

РОЗДІЛ 1

БІОХІМІЯ ЯК НАУКА. БУДОВА І ВЛАСТИВОСТІ ЕНЗИМІВ. МЕДИЧНА ЕНЗИМОЛОГІЯ

Тема № 1

Предмет і завдання біохімії. Мета і методи проведення біохімічних досліджень, їх обґрунтування і клініко-діагностичне значення

Мета заняття. Студентам потрібно знати фізико-хімічні методи досліджень діагностично важливих речовин, а також розуміти принципи роботи лабораторної апаратури, яку використовують у біохімічних дослідженнях. З метою правильної оцінки біохімічних показників потрібно знати фактори, дія яких призводить до похибки під час лабораторних досліджень. Виконання практичної роботи передбачає знання предмету і завдань біологічної хімії, методів біологічних досліджень, які використовуються в клінічній практиці.

Актуальність теми. Біохімічні показники залишаються найважливішими для діагностики, лікування та профілактики захворювань. У біохімічних дослідженнях використовуються сучасні хімічні, фізико-хімічні, фізичні та математичні методи. Знання основ біохімії – науки, яка вивчає хімічний склад живих організмів, будову, властивості, локалізацію та роль наявних у них сполук, шляхи їх синтезу, перетворень і катаболізму, які в сукупності представляють собою метаболізм організму, обмін речовин і перетворення енергії, дає можливість розв'язання основних питань природознавства і медицини, зокрема, проблем впливу на синтез білків, нуклеїнових кислот, лікування спадкових захворювань, здорового довголіття.

Теоретичні питання

1. Предмет і завдання біохімії. Основні напрямки і розділи біохімії: статична, динамічна, функціональна біохімія, медична та клінічна біохімія.
2. Біохімія як фундаментальна медико-біологічна наука. Історія розвитку, наукові біохімічні школи, значення в системі вищої медичної освіти.
3. Хімічний склад живого організму. Біомолекули (білки, вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти, гормони, вітаміни тощо), їх біохімічні функції. Характерні риси живої матерії: обмін речовин та енергії, їх зв'язок із зовнішнім середовищем.
4. Структурні елементи прокариотичних та еукариотичних клітин. Основні функції субклітинних органел, їх фракційне розділення методом ультрацентрифугування.
5. Принципи основних методів біохімічних досліджень: осадження речовин з розчину, висолування білків; оптичні методи в біохімії (фотоелектроколометрія, спектрометрія, спектрофотометрія, люмінісцентний аналіз, флюоресцентна гібридизація *in situ*); електрофорез (горизонтальний, диск-електрофорез, ізоелектричне фокусування, імуноелектрофорез); хроматографія (афінна, йонообмінна, тонкошарова, газова, ексклюзійна або витісна); полярографія; манометричний та радіоізотопний методи; імуноферментні методи; блотинги; полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).
6. Методи таргетної доставки ліків за допомогою наночастинок. Нанотехнології в біохімії.
7. Інформативність імуноферментних досліджень (ІФА) і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в діагностиці інфекційних захворювань (СНІД, SARS-CoV-2 тощо).
8. Мета проведення біохімічних лабораторних досліджень і критерії оцінки використаних методів лабораторних досліджень.
9. Матеріал для лабораторних діагностичних досліджень, принципи забору та збереження матеріалу для лабораторних досліджень.
10. Характеристика помилок, що мають місце під час проведення лабораторних досліджень.

Завдання

Виконати практичну роботу «Визначення оптичної густини розчинів, які містять різну кількість фосфату».

Клініко-діагностичне значення. Кожна забарвлена речовина має унікальний спектр поглинання з максимумом при певній довжині хвилі. Тому концентрації розчинів різних речовин визначають за показниками оптичної густини, які вимірюють при довжині хвилі, що відповідає максимуму поглинання відповідних речовин.

Для наукових досліджень фотоелектроколориметрія застосовується при визначенні активності ферментів і метаболітів сироватки крові, загальної антиоксидантної активності плазми крові та еритроцитів, гідропероксидів ліпідів плазми крові, серомукоїдів сироватки крові тощо. У клінічній практиці цей метод використовують для кількісного визначення пірвіноградної кислоти й холестеролу, гаптоглобіну, сечовини, сіалових кислот, тріацилгліцеролів крові, активності ферментів (креатинкінази, лужної та кислій фосфатаз, супероксиддисмутази) тощо.

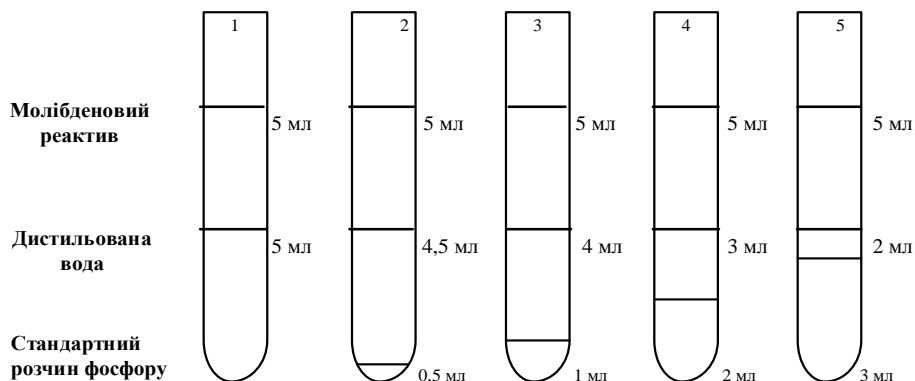


Принцип методу. У розчині сульфатної кислоти фосфати утворюють комплекси з молібдатами, які перетворюються у молібденову синь під час відновлення. Кількість фосфатів визначають колориметрично, вимірюючи інтенсивність забарвлення розчину, який досліджують.

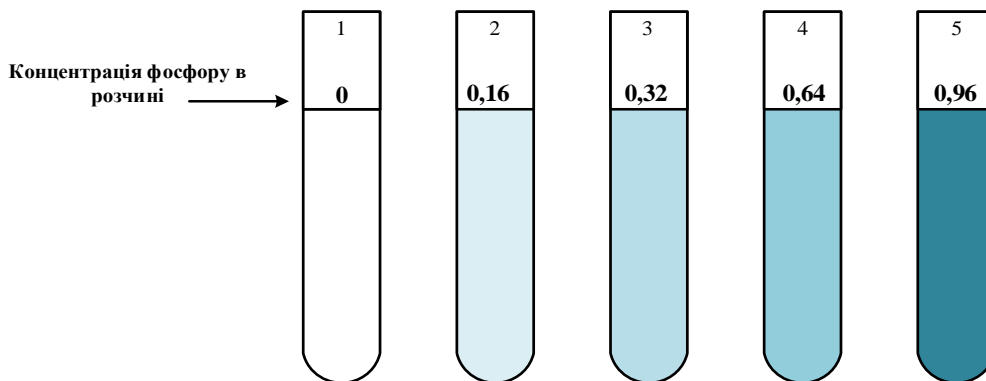
Матеріальне забезпечення: пробірки, піпетки, фотоелектроколориметр (ФЕК), стандартний розчин фосфору 0,32 мМ, молібденовий реактив.

Хід роботи. У п'ять пробірок додають розчини в кількостях, наведених нижче в таблиці:

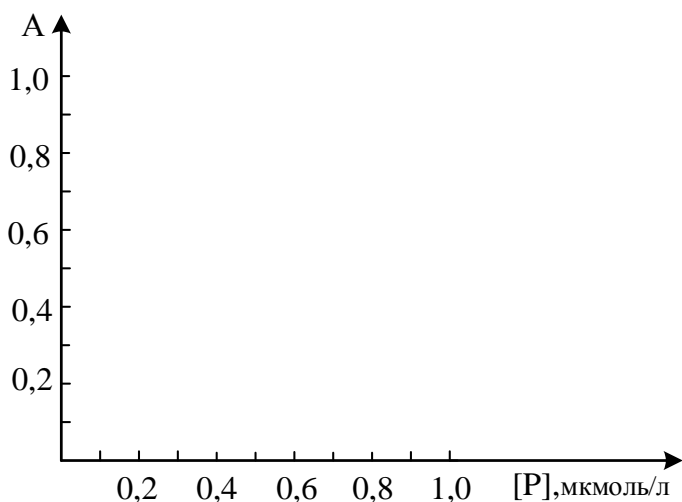
№ з/п	Назва реактивів	№ пробірки				
		1	2	3	4	5
1	Стандартний розчин фосфору 0,32 мМ, мл	-	0,5	1,0	2,0	3,0
2	Дистильована вода, мл	5,0	4,5	4,0	3,0	2,0
3	Молібденовий реактив, мл	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
4	Концентрація фосфору, мкмоль/л	0	16	32	64	96
5	Оптична густина (А)					



Після змішування всіх реагентів розчин у кожній пробірці (окрім першої) набувають блакитного кольору, інтенсивність якого зростатиме відповідно до зростання концентрації фосфору.



Розчини змішують і через 2–5 хв вимірюють величину оптичної густини на фотоелектроколориметрі (ФЕК), використовуючи червоний світлофільтр. Отримані дані вносять у таблицю. За результатами вимірювань будують графік залежності оптичної густини від концентрації фосфору в мкмоль/л.



У двох пробах з невідомою концентрацією фосфору проводять молібденову пробу і визначають оптичну густину. Використовуючи побудований калібрувальний графік, за показниками оптичної густини знаходять показники концентрації фосфору в мкмоль/л.

Висновок. _____

Виконати практичну роботу «Визначення наявності білків у розчині методом осадження сульфосаліциловою кислотою».

Клініко-діагностичне значення. Реакція між сульфосаліциловою та трихлорацетатною кислотами використовується для якісного і кількісного визначення білка в сечі. Здатність білка ефективно зв'язувати йони важких металів застосовують у медичній практиці. Білок використовують як протидіючий засіб при отруєннях солями ртуті, свинцю та іншими. У випадку отруєння солями важких металів пацієнту призначають значну кількість білка, зокрема – яєчний білок або молоко. У шлунку утворюються нерозчинні комплекси між металами і білками, що приводить до припинення всмоктування отрути в кров, зменшення отруєння та підвищення їх виділення з організму.

Принцип методу. Білки можуть легко осаджуватися з водного розчину за допомогою мінеральних, органічних кислот і солей важких металів. Денатурація та осадження білка кислотами відбуваються через нейтралізацію поверхневого заряду колоїдних частинок білка, руйнування гідратної оболонки білкових молекул та утворення комплексних солей білка з кислотами. Важкі метали створюють стійкі комплекси з SH-групами білків, що спричиняє зміни у структурі та втрату розчинності білка. Особливо чутливими до наявності білка в розчині є осадження трихлорацетатною кислотою (ТХАК) та сульфосаліциловою кислотою (чутливість останньої реакції становить 1:50000). Крім того, сульфосаліцилова кислота може

осаджувати низькомолекулярні білки, поліпептиди та олігопептиди, разом з високомолекулярними білками.

Матеріальне забезпечення: пробірки, піпетки, штатив, розчин білка, 20%-й розчин сульфосаліцилової кислоти.

Хід роботи. У пробірку наливають 1,0 мл досліджуваного розчину білка і додають 3–5 крапель 20%-го розчину сульфосаліцилової кислоти. Спостерігають за утворенням осаду білка.

Висновок. _____

Виконати практичну роботу «Кількісне визначення білка в досліджуваному розчині шляхом вимірювання оптичної густини колориметричним методом (Біуретова реакція)».

Клініко-діагностичне значення. Для кількісного визначення білків у біологічному матеріалі найчастіше застосовують фотоколориметричні та спектрофотометричні методи, в деяких випадках застосовують фотонейфелометричні методи, а також визначення білка за вмістом загального нітрогену (азотометрія).

У клініко-біохімічних лабораторіях для встановлення діагнозу захворювання проводять визначення концентрації білків у біологічних рідинах організму (крові, сечі, спинномозковій рідині, ексудатах). У нормі вміст загального білка в сироватці крові дорівнює у дорослих 65–85 г/л, у дітей до 6 років – 56–85 г/л.

Колориметричні методи визначення кількості білка базуються на «кольорових» реакціях на функціональні групи білків: біуретова реакція; мікрометод визначення кількості білка за допомогою реактива Бенедикта; метод Лоурі; метод Лоурі в модифікації Святкіна (метод використовують для визначення вмісту білка в препаратах з підвищеним вмістом ліпо- і глікопротеїнів); метод Флореса.

Ультраспектрофотометричний метод визначення кількості білка базується на здатності ароматичних радикалів тирозину, триптофану і меншою мірою – фенілаланіну білка поглинати ультрафіолетове світло з максимумом поглинання при 280 нм.

Кількісно загальний білок можна визначати в сироватці або плазмі крові за допомогою тестового набору реактивів напівавтоматичним біохімічним аналізатором «Stat Fax 1904 plus».

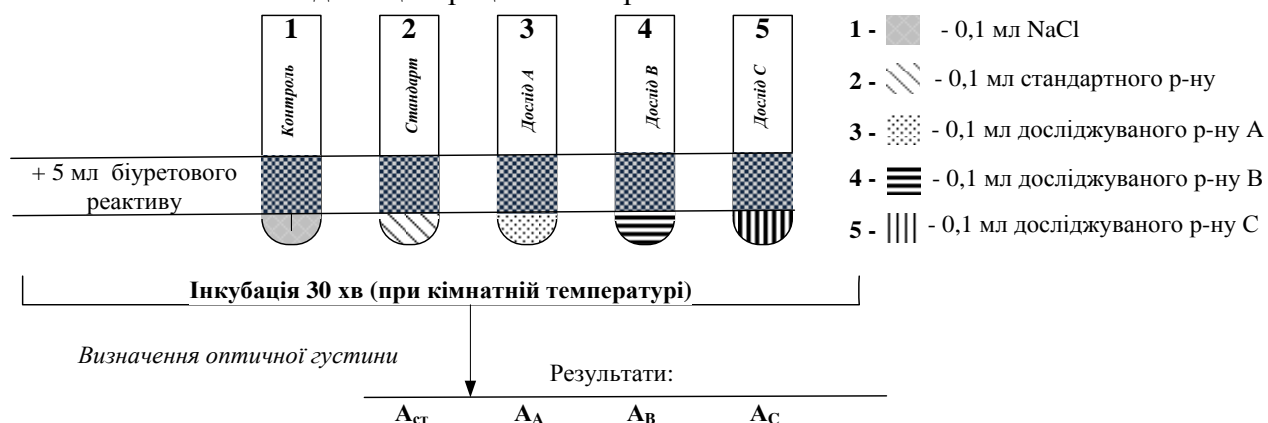
Для визначення вмісту білка в сироватці крові використовують рефрактометричний метод, який ґрунтується на різних здатностях середовищ заломлювати промінь світла, що проходить через них. Відношення синуса кута падіння світла до синуса кута заломлення є постійною величиною, яка називається показником заломлення. Показник заломлення сироватки крові залежить, в основному, від вмісту в ній білка. Для вимірювання показника заломлення використовують спеціальні пристрої – рефрактометри.

Принцип методу. Біуретова реакція є характерною реакцією для сполук, які містять принаймні два пептидних зв'язки. У лужному середовищі такі сполуки утворюють комплекс з сульфатом міді (мідний купорос), який має рожево-фіолетове забарвлення. В утворенні цього комплексу беруть участь пептидні зв'язки у їх енольній формі. Біуретова реакція слугує показником наявності пептидних зв'язків у білках і пептидах.

Матеріальне забезпечення: мірні пробірки, піпетки на 1, 2 і 10 мл, штатив, ФЕК, сироватка крові, 0,9% розчин NaCl, 10% розчин NaOH. Біуретовий реактив: 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,6 г калію-натрію виннокислого і 50 мл H_2O ; суміш перемішують і додають 30 мл 10 % розчину NaOH, 0,1 г калію йодиду і доводять водою до об'єму 100 мл (зберігають у холодильнику в запарафінзованому посуді).

Хід роботи. У першу пробірку вносять 0,1 мл 0,9% розчину NaCl (контроль), у другу – 0,1 мл стандартного розчину білка (50 г/л), у третю, четверту і п'яту пробірки – по 0,1 мл досліджуваного розчину білка (задачі). У кожен пробірку додають по 5 мл біуретового реактиву, перемішують і через 30 хв визначають оптичну густину за допомогою

фотоелектроколориметра в кюветах товщиною 10 мм при синьому світлофільтрі (440 нм) проти контрольного розчину. Поява фіолетового забарвлення (позитивна біуретова реакція) свідчить про наявність у розчині білка чи поліпептидів. Інтенсивність забарвлення змінюється залежно від концентрації білка в розчині.



Розрахунок проводять за формулою:

$$X = (C \square A_d) / A_{ст}, \text{ де:}$$

X – концентрація речовин у дослідній пробі, г/л;

C – концентрація речовин у стандартному розчині;

A_d – оптична густина досліджуваного розчину;

A_{ст} – оптична густина стандартного розчину білка.

Пояснити отриманий результат. Зробити висновок. Вказати на властивості білків утворювати в лужному середовищі з CuSO₄ комплекс рожево-фіолетового забарвлення.

Висновок. _____

Відповіді на контрольні запитання до практичної роботи.

1. Поясніть принцип визначення неорганічного фосфату фотометричним методом. _____

2. До якої групи методів, що використовуються у біохімічних дослідженнях, належить фотоелектроколориметрія? Опишіть методи, які належать до цієї групи.

3. Від чого залежить інтенсивність забарвлення досліджуваних розчинів при фотоколориметричних дослідженнях? _____

4. У якій ділянці спектра і при якій довжині хвилі визначають оптичну густина розчину молібденової сині при фотометричному дослідженні фосфатів?

5. Яких правил потрібно дотримуватися при визначенні оптичної густини за допомогою ФЕКу або спектрофотометра? _____

6. У чому полягає принцип методу кількісного визначення білків у сироватці крові біуретовим методом? _____

7. Що таке оптична густина розчину? _____

8. Що таке екстинкція, молярний коефіцієнт поглинання? Чому він дорівнює? _____

Вирішити ситуаційні задачі.

3.1. Плазму крові розлили у дві пробірки. До першої додали розчин натрію хлориду, до другої – розчин аргентуму нітрат. У якій пробірці спостерігатиметься висолування білка, а в якій – денатурація? Поясніть причину.

3.2. Вміст альбумінів у сироватці крові становить 18 г/л. Як називають такий стан? Порушення яких процесів в організмі можуть бути причиною цього стану? Які зміни метаболізму будуть спостерігатися внаслідок цього стану?

3.3. Досліджувану сечу перевірено на наявність білка. Реакція з сульфосаліциловою кислотою – позитивна. Кількісно виявлено 3,4 г/л білка. Як називається такий стан? Які ймовірні причини такого стану? До яких наслідків в організмі може призвести такий стан?

3.4. У сироватці крові пацієнта загальний вміст білка становить 95 г/л. Як називається такий стан? Які можливі причини і наслідки такого стану для організму?

3.5. На частку альбумінів сироватки крові здорової людини припадає 56% вмісту загального білка, який становить 65–85 г/л. Визначте білковий коефіцієнт і поясніть його можливі відхилення при патології.

3.6. Яка норма альбумін / глобулінового коефіцієнту? Яке діагностичне значення має цей коефіцієнт? _____

Дата виконання _____

Підпис викладача _____

Тема №2

Дослідження будови та фізико-хімічних властивостей ферментів. Визначення активності ферментів, дослідження механізму їх дії та кінетики ферментативного каталізу. Застосування методів виявлення ферментів у біологічних об'єктах

Мета заняття. Знання організації та загальних властивостей ферментів, їх чутливості до різноманітних факторів необхідні для визначення активності ензимів у біологічних рідинах (кров, слина, сеча та ін.) з діагностичною метою. Оволодіти методом визначення активності амілази слини і визначити цю активність за різних температурних режимів і використання буферних розчинів з різним рН для засвоєння впливу температури і рН середовища на активність ферментів.

Актуальність теми. Визначення активності й кількості ферментів у біологічних рідинах потребує знань з будови і функцій ферментів, їх номенклатури і класифікації, видів специфічності, фізико-хімічних та каталітичних властивостей, субклітинної, тканинної локалізації. Знання шляхів регуляції активності ферментів під дією ендогенних факторів, токсинів, лікарських засобів, механізмів дії ферментів та особливостей кінетики ферментативного каталізу лежить в основі розуміння метаболічних процесів у клітинах, тканинах та органах у нормі та при патологіях. Ці знання важливі для фахової оцінки метаболічних процесів і глибокого розуміння принципів застосування ферментних препаратів, їх активаторів та інгібіторів у клінічній практиці.

Теоретичні питання

1. Ферменти: визначення; властивості ферментів як біологічних каталізаторів реакцій обміну речовин; фізико-хімічні властивості ензимів та як білкових молекул (електрохімічні властивості, розчинність, термодинамічна стабільність, здатність до осадження, денатурації, взаємодії з лігандами).
2. Прості ферменти. Складні ферменти, їх будова (кофактори, коферменти, простетичні групи). Класифікація коферментів за хімічною будовою. Роль йонів металів у функціонуванні ферментів.
3. Рівні структурної організації ферментів: мультиферментні комплекси, ферментативні ансамблі, поліфункціональні ферменти, їх переваги. Навести приклади.
4. Будова ферментів: активний, регуляторний (алостеричний) центри, їх значення.
5. Номенклатура ферментів, навести приклади. Класифікація ферментів. Характеристика класів ферментів і відповідних їм коферментів за механізмом дії. Шифр ферментів.
6. Основні кінетичні властивості ферментів: залежність активності ферментів від рН середовища (пояснити і зобразити графічно); від температури (пояснити і зобразити графічно); від концентрації ферменту (пояснити і зобразити графічно); від концентрації субстрату (пояснити і зобразити графічно); рівняння Міхаеліса-Ментен і Лануївера-Берка; смислове значення величини константи Міхаеліса.
7. Одиниці ферментативної активності. Принципи кількісного визначення активності ферментів (за кількістю продукту, що утворюється під дією ферменту; за кількістю субстрату, що використовується; за зміною кількості коферменту (окисно-відновні перетворення для НАД та ФАД).
8. Утворення фермент-субстратного комплексу та процес перетворення субстрату. Механізми дії ферментів (ефекти зближення та орієнтації; ефекти кислотно-основного каталізу; ефекти нуклеофільного та електрофільного каталізу). Навести приклади.
9. Специфічність ферментів. Види специфічності (абсолютна, відносна, стереоспецифічність). Навести приклади.
10. Внутрішньоклітинна локалізація та тканинна (органна) специфічність ферментів. Навести приклади.

Завдання

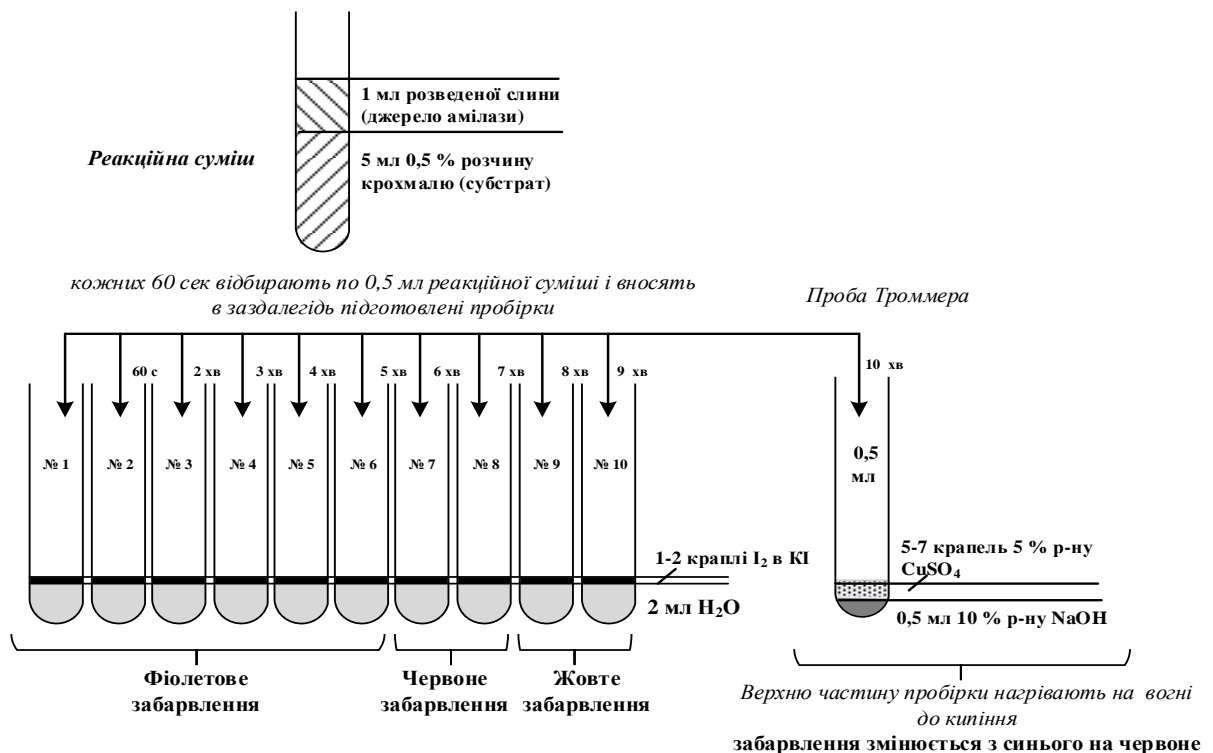
1. Виконати практичну роботу «Виявлення амілази в слині (реакція з йодом)».

Клініко-діагностичне значення. Амілаза виробляється, головним чином, у слинних залозах і підшлунковій залозі. Підвищена активність амілази у крові спостерігається при панкреатиті, перитоніті, судинному тромбозі, а також при введенні певних фізіологічно активних сполук, таких як морфін, кодеїн, кортикотропін (АКТГ) і кортизол. Підвищена активність амілази у слинних залозах спостерігається при стоматиті, невралгії трійчастого нерва, нирковій недостатності та паркінсонізмі. Знижена активність амілази у крові спостерігається при психічних захворюваннях та анацидних порушеннях. Зниження рівня амілази у слині відбувається при гіпосалівації, запаленні слинних залоз та інших станах. У клінічній практиці вимірюють рівень амілази у крові та сечі для діагностики гострих панкреатитів. Кількість цього ферменту збільшується в 10–30 разів, особливо протягом перших 24 годин хвороби, а потім поступово повертається до нормального рівня.

Принцип методу. Амілаза належить до класу ферментів, відомих як гідролази, які каталізують розрив хімічних зв'язків за допомогою молекули води. Амілаза, яка міститься в слині, здатна каталізувати гідроліз крохмалю, розриваючи глікозидні зв'язки та утворюючи декстрини, які подальше перетворюються на дисахарид мальтозу. Це можна підтвердити за допомогою реакції з йодом (яка дає позитивну реакцію для полісахаридів та декстринів) та реакції Тромера (яка дає позитивну реакцію для цукрів з вільною півацетальною групою, зокрема для мальтози). Крохмаль реагує з йодом, утворюючи синє забарвлення, і не реагує в реакції Тромера, оскільки не має вільних альдегідних груп. Декстрини реагують з йодом, утворюючи червоні сполуки. Мальтоза має вільну альдегідну групу, тому її можна виявити за допомогою проби Тромера.

Матеріальне забезпечення: 0,5% розчин крохмалю, 0,1% I₂ в KI, 10% розчин NaOH, 5% розчин CuSO₄, дистильована вода, газовий пальник, пробірки, піпетки, штатив.

Хід роботи. Для одержання розведеної слини ротову порожнину злегка прополіскують водою, набирають нову порцію дистильованої води і прополіскують нею рот протягом 1–2 хв. Зібрану в пробірку ротову рідину використовують для аналізу. Щоб переконатись у тому, що крохмаль з йодом дає синє забарвлення, у пробірку вносять 10 крапель розчину крохмалю і додають 2 краплі розчину I₂ в KI. Спостерігають позитивну реакцію.



В окремій пробірці готують реакційну суміш: наливають 5 мл 0,5% розчину крохмалю (субстрат), додають 1 мл розведеної слини (джерело амілази), вміст пробірки перемішують і спостерігають опалесценцію. З цієї пробірки кожних 60 секунд відбирають по 0,5 мл рідини і

вносять по черзі у пробірки № 1, 2, 3 і т.д., які були заготовлені з розчином I₂ в KI. Якщо після першого перенесення у пробірці спостерігають фіолетове або червоне забарвлення, то інтервал між перенесенням скорочують до 30 секунд. Якщо у черговій пробі спостерігається жовтий колір розчину йоду, гідроліз крохмалю вважається закінченим. Зазначають час повного гідролізу. Спостерігають зникнення опалесценції розчину в процесі гідролізу. Через 10 хв у пробірці з реакційною сумішшю проводять пробу Тромера.

Для проведення проби Тромера до вмісту пробірки з реактивною сумішшю додають рівний об'єм 10% розчину NaOH і 5–7 крапель 5% розчину CuSO₄. Вміст пробірки перемішують до зникнення помутніння. Верхню частину пробірки обережно нагрівають на відкритому вогні до кипіння, реакція Тромера повинна бути позитивною, що відзначають за зміною забарвлення з синього до червоного.

Висновок. _____

Виконати практичну роботу «Дослідження впливу рН середовища на активність амілази слини».

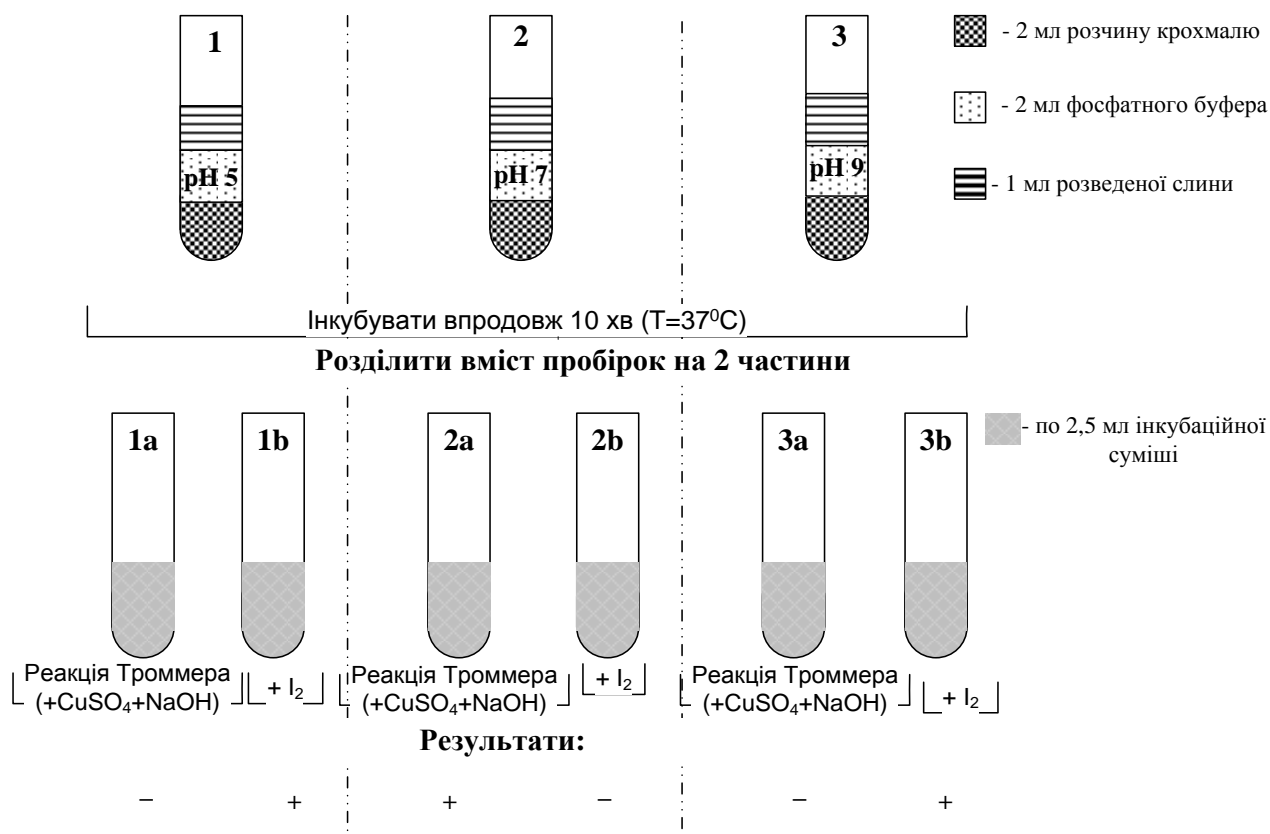


Принцип методу. Метод базується на властивості крохмалю реагувати з йодом та утворювати синє забарвлення при оптимальному рН для амілази. Продукт розщеплення крохмалю, яким є мальтоза, не дає забарвлення з йодом, але її можна виявити за допомогою проби Тромера.

Матеріальне забезпечення: 0,5% розчин крохмалю, 0,1% розчин I₂ в KI, 10% розчин NaOH, 5% розчин n CuSO₄, розведена слина, газовий пальник, водяна баня, штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи.

У три пробірки вносять по 2 мл 0,5% розчину крохмалю. У першу додають 2 мл фосфатного буферу рН 5,0, у другу – рН 7, а в третю – рН 9, відповідно. У кожен з пробірок вносять по 1 мл розведеної слини і поміщають їх у водяну баню на 15 хв при температурі 37°C.



Після інкубації вміст кожної пробірки ділять на дві рівні частини. До першої частини додають по 3–5 крапель розчину I₂ в KI і спостерігають за зміною забарвлення.

З другою частиною проводять пробу Тромера. Для цього до вмісту пробірки з реактивною сумішшю додають рівний об'єм 10% розчину NaOH і 5–7 крапель 5% розчину CuSO₄. Вміст пробірки перемішують до зникнення помутніння. Верхню частину пробірки обережно нагрівають на відкритому вогні до кипіння. Реакція Тромера повинна бути позитивною, що зазначають за зміною забарвлення з синього до червоного.

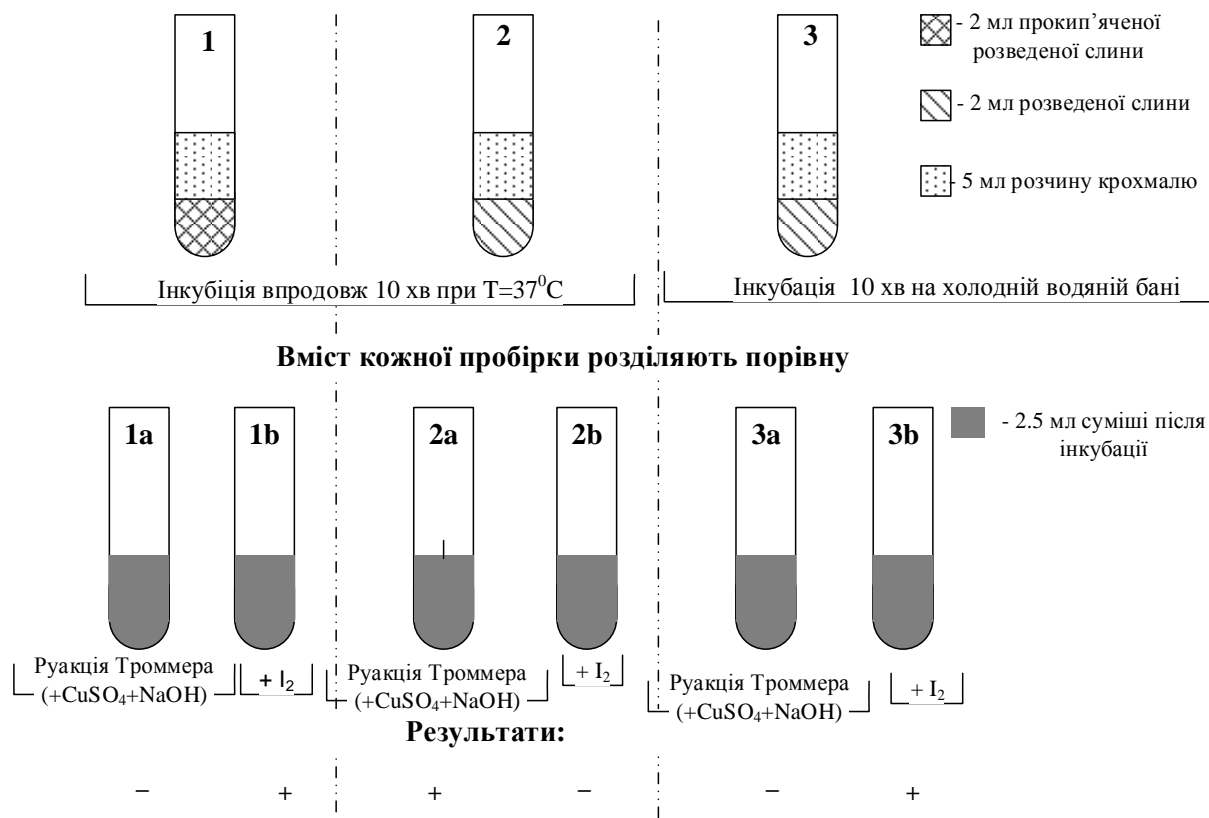
Висновок. _____

Виконати практичну роботу «Дослідження термолабільності амілази слини».

Принцип методу. Метод базується на здатності крохмалю при взаємодії з йодом утворювати синє забарвлення. Продукт розщеплення крохмалю – мальтоза – з йодом забарвлення не дає і її можна виявити за допомогою проби Тромера.

Матеріальне забезпечення: 0,5% розчин крохмалю, 0,1% розчин I₂ в KI, 10% розчин NaOH, 5% розчин CuSO₄, розведена слина, газовий пальник, водяна баня, холодна вода (лід), штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи. У пробірку вносять 2 мл розведеної слини і кип'ятять на відкритому вогні протягом 2 хв. Вміст пробірки охолоджують. У три інші пробірки вносять по 5 мл 0,5% розчину крохмалю. У пробірку № 1 додають прокип'ячену слину, а в пробірки № 2 і № 3 – по 2 мл розведеної непрокип'яченої слини. Пробірку № 2 ставлять на 10 хв на водяну баню при температурі 37°C. Пробірку № 3 поміщають на 10 хв у холодну воду з льодом. Після інкубації вміст кожної пробірки розділяють порівну. До відібраних проб додають по 3–5 крапель розчину I₂ в KI і спостерігають за зміною забарвлення. З пробами, які залишилися, проводять реакцію Тромера.



Висновок.

Виконати практичну роботу «Вивчення специфічності дії амілази слини і сахарози дріжджів».

Принцип методу. Однією з ключових характеристик ферментів є їх специфічність дії, яка полягає в тому, що кожен фермент працює з певним типом субстрату або групою субстратів, які мають подібну структуру. Специфічність може бути абсолютною, відносною (груповою) або стереохімічною. Висока специфічність ферментів пояснюється їх білковою природою і структурою активного центру.

Наприклад, амілаза слини каталізує розклад крохмалю на дисахарид мальтозу, але не взаємодіє з дисахаридом сахарозою. З іншого боку, сахароза розщеплює сахарозу на глюкозу і фруктозу, але не може розщеплювати крохмаль. Ступінь розкладання субстратів можна оцінити за допомогою реакції Троммера. Мальтоза містить вільну альдегідну групу, тому вона утворює забарвлену сполуку з реагентом Троммера, тоді як сахароза не має вільної альдегідної групи, тому реакція буде негативною.

Матеріальне забезпечення: 1% розчин крохмалю, препарат сахарози дріжджів, 1% розчин сахарози, 0,1% розчин I₂ в KI, 10% розчин NaOH, 5% розчин CuSO₄, розведена слина, газовий пальник, водяна баня, штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи.

Специфічність амілази: у пробірки № 1 і 2 поміщають по 1 мл розведеної вдвічі слини. В пробірку № 1 додають 2 мл 1%-го розчину крохмалю, в пробірку № 2 – 2 мл 1% розчину сахарози. Обидві пробірки ставлять у термостат при $t = 37^{\circ}\text{C}$ на 15 хв. Після закінчення інкубації в обох пробірках проводять реакцію Троммера.

Специфічність сахарози дріжджів: у пробірки № 3 і 4 поміщають по 1 мл препарату сахарози дріжджів. У пробірку № 3 додають 2 мл 1%-го розчину сахарози, в пробірку № 4 – 2 мл 1%-го розчину крохмалю. Обидві пробірки ставлять у термостат при $t = 37^{\circ}\text{C}$ на 15 хв. Після закінчення інкубації в обох пробірках проводять реакцію Троммера.

Результати проведеного експерименту заносять у таблицю:

№ пробірки	Фермент	Субстрат	Реакція Тромера
1	Амілаза	Крохмаль	
2	Амілаза	Сахароза	
3	Сахараза	Сахароза	
4	Сахараза	Крохмаль	

Висновок. _____

2. Відповісти на контрольні запитання до практичної роботи.

2.1. Поясніть, чому принцип визначення активності ферментів на прикладі амілази слини полягає у визначенні крохмалю (йод-крохмальна реакція) і мальтози (реакція Тромера)? Якими термінами в ензимології називають альфа-амілазу, крохмаль і мальтозу в реакції, яку каталізує альфа-амілаза?

2.2. Поясніть термолабільність ферментів на прикладі визначення активності амілази слини. Порівняйте властивості амілази слини, яка попередньо нагріта або охолоджена, з нативною амілазою слини?

2.3. Як визначити температурний оптимум фермента на прикладі амілази?

2.4. У хворого розвинувся метаболічний ацидоз (зниження рН крові внаслідок утворення великої кількості кислотних метаболітів). Як це вплине на активність ферментів сироватки крові?

2.5. Вакцину проти Covid-19 фірми Pfizer зберігають і транспортують при температурі -60°C – -80°C . Поясніть необхідність таких умов.

2.6. Лікарські засоби для зниження температури тіла рекомендують приймати, коли температура перевищує 38°C . Поясніть, у чому полягає небезпека надмірного підвищення температури тіла і чому підвищення температури тіла до 38°C не корегують?

2.7. На якій реакції ґрунтується метод визначення активності альфа-амілази?

2.8. Яке забарвлення дають з йодом проміжні продукти розщеплення крохмалю – декстрини, і кінцевий продукт розщеплення – мальтоза? _____

2.9. Поясніть реакції, які лежать в основі проби Тромера? Які цукри можна виявити цією пробою? Чому розчин мальтози дає позитивну пробу Тромера?

2.10. Як експериментально встановити тип специфічності фермента? Який тип специфічності властивий для амілази слини? Поясніть, як експериментально його підтвердити.

3. Вирішити ситуаційні задачі.

3.1. У дитини температура $37,8^{\circ}\text{C}$, загальна слабкість, головні болі, лікар ставить діагноз ГРВІ (гостра респіраторна вірусна інфекція) і рекомендує уважно стежити за температурою тіла, не допускати значного та тривалого підняття температури. Чи потрібно «збивати» температуру тіла $37,8^{\circ}\text{C}$? Коли треба «збивати» температуру тіла? Відповідь поясніть.

3.2. Хворого на цукровий діабет I типу привезли в лікарню у стані кетоацидотичної коми. Лікар призначив інсулінотерапію малими дозами інсуліну ($0,1-0,3$ ОД / кг) і внутрішньовенну інфузію ізотонічного розчину натрію хлористого для купірування ацидозу. Назвіть основну причину необхідності нормалізації рН крові для покращення стану хворого.

3.3. Зниження вмісту феруму в організмі людини викликає зниження активності низки ферментів. Назвіть, які ферменти містять залізо як кофактор? _____

3.4. Низку спадкових захворювань об'єднують під назвою лізосомальні. Наведіть приклади таких захворювань. Назвіть, які ферменти знаходяться у лізосомах і яку роль вони виконують? _____

3.5. Низку спадкових захворювань об'єднують під назвою мітохондріальні. Наведіть приклади таких захворювань. Назвіть, які ферменти знаходяться у мітохондріях і яку роль вони виконують? _____

3.6. До лікарні доставлено пацієнта з отруєнням технічним спиртом метанолом. Серед екстрених заходів – введення потерпілому довенно етанол. З якою метою потерпілому вводять етанол? Назвіть фермент, який каталізує метаболізм метанолу і етанолу? Назвіть вид

його специфічності. Поясніть доцільність використання етанолу при отруєнні метанолом?

Дата виконання _____

Підпис викладача _____

Тема № 3

Дослідження регуляції ферментативних процесів та аналіз механізмів виникнення ензимопатій. Медична ензимологія

Мета заняття. Засвоїти основні принципи регуляції ферментативних процесів, знати можливі причини порушення функціонування ензимів у клітині для використання лікарських засобів активаторів та інгібіторів ферментів у клінічній практиці.

Актуальність теми. Одною з відмінностей ферментів від неорганічних каталізаторів є їх здатність до регуляції. Знання принципів регуляції ферментів дозволяє використовувати їх у медичній практиці. Знання основ медичної ензимології є основою ензимодіагностики (визначення активності ферментів крові та сечі для діагностики патологічних станів), ензимопатології (визначення субстратів або продуктів реакцій для встановлення порушення активності ферментів), ензимотерапії (використання ферментів, їх активаторів, їх інгібіторів з метою лікування).

Теоретичні питання

1. Активація та інгібування ферментів. Активатори ферментів (приклади). Інгібування ферментів: зворотне, незворотне, конкурентне, неконкурентне (навести приклади).
2. Регуляція шляхом зміни каталітичної активності ферментів: алостеричні ферменти; ковалентна модифікація ферментів; протеолітична активація ферментів (обмежений протеоліз); дія регуляторних білків; циклічні нуклеотиди в регуляції ферментативних процесів.
3. Регуляція шляхом зміни кількості ферментів (конститутивні та адаптивні ферменти).
4. Ізоферменти (визначення, будова на прикладі лактатдегідрогенази та креатинфосфокінази). Використання ізоферментів для діагностики.
5. Ензимодіагностика (визначення). Зміни активності ферментів плазми та сироватки крові як діагностичні (маркерні) показники розвитку патологічних процесів (інфаркту міокарда, захворювання печінки, підшлункової залози, м'язової тканини).
6. Ензимопатологія (визначення). Вроджені (спадкові) та набуті вади метаболізму (приклади, їх клініко-лабораторна діагностика).
7. Ензимотерапія (визначення). Використання ферментів, кофакторів та інгібіторів ферментів (ацетилсаліцилова кислота, алопуринол, контрикал, трасилол, сульфаніламідні препарати та інші) як лікарських засобів.

Завдання

Виконати практичну роботу «Дослідити вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини».

Клініко-діагностичне значення. У медицині широко використовують інгібітори ферментів як лікарські засоби. Наприклад, ацетилсаліцилова кислота (аспірин) є інгібітором циклооксигенази (простагландинсинтази) і використовується як протизапальний препарат. При лікуванні панкреатиту застосовують трасилол (інгібітор трипсину) і контрикал (інгібітор протеїназ, зокрема калікреїнів). Алопуринол є інгібітором ксантинооксидази і використовується при лікуванні подагри та інших захворювань.

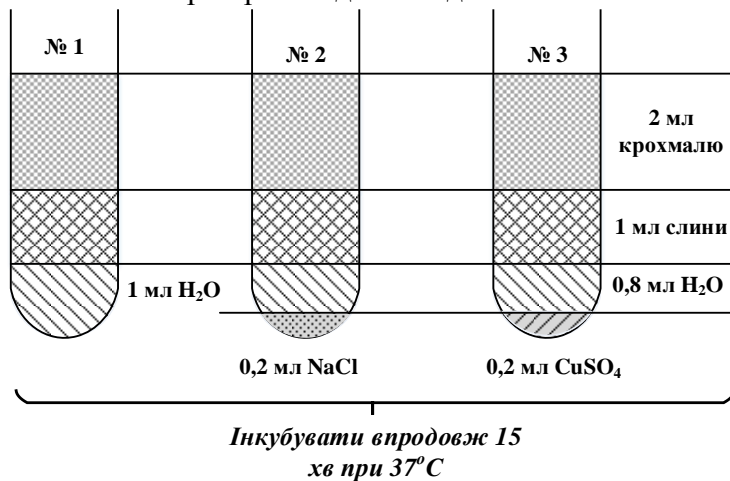


Принцип методу. Сполуками, які підвищують активність ферментів – активаторами, є йони багатьох металів, зокрема Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , а також органічні сполуки – проміжні продукти обміну речовин в організмі. Активатором амілази є натрію хлорид (NaCl), інгібітором – купруму сульфат (CuSO_4). Показником впливу цих сполук на активність амілази є ступінь гідролізу крохмалю під дією ферменту в присутності NaCl та CuSO_4 .

Матеріальне забезпечення: 0,5% розчин крохмалю, 0,1% I_2 в KI , 10% розчин NaOH , 5% розчин CuSO_4 , дистильована вода, газовий пальник, пробірки, піпетки.

Хід роботи.

Заповнюють пробірки згідно з поданою нижче схемою:



Додати декілька крапель 0,1 %-ного розчину йоду в 0,2 %-му розчині йодиду калію

Результати роботи заносять у таблицю:

Пробірка 1	Пробірка 2	Пробірка 3
Забарвлення розчину після додавання йодиду калію	Забарвлення розчину після додавання йодиду калію	Забарвлення розчину після додавання йодиду калію
?	?	?

Висновок. _____

1. Виконати практичну роботу «Дослідити вплив фосфаколу та йонів кальцію на активність холінестерази».

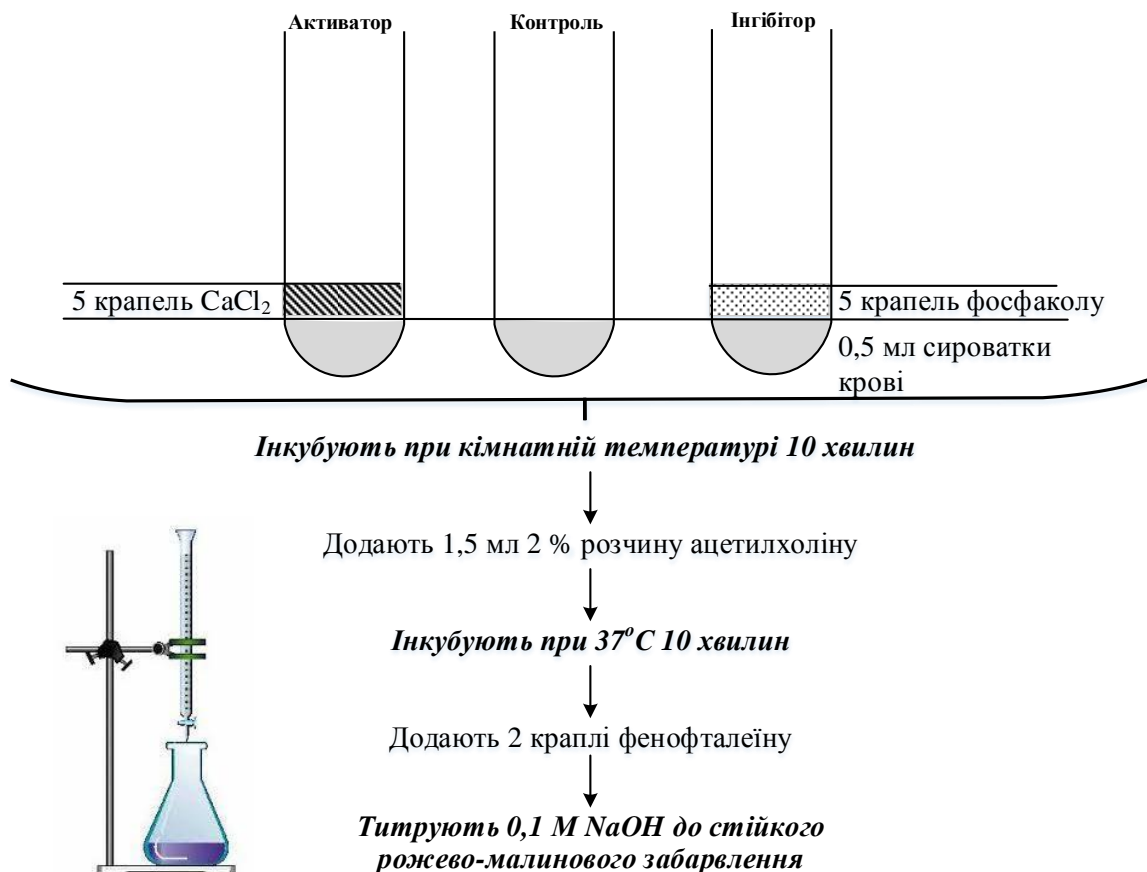
Клініко-діагностичне значення. Холінестераза виконує роль каталізатора реакції гідролізу нейромедіатора ацетилхоліну до утворення холіну та ацетатної кислоти. У людській крові є два типи холінестераз. У сироватці знаходиться неспецифічна ацилхолінестераза (КФ 3.1.1.8), яка розкладає не лише ацетилхолін, але й інші ефіри холіну. В еритроцитах присутня специфічна, істинна ацетилхолінестераза, яка розкладає лише ацетилхолін (КФ 3.1.1.7). У нормі активність холінестерази в сироватці крові, виміряна колориметричним методом за гідролізом ацетилхолінхлориду, коливається в межах 44,4–94,4 мккат/л. Фармакологічно і токсикологічно важливі сполуки, які є інгібіторами ацетилхолінестерази, значно підвищують концентрацію нейромедіатора ацетилхоліну як у структурах центральної нервової системи, так і в організмі загалом. Зворотні інгібітори ацетилхолінестерази використовують у медицині для збільшення активності холінергічної імпульсації, яка порушена при деяких неврологічних захворюваннях, таких як атонія кишківника і сечового міхура. Для цього використовують ліки, такі як Прозерин, Фізостигмін та Галантамін.

Незворотні інгібітори ацетилхолінестерази є сильнодіючими нервовими отрутами, які спричиняють інтенсивне збудження нервової системи, судоми і порушення функціонування серцево-судинної, шлунково-кишкової та інших систем організму. Фосфорорганічні сполуки (ФОС) є найпоширенішими незворотними інгібіторами. У сільському господарстві для боротьби з шкідливими комахами використовують хлорофос, дихлофос, метафос, карбофос та інші. Табун, зарин, зоман та інші є отрутами нервово-паралітичного типу, які використовують як бойові отруйні речовини. Активність холінестерази є специфічним біохімічним маркером для виявлення впливу фосфорорганічних сполук на людський організм, внаслідок високої чутливості цього ферменту до їх впливу. Механізм їх гальмівної дії полягає у зв'язуванні з ОН-групою серину в активному центрі ферменту. Під час нервового збудження відбувається збільшення концентрації йонів Ca^{2+} у нервовому закінченні, що слугує сигналом для активації вивільнення ацетилхоліну в синаптичну щілину, його взаємодії з холінорецепторами на постсинаптичній мембрані та розщеплення його ацетилхолінестеразою. Крім того, йони кальцію є потужними активаторами холінестерази.

Принцип методу. Фосфорорганічні сполуки (ФОС або фосфакол) є незворотними інгібіторами холінестерази та ацетилхолінестерази. Вони взаємодіють з активним центром ферменту та утворюють ковалентні зв'язки, що призводить до гальмування його активності. Лікарські засоби, які містять фосфорорганічні сполуки, є високотоксичними отрутами для комах (пестициди) і теплокровних тварин. Механізм їх гальмівної дії полягає у зв'язуванні з ОН-групою серину в активному центрі ферменту. Під час нервового збудження відбувається зростання концентрації йонів Ca^{2+} у нервовому закінченні, що викликає активацію виходу ацетилхоліну в синаптичну щілину. Далі відбувається взаємодія ацетилхоліну з холінорецепторами на постсинаптичній мембрані, а потім його розщеплення ацетилхолінестеразою. Крім того, йони кальцію є потужним активатором холінестерази. Для кількісного визначення активності холінестерази, яка вивільнилась у процесі гідролізу ацетилхоліну, використовують метод титрування лугом. Кількість витраченого лугу є показником активності ферменту.

Матеріальне забезпечення: 0,5% розчин $CaCl_2$, 0,5% розчин фосфаколу, 2% розчин ацетилхоліну, 0,1 М NaOH, розчин фенолфталеїну, сироватка крові, штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи. Три пробірки заповнюють реактивами згідно з таблицею:



Вміст пробірок	№ пробірки		
	1	2	3
Сироватка крові, мл	0,5	0,5	0,5
0,5% розчин CaCl_2 , кількість крапель	---	5	---
0,5% розчин фосфаколу, кількість крапель	---	---	5
Інкубація 5 хв при кімнатній температурі			
2% розчин ацетилхоліну, мл	1,5	1,5	1,5
Інкубація 10 хв при 37°С			
Фенофталеїн, кількість крапель	2	2	2
Кількість 0,1 М NaOH, яка пішла на титрування, мл			

Висновок. _____

Виконати практичну роботу «Кількісне визначення активності пептидаз панкреатину».

Клініко-діагностичне значення. Пептидази – це група гідролітичних ферментів, які розщеплюють пептидні зв'язки білків за участі молекул води. В організмі пептидази локалізовані як в окремих клітинах, так і секретуються екзокринними залозами в травний тракт. Найбільш активні пептидази підшлункової залози: трипсин (КФ 3.4.21.4), хімотрипсин (КФ 3.4.4.5), карбоксипептидаза (КФ 3.4.2.1).

У нормі активність пептидаз сироватки крові становить 0,2–1,7 мкмоль/мл год. Збільшення вмісту пептидаз у сироватці крові та зростання їх активності спостерігаються при посиленні катаболічних процесів. Це стосується насамперед гострого панкреатиту, виразкової хвороби, обширних опіків, гострого гепатиту. При таких станах активність

пептидаз крові може збільшуватися у десятки й сотні разів. Зниження активності пептидаз може спостерігатися при емфіземі легень, цирозі печінки.

Принцип методу. 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 титруванням лугом за методом Зернсена в присутності індикатора фенолфталеїну.

Матеріальне забезпечення: 6% розчин казеїну, фосфатний буфер рН 7,6, панкреатин, фенолфталеїн, 0,2 н розчин NaOH, 0,02 н розчин NaOH, формольна суміш рН 8,3, штатив з пробірками, піпетки, колбочки для титрування, бюретка, водяна баня, термометр, газовий пальник.

Хід роботи. У дві пробірки відмірюють по 5 мл 6% розчину казеїну і по 2 мл фосфатного буферу рН 7,6. В одну з пробірок додають 0,5 г панкреатину, старанно перемішують і ставлять на водяну баню при температурі 37°C разом з контрольною пробіркою. Через 30 хв пробірки знімають з бані, охолоджують, їх вміст переливають у колбочки для титрування, додають у кожен по 2–3 краплі фенолфталеїну і підлучнюють з піпетки 0,2 н розчином NaOH до утворення блідо-рожевого забарвлення (рН 8,3). При такому рН кількість аміногруп у розчині дорівнює кількості карбоксильних груп. Далі в обидві колбочки додають по 5 мл формольної суміші (рН 8,3). Формалін зв'язує аміногрупи, а карбоксильні групи зсувають рН розчину в кислу сторону. Розчин знебарвлюється. Обидві проби титрують із бюретки 0,02 н розчином NaOH до утворення слабо-рожевого забарвлення (рН 8,3) і додають ще декілька крапель 0,02 н розчину NaOH до яскраво червоного кольору (рН 9,1). Вираховують різницю між даними титрування досліджуваного і контрольного розчинів. Активність пептидаз виражають в умовних одиницях. Одна умовна одиниця відповідає 1 мл 0,02 н розчину NaOH, затраченого додатково на титрування дослідної проби.

Приклад розрахунку:

Кількість 0,02 н NaOH, що пішла на титрування гідролізату казеїну _____ мл.

Кількість 0,02 н NaOH, що пішла на титрування контрольного розчину _____ мл.

Різниця у кількості 0,02 н NaOH між дослідним і контрольним розчином _____ мл.

Висновок. _____

2. Відповісти на контрольні запитання до практичної роботи.

2.1. Поясніть вплив модуляторів на активність холінестерази сироватки крові за присутності хлориду _____ кальцію _____ і фосфату _____.

2.2. Поясніть вплив модуляторів на активність альфа-амілази слини в присутності натрію хлориду _____ і _____ купруму _____ сульфату? _____

2.3. Ацетилхолінестераза – фермент, що каталізує розщеплення ацетилхоліну на холін і ацетатну кислоту. Інсектициди, пестициди та отрути на основі фторфосфатів, незворотно інгібують ацетилхолінестеразу, здійснюючи нервово-паралітичну дію на організм. Який молекулярний механізм інгібування ацетилхолінестерази фосфорорганічними сполуками? _____

2.4. Яка активність пептидаз сироватки крові у нормі?

2.5. Як змінюється вміст пептидаз у сироватці крові при гострому панкреатиті, виразковій хворобі, обширних опіках, гострому гепатиті?

Вирішити ситуаційні задачі.

3.1. 51-річний чоловік звернувся до лікаря з приводу болю у грудях. Зі слів пацієнта останнім часом після фізичних навантажень він відчуває раптові стискаючі болі у грудній клітці, які поширюються на ліву сторону і віддають у шию. У процесі обстеження хворого було встановлено, що в сироватці крові високий рівень креатинфосфокінази і міоглобіну. Який діагноз можна поставити, спираючись на дані клінічного обстеження? Визначення яких біохімічних показників потрібно рекомендувати хворому для підтвердження діагнозу?

3.2. 55-річна жінка з діагнозом міастенія гравіс (хвороба Ерба-Гольдфлама) відчуває сильну м'язову слабкість і втому, яка виникає внаслідок зниження кількості ацетилхоліну в м'язах. Їй призначили фізостигмін – препарат, який впливає на активність ацетилхолінестерази, зумовлюючи підвищення рівня ацетилхоліну. Поясніть, який механізм дії фізостигміну на ацетилхолінестеразу.

3.3. Хворому після операції для профілактики активації фібринолізу, що може зумовити кровотечу, призначили препарат контрикал. Поясніть механізм дії цих ліків. До якого типу інгібіторів він належить?

3.4. Фосфорорганічні сполуки (високотоксичні отрути нервово-паралітичної дії) гальмують ацетилхолінестеразу шляхом утворення ковалентних зв'язків з ОН-групами серину в активному центрі ферменту. Який тип гальмування є характерним для цього класу сполук?

Дата виконання _____

Підпис викладача _____

Тема № 4

Роль водо- та жиророзчинних вітамінів у метаболізмі. Дослідження ролі кофакторів і коферментних вітамінів у прояві каталітичної активності ферментів

Мета заняття. Для діагностики гіповітамінозів, авітамінозів, гіпервітамінозів потрібно ознайомитися з деякими методами якісного та кількісного визначення вітамінів. Використання вітамінів, провітамінів, антивітамінів з лікувальною метою вимагає засвоєння будови, загальних принципів класифікації вітамінів за хімічною природою, ролі водорозчинних вітамінів у функціонуванні ферментів як коферментів, реакцій, у яких беруть участь вітаміни і вітаміноподібні речовини.

Актуальність теми. Патології, пов'язані з обмеженням надходження водорозчинних та обмеженням або надлишком надходження жиророзчинних вітамінів в організм, порушенням їх всмоктування, перетворення водорозчинних вітамінів у коферментні форми тощо, потребують знань характерних клінічних проявів цих порушень, особливостей будови, метаболізму вітамінів, їх участі у метаболічних процесах. Ціла низка фізіологічних станів (інтенсивне фізичне навантаження, вагітність, стрес), патології травного тракту, печінки, вірусних, бактеріальних інфекцій змінюють метаболічні процеси і потребують додаткового поступлення в організм окремих вітамінів. Знання причин виникнення, клінічних і біохімічних проявів дефіциту або надлишку вітамінів, шляхів їх компенсації є необхідною ланкою знань спеціалістів медичного профілю.

Теоретичні питання

1. Вітаміни як незамінні біологічно-активні компоненти харчування організму людини. Класифікація вітамінів.
2. Вітаміни В1 і В2, їх будова, коферментна роль, джерела для людини, добова потреба. Ознаки гіповітамінозу; застосування у медицині. Коферментні форми: ТМФ, ТДФ, ТТФ, ФМН і ФАД та їх роль у функціонуванні ферментів. Антивітаміни.
3. Будова, властивості вітаміну Н та пантотенової кислоти. Роль коферментів карбоксибіотину і КоASH в обмінних процесах. Основні джерела, добова потреба. Ознаки гіповітамінозу; застосування у медицині. Антивітаміни.
4. Антианемічні вітаміни (В12, фолієва кислота), їх будова, участь коферментів у обміні речовин, джерела для людини, добова потреба, ознаки гіповітамінозу, застосування у медицині. Кобаламіни та ТГФК як коферментні форми.
5. Вітаміни В6 та РР, їх будова, коферментна роль, джерела для людини, добова потреба, ознаки гіповітамінозу, застосування у медицині. Коферментні форми: ПАЛФ і ПАМФ НАД+/ НАДН, НАДФ+/ НАДФН та їх роль у функціонуванні ферментів. Антивітаміни.
6. Вітаміни С і Р, їх будова, біологічна роль, участь у обміні речовин, джерела для людини, добова потреба. Функціональний зв'язок між вітаміном Р та вітаміном С (синергічна дія вітамінів). Прояви недостатності в організмі людини, застосування у медицині, ліпоєва кислота. Участь у хімічних реакціях ліпоєвих коферментів та аскорбінової кислоти.
7. Вітаміни групи D, будова, біологічна роль, механізм дії, добова потреба, джерела для людини, ознаки гіпо- та гіпервітамінозів, авітаміноз.
8. Вітамін А, будова, біологічна роль, механізм дії, добова потреба, джерела для людини, ознаки гіпо-, гіпервітамінозів. Провітаміни.
9. Вітаміни Е, F, будова, біологічна роль, механізм дії, джерела для людини, механізм дії, добова потреба, ознаки гіпо-, гіпервітамінозів, застосування в медицині.
10. Антигеморагічні вітаміни (К2, К3) та їх водорозчинні форми, будова, біологічна роль, джерела для людини, механізм дії, добова потреба, ознаки недостатності, застосування у медицині.

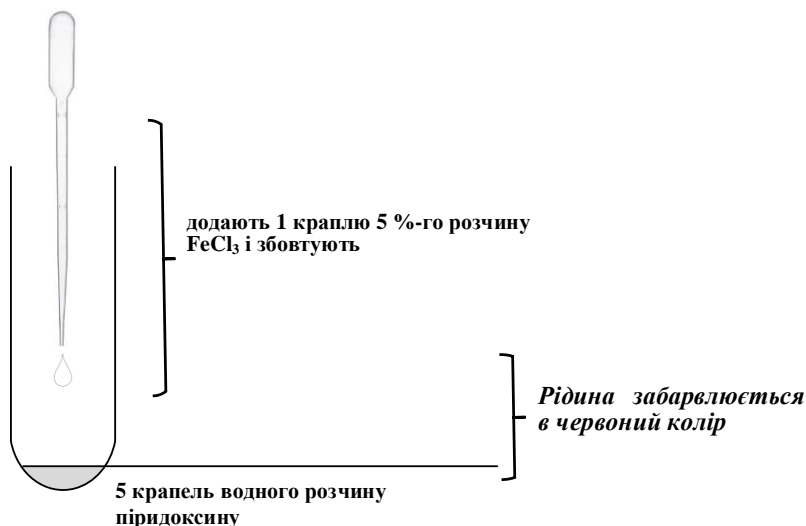
11. Вітаміноподібні речовини: визначення, структура та біологічна роль. Будова, властивості, участь у хімічних реакціях хінонових і карнітинових коферментів. Написати структурні формули убіхінону/убіхінолу і ацилкарнітину.

Завдання

1. Виконати практичну роботу «Феррихлоридна проба на піридоксин».

Клініко-діагностичне значення. Нормальний рівень вітаміну В6 у цільній крові людини становить 0,6 мкмоль/л, у сироватці крові – 0,4 мкмоль/л. Основною активною формою вітаміну В6 є фосфорний ефір піридоксалу, відомий як піридоксаль-5-фосфат (ПАЛФ). Обмежену біологічну активність проявляє піридоксамін-5-фосфат (ПАМФ), який бере участь тільки у реакціях переамінування. Ці коферменти входять до групи ферментів, які каталізують такі реакції: транспорт амінокислот через клітинні мембрани, переамінування, декарбоксилація, десульфування, знешкодження біогенних амінів, синтез гемопротейнів та сфінголіпідів. Недостатність цього вітаміну призводить до розвитку неврастенічного синдрому, почервоніння шкіри на спині рук, шиї та грудної клітки, гіперкератозу, сухості та блідості губ, а також можливого болю у м'язах вздовж нервів.

Принцип методу. При додаванні до розчину піридоксину розчину хлорного заліза утворюється комплексна сполука типу заліза феноляту, яка має характерний червоний колір. Матеріальне забезпечення: водний розчин піридоксину, 5% розчин FeCl_3 , пробірки.



Хід роботи. До 5 крапель водного розчину піридоксину додають 1 краплю 5% розчину FeCl_3 і збовтують. Рідина забарвлюється в червоний колір.

Висновок. _____

Виконати практичну роботу «Спектрофотометричне визначення вмісту ціанкобаламіну (вітаміну В12) методом показників».

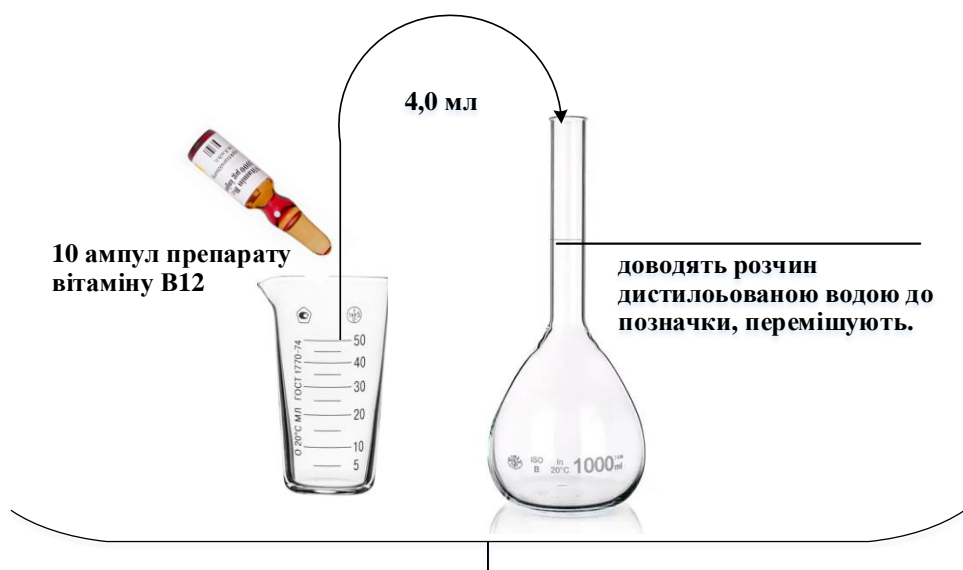
Клініко-діагностичне значення. Добова потреба вітаміну В12 в організмі залежить від віку. Дорослим людям у середньому потрібно 2–3 мкг на добу, дітям – від 0,3 до 1,4 мкг, підліткам – 2,0 мкг, а для вагітних і годуючих жінок рекомендована норма є дещо вищою – від 2,2 до 7,6 мкг на добу. При прийнятті традиційного раціону організм споживає приблизно 2–5 мкг на добу, що може перевищувати рекомендовану норму, хоча дослідження показали, що 6 мкг вітаміну В12 на день є достатнім для підтримки його нормального рівня у крові. Звичайна їжа містить 5–7 мкг кобаламіну на день, що задовольняє потребу організму. Вітамін В12 бере

участь у кровотворенні, метаболізмі жирів, синтезі ДНК, РНК, клітинних мембран і структур клітин, регулюванні циклу метилювання та інших процесах. Вітамін В12 запобігає розвитку злоякісної анемії, інфаркту та інсульту, використовується при лікуванні нервових захворювань, знімає тривогу, дратівливість, депресію, гіпертонію і склероз.

Принцип методу. Отримати навички спектрофотометричного визначення кількісного вмісту вітаміну В12 методом показників. Всі роботи виконують у захищеному від світла місці.

Матеріальне забезпечення: розчин вітаміну В12, дистильована вода, піпетки, пробірки, спектрофотометр.

Хід роботи. Розкривають 10 ампул препарату вітаміну В12 і виливають їхній вміст у хімічну склянку об'ємом 25 мл. Піпеткою відбирають 4,0 мл препарату, поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл, доводять розчин дистильованою водою до позначки, перемішують. Вимірюють оптичну густину отриманого розчину спектрофотометрично при довжині хвилі 361 нм у кюветі товщиною шару 1 см, використовуючи як розчин порівняння дистильовану воду.



Вимірюють оптичну густину отриманого розчину спектрофотометрично при довжині хвилі 361 нм у кюветі товщиною шару 1 см, використовуючи як розчин порівняння дистильовану воду

Вміст ціанкобаламіну (X) у г/мл вираховують за формулою:

$$X = 10 \times A \times V1 / A \times L \times V \times 1000 = 10 \times A \times V1 / A \times L \times 4 \times 1000 = A / 207 \times 4$$

де:

A – оптична густина досліджуваного розчину;

207 – питомий показник поглинання для ціанкобаламіну при довжині хвилі 361 нм;

V – об'єм препарату, взятий для розведення, мл;

V1 – кінцевий об'єм розчину, мл;

L – товщина шару розчину, см;

1000 – перевідний множник із л в мл;

10 – коефіцієнт зв'язку між питомим показником світлопоглинання та молярним коефіцієнтом світлопоглинання.

Вміст C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P (ціанкобаламіну) в 1 мл препарату повинен бути від 0,000180 до 0,000220 г (від 0,000450 до 0,000550 г).

Висновок. _____

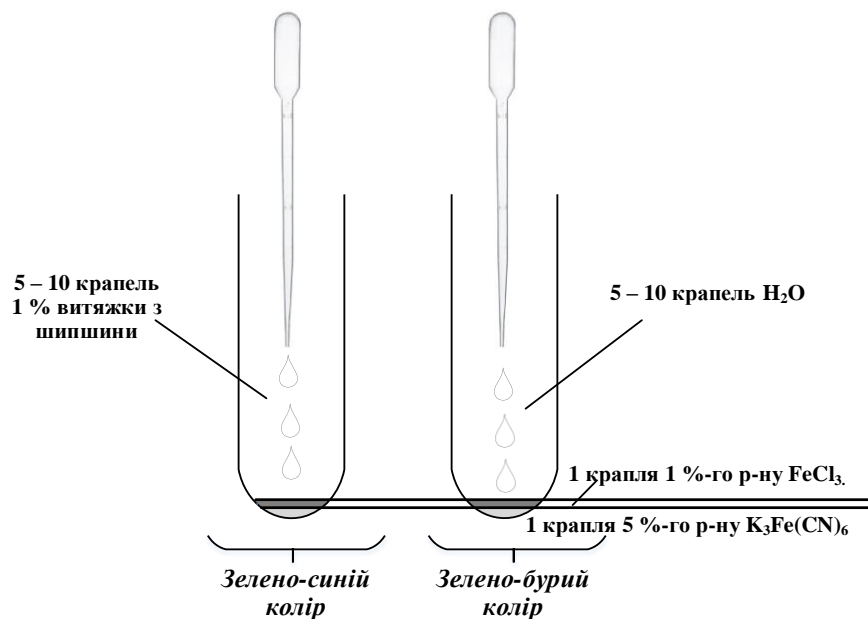
Виконати практичну роботу «Відновлення $K_3Fe(CN)_6$ аскорбіновою кислотою».

Клініко-діагностичне значення. Аскорбінова кислота з продуктами її розпаду виводиться з організму з сечею. У здорової людини протягом доби виводиться приблизно 20–35 мг або 113,55–170,33 мкмоль вітаміну С. Підвищений розпад аскорбінової кислоти спостерігається при гіпоацидному гастриті, виразковій хворобі, ентериті. Знижене виділення вітаміну С свідчить про дефіцит цього вітаміну. Гіповітаміноз вітаміну С призводить до розвитку хвороби скорбуту, що супроводжується синюшністю губ, нігтів, кровотечами з ясен, блідістю і сухістю шкіри, точковими підшкірними крововиливами, рухливістю і випаданням зубів, болями в суглобах і повільним загоюванням ран.

Принцип методу. Аскорбінова кислота відновлює $K_3Fe(CN)_6$ до $K_4Fe(CN)_6$, яка, реагуючи з $FeCl_3$, утворює сполуку синього кольору – берлінську лазур.

Матеріальне забезпечення: 5% розчин $K_3Fe(CN)_6$, 1% розчин $FeCl_3$, 1% витяжка з шипшини, дистильована вода, пробірки.

Хід роботи. У дві пробірки додають по одній краплі 5% розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 1% розчину $FeCl_3$. В одну з пробірок до зелено-бурої рідини, яка утворилася, додають 5–10 крапель 1% витяжки з шипшини, в другу – 5–10 крапель дистильованої води. Рідина в першій пробірці забарвлюється у зелено-синій колір і випадає синій осад берлінської лазури. При обережному нашаруванні дистильованої води осад на дні пробірки стає виразнішим. У другій пробірці зелено-бура рідина забарвлення не змінює.



Висновок. _____

Виконати практичну роботу «Реакція з феруму хлоридом на виявлення вітаміну Е».

Клініко-діагностичне значення. За сучасними уявленнями, головна роль токоферолів полягає у їхній здатності виступати як антиоксиданти. Альфа-токоферол містить лабільний атом гідрогену, який взаємодіє з пероксидними радикалами ліпідів, відновлюючи їх до гідропероксидів і, таким чином, перериваючи ланцюгову реакцію пероксидації.

Більшість проявів недостатності токоферолу пов'язані з його неефективністю у стримуванні самоокиснення ненасичених жирних кислот, які складають клітинні і субклітинні мембрани. Це може призводити до таких станів, як гемолітична анемія у недоношених дітей, атрофія

сім'яників і безпліддя, відшарування плода на ранніх стадіях вагітності та м'язова дистрофія, супроводжувана втратою внутрішньоклітинних азотистих компонентів і білків м'язів. Безпосередньою причиною м'язової дистрофії є виділення лізосомальних гідролаз через дефекти мембран лізосом.

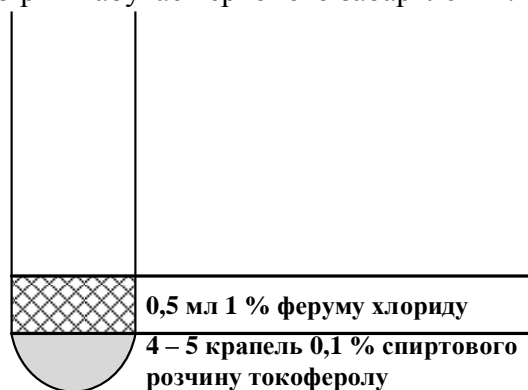


Принцип методу. Спиртовий розчин альфа-токоферолу окиснюється феруму хлоридом до токоферилхінону з утворенням червоного забарвлення.

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

Хід роботи. У суху пробірку вливають 4–5 крапель 0,1% спиртового розчину токоферолу, додають 0,5 мл 1% феруму хлориду, інтенсивно перемішують, нагрівають на відкритому вогні до зміни кольору. Вміст

пробірки набуває червоного забарвлення.



Нагрівають до зміни забарвлення

Вміст пробірки набуває червоного забарвлення

Висновок. _____

Виконати практичну роботу «Визначення вітаміну D імуноферментним аналізом».

Клініко-діагностичне значення. Вітамін D є стероїдною сполукою, яка бере участь у кишковій абсорбції та регулюванні гомеостазу кальцію. Дві основні форми вітаміну D, вітамін D3 (холекальциферол) і вітамін D2 (ергокальциферол), мають ізомерні структури, проте D2 є менш активним, ніж D3. Фізіологічні рівні вітаміну D3 є результатом не лише споживання з їжею, але також можуть бути отримані з попередників холестеролу, 7-дегідрохолестерину в шкірі під час перебування на сонці. D2, отриманий з рослинних джерел, становить менше 5% від загального вітаміну D в організмі. У печінці вітамін D гідроксильовується до 25-гідроксивітаміну D (25-OH D), основного циркулюючого метаболіту вітаміну D. Вітамін D і 25-OH D потрапляють у кровообіг, за рахунок взаємодії з вітамін D-зв'язуючим білком. За потреби невелика частина 25-OH D додатково гідроксильовується у нирках з утворенням біологічно активного гормону 1,25-дигідроксивітаміну D (1,25-(OH)₂D). Цей процес регулюється концентрацією 1,25-(OH)₂D, ПТГ, гіпофосфатемією та

йонізованими рівнями кальцію. Концентрації 1,25-(ОН)₂ є приблизно в 1000 разів нижчою, ніж 25-ОН D. Хоча 1,25-(ОН)₂ D є біологічно активною формою вітаміну D, проте вимірювання циркулюючого 25-ОН D забезпечує кращу інформативність щодо рівня вітаміну D пацієнтів і дозволяє використовувати його в діагностиці гіповітамінозу. Концентрація 25-ОН D зменшується у зимовий час (зменшено вплив сонця), в осіб з темним коліром шкіри і з віком. Визначення 25-ОН D у сироватці або плазмі крові дає можливість контролювати діагностику і терапію постменопаузального остеопорозу, рахіту в дітей, остеомалачії, ниркової остеодистрофії, неонатальної гіпокальціємії і гіперпаратиреозу. Інтоксикація вітаміном D відбувається під час прийому великої кількості фармацевтичних препаратів вітаміну D і може привести до гіперкальціємії і нефрокальцинозу в дітей. Про нестачу вітаміну 25-ОН D у крові людини свідчать такі концентрації: дефіцит <20 нг/мл, недостатність 21–30 нг/мл, нормальний рівень >30 нг/мл. Добова потреба – 100–500 МО. При різних патологічних станах, вікових особливостях, зміні клімату потреба в цьому вітаміні може суттєво зростати.

Принцип методу. 25-ОН вітамін D (загальний) ІФА набір – це твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА), який ґрунтується на принципі конкурентного зв'язування. На поверхні мікропланшета розміщені лунки, покриті моноклональним (мишачим) антитілом, спрямованим проти унікального антигенного сайту 25-ОН-молекули вітаміну D (25-ОН D). Зразок пацієнта інкубується разом з реагентом у лунках, щоб відокремити ендogenous 25-ОН D від вітаміну D-зв'язуючого білка. Відокремлений 25-ОН D потім зв'язується з покриттям антитіл у лунках. Після промивання додають мічений біотин-25-ОН D (ферментний кон'югат) і мічену пероксидазу стрептавідину (ферментний комплекс). Доданий біотин-25-ОН D конкурує з ендogenous 25-ОН D за зв'язування з покриттям антитіл. Потім стрептавідин-HRP виявляє пов'язаний біотин-25-ОН вітамін D. Після інкубації незв'язані компоненти змиваються. Кількість пов'язаного біотин-стрептавідинового комплексу зворотно пропорційна концентрації 25-ОН вітаміну D у зразку. Потім додають розчин субстрату, і після певного часу розвиток кольору припиняється. Інтенсивність утвореного кольору зворотно пропорційна концентрації 25-ОН вітаміну D у зразку. Поглинання вимірюють при 450 нм за допомогою рідера для мікропланшетів.

Матеріальне забезпечення: калібрований рідер для мікропланшетів; мікропіпетки змінної точності; абсорбуючий папір; дистильована або дейонізована вода; інкубатор 37°C; таймер; програмне забезпечення для обробки даних; MS E-5831 мікропланшет; 12 x 8 стріпи 96 лунок; лунки покриті 25-ОН D антитілом (моноклональним); MS E 5826 Release reag буфер вивільнення; MS E-5840 Conjugate Ферментний кон'югат; 25-ОН D антиген, кон'югований з біотином; Complex MS E-5841 Ферментний комплекс (Стрептавідин-пероксидаза кон'югат); SUBSTRATE FR E-0055 розчин субстрату; тетраметилбензидин (ТМБ); STOP SOLN FR E-0080 Стоп розчин (0,5 M H₂SO₄); WASH CONC 40x FR E-0030 Промивочний розчин.

Хід роботи.

Розподілити 50 мкл кожного стандарту, контролю і зразка з новими змінними наконечниками до відповідних лунок.

Розподіліть 150 мкл реагенту вивільнення в кожен лунку. Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. Важливо мати повне змішування на цьому етапі

Інкубувати протягом 60 хвилин при 37°C.

Швидко витрусіть вміст лунок.

Промийте лунки 4 рази по 400 мкл розведеного миючого розчину на лунку, якщо використовується вошер – або промийте лунки 4 рази по 300 мкл розведеного миючого розчину на лунку для ручного промивання. Постукати лунками різко об абсорбуючий папір для видалення залишкових крапель.

Важлива примітка: чутливість і точність цього аналізу помітно залежить від правильного виконання процедури промивки!

Додайте 50 мкл ферментного кон'югату в кожен лунку.

Додайте 50 мкл ферментного комплексу в кожен лунку.

Інкубувати протягом 30 хвилин при температурі 37°C.

Швидко витріть вміст лунки.

Промийте лунки 4 рази з 400 мкл розведеного миючого розчину на лунку, якщо використовується мийна машина – або промийте лунки 4 рази з 300 мкл розведеного миючого розчину на лунку для ручного промивання.

Постукати лунками різко об абсорбуючий папір для видалення залишкових крапель.

10. Додайте 100 мкл розчину субстрату в кожен лунку.

Інкубуйте протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.

Зупинити ферментативну реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку.

Визначити оптичну густину кожної лунки при 450 ± 10 нм з рідером мікропланшетів.

Рекомендується, щоб лунки були зчитані протягом 10 хвилин після додавання Стоп розчину.

1. Вносять по 50 мкл кожного стандарту, контролю і зразка у відповідні лунки

2. Додають 150 мкл реагенту вивільнення в кожен лунку. Ретельно перемішують упродовж 10 секунд.

3. Інкубують 60 хвилин при 37°C.

4. Промивають буфером для промивання 4 рази по 300 мкл, висушують фільтрувальним папером.

5. Додають по 50 мкл ферментного кон'югату та по 50 мкл ферментного комплексу в кожен лунку

6. Інкубують 30 хвилин при 37°C.

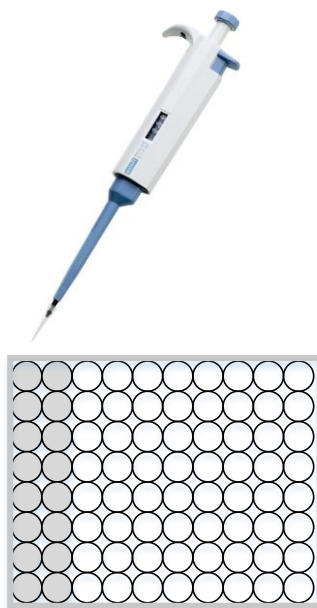
7. Промивають буфером для промивання 4 рази по 300 мкл, висушують фільтрувальним папером.

8. Додають у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату (ТМБ).

9. Інкубують при кімнатній температурі (18-25°C) упродовж 15 хвилин.

10. Додають у всі лунки по 100 мкл стоп-розчину.

11. Вимірюють величину оптичної густини при довжині хвилі 450nm.



Розрахунок результатів.

1. Обчислити середні значення поглинання для кожного набору стандартів, контролів і зразків пацієнтів.

2. Побудувати стандартну криву нанесенням середнього значення поглинання, отримане від кожного стандарту проти його концентрації.

Використовуючи значення середнього поглинання для кожного зразка, визначити відповідну концентрацію від стандартної кривої.

Концентрацію зразків можна зчитувати безпосередньо зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж у найвищого стандарту, треба розводити або повідомляти як такі. Для розрахунку концентрації цей коефіцієнт розбавлення потрібно брати до розрахунку.

Висновок. _____

2. Відповісти на контрольні запитання до практичної роботи.

2.1. У хворого спостерігають кровоточивість ясен, болі в м'язах і суглобах, підшкірні точкові крововиливи. Нестача якого вітаміну є причиною описаних змін та яким методом його можна виявити у сечі?

2.2. При тривалому лікуванні ізоніазидом хворих на туберкульоз виникають порушення, пов'язані з недостатністю вітаміну В6. Яка причина такого стану? _____

2.3. За добу в людини виділяється 10 мг вітаміну С. Чи забезпечений організм цим вітаміном? Поясніть відповідь. _____

2.4. За добу в людини виділяється 70 мг аскорбінової кислоти. Як оцінити отримані дані? _____

2.5. У пацієнта виявлений гіповітаміноз В6. Порушення яких хімічних процесів буде спостерігатися при цьому? _____

2.6. Виявлення вітаміну Е реакцією з феруму хлоридом. Поясніть принцип методу. _____

3. Вирішити ситуаційні задачі.

3.1. У хворого із сечею виділяється підвищена кількість пірвіноградної кислоти, яка є альфа-кетокислотою. Про нестачу якого вітаміну в організмі це свідчить? _____

3.2. Добова потреба дорослої людини в ніотиновій кислоті становить у середньому 20 мг, проте зменшується, якщо вміст триптофану в їжі вищий. Що можна сказати про взаємозв'язок між ніотиною кислотою і триптофаном з огляду на це? _____

3.3. У хворого діагностований гастрит з послабленою секрецією гідрохлоридної кислоти. Який авітаміноз може виникнути в цьому випадку? Чому? Яке захворювання розвивається внаслідок _____ цього гіповітамінозу? _____

3.4. Після годування курчат очищеним рисом серед них була зареєстрована висока смертність внаслідок паралічу нижніх, а пізніше і верхніх кінцівок. Що стало причиною загибелі курчат? _____

3.5. Наприкінці XIX і на початку XX століть поширеним захворюванням серед людей, які не споживали м'яса і молока, а харчувались переважно кукурудзою, була пелагра. Поясніть, що таке пелагра і чому таке харчування призводило до розвитку пелагри.

3.6. У групи мисливців, які тривалий період перебували на дрейфуючій станції в районі Північного полюсу, з'явилися такі клінічні прояви: гіперкератоз, алопеція, загальне виснаження організму. Ці симптоми супроводжувались головним болем, втратою апетиту, диспептичними проявами (нудота, блювання). Який гіповітаміноз розвинувся? _____

3.7. У пілотів та водіїв, що працюють в умовах переключення уваги від освітлених приладів до темряви, збільшується добова потреба у вітаміні А. Поясніть біохімічний механізм цього явища. _____

Дата виконання _____

Підпис викладача _____