основи, вуглеводний компонент). Будова полінуклеотидного ланцюга.
- 12.ДНК: структурна організація. Правила Чаргаффа.

13. Модель Уотсона та Кріка. Денатурація і ренатурація ДНК.
14. РНК: склад, класифікація, характеристика окремих класів.
15. Перетравлювання нуклеопротейнів в шлунково-кишковому тракту, всмоктування продуктів гідролізу.
16. Проміжний обмін нуклеопротейнів. Джерела атомів пуринового і піримідинового ядер. Синтез пуринових і піримідинових мононуклеотидів (МНТ).
17. Синтез дезоксирибози і d-ТМФ. Інгібітори синтезу ТМФ – протипухлинні препарати.
18. Розпад піримідинових мононуклеотидів в тканинах. Кінцеві продукти катаболізму. Вміст сечової кислоти в крові, сечі. Порушення пуринового обміну.
19. Молекулярні основи генетичного коду, його характеристика.
20. Біосинтез ДНК (реплікація): визначення, біологічне значення, фактори, механізм.
21. Пошкодження і репарація ДНК.
22. Транскрипція: визначення, біологічне значення, фактори, механізм. Значення промоторів і паліндромів. Поняття про процесінг.
23. Трансляція (біосинтез білка): визначення, біологічне значення, фактори, механізм. Посттрансляційні зміни білків.
24. Механізм регуляції білкового синтезу у прокаріотів і еукаріотів (на генетичному рівні, на рівні транскрипції і трансляції).
25. Особливості регуляції біосинтезу білка у людини. Механізм дії інгібіторів матричного синтезу білка: антибіотиків, протипухлинних препаратів.
26. Механізм дії препаратів і токсинів: інтерферону, дифтерійного токсину, аманітину та інших.
27. Нематричний синтез олігопептидів і білків. Пептидоглікани.
28. Механізм та значення точкових мутацій.
29. За допомогою яких методів можна визначити: білірубін, сечову кислоту в сироватці крові; уробілін, сечову кислоту та фенілпіровиноградну кислоту в сечі ?

## РОЗДІЛ VI ХІМІЯ ТА ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

### А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу

1. Визначення та функції вуглеводів. Вуглеводи та їх похідні як лікарські препарати.
2. Класифікація вуглеводів.
3. Найважливіші представники моносахаридів ( $\alpha$  та  $\beta$ -глюкоза;  $\alpha$  та  $\beta$ -фруктоза;  $\alpha$  та  $\beta$ -галактоза; рибоза та дезоксирибоза): будова та біологічне значення.
4. Олігосахариди (дисахариди), представники: мальтоза, сахароза, лактоза, целобіоза - будова, біологічне значення.
5. Похідні вуглеводів (глюконова кислота, уронові кислоти, аміноцукри, фосфати вуглеводів: глюкозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат та інші).
6. Будова, властивості, біологічне значення гомо- та гетерополісахаридів.
7. Харчове значення і потреба людини у вуглеводах. Вуглеводи їжі.
8. Роль клітковини та інших харчових волокон у функціонуванні шлунково-кишкового тракту.
9. Перетравлення (ентеральний обмін) та всмоктування вуглеводів. Характеристика ферментів, які приймають участь у гідролізі вуглеводів в ШКТ.
10. Доля глюкози після всмоктування у кров. Джерела глюкози крові.
11. Основні етапи синтезу і розпаду глікогену в печінці. Аденілатциклазний механізм активації глікогенфосфорилази.
12. Генетичні порушення метаболізму глікогену: глікогенози та аглікогенози.
13. Взаємоперетворення моносахарів.
14. Проміжний обмін вуглеводів. Гліколіз. Глікогеноліз. Гліколіз та канцерогенез.
15. Механізм гліколізу та біологічне значення.
16. Гліколітична оксидоредукція. Субстратне фосфорилування.
17. Енергетичний баланс гліколізу та глікогенолізу.
18. Регуляція гліколізу.
19. Подібність та відмінність гліколізу від спиртового бродіння.
20. Ефект Пастера. Етапи аеробного окислення глюкози та його енергетичний баланс.
21. Пентозофосфатний шлях окислення глюкози, локалізація, значення.
22. Глюконеогенез, значення, механізм та регуляція.
23. Нейроендокринна регуляція обміну вуглеводів.
24. Причини і види гіперглікемій, глюкозурій, гіпоглікемій.

25. Патологія вуглеводного обміну, цукровий діабет, його біохімічна діагностика. Цукрові криві здорової та хворої людини.
26. Роль печінки у вуглеводному обміні.
27. Біохімічні показники вуглеводного обміну.
28. Антидіабетичні цукрознижуючі фармпрепарати.
29. Принципи методів визначення глюкози в крові та сечі.

### Б. Література.

1. Л.М.Вороніна та співавт. "Біологічна хімія", Х., «Основа» », 2000, С.229-282.
2. Е.А.Строев. "Биологическая химия", М., «Высшая школа» 1986., С.60-69, 219-233, 246-258.
3. Ю.І.Губський. «Біологічна хімія», К., 2000., С.57- 72, 143-190.
4. Я.І.Гонський та ін. "Біохімія людини", 2002, Тернопіль, С.287-347.
4. Лекції, що читаються на кафедрі

### В. Опис лабораторних робіт

#### **Робота 6.1. Кількісне визначення активності $\alpha$ -амілази (3.2.1.1) слини**

**Принцип.** Метод кількісного визначення активності амілази слини по Вольгемуту полягає в тому, що шляхом розведення знаходять найменшу концентрацію ферменту, який повністю розщеплює всю кількість крохмалю, що добавлено. Потім проводять перерахунок на 1мл слини.

**Хід роботи.** В десяти пробірках проводять розведення слини в геометричній прогресії слідуєчим чином: в усі пробірки доливають по 1 мл води. В першу пробірку доливають 1 мл слини, сумлінно перемішують і 1 мл рідини переносять в другу пробірку, з другої пробірки 1 мл рідини переносять в третю пробірку і т.д., а з десятої пробірки 1 мл рідини виливають. В результаті такого розведення отримують ряд пробірок, в яких міститься кількість слини, а відповідно і  $\alpha$ -амілази, що зменшується. В кожен пробірку додають по 5 мл 1% розчину крохмалю. Пробірки ставлять у термостат при температурі 38°C на 30 хвилин, потім охолоджують. В кожен пробірку доливають по декілька крапель розчину йоду (до появи забарвлення). При наявності в пробірці крохмалю виникає синє забарвлення (+), відсутність крохмалю в результаті його гідролізу амілазою характеризується відсутністю синього забарвлення (-). При частковому гідролізі крохмалю з'являються декстрини, які дають з йодом червоне (еритродекстрини), або жовте (флаводекстрини) забарвлення. Відмічають першу пробірку з червоним забарвленням, тобто ту, де крохмаль гідролізований частково. Встановлюють в ній розведення слини та вираховують, яку кількість крохмалю може розщепити 1мл слини.

№№ пробірок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Розведення	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0.016	0,008	0,004	0,002	0,001

слини										
Реакція з йодом (+), (-)										

**Приклад розрахунку.** Припустимо, що червоне забарвлення відмічено у п'ятій пробірці. Розведення слини в ній – 0,0312мл. Складаємо пропорцію: 0,0312мл слини розщеплює 5мл крохмалю, а 1мл слини розщеплює X мл крохмалю:

$$X = \frac{5 \cdot 1}{0,0312} = 160,$$

Отже, 1 мл слини за 30 хвилин при 38°C може розщепити 160 мл 1% розчину крохмалю до стадії еритродекстринів. Це буде амілолітична сила слини, що досліджується. Позначимо її літерою А, можемо написати, що А = 160 (38°C, 30 хвилин). В нормі амілазна активність слини дорівнює 160-312.

## **Робота 6.2. Якісні реакції на відновлюючі вуглеводи.**

### **а) Проба Фелінга**

**Принцип.** Альдегідна група вуглеводів, що має здатність до редукції в лужному середовищі, при нагріванні окислюється купрум(II) гідроксидом (блакитного кольору), що, в свою чергу, утворюється з купрум(II) сульфату та натрій гідроксиду. При цьому купрум(II) гідроксид відновлюється до купрум(I) гідроксиду (жовтого кольору), останній при нагріванні розкладається на воду та купрум(I) оксид (червоного кольору). До складу реактиву Фелінга, крім купрум(II) сульфату та натрій гідроксиду, входить ще сегнетова сіль (NaK-тарtrat), яка зв'язує надлишок іонів купруму; що перешкоджає утворенню осаду купрум(II) оксиду, що, в свою чергу, заважає відкриттю вуглеводів, що мають здатність відновлювати.

**Хід роботи.** В чотири пробірки для утворення реактиву Фелінга вносять по 5 крапель 7% розчину купрум(II) сульфату та лужного розчину сегнетової солі. В першу пробірку вносять 1 мл 1% розчину глюкози, в другу – 1мл 1% розчину мальтози, в третю 1 мл 1% розчину сахарози, а в четверту - 1мл 1% розчину крохмалю. Нагрівають усі пробірки в кип'ячій водяній бані та спостерігають утворення цегельно-червоного осаду купрум(I) оксиду в пробірках, де були налиті розчини глюкози та мальтози.

### **б) Реакція Селіванова на кетози**

**Принцип.** Фруктоза та інші кетогексози дають вишнево-червоне забарвлення при нагріванні їх з реактивом Селіванова (хлоридна кислота та резорцин). Забарвлення, що виникає, залежить від реакції резорцину з оксиметил-фурфуролом, що утворюється при нагріванні кетоз з кислотою.

**Хід роботи:** В першу пробірку наливають 1 мл 1% розчину фруктози, в другу – 1 мл 1% розчину глюкози. В кожену пробірку вносять по 16 крапель реактиву Селіванова. Нагрівають на кип'ячій водяній бані. Спостерігають утворення вишнево-червоного забарвлення в пробірці з фруктозою.

### **в) Реакція Біалія на пентози**

**Принцип.** Пентози при кип'ятінні з кислотою відщеплюють воду, внаслідок чого утворюється фурфурол. Останній, взаємодіє з орцином і дає сполуку синьо-зеленого кольору.

**Хід роботи:** У дві пробірки вносять по 10 крапель реактиву Біалія (орцин, ферум(III) хлорид, хлоридна кислота та вода). Нагрівають вміст пробірок в кип'ячій бані 3 хвилини. Після цього в першу пробірку вносять 0,5 мл 1% розчину арабінози, а в другу – 0,5 мл 1% розчину глюкози. Вміст пробірок перемішують та нагрівають 5-6 хвилин на кип'ячій водяній бані. Спостерігають появу синьо-зеленого забарвлення в пробірці з арабінозою.

### **г) Гідроліз складних сахарів та відкриття продуктів їх гідролізу**

**Принцип:** Полісахариди та деякі дисахариди (наприклад, сахароза) не містять вільної альдегідної групи і не дають позитивної реакції Фелінга або Троммера. Після гідролізу складних сахарів утворюються моносахариди, які володіють позитивними відновлюючими властивостями. Гідроліз складних сахарів проводять в кислому середовищі при нагріванні.

**Хід роботи:** В першу пробірку відмірюють 1 мл 1% розчину сахарози, а в другу – 1 мл 1% розчину крохмалю. В кожену пробірку доливають по 2-3 краплі концентрованої хлоридної кислоти та кип'ятять на водяній бані 5-10 хвилин. Після охолодження для нейтралізації надлишку хлоридної кислоти в кожену пробірку вносять по 8 крапель 10% розчину натрій гідроксиду. Вміст першої пробірки ділять на дві частини. З однією частиною гідролізату проводять реакцію Фелінга, а з другою частиною - реакцію на крохмаль (прибавляють 2-3 краплі розчину йоду). Спостерігають позитивну реакцію Фелінга (червоний осад купрум(I) оксиду) та негативну реакцію на крохмаль (жовтий колір). У пробірці з гідролізованою сахарозою спостерігається позитивна реакція Фелінга.

## **Робота 6.3. Якісне визначення глюкози в патологічній сечі**

### **а) Проба Фелінга (принцип див. роботу 6.2.)**

**Хід роботи.** В дві пробірки для утворення реактиву Фелінга вносять по 5 крапель 7% розчину купрум(II) сульфату та лужного розчину сегнетової солі. До отриманого реактиву Фелінга додають: в першу пробірку – 1 мл нормальної сечі, а в другу – 1 мл патологічної сечі. Рідину в пробірках перемішують і нагрівають у кип'ячій водяній бані. Спостерігають утворення жовтого осаду купрум(I) гідроксиду або цегельно-червоного осаду купрум(I) оксиду в пробірці з патологічною сечею, що містить глюкозу.

### **б) Проба Ніландера**

**Принцип.** Реакція заснована на властивості глюкози відновлювати бісмут гідроксид до металевого бісмуту у лужному середовищі при нагріванні.

Солі бісмуту особливо зручні для визначення цукру в сечі, тому що на відміну від купруму, бісмут не відновлюється сечовою кислотою.

**Хід роботи.** В одну пробірку наливають 1 мл нормальної сечі, а в другу – 1 мл патологічної сечі. В кожену пробірку прибавляють по 16 крапель реактиву Ніландера (бісмут нітрат, сегнетова сіль, натрій гідроксид). Обережно кип'ятять 2-3 хвилини. В пробірці з патологічною сечею, що містить цукор, з'являється спочатку коричневе, а далі - чорне забарвлення, обумовлене утворенням осаду дрібно-кристалічного бісмуту.

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

Методи використовуються для визначення глюкози в патологічній сечі, наприклад, при цукровому діабеті.

### **Робота 6.4. Поляриметричний метод визначення вмісту глюкози в сечі**

**Принцип.** В молекулі глюкози є асиметричний атом карбону, тому розчини глюкози обертають площину поляризованого променя (праворуч). Кут обертання пропорційний концентрації глюкози в досліджуваній рідині, зокрема в сечі. Визначення проводять в спеціальному приладі - поляриметрі (сахариметрі).

**Хід роботи.** Після встановлення диску аналізатору на нульовій точці шкали, виймають трубку з приладу, заповнюють її сечею (без пухирців повітря) та знову встановлюють у прилад. При цьому у середині поля зору з'являється темна смуга і для рівноваги освітлення необхідно повернути диск аналізатору за ходом годинникової стрілки на певну величину. Коли таке положення буде знайдене, то за шкалою визначають кут обертання площини поляризованого променя в градусах. Якщо довжина трубки поляриметру дорівнює 1,894дм, то відсотковий вміст глюкози в сечі буде рівнятися градусам куту обертання. Якщо ж довжина трубки становить 0,9504дм, то для визначення відсоткового вмісту цукру необхідно число градусів перемножити на два.

### **Робота 6.5. Експрес-аналіз (скринінгова оцінка) вмісту глюкози в крові та сечі за допомогою глюкотесту**

**Принцип.** Для візуального напівкількісного визначення – скринінгової оцінки вмісту глюкози в крові та сечі використовують спеціальні тест-полоски фільтрувального паперу, які містять реактиви, чутливі до глюкози. Паралельно з глюкозою такі тест-полоски дозволяють визначити наявність інших метаболітів, що мають значення для діагностики захворювань. Визначення основане на зміні забарвлення цих реактивів.

Найбільш відомими вважаються:

- 1) тест-полоски "Глюкоуротест" для виявлення і напівкількісного визначення вмісту глюкози в сечі (НТХ "Аналіз-Х");
- 2) діагностичні полоски ФАН "Lachema", в тому числі "ГлюкоФАН" – для визначення глюкози в сечі; "ДіаФАН" – для визначення концентрації глюкози і кетонів в сечі; "ПентаФАН"; "ГексаФАН";
- 3) тест-полоски фірми "Cormay": Cormay Uritest – 1; Cormay Uritest – 2;

4) інші індикаторні тест-полоски.

**Хід роботи.** Для визначення вмісту глюкози каплю досліджуваної рідини: патологічної сечі або крові наносять на індикаторну зону тест-полоски. Забарвлення, яке при цьому з'являється, порівнюють із стандартною кольоровою шкалою, нанесеною на поверхню футляра, де зберігаються тест-полоски.

Для об'єктивізації оцінки результатів використовують "глюкометри", що дають цифрову інформацію про рівень глюкози в досліджуваній сечі або крові.

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

Метод має важливе клінічне значення для швидкого приблизного визначення вмісту глюкози в біологічних рідинах. Використовуючи даний метод, хворі на цукровий діабет можуть самостійно контролювати вміст глюкози в сечі та крові.

### **Робота 6.6. Визначення глюкози в сечі методом Альтгаузена**

**Принцип.** При кип'ятінні слабко-лужного розчину глюкози відбувається її руйнування з утворенням різних речовин: метилглюксаля, молочної кислоти, мурашиної кислоти, ацетатної кислоти, оксибутиролактону та пірокатехіну. Останній обумовлює забарвлення розчину, інтенсивність якого пропорційна вмісту глюкози.

**Хід роботи.** В пробірку вносять 4 мл патологічної сечі та змішують з 16 краплями 10% розчину натрій гідроксиду і кип'ятять 2-3 хвилини. Через 10 хвилин візуально визначають, якому забарвленню на сахариметрі (таблиця із шістьма кольоровими стовпцями) відповідає отриманий колір рідини в пробірці. Вміст цукру в сечі зазначено на кожній забарвленій смужці сахариметру.

### **Робота 6.7. Визначення глюкози в крові за кольоровою реакцією з орто-толуїдином**

**Принцип.** Глюкоза при нагріванні з орто-толуїдином в розчині ацетатної кислоти дає зелене забарвлення, інтенсивність якого прямо пропорційна концентрації глюкози і визначається колориметрично.

**Хід роботи.** Для досліду беруть 4 пробірки. В одну пробірку наливають 0,9 мл 3% розчину трихлорацетатної кислоти і додають 0,1 мл сироватки крові здорової людини. В другу пробірку наливають 0,9 мл 3% розчину трихлорацетатної кислоти і додають 0,1 мл сироватки крові хворої людини. З першої та другої пробірок відмірюють по 0,5 мл отриманої суміші в третю та четверту пробірки. В них додають по 2 мл орто-толуїдинового реактиву, поміщають в кип'ячу баню на 8 хвилин (точно) і одразу охолоджують до кімнатної температури. Проби фотоколориметрують на ФЕК супроти дистильованої води у кюветі на 5 мм при червоному світлофільтрі.

***Клініко-діагностичне значення.***



У нормі вміст глюкози в крові орто-толуїдиновим методом складає 3,3-5,5мМ. Особливе значення метод має для дослідження цукрового навантаження по виявленню прихованих форм цукрового діабету, порушення глікогенутворювальної функції печінки та впливу інсуліну на обмін вуглеводів.

Калібрувальна таблиця для визначення глюкози (в мМ).

Екстинкція	Кількість глюкози	Екстинкція	Кількість глюкози
0,01	0,5	0,18	10,0
0,05	2,7	0,20	11,1
0,10	5,5	0,22	12,2
0,12	6,6	0,25	13,8
0,15	8,3	0,28	15,5

### **Робота 6.8 Реакція на сахарозу**

**Принцип.** При додавання до розчину сахарози в лужному середовищі кобальту нітрату утворюється комплексна сполука фіолетового кольору. Реакція специфічна для сахарози.

**Хід роботи.** До 2 мл розчину сахарози додають 1 мл натрій гідроксиду та декілька крапель розчину кобальт нітрату. Спостерігають появу фіолетового забарвлення.

### **Робота 6.9. Вплив цукрового навантаження на вміст цукру у крові (побудова цукрової кривої)**

**Принцип.** Принцип методу полягає у визначенні здатності організму реагувати на пероральне введення глюкози, що дає можливість оцінювати функціональний стан підшлункової залози та печінки.

**Хід роботи.** Для студентів заздалегідь лаборантами готуються штучні сироватки крові, ніби взяті у людини натщесерце та після цукрового навантаження (з розрахунку 1,75г глюкози на 1 кг маси тіла). В штучних сироватках студентами визначається вміст цукру до та після цукрового навантаження (на 15-й, 30-й, 60-й хвилини) орто-толуїдиновим методом (див. роботу 6.7.). На основі отриманих даних будують криву, відкладаючи на осі абсцис умовний час взяття крові, а на осі ординат - кількість цукру.

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

Введення цукру в організм здорової людини викликає лише короткотривалу гіперглікемію, тому що посилене виділення підшлунковою залозою інсуліну сприяє утилізації глюкози та прискореному синтезу глікогену в печінці. Однак, при деяких захворюваннях (діабет, гіпертиреоз, гепатит, акромегалія, цироз печінки і т.д.) цукрове навантаження викликає стійку гіперглікемію.

## **Робота 6.10. Кількісне визначення глюкози в крові. Метод Хагедорна-Іенсена**

**Принцип.** Мікрометод визначення вмісту глюкози в крові базується на здатності глюкози відновлювати в лужному середовищі при нагріванні червону кров'яну сіль (гексаціано (III) ферат калію) в жовту кров'яну сіль (гексаціано (II) ферат калію). Надлишок червоної кров'яної солі визначається йодометричним титруванням. Вільний йод, що виділяється, відтитровують натрію тіосульфатом в присутності крохмалю в кислому середовищі.

Цукор в крові звичайно визначають натщесерце, в спокійному стані, коли кількість його в артеріальній і венозній крові майже однакова.

**Хід роботи.** Для осадження білків крові, які також мають відновлюючі властивості, готують цинк гідроксид. Для цього в три пробірки наливають по 5 мл 0,45% розчину цинк сульфату і по 1 мл 0,1М розчину натрій гідроксиду. В першу пробірку вносять мікропіпеткою 0,1 мл сироватки крові здорової людини (донорська), а в другу – 0,1 мл сироватки крові (штучної) хворої людини. Третя пробірка є контролем для перевірки редуруючих властивостей реактивів, куди сироватка крові не вноситься.

Дослідні та контрольну пробірки ставлять в кип'ячу водяну баню на 3 хвилини для осадження білків крові. Після цього вміст пробірок фільтрують в широкі ("цукрові") пробірки через попередньо змочену дистильованою водою кип'ячену вату. Для того, щоб змити залишки глюкози, пробірки промивають двічі 2 мл дистильованої води, яку фільтрують через ту ж вату і в ті ж "цукрові пробірки". Після фільтрування вату віджимати не потрібно. Безбілковий фільтрат повинен бути безбарвним та прозорим.

В три пробірки до фільтрату додають точно по 2 мл 0,005М розчину червоної кров'яної солі (гексаціано(III) ферат калію) і кип'ятять 15 хвилин, охолоджують. Додають по 2 мл "трійчастого" розчину солей (цинк сульфат, натрій хлорид, калій йодид), по 3 мл 3% розчину ацетатної кислоти і по 2-3 краплі 1% розчину крохмалю. З'являється синє забарвлення. Титрують 0,005М розчином тіосульфату до зникнення синього забарвлення.

Вміст глюкози обчислюють за таблицею Хагедорна-Іенсена в мМ на 1 л крові.

**Приклад розрахунку.** На титрування вмісту дослідної пробірки витрачено 1,34 мл 0,005М розчину натрій тіосульфату. За таблицею на перетині граф 1, 3 та 4 стоїть число 6,49мМ глюкози. На титрування вмісту контрольної пробірки пішло 1,97 мл натрій тіосульфату. За таблицею на перетині граф 1, 9 та 7 стоїть число 0,28мМ. З показника досліду 6,49мМ віднімають показник контролю – 0,28мМ. Отже, в крові міститься 6,21мМ/л глюкози.

В нормі вміст глюкози у крові разом з іншими редуруючими речовинами коливається від 4,4 до 6,6 мМ/л.

### **Клініко-діагностичне значення**

Метод використовується в клінічних лабораторних дослідженнях для визначення вмісту глюкози в крові. Фізіологічні гіперглікемії спостерігають при емоційних стресах, споживанні великої кількості вуглеводів з їжею.

Патологічні гіперглікемії найчастіше пов'язують із захворюваннями ендокринної системи. Їх спостерігають при цукровому діабеті, злоякісних новоутвореннях кори наднирників та гіпофізу, важких розладах функцій печінки, тощо.

**Таблиця для визначення глюкози (в мМ/л)**

Натрій тіосуль- фат, мл	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0,0	21,	21,20	21,03	20,87	20,62	20,54	20,37	20,20	20,04	
0,1	19,70	19,54	19,43	19,31	19,15	19,04	19,93	18,76	18,65	18,48
0,2	18,37	18,26	18,15	18,04	17,93	17,82	17,65	17,54	17,43	17,32
0,3	17,21	17,09	16,98	16,87	16,76	16,65	16,54	16,43	16,32	16,21
0,4	16,10	15,98	15,87	15,76	15,65	15,54	15,43	15,32	15,21	15,10
0,5	14,99	14,87	14,76	14,65	14,54	14,43	14,32	14,26	14,09	14,04
0,6	13,93	13,82	13,71	13,60	13,49	13,38	13,32	13,21	13,09	12,99
0,7	12,88	12,77	12,65	12,54	12,43	12,32	12,27	12,15	12,04	11,93
0,8	11,82	11,71	11,60	11,54	11,43	11,32	11,21	11,04	10,99	10,93
0,9	10,82	10,71	10,60	10,54	10,43	10,32	10,21	10,10	9,99	9,93
1,0	9,82	9,71	9,60	9,55	9,44	9,32	9,21	9,10	9,05	8,84
1,1	8,82	8,71	8,60	8,55	8,44	8,33	8,21	8,10	8,05	7,94
1,2	7,83	7,71	7,66	7,54	7,44	7,33	7,27	7,10	7,06	6,94
1,3	6,87	6,77	6,66	6,60	6,49	6,38	6,27	6,16	6,11	5,99
1,4	5,88	5,77	5,66	5,61	5,49	5,38	5,27	5,16	5,11	4,99
1,5	4,88	4,77	4,66	4,61	4,49	4,38	4,27	4,16	4,11	3,99
1,6	3,90	3,77	3,70	3,60	3,49	3,38	3,27	3,20	3,10	2,99
1,7	2,88	2,78	2,66	2,61	2,50	2,39	2,28	2,16	2,11	1,10
1,8	1,89	1,78	1,72	1,61	1,50	1,39	1,33	1,22	1,11	1,05
1,9	0,94	0,83	0,78	0,67	0,56	0,44	0,39	0,28	0,177	0,11

### **Робота 6.11 Реакція з $\alpha$ -нафтолом (Моліша)**

**Принцип.** Вуглеводи та їх похідні в присутності концентрованої сульфатної кислоти утворюють фурфурол, який з  $\alpha$ -нафтолом дає фіолетове забарвлення.

**Хід роботи.** Наливають у три пробірки відповідно по 1 мл 1% розчину крохмалю, 3% розчину сахарози і 1% розчину глюкози. У кожен пробірку додають по 2-3 краплі розчину  $\alpha$ -нафтолу та обережно по стінці пробірок нашаровують по 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Спостерігають утворення фіолетового забарвлення на межі між сульфатною кислотою та розчином цукрів.

Позитивну реакцію з  $\alpha$ -нафтолом дають моно-, оліго-, та полісахариди, тому її використовують для їх виявлення в біологічних рідинах.

### **Робота 6.12 Реакція Барфуда**

**Принцип.** Всі моно- і дисахариди, які у своєму складі мають вільний напівацетальний гідроксил, здатні в лужному середовищі відновлювати метали (аргентум, купрум, бісмут тощо). Паралельно йде розрив вуглеводного ланцюга вуглеводів та його полімеризація.

**Хід роботи.** У дві пробірки наливають по 1 мл глюкози і лактози. У кожен з них додають по 1 мл реактиву Барфуда та кип'ятять протягом 5 хвилин. Випадає осад червоного кольору. Спостерігають позитивну реакцію з глюкозою та негативну з лактозою. Ця реакція відрізняється від реакції Троммера тим, що в даних умовах дисахариди, які мають відновні властивості, практично не окиснюються.

### **Робота 6.13 Виявлення сіалових кислот у сироватці крові**

**Принцип.** Метод ґрунтується на кольоровій реакції, яка відбувається в разі нагрівання сіалових (нейрамінової) кислот з реактивом Гесса. Інтенсивність бурувато-рожевого забарвлення залежить від концентрації сіалових кислот.

**Хід роботи.** В пробірку для центрифугування наливають 1 мл штучної сироватки крові, додають 1 мл 10% розчину трихлорацетатної кислоти. Суміш перемішують, пробірку закривають фольгою та ставлять у кип'ячу водяну баню на 5 хв. Охолоджують її в воді з льодом. Це призводить до вивільнення зв'язків нейрамінової кислоти з білковою частиною молекули нуклеопротейнів. Суміш центрифугують або обережно фільтрують. До 0,4 мл надосадової рідини додають 5 мл реактиву Гесса і знову кип'ятять у водяній бані протягом 30 хв, закриваючи пробірку фольгою. Після охолодження фотометрують на ФЕК у кюветах на 10 мм проти води при зеленому світлофільтрі (546 нм). Отриману величину екстинкції домножують на 1000. Результати вимірювання виражають в умовних одиницях. У нормі величина коливається від 100 до 720 мг/л (0,7 г/л) ацетилнейрамінової кислоти.

У нормі здорової людини з сечею за добу виділяється до 0,02% глюкози, яку не визначають звичайними методами.

#### **Робота 6.14 Реакція на пентози**

**Принцип.** Усі пентози під час кип'ятіння в кислому середовищі за присутності бензидину дають червоне забарвлення. Реакція залежить від дегідрування пентоз з утворенням фурфуролу. Останній дає червоне забарвлення з бензидином або зелене з орцином.

**Хід роботи.** У пробірку наливають 0,5 мл розчину бензидину в оцтовій кислоті і додають 1-2 краплі розчину арабінози. Пробірку кип'ятять 5хв. З'являється червоне забарвлення.

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

Реакцію використовують у клінічній практиці, щоб виділити пентозурію, пов'язану із вживанням в їжу фруктів, багатих на пентози, від глюкозурії.

#### **Робота 6.15 Кількісне визначення концентрації молочної кислоти в сироватці крові за методом Бюхнера**

**Принцип.** Молочна кислота внаслідок нагрівання з концентрованою сульфатною кислотою перетворюється на ацетатний альдегід, який у разі взаємодії з гідрохіноном утворює сполуку червоно-коричневого кольору. Кількість молочної кислоти визначають колориметрично на ФЕК за синього світлофільтра.

**Хід роботи.** У дві сухі пробірки наливають по 6 мл дистильованої води. Потім у першу пробірку (контроль) додають 1мл стандартного розчину молочної кислоти, у другу (дослід) – 1 мл штучної сироватки крові. Для осадження білків вливають у кожну пробірку по 1 мл метафосфатної кислоти, струшують та залишають на кілька хвилин, після чого відфільтровують. До фільтратів додають по 1 мл 10% розчину купрум(II) сульфату та по 0,5г кальцію гідроксиду. Проби перемішують скляними паличками, через 5хв відфільтровують. Відбирають по 1 мл фільтрату в пробірки з притертими корками, додають по 0,1 мл розчину купрум(II) сульфату та по 4мл концентрованої сульфатної кислоти. Ставлять їх на киплячу водяну баню на 1,5хв. Після охолодження додають по 0,1 мл 20% спиртового розчину гідрохінону, добре перемішують та кип'ятять протягом 15хв. Пробірки охолоджують та колориметрують при синьому світлофільтрі. Концентрацію молочної кислоти розраховують за формулою:

$$C = \frac{C_{ст} \cdot E_{досл.}}{E_{ст.}}, \text{ де}$$

C – концентрація молочної кислоти в сироватці крові, ммоль/л;

C<sub>ст.</sub> – концентрація молочної кислоти в стандартному розчині;

E<sub>ст.</sub> – екстинкція стандартного розчину молочної кислоти;

E<sub>досл.</sub> – екстинкція густина дослідної проби.

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

У крові здорової людини міститься 1-2 мМ/л молочної кислоти. Збільшення вмісту молочної кислоти спостерігається при інтенсивній м'язовій праці та деяких патологічних станах: гострому гнійному запальному ураженні тканин, важкій анемії, епілепсії, титанії, правцю, цукровому діабеті, нирковій недостатності, лейкозі, тощо.

#### **Робота 6.16 Кількісне визначення концентрації піровиноградної кислоти в сечі колориметричним методом**

**Принцип.** Піровиноградна кислота з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) у лужному середовищі утворює 2,4-динітрофенілгідразони піровиноградної кислоти коричнево-червоного забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації піровиноградної кислоти і визначається колориметрично.

**Хід роботи.** В одну пробірку наливають 0,1мл сечі, у другу- 0,1мл піровиноградної кислоти, а потім в обидві пробірки додають по 0,9мл дистильованої води. Після цього вносять по 0,5мл 0,1% розчину 2,4-ДНФГ, змішують і на 20хв ставлять у темне місце. Пізніше додають по 1мл 12% розчину натрій гідроксиду і через 10хв колориметрують на ФЕК проти контролю (води) при синьому світлофільтрі.

Концентрацію піровиноградної кислоти вираховують за формулою:

$$C_{\text{досл.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{досл.}} \cdot V}{E_{\text{ст.}} \cdot a}$$

де:  $C_{\text{ст}}$  – концентрація стандартного розчину піровиноградної кислоти;

$C_{\text{досл.}}$  – концентрація піровиноградної кислоти у сечі, мг/добу;

$E_{\text{досл.}}$  – оптичне густина досліджуваної проби;

$E_{\text{ст.}}$  – оптична густина стандарту;

$V$  – добова кількість сечі;

$a$  – 0,1 мл сечі, взятої для аналізу.

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

В крові здорової людини міститься 45-115 мкмоль/л піровиноградної кислоти, із сечею за добу виділяється 15-25 мг піровиноградної кислоти. Вміст піровиноградної кислоти підвищується (разом з молочною) під час посиленої м'язової праці, а також деяких патологічних станах, що супроводжуються судомами (тетанія, епілепсія, правець). Збільшується виділення піровиноградної кислоти із сечею при  $B_1$ -вітамінній недостатності, токсикозах, інсулінозалежному цукровому діабеті, тощо.

#### **Робота 6.17 Визначення концентрації глюкози в крові глюкозооксидазним методом**

**Принцип.** Окиснення глюкози киснем повітря під дією глюкозооксидази з утворенням гідроген пероксиду, який в присутності фенолу з 4-амінофеназоном (4-аміноантипірином) утворює забарвлену сполуку.

**Хід роботи.** Послідовність досліду представлена у таблиці.

Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Стандартна проба, мл	Контрольна проба, мл
Сироватка, плазма	0,02	-	-
Стандарт	-	0,02	-
Робочий реактив	2	2	2

Робочий реактив: розчин глюкозооксидази, розчин пероксидази, фенолу, 4-амінофеназону у фосфатному буфері.

Вміст пробірок перемішують, інкубують при кімнатній температурі протягом 30-60хв. Колориметрують за довжини хвилі 490-540нм проти контрольної проби. Результати обчислюють за формулою:

$$C_{\text{досл}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot E_{\text{досл}}}{E_{\text{ст}}}$$

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

$C_{\text{ст}}$  – концентрація глюкози в стандартній пробі, ммоль/л;

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

$E_{\text{ст}}$  – екстинкція стандартної проби.

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

Дослідження можуть бути виконані на автоматичному аналізаторі. Також визначення можна проводити за допомогою наборів фірмових реактивів.

#### **Робота 6.18. Кількісне визначення фруктозо-1,6-дифосфату**

**Принцип.** Фруктозо-1,6-дифосфат – один з ключових метаболітів обміну вуглеводів. Продуктом кислотного гідролізу фруктозо-1,6-дифосфату є фруктоза. Кількісне визначення фруктозо-1,6-дифосфату здійснюють по вмісту фруктози за кольоровою реакцією з резорцином.

**Хід роботи.** В пробірку вносять 1 мл досліджуваної рідини, додають 1 мл 0,1 % розчину резорцину та 3 мл 30 % хлоридної кислоти. Пробу кип'ятять 8 хвилин на водяній бані, охолоджують та фотоколориметрують на ФЕК при  $\lambda=490$  нм в кюветі 1 см проти води. Заздалегідь будують калібрувальний графік, за яким знаходять кількість фруктози в крові. Для підрахунку вмісту фруктозо-1,6-дифосфату величину, знайдену за калібрувальним графіком, перемножують на коефіцієнт 1.9. Результат отримують в мкМ/мл.

#### **Г. Контрольні питання з теми: “Хімія та обмін вуглеводів”**



1. Визначення вуглеводів, їх класифікація, біологічна роль. Вуглеводи та їх похідні як лікарські препарати.
2. Головні представники моносахаридів (глюкоза, фруктоза, галактоза, рибоза, дезоксирибоза), будова, біологічне значення.
3. Дисахариди (сахароза, мальтоза, лактоза, целобіоза): будова, біологічне значення.
4. Основні представники гомополісахаридів (крохмаль, глікоген, клітковина): будова, біологічне значення.
5. Представники і біологічна роль гетерополісахаридів: гіалуронова кислота, хондроїтинсульфати, гепарин, тощо.
6. Похідні вуглеводів (глюкуронова кислота, уронові кислоти, аміноцукри, фосфати вуглеводів: глюкозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат).
7. Добова потреба людини в вуглеводах. Вуглеводи їжі.
8. Роль клітковини та інших харчових волокон в травленні.
9. Перетравлювання вуглеводів в шлунково-кишковому тракті. Характеристика ферментів, які приймають участь в гідролізі вуглеводів.
10. Всмоктування продуктів гідролізу вуглеводів. Доля глюкози після всмоктування, джерела глюкози крові.
11. Синтез глікогену, регуляція.
12. Розпад глікогену. Аденілатциклазний механізм регуляції розпаду глікогену.
13. Генетичні порушення обміну глікогену: глікогенози і аглікогенози.
14. Анаеробний гліколіз і глікогеноліз: механізм, регуляція. Гліколітична оксидоредукція. Субстратне фосфорилування. Енергетичний баланс гліколізу і глікогенолізу.
15. Подібність та відмінність гліколізу від спиртового бродіння.
16. Ефект Пастера. Етапи аеробного окислення глюкози.
17. Енергетичний баланс аеробного окислення глюкози.
18. Пентозофосфатний шлях обміну вуглеводів: біологічне значення, локалізація, механізм.
19. Глюконеогенез: визначення, значення, механізм обхідних реакцій, регуляція.
20. Обмін глюкози та фруктози, їх значення. Взаємоперетворення моносахаридів.
21. Роль нервової системи в регуляції рівня глюкози у крові.
22. Участь гормонів (адреналіну, глюкагону, кортикостероїдів, інсуліну) в регуляції рівня глюкози в крові.
23. Причини і види гіперглікемій і гіпоглікемій.
24. Глюкозурія, причини і види.
25. Біохімічні ознаки цукрового діабету.
26. Цукрові криві, їх діагностичне значення.
27. Антидіабетичні цукрознижуючі фармацевтичні препарати.
28. Роль печінки у вуглеводному обміні.
29. Біохімічні показники вуглеводного обміну.

30. Фізико-хімічні властивості глюкози та інших вуглеводів, на яких базуються основні методи їх якісного та кількісного визначення в біологічних рідинах.

## РОЗДІЛ VII ХІМІЯ ТА ОБМІН ЛІПІДІВ

### А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу

1. Ліпіди: визначення, значення, сучасна класифікація.
2. Будова найважливіших представників ліпідів.
3. Будова і фізико-хімічні властивості мембран: ліпідний бішар, білки мембран, асиметрія та латеральна дифузія мембран.
4. Загальні і спеціалізовані функції мембран, види транспорту речовин через мембрани.
5. Активні форми кисню: утворення, знешкодження. Неферментативне перекисне окиснення ліпідів біомембран.
6. Ферментативне перекисне окиснення ліпідів мембран: каскад арахідонової кислоти. Біологічна роль ейкозаноїдів.
7. Антиоксиданти як лікарські препарати.
8. Харчове значення ліпідів, добова потреба.
9. Перетравлювання жирів, фактори емульгування, ферменти, будова і роль жовчних кислот.
10. Особливості травлення гліцерофосфоліпідів, холестеридів.
11. Всмоктування продуктів гідролізу ліпідів. Ресинтез жирів. Транспортні форми ліпідів: класифікація, будова, значення.
12. Внутрішньоклітинний ліполіз. Роль гормонів в цьому процесі.
13. Механізм  $\beta$ - окиснення жирних кислот, енергетичний баланс. Особливості окиснення ненасичених жирних кислот.
14. Окислення гліцерину, енергетичний баланс.
15. Механізм біосинтезу жирних насичених і ненасичених кислот.
16. Біосинтез жирів (триацилгліцеролів).
17. Біосинтез гліцерофосфоліпідів.
18. Ацетонові (кетонові) тіла: представники, будова, значення, кетогенез, кетоліз, кетогенні та антикетогенні фактори. Кетонемія (норма ацетонових тіл в крові), кетонурія та їх причини.
19. Холестерин: будова, значення, біосинтез та шляхи виділення.
20. Нейро-гуморальна регуляція ліпідного обміну.
21. Патологія ліпідного обміну. Ліпогенні та ліпотропні фактори. Біохімічні показники ліпідного обміну.
22. Ліпіди як лікарські препарати.
23. Принципи методів визначення холестерину та ацетонових тіл в біологічних рідинах.

### Б. Література:

1. Л.М.Вороніна та співавтори, "Біологічна хімія", Харків, 2000. С. 282-321.
2. Ю.І.Губський, "Біологічна хімія", Київ-Тернопіль, 2000. С. 72-86, 190-234.
3. Е.А.Строев, "Биологическая химия", Москва, 1986. С. 84-98, 163-173, 181-184, 186-189, 258-273.

4. Я.І. Гонський та співавтори, "Біохімія людини", Тернопіль 2002. С. 213-243Ю 348-397.

5. Лекції, що читаються на кафедрі.

## **В. Опис лабораторних робіт**

### **Робота 7.1. Емульгація жиру**

**Принцип.** Під дією жовчі, білка або соди жир розпадається на найдрібніші краплі, утворюючи емульсію. На межевій поверхні жирових крапель розміщуються частинки поверхнево-активних речовин (детергенти), які оточують краплі жиру і не дають їм зливатися.

**Хід роботи.** В 4 пробірки вносять по 2 краплі рослинної олії. В першу додають 2 краплі води, в другу - 8 крапель 10% натрій карбонату, в третю - 8 крапель жовчі, в четверту - 8 крапель розчину мила. При збовтуванні усіх пробірок жир емульгує. Найменш стійка емульсія - водна.

### **Робота 7.2. Визначення поверхнево-активних властивостей фосфоліпідів (демонстрація)**

**Принцип.** Метод базується на здатності амфіпатичних речовин утворювати в органічних розчинниках комплекси з феротіоціанатом.

**Хід роботи.** У 2 пробірки наливають по 2 мл хлороформу і по 0,5 мл розчину феротіоціанату, потім в одну додають 0,5 мл розчину фосфатидилхоліну, а в другу – 0,5 мл пальмітинової кислоти. Вміст обох пробірок збовтують. Якщо у пробірці є поверхнево-активна речовина, хлороформний шар забарвлюється у червоний колір.

### **Робота 7.3. Визначення показника рефракції жиру**

**Принцип.** Метод базується на оптичних властивостях ліпідів. Величину показника рефракції, яка залежить від якісного складу жиру, заміряють за допомогою рефрактометру.

**Хід роботи.** 1-2 краплі жиру поміщають між двома призми рефрактометру. Визначивши показник заломлення за шкалою приладу і відповідною таблицею, встановлюють вид жиру, що досліджувався.

### **Робота 7.4. Визначення йодного числа**

**Принцип.** Визначення основане на здатності ненасичених жирних кислот приєднувати йод по місцю подвійних зв'язків. Йодне число - це кількість йоду у грамах, що приєднується до 100г жиру. По йодному числу можна визначити вид жиру.

**Хід роботи.** Наважку жиру (0,1г) вносять у колбу на 500 мл, доливають 5 мл етанолу для розчинення жиру. Потім додають 10 мл спиртового розчину йоду ( $C_n = 0,1$  моль) та 200 мл води, збовтують і залишають на 5 хвилин. Титрують надлишок йоду розчином натрій тіосульфату ( $C_n = 0,1$  моль) в присутності крохмалю. Паралельно ставлять контроль, що не містить жиру. Розрахунок йодного числа (x) ведуть за формулою:

$$X = \frac{(A - B) \cdot 12,692 \cdot 100}{0,1 \cdot 1000}, \text{ де}$$

A – об'єм тіосульфату, що пішов на титрування контролю;

B – об'єм тіосульфату, що пішов на титрування досліду;

12,692 - маса йоду, що відповідає 1мл 0,1N розчину тіосульфату, мг;

100 - перерахунок на 100г жиру;

0,1 - наважка жиру у грамах;

1000 – коефіцієнт перерахунку мг йоду у грами

#### **Фізичні та хімічні константи деяких ліпідів**

Назва жиру	Показник заломлення	Йодне число
Жир людини	1,452—1,457	62,5—73,3
Вершкове масло	1,475—1,476	26—38
Соняшникова олія	1,475—1,476	118—120
Риб'ячий жир	1,475—1,485	150—175
Касторова олія	1,447—1,478	31—91

#### **Робота 7.5. Відкриття фосфорного залишку у фосфатидилхолінах**

**Принцип.** Якісний аналіз фосфоліпідів оснований на визначенні речовин, що входять до їх складу та звільняються при гідролізі. Фосфатну кислоту відкривають реакцією з молібденовим реактивом (розчин амоній молібдату в нітратній кислоті).

**Хід роботи.** До 16 крапель 1% гідролізату фосфатидилхоліну приливають 8 крапель 20% натрій гідрокарбонату і 2 хвилини кип'ятять. Потім доливають 10 крапель молібденового реактиву. Розчин забарвлюється у жовтий колір, що свідчить про наявність фосфорних ефірів.

#### **Робота 7.6. Вплив жовчі на активність ліпази**

**Принцип.** Ліпаза підшлункового соку розщеплює жир молока на гліцерин та жирні кислоти. Кількість жирних кислот визначають титрометрично та виражають в мл 0,1M розчину натрій гідроксиду, що пішов на титрування.

Жовч активує ліпазу і в її присутності гідроліз жирів проходить з більшою швидкістю.

**Хід роботи.** В два хімічних стаканчика наливають по 10 мл кип'яченого молока, розведеного водою (1:1), і по 1 мл витяжки із підшлункової залози, що містить ліпазу. В один стаканчик доливають 10 крапель дистильованої води (контроль), в другий - 10 крапель жовчі (дослід). З кожного відбирають по 2 мл

суміші в колбочки відповідними піпетками (контрольною та дослідною), доливають по 1-2 краплі фенолфталеїну та титрують 0,01М розчином натрій гідроксиду до слабо-рожевого забарвлення. Стаканчики поміщають у термостат при 38-40°C. Через кожні 15 хвилин відбирають по 2 мл суміші і титрують 0,01М розчином натрій гідроксиду. Проводять 3-4 таких визначення. Час титрування і об'єм 0,01М лугу, що пішов на титрування, записують. На основі отриманих результатів складають графік, де на осі абсцис відкладають час у хвиликах, а на осі ординат – об'єм 0,01М натрій гідроксиду, що пішов на нейтралізацію жирних кислот, які утворилися за даний проміжок часу. При складанні графіку від результату кожного титрування необхідно відняти результат першого титрування .

### **Робота 7.7. Якісне та кількісне визначення холестерину**

#### **Робота 7.7.1. Якісна реакція на холестерин з сульфатною кислотою**

**Принцип.** При взаємодії сульфатної кислоти з холестерином утворюються забарвлені в червоно-фіолетовий колір продукти розпаду холестерину.

**Хід роботи.** У пробірку поміщають декілька кристалів холестерину і 10 крапель хлороформу. Обережно по стінці нашаровують 16 крапель концентрованої сульфатної кислоти. З'являється червоно-фіолетове кільце.

#### **Робота 7.7.2. Мікрометод кількісного визначення фракцій холестерину у сироватці крові за Станкевичене**

**Принцип.** Визначення окремих фракцій холестерину основане на реакції їх взаємодії з кольоровим реактивом (3 частини 0,1% розчину ферум хлориду (III) у льодовій ацетатній кислоті і 2 частини концентрованої сульфатної кислоти) за різних температурних умов. Вільний холестерин вступає в реакцію при кімнатній, а ефірнозв'язаний - при температурі 100°C.

**Хід роботи. Визначення вільного холестерину:** В пробірку вносять 2мл кольорового реактиву та мікропіпеткою відміряють 0,04 мл сироватки крові, змішують і залишають на одну годину при кімнатній температурі. Потім колориметрують на ФЕК проти контрольної пробірки (кольоровий реактив) у кюветі товщиною шару 5 мм при зеленому світлофільтрі.

**Визначення загального холестерину:** Рідину з кювети, в якій визначали вільний холестерин, переливають у пробірку, кип'ятять 3 хвилини, охолоджують до кімнатної температури і її вміст колориметрують на ФЕК. За показниками ФЕК, отриманими при визначенні вільного і загального холестерину і за допомогою калібрувального графіку знаходять вміст вільного і загального холестерину у мкг. Потім за формулою проводять розрахунок вмісту у сироватці крові вільного і загального холестерину (X) в мМ/л.

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 0,0259}{0,04 \cdot 1000} \text{ мМ/л , де}$$

а - маса холестерину ,що знайдена за калібрувальним графіком, мкг;  
100 - перерахунок на 100 мл крові;  
1000 - перерахунок мкг в мг;  
0,0259 - коефіцієнт перерахунку мг % у мМ/л;  
0,04 – об'єм сироватки крові, мл.

Ефірнозв'язаний холестерин визначають за різницею між загальним і вільним холестерином. У нормі загального холестерину в крові міститься 3 - 6,1 мМ/л, а вільного - 1,4 - 3,4 мМ/л

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

Гіперхолестеринемія (збільшення вмісту холестерину в крові) – фактор ризику розвитку коронарного атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда.

Найвищий рівень холестерину відмічається при генетичних порушеннях обміну ліпопротеїнів – сімейній холестринемії. Вторинна гіперхолестеринемія має місце при захворюваннях печінки, ураженнях нирок, злякисних пухлинах підшлункової залози, подагрі, гіпертензивній хворобі, ожирінні, цукровому діабеті.

Гіпохолестеринемію спостерігають у хворих з ураженням ЦНС, гіпотиреозі, ревматизмі, лихоманці тощо. Вважають, що гіпохолестеринемія, сприяючи запобіганню атеросклеротичних уражень коронарних судин, створює умови для розвитку онкопатологій.

### **Робота 7.8. Якісне та кількісне визначення ацетонових тіл у сечі**

#### **Робота 7.8.1. Реакція утворення йодоформу**

***Хід роботи.*** До 1мл сечі доливають 8 крапель розчину йоду та 8 крапель 10% розчину натрій гідроксиду. В присутності ацетону утворюється жовтий осад йодоформу з характерним запахом.

#### **Робота 7.8.2. Реакції з натрій нітропрусидом**

***Хід роботи.***

а) До 1мл сечі доливають 5 крапель 10% розчину натрій нітропрусиду та 10 крапель - 10% розчину натрій гідроксиду. З'являється оранжово-червоне забарвлення, яке переходить у вишневе при додаванні ацетатної кислоти.

б) До 1-2мл сечі додають 8 крапель ацетатної кислоти та 8 крапель 10% розчину натрій нітропрусиду. Змішують, обережно нашаровують 8 крапель розчину аміаку - з'являється фіолетове кільце.

#### **Робота 7.8.3. Кількісне визначення ацетонових тіл у сечі**

***Принцип.*** Визначення основане на реакції ацетонових тіл з натрій нітропрусидом. Емпірично встановлено, що при концентрації ацетону в сечі 146,2 мкМ/л через 3 - 4 хвилини з'являється фіолетове кільце на межі між сечею та розчином натрій нітропрусиду.

***Хід роботи.*** Беруть 8 пробірок. В усі, крім першої, наливають по 1 мл дистильованої води, в першу і другу пробірки по 1 мл досліджуваної сечі. З

другої пробірки 1 мл суміші переносять в третю, з третьої — в четверту, й т.д., з останньої пробірки 1 мл суміші виливають. Потім в кожен пробірник наливають по 8 крапель 50% розчину амоній сульфату для збільшення питомої густини рідини і по 8 крапель натрій нітропрусиду і концентрованої ацетатної кислоти. Перемішують і в кожен пробірник нашаровують по 16 крапель аміаку за допомогою гумової груші під витяжною шафою, слідкують, в якій пробірці з'явиться фіолетове кільце через 3 - 4 хвилини. При розрахунку ацетонових тіл показник концентрації 146,2 мкМ/л домножують на показник розведення в пробірці, де фіолетове кільце з'явилося через 3 - 4 хвилини, і на об'єм добової сечі.

#### **Робота 7.9. Напівкількісний метод визначення ацетонових (кетонових) тіл в сечі. (Експрес-аналіз)**

Для напівкількісного визначення ацетонових тіл в сечі використовують діагностичні тест-полоски “Cormay Uritest – 1“. При наявності в сечі кетонових тіл в діапазоні 0,3 – 0,5 ммоль полоска міняє колір, інтенсивність забарвлення якої зрівнюють з стандартною кольоровою шкалою на футлярі.

**Хід роботи.** На тест-полоску наносять піпеткою 2 краплі досліджуваної сечі. Через 2 хвилини колір тест-полоски зрівнюють з стандартною кольоровою шкалою на футлярі набору. При відсутності ацетону в сечі колір полоски не змінюється. Наявність ацетонових тіл обумовлює фіолетове забарвлення.

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

У здорової людини із сечею виділяється настільки мала кількість ацетонових тіл, що практично не визначається звичайними методами дослідження. Кетонурія (різке збільшення кетонових тіл в сечі) спостерігається в результаті їх посиленого утворення та порушення процесу окиснення. Спостерігається при: цукровому діабеті, голодуванні, кахексії, тиреотоксикозах, акромегалії, інфекційних захворюваннях, інтоксикаціях тощо.

#### **Робота 7.10. Демонстрація кислих властивостей жирних кислот**

**Принцип.** Солі жирних кислот завдяки негативному заряду своїх карбоксильних груп здатні зв'язуватися з основними барвниками з утворенням комплексів, що розчиняються в органічних розчинниках.

**Хід роботи.** У пробірку наливають 10 крапель розчину солей жирних кислот, додають 10 крапель 0,5% розчину метиленової сині і 1 мл хлороформу. Збовтують. У присутності солей жирних кислот хлороформний шар забарвлюється у синій колір.

#### **Робота 7.11. Визначення холінвмісних фосфоліпідів у суміші ліпідів**

**Принцип.** Холінвмісні фосфоліпіди, що містять четвертинний атом азоту, проявляють властивості сильних органічних основ. У зв'язку з цим вони здатні зв'язувати барвники (бромтимоловий синій, бромфеноловий синій), які мають негативний заряд за рахунок сульфогрупи. Утворений гідрофобний комплекс екстрагується органічними розчинниками. Інші фосфоліпіди



(фосфатидилсерин, кардіоліпіди, фосфатидилетаноламін), які не мають четвертинного атому нітрогену, з цими барвниками не зв'язуються.

**Хід роботи:** До 1 мл 0,2% розчину суміші ліпідів приливають 1 мл 0,1% розчину бромтимолового синього з рН=8, 2 мл хлороформу та розмішують шляхом перевертання пробірки, не допускаючи утворення піни, протягом 30 секунд. Залишають пробірку на декілька хвилин для розмежування шарів.

В присутності холінвмісних фосфоліпідів хлороформний шар забарвлюється у жовтий колір.

### **Робота 7.12. Визначення гідропероксидів жирних кислот**

**Принцип.** Гідропероксиди жирних кислот здатні в кислому середовищі окислювати  $Fe^{+2}$  до  $Fe^{+3}$ , яке утворює комплекс з роданід-іоном яскраво-червоного кольору.

**Хід роботи.** До 0,5 мл біологічного матеріалу додають по 0,5 мл 2 М розчину HCl, 0,5% розчину солі Мора і 0,1М розчину амоній роданіду. При наявності гідропероксидів розчин забарвлюється в червоний колір.

### **Робота 7.13. Визначення суми тригліцеридів і фосфогліцеридів у суміші ліпідів**

Ліпіди екстрагуються органічними розчинниками, наприклад, сумішшю етанолу та діетилового ефіру або хлороформу з метанолом (2:1). Ліпіди із складно-ефірними зв'язками реагують з гідроксиламіном в лужному середовищі з утворенням гідроксаматів, які в кислому середовищі забарвлюються розчином ферум (3) хлоридом.

**Хід роботи.** В дослідну пробірку наливають 0,2 мл ліпідного екстракту, в контрольну 0,2 мл води. В обидві пробірки додають по 0,5 мл 13,9% розчину гідроксиламінхлориду і 3,5 М розчину натрій гідроксиду, залишають на 15 хвилин. Додають 1 мл 12% розчину хлоридної кислоти (HCl) та 0,5 мл 10% розчину  $FeCl_3$ . Фотометрують при зеленому світлофільтрі в кюветі 5 мм проти контролю.

Розрахунок: показник екстинкції 0,35 - 2 мМ/л  
показник екстинкції досліду х мМ/л

В нормі кількість складно-ефірних зв'язків не більше 4 мМ/л.

### **Робота 7.14. Якісне визначення жовчних кислот (реакція Петенкофера).**

**Принцип.** При взаємодії сахарози з сульфатною кислотою утворюється оксиметилфурфурол, який з жовчними кислотами дає сполуку червоно-фіолетового забарвлення

**Хід роботи.** До 3 мл жовчі (1:3) додають 2 краплі 10% розчину сахарози і 16 крапель  $H_2SO_4$  (концентрованої). На межі рідин утворюється червоно-фіолетове кільце.

### **Робота 7.15. Кількісне визначення жовчних кислот в жовчі.**

**Принцип.** Метод оснований на якісній реакції Петенкофера. Продукт реакції має максимум поглинання при довжині хвилі 540 нм.

**Хід роботи.** До 0,01 мл жовчі (1:4) додають 0,4 мл 2% розчину сахарози, 5 мл 67% розчину  $H_2SO_4$ , прогрівають 15 хвилин при температурі  $60^\circ C$ . Після охолодження колориметрують на ФЕК при 540 нм в кюветі 10мм. Концентрацію жовчних кислот в мкг визначають за калібрувальним графіком, вміст в жовчі розраховують за формулою:

$$C_{ж.к.} = \frac{X \cdot 5 \cdot 10^{-6}}{10^{-2} \cdot 10^{-3}}, \text{ г/л, де}$$

x -концентрація жовчних кислот в мкг за калібрувальним графіком;

5-розведення жовчі;

$10^{-6}$ - перерахунок мкг в г;

$10^{-2}$  (0,01)- об'єм жовчі, в мл;

$10^{-3}$ - перерахунок мл в л.

В нормі вміст жовчних кислот в міхуровій жовчі 90-120 г/л.

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

Дефіцит жовчі в кишках може бути наслідком хвороб печінки, жовчного міхура або жовчних шляхів (жовчно-кам'яна хвороба). Супроводжується порушенням емульгування, травлення і всмоктування ліпідів і жиророзчинних вітамінів, а також стеатореєю – поява крапель жиру у фекаліях

### **Робота 7.16. Визначення активності супероксиддисмутази (СОД).**

(демонстраційна робота)

**Принцип.** Про активність ферменту свідчить його здатність гальмувати відновлення нітротетразолію синього за присутності НАДН<sub>2</sub>.

**Хід роботи.** У центрифугальні пробірки наливають по 1 мл 10% гомогенату печінки у фосфатному буфері (рН=7,4) або плазми крові. Додають по 0,5 мл хлороформ-спиртової суміші (співвідношення 1:2) і 300 мг калій дигідрогенфосфату. Осаджений білок відцентрифугують за швидкості 1200 об/хв протягом 15хв за температури  $4^\circ C$ . Активність ферменту визначають у безбілковій надосадовій рідині(супернатанті). До 0,2 мл супернатанту (у контрольній пробі – 0,2 мл фосфатного буфера) додають 1,3 мл 0,1М фосфатного буфера (рН=8,3), 1мл розчину тетразолію синього (200 мкг/мл), 0,3мл розчину феназинметасульфату (69 мкг/мл) і 2 мл 0,2М розчину НАДН<sub>2</sub>. Проби витримують у темряві протягом 10 хв. і фотометрують на спектрофотометрі за довжини хвилі 540нм у кюветі завтовшки 10 мм проти контрольної пробі.

Процент інгібування редукції нітротетразолію синього визначають за формулою:

$$\frac{(E_k - E_d) \cdot 100\%}{E_k},$$

де:  $E_k$  – екстинкція контрольної пробі;

Е<sub>д</sub>-екстинкція дослідної проби.

Кількість ферменту, який здатний інгібувати відновлення нітротетразолію синього на 50%, приймають за одну умовну одиницю активності.

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

СОД каталізує реакцію знешкодження супероксидного аніон-радикалу кисню, тобто в організмі є антиоксидантом – речовиною, яка зменшує активність ПОЛ.

#### **Робота 7.17. Визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА)**

**Принцип.** За високої температури в кислому середовищі МДА реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою з утворенням забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при довжині хвилі 532нм.

**Хід роботи.** До 3 мл фосфатного буфера (рН 7,4) додають 0,2 мл сироватки донорської крові, 0,5 мл 1ММ калій перманганату, розчин перемішують, через 10 хвилин додають 0,5 мл 1ММ розчину ферум сульфату, 1мл 20% розчину трихлорацетатної кислоти і центрифугують 10 хв. за швидкості 3000об/хв. Далі до 2 мл супернатанту додають 0,5 мл 1М розчину хлоридної кислоти та 1 мл 0,7% тіобарбітурової кислоти. Суміш витримують 20хв. на кип'ячій водяній бані. Після різкого охолодження в пробірку вливають 3 мл бутанолу, ретельно перемішують і центрифугують 10 хв. за швидкості 3000об/хв.

Екстинкцію розчину визначають спектрофотометрично. Вміст виражають у мкМ МДА/мл сироватки:

$$A = \frac{E \bullet 52,88}{0,2}, \quad \text{де}$$

Е – екстинкція розчину;  
52,88- коефіцієнт перерахунку;  
0,2- об'єм сироватки крові в пробі , мл.

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

Збільшення концентрації МДА свідчить про інтенсифікацію процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які ініціюють виникнення таких патологічних станів як променева хвороба, канцерогенез, опікова хвороба, виразкова хвороба тощо.

### **Г. Контрольні питання з теми:**

#### **“Хімія та обмін ліпідів”**

- 1.Класифікація, загальна характеристика та біологічне значення ліпідів.
- 2.Найважливіші вищі жирні кислоти і нейтральні жири: будова, біологічне значення.
- 3.Фізико-хімічні властивості жирів.
- 4.Фосфогліцериди: будова, властивості, біологічна роль.
- 5.Сфінголіпіди: хімічна будова, класифікація значення.

6. Стероїди: загальна характеристика, біологічне значення.
7. Сучасні уявлення про структуру і функції біологічних мембран: ліпідний бішар, білки мембран, латеральна дифузія, асиметрія мембран.
8. Основні і спеціалізовані функції біологічних мембран.
9. Види транспорту речовин через мембрани. Фармпрепарати – активатори та інгібітори трансмембранних переносників.
10. Поняття про перекисне окиснення ліпідів. Активні форми кисню. Антиоксиданти як лікарські препарати.
11. Каскад арахідонової кислоти. Ейкозаноїди: структура, біологічна роль.
12. Значення жирів в харчуванні, добова потреба.
13. Перетравлювання і всмоктування жирів в ШКТ.
14. Перетравлювання і всмоктування фосфогліцеридів та холестеридів в ШКТ.
15. Жовчні кислоти: будова, синтез, значення в процесах перетравлювання і всмоктування ліпідів.
16. Транспортні форми ліпідів: склад, будова, характеристика.
17. Проміжний обмін ліпідів.
18. Внутрішньоклітинний ліполіз.
19. Човникові механізми транспорту жирних кислот і ацетил-КоА через мітохондрії.
20. Хімізм і енергетичний баланс окиснення гліцерину, насичених і ненасичених жирних кислот.
21. Біосинтез жирних кислот, значення біотину та роль синтази жирних кислот.
22. Біосинтез тригліцеридів і гліцерофосфоліпідів.
23. Ацетонові (кетонові) тіла: синтез (кетогенез), будова, вміст у крові. Кетогенні, антикетогенні фактори. Кетоліз (утилізація ацетонових тіл).
24. Холестерин: будова, біологічне значення, шляхи виведення з організму.
25. Нейро-гуморальна регуляція ліпідного обміну.
26. Патологія ліпідного обміну: ожиріння – ліпотропні, ліпогенні фактори, механізм їх дії; атеросклероз, жовчно-кам'яна хвороба.
27. Біохімічні показники ліпідного обміну.
28. Ліпіди як лікарські препарати.
29. Принципи методів визначення ацетонових тіл та холестерину в біологічних рідинах

## **РОЗДІЛ VIII**

### **ГОРМОНИ ТА ІНШІ СИГНАЛЬНІ МОЛЕКУЛИ.БІОХІМІЯ КРОВІ. ІМУНОХІМІЯ**

#### **А.Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:**

- 1.Історія розвитку ендокринології.
- 2.Компоненти ендокринної системи. Поняття про APUD-систему, апудоцити.
- 3.Класифікація гормонів за характером дії, хімічною природою, місцем синтезу.
- 4.Характерні ознаки істинних гормонів та гормоноподібних речовин. Різновиди ізокринної дії. Представники гормоноподібних речовин та їх біологічна роль.
- 5.Регуляція секреції гормонів. Каскадне посилення гормонального сигналу.
- 6.Типи комунікацій між клітинами.
- 7.Типи механізмів передачі регуляторних сигналів:
  - а)гормонами білково-пептидної природи та катехоламінами(типи рецепторів плазматичної мембрани, роль G-білків-трансдукторів, каталітичної ділянки, месенджерів); активні форми кисню та газу як месенджери клітинних сигналів;
  - б)гормонами ліпідної природи (стероїдами) та тиреоїдними гормонами;
  - в)сигнальні системи апоптозу.
- 8.Гормони центральних регуляторних ендокринних утворень: гіпоталамуса, гіпофіза, епіфіза (представники, хімічна природа, біосинтез, інактивація, механізм дії, біологічна роль та можлива патологія).
- 9.Гормони периферичних ендокринних залоз: щитоподібної залози, паращитоподібних залоз, наднирників (представники, хімічна природа, біосинтез, інактивація, механізм дії, біологічна роль та можлива патологія).
- 10.Гормони органів змішаних функцій: статевих залоз та підшлункової залози (представники, хімічна природа, біосинтез, інактивація, механізм дії, біологічна роль та можлива патологія).
- 11.Гормони як лікарські препарати.
- 12.Кров як біологічна рідина. Види крові, препарати крові як ліки. Константи крові , їх регуляція.
- 13.Основні функції крові.
- 14.Склад крові, зміни при патології. Плазма та сироватка, визначення.
- 15.Хімічний склад крові: характеристика білків (нормальних та патологічних); безазотисті органічні компоненти крові. Залишковий азот крові, його клінічне значення.
- 16.Ферменти сироватки крові.
- 17.Електролітний склад крові.
- 18.Імунохімія як наука, її значення в сучасній біології, медицині та фармації. Поняття про чужорідну інформацію. Імунітет: визначення, види імунітету. Імунодепресори та імуностимулятори.
- 19.Основні поняття в імунохімії: імуноген, антиген, гаптен, антигенні детермінанти.

20. Антитіла та імуноглобуліни, їх структура та характеристика.
21. Органи та Т- і В-системи імунітету. Неспецифічні фактори захисту, біохімічні механізми їх дії.
22. Основи імунопатології: види та причини. Перспективи профілактики та лікування.
23. Принципи методів визначення гормонів в біологічних рідинах, сечовини та хлоридів в крові.

### **Б. Література:**

1. Л.М.Вороніна та співавт. “ Біологічна хімія”, Х., «Основа », 2000., С.463-533.
2. Е.А.Строев. “Биологическая химия”, М., «Высшая школа» 1986., С.:370-423.
3. Ю.І.Губський. “Біологічна хімія”, К., 2000., С.:330-381, 418-432, 440-449.
4. Я.І.Гонський та співавт. “Біохімія людини”, Тернопіль, 2002, С. 154-213.
5. Лекції, що читаються на кафедрі.

### **В. Опис лабораторних робіт.**

#### **Робота 8.1. Якісні реакції на гормони**

##### **Робота 8.1.1. Реакції, що доводять білкову природу інсуліну**

###### **а) Реакція Геллера**

*Принцип.* Осадження білка концентрованими мінеральними кислотами (крім фосфатної кислоти) відбувається в результаті дегідратації білкових молекул та нейтралізації їх зарядів. Реакція осадження білка нітратною кислотою (реакція Геллера) використовується в клінічних дослідженнях сечі на наявність та кількісний вміст в ній білка за методом Стольнікова.

*Хід роботи.* До 5 крапель концентрованої нітратної кислоти обережно по стінці пробірки нашаровують 2 краплі розчину інсуліну. На межі двох рідин виникає білий осад у вигляді невеликого кільця.

###### **б) Біуретова реакція**

*Принцип.* В лужному середовищі в присутності купруму солей розчин білка набуває фіолетового кольору. Біуретова реакція обумовлена наявністю в молекулі білка пептидних зв'язків, які в лужному середовищі утворюють комплексні сполуки купруму.

*Хід роботи.* До 3 крапель інсуліну доливають 5 крапель 10% розчину натрій гідроксиду і одну краплю 1 % розчину купрум(II)сульфату. Рідина забарвлюється у фіолетовий колір.

###### **в) Реакція Фоля**

*Принцип.* При додаванні до розчину білка 30% розчину натрій гідроксиду, плюмбум(II)ацетату з наступним кип'ятінням розчин починає темніти. Реакція обумовлена присутністю в молекулі білка сірковмісних амінокислот - цистеїну, цистину, метіоніну. Ці амінокислоти при нагріванні в присутності натрій гідроксиду руйнуються, утворюючи натрій сульфід ( $\text{Na}_2\text{S}$ ).

Плюмбум(II) ацетат реагує з натрій гідроксидом з утворенням натрій плюмбіту.

Натрій сульфід взаємодіє з натрій плюмбітом, утворюючи чорний осад плюмбум сульфід ( $\text{PbS}$ ).

**Хід роботи.** До 3 крапель розчину інсуліну доливають 5 крапель реактиву Фоля та кип'ятять. Випадає чорний осад плюмбум сульфід (PbS).

### **Робота 8.1.2. Реакція на 17-кетостероїди**

**Принцип.** Робота основана на реакції взаємодії 17-кетостероїдів з мета-динітробензолом в присутності натрій гідроксиду з утворенням продуктів конденсації вишнево-червоного кольору.

**Хід роботи.** В пробірку вносять 3 краплі сечі, 3 краплі 10% натрій гідроксиду і 3 краплі 2% спиртового розчину мета-динітробензолу та кип'ятять. Утворюється продукт конденсації вишнево-червоного кольору. Ця реакція використовується і для кількісного визначення 17-кетостероїдів у сечі.

### **Робота 8.1.3. Реакції на адреналін**

**а) Реакція з ферум(III)хлоридом** характерна для пірокатехінового ядра, що входить до складу адреналіну.

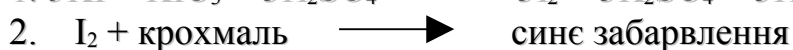
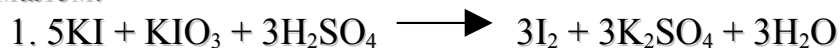
**Хід роботи.** В пробірку вносять 4 краплі розчину адреналіну і 1 краплю 1% розчину ферум(III)хлориду. Виникає зелене забарвлення.

**б) Флуоресцентне визначення адреналіну.** Адреналін, що окислюється киснем повітря, при додаванні луку утворює флуоресцентні речовини.

**Хід роботи.** В пробірку вносять 5 крапель води, 3 краплі 10% розчину натрій гідроксиду і 1 краплю розчину адреналіну. Пробірку розташовують перед екраном флуороскопа. Спостерігають зелену флуоресценцію продуктів окислення адреналіну.

### **Робота 8.1.4. Якісна реакція на тироксин (відкриття йоду в гідролізаті тиреоїдину)**

**Принцип.** При руйнуванні тироксину утворюється калій йодит, із якого йод легко витісняється калій йодатом. Йод, що виділився, дає синє забарвлення з крохмалем.



**I-етап.** Лужний гідроліз тиреоїдину (готується заздалегідь лаборантами)

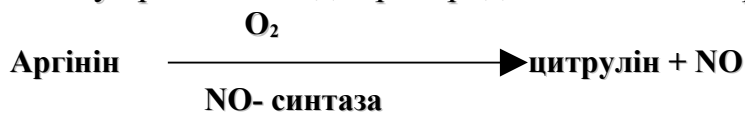
**Хід роботи.** В ступці старанно розтирають 5 таблеток тиреоїдину (препарат щитовидної залози). Розтерту масу пересипають у колбочку, доливають 5 мл 10% розчину натрій гідроксиду і 5 мл дистильованої води. Колбочку поміщають на азбестову сітку та кип'ятять 15 хвилин.

**II-етап.** Відкриття йоду в отриманому гідролізаті (виконують студенти).

**Хід роботи.** До 24 крапель охолодженого гідролізату тиреоїдину доливають 10% розчин сульфатної кислоти до появи кислої реакції на лакмусовому папері (1-2 краплі). Після підкислення доливають 3 краплі 2% розчину калій йодату (непотрібно додавати надлишок  $KIO_3$ ) і одну краплю 1% розчину крохмалю. Йод, що виділяється, дає синє забарвлення з крохмалем.

## **Робота 8.2. Визначення метаболітів нітроген оксиду (нітритів) в слині**

Нітроген(II)оксид (NO) - це вільний радикал, що утворюється в організмі із аргініну і виконує роль месенджера в ряді біологічних процесів.



При метаболізмі 80% NO перетворюється в нітрити або нітрати.

**Принцип.** Нітрити взаємодіють з реактивом Грісса ( $\alpha$ -нафтіламін і сульфанілова кислота у співвідношенні 5:1) при температурі 30°C з утворенням сполук рожевого кольору. Забарвлення, інтенсивність якого визначається на ФЕК, прямопропорційне концентрації нітритів в слині.

**Хід роботи.** До 0,1 мл слини додають 0,9 мл дистильованої води і 1 мл реактиву Грісса. Витримують в термостаті на протязі 20 хв. при температурі 30°C. Колориметрують на ФЕК при довжині хвилі 540нм в кюветі 0,5 см проти контролю, де замість слини беруть 0,1 мл дистильованої води.

### **Розрахунок:**

$$I(C) = 3,34 \cdot \Delta D \text{ мкг в досліді, де}$$

I(C) - концентрація оксиду нітрогену (нітритів) в слині;

3,34 - коефіцієнт розрахунку;

$\Delta D$  - маса нітритів в досліді, в мкг, знайдена за калібрувальним графіком.

Концентрація нітритів в слині - 2-4 мкг/мл.

### **Клініко-діагностичне значення**

Відкриття ендотеліоцитарної системи утворення нітроген оксиду – газоподібного медіатора – є одним із найбільш значних наукових досягнень в галузі біології та медицини. Нітроген оксид є важливим медіатором запальної реакції: збільшення активності NO-синтази і накопичення NO спричиняють інтерлейкін-1, інтерлейкін-6, фактор некрозу пухлин, які утворюються макрофагами. Блокування NO-синтази і зменшення біосинтезу нітроген оксиду зумовлює підвищення артеріального тиску, периферійної опірності судин і супроводжується порушенням функції нирок, що проявляється зменшенням виділення із сечею іонів натрію. З пригніченням утворення нітроген оксиду пов'язане і підвищення артеріального тиску у хворих на хронічну ниркову недостатність. Зменшення біосинтезу нітроген оксиду в клітинах стінки уражених атеросклерозом судин здатне призводити до вазоконстрикції, збільшення адгезії тромбоцитів, нейтрофілів, збільшення проліферації гладеньких м'язових клітин. До гальмування NO-синтази призводять глюкокортикоїди.

## **Робота 8.3. Вплив адреналіну та інсуліну на рівень глюкози в крові кролів. Глюкоза визначається орто-толуїдиновим методом (див. роботу 6.7.)**

**Принцип.** Адреналін активує фосфорилазу печінки, посилюючи розпад глікогену, в результаті чого після введення адреналіну вміст цукру в крові



підвищується. Інсулін сприяє проникненню глюкози з кров'яного русла через плазматичні мембрани в середину клітини і окисленню глюкози, тому при введенні інсуліну рівень глюкози в крові знижується.

**Хід роботи. I етап. Заздалегідь проводиться лаборантами**

У двох кролів лаборанти беруть кров з вени вуха і готують з неї сироватку крові. Потім одному кролю під шкіру вводять адреналін у розведенні 1:1000 з розрахунку 0,37мл на 1кг маси. Через кожні 15 хвилин на протязі 2 годин знову проводять забір крові і готують з неї сироватку. Іншому кролю підшкірно вводять 2 мл розчину інсуліну в дозі 1,5 Міжнародних Одиниці на 1кг маси тіла і також проводять забір крові через кожні 15 хвилин на протязі 2 годин і готують з неї сироватку.

**II етап. Виконується студентами**

В отриманих сироватках крові до і після введення гормонів визначають цукор крові за орто-толуїдиновим методом (див. роботу 6.8.). Отримані дані відкладають на графіку і порівнюють.

**Робота 8.4. Кількісне визначення 17-кетостероїдів (17-КС) в сечі**

**Принцип.** Кількісне визначення 17-КС в сечі базується на їх взаємодії з мета-динітробензолом з утворенням продуктів конденсації вишнево-червоного кольору, інтенсивність забарвлення яких прямопропорційна концентрації 17-КС в сечі.

**Хід роботи. I-етап.** Гідроліз глюкуронідів (**виконується лаборантами заздалегідь**).

Гідроліз проводиться хлоридною кислотою: 20 мл сечі та 3 мл концентрованої НСІ кип'ятять 15 хвилин.

**II-етап.** Екстракція 17-КС (**виконується лаборантами заздалегідь**).

Гідролізат глюкуронідів, отриманий на I етапі, двічі екстрагують ефіром, промивають 10% розчином NaOH, потім випарюють до сухого залишку на кип'ячій водяній бані. Сухий залишок розчиняють в 2 мл 96% етанолу.

**III-етап.** Кольорова реакція та колориметрування (**виконують студенти**).

**Хід роботи.** В дослідну пробірку вносять 1 мл спиртового екстракту сечі, додають 0,5 мл 5М розчину КОН і 0,5 мл 2% спиртового розчину мета-динітробензолу. Паралельно ставлять контроль, де замість спиртового екстракту сечі беруть 1 мл спирту. Колориметрують на ФЕК при довжині хвилі 540нм в кюветі 0,5см проти контролю.

**Розрахунок:**

$$C = \frac{E \cdot 1500 \cdot 2}{1,45 \cdot 20} \quad (\text{мкмоль/добу}), \text{ де}$$

C- концентрація 17-КС ;

E- екстинкція ФЕК, що отримана при колориметруванні дослідіду; 1500-діурез (добова кількість сечі);

2; 20; 1,45 - коефіцієнти перерахунку.

В нормі 17-КС – 22,88-81,12 мкмоль/добу.

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

17-кетостероїди (КС) – це продукти інактивації стероїдних гормонів (кортикостероїдів, андрогенів та прогестерону). Їх кількість в сечі є свідченням функціонального стану наднирників та статевих залоз. 17-КС виділяються з сечею у вигляді глюкуронідів, тобто парних продуктів конденсації з глюкуроною кислотою. З віком концентрація 17-КС в сечі зменшується. Підвищення показників 17-КС в сечі спостерігають при хворобі Іценка-Кушінга, карциномі кіркової речовини надниркових залоз, пухлинах яєчка. Зниження 17-КС в сечі спостерігають при ослабленій функції статевих залоз (гіпогонадоїзмі) і, меншою мірою, при хворобі Аддісона (гіпофункція наднирників), при гіпертиреозі та цирозі печінки.

#### **Робота 8.5. Відкриття залишків крові на медичному інструментарії реакцією з азопірамом**

***Принцип.*** При взаємодії азопіраму (10% розчин амідопіріну і 0,10-0,15% розчин хлорид феніламонію в 96% етанолі) з гемоглобіном в присутності гідроген пероксиду, як окисника, утворюються забарвлені продукти.

***Хід роботи.*** Робочим розчином (розчин азопіраму і 3% розчин гідроген пероксиду в рівних об'ємах) обробляють досліджувані інструменти: протирають їх тампоном, змоченим у робочому розчині, або наносять декілька крапель робочого розчину на досліджуваний об'єкт за допомогою піпетки. Або в шприц наливають 3-4 краплі робочого розчину, декілька разів просувають поршнем для змочування реактивом внутрішньої поверхні і залишають на 0,5-1 хвилину. Потім вміст шприца через голку виливають на марлеву серветку.

При наявності слідів крові негайно, не пізніше, ніж через 1хв. після контакту з забрудненою кров'ю частиною, з'являється забарвлення спочатку фіолетове, яке швидко переходить в рожево-бузкове.

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

Користування медичним інструментарієм, що забруднений кров'ю може призвести до захворювань вірусним гепатитом, СНІД-ом, тощо, віруси і збуджувачі яких знаходяться в крові.

#### **Робота 8.6. Кількісне визначення сечовини в сироватці крові**

***Принцип.*** Сечовина утворює з діацетилмонооксимом в присутності тіосемикарбазиду та іонів феруму ( $Fe^{3+}$ ) в кислому середовищі комплексну сполуку червоного кольору, інтенсивність забарвлення якої прямопропорційна вмісту сечовини в крові.

***Хід роботи.*** В дослідну пробірку вносять 0,01 мл сироватки крові (донорської або штучної), доливають 2,0 мл робочого розчину, що містить діацетилмонооксим, тіосемикарбазид, сульфатну кислоту та змішують. Пробірку закривають ватою і кип'ятять 10 хвилин (точно!). Охолоджують та заміряють оптичну густину на ФЕК супроти води в кюветі 0,5см при зеленому

світлофільтрі. Паралельно обробляють 0,01 мл еталону сечовини так, як і дослідну пробірку і також колориметрують. Розрахунок концентрації сечовини проводять за формулою.

$$C = \frac{A}{B} \cdot 16,65 \text{ мМ сечовини на 1л сироватки крові, де}$$

А - показник екстинкції досліду;

Б - показник екстинкції еталону;

16,65 - коефіцієнт перерахунку мг % сечовини в мМ/л.

В нормі вміст сечовини в сироватці крові людини - 3,38-8,33 мМ/л.

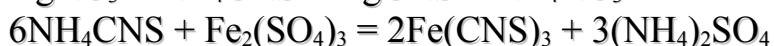
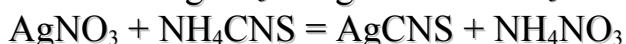
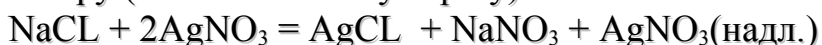
#### ***Клініко-діагностичне значення***

Підвищення вмісту сечовини в крові (уремія) є головною ознакою порушення видільної функції нирок. При цьому вміст сечовини в сечі зменшується. Уремію спостерігають також при патологіях, що супроводжуються інтенсивним розпадом білків (гарячка, сепсис, туберкульоз, опіки, перитоніти), а також при втраті рідини організмом.

Зниження вмісту сечовини в крові та зменшення її виділення із сечею спостерігається при порушенні синтезу сечовини (уреогенезу) внаслідок важких захворювань печінки (цироз, гострий жировий гепатоз, отруєння фосфором, арсеном та іншими ядами). Зниження сечовини в крові може виникати і при малобілковій дієті.

#### **Робота 8.7 Визначення хлоридів у сироватці крові за методом Рушняка**

***Принцип.*** У безбілковому фільтраті іони хлору взаємодіють з аргентум нітратом, надлишок якого відтитровують амоній роданідом у присутності індикатору (залізо-амоній сульфату).



Закінчення реакції визначають за появою рожевого забарвлення, що утворене  $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ .

***Хід роботи.*** В дві колбочки наливають по 5 мл дистильованої води, в одну вносять 0,2 мл сироватки крові. Потім в обидві колбочки відмірюють по 3 мл 0,01М розчину аргентум нітрату, по 8 крапель концентрованої нітратної кислоти і по 4-5 крапель розчину залізо-амоній сульфату. Титрують 0,01М розчином амоній роданідом до слабо рожевого забарвлення. Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{(a-b) \cdot 0,01 \cdot 1000}{0,2} = (a-b) \cdot 50 \text{ ммоль/л, де:}$$

а - результат титрування в контролі;

б – результат титрування в досліді;

0,01 – еквівалентність розчину аргентум нітрату;

1000 – перерахунок на мг – еквівалент;

0,2 – об'єм сироватки крові, мл.

Нормальний вміст хлоридів у сироватці крові – 86-103 мМ/л.

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

Зниження вмісту хлоридів (гіпохлоремія) спостерігається при:

- ☞ підвищенні виділення хлоридів з організму (посилене потовиділення);
- ☞ діареї, частій блювоті;
- ☞ респіраторному та метаболічному ацидозі;
- ☞ частому зондуванні;
- ☞ непрохідності кишечника;
- ☞ недостатності функції наднирників.

Підвищення вмісту хлоридів в крові має місце при:

- ☞ нирковій недостатності;
- ☞ гіперпаратиреозі;
- ☞ дегідратації тканин.

#### **Робота 8.8. Реакція гемолізу**

***Принцип.*** До зависі еритроцитів барана, взятих на санітарно-епідеміологічній станції, додають кролячу антиеритроцитарну сироватку, що містить антитіла класу IgG до еритроцитів барана. Антитіла адсорбуються на поверхні еритроцитів. При додаванні комплекменту останній приєднується до комплексу антиген-антитіло, еритроцити руйнуються (гемолізуються). Еритроцитарна завись стає прозорою.

***Хід роботи.*** В дві преципітаційні пробірки наливають по 0,25 мл 0,5% зависі еритроцитів барана і по 0,2 мл антиеритроцитарної сироватки. В одну пробірку доливають 0,1 мл комплекменту (сироватка крові морської свинки в розведенні 1:10), в другу пробірку - 0,1 мл фізіологічного розчину. Пробірки ставлять у термостат на 20 хвилин при температурі 37°C. Результати реакції відмічають у протоколі

#### **Г.Контрольні питання з теми:**

#### **“Гормони. Трансдукція регуляторного сигналу. Біохімія крові. Імунохімія”**

- 1.Поняття про гормони. Історія розвитку ендокринології.
- 2.Структурна організація ендокринної системи. Поняття про APUD-систему, апудоцити.
- 3.Класифікація гормонів за характером дії, хімічною природою та місцем синтезу.
- 4.Характерні ознаки істинних гормонів та гормоноподібних речовин(гістогормонів). Різновиди ізокринної (місцевої) дії. Представники гормоноподібних речовин та їх біологічна роль.
- 5.Регуляція секреції гормонів. Каскадне посилення гормонального сигналу.
- 6.Типи комунікацій між клітинами та типи механізмів передачі регуляторного сигналу.

7. Механізм дії гормонів білково-пептидної природи та катехоламінів (через рецептори плазматичної мембрани): типи рецепторів плазматичної мембрани, їх будова; структура та роль G-білків-трансдукторів; каталітичної ділянки та вторинних посередників (месенджерів): цАМФ, цГМФ, кальцій-кальмодуліновий та фосфоінозитидні месенджери. Активні форми кисню та газу як месенджери клітинних сигналів.
8. Механізм дії гормонів ліпідної природи та тиреоїдних гормонів (через цитозольні рецептори).
9. Сигнальні системи апоптозу.
10. Гормональна регуляція метаболізму та фізіологічних функцій:
  - гормонами центральних регуляторних утворень ендокринної системи;
  - гормонами периферичних ендокринних залоз;
  - гормонами органів змішаних функцій (панкреатичної та статевих залоз).
11. Гормони як лікарські препарати.
12. Кров як біологічна рідина. Склад крові, плазма, сироватка крові. Види крові. Препарати крові як ліки.
13. Основні функції крові.
14. Основні фізико-хімічні константи крові, їх регуляція.
15. Хімічний склад крові: білки (фізіологічні та патологічні), небілковий залишковий азот крові, його клінічне значення, безазотисті органічні компоненти крові, електролітний склад крові.
16. Ферменти сироватки крові. Клінічне значення їх визначення.
17. Електролітний склад крові.
18. Імунохімія як наука, її значення в сучасній біології, медицині та фармації. Поняття про чужорідну інформацію. Імунітет: визначення, види імунітету. Імунодепресори та імуностимулятори.
19. Основні поняття в імунохімії: імуногени, антигени, гаптени, антигенні детермінанти.
20. Антитіла та імуноглобуліни, їх структура та характеристика.
21. Органи та Т- і В-системи імунітету. Неспецифічні фактори захисту, біохімічні механізми їх дії. Рецептори і маркери Т- і В-лімфоцитів.
22. Основи імунопатології: види та причини. Перспективи профілактики та лікування.
23. В чому полягає принцип методів визначення адреналіну, тироксину, 17-кетостероїдів?

## **РОЗДІЛ ІХ**

### **ФУНКЦІОНАЛЬНА БІОХІМІЯ ДЕЯКИХ ТКАНИН ТА ОРГАНІВ**

#### **А. Питання для підготовки з теоретичного матеріалу:**

1. Загальна характеристика та структура м'язів.
2. Хімічний склад м'язового волокна: білки м'язів, екстрактивні та мінеральні речовини.
3. Джерела енергії та енергопостачаючі процеси при м'язовому скороченні.
4. Синтез та біологічне значення креатину та креатинфосфату. Роль креатинфосфокінази (КФК).
5. Біохімічний механізм м'язового скорочення та розслаблення м'язового волокна, біохімія м'язової втомлюваності та тренування.
6. Особливості скоротливої функції кардіоміоцитів та гладеньких м'язів.
7. Біохімічні показники патології міокарду та скелетних м'язів. Фармацевтичні препарати, які використовуються при кардіопатіях та міопатіях.
8. Загальна характеристика та хімічний склад нервової тканини.
9. Особливості обміну речовин в мозковій тканині.
10. Хімічні основи синаптичної передачі, нейромедіатори.
11. Холінергічні та адренергічні синапси.
12. Медіатори та біологічна роль амінокислотних синапсів (серотонінових, гістамінових, ГАМК, гліцинових, тауринових)
13. Роль пептидних (опіатних) та бенздіазепінових рецепторів.
14. Спинномозкова рідина, діагностичне значення її дослідження.
15. Клініко-біохімічні показники патології головного мозку (менінгіт, енцефаліт, арахноїдит, пухлини).
16. Нейрохімічні механізми дії психотропних засобів.
17. Загальна характеристика, види, будова і біологічна роль сполучної тканини.
18. Характеристика клітинних елементів.
19. Фібронектин, його хімічна структура та біологічна роль.
20. Характеристика волокнистих структур. Хімічний склад та синтез колагену і еластину.
21. Характеристика та класифікація ферментів деградації колагену.
22. Міжклітинний матрикс, біологічна роль протеогліканів. Представники, будова та характеристика глікозаміногліканів.
23. Біохімічні показники патології сполучної тканини. Колагенози як аутоімунні захворювання. Рекомендовані фармпрепарати.
24. Найважливіші функції печінки в підтримці гомеостазу.
25. Біохімічні механізми знешкодження токсичних продуктів: уреогенез, реакції кон'югації та ін.
26. Клініко-біохімічні показники порушень функціонального стану печінки.
27. Будова та функції нирок. Кліренс.
28. Фізико-хімічні властивості та склад сечі в нормі та при патології.
29. Принципи методів визначення: креатиніну в сечі, церулоплазміну в сироватці крові, гідроксипроліну у сечі.

## Б. Література

- 1.Л.М.Вороніна та співавт. “Біологічна хімія”, Х., «Основа », 2000., С. 533-555.
- 2.Е.А.Строев. “Биологическая химия”, М., «Высшая школа» 1986., С. 423-433.
- 3.Ю.І.Губський. “Біологічна хімія”, К., 2000., С. 28, 29, 31, 40, 65-69, 234, 394, 409, 449-490.
- 4.Я.І.Гонський та співавтори ”Біохімія людини”, Тернопіль, ”Укрмедкнига”, 2002, С. 607-688.
- 5.Лекції, що читаються на кафедрі

## В. Опис лабораторних робіт

### **Робота 9.1. Якісне визначення креатиніну в сечі**

#### **а) Реакція Яффе**

**Принцип.** При підлученні і додаванні до сечі пікринової кислоти з'являється оранжово-червоне забарвлення, зумовлене утворенням червоного таутомеру пікрату креатиніну. Через кілька хвилин забарвлення посилюється і зберігається довгий час.

**Хід роботи.** В пробірку поміщають 1 мл досліджуваної сечі, додають 8 крапель 10% розчину натрій гідроксиду і 5-6 крапель насиченого розчину пікринової кислоти. З'являється оранжово-червоне забарвлення.

#### **б) Реакція Вайля**

**Принцип.** При підлученні та змішуванні сечі з декількома краплями свіжовиготовленого розчину натрій нітропрусиду рідина набуває червоного забарвлення, яке швидко переходить у жовте. Реакція зумовлена утворенням нестійкого ізонітрозокреатиніну. При підкисленні ацетатною кислотою червоне забарвлення одразу переходить у жовте. Остання обставина відрізняє реакцію на креатинін від аналогічної реакції на ацетон, при якій червоне забарвлення не зникає при підкисленні ацетатною кислотою, а стає більш темним, набуваючи вишневого відтінку.

**Хід роботи.** В пробірку наливають 1 мл досліджуваної сечі, додають 5-6 крапель 10% розчину натрій гідроксиду і 3-4 краплі свіжовиготовленого натрій нітропрусиду. Утворюється червоне забарвлення. Додавання 2-3 крапель концентрованої ацетатної кислоти викликає перехід червоного забарвлення в жовте.

### **Робота 9.2 Кількісне визначення креатиніну в сечі за методом Поппера**

**Принцип.** Метод базується на кольоровій реакції (реакція Яффе) креатиніну з пікриновою кислотою в лужному середовищі з подальшим визначенням інтенсивності забарвлення на ФЕК.

**Хід роботи.** В дві мірні пробірки наливають по 0,1 мл 10% натрій гідроксиду і 0,15 мл насиченого розчину пікринової кислоти. В дослідну пробірку додають 0,1 мл досліджуваної сечі, а в контрольну - 0,1 мл дистильованої води. Обидві пробірки збовтують і залишають на 5 хвилин для розвитку забарвлення. Потім вміст пробірок доводять дистильованою водою до

мітки 10 мл, старанно перемішують. Інтенсивність забарвлення дослідної пробірки заміряють на ФЕК супроти контролю при синьому світлофільтрі в кюветі товщиною 0,5см.

Показники оптичної густини, отримані при колориметруванні, переводять на кількість мМ креатиніну в 0,1мл сечі згідно запропонованої таблиці, складеної на основі колориметрування стандартних розчинів креатиніну і перераховують на діурез згідно з формулою:

$$X = \frac{A \cdot 1500}{0,1}, \text{ де:}$$

A- кількість мМ креатиніну, знайдена за калібрувальною таблицею;  
1500- добовий об'єм сечі, мл;  
0,1- об'єм сечі, взятий для дослідження.

Екстинкція	Концентрація креатиніну в мМ(в 0,1 мл сечі)
0,05	0,0007
0,10	0,0008
0,20	0,0010
0,30	0,0012
0,40	0,0013
0,50	0,0015
0,60	0,0017

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

У середньому за добу з сечею виділяється креатиніну у чоловіків 8,8-17,7 ммоль на добу (1-2г на добу), у жінок - 7,1-15,9 ммоль на добу (0,8-1,8г на добу). Збільшення виділення креатиніну спостерігають у разі надмірного вживання м'ясної їжі (екзогенний креатинін), розпаду білків протоплазми, внаслідок фізичного навантаження, при акромегалії, цукровому і нецукровому діабеті, інфекційних та інших захворюваннях (ендогенний креатинін). Виділення креатиніну значно зменшується при захворюваннях нирок, м'язовій дистрофії, гіпертиреозі, анемії, лейкемії, у людей похилого віку, хронічному нефриті з уремією (при цьому вміст його в крові збільшується). Креатинін, на відміну від багатьох інших низькомолекулярних речовин, не реабсорбується, тому за його екскрецією із сечею можна оцінювати стан клубочкової фільтрації.

### **Робота 9.3. Кількісне визначення вмісту креатину у сечі**

***Принцип.*** Креатин у сечі визначають тим же методом, що і креатинін, попередньо перетворивши креатин на креатинін у кислому середовищі під час нагрівання.

***Хід роботи.*** Беруть три пробірки: у першу пробірку відміряють 0,5 мл сечі (дослід), у другу – 0,5 мл стандартного розчину креатиніну, у третю – 0,5



мл дистильованої води (контроль). У всі три пробірки додають по 0,1 мл концентрованої хлоридної кислоти і ставлять їх на кип'ячу водяну баню на 3хв. Після охолодження у всі пробірки додають по 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти, ретельно перемішують, а потім додають по 0,2 мл 10% розчину натрій гідроксиду, перемішують вміст пробірок і залишають при кімнатній температурі на 10хв. Потім вміст пробірок кількісно переносять у мірні циліндри на 100 мл, тричі змиваючи пробірки дистильованою водою по 10 мл. Доводять об'єми циліндрів до позначки і перемішують скляними паличками. Вимірюють екстинкції проб дослідів і стандартного розчину проти контролю на ФЕК у кюветі на 10 мм при 500-540нм (зелений світлофільтр). Розраховують кількість креатиніну за формулою:

$$X = \frac{8,8 \text{ ммоль/л} \cdot E_{\text{досл}} \cdot V_{\text{доб.}}}{E_{\text{ст.}} \cdot V_{\text{досл.}}}, \text{ де:}$$

X – кількість креатиніну в добовій сечі, ммоль/л;

8,8 – концентрація стандартного розчину креатиніну, ммоль/л;

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

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

$E_{\text{ст.}}$  – екстинкція стандартної проби;

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

Креатинін є сумою креатину і власне креатиніну. Під час визначення кількості креатину знаходять різницю між показниками з дослідів 9.3. та дослідів 9.2. Цю різницю множать на 1,16 – коефіцієнт перерахунку відповідності рівня креатиніну кількості креатину, тобто це співвідношення молекулярних мас креатину і креатиніну (131:113=1,16).

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

Нормальна екскреція креатину із сечею становить у чоловіків 0 - 0,3 ммоль за добу, у жінок – 0 – 0,61 ммоль за добу. У сечі здорової людини під час нормального фізичного навантаження креатину, як правило, немає. Появу його в сечі (креатинурію) спостерігають у разі підвищеного м'язового навантаження, у період росту дітей (до 14-17 років), під час вагітності, у ранній післяпологовий період, під час вуглеводного і білкового голодування в осіб літнього віку, під час загоювання великих переломів, оперативних втручань. Креатинурію спостерігають при посиленому розпаді тканин (опіки, рак, туберкульоз), авітомінозі E, цукровому діабеті, паренхіматозному гепатиті.

#### **Робота 9.4. Якісна реакція на білки м'язів**

***Принцип.*** Наявність білка визначають біуретовою реакцією, обумовленою тим, що пептидні групи білка в лужному середовищі утворюють з міддю комплексні сполуки. Розчини, що містять білки, набувають фіолетового забарвлення.

***Хід роботи.*** Для отримання гомогенату 500 мг м'язової тканини розтирають в ступці з 10 мл дистильованої води на протязі 3-х хвилин. Беруть 2

пробірки, в одну вносять 0,5 мл дистильованої води (контроль), а в другу – 0,5мл гомогенату (дослід). В обидві пробірки доливають по 2 мл біуретового реактиву і залишають на 20 хвилин для розвитку забарвлення.

Фіолетове забарвлення в дослідній пробірці вказує на наявність білка в гомогенаті м'язової тканини.

### **Робота 9.5** Визначення активності церулоплазміну в сироватці крові за методом Ревіна (модифікація С.В.Бестужева, В.Г.Колб)

**Принцип.** Метод базується на окисленні парафенілендіаміну церулоплазміном з утворенням кольорової сполуки, інтенсивність забарвлення якої пропорційна активності ферменту.

**Хід роботи.** Беруть дві пробірки : у першу пробірку (дослід) наливають 0,1 мл сироватки донорської крові, додають 8 мл ацетатного буферу та 1 мл розчину парафенілендіаміну (субстрат); у другу пробірку (контроль) наливають 2 мл розчину натрій фториду (інгібітор), додають 0,1 мл сироватки донорської крові, 8 мл ацетатного буфера та 1 мл розчину парафенілендіаміну. Обидві пробірки витримують в термостаті протягом 60 хвилин при температурі 37°C. Пробірки виймають з термостату і у першу пробірку додають 2 мл натрій фториду (в обох пробірках загальні об'єми рівні). Пробірки охолоджують і вимірюють екстинкції досліду проти контролю на ФЕК у кюветі 10мм при 530нм (зелений світлофільтр).

#### **Розрахунок:**

$$C = E_{\text{досл.}} \cdot 875(\text{мг/л}), \text{ де:}$$

C – маса церулоплазміну;

$E_{\text{досл.}}$  – показник екстинкції досліду;

875 – коефіцієнт перерахунку.

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

У нормі церулоплазміну у сироватці крові міститься 300 – 380 мг/л. Гіпоцерулоплазмінемію спостерігають при гепатоцеребральній дистрофії (хвороба Коновалова-Вільсона), важкому гепатиті, синдромі Менкеса (хвороба кучерявого волосся), захворюваннях нирок (протеїнурія), нефротичному синдромі, ремісії лейкозу, деяких залізодефіцитних анеміях, гастроентериті, опіках, цукровому діабеті, токсикозі вагітних, первинному біліарному цирозі печінки, у разі дефіциту міді у продуктах або порушення її засвоєння організмом. Її часто виявляють у новонароджених. Гіперцерулоплазмінемія виникає при хронічних запальних процесах, у гострий період інфекції, при злоякісних пухлинах та метастазах, лейкозі, меланомі, лімфогранулематозі, пелагрі, туберкульозі легенів, таласемії, ревматизмі, інфаркті міокарду, гіпотиреозі, гіперпаратиреозі, цирозі печінки, холестази, шизофренії, в III триместрі вагітності, у жінок, які приймають естрогеновмісні контрацептиви. Особливо підвищується вміст церулоплазміну при шизофренії, при сифілітичному ураженні нервової системи (у 2-3 рази). Існує пряма залежність між його вмістом в крові та розміром вогнища інфаркту міокарду.

## **Робота 9.6. Якісна реакція на ацетилхолін**

**Принцип.** Ацетилхолін містить четвертинний атом нітрогену і проявляє властивості сильних органічних основ (саме це обумовлює його біологічну активність). В зв'язку з цим четвертинний нітроген здатний зв'язувати барвники (бромтимоловий синій, бромфеноловий синій), що несуть від'ємний заряд, за рахунок сульфогруп. Гідрофобний комплекс, що утворився, екстрагується органічними розчинниками.

**Хід роботи.** До 1 мл (16 крапель) 0,5% розчину ацетилхоліну доливають 10 крапель 0,1% розчину бромтимолового синього з рН=8,0, доливають 2 мл хлороформу і змішують на протязі 30 секунд. При наявності ацетилхоліну хлороформний шар забарвлюється в інтенсивно жовтий колір.

## **Робота 9.7 Кількісне визначення вмісту гідроксипроліну (оксипроліну) у сечі**

**Принцип.** Метод полягає в окисленні гідроксипроліну гідроген пероксидом до піролу в лужному середовищі при наявності іонів купруму. Пірол утворює рожеве забарвлення з парадиметиламінобензальдегідом у кислому середовищі. Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна концентрації гідроксипроліну.

**Хід роботи.** Беруть три пробірки: в першу наливають 1 мл профільтрованої сечі (дослід), в другу 2 – 1 мл стандартного розчину гідроксипроліну, у третю – 3 мл дистильованої води (контроль). У три пробірки додають по 1 мл 0,05М розчину купрум(II) сульфату, по 1 мл 2,5М розчину натрій гідроксиду, по 1 мл 6% розчину гідроген пероксиду. Проби перемішують протягом 10хв. і кип'ятять на водяній бані для видалення надлишку гідроген пероксиду. Потім пробірки охолоджують, додають по 4 мл розчину сульфатної кислоти з  $C_H=3$ моль/л і по 2 мл реактиву Ерліха. Знову кип'ятять 5хв. на водяній бані, охолоджують та колориметрують (дослідну пробу та пробу з стандартним розчином) на ФЕК при 500-560нм (зелений світлофільтр) проти контролю у кюветах на 10 мм. Розраховують кількість гідроксипроліну за формулою:

$$X = \frac{C_{ст.} \cdot E_{досл.} \cdot V_{доб.}}{E_{ст.} \cdot V_{досл.}}, \text{ де:}$$

X – маса гідроксипроліну у добовій сечі, мг на добу;

$C_{ст.}$  – концентрація стандартного розчину гідроксипроліну;

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

$E_{ст.}$  – екстинкція стандартної проби;

$V_{доб.}$  – добовий об'єм сечі;

$V_{досл.}$  – об'єм сечі, взятої для аналізу, мл.

Для перерахунку в одиниці СІ (мкмоль за добу), отриманий результат перемножують на коефіцієнт 7,626.

## **Клініко-діагностичне значення**

Гідроксипролін – це амінокислота білків сполучної тканини. У колагені її міститься 12-14 %, а в еластині – 1-2 %. Вміст гідроксипроліну в крові та сечі характеризує інтенсивність катаболізму колагену та швидкість обміну цієї амінокислоти. Гідроксипролін може перебувати у зв'язаному вигляді з білками, пептидами, а також у вільному стані як у сироватці крові, так і в сечі. У нормі у людини віком 10-20 років виділяється із сечею 422 – 610 мкмоль за добу, а у людей віком понад 20 років – 125-209 мкмоль за добу. Різко збільшується кількість гідроксипроліну при колагенозах (ревматизм, ревматоїдний артрит, системна склеродермія, дерматоміозит), при гіперпаратиреоїдизмі, хворобі Педжета (до 1 г за добу). Ще більше виділяється гідроксипроліну при спадковій гіпергідроксипролінемії, що спричинено дефектом ферменту гідроксипро-ліноксидази, в результаті чого і порушується обмін гідроксипроліну. Синтез колагену посилюється у період загоєння ран, рубцювання

### **Робота 9.8. Якісна реакція на глікозаміноглікани (проба Беррі-Спіланджера)**

**Принцип.** У сечі здорової людини виділяється 2,7-7,5 мг за добу кислих глікозаміногліканів (в основному хондроїтин-сульфати А і С). При гаргоїлізмі й синдромі Гюнтера підвищується виділення глікозаміногліканів із сечею (мукополісахаридурія) до 30-80 мг.

Глікозаміноглікани з толуїдиновим синім у кислому середовищі дають червоне забарвлення (метахромазія).

**Хід роботи.** На смужку фільтрувального паперу на відстані 1 см один від одного наносять мікропіпеткою 0,005, 0,01 і 0,025 мл сечі, висушують папір при кімнатній температурі, а потім занурюють його в 0,04% розчин толуїдинового синього на 1 хв. Виймають смужку паперу і відмивають реактив 10% розчином ацетатної кислоти. Якщо концентрація глікозаміногліканів у досліджуваній сечі вища ніж 10мг/100мл, тоді з'являється червоне забарвлення на одній з нанесених плям. Негативну реакцію відмічають у здорової дитини на другий тиждень життя. Позитивна проба характерна для гаргоїлізму.

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

З сечею здорової людини виділяється 2,7-7,5мг на добу кислих глікозаміногліканів (в основному хондроїтинсульфати А і С). При гаргоїлізмі і синдромі Гюнтера підвищується виділення глікозаміногліканів із сечею (мукополісахаридурію) до 30-80 мг на добу.

### **Робота 9.9. Фізико-хімічні властивості сечі**

#### **Робота 9.9.1. Кількість сечі**

Виділення сечі за певний проміжок часу (за день, ніч або за добу) називають діурезом.

Об'єм сечі вимірюють мірним циліндром за нижнім меніском.

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

В нормі доросла людина за добу виділяє в середньому 1100—1800 мл сечі. Відхилення від норми називають поліурією, олігурією й анурією.

Поліурія — збільшене виділення сечі (понад 2000 мл) — може бути фізіологічною (за рахунок вживання великої кількості рідини або внаслідок нервового збудження) і патологічною (при цукровому і нецукровому діабеті, захворюваннях нирок, внаслідок приймання сечогінних і серцевих лікарських засобів).

Олігурія — зменшене виділення сечі (600 мл і менше) — може бути фізіологічною (внаслідок обмеженого вживання рідини, втрати рідини з потом) і патологічною (при запаленні нирок, частих проносах, гарячці, блювоті, вадах серця).

Анурія — повне припинення виділення сечі — часто спостерігається при закупорці сечоводів (нирковий камінь, пухлина). Таку анурію називають несправжньою. Справжня анурія виникає при порушенні сечовидільної функції нирок (гостра ниркова недостатність, важкі форми гострого гломерулонефриту, отруєння ртуттю (меркурієм), свинцем (плюмбумом).

Ніктурія — збільшення виділення сечі вночі. Зустрічається при початкових формах серцевої декомпенсації, цистопієлітах.

### **Робота 9.9.2. Питома вага**

В циліндр наливають сечу, занурюють в неї урометр і по нижньому меніску шкали відмічають результат. В нормі питома вага сечі (густина, щільність) дорівнює 1,014 – 1,025. За густиною можна вирахувати щільний залишок, перемноживши дві останні цифри на на коефіцієнт 2,6. В середньому він дорівнює близько 50г за добу.

Густина сечі характеризує концентраційну здатність нирок, тобто концентрацію речовин, що в ній розчинені. Густина протягом доби може змінюватись: нічна сеча має більшу густину ніж денна. Зміни залежать як від кількості спожитої рідини, так і від кількості рідини, виділеної з потом і калом (блювота, проноси, гарячка).

При нецукровому діабеті густина сечі зменшується і коливається від 1,001 до 1,004, а при цукровому – досягає 1,030 – 1,040 і більше. Протеїнурія також збільшує густину сечі.

Виділення протягом тривалого часу сечі зі стабільною густиною (1,010-1,011) називають ізостенурією (хвороби нирок).

### **Робота 9.9.3. Колір сечі**

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

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

В нормі колір сечі дорослої людини солом'яно-жовтий завдяки таким пігментам як урохром, уробілін, уроеритрин тощо. У новонароджених сеча майже безбарвна.

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

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

Червоний колір сечі спостерігають при порфіринурії. Розрізняють первинну порфіринурію, що виникає внаслідок ензимопатії, наприклад, спадкова хвороба Гунтера, при якій із сечею виділяється багато уропорфіринів і копропорфіринів I типу, та вторинну, яка виникає при інтоксикаціях з подальшим ураженням печінки.

У разі поліурії (нефросклероз, нецукровий і цукровий діабет, швидке розсмоктування набряків, тощо) відмічається слабке забарвлення сечі. Інтенсивне забарвлення спостерігають при олігурії або посиленому виділенні пігментів, зокрема білірубіну (механічна та паренхіматозна жовтяниці). Внаслідок вживання буряків, моркви, суниць сеча забарвлюється різними пігментами, що містяться в цих продуктах.

Молочно-білий колір сечі спостерігають при хілурії внаслідок розриву лімфатичних капілярів нирки, за наявності великого вмісту ліпідів, фосфатів і домішок гною.

#### **Робота 9.9.4. Запах сечі**

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

#### **Робота 9.9.5. Прозорість сечі**

Прозорість сечі визначають у склянці з безбарвного скла після збовтування. У нормі свіжа сеча завжди прозора. З часом у ній починається лужне бродіння, і сеча стає каламутною. Розрізняють сечу прозору, слабокаламутну, каламутнувату і різко каламутну.

Причиною каламутності різної інтенсивності може бути наявність у сечі солей (у лужній сечі фосфатів, а в кислій уратів), слизу, клітинних елементів і бактеріальної флори (цистопієліт). Дуже рідко каламутність спричинюють жири (при переломах великих кісток). Щоб відрізнити патологічну каламутність (осад) сечі від звичайної сольової, треба провести відповідні хімічні і мікроскопічні дослідження.

### **Робота 9.9.6. Хімічне дослідження організованих осадів та їх відмінність від неорганізованих**

Усі елементи сечових осадів поділяють на дві великі групи: організовані й неорганізовані.

Неорганізований осад складається із солей і кристалічних утворень, що наявні як у нормальній, так і в патологічній сечі. Солі осаду різноманітні залежно від реакції сечі.

До неорганізованих елементів осаду в кислій сечі належать аморфні урати, сечова кислота, оксалати, у лужній — аморфні фосфати, трипель-фосфати, амонію урати.

До організованих елементів осаду сечі належать усі клітинні елементи: еритроцити, лейкоцити, епітеліальні клітини (плоскі, циліндричні й круглі).

**Хід роботи.** У 2 пробірки наливають по 5 мл сечі і додають у першу пробірку 1 мл 10 % ацетатної кислоти, а в другу — 1 мл 5 % натрій гідроксиду і нагрівають.

Неорганізовані осадки (фосфати, карбонати, оксалати) розчиняються у кислотах, а урати — в основах. Якщо в лужному середовищі каламуть не зникає навіть після додавання 3—5 крапель концентрованого розчину натрію гідроксиду, тоді вона зумовлена наявністю клітинних елементів (епітелій, лейкоцити, еритроцити, слиз).

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

### **Робота 9.9.7. Реакція сечі. Визначення рН сечі за допомогою індикаторного паперу**

**Хід роботи.** На середину індикаторного папірця "Рифан" наносять 1—2 краплі свіжої сечі й за зміною забарвлення смужки, яка співпадає з кольором контрольної, визначають рН сечі. Більш точно визначають рН сечі потенціометричним методом.

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

Реакція сечі (рН) у здорової людини коливається в нормі від 4,5 до 8. На реакцію може впливати характер їжі та патології. Наприклад, лужну реакцію сечі спостерігають при блювоті, фосфатурії, запаленні сечового міхура (цистит) і ниркових мисок (в останніх двох випадках бактеріальна флора розкладає сечовину на аміак), під час вагітності, вживанні лужних мінеральних вод. Більш кисла реакція сечі буває при цукровому діабеті та в період голодування (внаслідок нагромадження у сечі кетонових тіл), при важкій нирковій недостатності внаслідок порушення функції нирок і зменшення вмісту аміаку, що нейтралізує сечу. Дуже кислу реакцію спостерігають при подагрі й гарячці.

### **Робота 9.10. Титраційна кислотність сечі**

**Хід роботи.** В колбочку наливають 2 мл сечі, 10 мл води, 2 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1 М р-ном натрій гідроксиду до рожевого забарвлення. Титраційну кислотність виражають об'ємом лугу, необхідного для нейтралізації добової кількості сечі. В нормі вона дорівнює 250-500.

### **Робота 9.11. Визначення азоту амінокислот в сечі**

**Хід роботи.** До нейтралізованої сечі (див. попередню роботу) доливають 3 мл формолової суміші і знову титрують лугом до рожевого забарвлення. Розраховують азот амінокислот, виходячи з того, що 1 мл натрій гідроксиду відповідає 0,0014 г азоту. Норма азоту амінокислот в добовій сечі дорівнює 0,3-0,5 г.

### **Робота 9.12. Виявлення білка в сечі сульфосаліциловою пробою**

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

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

### **Робота 9.13. Виявлення цукру в сечі**

**Принципи** методів якісного виявлення цукру в сечі описані в розділі УІ "Хімія та обмін вуглеводів".

**Хід роботи.** Реакції здійснюють після видалення білка із сечі, тому що він заважає (має редуруючі властивості) виявленню цукру. Для цього до 10—15 мл сечі додають 5—6 крапель 10 % ацетатної кислоти і кип'ятять, а потім осад відфільтровують. У фільтраті сечі може бути в основному глюкоза або лактоза. Ці вуглеводи відновлюють оксиди важких металів у лужному середовищі, а в слабкокислому середовищі відновлює тільки глюкоза. Розрізнити їх можна за бродінням: глюкоза бродить, а лактоза — ні.

#### **1. Проба Фелінга**

**Хід роботи.** У пробірку вміщують по 10 крапель розчину Фелінга (купрум сульфату) і лужного розчину сегнетової солі), перемішують, додають 20 крапель сечі, нагрівають до кипіння. За наявності глюкози в сечі випадає жовтий або червоний осад.

#### **2. Проба Барфуда**

**Хід роботи.** До 2 мл сечі додають 1 мл реактиву Барфуда (купрум ацетат розчинений в ацетатній кислоті) і нагрівають на водяній бані протягом 5 хв. За наявності глюкози з'являється осад купрум(І)оксиду.

Ця окисно-відновна реакція відрізняється від інших (Троммера, Ніландера, Фелінга, Бенедикта, реакції срібного дзеркала) тим, що окиснення моносахаридів відбувається не в лужному середовищі, а в близькому до нейтрального. У цих умовах дисахариди, що мають відновні властивості (на



відміну від моносахаридів) не окиснюються. Проба Барфуда з лактозою негативна.

#### **Робота 9.14. Виявлення крові (бензидинова проба)**

**Хід роботи.** До 3 мл сечі додають 2—3 краплі 3 % розчину гідроген пероксиду і 2—3 краплі розчину бензидину в ацетатній кислоті. За наявності крові з'являється синьо-зелене забарвлення.

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

Сеча при гематурії каламутна і має червоний відтінок, інтенсивність якого залежить від кількості формених елементів крові. В осаді під мікроскопом виявляють еритроцити і лейкоцити. Гемоглобінурію спостерігають при захворюваннях, пов'язаних із гемолізом (розпадом) еритроцитів. Сеча при цьому буває червоного або кавово-бурого кольору. При гематурії і гемоглобінурії в сечі міститься білок.

#### **Робота 9.15. Виявлення жовчних кислот (проба Петтенкофера)**

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

**Хід роботи.** У пробірку наливають 2—3 мл сечі, додають 2 краплі 10 % розчину сахарози, суміш струшують. Потім обережно по стінці пробірки нашаровують 1—2 мл сульфатної кислоти. За наявності жовчних кислот з'являється яскраво-червоне забарвлення на межі двох рідин.

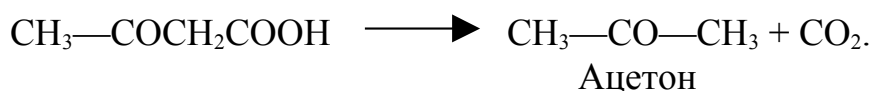
##### **Клініко-діагностичне значення**

При механічній жовтяниці внаслідок закупорки загальної жовчної протоки каменем або пухлиною жовчні капіляри переповнюються жовчю, гепатоцити стискаються і жовч проникає в кров. У цьому випадку відбувається посилене виділення жовчних пігментів (білірубін, білівердин) і жовчних кислот із сечею.

#### **Робота 9.16. Виявлення кетонових тіл (проба Герхарда)**

**Принцип** ґрунтується на здатності ацетоацетату утворювати з ферум(III)хлоридом сполуку, забарвлену в червоний колір.

**Хід роботи.** До 5 мл сечі додають по краплях 10 % розчин ферум(III)хлориду; випадає в осад ферум фосфат. За наявності ацетоацетату після додавання зайвої краплі ферум(III)хлориду з'являється червоне забарвлення (реакція на еноли), яке поступово зникає в результаті самовільного декарбоксілювання ацетоацетатної кислоти:



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

У нормі за добу виділяється 20—40 мг кетонових тіл. Збільшення кількості кетонових тіл у крові (кетонемія) і сечі (кетонурія) спостерігають при цукровому діабеті, дефіциті вуглеводів у харчуванні (вуглеводне голодування), тиреотоксикозі, ураженні печінки, важких інтоксикаціях тощо.

### **Робота 9.17. Виявлення жовчних пігментів (проба Гмеліна)**

**Принцип:** Жовчні пігменти здатні окиснюватись концентрованою нітратною кислотою з утворенням забарвлених у різні кольори продуктів окиснення: білівердину (зелений колір), біліціаніну (синій колір), холелетину (жовчний колір) тощо.

#### **Робота 9.17.1.. Проба в пробірці.**

**Хід роботи.** В пробірку наливають 1-2 мл концентрованої нітратної кислоти. По стінці обережно нашаровують рівний об'єм сечі. За наявності жовчних пігментів на межі рідин з'являються кольорові кільця. Наявність зеленого, фіолетового, червоного і жовтого кілець у вказаній послідовності відповідає різним ступеням окиснення пігменту.

#### **Робота 9.17.2. Проба на фільтрувальному папері (проба Розенбаха)**

**Хід роботи.** 2 мл сечі кілька разів фільтрують. За наявності жовчних пігментів у сечі вони частково затримуються на фільтрі. В центрі фільтра, розгорнутого на предметному склі й злегка підсушеного, скляною паличкою наносять краплю концентрованої нітратної кислоти. З'являються характерні кольорові кільця, зелене кільце розташовано ззовні.

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

Жовчні пігменти — білірубін, білівердин і уробілін (мезобіліноген) — з'являються у сечі лише при патології. Поява білірубину (прямого) у сечі має назву білірубінурії. Білірубінурію спостерігають при ураженнях печінки і жовчовивідних шляхів. Таке явище найчастіше спостерігають при паренхіматозній (хвороба Боткіна) та механічній жовтяниці, й вона є ознакою важкого органічного ураження паренхіми печінки (гепатит, цироз), при гемолітичних станах та захворюваннях кишок (ентерит, кишкова непрохідність, схильність до закріпів).

Сеча за наявності вказаних жовчних пігментів набуває темного кольору (кольору пива).

## ОСНОВНІ БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ

Показники	Об'єкт досліджень	Вміст речовини	
		Система Сі	Традиційна система
1	2	3	4
<b>1. Кров – неорганічні речовини</b>			
Водневий показник	• Кров .	7,36-7,42    7,26-7,36	
Ферум	Плазма	12-32 мкмоль/л	65-175 мкг/100
Калій		3,4-5,3 ммоль/л	13,6-20,8
Кальцій	Сироватка	2,3-2,75 ммоль/л	9-11 мг/100 мл
Магній		0,7-1,7 ммоль/л	1,7-2,8 мг/100мл
Купрум		11- 24,4 ммоль/л	30-150 мкг/100мл
Натрій	Плазма	130-157 ммоль/л	300-360 мг/100мл
Фосфор неорганічний		1-2 ммоль/л	3-6 мг/100 мл
Хлориди		86-103 ммоль/л	580-600 мг/100мл
Хлор		97-108 ммоль/л	340-380 мг/100мл
<b>2. Кров – білки</b>			
Білок	Кров	200 г/л	20 г/100мл
Білок загальний	Сироватка	65-85 г/л	6-8 г/100 мл
Альбуміни		35-50 г/л	4-5 г/100 мл
Глобуліни		23-35 г/л	2-3 г/100 мл
Фібриноген	Плазма	2-4 г/л	0,2-0,4 г/100 мл
Білковий альбуміново-глобуліновий коефіцієнт А/Г)	Сироватка	1,5-2,3 /'	
Імуноглобуліни G	Плазма	50-112,5 мкмоль/л	800-1800 мг/100 мл
Імуноглобуліни M	Плазма	0,62-2,5 мкмоль/л	60-250 мг/100 мл
Імуноглобуліни A		5,62-28,12	90-450 мг/100 мл
Імуноглобуліни E		0,30-30 мкмоль/л	0,006-0,6 мг/100 мл
Гемоглобін	Кров У чоловік. у жінок	132-164 г/л 115-145 г/л	13-16 г/100 мл 12-14 г/100 мл

Аланін-амінотрансфераза (АЛТ)	Сироватка	28-190 нмоль/с/л	0,1-0,68 мкмоль /година/л
Аспартат-амінотрансфераза (АСТ)	-...-	28-125 нмоль/с/л	0,1-0,45 мкмоль/година/л
Фосфатаза кисла		67-167 нмоль/с/л	4-10 мкмоль /хв./л
Фосфатаза лужна		278-830 нмоль/с/л	0,5-1,3 мкмоль /година/мл
Холінестераза		45-95 мкмоль /с/л	160-340 мкмоль /година/мл

### 3. Кров – небілкові азотовмісні речовини

Залишковий азот	Кров	14,3-28,5 ммоль/л	20-40 мг/100 мл
Аміак	-...-	20-50 мкмоль/л	30-80 мкг/100 мл
Креатин	Сироватка	0,076-0,804 ммоль/л	0,2-1 мг/100 мл
Креатинін	-...-	0,044-0,132 ммоль/л	0,5-1,5 мг/100 мл
Сечовина	-...-	2,5-8,3	15-50 мг/100 мл
Сечова кислота	-...-	0,24-0,5 ммоль/л	4,4-8,5 мг/100 мл
Білірубін загальний	-...-	8,5-20,5 мкмоль/л	0,5-1,2 мг/100 мл
Білірубін прямий (зв'язаний)	-...-	2,05-5,1 мкмоль/л	0,12-0,3 мг/100 мл
Білірубін непрямий	-...-	6,5-15,4 мкмоль/л	0,38-0,9 мг/100 мл

### 4. Кров – вуглеводи та їх метаболіти

Глюкоза (глюкозооксидазним методом)	Сироватка	3,3-5,5 ммоль/л	55-100 мг/100 мл
Глюкоза (орто-толуїдиновим методом)		3-6,1 ммоль/л	60-110 мг/100 мл

"Цукор"– загальна кількість відновлюючих речовин у перерахунку на глюкозу (методом Хагедорна- Іенсена)		4,4-6,6 ммоль/л або 0,8-1,2 г/л	80-120 мг/100 мл
Лактат		0,5- 2,0ммоль/л	
Піруват		0,1ммоль/л	
<b>5.Кров - ліпіди та їх метаболіти</b>			
Ліпіди	Кров	3,5г/л	350-800 мг /100мл
Холестерол загальний	-...-	3,9-6,5 ммоль/л	150-250 мг/100мл
Холестерол ефірно- зв'язаний	-...-	2/3 від загального	
Тригліцери- ди	-...-	0,5-1,3 ммоль/л	350 мг/100 мл
Кетонові тіла	-...-	0,034-0,43 ммоль/л	0,5-1,5 мг/100 мл
$\alpha$ - ліпопротеї- ни (ЛПВЩ)	Плазма	1,25-6,5 г/л	
$\beta$ - ліпопротеї- ни (ЛПНЩ)	-...-	3-4,5г/л	
Пре- $\beta$ - ліпопротеї- ни (ЛПДНЩ)	-...-	0,8-1,5г/л	
<b>6.Кров - вітаміни</b>			
Віт.А	сироватк а	0,5-2 мкмоль/л	80-120 мг/100 мл
Віт.С	-...-	30-90 мкмоль/л	0,5-1,5 мг/100 мл
<b>7.Кров - гормони</b>			
Гормон роста	сироват ка	46-465 пмоль/л	
Адреналін	плазма	до 0,55 нмоль/л	
Альдостерон	плазма	56- 250 пмоль/л	

Кортизол	сироватка	0,14-0,55 мкмоль/л	
Інсулін	сироватка	29-181 пмоль/л	
Хоріонічний гонадотропін	сироватка	Ч <9МО/л Ж >10МО/л	
Тестостерон вільний	сироватка	0,35-1,5 нмоль/л	
Кальцітонін	сироватка	< 29,2 пмоль/л	
Тироксин	сироватка	65-156 нмоль/л	
<b>8. Сеча (добовий об`єм 1,2-1,5 л)</b>			
Сухий залишок		47-65 г/доб	47-65 г/доб
Відносна густина		1,016-1,022	
Калій		30 ммоль/добу	30 мекв/л
Натрій		130 ммоль/добу	130 мекв/л
Хлор		150-260 ммоль/добу	5-11 г/добу
Уробіліноген		0-4,23 мкмоль/добу	
Δ-Амінолеву- лінова кислота		11,4-57,2 мкмоль/добу	
Копропорфі- рини		<345 нмоль/добу	
Уропорфірин		<60 нмоль/добу	
Сечова кислота		1,2-7,1 ммоль/добу	0,3-1,2 г/добу
Сечовина		330-580 ммоль/доб	20-35 г/добу
Креатинін		4,4-17,6 ммоль/добу	0,5-2 г/добу
Кетоніві тіла		344,3-860,8 ммоль/добу	20-50 мг/добу
17- кетостероїди у чоловіків		22,88-81,12 мкмоль/доб	6,6-23,4 мг/добу
у жінок		22,19-68,09 мкмоль/доб	

Альдостерон		5,5-72 нмоль/добу	
Кортизол		0,55-2,76 мкмоль/добу	
Адреналін		< 55 нмоль/добу	
Норадреналін		<591 нмоль/добу	
Амілаза		44 мг/с/л	16-64 ОД
Індикан		0,047-0,056 ммоль/доб	0,010-0,013 г/добу

<b>9. Шлунковий сік</b>			
Загальна кислотність		40-60 ммоль/л	40-60 тит.од.
Вільна НСІ		20-40 ммоль/л	20-40 тит.од.
Зв'язана НСІ		10-15 ммоль/л	15-20 тит.од.
рН		1,5-2	1,5-2

<b>Зміст</b>	<b>Сторінки</b>
<i>Передмова</i>	3
<i>Загальні відомості</i>	3-4
<i>Техніка безпеки</i>	4-5
<i>Список навчальної літератури</i>	5
<i>Методи біохімічних досліджень</i>	6-12
<i>Розділ I. Хімія амінокислот та простих білків</i>	13-25
<i>Розділ II. Ферменти . Коферменти. Вітаміни</i>	26-38
<i>Розділ III. Біологічне окислення</i>	39-47
<i>    Метаболізм ксенобіотиків та мікосомальне окиснення</i>	
<i>Розділ IV. Обмін амінокислот та простих білків</i>	48-58
<i>Розділ V. Складні білки. Нуклеїнові кислоти.</i>	
<i>    Етапи передачі генетичної інформації</i>	59-70
<i>Розділ VI. Хімія та обмін вуглеводів</i>	71-84
<i>Розділ VII. Хімія та обмін ліпідів</i>	85-94
<i>Розділ VIII. Гормони та інші сигнальні молекули.</i>	95-103
<i>    Біохімія крові Імунохімія</i>	
<i>Розділ IX. Функціональна біохімія деяких тканин та органів</i>	104-117
<i>Основні біохімічні показники організму людини</i>	118-122