

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО
КАФЕДРА БІОЛОГІЧНОЇ ХІМІЇ

БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ

Навчально-методичний посібник
для студентів медичного факультету
(другий магістерський рівень)

(частина 1)

Львів 2022

УДК 612.015 (075)

Б 63

БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ. Навчально-методичний посібник для студентів медичного факультету (другий магістерський рівень) (ч.1): Л. І. Кобилінська, Т. М. Макаренко, Л. П. Білецька, І. І. Лозинська, О. Є. Мазур, Ю. М. Федевич, І. С. Фоменко, О. П. Хаврона. 2022. 197 с.

Рецензенти:

Г. С. Маслак – д-р. біол. н., доц., завідувачка кафедри біохімії та медичної хімії Дніпропетровської медичної академії.

І. В. Геруш – к. мед. н., доц., завідувач кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Буковинського державного медичного університету.

Затверджено на засіданні профільної методичної комісії з фізико-хімічних дисциплін 31 серпня 2017 р.

Затверджено на засіданні ЦМК Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького 26 жовтня 2017 р.

Посібник розроблений згідно робочої програми дисципліни «Біологічна хімія» (2021) для спеціальності 222 «Медицина» галузі знань 22 «Охорона здоров'я» у відповідності з освітньо-кваліфікаційними характеристиками та освітньо-професійними програмами підготовки фахівців відповідно до Стандарту вищої освіти України (другий магістерський рівень) з врахуванням досвіду викладання на кафедрі біохімії ЛНМУ імені Данила Галицького.

ЗМІСТ

Вступ.	5
Загальні правила техніки безпеки при роботі студентів у навчальній хімічній лабораторії.	8
Перелік практичних навичок, якими повинні оволодіти студенти під час лабораторного практикуму.	9
Критерії оцінювання поточної навчальної діяльності студента.	10
Розділ 1. Біохімія як наука. Загальні закономірності метаболізму. Будова і властивості ензимів. Медична ензимологія.	12
Тема № 1. Предмет і завдання біохімії. Мета і методи проведення біохімічних досліджень; їх обґрунтування та клініко-діагностичне значення.	12
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.	40
Тема № 3. Дослідження регуляції ферментативних процесів та аналіз механізмів виникнення ензимопатій. Медична ензимологія.	53
Тема № 4. Роль водо- та жиророзчинних вітамінів у метаболізмі живих організмів. Дослідження ролі кофакторів та коферментних вітамінів у прояві каталітичної активності ферментів.	65
Розділ 2. Молекулярні основи біоенергетики.	
Тема № 5. Обмін речовин і енергії. Дослідження функціонування циклу трикарбонових кислот.	76
Тема № 6. Дослідження процесів біологічного окиснення, окисного фосфорилювання та синтезу АТФ. Дослідження дії інгібіторів та роз'єднувачів окисного фосфорилювання та синтезу АТФ.	87
Розділ 3. Метаболізм вуглеводів в нормі та при патології, регуляція обміну вуглеводів.	
Тема № 7. Особливості травлення вуглеводів у ШКТ. Дослідження гліколізу – анаеробного окиснення вуглеводів.	101
Тема № 8. Дослідження аеробного окиснення глюкози та альтернативних шляхів обміну моносахаридів.	109
Тема № 9. Дослідження катаболізму та біосинтезу глікогену. Регуляція обміну глікогену, біосинтез глюкози – глюконеогенез.	119
Тема № 10. Дослідження механізмів метаболічної та гормональної регуляції обміну вуглеводів. Цукровий діабет.	129
Розділ 4. Метаболізм ліпідів в нормі та при патології. Регуляція обміну ліпідів.	
Тема № 11. Особливості травлення ліпідів у ШКТ. Дослідження катаболізму і біосинтезу триацилгліцеролів та фосфоліпідів. Внутрішньоклітинний ліполіз та молекулярні механізми його регуляції.	137
Тема № 12. Бета-окиснення та біосинтез жирних кислот. Дослідження обміну жирних кислот та кетонових тіл.	150

Тема № 13. Біосинтез та біотрансформація холестеролу. Патології ліпідного обміну: стеаторея, атеросклероз, ожиріння. Транспортні форми ліпідів – ліпопротеїни плазми крові.	158
Розділ 5. Метаболізм амінокислот в нормі та при патології. Регуляція обміну амінокислот.	
Тема № 14. Дослідження травлення білків у ШКТ, внутрішньоклітинних загальних шляхів перетворень амінокислот (трансамінування, дезамінування, декарбоксилювання).	171
Тема № 15. Дослідження процесів детоксикації аміаку та біосинтезу сечовини. Біосинтез глутатіону та креатину.	181
Тема № 16. Специфічні шляхи обміну амінокислот. Спадкові та набуті порушення специфічних шляхів обміну амінокислот. Аміноацидурії: їх причини та наслідки.	187
Література.	195

ВСТУП

Біологічна хімія належить до фундаментальних медичних дисциплін. Знання біохімічних процесів, що відбуваються на різних рівнях організації – клітинному, органному, тканинному та цілому організмі – необхідні студентам-медикам як для розуміння метаболічних процесів обміну речовин, енергії, перебігу реакцій розпаду та синтезу, передачі спадкової інформації, процесів, що забезпечують перебіг фізіологічних функцій, так і для інтерпретації біохімічних показників з діагностичною або прогностичною метою у клінічній практиці.

Посібник розроблений згідно робочої програми дисципліни «Біологічна хімія» (2022) для спеціальності 222 «Медицина» галузі знань 22 «Охорона здоров'я» у відповідності з освітньо-кваліфікаційними характеристиками та освітньо-професійними програмами підготовки фахівців відповідно до Стандарту вищої освіти України (другий магістерський рівень) з врахуванням досвіду викладання на кафедрі біохімії ЛНМУ імені Данила Галицького.

Викладання «Біологічної хімії» для спеціальності 222 «Медицина» здійснюється впродовж III – IV семестрів 2-ого року навчання і включає 18 годин лекцій; 80 годин - практичних занять; 97 годин – самостійної роботи, що відповідає 6,5 кредитам ECTS.

На практичних заняттях студенти мають засвоїти визначений програмою навчальний матеріал, провести лабораторне дослідження різних речовин та інтерпретувати їх клініко-діагностичну роль. До кожного розділу студентам пропонуються теми для індивідуальної самостійної роботи та тести.

Посібник спрямований на поглиблення рівня засвоєння знань студентів шляхом інтеграції аудиторної та самостійної роботи. Суттєва увага при вивченні біологічної хімії приділяється клінічним аспектам – вивченню спадкових та набутих порушень обміну речовин, ензимопатій, питань застосування ензимів як фармпрепаратів, а також патохімічних процесів, які відбуваються при розвитку та перебігу цукрового діабету, атеросклерозу, ревматизму, інфаркту міокарда, захворювань травної системи тощо.

Для покращення засвоєння навчального матеріалу студенти мають використовувати сучасні підручники та посібники, що підготовлені провідними спеціалістами України та працівниками кафедри біохімії Львівського національного медичного університету.

Кінцеві цілі при вивченні навчальної дисципліни „Біологічна хімія” пов'язані з тим, що студент у своїй майбутній професійній діяльності повинен вміти:

- Аналізувати відповідність структури біоорганічних сполук фізіологічним функціям, які вони виконують в організмі людини.
- Інтерпретувати особливості фізіологічного стану організму та розвитку патологічних процесів на основі лабораторних досліджень.
- Аналізувати реакційну здатність вуглеводів, ліпідів, амінокислот, що забезпечує їх функціональні властивості та метаболічні перетворення в організмі.

- Інтерпретувати особливості будови та перетворень в організмі біоорганічних сполук як основи їх фармакологічної дії в якості лікарських засобів.
- Інтерпретувати біохімічні механізми виникнення патологічних процесів в організмі людини та принципи їх корекції.
- Пояснювати основні механізми біохімічної дії та принципи спрямованого застосування різних класів фармакологічних засобів.
- Пояснювати біохімічні та молекулярні основи фізіологічних функцій клітин, органів і систем організму людини.
- Аналізувати функціонування ферментативних процесів, що відбуваються в мембранах і органелах для розуміння інтеграції обміну речовин.
- Класифікувати результати біохімічних досліджень та зміни біохімічних і ферментативних показників, що застосовуються для діагностики найпоширеніших хвороб людини.
- Інтерпретувати значення біохімічних процесів обміну речовин та його регуляції в забезпеченні функціонування органів, систем та цілісного організму людини.

Під час вивчення «Біологічної хімії» студент повинен оволодіти загальними і фаховими компетентностями.

Загальні компетентності:

- Здатність до абстрактного мислення, аналізу та синтезу.
- Здатність вчитися і оволодівати сучасними знаннями.
- Здатність застосовувати знання у практичних ситуаціях.
- Знання та розуміння предметної галузі та розуміння професійної діяльності.
- Здатність до адаптації та дії в новій ситуації.
- Здатність приймати обґрунтовані рішення.
- Здатність працювати в команді.
- Здатність до міжособистісної взаємодії.
- Здатність спілкуватися іноземною мовою.
- Здатність використовувати інформаційні і комунікаційні технології.
- Здатність до пошуку, опрацювання та аналізу інформації з різних джерел.
- Визначеність і наполегливість щодо поставлених завдань і взятих обов'язків.
- Здатність зберігати та примножувати моральні, культурні, наукові цінності і досягнення суспільства на основі розуміння історії та закономірностей розвитку предметної області, її місця у загальній системі знань про природу і суспільство та у розвитку суспільства, техніки і технологій, використовувати різні види та форми рухової активності для активного відпочинку та ведення здорового способу життя.

Фахові компетентності:

- Здатність збирати медичну інформацію про пацієнта і аналізувати клінічні дані.
- Здатність до визначення необхідного переліку лабораторних та інструментальних досліджень та оцінки їх результатів.

- Здатність до встановлення попереднього та клінічного діагнозу захворювання.
- Здатність до діагностування невідкладних станів.
- Здатність до оцінювання впливу навколишнього середовища, соціально-економічних та біологічних детермінант на стан здоров'я індивідуума, сім'ї, популяції.
- Зрозуміло і неоднозначно доносити власні знання, висновки та аргументацію з проблем охорони здоров'я та дотичних питань до фахівців і нефахівців, зокрема до осіб, які навчаються.
- Здатність розробляти і реалізовувати наукові та прикладні проекти у сфері охорони здоров'я.
- Дотримання етичних принципів при роботі з пацієнтами, лабораторними тваринами.
- Дотримання професійної та академічної доброчесності, нести відповідальність за достовірність отриманих наукових результатів

Самостійна робота студентів:

1. є обов'язковою формою роботи, яка забезпечує глибоке засвоєння навчального матеріалу;
2. виконується у спеціальних зошитах письмово за наведеним алгоритмом;
3. перевірка самостійної роботи здійснюється викладачами під час проведення контрольної роботи на заняттях.

Алгоритм самостійного вивчення навчального матеріалу:

А. Письмова підготовка відповідей до

- кожного теоретичного контрольного питання теми, що вивчається, з використанням лекційного матеріалу, основної та додаткової літератури. (Перелік теоретичних контрольних питань до занять наведений у методичних вказівках для практичних занять з “Біологічної хімії”);
- контрольних питань з практичної роботи;
- ситуаційних задач до теми.

Б. Підготовка за вирішенням тестів, включених до інтегративного іспиту “Крок-1” проводиться

за посібниками:

- Склярів ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
- Склярів ОЯ, Гайова ЛВ, редактори. Посібник з біологічної хімії «Крок-1. Стоматологія». Київ: Медицина; 2019. 360 с.

за даними сайтів:

- ЛНМУ – <http://www.meduniv.lviv.ua/index.php>
- Центру тестування - <http://www.testcentr.org.ua>

- Дистанційного навчання в ЛНМУ – <http://misa.meduniv.lviv.ua>

В. Індивідуальна самостійна робота студентів виконується у вигляді реферату за планом:

- Назва.
- План реферативної роботи.
- Відповіді на питання за планом.
- Список використаної літератури.

ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ СТУДЕНТІВ У НАВЧАЛЬНІЙ ХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1. Перебуваючи в хімічній лабораторії, необхідно суворо дотримуватись загальних правил техніки безпеки, пам'ятаючи, що будь - яке порушення може призвести до нещасного випадку.
2. У хімічній лабораторії працювати тільки в медичних халатах та шапочках. Довге волосся має бути акуратно підібране.
3. На робочому місці залишати тільки необхідні речі (книгу, зошити, ручки), всі інші речі (портфелі, сумки) зберігати в спеціально відведеному для цього місці, одяг у гардеробі.
4. Кожен студент повинен працювати за закріпленим за ним місцем, перехід на інше робоче місце без дозволу викладача не допускається.
5. Категорично забороняється виконувати в лабораторії роботи, не пов'язані із виконанням навчального практикуму.
6. Реактиви після їх використання необхідно ставити на відведене місце.
7. Роботи з концентрованими кислотами, лугами слід проводити обережно, під витяжною шафою, щоб виключити можливість їх потрапляння в очі, а також появи опіків і пошкодження одягу.
8. Бути обережним при роботі з електроприладами. Працювати тільки із заземленим обладнанням.
9. При запалюванні газу, кран пальника відкривати поступово.
10. Для уникнення нещасних випадків не працювати з леткими та легкозаймистими речовинами поблизу запаленого пальника.
11. Користуватись горючими і токсичними речовинами (галогени, концентровані кислоти, луги, сірководень і т.д.), а також проводити досліди, які супроводжуються виділенням шкідливих парів, газів, дозволяється тільки у витяжній шафі.
12. При нагріванні речовин у пробірці - не направляти її отвір у бік товариша, який працює, або до себе.
13. Не можна залишати в лабораторії без нагляду включені фотоелектроколориметри, водяні бані, газові пальники, центрифуги тощо.

14. У випадку пожежі негайно погасити найближчі пальники і гасити вогонь використовуючи вогнегасник, покривало, пісок.
15. При опіках: а) сильними лугами – необхідно промити уражені ділянки тіла водою і накласти компрес, змочений 1% розчином оцтової кислоти; б) сильними кислотами – необхідно промити уражені ділянки тіла водою і накласти компрес, змочений 1% розчином соди; в) фенолом – необхідно розтерти побілілу від опіку ділянку до нормального стану шкіри, а потім промити водою і накласти пов'язку з гліцерином.
16. У разі потрапляння кислоти або лугу в очі необхідно промити їх великою кількістю води, а потім 2% розчином соди або борної кислоти, відповідно.
17. Не виливати у раковину вміст пробірок з концентрованими кислотами та лугами.
18. Не кидати папір, сірники, побитий посуд в водостічну раковину, для цього користуватись ящиками для сміття.
19. Після закінчення роботи привести в порядок своє робоче місце, протерти полиці і стіл вологою ганчіркою, поставити посуд з реактивами на відведене місце, виключити воду та газ.
20. З метою уникнення контакту з інфекційними збудниками бактеріального чи вірусного походження (SARS-CoV-2 та інші) в лабораторії знаходиться в респіраторі чи масці, практичну роботу виконувати в гумових/латексних рукавичках.
21. Під час заняття мобільні телефони повинні бути виключеними.

**Перелік практичних навичок,
якими повинні оволодіти студенти під час лабораторного практикуму**

1. Пояснити основні принципи визначення активності ферментів на прикладі амілази слини.
2. Пояснити термолабільність ферментів на прикладі визначення активності амілази слини, яка попередньо нагріта або охолоджена та попередньо не оброблена.
3. Намалювати графік залежності активності фермента від рН середовища за результатами визначення активності амілази слини. Пояснити його.
4. Як довести абсолютну специфічність сахарози в експерименті?
5. Пояснити вплив модуляторів на активність ферментів на прикладі визначення активності альфа-амілази слини. Назвати модулятори холінестерази крові.
6. Як оцінити вплив маленової кислоти на активність ферментів ЦТК? Назвіть тип інгібування.
7. Визначення глюкози крові глюкозооксидазним методом. Пояснити принцип цього методу. Пояснити клініко-діагностичне значення визначення глюкози крові.
8. Визначення кінцевого продукту анаеробного гліколізу – молочної кислоти. Пояснити принцип методу та клініко-діагностичне значення визначення лактату в крові.
9. Виявлення ацетону (кетонових тіл) в крові та сечі. Пояснити принцип методу та клініко-діагностичне значення виявлення кетонових тіл в крові та сечі.
10. Визначення вмісту піровиноградної кислоти в біологічній рідині. Пояснити принцип методу та клініко-діагностичне значення визначення пірувату в крові та сечі.
11. Пояснити клініко-діагностичне значення визначення вмісту холестерину в крові людини? У пацієнта вміст холестеролу крові становить 25 ммоль/л. Дайте діагностичну оцінку даному показнику, вказавши нормальні показники холестерину крові. Пояснить можливі причини і наслідки такого стану для організму.

12. Пояснити клініко-діагностичне значення визначення в крові ЛПНЩ, ЛПДНЩ і ЛПВЩ. Поясніть, які зміни ліпопротеїнів крові характерні для атеросклерозу, для цукрового діабету?
13. Вивчення дії ліпази підшлункової залози в присутності жовчі і без неї. Пояснити значення жовчних кислот у процесах травлення.
14. Пояснити принцип визначення трансаміназ крові та клініко-діагностичне значення визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ) крові. Пояснити клініко-діагностичне значення визначення коефіцієнта де Рітиса.
15. Пояснити клініко-діагностичне значення визначення сечовини в крові та сечі. У хворого виявлено у крові вміст сечовини вище 9,0 ммоль/л, а в сечі добове виділення менше 20 г/добу. Поясніть причини таких змін. Вкажіть норму вмісту сечовини крові та добового виділення із сечею.
16. Визначення креатиніну в крові та сечі. Пояснити принцип методу та клініко-діагностичне значення визначення креатину і креатиніну у крові та сечі.
17. Якісна реакція на фенілпіровиноградну кислоту. Як називається метод? Пояснити принцип методу і клініко-діагностичне значення визначення фенілпірувату в сечі.

Критерії оцінювання поточної навчальної діяльності студента

Поточний контроль навчальної діяльності здійснюється на кожному занятті відповідно до конкретних цілей, а також під час індивідуальної роботи викладача зі студентом для тих тем, які студент опрацьовує самостійно.

Контрольні засоби включають:

- A. Усне опитування студентів.
- B. Письмові відповіді студентів на стандартні тестові завдання, що включають 20 тестів українською та англійською мовами. У навчальному процесі використовують відкриті тести, з однією або декількома правильними відповідями.
- C. Виконання письмових завдань у кількості трьох питань. Завдання представлені у вигляді ланцюгів перетворень біоорганічних сполук, переліку певних біохімічних показників, заповнення таблиць, складання схем, написання рівнянь хімічних реакцій тощо.
- D. Виконання практичних (лабораторних) робіт, оформлення протоколу практичного заняття.
- E. Виконання індивідуальної самостійної роботи студента здійснюється при засвоєнні тем розділів. Бали за ІСРС нараховуються при успішному її захисті під час усного чи письмового опитування на практичному занятті.

Оцінювання поточної навчальної діяльності.

Під час оцінювання засвоєння кожної теми за поточну навчальну діяльність студенту виставляються оцінки за 4-ри бальною (традиційною) шкалою з урахуванням затверджених критеріїв оцінювання для відповідної дисципліни. При цьому враховуються усі види робіт, передбачені навчальною програмою.

Оцінку «**відмінно**» одержує студент, який бездоганно засвоїв теоретичний матеріал, взяв активну участь в обговоренні найбільш складних питань з теми

заняття, дав не менше 90% правильних відповідей на стандартизовані тестові завдання (19-20 з 20), без помилок відповів на письмові завдання, виконав практичну роботу та оформив протокол. Студент логічно мислить і будує відповідь, вільно використовує набуті теоретичні знання при аналізі практичного матеріалу, демонструє високий рівень засвоєння практичних навичок, набув фахових і навчальних компетентностей.

Оцінку *«добре»* одержує студент, який добре засвоїв теоретичний матеріал, взяв участь в обговоренні найбільш складних питань з теми, дав не менше 75% правильних відповідей на стандартизовані тестові завдання (17-18 з 20), припустився окремих незначних помилок у відповідях на письмові завдання, виконав практичну роботу та оформив протокол. Студент висловлює свої міркування з приводу тих чи інших проблем, але припускається певних неточностей і похибок у логіці викладу теоретичного змісту, при аналізі результатів практичної роботи. Набув практичні навички і майже всі компетентності.

Оцінку *«задовільно»* одержує студент, який не брав участь в обговоренні найбільш складних питань з теми, дав не менше 60% правильних відповідей на стандартизовані тестові завдання (15-16 з 20), припустився значних помилок у відповідях на письмові завдання, виконав практичну роботу та оформив протокол. В цілому опанував теоретичні знання, демонструє невпевненість або відсутність стабільних знань, допускає неточності, не вміє оцінювати факти і явища, пов'язувати їх з майбутньою практичною діяльністю. Оволодів деякими практичними навичками і компетентностями.

Оцінку *«незадовільно»* одержує студент, який не брав участь в обговоренні найбільш складних питань з теми, дав менше 60% правильних відповідей на стандартизовані тестові завдання (14 і менше), припустився грубих помилок у відповідях на письмові завдання або взагалі не дав відповідей на них, не виконав практичну роботу та не оформив протокол. Не знає наукових визначень і фактів, не орієнтується у рекомендованій навчальній літературі, практичні навички і компетентності не сформовані.

РОЗДІЛ 1.
БІОХІМІЯ ЯК НАУКА.
ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ.
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: Знати предмет і завдання біологічної хімії, методи біологічних досліджень, які використовуються в клінічній практиці. Оволодіти деякими фізико-хімічними методами досліджень біологічно важливих речовин, а також ознайомитися з апаратурою, що використовується в біохімії. Знати фактори, дія яких призводить до похибки біохімічних досліджень.

Актуальність теми: Біохімія – це наука, яка вивчає хімічний склад живих організмів, будову, властивості, локалізацію та роль наявних у них сполук, шляхи їх виникнення і перетворення, а також притаманні живій клітині хімічні процеси, які в сукупності забезпечують обмін речовин й перетворення енергії. Через біохімію лежить шлях до розв'язання основних питань природознавства і медицини, зокрема, проблеми синтезу білків, лікування спадкових захворювань, довголіття.

У біохімічних дослідженнях використовуються сучасні фізико-хімічні, фізичні та математичні методи. Біохімічні показники використовуються для діагностики, лікування та профілактики захворювань.

Компетентності фахові:

- знати етапи та закономірності становлення біохімії як фундаментальної медико – біологічної науки та навчальної дисципліни;
- знати принципи методів біохімічних досліджень функціонального стану організму людини в нормі та при патології;
- використовувати результати біохімічного аналізу для оцінки стану певних ланок обміну речовин;
- вміти визначати оптичну густину забарвлених розчинів при різних довжинах хвиль на фотоелектроколориметрі; правильно інтерпретувати отримані результати;
- вміти оцінювати помилки при біохімічних дослідженнях з метою їх запобігання;
- знати принципи основних біохімічних методів, що використовуються у медичній практиці.

Базові знання:

Дисципліна: Біологічна та біоорганічна хімія.

Отримані навички: знати хімічний склад живого організму; біомолекули (білки, вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти, гормони, вітаміни тощо) та їх біохімічні функції.

Дисципліни: Медична біологія, гістологія.

Отримані навички: знати структурні елементи прокаріотичних та еукаріотичних клітин; основні функції субклітинних органел.

Теоретичні питання

1. Предмет і завдання біохімії. Основні напрямки та 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 й енергії та їх зв'язок із зовнішнім середовищем.
4. Структурні елементи прокаріотичних та еукаріотичних клітин. Основні функції субклітинних органел, їх фракційне розділення методом ультрацентрифугування.
5. Принципи основних методів біохімічних досліджень: осадження речовин з розчину, висолювання білків; оптичні методи в біохімії (фотоелектроколориметрія, спектрометрія, спектрофотометрія, люмінісцентний аналіз, флюоресцентна гібридизація *in situ*); електрофорез (горизонтальний, диск-електрофорез, ізоелектричне фокусування, імуноелектрофорез); хроматографія (афінна, іонообмінна, 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.

Наукові напрями роботи кафедри біохімії

Понад 100 років минуло з часу створення кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Традиційно наукова діяльність кафедри була тісно пов'язана з проблемами практичної медицини.

Кафедра біохімії була заснована у 1894 р. при медичному факультеті Львівського Університету професором Владиславом Неміловичем (1863-1904), який у 1891 році на запрошення Львівського університету приїхав з Відня працювати доцентом з фармакогнозії і одночасно читав лекції з хімії.

З 1906 по 1919 рр. кафедрою завідував професор Станіслав Людвіг Філіп Бондзінський (1862-1929), який розгорнув велику педагогічну і наукову діяльність. Темою наукової роботи кафедри під його керівництвом були так звані оксипротейнові кислоти – продукти білкового характеру, які в невеликій кількості виділяються з сечею. В цей час колективом кафедри проводились дослідження жовчних пігментів і продуктів їх обміну, вивчався склад кісток зубів, досліджувався обмін холестеролу, вплив алкоголю на

метаболічні процеси, вивчався склад жирів молока, обмін кофеїну, теоброміну в організмі людини. Проводились клінічні дослідження ацетилсаліцилової кислоти та її ефірів. Професор С. Бондзінський написав близько 30 наукових робіт.

Короткий час з 1919 по 1922 р. кафедрою завідував вчений світового рівня, біохімік, патофізіолог, професор Вацлав Морачевський, який пізніше був ректором Медичної ветеринарної академії у Львові. Професор В. Морачевський видав близько 180 наукових робіт.

З 1922 по 1941 рік кафедрою завідував професор Якуб Парнас (1884-1949). Під його керівництвом було вивчено ряд актуальних питань біохімії, а саме, особливості метаболізму глікогену, взаємозв'язок процесів гліколізу і спиртового бродіння, зв'язки між реакціями гліколізу та іншими ферментативними перетвореннями в м'язах. Були досліджені процеси анаеробного обміну вуглеводів, який у біохімічній літературі відомі як теорія Ембдена-Мейергофа-Парнаса. Під його керівництвом кафедра активно включилась у вивчення процесів обміну аденолової кислоти в м'язах та її роль в утворенні аміаку, проводились дослідження обміну похідних пурину та особливостей їх метаболізму при діабеті, особливостей метаболізму стереоізомерних молочних кислот в організмі та інше. Я. Парнас вперше у світі застосував радіоактивні ізотопи в біохімічних дослідженнях. На кафедрі були створені біохімічна лабораторія і бібліотека. Я. Парнас був організатором і науковим керівником хіміко-фармацевтичного інституту Львівського університету, а також діючого і зараз Львівського фармацевтичного заводу, деканом медичного та хіміко-фармацевтичного факультетів. Колектив кафедри біохімії під керівництвом професора Я. Парнаса ввійшов в історію як „Школа професора Парнаса”, його працівники з часом стали провідними біохіміками вищих навчальних закладів Європи, а Львівський інститут медичної хімії займав одне з перших місць серед світових центрів біохімії. Колективом було видано більше 300 наукових праць. Я. Парнас видав більше 170 наукових робіт, у тому числі 5 підручників.

З 1944 по 1973 рр. завідувачем кафедри був учень Я. Парнаса професор Богдан Собчук (1909-1974). Основні напрями наукової роботи кафедри під його керівництвом – обмін вуглеводів у злоякісних пухлинах та дія оксиду вуглецю (II) на гемові білки, а також вивчення біохімічних процесів при різних патологіях організму людини. Проводились дослідження обміну йоду та функції щитоподібної залози, був розроблений і впроваджений у практику метод визначення йоду. Професор Б. Собчук опублікував близько 70 наукових праць.

З 1974 по 1995 рр. кафедрою керував професор Михайло Шлемкевич (1928-1998). Під його керівництвом на кафедрі біохімії у тісній співпраці з кафедрою онкології вивчали індивідуальну чутливість ракових пухлин шлунку людини при застосуванні хіміотерапії, зокрема 5-фторурацилу; досліджували механізми розвитку резистентності до лікарських засобів; вивчали особливості нуклеїнового і вуглеводного обмінів у злоякісних клітинах. У дослідженнях були використані фармацевтичні препарати, мічені радіоактивними ізотопами. На кафедрі проводились також експерименти з метою вивчення змін у вуглеводному та нуклеїновому обмінах при отруєнні чадним газом, були запропоновані нові методи вивчення монооксиду вуглецю в повітрі, карбоксигемоглобіну в крові.

З 1995 по 1998 роки кафедрю очолював академік УАННП професор Михайло Тимочко (1935-1998). Основними напрямами робіт, що здійснювались під його керівництвом, були вивчення впливу шкідливих екологічних факторів на функції органів травної системи, дослідження ролі енергетичного обміну в патогенезі хронічних захворювань печінки, серцево-судинної системи, визначення ступеня ризику в абдомінальній та ендокринній хірургії, визначення рівня інтоксикації у онкологічних хворих, вивчення процесів пероксидного окиснення ліпідів та стану антиоксидантної системи в експерименті та клініці. Основним напрямом наукових досліджень професора М. Тимочка було вивчення процесів формування адаптаційно-компенсаторних процесів за умов норми та патології, зокрема вивчення особливостей кисеньзалежних процесів, реалізації оксидативного стресу в умовах

експерименту та клініки. Професор М. Тимочко є співавтором відкриття, зареєстрованого Міжнародною інформаційною інтелектуальною палатою реєстрації нововведень (1997 р) «Механізм життєзабезпечення високорезистентних до гіпоксії індивідів в експериментальних проявах». Професор М. Тимочко підготував близько 450 наукових робіт.

З 1998 по 2021 рік кафедрою завідував заслужений працівник освіти України (2020), заслужений професор ЛНМУ імені Данила Галицького, академік УАН (1994), Всесвітньої Угорської медичної академії (1996); Соросівський доцент (1997); член Польської академії наук, кількох європейських наукових асоціацій Олександр Склярів. Кафедра тісно співпрацювала з кафедрою клінічної аналітики Люблінського медичного університету (Польща). У рамках договорів з кафедрою клінічної аналітики Люблінського медичного університету (завідувач професор Я. Сольський), підписаних у 2000 та 2007 рр. було проведено 8 міжнародних Львівсько-Люблінських конференцій з експериментальної та клінічної біохімії, здійснювалося стажування працівників, проводилися спільні дослідження, за реалізацію яких професор О. Склярів був нагороджений медаллю Люблінського медичного університету та медаллю мера міста Люблін. На кафедрі проводилися дослідження по вивченню впливу стресу на цитопротективні та ульцерогенні механізми слизової оболонки органів травної системи, метаболічні та іонно-транспортні процеси, вплив екзоєкологічних факторів на ендоекологічний стан внутрішнього середовища, дослідження ролі прозапальних систем організму (ЦОГ-2/ПГ, 5-ЛОГ/ЛТ, iNOS/NO) у патогенезі захворювань травного тракту (виразкова хвороба шлунка, ульцерогенний коліт, гострий панкреатит тощо) та їх взаємозв'язок із процесами ліпопероксидації у клітинах; вивчався вплив антиоксидантних вітамінів аскорбінової кислоти, токоферолу та коротколанцюгових пептидів (мет- і лей-енкефалінів та тимогексину), похідних 4-тіазолідионів, 1,4-нафтохінону на процеси цитопротекції та ульцерогенезу у слизових оболонках органів травлення. Професор Склярів О.Я. автор близько 500 наукових робіт, а також навчальних посібників і підручників.

З 2021 року кафедру біохімії очолює к.мед.н., д.б.н., професор Леся Кобилінська. Предметом її досліджень є доставка протипухлинних ліків за допомогою наночастинок і полімерних нанорозмірних носіїв, їхня токсичність і метаболічний вплив. Під керівництвом проф. Л. Кобилінської кафедра біохімії проводить дослідження системних біохімічних змін викликаних впливом Covid 19 на організм людини у пацієнтів групи високого ризику, які мають найпоширеніші метаболічні порушення (цукровий діабет II типу), серцево-судинні захворювання, ожиріння тощо, при інфікуванні SARS-CoV-2.

Пріоритетом проф. Л. Кобилінської є навчальний процес. Кафедра зосереджується на медичній біохімії, ролі біохімічних процесів при різних метаболічних станах людини для пояснення складних порушень метаболізму при серцево-судинних і нейродегенеративних захворюваннях, які на сьогодні є глобальними проблемами громадського здоров'я. Поряд із науковою діяльністю завідувачка значну увагу приділяє науковій і виховній роботі зі студентами.

Професор Л. Кобилінська є автором 170 наукових праць з різних напрямів біохімії, серед яких підручник «Клінічна біохімія»; посібники «Практикум з біологічної хімії», «Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення», «Біохімічні показники в нормі і при патології», «Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі», «Практикум з клінічної біохімії»; монографії «Метаболічні аспекти формування кисневого гомеостазу в екстремальних умовах», «Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування», «Протипухлинні перспективи сірковмісних гетероциклів», «Biomedical Nanomaterials. Design, Imaging, Applications, and Environmental Impacts».

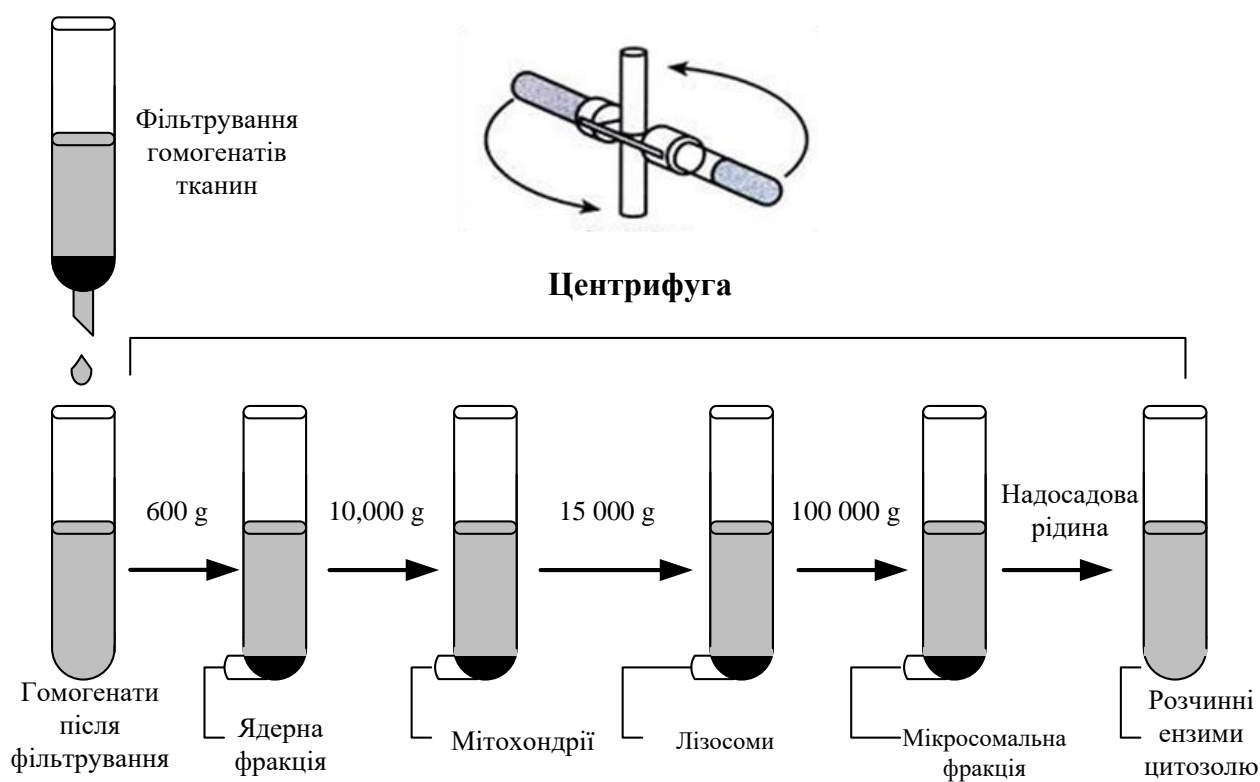
Характеристика методів дослідження, що використовуються у медицині

У біохімії широкого застосування набули діаліз, центрифугування, оптичні та електрохімічні методи, різні види хроматографії, радіоімунні дослідження тощо. В сучасній

медичній діагностиці використовують також методи молекулярної біології – полімеразну ланцюгову реакцію, блотинги, флуоресцентну гібридизацію, рестрикційний аналіз та інші.

Центрифугування. Суть процесу центрифугування полягає в розділенні неоднорідних систем (суспензій, емульсій) у полі дії доцентрових сил. Під дією цих сил суспензії розділяються на тверду фазу – осад і рідку – центрифугат, який називають також супернатантом, або надосадовою рідиною. Значну роздільну здатність має так зване центрифугування в градієнті густини. У цьому разі частинки речовини в процесі центрифугування розділяються вздовж градієнта у вигляді дискретних зон або полюсів.

Залежно від фактору розділення (характеризує відношення прискорення доцентрових сил до прискорення сили тяжіння) центрифуги умовно поділяють на звичайні (g – до 3500) і ультрацентрифуги (g – понад 3500, відцентрове прискорення $g = n^2 \cdot R$, де n – кутова швидкість (об./хв); R – радіус ротора (см)). Звичайні центрифуги використовують з метою препаративного центрифугування. Ультрацентрифуги дають змогу розвинути доцентрове прискорення поля до 300000 g . Вони використовуються з аналітичною метою, для визначення молекулярної маси речовин та виділення їх окремих фракцій з розчинів.



Фракціонування субклітинних фракцій гомогенатів методом центрифугування

До **оптичних методів** дослідження належать: фотоелектроколориметричні, спектрофотометричні, флуоресцентний та ін.

Серед сучасних методів дослідження перевагу віддають **спектральному аналізу**. Він належить до фізико-хімічних методів якісного й кількісного визначення атомного та молекулярного складу речовин. Ці методи ґрунтуються на дослідженні спектрів, що поглинаються або випромінюються аналізованими речовинами. В основу цих методів покладено принцип вимірювання зміни інтенсивності світлового потоку. Залежно від довжини хвилі змінюється характер випромінювання, тому електромагнітний спектр поділено на зони: γ - та космічні промені з довжиною хвилі 0,01 – 9 нм, ультрафіолетова зона – 10 – 380 нм, видима зона – 380 – 760 нм, інфрачервона зона – 760 – 1100 нм.

Серед спектральних методів дослідження виділяють абсорбційні та імерсійні. Абсорбційна спектроскопія полягає у вимірюванні поглинання світла, що проходить крізь досліджуваний розчин унаслідок абсорбції його речовиною, яку визначають. Кожна речовина поглинає світло певної довжини хвилі, отже, абсорбція світла вибіркова.

Фотометричні методи оптичного фізико-хімічного аналізу поділяють на дві групи: абсорбційну та емісійну фотометрію.

Абсорбційна фотометрія – це метод, що ґрунтується на встановленні ступеня послаблення монохроматичного світлового потоку внаслідок вибіркового поглинання світла розчиненою речовиною. Основним законом фотометрії є закон Ламберта – Бера, що формулюється таким чином: логарифм відношення інтенсивності світлового потоку, що проходить через розчин до інтенсивності світлового потоку, що виходить з розчину, прямо пропорційний концентрації речовини і товщині поглинального шару.

До методів абсорбційної фотометрії належать спектрофотометрія і нефелометрія.

Спектрофотометрія, або в ширшому розумінні колориметрія – це визначення інтенсивності забарвлення розчину досліджуваної речовини відносно інтенсивності забарвлення еталонного розчину з точно відомою концентрацією.

Фотоколориметрія – це вимірювання поглинання видимої частини спектра забарвленими розчинами.

Власне спектрофотометрія – це вимірювання поглинання (і пропускання) прозорих розчинів в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній зонах спектра (220 – 1100 нм).

Прилади, якими вимірюють світлопоглинання речовин, називаються абсорціометрами. До них належать фотоелектроколориметри і спектрофотометри. Фотоелектроколориметри дають змогу проводити вимірювання у видимій частині спектра. За допомогою спектрофотометрів проводять вимірювання в широкому діапазоні хвиль від ультрафіолетового до інфрачервоного (210 – 1100 нм) і досліджують забарвлені та безбарвні розчини у вузькій частині спектра, в зоні максимального поглинання монохроматичного потоку світла.

В основі абсорбційної спектроскопії – загальні принципи здатності речовин поглинати світлову енергію за законом Ламберта – Бера. Під час вимірювання інтенсивності поглинання світлового потоку користуються величиною, яка називається оптичною густиною розчину й позначається буквою A :

$A = k \times c \times d$, де c – концентрація речовини (моль/л), d – товщина шару кювети (см), k – молярний коефіцієнт поглинання (екстинкція). Цей коефіцієнт поглинання відповідає оптичній густині 1 М розчину речовини за товщини шару кювети в 1 см. Оптична густина розчину досліджуваної речовини прямопропорційна концентрації даної речовини, що дає можливість розраховувати концентрації речовин в досліджуваних розчинах за пропорцією, або калібрувальними графіками з використанням відомих (стандартних) концентрацій речовин та відповідних оптичних густин.

Нефелометрія – це метод аналізу, пов'язаний з оцінкою ступеня помутніння досліджуваного розчину. Інтенсивність розсіювання залежить від розмірів частинок і кількості розчиненої речовини.

Емісійна фотометрія – ґрунтується на визначенні енергії, яка випромінюється досліджуваною речовиною в енергетично збудженому стані. До методів емісійної фотометрії відносять флюориметрію і полум'яну фотометрію.

Флюориметрія базується на ефекті флюоресценції, що дає енергетично збуджена досліджувана речовина під впливом короткохвильового опромінення.

Полум'яна фотометрія полягає у використанні як енергетичного агента, що забезпечує стан збудження розчину досліджуваної речовини, полум'я газової горілки. Йони металів забарвлюють полум'я відповідно до характерних для них спектрів випромінювання. Щоб виділити випромінювання окремих іонів, застосовують спеціальні світлофільтри, після чого виконують всі необхідні вимірювання.

Люмінесцентний аналіз, в основі якого лежить флюоресценція, набув широкого застосування. Люмінесценція це явище холодного світіння деяких речовин, спричинене зміною електронного стану молекул або атомів. Вимірювання інтенсивності флюоресценції залежить від концентрації речовин, що дає змогу проводити кількісне визначення речовин на спеціальних приладах – флюориметрах. У ході цих досліджень як джерело збудження використовують ультрафіолетове випромінювання.

Флюоресцентна гібридизація *in situ* (англ. *Fluorescence in situ hybridization, FISH*) — це цитогенетичний метод, який використовується для визначення і локалізації певної послідовності ДНК на хромосомі. Для досягнення цієї мети використовуються спеціальні гібридизаційні ДНК-зонди з флюоресцентними властивостями та комплементарні до певної ділянки ДНК. Використання FISH дозволяє визначати різноманітні хромосомні аномалії: делеції, транслокації, ампліфікації, тощо. Для виконання FISH застосовують ДНК та РНК зонди, для візуалізації відповідно послідовностей в ДНК або РНК. Часто зонди синтезують з ізольованих фрагментів ДНК.

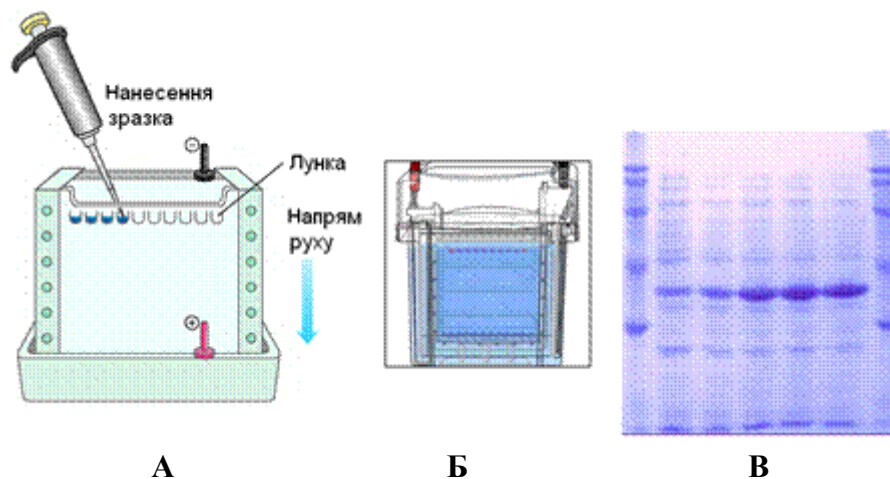
Електрофорез – метод розділення заряджених частинок в електричному полі, метод розділення великих заряджених органічних молекул (білків, нуклеїнових кислот), в якому використовується різниця електрофоретичних швидкостей їхнього руху в нерухомій рідкій фазі. Рідина може бути іммобілізованою за допомогою різних основ (наприклад, папір, желатин, капілярні матеріали). Різна молекулярна маса зарядів речовин визначає різну швидкість пересування, що дає змогу їх диференціювати. Швидкість руху іонів збільшується з посиленням електрофоретичного заряду, сили електричного поля, але зменшується зі збільшенням радіуса частинок, що рухаються, і збільшенням в'язкості середовища. На швидкість руху заряджених частинок впливає температура навколишнього середовища, з підвищенням якої наростає швидкість руху іонів.

Використовують такі методи електрофорезу: фронтальний (вільний), зональний (на носіях), ізоелектричне фокусування, імуноелектрофорез, гелевий.

Фронтальний електрофорез – розділення речовин у гомогенному розчині без стабілізації зон розподілу. Проводять в приладах, що містять U – подібну трубку. Нижню частину трубки заповнюють досліджуваною пробєю (наприклад, розчин білка), нашаровують розчинник, в який занурюють електроди, з'єднані з джерелом постійного току. При цьому електрично заряджені частинки рухаються, внаслідок чого межа розподілу між розчином і розчинником рухається. Прилади містять датчики автоматичної реєстрації переміщення компонентів у трубці.

Зональний електрофорез (на носіях) - дає змогу отримувати стабільні зони розподілу. Види зонального електрофорезу класифікують залежно від роздільного середовища. Для цього типу електрофорезу як середовище використовують порошки та інші пористі матеріали (крохмаль, целюлоза, полівінілхлорид), гелі (крохмальний, агаровий, поліакриламідний), смуги паперу та інших волокнистих матеріалів.

Гель-електрофорез — аналітичний метод хімії і молекулярної біології для розділення різних видів молекул. Суміш молекул пропускається через гель, який являє собою молекулярне сито, яке легше пропускає дрібніші молекули, аніж великі. Рушійну силу задає електричне поле, тому молекули мають бути заряджені. Метод використовується в молекулярній біології для розділення фрагментів дезоксирибонуклеїнових, рибонуклеїнових кислот або білків, використовуючи електричне поле, що створюється в гелевій матриці. Метод зазвичай застосовується для аналітичних цілей, але може також використовуватися як попередня стадія таких методів як мас-спектрометрія, поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), молекулярне клонування, секвенування ДНК, саузерн-блот, вестерн-блот що застосовуються для аналізу послідовностей молекул або визначення певних білків.



А

Б

В

Схема розділення білків методом гелі-електрофорезу: А – нанесення зразків у гелі; Б – камера для електрофорезу; В – електрофореграма білків

Електрофорез в поліакриламідному гелі (ПААГ) (англ. PAGE) – метод молекулярної біології та біохімії, що використовується для розділення білків та нуклеїнових кислот, базується на пересуванні заряджених біологічних макромолекул у сталому електричному полі. Розділення в поліакриламідному гелі відбувається за рахунок різниці заряду досліджуваних молекул і відмінності молекулярних мас, а також від конфігурації молекул. Одним з підвидів електрофорезу у ПААГ є диск-електрофорез. *Диск-електрофорез (від англ. discontinuous)* – метод, при якому в процесі електрофоретичного розділення білків на межі між концентруючим та розділяючим гелями утворюється градієнт рН, за рахунок чого досягається якісніше розділення білкових молекул.

Імуноелектрофорез належить до найчутливіших і найсучасніших методів імунологічного аналізу. За допомогою цього методу можна визначити кількість компонентів суміші, а також ідентифікувати ці компоненти за їхньою електрофоретичною рухливістю, імунологічною специфічністю, а іноді – за хімічною природою, а також виявити речовини, здатні давати реакцію преципітації з антитілами, тобто переважно білки і вуглеводи. Метод імуноелектрофорезу дає змогу дуже точно встановити компоненти складних білкових сумішей за їх імунологічною специфічністю та електрофоретичною рухливістю.

Ізоелектричне фокусування або електрофокусування — метод розділення молекул за значенням ізоелектричної точки (pI). Ізоелектричне фокусування є типом зонного електрофорезу і зазвичай виконувався в гелі, та засноване на факті, що заряд молекул змінюється із кислотністю (рН) середовища. Молекули, призначені для ізоелектричного фокусування, додаються до середовища, що має градієнт значень рН (зазвичай створено ациклічними цвіттер-іонами). У цьому середовищі створюється електричне поле, що змушує заряджені частинки рухатися у напрямку електричного поля. Оскільки частинка рухається в гелі із змінним рН, її заряд змінюється, поки вона не досягне точки, в якій буде досягнута її ізоелектрична точка. У цей момент молекула більше не має електричного заряду (завдяки протонуванню та депротонуванню зв'язаних функціональних груп) і таким чином зупиняється на місці. Метод часто застосовується при дослідженні білків, які розділяються, таким чином, засновуючись на відносному вмісті кислих та основних амінокислотних залишків, які впливають на значення pI. В цьому випадку використовується поліакриламідний, крохмалевий або агарозний гелі. В цьому процесі зазвичай використовуються гелі з великими порами для усунення артефактів, викликаних різною швидкістю міграції білків в гелі. Ізоелектричне фокусування дозволяє розділення білків із різницею значення pI лише на 0,01^[1]. Часто це перший крок очищення білків, після чого використовуються інші методи, такі як SDS-PAGE, що розділює білки за їх молекулярною масою.

Хроматографія (з грец. *хромо* — колір, *графо* — пишу) — високоефективний фізико-хімічний метод розділення і аналізу, в якому речовина розподіляється між двома фазами: рухомою (елюент) і нерухомою. В основі всіх видів хроматографії лежить один принцип – потік рухомої фази, що містить досліджувану речовину, проходить через стаціонарну фазу, яка в залежності від своїх особливостей, по різному взаємодіє з різними компонентами досліджуваної проби. В результаті окремі компоненти проби рухаються з різною швидкістю. Хроматографічні методи розрізняються типом взаємодії між компонентами проби і стаціонарною фазою. Це може бути йонний обмін, розчинність, адсорбція, фільтрація або їх комбінація. Для розділення й кількісного визначення білків і амінокислот, нуклеїнових кислот, вуглеводів, ліпідів та інших метаболітів використовують різні види хроматографічного аналізу.

Варіанти хроматографії за фазовим станом

- Газова хроматографія - розділення суміші речовин здійснюють в атмосфері газу (використовується, наприклад, для визначення якості харчового спирту).
- Рідинна хроматографія (використовується для аналізу та виділення органічних сполук).
- Газо-рідинна хроматографія.
- Газо-твердофазна хроматографія.

Варіанти хроматографії за технікою виконання:

- Тонкошарова хроматографія - широко застосовується в органічній хімії для поточного аналізу сумішей (сумарний час експерименту 2-10хв). Нерухомою фазою служить силікагель, нанесений на пластинку (найчастіше товсту алюмінієву фольгу). Як рухому фазу застосовують органічні розчинники. Набір гептан<етилацетат<метанол дозволяє елюювати більшість сполук. Часто також застосовують етер та хлороформ.
- Колонкова хроматографія - один з основних способів очистки органічних речовин в сучасній синтетичній практиці. Силікагелем набивають скляну колонку завтовшки 5-50 мм. Зверху наносять малу кількість концентрованого р-ну суміші, а потім починають елювання, аналізуючи час від часу розчин, що виходить через малий отвір знизу колонки. Різновид адсорбційної хроматографії, де розчин, що містить суміш речовин, пропускається через вузькі трубки, наповнені стаціонарною фазою. Оскільки різні речовини в суміші мають різну спорідненість щодо стаціонарної фази, то вони проходять через трубку з різними швидкостями, що дозволяє їх розділити, проаналізувати, або й зібрати при виході з трубки.
- ВисокоЕфективна Рідинна Хроматографія (ВЕРХ) (англ. HPLC) - використовується прикладання зовнішнього тиску для прискорення проходження рідини через колонку. Це дозволяє застосовувати наповнювач з часточками меншого розміру й прискорює розділення. Препаративні хроматографи для розділення органічних речовин працюють при тиску порядку 100—600 бар з металевими колонками діаметром 0.5-4.6 мм (найчастіше використовують діаметром 2.1 та 4.0 — 4.6 мм) та довжиною 15-300 мм. Як нерухому фазу застосовують ліпофільно-модифікований силікагель (оберненофазна хроматографія), тоді як рухомою фазою слугують суміші води та органічного розчинника (найчастіше ацетонітрилу). ВЕРХ застосовують як для аналізу, так і для розділення сумішей. Типовий час експерименту 2-30 хв.

Найважливіші з них

- Іонообмінна, що базується на різній здатності речовин, що розділяють, до іонного обміну з тим чи тим іонітом (використовують катіонообмінні або аніонообмінні смоли у вигляді гранул маленьких розмірів 5-10 мкм в діаметрі).
- Розподільча, в якій розділення компонентів суміші ґрунтується на різниці їх розчинностей у нерухомій фазі (газова хроматографія) або на відмінності їх розподілу між

незмішуваними фазами — рухомою і нерухомою, яка нанесена на твердий носій (рідинна хроматографія):

- адсорбційна хроматографія - метод розділення, аналізу та фізико-хімічного дослідження речовин, заснований на різниці в швидкостях руху зон різних компонентів, що переміщуються з потоком рухомої фази (елюенту) через шар нерухомої фази з відповідно підібраними сорбуючими властивостями; розділення речовин в сумішах ґрунтується на відмінностях адсорбційних спорідненостей компонентів до поверхні активного твердого тіла; у залежності від стану, в якому перебуває елюент, розрізняють рідинно- або газо-твердофазну хроматографію;

- двовимірна хроматографія - хроматографія (паперова і тонкошарова), де використовується елюювання із вимушеним рухом компонентів послідовно у взаємоперпендикулярних напрямках (звичайно зі застосуванням різних елюентів).

• Ексклюзійна хроматографія (витісна хроматографія) (англ. size exclusion chromatography) — хроматографія, в якій розділення базується в основному на ефектах витіснення, де звичайно використовується різниця в молекулярних розмірах, формах молекул чи їх зарядах. Розділення речовин здійснюється шляхом пропускання елюенту (рідини або газу) через хроматографічний шар, утворений з твердого пористого матеріалу. Молекули з розмірами меншими від діаметра пор проникають у пори і затримуються при переміщенні рухомої фази, а крупні молекули переміщуються разом з рухомою фазою. Так відбувається розділення молекул за розмірами. Раніше використовувались синоніми - дифузна, що ґрунтується на розділенні речовин за швидкістю дифузії всередину сорбента, гель-фільтраційна хроматографія, при якій розділення речовин ґрунтується на механічному явищі молекулярного просіювання (використовують декстранові гелі, які отримали назву сефадексів) та гель-проникна хроматографія для випадку, коли нерухомою фазою був гель.

• Афінна (хроматографія за спорідненістю) – високоспецифічний метод розділення різних сполук, що базується на використанні нерозчинних форм біологічно активних речовин, споріднених з розділюваними речовинами.

Іонообмінну, розподільчу, ексклюзійну хроматографію можна проводити в колонках і на площині (на папері і в тонких шарах).

Полярнографічний метод ґрунтується на принципі визначення сили струму під час окисно-відновних реакцій на зовнішній поверхні робочого електроду. На момент проходження струму в процесі електровідновлення або електроокиснення на полярнограмах з'являються ділянки з силою струму пропорційною концентрації реагентів. Зміна висоти полярнограм дає уявлення про концентрацію речовини.

Завдяки дослідженню біологічних об'єктів полярнографічним методом виявляють катіони, аніони, амінокислоти, вітаміни, вуглеводи та інші речовини. Особливе місце займає полярнографічний метод у дослідженні білків і ферментів: дає відомості про деякі функціональні групи білків (-SH, -NH₂, імідазольну групу), каталітичну активність ферментів тощо.

Використання **манометричного** (вимірювання тиску газів або рідин) і **радіоізотопного** (використання ізотопів в якості міток) методів дає змогу провести дослідження як на рівні цілого організму, так і на рівні клітини.

Імунний аналіз - в основу покладена реакція взаємодії антигену і антитіла з використанням різних варіантів мічення одного з компонентів (фермент, радіонуклід, флуоресцентний барвник та інші). Використовується у всіх галузях медицини в сучасних умовах для діагностики та наукових цілей. Методи імунного аналізу, такі як імуноферментний аналіз (ІФА), хемілюмінесцентний аналіз і імунофлуоресцентний відрізняються між собою за типом використовуваної мітки, умовами і варіантами методик.

Імуноферментний аналіз (ІФА)— імунологічний метод для визначення речовин з низькою та дуже низькою концентрацією за утворенням антитіл. Основою цього методу є реакція “антиген – антитіло”, тобто, специфічне зв’язування антитіла з певною речовиною. При цьому один з компонентів, кон’югованих з ферментом, в результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворює забарвлений продукт. За допомогою рідера або імуноферментного аналізатора спектрофотометрично визначається шукане в матеріалі з’єднання або речовина.

Об’єктами дослідження ІФА є як низькомолекулярні, так і високомолекулярні сполуки, віруси і бактерії. Даний метод дозволяє ідентифікувати такі біологічно активні речовини організму людини як: гормони, ферменти, нейропептиди, продукти імунної системи та інші, а також призначений для виявлення чужорідних антигенів та антитіл. Біогенні аміни: melatonin, adrenaline, noradrenaline, dopamine, metanephrine, normetanephrine, serotonin, tryptophan - визначають у сироватці крові, плазмі, сечі, а histamine можливо визначити і в калі. Окремі варіанти твердофазного ІФА дозволяють виявляти у зразку поодинокі молекули.

Метод ІФА має ряд переваг: метод високочутливий, специфічний, точний, експрес-метод, стандартизований (оцінка реакції проводиться автоматично), не вимагає спеціальних умов у лабораторії, для роботи необхідні мікрообсяги матеріалу, виконують методику на доступному вітчизняному або імпортному обладнанні. У сучасних імуноферментних наборах широко використовують моноклональні антитіла. Постійне технічне вдосконалення методики призвело до появи можливості іммобілізації антигену і антитіла на різних носіях із збереженням їх зв’язуючої активності.

У методі імуноферментного аналізу виділяють три стадії:

1. «упізнавання» тестованого з’єднання специфічним до нього антитілом, що веде до утворення імунного комплексу;
2. формування зв’язку кон’югату з імунним комплексом або з вільними місцями зв’язування;
3. перетворення ферментної мітки в реєстрований сигнал.

В основу класифікації ІФА покладено кілька підходів:

I. За типом реагентів, присутніх на першій стадії ІФА, розрізняють конкурентний і неконкурентний методи.

- *конкурентний метод ІФА* - на першій стадії в системі присутні одночасно аналізоване з’єднання і його аналог, мічений ферментом, який конкурує з аналізованим з’єднанням за центри специфічного зв’язування з ним;
- *неконкурентний метод ІФА* - в системі на першій стадії присутнє тільки аналізоване з’єднання і специфічні до нього центри зв’язування.

II. Методи ІФА поділяються на гомогенні і гетерогенні.

Гомогенний метод (EMIT)- передбачає проведення трьох стадій ІФА у розчині, де між основними стадіями немає додаткових етапів поділу утворених імунних комплексів від компонентів, що не прореагували. Гомогенний метод призначений для визначення низькомолекулярних субстанцій і в його основі лежить інгібування активності ферменту при його з’єднанні з антигеном або антитілом. Активність ферменту відновлюється в результаті реакції антиген-антитіло. Зв’язування антитіла з антигеном (що містить ферментну мітку) призводить до інгібування активності ферменту на 95% по відношенню до високомолекулярного субстрату. Це обумовлено винятком субстрату з активного центру ферменту. У міру збільшення концентрації антигену зв’язується все більше антитіл і зберігається все більше вільних кон’югатів антиген-фермент, здатних гідролізувати високомолекулярний субстрат.

Гетерогенний метод (ELISA, EIA) - здійснюється проведення аналізу у двофазній системі за участю твердої фази – носія. Обов’язковою є стадія відокремлення імунних комплексів від компонентів, що не прореагували (відмивання вошером). Утворені імунні комплекси знаходяться на твердій фазі, а не прореаговані комплекси - у розчині. Гетерогенні методи, в яких формування імунних комплексів на першій стадії відбувається на твердій фазі,

називають твердофазними методами. Методи відносяться до гомогенно - гетерогенним, якщо перша стадія ІФА - утворення специфічних комплексів відбувається у розчині, а потім для розділення компонентів використовують тверду фазу з іммобілізованим реагентом.

У методі ІФА за принципом визначення тестованої речовини виділяють:

- 1) *Пряме визначення* концентрації речовини (антигену або антитіл) за кількістю прореагувавших (протизасвідуючих) з ним центрів зв'язування. У цьому випадку ферментна мітка буде знаходитися в утвореному специфічному комплексі антиген-антитіло. Концентрація визначеної речовини буде прямо пропорційна реєстрованим сигналам.
- 2) *Визначення концентрації речовини по різниці загального числа місць зв'язування і залишених вільних центрів зв'язування.* Концентрація визначеної речовини при цьому буде зростати, а реєстрований сигнал знижуватися. Спостерігається зворотна залежність від величини реєстрованого сигналу.

У діагностиці використовують і застосовують такі варіанти методики ІФА: з загальним принципом ІФА, прямий імуоферментний аналіз, непрямий імуоферментний аналіз, за принципом «Сендвіч» - як варіант для виявлення антигенів, конкурентний ІФА, інгібіторний ІФА, метод імуоферментних плям (ELISPOT) та інші.

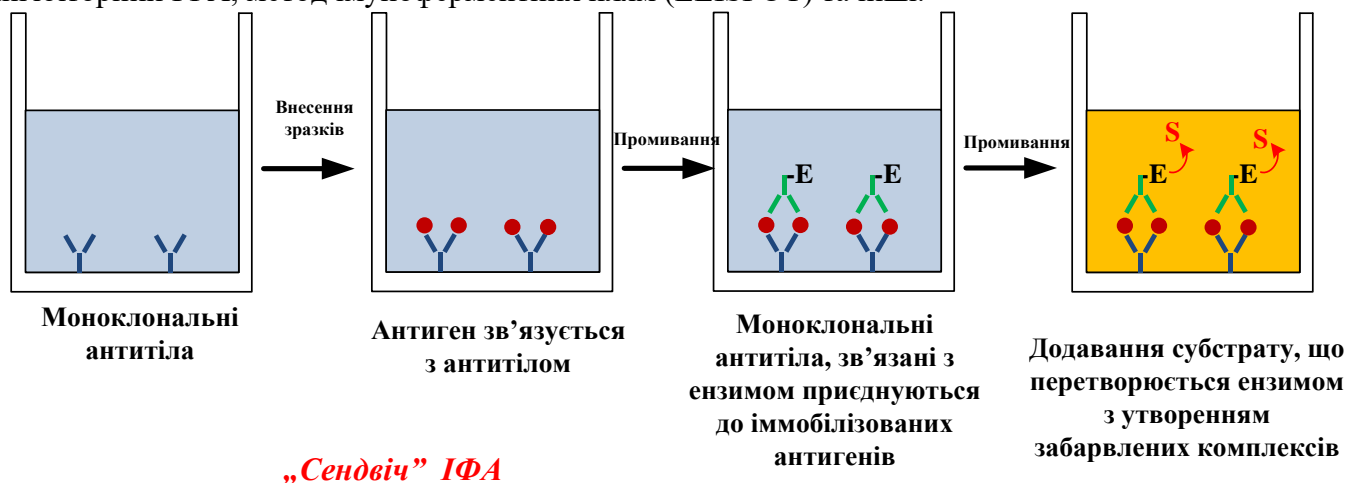


Схема проведення «Сендвіч» ІФА

Блотинг (от англ. *Blot*) — загальна назва методів молекулярної біології з переносу певних білків чи нуклеїнових кислот з розчину, що містить велику кількість інших молекул, на певний носій (мембрану з нітроцелюлозу, PVDF або нейлону) з метою наступного аналізу. В одних випадках молекули попередньо розділяють геле-електрофорезом, в інших — переносять безпосередньо на мембрану. Після блотингу молекули візуалізують за допомогою різних методів:

- надання кольору (наприклад, білки - сріблом);
- авторадіографічна візуалізація;
- специфічне маркування за допомогою імунохімічних методів або гібридизації.

Блотинги класифікують за типом речовини, яку досліджують:

- Саузерн-блотинг (англ. *Southern blot*) — визначення послідовності ДНК у пробі.
- Соувестерн-блотинг (англ. *Southwestern blot*) — визначення білків, зв'язаних з ДНК.
- Нозерн-блотинг — визначення послідовності РНК у пробі.
- Вестерн-блотинг (англ. *Western blot*) — визначення специфічних білків у пробі.
- Істерн-блотинг (англ. *Eastern blotting*) — визначення посттрансляційних модифікацій білків.

Вестерн-блот (англ. *Western blot*) — широко розповсюджений лабораторний метод, заснований на реакції антиген-антитіло, що застосовується для визначення специфічних протеїнів в екстрактах клітин або тканин, попередньо фракціонованих за допомогою гелевого електрофорезу та перенесені, в переважній більшості випадків, на

нітроцелюлозну або PVDF-мембрану. Трансфер протеїнів з гелю на мембрану дозволяє інкубувати їх з певним антитілом та виконати подальшу візуалізацію отриманих бендів. Вестерн-блот було винайдено Гарі Тоубіном (Harry Towbin), який працював в лабораторії Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research. Проте назва «вестерн-блот» була дана цьому методу іншим науковцем — W. Neal Burnette.

Методика вестерн-блоту включає:

- 1) Приготування зразків білку. Протоколи виготовлення зразків можуть суттєво відрізнятись в залежності від того, чи є досліджуваний білок інтегральним або розчинним, чи є необхідність у збереженні нативної конформації білка тощо. Зазвичай тканину, з якої необхідно виділити білок, механічно гомогенізують у присутності потужних детергентів, таких як β -меркаптоетанол або Тритон X-100. Обов'язковим кроком є також вимірювання загальної концентрації білка (за методом Лоурі або Бредфорда) та вирівнювання її в різних зразках шляхом розведення, що полегшує порівняння кінцевих результатів.
- 2) Електрофорез. Гелевий електрофорез дозволяє розділити протеїни на фракції, в залежності від їх молекулярної маси — важкі рухаються в гелі повільніше за легкі.
- 3) Трансфер. Наступним етапом вестерн-блоту є перенесення білків з електрофорезного гелю на носій, на якому їх можна специфічно помітити антитілами. Як носія зазвичай використовують мембрану, виготовлену з нітроцелюлози або PVDF. Для проведення трансферу використовується спеціальний пристрій, що має назву трансблотер. В ранніх версіях вестерн-блоту перенесення білків з гелю на мембрану забезпечувалось фільтрувальним папером, який клався у «сендвіч» з носіїв та тягнув на себе багатий на детергенти трансферний розчин за рахунок капілярних сил. В наш час рушійною силою у процедурі трансферу є електричне поле.
- 4) Візуалізація. Нітроцелюлозна та PVDF-мембрани є сильними сорбентами білків, тому перед їх інкубуванням з антитілами проводиться процедура блокування (на лабораторному жаргоні її також часто називають «забивкою») — обробка носія багатим на білок розчином, який зв'яжеться з вільними сайтами на поверхні мембрани і попередить неспецифічну сорбцію антитіл. Зазвичай як білковий розчин використовують знежирене молоко. Після блокування мембрана інкубується з первинним антитілом, яке специфічно зв'язується з досліджуваним білком. Далі додається вторинне антитіло, мічене біотином, пероксидазою хрину або радіоактивною речовиною, за допомогою якого можна виконати візуалізацію отриманих бендів.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це високоспецифічний метод експрес-діагностики, що дозволяє множити певні нуклеотидні послідовності до утворення необмеженого числа копій генів в таких кількостях, які можна виявити методом молекулярної гібридизації за допомогою електрофорезу. ПЛР базується на багатократному повторюванні циклів синтезу (ампліфікації) специфічної ділянки ДНК–мішені з дезоксинуклеозидтрифосфатів у присутності термостабільної ДНК–полімерази, відповідного сольового буфера та олігонуклеотидних затравок – праймерів, що визначають кордони ампліфікованої ділянки ДНК-мішені. Для діагностики інфекційного захворювання підбираються системи праймерів, комплементарних специфічним для збудника ділянкам генів, які дозволяють ампліфікувати фрагмент, що має для кожної системи праймерів свою довжину. ПЛР застосовується у клініці для діагностики гонореї, трихомоніазу, цитомегаловірусу, мікоплазму, уреоплазму, герпесу тощо.

Рестрикційний аналіз – встановлення місць розщеплення ДНК рестрикційними ендонуклеазами. Широко використовується у молекулярно-біологічних дослідженнях та прикладних роботах і є одним з найважливіших інструментів дослідження нуклеїнових кислот. Як правило, продукти розщеплення ДНК рестриктазами аналізуються за допомогою гель-електрофорезу в агарозному чи актиліпмідному гелі. За результатами рестрикційного

аналізу будується рестрикційна карта – схема молекули ДНК, на якій вказано сайти розрізання її різними рестрикційними ендонуклеазами.

Методи таргетної доставки ліків за допомогою наночастинок. Нанотехнології – використання нанорозмірних структур і пристроїв для відстежування, виправлення, конструювання та контролю над біологічними системами людини на молекулярному рівні. Наночастинка – ізольований твердофазний об'єкт, який має чітко виражену межу з навколишнім середовищем, розміри якого становлять від 1 до 100 нм.

Ідея застосування наночастинок для підвищення ефективності впливу фармакологічних засобів діагностики і терапії заснована на тому факті, що **речовини у наноформі мають властивості, відмінні від властивостей речовин у макродисперсійній формі**. Зокрема, висока питома поверхня наноматеріалів призводить до того, що поверхневі явища (адсорбція-десорбція, адгезія) починають переважати у процесах їх взаємодії з макромолекулами і біологічними об'єктами. Наслідком цього є те, що навіть невисокі концентрації наночастинок, які не мають значного токсичного ефекту, можуть суттєво впливати на живі організми.

Деякі наноструктури, як біогенного (вірусні частинки, капсиди), так і небіогенного походження мають форму контейнера, що обумовлює їх застосування як засобів доставки терапевтичних чи діагностичних компонентів (у тому числі й інших наночастинок) до цільових клітин або органів. Специфічність доставки наноструктур до цільових клітин визначається використанням специфічних антитіл, рецепторів або лігандів. Наномедицина може зробити величезний стрибок у лікуванні захворювань.

За хімічним походженням виділяють такі наночастинки:

неорганічні: кераміка, метали (Fe, Mg, Zn, Ti, Cu, Ag), сплави (Cu-Ta, Cu-V, Cu-W). Металеві наночастинки займають особливе місце серед наноматеріалів: золото, срібло, мідь, а також магнітних матеріалів: залізо, нікель, кобальт та виготовлені із них сплави;

органічні: полімери (хітозан), біологічні наноструктури (целосоми), вуглецеві наноматеріали (фулерени, нанотрубки, нановолокна, наноспіралі);

неорганічно-органічні: металоорганічні (PbS, CdS, ZnS), металополімерні наноструктури.

Класифікують наночастинки також залежно від **речовини, форми кластерів та типу зв'язку**. Ця класифікація включає такі групи наночастинок: **ліпосоми** – маленькі одношарові везикули-шари, великі одношарові везикули, багатошарові везикули, структурні компоненти клітин; **наноемульсії**; **полімерні наночастинки** – наносфери, нанокапсули, дендримери, полімер-білкові кон'югати; **керамічні наночастинки** – кремнієві сполуки; **металічні наночастинки** – заліза, магнію, міді, титану, цинку, срібла; нанооболонки – золото; **карбонові наночастинки** – фулерени, нанотрубки, нанодіаманти, нановолокна, наноспіралі; **квантові мітки** – CdSe, ZnS; нанокапсули.

Вуглецеві нанотрубки – це штучно отримана структура, що являє собою сукупність атомів у вигляді трубок з порожниною всередині довжиною до 100 нм і діаметром 1–2 нм. Карбонові нанотрубки мають простір для розміщення інших речовин, наприклад, лікарських засобів, а їх відкриті кінці можуть служити воротами для входу та виходу інших медикаментів. Саме завдяки цій властивості вони можуть слугувати ідеальним переносником ліків. Вуглецеві нанотрубки можуть легко проникати до судинного русла через органи дихання, що використовується при порушеннях серцевого ритму та при судинних захворюваннях. Особливу цінність мають собою нанотрубки як переносники ДНК, РНК — молекулярні біосенсори. Завдяки цим біосенсорам стануть можливими швидка діагностика генетичних хвороб, раку на ранніх стадіях, автоімунних захворювань та ін. Завдяки своїй міцності нанотрубки можуть замінити мікрокапіляри, перспективним є створення такої комбінації нанотрубок з різноманітними полімерами, яка б за властивостями відповідала м'яким тканинам людини, що дозволить проводити трансплантацію тканин без ризику відторгнення.

Фулерени — це алотропна модифікація карбону у вигляді пологих сферичних утворень. Класичною структурою вважають фулерени що являють собою сферичну структуру і містять 60 атомів вуглецю (C₆₀), на поверхні якої шестичленні кільця пов'язані між собою п'ятичленними циклами.

Нанокапсули або коллоїдосоми – наночастинки, які складаються з полімерної, ліпідної або іншої оболонки, яка оточує її внутрішню порожнину або вміст. Зазвичай нанокапсули являють собою сферичні порожні частинки, оболонка яких утворена полімерами або фосфоліпідами (в цьому випадку вони називаються ліпосомами або наносомами), а всередині знаходиться низькомолекулярна речовина. Оболонка нанокапсул може бути виготовлена також з інших матеріалів, наприклад, гідроксиапатиту або силікату кальцію, а також певним чином організованих молекул ДНК. Нанокапсули повинні бути хімічно стабільні, біоактивні, біосумісні з організмом, захищати капсульовану речовину від небажаного впливу. Розміри нанокапсул зазвичай не виходять за межі 100 нм, а мікрокапсул – 600 мкм. Нанокапсули мають високу проникаючу здатність і можуть проходити навіть гемато-енцефалічний бар'єр. Нанокапсули застосовують для контрольованого введення інкапсульованих біологічно активних речовин: лікарських препаратів (у тому числі нерозчинних у воді або нестабільних), пептидів і білків (що мають функції гормонів та цитокінів), а також генетичних конструкцій, що несуть гени ферментів, гормонів та цитокінів. Діапазон капсульованих речовин широкий - від засобів протипухлинної терапії та морфогенетичних білків кісткової тканини до засобів косметології. Для цільової доставки поверхня нанокапсул може бути модифікована специфічними антигенами, рецепторами або лігандами. Перспективними також є підходи доставки нанокапсул всередині еритроцитів та бактерій.

Магнітні наночастинки, які використовуються у терапевтичних цілях, можуть складатися з феромагнітних чи суперпарамагнітних матеріалів. За допомогою використання наночастинок і магнітно-резонансної томографії ми можемо бачити, куди дісталися ліки, де вони накопичуються. У такому випадку наноліки поєднують у собі лікувальну і діагностичну роль. Їхня основна перевага – це можливість безконтактного управління їх переміщенням у організмі із застосуванням зовнішнього магнітного поля. Найбільш широке застосування у медицині знаходять наночастинки на основі оксидів заліза (магнетит, маггеміт).

Загальні принципи клініко-біохімічної оцінки результатів досліджень

До способів розрахунку результатів дослідження, які використовують у клінічній біохімії, можна віднести застосування умовних одиниць, розрахунки за стандартним (еталонним розчином), калібрувальним графіком, коефіцієнтом перерахунку. Умовні одиниці використовуються поряд із системними одиницями переважно в традиційних методиках.

Стандартні розчини обробляють одночасно із серією досліджуваного біоматеріалу і перебувають у тих самих умовах, що й останній. Еталонні розчини повинні містити точно визначену концентрацію певної речовини. Результати дослідження розраховують за пропорцією: за трьома відомими величинами встановлюється четверта, досліджувана:

$$\frac{A_{ст}}{A_{дос}} = \frac{C_{ст}}{C_x}, \quad C_x = A_{дос} \cdot C_{ст} / A_{ст}$$

де $A_{ст}$ – оптична густина стандартного розчину;

$A_{дос}$ – оптична густина досліджуваної проби;

$C_{ст}$ – відома концентрація стандартного розчину;

C_x – досліджувана концентрація проби.

Калібрувальні графіки будують для кожного фотометра, використовуючи серію стандартних розчинів. Такі розчини різняться за концентрацією речовини у порядку наростання.

Розрахунок за допомогою коефіцієнта перерахунку найпростіший. Розрахунки виконують за формулою:

$$C = k \times A_{\text{дос}},$$

де C – концентрація досліджуваного компонента;

k – коефіцієнт перерахунку;

$A_{\text{дос}}$ – оптична густина досліджуваної реакційної суміші.

Коефіцієнт перерахунку – величина специфічна для кожного окремого тесту.

Помилки, що трапляються під час проведення лабораторних досліджень

У ході лабораторного дослідження можна припуститися помилок. До складу остаточного результату кожного визначення входять остаточно дійсна вартість (дійсні величини) та певні помилки. Оцінка достовірності результату та його клінічна оцінка потребують знання видів помилок. Загалом під час діагностичних досліджень трапляються помилки, які можна класифікувати так:

1) помилка перед проведенням дослідження; 2) аналітична лабораторна помилка; 3) інтерпретаційна помилка.

Помилка перед проведенням дослідження охоплює групу факторів, які можуть впливати на остаточний результат досліджень, доки матеріал аналізують у лабораторії. Ці фактори пов'язані з підготовкою хворого до дослідження, із заборою та зберіганням матеріалу до початку аналізу.

Вплив уживаних ліків завжди треба брати до уваги під час інтерпретації результату. Вирішуючи питання впливу лікарських засобів на результат дослідження, необхідно передусім з'ясувати існування двох основних механізмів інтерференції.

Перший механізм полягає в інтерференції ліків або їх продуктів з ідентифікаторами або методами визначення. Насамперед, це фізико-хімічний та біохімічний вплив. Прикладами фізико-хімічної взаємодії є можливість зміни відносної густини сечі за умови застосування більшої кількості декстрану або вплив тетрацикліну на визначення концентрації глюкози. Прикладом біохімічного впливу може бути вплив лікарських засобів з відновними властивостями на завищені результати визначення вмісту креатиніну. Ці впливи, тобто фізико-хімічна та біохімічна інтерференція, спричинені переважно дефіцитом специфічних методик.

Другий механізм базується на фармакологічній дії препаратів, незалежно від запланованого лікування, на складові або процеси системи, які призводять до змін, не пов'язаних із захворюванням.

Інтерференція, спричинена фармакологічною дією ліків, має дуже важливе значення. Її не можна залишати поза увагою. Істотне значення має також кількість медикаментів та індивідуальна чутливість організму, а також спосіб їх застосування.

Виключення помилки, пов'язаної з впливом ліків, вимагає проведення досліджень перед лікуванням або в процесі лікування з вибором найкращого методу забору матеріалу. Вважають, що інтерференція лікарських засобів буде найменш вираженою за найнижчої їх концентрації в організмі.

Незалежно від того чи відбувається обмеження впливу ліків, цей фактор треба взяти до уваги під час інтерпретації результату, а саме непередбачуваного результату.

Аналітична (лабораторна) помилка. Ця помилка пов'язана з ходом дослідження біологічного матеріалу в лабораторії. Систематична помилка (точності) відтворює різницю між величиною отриманою і дійсною. Джерелом систематичної помилки виступають властивості методу або способи його реалізації, які є причиною того, що визначений показник не відповідає дійсній величині, тобто, вона зумовлена особливостями методу або лабораторією (дослідником).

Прикладом систематичної помилки методу може бути визначення концентрації глюкози за методом Хагедорна-Єнсена, що ґрунтується на відновних властивостях глюкози. Інші наявні в крові речовини з відновними властивостями також беруть участь у реакції. Тому результат визначення рівня глюкози цим методом завищений.

Систематична помилка в лабораторії полягає в тому, що в процесі дослідження виявляють неточність, яка постійно повторюється. Вона може стосуватися кожного етапу процесу (продукування ідентифікаторів, приготування та визначення стандарту) або може бути пов'язана з лабораторним устаткуванням.

Випадкова помилка (повторюваності) забезпечується різницею між результатами вимірювання одного й того ж самого зразка на тому самому лабораторному устаткуванні й тим самим методом, спричиненою змінами умов під час виконання вимірів. Джерело випадкової помилки пов'язане зі взаємодією багатьох непередбачуваних факторів і тих випадків, які змінюють умови визначення. Саме ця зміна зумовлює різницю результатів кількох визначень одного й того ж самого зразка в тому самому матеріалі.

Мірою випадкової помилки є акуратність (точність). Найчастіше її відхилення приймають за стандарт або визначають у відсотках як коефіцієнт зміни. Під час аналітичного процесу, який охоплює багато дій і методів та значну кількість визначень, може порушитися перебіг одного з етапів процесу або однієї з дій. Це формує помилку, що називається тривіальною. Частота помилок важлива під час обчислення показника. Вважається, що одна помилка на 2000 значень становить абсолютний мінімум.

Помилка інтерпретації результату. Використання поодинокого результату лабораторного аналізу в діагностичному процесі або моніторинг під час терапії можуть бути джерелом численних і зумовлених різними факторами помилок.

Помилка I типу: на основі результату дослідження роблять висновки про наявність патології, у здорової людини.

Помилка II типу: на основі результату дослідження дійсно хворого вважають здоровим.

Щоб уникнути таких помилок або зменшити їх кількість, треба пам'ятати, що є фізіологічні коливання клініко-біохімічних показників (інколи вони є значущими), які інтерферують із можливістю клінічної інтерпретації отриманого результату. Такі зміни можуть бути циклічними – годинними, денними, сезонними. Це викликає необхідність проведення додаткових досліджень. Крім того, слід враховувати, що значення клініко-біохімічних показників можуть коливатися за рахунок змін внутрішнього середовища організму, зокрема при вживанні лікарських речовин.

Кожний етап процесу від моменту початку дослідження до моменту отримання і використання результату може бути джерелом помилки. Встановлення причин помилок допомагає обмежувати їх до мінімуму. Одночасно врахування помилок є умовою правильної інтерпретації результату і, таким чином, правильного використання отриманої інформації з метою виявлення, профілактики і лікування захворювань.

Практична робота

Визначення оптичної густини забарвлених розчинів з різною концентрацією

Кожна забарвлена речовина має свій 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.

Дослід 1. Побудова калібрувального графіку для визначення концентрації фосфору за показниками оптичної густини. Виміряти оптичну густину (A) розчинів, що містять різну кількість фосфору.

Принцип методу. Фосфати в розчині сульфатної кислоти утворюють з молібдатами фосфорно-молібденові комплекси, які відновлюються до

молібденової сині. Кількість фосфатів визначають колориметрично за інтенсивністю забарвлення досліджуваного розчину.

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

Хід роботи. У п'ять пробірок додають розчини у 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)					

Розчини змішують і не раніше, ніж через 2 хв, але не пізніше, ніж через 5 хв, вимірюють величину оптичної густини на ФЕКу, використовуючи червоний світлофільтр. Отримані дані вносять у таблицю. За результатами вимірювань будують графік залежності оптичної густини від концентрації фосфору в мкмоль/л.

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

Зробити висновок. Пояснити вплив концентрацій речовин на величину оптичної густини.

Дослід 2. Визначення наявності білків у розчині методом осадження сульфосаліциловою кислотою.

Принцип методу. Білки легко осаджуються із водного розчину мінеральними, органічними кислотами та солями важких металів. Денатурація і осадження білка кислотами зумовлюється нейтралізацією поверхневого заряду колоїдних частинок білка, руйнуванням гідратної оболонки білкових молекул та утворенням комплексних солей білка з кислотами. Важкі метали утворюють стійкі комплекси з SH-групами білків, що викликає зміни структури та втрату розчинності білка. Особливо чутливою реакцією на наявність білка в розчині є осадження трихлорацетатною (ТХАК) та сульфосаліциловою кислотою (чутливість останньої реакції складає 1:50000). Крім того, сульфосаліцилова кислота здатна осаджувати поряд з високомолекулярними білками, низькомолекулярні білки та продукти розпаду білків – поліпептиди і олігопептиди.

Матеріальне забезпечення: пробірки, розчин білка, 20 % - ний розчин сульфосаліцилової кислоти.

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

Клініко-діагностичне значення. Реакція з сульфосаліциловою та трихлорацетатною кислотами використовується для якісного та кількісного визначення білка в сечі.

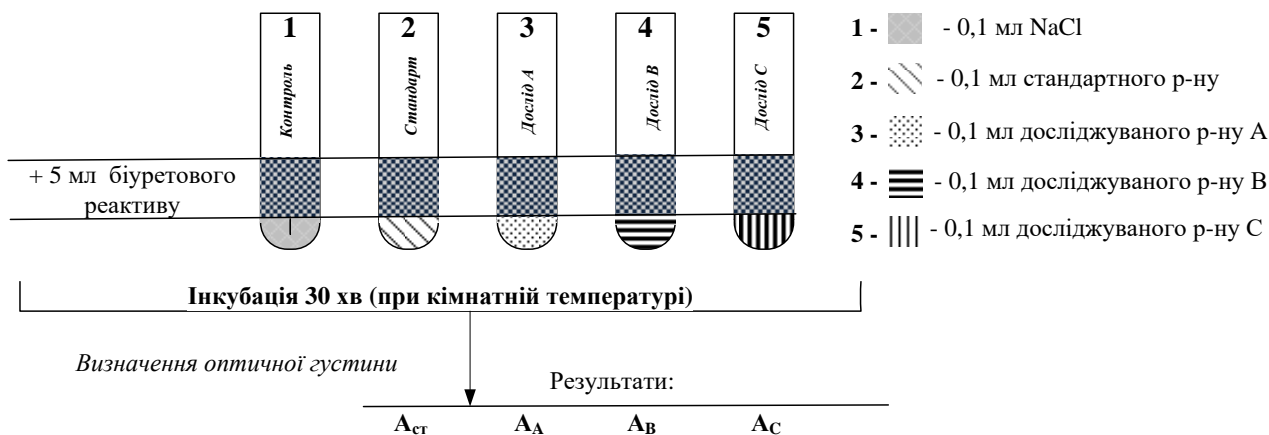
Здатність білка міцно зв'язувати іони важких металів використовується в клінічній практиці. Білок використовують як протиотруту при отруєннях солями ртуті, свинцю тощо. У разі отруєння солями важких металів хворому дають велику кількість білка (яєчного білка або молока). В шлунку утворюються нерозчинні комплекси металів з білками, внаслідок чого припиняється всмоктування отрути в кров, послаблюється інтоксикація та посилюється їх виведення з організму.

Дослід 3. Кількісне визначення білка в досліджуваному розчині шляхом вимірювання оптичної густини колориметричним методом (Біуретова реакція).

Принцип методу. Біуретова реакція – характерна реакція на сполуки, що містять в своєму складі не менше двох пептидних зв'язків. Такі сполуки в лужному середовищі утворюють з купруму сульфатом (мідним купоросом) комплекс, забарвлений у рожево-фіолетовий колір. В утворенні цього комплексу беруть участь пептидні зв'язки в енольній формі. Біуретова реакція служить доказом наявності пептидних зв'язків у білках та пептидах.

Матеріальне забезпечення: сироватка крові, калій-натрій виннокислий, міді сульфат, 0,9 % розчин NaCl, 10 % розчин NaOH, мірні пробірки, піпетки на 1, 2 і 10 мл, ФЕК, 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 запарафінованому 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 кожену 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 (біуретова реакція) свідчить про наявність у розчині білка чи поліпептидів. Інтенсивність забарвлення змінюється залежно від концентрації білка в розчині.



Розрахунок проводять за формулою:

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

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 CuSO_4 комплекс рожево-фіолетового забарвлення.

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

Клініко-діагностичне значення. Для кількісного визначення білків у біологічному матеріалі найчастіше застосовують фотокolorиметричні та спектрофотометричні методи, у 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 у сироватці крові дорівнює у дорослих 65-85 г/л (6,5-8,5 г %), у дітей до 6 років 56-85 г/л (5,6-8,5 г %).

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.

Визначення вмісту білка сироватки крові рефрактометричним методом, оснований на неоднаковій здатності різних середовищ заломлювати промінь

світла, що проходить через них. Відношення синуса кута падіння світла до синуса кута заломлення є постійною величиною і називається показником заломлення. Величина показника заломлення сироватки крові залежить, головним чином, від вмісту в ній білка. Для визначення показника заломлення використовують спеціальні прилади – рефрактометри.

Контрольні питання до практичної роботи теми 1

1. Назвати оптичні методи дослідження, які використовуються в клінічній біохімії.
2. Які методи дослідження використовують для виявлення функціональних груп (-SH, -NH₂, імідазольних) у білках, ферментах?
3. Вказати методи, які використовують для фракціонування білків.
4. З біологічної рідини шляхом висолювання виділили білок, який буде використаний для лікування. Яким методом проводять очищення розчину білка від солей?
5. Яка різниця між іонообмінною та афінною хроматографіями?
6. У яких випадках використовується імуноферментний аналіз?
7. Назвіть принципи радіоізотопних методів та їх застосування?
8. На чому ґрунтується застосування в біохімії флюориметричних методів?
9. Опишіть можливості методу ланцюгової полімеразної реакції в медицині.
10. Яким методом можна виявити антитіла до рецептора тиреотропного гормону для підтвердження діагнозу хвороба Грейвса?

Інструктивно-методичні матеріали до теми №1

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Предмет і завдання біохімії. Основні напрями та розділи біохімії: статична, динамічна, функціональна біохімія, медична та клінічна біохімія.
 - 1.1. Дати визначення.
Біохімія – це...
 - 1.2. Описати завдання біохімії.
 - 1.3. Охарактеризувати основні напрями та 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.
 - 2.1. Дати характеристику особливостей розвитку біохімії на різних етапах.
 - 2.2. Заповнити таблицю «Головні досягнення біохімії».

Етапи розвитку біохімії	Час	Головні досягнення
I – період накопичення емпіричних знань під час практичної діяльності людини: виробництва хліба, вина, сира, оцту, тютюну, дублення шкір, виготовлення барвників	з давніх часів до XV століття	

II – нагромадження знань хімії органічних речовин, фізіологічної хімії	XV ст. – друга половина XIX ст.	
III – біохімія – як наука	друга половина XIX ст. – початок XX ст.	
IV – сучасний період (розвиток основних напрямів біохімії)	40-50 – і роки XX ст - сьогодення	
Розвиток біохімії в Україні		

3. Хімічний склад живого організму. Біомолекули (білки, вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти, гормони, вітаміни тощо), їх біохімічні функції. Характерні риси живої матерії: обмін речовин й енергії та їх зв'язок із зовнішнім середовищем.

3.1. Дати коротку характеристику структури і властивостей основних біомолекул. Заповнити таблицю.

Полімери	Основні функції в людському організмі	Мономери
Білки		
Вуглеводи		
Ліпіди		
Нуклеїнові кислоти		

3.2. Дати визначення і навести приклади.

Метаболізм – це...

Анаболізм – це...

Катаболізм – це...

4. Структурні елементи прокариотичних та еукариотичних клітин. Основні функції субклітинних органел, їх фракційне розділення методом ультрацентрифування.

4.1 Скласти таблицю.

Органела	Функції	Фактор седиментації

4.2 Дати визначення:

Метод диференційного центрифугування – це...

5. Принципи основних методів клініко-біохімічних досліджень.

5.1. Заповнити таблицю.

№ з/п	Назву методу	Принцип методу	Мета використання в медичній практиці
1	Осадження речовин з розчину, висолювання білків		
2	Оптичні ✓ Фотоелектроколориметрія ✓ Спектрофотометрія		

	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Спектрометрія ✓ Люмінісцентний аналіз ✓ Флюоресцентна гібридизація <i>in situ</i> 		
3	Електрофорез <ul style="list-style-type: none"> ✓ Горизонтальний ✓ Зональний ✓ Гель-електрофорез ✓ Ізоелектричне фокусування ✓ Імуноелектрофорез 		
4	Хроматографія <ul style="list-style-type: none"> ✓ Іонообмінна ✓ Розподільча ✓ Ексклюзійна (гель-фільтрація) ✓ Афінна 		
5	Полярографія		
6	Манометричний		
7	Радіоізотопний		
8	Імуноферментний аналіз		
9	Блотинги		
10	Полімеразна ланцюгова реакція		

5.2. Заповнити таблицю « Види блотингу».

Види блотингу	Переклад з англ.	Використовується для визначення	Використання в медицині
Саузерн			
Соувестерн			
Нозерн			
Вестерн			
Істерн			

6. Методи таргетної доставки ліків за допомогою наночастинок. Нанотехнології в біохімії.

6.1. Дати визначення.

Наночастинки – це...

Нанотехнології – це...

Фулерени – це...

Нанокapsули – це...

6.2. Дати характеристику класифікаціям наночастинок.

7. Інформативність імуноферментних досліджень (ІФА) і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в діагностиці інфекційних захворювань (СНІД, SARS-CoV-2 тощо).

7.1. Дати визначення:

ІФА – це...

ПЛР – це...

- 7.2. Дати характеристику інформативності ПЛР при діагностиці інфекційних захворювань.
- 7.3. Пояснити, чому ПЛР при Covid-19 необхідно робити на 5-6 день захворювання.
- 7.4. Дати характеристику інформативності ІФА при діагностиці інфекційних захворювань.
- 7.5. Як оцінюють зростання IgM та IgG?
8. Мета проведення біохімічних лабораторних досліджень і критерії оцінки використаних методів лабораторних досліджень.
 - 8.1. Дати визначення.
 - Чутливість методу – це...*
 - Специфічність методу – це...*
 - Точність методу – це...*
 - Відтворюваність методу – це...*
 - Достовірність методу – це...*
9. Матеріал для лабораторних діагностичних досліджень, принципи забору та збереження матеріалу для лабораторних досліджень.
 - 9.1. Пояснити особливості забору крові, сечі, спинномозкової рідини, шлункового, дуоденального вмістів, амніотичної рідини для біохімічних аналізів.
 - 9.2. Антикоагулянти крові та їх застосування в лабораторній практиці.
 - 9.3. Пояснити особливості забору біологічного матеріалу для полімеразної ланцюгової реакції.
10. Характеристика помилок, що мають місце під час проведення лабораторних досліджень.
 - 10.1. Заповнити таблицю.

Вид помилки	Навести приклади можливих причин
перед проведенням дослідження	
аналітична лабораторна систематична	
аналітична лабораторна випадкова	
інтерпретаційна	

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 1

1. При обстеженні пацієнта на СНІД було отримано позитивний результат імуноферментного аналізу (ІФА). Який метод необхідно використати для виключення псевдопозитивного результату ІФА? Назвіть і опишіть цей метод.
2. До одного розчину білка додали натрію хлорид, до іншого – срібла нітрат. У якому розчині спостерігатиметься висолювання білка, а в якому - денатурація?
3. Якого заряду набуде білок, якщо розмістити його в розчин, рН якого нижче від ізоелектричної точки?
4. Якого заряду набуде білок, якщо розмістити його в розчині, рН якого вище від ізоелектричної точки?

5. Вміст альбумінів у плазмі крові становить 20 г/л. Як називають такий стан? Чим він може бути спричинений та які наслідки може мати для організму?
6. У сечі спостерігається позитивна реакція з сульфосаліциловою кислотою. Кількісно виявлено 0,253 % білка. Про що це свідчить? До яких наслідків в організмі може призвести такий стан?
7. За одноразове сечовипускання хворий зібрав сечу в три посудини (початкова, середня, кінцева порції). Реакція зі сульфосаліциловою кислотою дає позитивний результат у перших двох порціях, а в третій – негативний. Як трактувати такі результати аналізу?
8. Загальний вміст білка у крові становить 95 г/л. Чи відповідає це нормі? Яка причина такого стану?
9. На частку альбумінів сироватки крові здорової людини припадає 56 % вмісту загального білка, який дорівнює 65-85 г/л. Визначте білковий коефіцієнт і поясніть його можливі відхилення при патології.

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Катіонні глікопротеїни є основними компонентами слини привушних залоз. Які амінокислоти зумовлюють їх позитивний заряд?	А. *Лізин, аргінін, гістидин В. Аспартат, глутамат, гліцин С. Аспартат, аргінін, глутамат D. Глутамат, валін, лейцин E. Цистеїн, гліцин, пролін	
2	У новонародженої дитини спостерігаються: судоми, блювання, жовтяниця, специфічний запах сечі. Лікар-генетик висловив підозру про спадкову хворобу обміну речовин. Який метод дослідження необхідно використати для постановки точного діагнозу?	А. *Біохімічний В. Дерматогліфіка С. Популяційно-статистичний D. Цитогенетичний E. Близнюковий	
3	В клініку доставлено хворого у важкому стані після отруєння солями п्लомбуму. Яка з перелічених речовин може застосовуватися як акцептор п्लомбуму і таким чином	А. *Розчин білка В. Вода С. Аналгетики D. Розчин глюкози E. Фізіологічний розчин	

	зменшувати інтоксикацію організму?		
4	Лікар призначив пацієнту аналіз білкових фракцій крові. В лабораторії був використаний метод електрофорезу. Яка властивість білків дає змогу застосовувати даний метод?	А. *Наявність електричного заряду В. Оптична активність С. Високий онкотичний тиск D. Здатність до набухання E. Висока в'язкість	
5	Для кількісного розділення і визначення відносного вмісту кожної амінокислоти в гідролізаті білків використовують	А. *Електрофорез В. Розподільну хроматографію С. Іонообмінну хроматографію D. Ультрацентрифугування E. Гель-фільтрацію	

Ускладнені тести з багатьма відповідями

Пояснити, чому вибрані відповіді є правильними, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – високоспецифічний метод експрес –діагностики, що дозволяє множити певні нуклеотидні послідовності до утворення необмеженого числа копій генів в таких кількостях, які можна виявити методом молекулярної гібридизації за допомогою електрофорезу. Які твердження правильні щодо цього методу?	a. *Плавлення ДНК відбувається при температурі 94°C b. *Приєднання (відпалювання) праймерів до ДНК відбувається при температурі 50–65°C c. *Синтез нових ланцюгів ДНК відбувається при температурі 72°C d. Плавлення ДНК відбувається при температурі 50–65°C e. Плавлення ДНК відбувається при температурі 72°C f. Приєднання (відпалювання) праймерів до ДНК відбувається при температурі 72°C	

		g. Приєднання (відпалювання) праймерів до ДНК відбувається при температурі 94°C h. Синтез нових ланцюгів ДНК відбувається при температурі 50–65°C	
2	Блотинг (от англ. Blot) — загальна назва методів молекулярної біології з переносу певних белків чи нуклеїнових кислот з розчину, що містить велику кількість інших молекул, на певний носій (мембрану з нітроцелюлоз, PVDF або нейлону) з метою наступного аналізу. Блотинги класифікують за типом речовини, яку досліджують. Які твердження правильні щодо різновидів блотингів?	a. *Саузерн-блотинг — визначення послідовності ДНК у пробі b. *Нозерн-блотинг — визначення послідовності РНК у пробі c. *Вестерн-блотинг — визначення специфічних білків у пробі d. Саузерн-блотинг - визначення послідовності РНК у пробі e. Саузерн-блотинг - визначення специфічних білків у пробі f. Нозерн-блотинг — визначення послідовності ДНК у пробі g. Вестерн-блотинг — визначення послідовності ДНК у пробі h. Вестерн-блотинг — визначення послідовності РНК у пробі	

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Внесок вчених кафедри біохімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького в розвиток біологічної хімії.

Рекомендована література:

1. Зіменковський БС, Калинюк ТГ, Лесик РБ, Різничок СВ, Терещук СІ, Терещук ТО. Сув'язь поколінь. Фармацевтичний факультет Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького 1853-2009. Львів: Наутілус; 2009: 414-47.
2. Лесик РБ, Надрага МС, редактори. Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького: погляд крізь віки (До 230-річчя

від дня заснування): бібліографічний покажчик. Львів: ЛНМУ; 2014. 77с.

3. Парнас ЯО. Избранные труды. Москва: АН СССР; 1960. 491 с.
4. Панишко ЮМ, Метельська ЛС. Якуб-Кароль Оскарович Парнас. До 130-річчя від дня народження. В Панишко ЮМ, редактор. Феномен людини. Здоровий спосіб життя. Львів. 2014; 23(89):64-69.
5. Тимочко ІФ, редактор. Михайло Тимочко. Спогади рідних, колег, друзів. Львів: Кварт; 2020. 186 с.

Рекомендована література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-те вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.: ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
4. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
5. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
6. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
7. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Сверстюк АС, Бігуняк ТВ, Перевізник БО. Огляд методів та моделей полімеразно-ланцюгової реакції. Медична інформація та інженерія. 2014;3:97-100.
2. Полювання вчених на коронавірус SARS-COV-2, що викликає COVID-19: наукові стратегії подолання пандемії./ С.В.Комісаренко //Вісн.НАН України. -2020, №8. – С. 29-71.
3. COVID-19: cytokine storm and anticytokine therapy. Bondar, M., Pylypenko, M., & Loskutov, O.// EMERGENCY MEDICINE, 2021. - 17(2), 6–13. <https://doi.org/10.22141/2224-0586.17.2.2021.230629>
4. Szabo S. COVID-19: New disease and chaos with panic, associated with stress // Праці НТШ Медичні науки. – 2020, т. 59, № 1. – С. 41 – 62.

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: Засвоїти принципи організації та загальні властивості ферментів. Оволодіти методом визначення активності амілази слини і на її прикладі вивчити вплив температури та рН середовища на активність ферментів.

Актуальність теми: Ферменти – це біологічні каталізатори білкової природи, які забезпечують прискорення і координацію численних метаболічних процесів в живих організмах. Існують тисячі ферментів, які каталізують окремі хімічні перетворення або групи споріднених реакцій. Ферменти розрізняються за своєю будовою, наявністю небілкових компонентів, специфічністю, різними фізико-хімічними та каталітичними властивостями, локалізацією. Активність ферментів регулюється і може змінюватись в широких межах в залежності від численних факторів. Знання механізму дії ферментів та кінетики ферментативного каталізу лежить в основі розуміння метаболічних процесів у клітинах, тканинах та органах організму, що важливо для засвоєння перебігу хімічних перетворень і застосування ферментних препаратів, їх активаторів та інгібіторів у практичній медицині.

Компетентності фахові:

- засвоїти фізико-хімічні властивості білків-ферментів;
- знати прості та складні білки-ферменти, простетичні групи складних ферментів (кофактори, коферменти);
- засвоїти рівні структурної організації ферментів;
- знати номенклатуру та класифікацію ферментів, типи реакцій, що каталізують окремі класи ферментів;
- знати властивості та специфічність дії ферментів;
- знати принципи кількісного визначення активності ферментів;
- засвоїти основні положення кінетики ферментативного каталізу;
- оволодіти методикою виявлення амілази в слині (реакція з йодом).

Базові знання:

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія.

Отримані навички: знати фізико-хімічні властивості ферментів, вміти пояснити

та зобразити графічно залежність швидкості ферментативної реакції від рН середовища, температури та інших факторів; знати механізм дії ферментів та кінетику ферментативного каталізу.

Теоретичні питання

1. Ферменти: визначення; властивості ферментів як біологічних каталізаторів реакцій обміну речовин та як білків (електрохімічні властивості, розчинність, термодинамічна стабільність, здатність до осадження, денатурації, взаємодії з лігандами).
2. Рівні структурної організації ферментів. Прості ферменти. Складні ферменти, їх будова (кофактори, коферменти, простетичні групи). Класифікація коферментів за хімічною будовою. Роль іонів 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);
 - залежність активності ферментів від температури (пояснити і зобразити графічно).
 - залежність швидкості реакції від концентрації ферменту (пояснити і зобразити графічно);
 - залежність швидкості реакції 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.

Практична робота

Дослід 1. Виявлення амілази в слині (реакція з йодом).

Принцип методу. Амілаза відноситься до класу гідролаз – ферментів, що каталізують розрив хімічних зв'язків з приєднанням молекули води. Амілаза слини каталізує гідроліз крохмалю (розрив глікозидних зв'язків) через стадію утворення декстринів до дисахариду мальтози. Це можна підтвердити реакцією з йодом (позитивна для полісахаридів та декстринів) та реакцією Тромера (позитивна для цукрів, що мають вільний півацетальний гідроксил, зокрема для мальтози). Крохмаль реагує з йодом з появою синього забарвлення і не дає забарвлення в реакції Тромера, оскільки не містить вільних альдегідних груп, декстрини реагують з йодом з появою сполук червоного кольору. Мальтоза містить вільну альдегідну групу, а тому її можна виявити за допомогою проби Тромера.

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, 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 рідину використовують для аналізу.

Щоб переконатись у тому, що крохмаль з йодом дає синє забарвлення, в пробірку вносять 10 крапель розчину крохмалю та додають 2 краплі розчину I_2 в KI. Спостерігають позитивну реакцію.

У штатив ставлять 10 пробірок і наливають у кожен по 2 мл дистильованої води та додають по одній краплі розчину I_2 в KI.

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 в пробірки № 1, 2, 3 і т.д., що були заготовлені з розчином I_2 в KI. Якщо після першого перенесення в 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. Відзначають 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 реакційною сумішшю додають рівний об'єм 10 % розчину NaOH і 5-7 крапель 5 % розчину $CuSO_4$. 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.

Пояснити отриманий результат. Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення кількісного визначення активності амілази крові та сечі (діастази).

Амілаза синтезується переважно в слинних та підшлунковій залозах.

Підвищення активності амілази в крові спостерігається при панкреатиті, перитоніті, тромбозі судин, внаслідок введення в організм ряду фізіологічно активних сполук, зокрема морфіну, кодеїну, кортикотропіну (АКТГ) та кортизолу.

Підвищення активності амілази слинних залоз спостерігається при стоматиті, невралгії лицевого нерва, нирковій недостатності, паркінсонізмі.

Зниження активності амілази крові спостерігається при психічних захворюваннях, анацидних порушеннях. Зниження вмісту амілази в слині має місце при гіпосалівації, запаленні слинних залоз, тощо.

В клінічній практиці використовують визначення амілази крові та сечі для діагностики гострих панкреатитів. Кількість цього ферменту зростає в 10-30 разів, особливо протягом першої доби захворювання, потім поступово повертається до норми.

Дослід 2. Дослідження впливу рН середовища на активність амілази слини.

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності крохмалю при взаємодії з йодом утворювати синє забарвлення за умов оптимального для амілази рН середовища. Продукт розщеплення крохмалю – мальтоза – з йодом забарвлення не дає і її можна виявити за допомогою проби Тромера.

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

Хід роботи.

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

A. Хімотрипсин	1 – стереоспецифічність
B. Уреаза	2 – групова специфічність
C. Фумараза	3 – абсолютна специфічність
D. Пепсин	
E. Сахараза	

Інструктивно-методичні матеріали до теми №2

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Ферменти: визначення; властивості ферментів як біологічних каталізаторів реакцій обміну речовин та як білків (електрохімічні властивості, розчинність, термодинамічна стабільність, здатність до осадження, денатурації, взаємодії з лігандами).

1.1. Дати визначення:

Ферменти – це ...

1.2. Пояснити буквенні позначення субстрату (-ів), ензиму і продукту(-ів) реакції.

1.3. Навести спільні та відмінні риси між ферментами та неорганічними каталізаторами

1.3. Представити та пояснити фізико-хімічні властивості ферментів

1) електрохімічні;

2) амфотерні;

3) оптичні;

4) розчинність;

5) осадження;

6) денатурація;

7) взаємодія з лігандами.

2. Рівні структурної організації ферментів. Прості ферменти. Складні ферменти, їх будова (кофактори, коферменти, простетичні групи). Класифікація коферментів за хімічною будовою. Роль іонів металів у функціонуванні ферментів. Мультиферментні комплекси, ферментативні ансамблі, поліфункціональні ферменти, їх переваги. Навести приклади.

2.1. Пояснити рівні структурної організації ферментів, за допомогою яких зв'язків утворюються ці структури

2.2. Дати визначення ключовим словам:

Прості ферменти – це ...

Складні ферменти – це ...

Холофермент – це ...

Апофермент – це ...

Кофактор – це ...

Кoferмент – це ...

Простетична група – це ...

Металоферменти – це ...

2.3. Пояснити відмінності між коферментом та простетичною групою,

навести приклади, металовмісні ферменти.

Заповнити таблицю

Тип небілкової частини складного фермента	Особливість хімічної будови та зв'язування з апоферментом	Приклади
Кофактор		
Кофермент		
Протетична група		

2.4. Описати класифікацію коферментів за хімічною природою. Навести приклади. Заповнити таблицю.

№ з/п	Хімічна природа коферментів	Приклад коферментів
1	Похідні водорозчинних вітамінів	
2	Нуклеотиди - похідні вітамінів	
3	Динуклеотиди - похідні вітамінів	
4	Вітаміноподібні речовини	
5	Невітамінні нуклеотиди - макроерги	УДФ, ЦДФ
6	Фосфати моносахаридів	
7	Металопорфірини	
8.	Пептиди	Глутатіон

2.5. Заповнити таблицю

Роль металів у ферментативній активності	Приклади металів	Приклади ферментів
Me – кофактори		
Me - активатори		
Me - інгібітори		

2.6. Дати визначення і навести приклади

Мультиферментні комплекси – це...

Ферментативні ансамблі – це...

Поліфункціональні ферменти – це...

3. Будова ферментів: активний, регуляторний (алостеричний) центри, їх значення.

3.1. пояснити будову та значення активного центру ферменту

3.2. пояснити розташування та значення алостеричного центру ферменту

4. Номенклатура ферментів, навести приклади. Класифікація ферментів. Характеристика шести класів ферментів. Шифр ферментів.

4.1. Пояснити як утворюється систематична та тривіальна назви ферментів, навести приклади.

- 4.2. Пояснити, який принцип покладений в основу класифікації ферментів
- 4.3. Заповнити таблицю із зазначенням класів ферментів, типів каталізованих реакцій, прикладів ферментів, що належать до певних класів.

Номер класу	Назва класу	Тип каталізованої реакції	Приклади коферментів	Приклади ферментів
1	Оксидоредуктази			
2	Трансферази			
3	Гідролази			
4	Ліази			
5	Ізомерази			
6	Лігази			

5. Основні кінетичні властивості ферментів:

- залежність активності ферментів від рН середовища (пояснити і зобразити графічно);
- залежність активності ферментів від температури (пояснити і зобразити графічно).
- залежність швидкості реакції від концентрації ферменту (пояснити і зобразити графічно);
- залежність швидкості реакції від концентрації субстрату (пояснити і зобразити графічно); рівняння Міхаеліса-Ментен і Лануївера-Берка; смислове значення величини константи Міхаеліса.

5.1. Зобразити графічно залежність активності ферментів від рН середовища і дати визначення рН оптимум фермента, на графіку знайти значення V_{max} і рН оптимум

5.2. Зобразити графічно залежність активності ферментів від температури і дати визначення t оптимум фермента, на графіку знайти значення V_{max} і t оптимум

5.3. На графіку залежності швидкості реакції від концентрації субстрату знайти значення V_{max} , $\frac{1}{2} V_{max}$, K_m .

5.4. Написати рівняння Міхаеліса-Ментен та письмово пояснити смислове значення константи Міхаеліса

5.5. Зобразити графічно вираз ферментативної реакції в подвійних зворотних величинах та написати рівняння Лануївера-Берка.

6. 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).

6.1. Дати визначення:

Катал – це..

Міжнародна одиниця (МО) – це...

Питома активність – це...

Молярна активність – це ...

6.2. представити основні принципи визначення активності ферментів:

- 1) за кількістю продукту, що утворюється під дією ферменту;
- 2) за кількістю субстрату, що використовується;
- 3) за зміною кількості коферменту (окисно-відновні перетворення для НАД та ФАД);

7. 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.

7.1. Описати три етапи ферментативної реакції: утворення фермент-субстратного комплексу, процес перетворення субстрату, утворення продукту реакції.

7.2. Описати особливості взаємодії субстрату з ферментом за теорією «жорсткої матриці» Е.Фішера та гіпотезою «індукованої відповідності» Д.Кошланда.

7.3. Дати визначення терміна «енергія активації» та графічно пояснити відмінність енергії активації для 1) реакцій без каталізатора, 2) реакцій в присутності небіологічного каталізатора, 3) ферментативних реакцій.

7.4. Описати молекулярні ефекти взаємодії субстратів з активним центром:

- 1) зближення та орієнтації;
- 2) кислотно-основного каталізу на прикладі каталітичної дії хімотрипсину та ацетилхолінестерази; вказати особливості амінокислотного складу активних центрів та механізми реакцій;
- 3) нуклеофільного та електрофільного каталізу, навести приклади нуклеофільних та електрофільних груп.

8. Специфічність ферментів. Види специфічності (абсолютна, відносна, стереоспецифічність). Навести приклади.

8.1. Пояснити що таке специфічність дії ферментів та її значення.

8.2. Дати характеристику субстратній специфічності – абсолютній, відносній та стереоспецифічності, навести приклади до кожного виду специфічності. Заповнити таблицю.

Види субстратної специфічності	Приклади субстрату (-ів)	Приклад ензиму (-ів)
Абсолютна	Аргінін ? ? ?	? Глюкокіназа ? ?
Відносна	Білки ? ? ?	? Гексокіназа Алкогольдегідрогеназа ?
Стереоспецифічність	L-амінокислоти	?

	?	Оксидаза	D-аміно-
	?	кислот	
	?	?	
	?	?	

8.3. Дати визначення каталітичній специфічності. Навести приклад.

9. Внутрішньоклітинна локалізація та тканинна (органна) специфічність ферментів. Навести приклади.

9.1. Дати визначення і пояснити доцільність внутрішньоклітинної локалізації ферментів

9.2. Заповнити таблицю

Органела або компартмент клітини	Ферменти	Процеси, в яких ферменти беруть участь
Ядро	Ензими синтезу ДНК та РНК - ДНК- полімераза ?	Синтез ДНК ?
Мітохондрії: - матрикс - внутрішня мембрана		
Лізосоми		
Пероксисоми		
Комплекс Гольджі		
Рибосоми / гранулярна ендоплазматична сітка		
Агранулярна ендоплазматична сітка (фракція мікросом)		
Цитозоль		
Клітинна мембрана		

9.3. Описати маркерні ферменти та їх значення для ензимодіагностики.

Заповнити таблицю.

Орган чи тканина, порожнинні рідини	Ензими
Серцевий м'яз	
Скелетні м'язи	
Печінка	

Нирка (кіркова частина)	
Нирка (мозкова частина)	
Ротова порожнина	
Шлунковий сік	
Сік підшлункової залози	

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 2

1. Пояснити, який фермент присутній у розчині, якщо при додаванні до цього розчину H_2O_2 відбувається виділення пухирців O_2 .
2. Зниження вмісту Феруму в організмі людини викликає зниження активності ряду ферментів. Назвіть, які ферменти містять в якості кофактора Ферум.
3. При запаленні підшлункової кислоти порушується секреція травних ферментів. Назвіть, які травні ферменти синтезуються підшлунковою залозою і яку роль вони виконують.
4. Ряд спадкових захворювань називають лізосомальними. Назвіть, які ферменти знаходяться у лізосомах і яку роль вони виконують.
5. При отруєнні технічним спиртом метанолом з метою зменшення його токсичної дії потерпілим вводять етанол. Поясніть доцільність такого заходу враховуючи факт відносної специфічності ферменту алкогольдегідрогенази.

Ситуаційна клінічна задача до теми 2

1. Після споживання порції морозива з шоколадною поливкою та молочного коктейлю у дівчини-підлітка значно зріс рівень цукру в крові. Відомо, що в процесі метаболізму глюкози печінкою задіяні два ензими глюкокіназа ($K_m - 10\text{мМ}$) і гексокіназа ($K_m - 0,10\text{мМ}$).
 - Котрий з ензимів буде більш ефективний в даній ситуації, чому?
 - Яка біологічна роль константи Міхаеліса?

Посилання на відео:

1. <https://www.youtube.com/watch?v=yk14dOOvwMk>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=PNyvtcu5-EU>

Приклад вирішення клінічної задачі

Умова	Розв'язок
Ротенон - це хімічна речовина, яка використовується в основному як рибна отрута. Вона є зворотним конкурентним інгібітором НАДН-дегідрогенази, першого комплексу	<p>Відповідь:</p> <p>K_m збільшиться, тоді як V_{max} залишиться незмінним</p> <p>Конкурентні інгібітори за будовою подібні до субстрату, вони конкурують із ним за зв'язування з активним центром ферменту. Характерною особливістю конкурентного гальмування є те, що</p>

<p>електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. Застосування ротенона призводить до припинення клітинного дихання на цій стадії. Яка з наступних комбінацій описує вплив ротенона на кінетику ферменту НАДН-дегідрогенази?</p>	<p>ефективність інгібітора залежить від співвідношення концентрацій субстрату й інгібітора. Гальмування відбувається за умови перевищення концентрації інгібітора над концентрацією субстрату. У цьому випадку інгібітор утворює з ферментом комплекс фермент-інгібітор і фермент стає неактивним. Але якщо концентрація субстрату буде вищою за концентрацію інгібітора, утворюється фермент-субстратний комплекс і дія інгібітора припиняється. Кінетичний аналіз демонструє, що конкурентні інгібітори збільшують константу Міхаеліса (K_m) ферменту і не впливають на максимальну швидкість реакції.</p>
---	---

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	У хворих деякими формами лейкозів клітини не здатні перетворювати аспарагінову кислоту в аспарагін. Введення аспарагінази в кров хворих лейкозом призводить до загибелі ракових клітин. Виберіть вид специфічності аспарагінази.	А. *Абсолютна В. Відносна С. Стереохімічна D. Групова E. Видова	
2	При вивченні механізму ферментативної реакції були виявлені функціональні групи, що забезпечують зв'язок молекули ферменту з субстратом і приймають пряму участь в акті каталізу. Як називається ділянка ферменту, утворена цими групами?	А. *Активний центр В. Алостеричний центр С. Кофермент D. Кофактор E. Простетична група	
3	Фармпрепарати, що містять ртуть, миш'як та інші важкі метали інгібують ферменти, які мають сульфгідрильні групи. Яку	А. *Цистеїн В. Ізолейцин С. Гістидин D. Аспарагінову кислоту	

	амінокислоту використовують для реактивації цих ферментів?	Е. Гліцин	
4	Експериментально довели, що фермент уреаза підвищує швидкість гідролізу сечовини при рН 8 і 10°C в 10 мільйон разів в порівнянні з неферментативним процесом. Вкажіть причину зміни швидкості реакції.	А. *Зменшення енергії активації реакції гідролізу В. Зменшення вільної енергії реакції С. Підвищення кінетичної енергії субстрату D. Підвищення енергії активації реакції гідролізу Е. Порушення гідрофобних взаємодій	
5	До якого класу ферментів належить глюкокіназа, яка каталізує реакцію перенесення фосфорної групи з АТФ на глюкозу?	А. *Трансферази В. Ліази С. Ізомерази D. Гідролази Е. Оксидоредуктази	

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Механізм каталітичної дії хімотрипсиногену та ацетилхолінестерази.

Рекомендована література

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-те вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров О.Я., Сольські Я., Великий М.М. та ін.. Біохімія ензимів. Ензимодіагностика. Ензимопатологія. Ензимотерапія. – Львів: Кварт, 2008. – С. 46.
7. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
8. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
9. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
10. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.

11. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
12. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
13. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
14. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Скляр О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Скляр О.Я. – Київ: Медицина, 2006. – 432 с.
3. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
4. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.: Академперіодика; 2017. - 76 с.
5. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред Н.О.Сибірної – Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
6. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
7. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Дмухальська Е. Б., Гонский Я. И. Вплив важких металів, фосфорорганічних пестицидів і пептиду на активність ферментів глутатіонової системи // Медична та клінічна хімія. 2016. Т. 18, № 1. С. 70 – 74.
2. Zeymer C, Hilvert D. Directed Evolution of Protein Catalysts. Annu Rev Biochem. 2018 Jun 20;87:131-157. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012034. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29494241
3. Benítez-Mateos AI, Roura Padrosa D, Paradisi F. Multistep enzyme cascades as a route towards green and sustainable pharmaceutical syntheses. Nat Chem. 2022 May;14(5):489-499. doi: 10.1038/s41557-022-00931-2. Epub 2022 May 5. PMID: 35513571 Review.

Тема № 3. Дослідження регуляції ферментативних процесів та аналіз механізмів виникнення ензимопатій. Медична ензимологія.

Мета заняття: Засвоїти основні принципи регуляції ферментативних процесів, порушення функціонування ферментів у клітині та використання ферментів у медицині.

Актуальність теми: Ферменти є біокатализаторами з активністю, яка може змінюватися при певних регулюючих впливах. Медична ензимологія вивчає використання у клінічній практиці ряду ферментів та їх інгібіторів як фармпрепаратів, визначення активності ферментів крові та сечі для діагностики патологічних станів.

Компетентності фахові:

- знати принцип методу дослідження впливу активаторів та інгібіторів на активність амілази слини;
- вміти аналізувати шляхи та механізми регуляції ферментативних процесів,

- як основи обміну речовин в організмі в нормі та при патологіях;
- вміти пояснювати застосування інгібіторів та активаторів ферментів як фармпрепаратів при порушеннях обміну речовин та певних патологіях;
 - вміти пояснювати зміни перебігу ферментативних процесів та накопичення проміжних продуктів метаболізму при вроджених (спадкових) та набутих вадах метаболізму – ензимопатіях;
 - вміти аналізувати зміни активності індикаторних ферментів плазми крові при патологіях певних органів та тканин.

Базові знання:

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія.

Отримані навички: знати основні принципи ферментативної регуляції та основні положення медичної ензимології.

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) в якості лікарських засобів.

Практична робота

Дослід 1. Дослідити вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини.

Принцип методу. Сполуками, що підвищують активність ферментів – активаторами – є іони 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: 1 % р-н крохмалю, 0,1 %-й розчин йоду в 0,2%-му розчині йодиду калію, 5 % р-н CuSO_4 , 1 %-й розчин NaCl , розведена слина, газовий пальник, водяна баня, штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи. Слину розводять в 2 рази. Беруть 3 пробірки. В пробірку № 1 наливають 1 мл води, в пробірку № 2 – 0,8 мл води та 0,2 мл 1% -го розчину NaCl , в пробірку № 3 – 0,8 мл води та 0,2 мл 1 %-го розчину CuSO_4 . У всі три пробірки додають по 1 мл слини. Вміст перемішують і додають по 2 мл 1 % -го розчину крохмалю, знову перемішують і ставлять в термостат чи на водяну баню при $t = 37^\circ\text{C}$ на 15 хв.

Далі у всіх пробірках проводять реакцію з йодом (0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-му розчині йодиду калію). Спостерігають зміну забарвлення.

Результати роботи заносять у таблицю:

Вміст пробірок	1. № пробірки		
	1	2	3
Вода, мл	1	0,8	0,8
NaCl , 1 %-й розчин, мл	---	0,2	---
CuSO_4 , 5 %-й розчин, мл	---	---	0,2
Слина (розведення 1:2), мл	1	1	1
Крохмаль, 1 %-й розчин, мл	2	2	2
Забарвлення після додавання йоду			

За результатами проведеного експерименту зробити висновки.

Клініко-діагностичне значення. Інгібітори ферментів широко використовуються в медицині в якості лікарських засобів, зокрема ацетилсаліцилова кислота (аспірин) – інгібітор циклооксигенази (простагландинсинтази) використовується як протизапальний препарат, трасилол – інгібітор трипсину та контрикал – інгібітор протеїназ (зокрема калікреїнів) використовуються при панкреатиті, алопуринол – інгібітор ксантиноксидази застосовується при подагрі, тощо.

Дослід 2. Дослідити вплив фосфаколу та іонів кальцію на активність холінестерази.

Принцип методу. Фосфорорганічні сполуки (ФОС, фосфакол) є незворотними інгібіторами холінестерази та ацетилхолінестерази, оскільки ковалентно зв'язуються з активним центром ферменту і гальмують його активність. Препарати ФОС є високотоксичними отрутами для комах (пестициди) та теплокровних тварин. Механізм гальмівної дії полягає у зв'язуванні з ОН-групою серину в активному центрі ферменту.

При проведенні нервового збудження відбувається зростання концентрації іонів Ca^{2+} у нервовому закінченні, що є сигналом для активації виходу ацетилхоліну у синаптичну щілину, взаємодії його з холінорецепторами

постсинаптичної мембрани та розщепленням ацетилхолінестеразою. Окрім цього, іони кальцію є потужним активатором холінестерази.

Метод кількісного визначення холінестерази ґрунтується на титруванні лугом ацетатної кислоти, що вивільнилась в процесі гідролізу ацетилхоліну.

Кількість лугу, що затратилась на титрування є мірою активності ферменту.

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

Хід роботи. Три пробірки заповнюють реактивами за таблицею.

Вміст пробірок	№ пробірки		
	1	2	3
Сироватка крові, мл	0,5	0,5	0,5
0,5 % розчин CaCl_2 , кіл-сть крапель	---	5	---
0,5 % розчин фосфаколу, кіл-сть крапель	---	---	5
Інкубація при кімнатній температурі, 5 хвилин			
2 % розчин ацетилхоліну, мл	1,5	1,5	1,5
Інкубація 10 хвилин, 37 ° С			
Фенолфталеїн, кіл-сть крапель	2	2	2
Кількість 0,1 М NaOH, що пішла на титрування, мл			

Зробити висновки.

Клініко-діагностичне значення. Холінестераза каталізує реакцію гідролізу нейромедіатора – ацетилхоліну з утворенням холіну та ацетатної кислоти. В крові людини міститься два види холінестерази. В сироватці міститься неспецифічна ацилхолінестераза (КФ 3.1.1.8), яка розщеплює не лише ацетилхолін, але й інші ефіри холіну. В еритроцитах міститься специфічна, істинна ацетилхолінестераза, яка розщеплює лише ацетилхолін (КФ 3.1.1.7).

У нормі активність холінестерази в сироватці крові становить 44,4 – 94,4 мккат/л (колориметричним методом за гідролізом ацетилхолінхлориду).

Фізіологічно активні сполуки, що є інгібіторами ацетилхолінестерази, мають важливе фармакологічне та токсикологічне значення, оскільки спричиняють значне підвищення концентрації нейромедіатора як в структурах центральної нервової системи, так і в організмі в цілому.

Зворотні інгібітори ацетилхолінестерази застосовуються в медицині з метою збільшення активності холінергічної імпульсації, порушеної при певних неврологічних захворюваннях, таких як атонія кишківника, сечового міхура. Із зазначеною метою застосовуються препарати: Прозерин, Фізостигмін, Галантамін.

Незворотні інгібітори ацетилхолінестерази є потужними нервовими отрутами, які спричиняють різке збудження нервової системи із судомами, порушенням функції серцево-судинної, гастро-інтестинальної та інших фізіологічних систем організму. Найбільш поширеними незворотними інгібіторами є фосфорорганічні сполуки – ФОС. В сільському господарстві для боротьби зі шкідливими комахами використовують: хлорофос, дихлофос, метафос, карбофос, тощо. Нервово-паралітичними отрутами, що використовуються як бойові отруйні речовини є табун, зарин, зоман, тощо. Висока чутливість холінестерази до дії фосфорорганічних сполук робить її специфічним біохімічним маркером для виявлення впливу цих отрут на організм людини. Механізм гальмівної дії їх полягає у зв'язуванні з ОН-групою серину в активному центрі ферменту.

При проведенні нервового збудження відбувається зростання концентрації іонів Ca^{2+} у нервовому закінченні, що є сигналом для активації виходу ацетилхоліну у синаптичну щілину, взаємодії його з холінорецепторами постсинаптичної мембрани та розщепленням ацетилхолінестеразою. Окрім цього, іони кальцію є потужним активатором холінестерази.

Контрольні питання до практичної роботи теми 3

1. Пояснити вплив модуляторів на активність ферментів на прикладі визначення активності холінестерази в присутності хлориду кальцію та фосфаколу, на прикладі активності амілази слини в присутності натрію хлориду і купруму сульфату.
2. Вкажіть який тип інгібування спостерігається при застосуванні інгібітора ацетилхолінестерази – прозерину?
3. Ацетилхолінестераза – фермент, що здійснює розщеплення ацетилхоліну. Інсектициди, пестициди та отрути з нервово-паралітичною дією на основі фторфосфатів, незворотньо інгібують ацетилхолінестеразу. Який молекулярний механізм інгібування ацетилхолінестерази інсектицидами?

Інструктивно-методичні матеріали до теми №3

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Активація та інгібування ферментів. Активатори ферментів (приклади). Інгібування ферментів: зворотне, незворотне, конкурентне, неконкурентне (навести приклади)

1.1. Дати визначення ключовим словам:

Активатори – це...

Інгібітори – це...

1.2. Пояснити активацію ферментів, навести приклади активаторів.

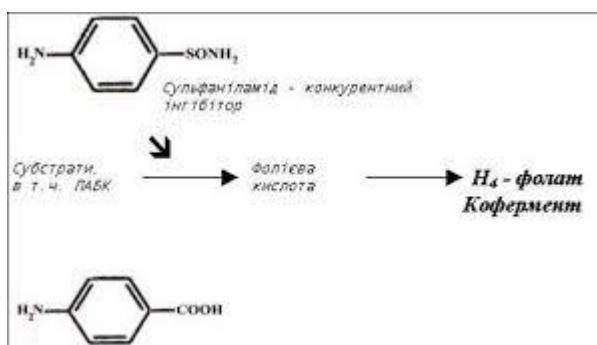
1.3. Описати і пояснити зворотне, незворотне, конкурентне, неконкурентне інгібування, навести приклади таких інгібіторів. Заповнити таблицю.

Види інгібування	Приклади інгібіторів	Ензим, дія якого інгібується
------------------	----------------------	------------------------------

Незворотне	- Фосфорорганічні сполуки (ФОС) - Алкілюючі агенти	-... -...
Зворотне конкурентне	... - Сульфаніламід - Метотрексат - Прозерин	- Сукцинатдегідрогеназа - ... - ... - ...
Зворотне неконкурентне	- Іони важких металів (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{+})	-

1.4. Представити графіки Міхаеліса-Ментен та Лайнуівера–Берка для конкурентного та неконкурентного інгібування із зазначенням показників V_m та K_m .

1.4. Пояснити механізм конкурентного інгібування на прикладі дії сульфаніламідних препаратів.



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.

2.1. Пояснити алостеричну регуляцію та навести приклади алостеричних інгібіторів.

2.2. Описати шляхи ковалентної модифікації ферментів та навести приклади

2.3. Пояснити обмежений протеоліз, навести приклади

2.4. Описати регуляторну дію білків (кальмодуліну, інгібіторів протеїназ, антигемофільного глобуліну А)

2.5. Дати визначення:

Конститутивні ферменти – це...

Адаптивні ферменти – це...

2.6. Пояснити роль циклічних нуклеотидів в регуляції ферментативних процесів. Представити реакції утворення та розщеплення цАМФ, цГМФ.

3. Регуляція шляхом зміни кількості ферментів (конститутивні та адаптивні ферменти).

3.1. Дати визначення:

Конститутивні ферменти – це...

Адаптивні ферменти – це...

4. Ізоферменти (визначення, будова на прикладі лактатдегідрогенази та креатинфосфокінази). Використання ізоферментів для діагностики.

4.1. Дати визначення:

Ізоферменти – це ...

4.2. описати будову, локалізацію та значення для діагностики ізоферментів лактатдегідрогенази

4.3. описати будову, локалізацію та значення для діагностики ізоферментів креатинфосфокінази

4.4. Заповнити таблицю

Назва ізоферменту/ аббревіатура	Кількість субодиниць в молекулі	Типи субодиниць	Кількість ізоформ	Будова ізофермента
Лактатдегідрогеназа ЛДГ				ЛДГ1 - ЛДГ2 - ЛДГ3 - ЛДГ4 - ЛДГ5 -
Креатинфосфокіназа КФК				

1.5. Пояснити різну електрофоретичну активність ізоферментів ЛДГ в залежності від складу субодиниць та використання електрофорезу для визначення вмісту ізоферментів крові при інфаркті міокарду і захворюваннях печінки.



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)

5.1. Дати визначення:

Ензимодіагностика – це ...

5.2. Пояснити зміни маркерних ферментів крові при інфаркті міокарда, нарисувати графік змін цих ферментів у динаміці захворювання.

5.3. Заповнити таблицю

Патології	та	Органоспецифічні	Напрямок	Напрямок
-----------	----	------------------	----------	----------

патологічні процеси	ферменти	змін в крові	змін в сечі
Інфаркт міокарду			
Запальні процеси печінки			
Гострий панкреатит			
Захворювання скелетних м'язів, що супроводжуються цитолізом			

6. Ензимопатологія (визначення). Вроджені (спадкові) та набуті вади метаболізму, (приклади, їх клініко-лабораторна діагностика).

6.1. Дати визначення:

Ензимопатологія – це ...

6.2. Пояснити причини виникнення вроджених та набутих вад метаболізму.

6.3. Навести приклади спадкових ензимопатій обміну вуглеводів, їх клініко-лабораторна діагностика.

6.4. Навести приклади спадкових ензимопатій обміну ліпідів, їх клініко-лабораторна діагностика.

6.5. Навести приклади спадкових ензимопатій обміну амінокислот, їх клініко-лабораторна діагностика.

6.6. Заповнити таблицю:

Назва спадкових ензимопатологій	Назва ферменту, нестача якого викликає розвиток патології	Реакція, яку каталізує фермент	Характерні біохімічні та клінічні зміни при патології
Фенілкетонурія	Фенілаланін-4-монооксигеназа		

7. Ензимотерапія (визначення). Використання ферментів, кофакторів та інгібіторів ферментів (ацетилсаліцилова кислота, алопуринол, контрикал, трасилол, сульфаніламідні препарати та інші) в якості лікарських засобів.

7.1. Дати визначення:

Ензимотерапія – це ...

7.2. Пояснити принципи використання ферментів як фармпрепаратів.

7.3. Заповнити таблицю:

Фармакологічна класифікація ферментів	Фермент / Назва фармпрепарату, що містить його	При яких захворюваннях використовується	Мета використання

		ЮТЬ	
1..Пептидази (Протеази)	Пепсин Трипсин Хімотрипсин		
2. Нуклеази	Рибонуклеаза (РНКаза) Дезоксирибонуклеаза (ДНКаса)		
3..Препарати гіалуронідази	Гіалуронідаза / Лідаза, ронідаза		
4. Фібринолітичні ферменти	Урокіназа Фібринолізин (плазмін) Стрептокіназа Альтеплаза / Актилізе		
5.Оксидоредуктази	Цитохром С Супероксиддисмутаза/ Ерисод, Пероксинорм		
6..Гідролази	Аспарагіназа Пеніциліназа		
7. Поліферментні препарати	... / Панкреатин / Креон / Фестал / Вобензим		

7.4. Пояснити принципи використання активаторів ферментів у медицині. Навести приклади.

7.5. Пояснити при яких захворюваннях доцільно використовувати інгібітори ферментів, заповнивши таблицю:

Інгібітор фермента	Фермент, дія якого блокується	Реакція, яку каталізує фермент	Біохімічний / клінічний ефект
Алопуринол			
Контрикал			
Трасилол			
Ацетилсаліцилова кислота (аспірин)			
Сульфаніламідні препарати			
Метотрексат			

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 3

1. У дитини спостерігається виділення сечі з високим вмістом гомогентизинової кислоти, яка темніє на повітрі. З якою ферментопатологією пов'язані вказані прояви?
2. Поясніть, дефіцит яких ферментів викликає такі зміни: збільшення печінки, м'язова слабкість після фізичного навантаження, надлишок глікогену зміненої структури у тканинах, виражена глюкозурія натще.
3. Алопуринол, інгібітор ксантиноксидази, використовують для лікування подагри. Поясніть механізм дії цього препарату.
4. У клінічній практиці для лікування гострого і хронічного панкреатитів та інших уражень підшлункової залози використовують фармпрепарат контрикал. Який механізм його дії?
5. Ацетилсаліцилову кислоту, інгібітор циклооксигенази, використовують як протизапальний засіб. Поясніть лікувальний ефект цього препарату.

Ситуаційні клінічні задачі до теми 3

1. Чоловік 51р. звернувся до лікаря з приводу болю в грудях. Зі слів пацієнта останнім часом, після фізичних навантажень він відчуває раптові стискаючі болі у грудній клітці, які поширюються на ліву сторону та віддають у шию. Останній напад болю дещо відрізнявся від попередніх випадків, оскільки тривав довше (біля 15 хв.) і супроводжувався нудотою та спітнінням. З анамнезу відомо, що раніше пацієнт не скаржився на здоров'я і не звертався до лікарів кілька останніх років.
В процесі обстеження хворого було встановлено, що легені пацієнта чисті, дихання безшумне, ритми серця рівні. Однак, електрокардіограма виявила виражену елевацію сегмента ST у відведеннях II, III і aVF. У сироватці крові був високий рівень креатинфосфокінази та міоглобіну.
 - Який діагноз можна поставити, спираючись на дані клінічного обстеження?
 - Які біохімічні показники визначали для підтвердження діагнозу?
2. 55- річна жінка з діагнозом «міастенія гравіс» відчуває сильну м'язову слабкість та втому, що виникає внаслідок зниження кількості ацетилхоліну в м'язах. Їй призначили фізостигмін, препарат, який підвищує рівень ацетилхоліну шляхом інгібування ацетилхолінестерази.
 - Поясніть механізм дії фізостигміну.

Посилання на відео:

1. https://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/animations/enzyme_inhibition/index.html
2. <http://higherred.mheducation.com/olcweb/cgi/pluginpop.cgi?it=swf::535::535::/sites/dl/free/0072437316/120070/bio10.swf::Feedback%20Inhibition%20of%20Biochemical%20Pathways>
3. <https://www.youtube.com/watch?v=PILzvT3spCQ>

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Батьки хлопчика 3-х років звернули увагу на потемніння кольору його сечі при відстоюванні. Об'єктивно: температура у нормі, шкірні покриви чисті, рожеві, печінка не збільшена. Назвіть імовірну причину даного стану.	А. *Алкаптонурия В. Синдром Іценко-Кушінга С. Подагра D. Гемоліз E. Фенілкетонурия	
2	Для лікування деяких інфекційних захворювань, викликаних бактеріями, застосовують сульфаніламідні препарати, що блокують синтез фактора росту бактерій. Назвіть механізм їх дії.	А. *Є антивітамінами пара-амінобензойної кислоти В. Є алостеричними ферментами С. Є алостеричними інгібіторами ферментів D. Беруть участь в окисно-відновних реакціях E. Інгібують всмоктування фолієвої кислоти	
3	Активність яких ферментів необхідно визначити з діагностичною і прогностичною метою, якщо в клініку поступив хворий з патологією серцевого м'язу?	А. *Креатинкінази, АЛАТ, АсАТ В. Аргінази, пептидази, фосфатази С. Лізоциму, цитратсинтази, альдолази D. Нейрамінідази, гексокінази, піруваткінази E. СукцинатДГ, малатДГ, ізоцитратДГ, альфаКГДГ	
4	При обстеженні хворого встановлено підвищення в крові активності ізоферментів креатинкінази ММ ₁ і ММ ₃ . Вкажіть їх спільні властивості.	А. * Каталізують одну і цю ж реакцію В. Чутливість до різних інгібіторів С. Електрофоретична рухливість D. Молекулярна маса E. Термолабільність	
5	Одним із шляхів регуляції	А. *Алостеричного	

	<p>активності ацетил-КоА карбоксилази (лімітуючого фермента в синтезі жирних кислот) є ретроінгібування кінцевим продуктом - пальмітоїл-КоА. Ретроінгібування є варіантом:</p>	<p>інгібування В. Необоротного інгібування С. Конкурентного гальмування D. Ковалентної модифікації ферменту Е. Безконкурентного гальмування</p>	
--	--	---	--

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Використання ферментів при захворюваннях травної системи, при гнійно-некротичних процесах, як фібринолітичні препарати та інші.

Рекомендована література

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-те вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ПІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров О.Я., Сольські Я., Великий М.М. та ін.. Біохімія ензимів. Ензимодіагностика. Ензимопатологія. Ензимотерапія. – Львів: Кварт, 2008. – С. 46.
7. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
8. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “ Medicine”, 2021. -544 p.
9. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
10. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
11. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
12. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
13. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
14. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.

2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірна, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Активність амінотрансфераз у сироватці крові щурів при злоякісному рості карциноми герена за умов введення антиоксидантного препарату / Я. Б. Раєцька, Т. В. Іщук, О. О. Моргаєнко, Л. І. Остапченко // Медична хімія. 2013. Т. 15. № 4. С. 41-44.
2. Басараб, І. М. Зміни активності маркерних ензимів у крові та органах тварин за дії екзогенних чинників: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук : [спец.] 03.00.04 «Біохімія» / Ін-т біології тварин. Львів, 2013. 20 с.
3. Кібірев В. К., Осадчук Т. В. Структура та властивості інгібіторів протеїнконтвертаз // Укр. біохім. журн. 2012. Т. 84, № 2. С. 5-29.
4. Dhankhar R, Gupta V, Kumar S, Kapoor RK, Gulati P . Microbial enzymes for deprivation of amino acid metabolism in malignant cells: biological strategy for cancer treatment. . Appl Microbiol Biotechnol. 2020 Apr;104(7):2857-2869. doi: 10.1007/s00253-020-10432-2. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32037468
5. Métayer LE, Brown RD, Carlebur S, Burke GAA, Brown GC. Mechanisms of cell death induced by arginase and asparaginase in precursor B-cell lymphoblasts. Apoptosis. 2019 Feb;24(1-2):145-156. doi: 10.1007/s10495-018-1506-3.

Тема № 4. Роль водо- і жиророзчинних вітамінів у метаболізмі. Дослідження ролі кофакторів і коферментних вітамінів у прояві каталітичної активності ферментів.

Мета заняття: Засвоїти будову, загальні принципи класифікації вітамінів за хімічною природою. Засвоїти роль водорозчинних вітамінів у функціонуванні ферментів в якості коферментів. Ознайомитися з деякими методами якісного та кількісного визначення вітамінів.

Актуальність теми: Водорозчинні вітаміни беруть участь в обміні речовин як коферменти і активатори багатьох ферментативних процесів.

Обмеження надходження вітамінів водо- і жиророзчинних вітамінів в організм або патологія їх обміну, пов'язана з порушенням всмоктування, перетворення водорозчинних вітамінів у коферментні форми, різко знижує інтенсивність енергетичного та пластичного обмінів, що супроводжується порушенням функцій головного мозку, серця, печінки та інших органів, зниженням імунітету до вірусних та інфекційних захворювань, втратою організмом здатності адаптуватись до різних несприятливих факторів.

Недостатнє забезпечення організму вітамінами призводить до розвитку гіповітамінозів із характерними клінічними проявами. Надлишок жиророзчинних вітамінів викликає розвиток гіпервітамінозів.

Компетентності фахові:

- вміти трактувати роль вітамінів та їх біологічно активних похідних у механізмах каталізу за участю основних класів ферментів;
- пояснювати застосування антивітамінів як інгібіторів ферментів при інфекційних захворюваннях та при патологіях системи гомеостазу;
- пояснювати роль металів в механізмі ферментативного каталізу;
- вміти класифікувати окремі коферменти за хімічною природою та типом реакції, яку вони каталізують.
- знати принцип методу визначення різних водорозчинних коферментних вітамінів у біологічних рідинах; вміти інтерпретувати отримані дані.

Базові знання:

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія.

Отримані навички: вміти писати структурні формули коферментних форм вітамінів.

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 КоАШ 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 в 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 (K_2 , K_3) та їх водорозчинні форми, будова, біологічна роль, джерела для людини, механізм дії, добова потреба, ознаки недостатності, застосування в медицині.
11. Вітаміноподібні речовини: визначення, структура та біологічна роль. Будова, властивості, участь в хімічних реакціях хінонових і карнітинових коферментів. Написати структурні формули убіхінону/убіхінолу і ацилкарнітину.

Практична робота

Дослід 1. Феррихлоридна проба на піридоксин.

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 %-го розчину $FeCl_3$ і збовтують. Рідина забарвлюється в червоний колір.

Пояснити отриманий результат і зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. У нормі вміст даного вітаміну в крові людини становить 0,6 мкмоль/л, сироватці – 0,4 мкмоль/л. Основною метаболічно активною формою вітаміну B_6 є фосфорний ефір піридоксалу – піридоксаль-5-фосфат (ПАЛФ). Обмежену біологічну дію виявляє піридоксамін-5-фосфат (ПAMФ), який бере участь тільки в реакціях переамінування. Дані коферменти входять до ряду ферментів, які каталізують наступні реакції: транспорт амінокислот через клітинні мембрани; реакціях переамінування, декарбоксилування, десульфування, знешкодженні біогенних амінів, синтезі гемопротейнів та сфінголіпідів. При нестачі даного вітаміну розвивається неврастенічний синдром, еритема тильної частини кистей рук, шиї, грудної клітки, гіперкератоз, сухість та блідість губ, можливий біль у м'язах по ходу нервів.

Дослід 2. Відновлення $K_3Fe(CN)_6$ аскорбіновою кислотою.

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

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 %-го розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 1 %-го 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 в зелено-синій колір і випадає синій осад берлінської лазурі. При обережному нашаруванні дистильованої води, осад на дні пробірки стає виразнішим. В другій пробірці зелено-бура рідина забарвлення не змінює.

Пояснити отримані результати і зробити висновок.

Дослід 3. Реакція з феруму хлоридом на виявлення вітаміну Е.

Принцип методу. Спиртовий розчин α -токоферолу окиснюється феруму хлоридом до токоферилхінону червоного кольору.

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

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

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

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

Більшість проявів недостатності токоферолу залежить, мабуть, від припинення здійснюваної вітаміном інгібуючої дії на аутоокиснення ненасичених жирних кислот, що входять у склад клітинних і субклітинних мембран: гемолітична анемія у недоношених дітей; атрофія сім'яників і безплідність; розсмоктування плоду на ранніх стадіях вагітності; м'язова дистрофія, що супроводжується втратою внутрішньоклітинних азотистих компонентів та білків м'язів. Безпосередня причина м'язової дистрофії – вивільнення лізосомальних гідролаз внаслідок дефекту мембрани лізосом.

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

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

Найбільш багаті на вітамін Е рослинні масла: соняшникове, кукурудзяне, бавовняне, оливкове. Особливо високий його вміст у маслі, отриманому із зародків пшениці, вівса, зеленого горошку. Випускають препарат синтетичного α -токоферолу ацетату в рослинному маслі для внутрішнього прийому і для внутрішньом'язових ін'єкцій. Застосовують в якості антиоксиданту при м'язовій дистрофії, порушенні репродуктивної функції у жінок і чоловіків,

гемолітичній анемії у новонароджених, в комплексній терапії серцево-судинних захворювань, очних та печінкових захворювань тощо.

Контрольні питання до практичної роботи теми 4

1. У хворого спостерігається кровоточивість ясен, болі в м'язах та суглобах, підшкірні точкові крововиливи. Нестача якого вітаміну спостерігається та яким методом це можна виявити у сечі?
2. При тривалому лікуванні ізоніазидом хворих на туберкульоз виникають порушення пов'язані з недостатністю вітаміну В₆. Яка причина такого стану?
3. За добу у людини виділяється 10 мг вітаміну С. Чи забезпечений організм цим вітаміном? Поясніть відповідь.
4. За добу у людини виділяється 70 мг аскорбінової кислоти. Як оцінити отримані дані?
5. У пацієнта виявлений гіповітаміноз В₆. Порушення яких хімічних процесів буде спостерігатися при цьому?

Інструктивно-методичні матеріали до теми №4

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Вітаміни як незамінні біологічно-активні компоненти харчування організму людини. Класифікація вітамінів.

1.1. Дати визначення:

Вітаміни – це...

3.2. Заповнити таблицю

Вітаміни	
водорозчинні	жиророзчинні

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.

2.1. Заповнити таблицю

Вітамін – попередник коферменту	Назва коферментів (повна та аббревіатура)	Тип реакції, в якій бере участь, приклад ферменту	Роль коферменту в цій реакції	Прояви гіповітамінозу
Тіамін (В1)				
.....(В2)				

2.2. Написати структурні формули ТМФ, ТДФ (ТПФ), ТТФ. Виділити структурну формулу тіаміну.

2.3. Написати структурні формули ФМН, ФАД. Виділити структурну формулу рибофлавіну.

2.4. Дати визначення

Поліневрит – це...

Бері-бері – це...

2.5. Заповнити таблицю

Вітаміни	Джерела для людини	Добова потреба	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.

3.1. Заповнити таблицю

Вітамін – попередник коферменту	Назва коферментів (повна та аббревіатура)	Тип реакції, в якій бере участь, приклад ферменту	Роль коферменту в цій реакції	Прояви гіповітамінозу

3.2. Представити будову вітамінів Н та пантотенової кислоти, їх коферментів, описати роль коферментів, джерела для людини, добову потребу. Ознаки гіповітамінозу; застосування у медицині.

3.4. Написати структурну формулу карбоксибіотину. Виділити структурну формулу біотину.

5.2. Написати структурну формулу КоА-SH. Виділити структурну формулу пантотенової кислоти.

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.

4.1. Представити структурні формули фолієвої кислоти, коферментну роль (вітаміну В₁₂, фолієвої кислоти), джерела для людини, добову потребу. Ознаки гіповітамінозу; застосування у медицині.

4.2. Описати будову кобамідних коферментів. Дати характеристику нуклеотидної частини та коринового циклу.

4.3. Заповнити таблицю

Вітамін – попередник коферменту	Назва коферментів (повна та аббревіатура)	Тип реакції, в якій бере участь, приклад ферменту	Роль коферменту в цій реакції	Прояви гіповітамінозу

4.3. Дати визначення фактор Касла – це ...

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.

- 5.1. Представити структурні формули вітамінів В₆ та РР, коферментну роль, джерела для людини, добову потребу. Ознаки гіповітамінозу; застосування у медицині.
- 5.2. Написати структурні формули ПАЛФ і ПАМФ. Виділити структурні формули піридоксальфосфату та піридоксаміну.
- 5.3. Написати структурні формули НАД⁺, НАДФ⁺. Виділити структурну формулу нікотинаміду.
- 5.4. Заповнити таблицю

Вітамін – попередник коферменту	Назва коферментів (повна та аббревіатура)	Тип реакції, в якій бере участь, приклад ферменту	Роль коферменту в цій реакції	Прояви гіповітамінозу

- 5.3. Дати визначення
Пелагра – це...

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 в хімічних реакціях ліпоєвих коферментів та аскорбінової кислоти.

- 6.1. Дати визначення
Цинга або скорбут – це...
- 6.2. Написати структурні формули окислених і відновлених форм ліпоаміду і аскорбінової кислоти.

7. Вітаміни групи D, будова, біологічна роль, механізм дії, добова потреба, джерела для людини, ознаки гіпо- та гіпервітамінозів, авітаміноз.

- 7.1. Дати визначення
Рахіт – це...
Остеопороз – це...
Остеомалія – це...
Активна форма вітаміну D₃ - - це...
- 7.2. Представити структурні формули вітамінів D₂ і D₃, активної форми вітаміну D₃.

8. Вітамін А, будова, біологічна роль, механізм дії, добова потреба, джерела для людини, ознаки гіпо-, гіпервітамінозів. Провітаміни.

- 8.1. Дати визначення
Гемералопія – це...

Кератомаліяція – це...

9. Вітаміни E, F, будова, біологічна роль, механізм дії, джерела для людини, механізм дії, добова потреба, ознаки гіпо-, гіпервітамінозів, застосування в медицині.
 - 9.1. Назвати жирні кислоти, які входять до складу вітаміну F
10. Антигеморагічні вітаміни (K₂, K₃) та їх водорозчинні форми, будова, біологічна роль, джерела для людини, механізм дії, добова потреба, ознаки недостатності, застосування в медицині.
 - 10.1. Представити структурні формули вітамінів (K₂, K₃) та їх водорозчинних форм (вікасол), біологічну роль, механізм дії, добову потребу, джерела для людини, ознаки гіповітамінозу та авітамінозу, застосування в медицині.
11. Вітаміноподібні речовини: визначення, структура та біологічна роль. Будова, властивості, участь в хімічних реакціях хінонових і карнітинових коферментів. Написати структурні формули убіхінону/убіхінолу і ацилкарнітину.
 - 11.1. Зазначити будову вітаміноподібних речовин, біологічну роль, механізм дії, джерела для людини.
 - 11.2. Дати визначення ключовим термінам:
 - 11.3. *Вітаміноподібні речовини – це...* Навести приклади.

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 4

1. У хворого із сечею виділяється підвищена кількість піровиноградної кислоти, яка є альфа-кетокислотою. Про нестачу якого вітаміну в організмі це свідчить?
2. Добова потреба дорослої людини у нікотинівій кислоті становить в середньому 20 мг, проте зменшується, якщо вміст триптофану у їжі вищий. Що можна сказати про взаємозв'язок між нікотиновою кислотою і триптофаном з огляду на це?
3. У хворого діагностований гастрит з послабленою секрецією хлоридної кислоти. Який авітаміноз може виникнути у цьому випадку? Чому? Яке захворювання розвивається внаслідок цього гіповітамінозу?
4. В результаті годування курчат очищеним рисом серед них була зареєстрована висока смертність внаслідок паралічу нижніх, а пізніше верхніх кінцівок. Що стало причиною загибелі курчат?
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.

Ситуаційні клінічні задачі до теми 4

1. Рідні привезли 59 –річного чоловіка в приймальне відділення лікарні швидкої допомоги, оскільки помітили дивні зміни в його стані та поведінці: свідомість хворого була спутана, рухи та хода різкими, без координації, погляд розфокусований. Було відомо, що пацієнт в минулому зловживав алкоголем. Він стверджував, що не мав до цього серйозних проблем зі здоров'ям, і не приймав жодних лікарських препаратів. Огляд хворого виявив ослаблення периферичного пульсу та наявність горизонтального ністагму, також підтвердив серйозні порушення координації рухів. Додаткові обстеження інших відхилень від норми не виявили. Проба крові на наявність алкоголю – позитивна. Для покращення стану лікар приймального відділення призначив хворому препарат тіаміну.

- Який діагноз слід поставити хворому?
- Для яких біохімічних процесів необхідний тіамін?

2. 38-річна жінка звернулася до сімейного лікаря з приводу постійної втоми та відчуття оніміння в кінцівках. Вона повідомила, що подібні симптоми відчуває впродовж останнього року. В процесі опитування пацієнтки вдалося встановити, що вона почала раптово втрачати вагу. При огляді лікар відзначив блідий колір шкіри та прискорене серцебиття. Її язик був яскраво червоного кольору, неврологічні тести підтвердили оніміння та виявили зниження чутливості на сенсорні стимули. Клінічний аналіз крові вказував на наявність мегалобластної анемії.

- Що стало причиною розвитку патологічного стану пацієнтки?
- Які типи реакцій порушуються при мегалобластній анемії?

Посилання на відео:

<https://www.youtube.com/watch?v=jbltegi4sOk>

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	За клінічними показами хворому призначено піридоксальфосфат. Для корекції яких процесів рекомендований цей препарат?	<p>A. *Трансамінування і декарбоксілювання амінокислот</p> <p>B. Окисного декарбоксілювання кетокислот</p> <p>C. Дезамінування пуринових нуклеотидів</p> <p>D. Синтезу пуринових і піримідинових основ</p> <p>E. Синтезу білка</p>	
2	Під час патронажу лікар виявив у	A. *Нікотинова кислота,	

	дитини симетричну шорсткість щік, діарею, порушення нервової діяльності. Нестача яких харчових факторів є причиною такого стану?	триптофан В. Метіонін, ліпоєва кислота С. Лізин, аскорбінова кислота D. Фенілаланін, пангамова кислота E. Треонін, пантотенова кислота	
3	У дитини, яку годували синтетичними сумішами, з'явилися ознаки недостатності вітаміну В ₁ . В яких реакціях приймає участь цей вітамін?	A. *Окислювальне декарбоксілювання кетокислот B. Трансамінування амінокислот C. Декарбоксілювання амінокислот D. Гідроксилювання проліну E. Окислювально-відновні реакції	
4	У сечі хворого з петехіями в слизових оболонках виявлено пролін і лізин. Відсутність якого вітаміну призводить до порушення їх гідроксилювання?	A. *С B. А C. К D. D E. E	
5	Карбоксибіотин – коферментна форма вітаміну Н. Назвіть процес в якому цей вітамін приймає участь.	A. *Біосинтез вищих жирних кислот B. Трансамінування кислот C. Декарбоксілювання амінокислот D. Гідроксилювання проліну E. ЦТК	

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Історія відкриття вітамінів. Розвиток вітамінології в Україні.
2. Екзо- і ендogenous гіпо- та авітамінози, їх причини та наслідки. Гіпервітамінози: можливі причини та наслідки.
3. Сучасні вітамінні препарати та їх профілактичне та лікувальне застосування в медичній практиці. Біологічно активні добавки (БАДи).

Рекомендована література

Основна

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров О.Я., Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров О.Я., Сольські Я., Великий М.М. та ін.. Біохімія ензимів. Ензимодіагностика. Ензимопатологія. Ензимотерапія. – Львів: Кварт, 2008. – С. 46.
7. Скляров О.Я., редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
8. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “ Medicine”, 2021. -544 p.
9. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
10. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
11. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
12. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
13. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
14. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред. Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Гайова Л. В. Теоретично-експериментальне обґрунтування використання вітаміну В6 в умовах фармакотерапії ізоніазидом // Гігієна населених місць. 2015. № 66. С. 272 – 284.
2. Профілактика туберкульозу: навч. посібник для студентів і лікарів-інтернів ВНМЗ IV рівня акредитації та лікарів / В. І. Петренко [та ін.]. — Київ: Ріджи, 2017. 88 с.
3. Bubko I. The role of thiamine in neurodegenerative diseases / Bubko I, Gruber B.M, Anuszevska E.L. // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2015. – №69. – P. 1096 – 1106.

4. Kuroishi T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin / Kuroishi T. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2015. – №93 (12). – P. 1091 – 1096.
5. Effect of supplementation of water-soluble vitamins on oxidative stress and blood pressure in prehypertensives / Talikoti P, Bobby Z, Hamide A та ін.] // *Clin. Exp. Hypertens.* – 2015. – №37(1). – P. 15 – 18.
6. Dimova R. Vitamin D in the Spectrum of Prediabetes and Cardiovascular Autonomic Dysfunction / Dimova R, Tankova T, Chakarova N. // *J. Nutr.* – 2017. – №147 (9). – P. 1607 – 1615.
7. The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis / Saeed A, Hoekstra M, Hoeke M.O та ін.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2017. – №1862 (5). – P. 496 – 512.
8. Transporters for the Intestinal Absorption of Cholesterol, Vitamin E, and Vitamin K / Yamanashi Y, Takada T, Kurauchi R та ін.] // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2017. – №24 (4). – P. 347 – 359.
9. Complexity of vitamin E metabolism / Schmölz L, Birringer M, Lorkowski S, Wallert M. // *World J. Biol. Chem.* – 2016. – №7 (1). – P. 14 – 43.
10. Rhodes J.M. Perspective: Vitamin D deficiency and COVID - 19 severity - plausibly linked by latitude, ethnicity, impacts on cytokines, ACE 2 and thrombosis/ Rhodes J.M., Subramanian S., Laird E., Griffin G., Kenny R.A.]// *J. of internal med.* – 2021. – №289. – P. 97 – 115.
11. Rawat D. Vitamin D supplementation and COVID - 19 treatment: Asystematic review and meta - analysis /Rawat D., Roy A., Maitra S., Shankar V., Khanna P., Baidya D.K.// *Diab. & Metabolic syndr.: Clinic Res. & Reviews* – 2021. – №15. – P. 1021 – 1089.

РОЗДІЛ 2. МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ БІОЕНЕРГЕТИКИ

Тема № 5. Обмін речовин та енергії. Дослідження функціонування циклу трикарбонних кислот.

Мета заняття: Засвоїти послідовність реакцій та біологічне значення циклу трикарбонних кислот, як універсального кінцевого шляху окисного катаболізму клітини. Оволодіти методами дослідження функціонування ЦТК мітохондрій та впливу малонової кислоти на перебіг його реакцій.

Актуальність теми: Вивчення особливостей функціонування циклу трикарбонних кислот є важливим для визначення його ролі у енергозабезпеченні клітини та пояснення його амфіболічної природи. Вміння аналізувати роль ЦТК необхідні для розуміння обміну речовин та енергії у клітині.

Компетентності фахові:

- уміти трактувати біохімічні закономірності перебігу обміну речовин: катаболічні, анаболічні, амфіболічні шляхи метаболізму;
- пояснювати біохімічні механізми регуляції процесів анаболізму та катаболізму;
- трактувати біохімічні закономірності функціонування циклу трикарбонних кислот, його анаплеротичні реакції та амфіболічну сутність;
- уміти пояснювати біохімічні механізми регуляції циклу трикарбонних кислот та його ключову роль в обміні речовин та енергії;

- оволодіти методами дослідження функціонування ЦТК мітохондрій та дослідити вплив малонової кислоти на перебіг його реакцій.

Базові знання:

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія.

Отримані навички: вміти писати формули трикарбонових кислот; знати загальні закономірності обміну речовин; механізм конкуретного інгібування ферментів.

Теоретичні питання

1. Поняття про обмін речовин та енергії. Характеристика катаболічних, анаболічних та амфіболічних шляхів метаболізму, їх значення.
2. Екзергонічні та ендергонічні біохімічні реакції; роль АТФ та інших макроергічних фосфатів у їх спряженні.
3. Внутрішньоклітинна локалізація метаболічних шляхів, компартменталізація метаболічних процесів в клітині. Виділення субклітинних структур методом диференційного центрифугування.
4. Етапи катаболізму біомолекул: білків, вуглеводів, ліпідів; їх характеристика.
5. Найважливіші метаболіти шляхів обміну білків, вуглеводів, ліпідів (піруват, ацетил-S-КоА); їх роль в інтеграції метаболізму клітини.
6. Цикл трикарбонових кислот (ЦТК): внутрішньоклітинна локалізація ферментів ЦТК; послідовність реакцій ЦТК; характеристика ферментів та коферментів ЦТК; реакції субстратного фосфорилування в ЦТК; вплив алостеричних модуляторів на регуляцію ЦТК; енергетичний баланс циклу трикарбонових кислот.
7. Механізми регуляції ЦТК. Навести приклади.
8. Анаплеротичні реакції ЦТК. Дати визначення і навести приклади.

Практична робота

Дослід 1. Визначення сумарного вмісту альфа-кетокислот у сечі.

Принцип методу. Альфа-кетокислоти (піруват, а-кетоглутарат, оксалоацетат) в присутності хлоридної кислоти утворюють з 2,4-динітрофенілгідразоном (ДНФГ) сполуки оранжево-червоного забарвлення.

Матеріальне забезпечення: розведена хлоридна кислота (НСІ 8,33%); 0,1% розчин ДНФГ в хлоридній кислоті; стандартний розчин пірувату натрію 80 мг%; розчин натрію гідроксиду NaOH 12 %; еталонні розчини пірувату: 4 мг%, 6 мг%, 8 мг%, 10 мг %, 12 мг %.

Хід роботи. П'ять пробірок заповнюють реактивами за таблицею:

	Пробірки					
	1	2	3	4	5	6
H ₂ O, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ДНФГ, мл	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Концентрація еталонних розчинів пірувату, мг %.	4	6	8	10	12	-
Еталонні розчини пірувату, мл	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-

Сеча, мл	-	-	-	-	-	0,1
----------	---	---	---	---	---	-----

Вміст пробірок змішують та залишають їх у темному місці на 20 хв. Потім у пробірки додають по 1 мл 12 % розчину NaOH, змішують і через 5 хв порівнюють інтенсивність забарвлення розчину із кольоровою шкалою. Обчислюють результат за формулою:

Сумарний вміст а-кетокислот у сечі, мг = C_x (мг %) * Діурез (мл)/100, де

C_x – показник за еталонем, діурез (нічний) – 300 мл

За результатами проведеного експерименту зробити висновки.

Клініко-діагностичне значення. Рівень альфа-кетокислот (пірувату, а-кетоглутарату, оксалоацетату) може бути використаний для контролю функціонального стану вуглеводного обміну (глюконеогенезу, глюкозоаланінового циклу та толерантності ЦТК до глюкози).

Норма нічної а-кетонурії – 14 – 24 мг, передпрандіальної – 3,0 – 8,1 мг; постпрандіальної – 6,0 – 11,4 мг, добової – 36 – 72 мг.

Дослід 2. Дослідження функціонування ЦТК за швидкістю утворення CO₂ і відновлених еквівалентів.

А). Виділення мітохондрій із м'язів шляхом диференційного центрифугування (демонстрація).

Принцип методу. Клітини м'язової тканини містять велику кількість спеціалізованих субклітинних органел – мітохондрій. Саме в мітохондріях відбуваються реакції циклу трикарбонних кислот (ЦТК), тканинного дихання та окисного фосфорилювання. Ферменти ЦТК локалізовані в матриксі мітохондрій, а компоненти дихального ланцюга локалізовані на внутрішній мембрані мітохондрій.

Для виділення мітохондрій м'язову тканину розтирають (гомогенізують) у механічному гомогенізаторі з тefлоновим наконечником, додаючи розчин сахарози. Виділення мітохондрій з гомогенату здійснюють на рефрижераторній центрифугі. Швидкість осадження клітинних компонентів під дією відцентрової сили залежить від їх маси, розміру, а також часу центрифугування.

Матеріальне забезпечення: свіжі м'язи кроля; розчин № 1 – середовище для виділення мітохондрій (0,25 М розчин сахарози і 0,01 М розчин етилендіамінтетраацетатної кислоти (ЕДТА – для зв'язування кальцію, рН = 7,6); розчин № 2 – середовище для отримання суспензії мітохондрій (0,25 М розчин сахарози в 0,02 М розчині трис-буфера з рН = 7,5). Всі розчини охолоджують до + 2°C.

Хід роботи. Тканину м'язів очищають від жиру, подрібнюють, зважують та гомогенізують в десятикратному об'ємі охолодженого розчину № 1 протягом 40 хв при швидкості обертання – 600 об/хв. Всі подальші процедури проводять при температурі + 1-2°C. Гомогенат звільняють від ядер та уламків клітинних мембран шляхом центрифугування впродовж 6 хв при 700 об/хв. Отриману надосадову рідину (супернатант) переносять в інші центрифужні пробірки та повторно центрифугують протягом 10 хв при 7000 об/хв.

Після видалення надосадової рідини отримують осад мітохондрій. Для очищення мітохондрій, додають вихідну кількість розчину № 1, осад ресуспендують, а потім проводять повторне осадження мітохондрій протягом 10 хв при 7000 об/хв. Осад мітохондрій ресуспендують в невеликому об'ємі розчину № 2, визначають вміст білка.

Отриману суспензію мітохондрій використовують для проведення дослідів 2 – 4, а також для дослідження процесів тканинного дихання та окисного фосфорилування.

В). Дослідження функціонування ЦТК мітохондрій за швидкістю утворення CO_2 та вплив маленової кислоти на цей процес.

Принцип методу. Перетворення ацетил-S-CoA в присутності мітохондрій, що містять ферменти ЦТК, супроводжується виділенням CO_2 . Як джерело ацетил-S-CoA, що вступає в ЦТК, використовують пірвіноградну кислоту (ПВК). ПВК під дією мультиферментного пірватдегідрогеназного комплексу мітохондрій піддається окисному декарбосилуванню з утворенням ацетил-S-CoA.

Якщо блокувати ЦТК малонатом (маленовою кислотою), то CO_2 не утворюється і бульбашки газу не виділяються. Малонат є класичним конкурентним інгібітором сукцинатдегідрогенази – ферменту ЦТК, оскільки зв'язується з її активним центром та перешкоджає зв'язуванню субстрату – сукцинату (бурштинової кислоти).

Для зв'язування CO_2 , що утворюється, в інкубаційне середовище додають $Ca(OH)_2$. Після закінчення інкубації, зв'язаний CO_2 визначають за виділенням бульбашок газу, що утворюються після додавання до інкубаційного середовища сульфатної кислоти.

Матеріальне забезпечення: фосфатний буфер рН 7,4, розчин пірвату натрію, маленова кислота, фізіологічний розчин, розчин $Ca(OH)_2$, суспензія мітохондрій, 0,1 М розчин H_2SO_4 , термостат, штатив із пробірками, піпетки

Хід роботи. Три пробірки – контрольну, дослідну № 1 та дослідну № 2 заповнюють реактивами згідно таблиці:

Вміст пробірок	Пробірки		
	Контроль	Дослід №1	Дослід №2
Фосфатний буфер, рН = 7,4, мл	2,0	2,0	2,0
Розчин пірвату натрію, мл	0,5	0,5	0,5
Маленова кислота, мл	–	–	0,5
Фізіологічний розчин, мл	0,5	0,5	–
Розчин $Ca(OH)_2$, мл	0,5	0,5	0,5
Суспензія мітохондрій, мл	–	0,5	0,5
Суспензія мітохондрій після кип'ятіння, мл	0,5	–	–
Інкубація в термостаті: 15 хв при температурі 37°C			
0,1 М розчин H_2SO_4 , мл	1,0	1,0	1,0

Результати: виділення бульбашок CO ₂			
---	--	--	--

Всі пробірки поміщають в термостат на 15 хв при 37°C. Після інкубації в кожену пробірку додають по 1,0 мл 0,1 М розчину H₂SO₄ і спостерігають за вивільненням бульбашок CO₂.

За результатами проведеного експерименту зробити висновки.

С. Дослідження функціонування ЦТК мітохондрій за швидкістю утворення атомів водню та вплив малонової кислоти на цей процес.

Принцип методу. При окисненні ацетил-S-CoA в ЦТК вивільняється водень, який відновлює метиленову синьку та перетворює її в безбарвну лейкосполуку. Час, протягом якого відбувається знебарвлення розчину, є показником інтенсивності протікання ЦТК в мітохондріях.

При блокуванні ЦТК малонатом (малоною кислотою), вивільнення водню не відбувається і метиленова синька не знебарвлюється.

Матеріальне забезпечення: фосфатний буфер рН 7,4, розчин пірувату натрію, малонова кислота, фізіологічний розчин, розчин метиленової синьки, суспензія мітохондрій, термостат, штатив із пробірками, піпетки

Хід роботи. Три пробірки – контрольну, дослідну № 1 та дослідну № 2 заповнюють реактивами згідно таблиці:

Вміст пробірок	Пробірки		
	Контроль	Дослід №1	Дослід №2
Фосфатний буфер, рН = 7,4, мл	2,0	2,0	2,0
Розчин пірувату натрію, мл	0,5	0,5	0,5
Малонова кислота, мл	–	–	0,5
Фізіологічний розчин, мл	0,5	0,5	–
Суспензія мітохондрій, мл	–	0,5	0,5
Суспензія мітохондрій після кип'ятіння, мл	0,5	–	–
Розчин метиленової синьки, мл	0,5	0,5	0,5
Інкубація в термостаті при температурі 37°C			
Результати: інтенсивність знебарвлення метиленової синьки (колір розчину)			

Зробити висновки.

Клініко-діагностичне значення. Багато речовин, у тому числі і лікарські засоби, можуть змінювати енергетику клітин, інтенсивність окислювального фосфорилування – утворення АТФ. Їх можна поділити на активатори та інгібітори енергетичного обміну. До активаторів належать кислоти циклу Кребса (лимонна, яблучна, бурштинова) та низка інших сполук (глюкоза, амінокислоти тощо), тому вони знайшли застосування у медичній практиці. Лимонну кислоту у вигляді солей (цитрат натрію)

використовують як засіб, що запобігає згортанню крові та може входити до складу деяких ліків.

Конкурентними інгібіторами сукцинатдегідрогенази є дикарбонові кислоти, наприклад малонат.

Контрольні питання до практичної роботи теми 5

1. Як можна довести функціонування ЦТК? Принцип визначення активності ферментів ЦТК. Довести функціонування ЦТК за використанням ацетил-S-CoA, за утворенням CO₂, за вивільненням з проміжних продуктів атомів водню.
2. Назвіть регуляторні ферменти ЦТК. Який тип регуляції ферментативних процесів характерний для ЦТК?
3. До яких класів та підкласів належать ферменти ЦТК?
4. Як визначити активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій. До якого класу та підкласу ферментів належить цей фермент? Пояснити принцип методу.
5. Що таке субстратне фосфоритування? Яка з реакцій ЦТК належить до реакцій субстратного фосфорилування?

Інструктивно-методичні матеріали до теми №5

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Поняття про обмін речовин та енергії. Характеристика катаболічних, анаболічних та амфіболічних шляхів метаболізму, їх значення.

1.1. Дати визначення ключовим словам:

Обмін речовин (метаболізм) - це...

Катаболізм – це...Наприклад...

Анаболізм – це ...Наприклад...

Метаболічні шляхи - це...Наприклад...

1.2. У таблиці подати порівняльну характеристику реакцій катаболізму та анаболізму:

Катаболізм	Анаболізм
1. Розпад складних органічних молекул на простіші кінцеві продукти. Важливі ключові реакції - окиснення метаболітів. Використовуються окиснені коферменти, виникають – відновлені.	1. Синтез складних органічних молекул із простих. Важливі ключові реакції – відновлення. Використовуються відновлені форми коферментів, утворюються окиснені.
2. Виділяється вільна енергія...	2. Витрачається енергія...
3. ...	3. ...
4. ...	4. ...

1.3. Дати визначення

Амфіболічні реакції – це... Наприклад...

Пояснити особливості перебігу амфіболічних реакцій на прикладі ЦТК.

2. Екзергонічні та ендергонічні біохімічні реакції; роль АТФ та інших макроергічних фосфатів у їх спряженні.

2.1. Вказати на зв'язок обміну речовин з обміном енергії.

2.2. Дати визначення ключовим словам:

Екзергонічні біохімічні реакції – це...Наприклад...

Ендергонічні біохімічні реакції– це ...Наприклад...

Макроергічні сполуки – це... Наприклад...

Спряження екзергонічних та ендергонічних процесів здійснюється ...

2.3. Написати структурні формули сполук з такими макроергічними зв'язками:

1) Фосфоангідридними - АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ;

2) Фосфогуанідиновим - креатинфосфат;

3) Енолфосфатним – фосфоенолпіруват;

4) Тіоефірним – ацетил-КоА, сукциніл-КоА.

Виділити макроергічні зв'язки значком тільде.

3. Внутрішньоклітинна локалізація метаболічних шляхів, компартменталізація метаболічних процесів в клітині. Виділення субклітинних структур методом диференційного центрифугування.

3.1. Дати визначення

Метод диференційного центрифугування – це...

Фактор седиментації – це...

Супернатант – це...

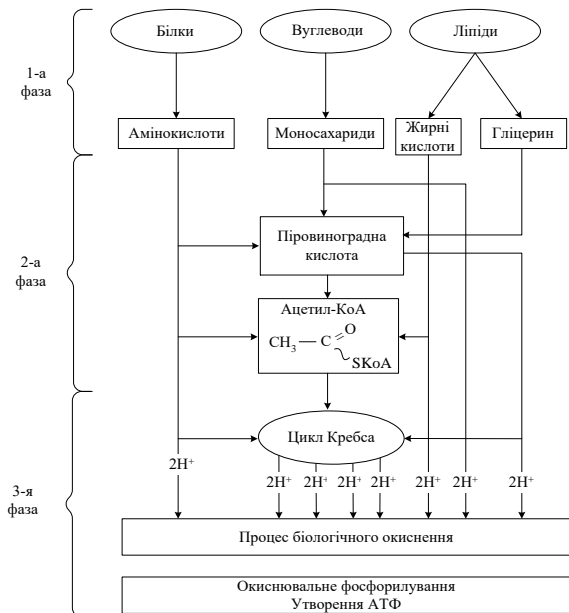
3.2. Пояснити принцип виділення основних субклітинних структур методом диференційного центрифугування.

3.3. Заповнити таблицю

Фактор седиментації	Фракція	Склад фракції	Маркерні ферменти
600 g			
10 000 g			
12-16 000 g			
100 000 g			
Останній супернатант			

4. Етапи катаболізму біомолекул: білків, вуглеводів, ліпідів; їх характеристика.

4.1. Представити схему загальних шляхів катаболізму біомолекул.

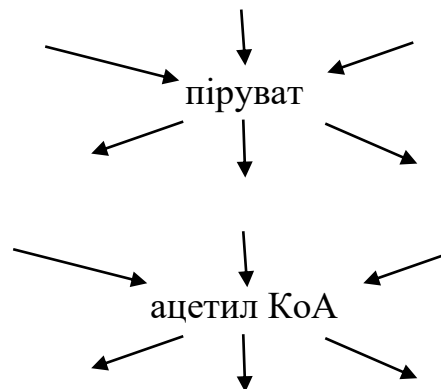


4.2. Дати характеристику основних трьох стадій катаболізму, вказавши

- 1) субклітинну локалізацію стадій,
- 2) субстрати, кінцеві продукти стадій,
- 3) енергетичний ефект.

5. Найважливіші метаболіти шляхів обміну білків, вуглеводів, ліпідів (піруват, ацетил-S-КоА); їх роль в інтеграції метаболізму клітини.

5.1. Пояснити ключову роль пірувату і ацетил-КоА у катаболізмі біомолекул, представивши шляхи їх утворення та використання.



6. Цикл трикарбонових кислот (ЦТК): внутрішньоклітинна локалізація ферментів ЦТК; послідовність реакцій ЦТК; характеристика ферментів та коферментів ЦТК; реакції субстратного фосфорилювання в ЦТК; вплив алостеричних модуляторів на регуляцію ЦТК; енергетичний баланс циклу трикарбонових кислот.

6.1. Дати визначення ЦТК; вказати на локалізацію цього процесу

6.2. Написати послідовність реакцій ЦТК із зазначенням назв метаболітів і ферментів (коферментів), модуляторів;

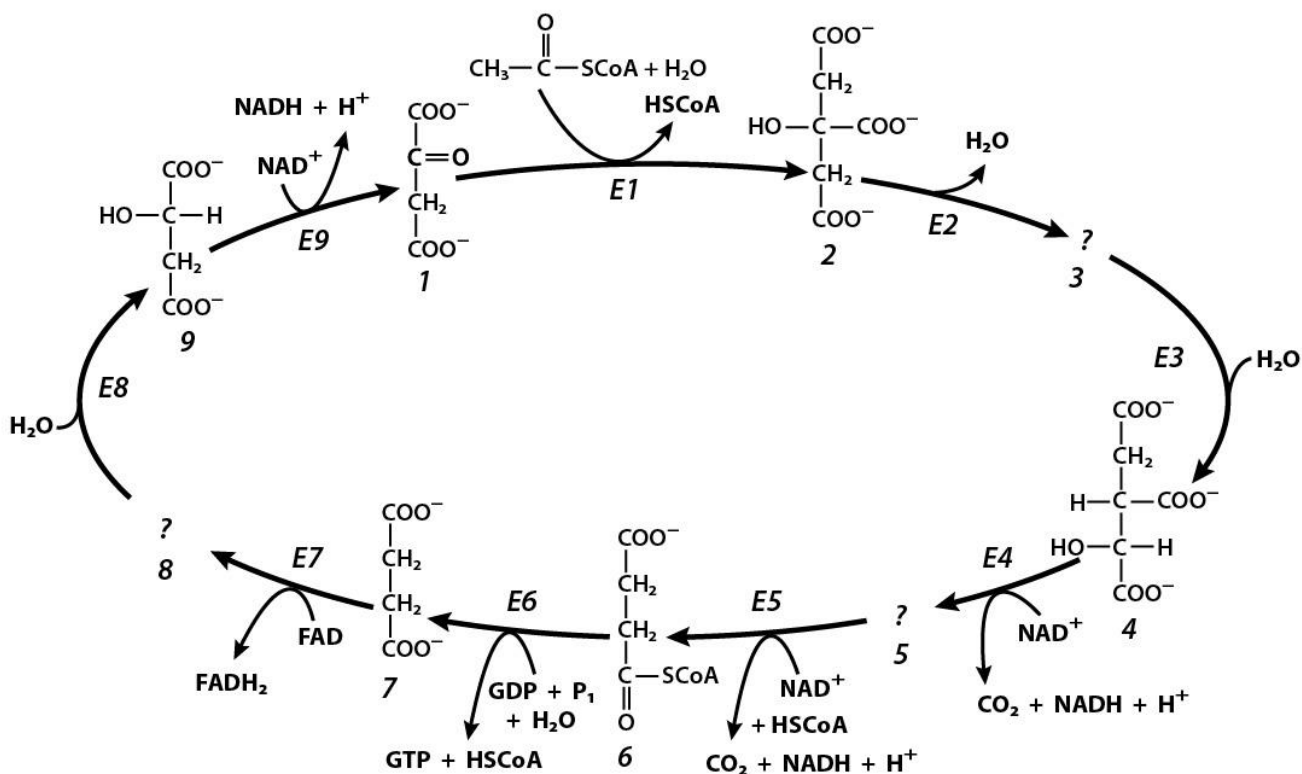
6.3. На схемі "ЦТК"

1. вписати структурні формули пропущених метаболітів,
2. підписати назви метаболітів,
3. підписати назви ензимів,
4. вказати регуляторні ензими,
5. підписати речовини, які є активаторами та інгібіторами ензимів ЦТК,
6. вказати реакцію субстратного фосфорилювання,
7. порахувати енергетичний ефект окиснення однієї молекули ацетил-КоА в ЦТК.

Схема ЦТК

7. Механізми регуляції ЦТК. Навести приклади.
 - 7.1. Вказати активатори та інгібітори регуляторних ферментів ЦТК, зазначити їх використання в медичній практиці
 - 7.2. Заповнити таблицю

Регуляторний ЦТК	ензим	Кофермент	Ефектори	
			Активатори	Інгібітори



1.			
2.			
3.			

8. Анаплеротичні реакції ЦТК. Дати визначення і навести приклади.

8.1. Дати визначення

Анаплеротичні реакції – це... Наприклад...

8.2. Написати основні анаплеротичні реакції ЦТК.

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 5

1. Пацієнт поступив у стаціонар з діагнозом цукровий діабет I типу. Серед метаболічних змін має місце зниження швидкості синтезу оксалоацетату. Який метаболічний процес порушується в результаті цього? Які енергетичні втрати будуть спостерігатися при порушенні цього метаболічного процесу. Вказати, які метаболічні шляхи можуть активуватись для компенсації втрати енергії.
2. В інкубаційне середовище, де були сукцинатдегідрогеназа і бурштинова кислота, додали малонову кислоту. Як зміниться активність ферменту? Яким чином можна позбавитись негативного впливу малонової кислоти? Намалуйте графік залежності активності сукцинатдегідрогенази від концентрації субстрату без малонової кислоти та в її присутності. Які кислоти можуть бути конкурентними інгібіторами сукцинатдегідрогенази?
3. Порахуйте енергетичний ефект в молекулах АТФ при окисненні в ЦТК:
 - Альфа-кетоглутарату до оксоацетату
 - Ізоцитрату до сукцинату
 - Ізоцитрату до малату
4. Під час голодування у пацієнта різко знизився рівень пірувату. Порушення якої анаплеротичної реакції ЦТК буде спостерігатися? Які зміни у функціонуванні ЦТК будуть спостерігатися?
5. Назвіть головні анаплеротичні реакції ЦТК і відповідні ним амфіболічні?

Ситуаційна клінічна задача до теми 5

1. 18-и місячна дитина, залишена без нагляду на кухні, проковтнула маленьку порцію отрути для щурів, знайденої під корпусом буфету. Інградієнтом цієї отрути є фторацетат, який реагує з оксалоацетатом.

- Який шлях в організмі інгібує ця отрута?
- Який механізм інгібіторної дії фторацетату?

Посилання на відео:

1. https://www.youtube.com/watch?v=8DQJg_7UNYw&feature=related
2. <https://www.youtube.com/watch?v=ncEHa-ZwX3M&feature=related>

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№	Умова тестового завдання	Правильна відповідь	Пояснення
---	--------------------------	---------------------	-----------

з/п		та дистрактори	
1	Для нормального метаболізму клітинам необхідні макроергічні сполуки. Що належить до макроергів?	А. *Креатинфосфат В. Креатин С. Креатинин D. Глюкозо-6-фосфат E. Аденозінмонофосфат	
2	Яка речовина є основним джерелом енергії (паливом) для функціонування циклу трикарбонових кислот?	А. *Ацетил-КоА В. Глюкоза С. Амінокислоти D. Жирні кислоти E. Сукциніл-КоА	
3	Яка кислота, проміжний продукт циклу трикарбонових кислот, приймає участь у зв'язуванні іонів кальцію?	А, *Лимонна В. Ацетатна С. Яблучна D. Янтарна E. α -Кетоглутарова	
4	При окисненні вуглеводів, ліпідів виділяється велика кількість енергії, основна частина якої утворюється завдяки окисненню ацетил-КоА. Скільки молекул АТФ генерується при повному окисненні однієї молекули ацетил-КоА?	А.*12 В. 36 С. 24 D. 8 E. 38	
5	Перетворення сукцинату в фумарат каталізується сукцинатдегідрогеназою. Який конкурентний інгібітор гальмує активність ферменту?	А.* Малонова кислот В. Щавлевоцтова кислота С. Яблучна кислота D. Фумарова кислота E. Піровиноградна кислота	

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Роль найважливіших метаболітів амфіболічних шляхів (глюкозо-6-фосфату, пірувату, α -кетоглутарату, ацетил-S-КоА, сукциніл-S-КоА та ін.) в інтеграції метаболізму.
2. Інтермедіати ЦТК та їх роль в регуляції ключових ферментів .

Рекомендована література

Основна

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-те вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.

4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ПІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірна, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред. Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Состояние биоэнергетического обмена в организме белых крыс в условиях длительного воздействия субтоксических доз лапроксидов / Кучерявченко М. А., Зайцева О. В., Жуков В. И., Книгавко В. Г. // Проблемы экологии та медицини. 2014. Т.18, № 1 – 2. С.44 – 46.
2. Comim C. M., Hoepers A., Ventura L. Activity of Krebs cycle enzymes in mdx mice // Muscle Nerve. 2016. Vol.53, №1. – P. 91 – 95.
3. Meitinger T. Mutations in MDH2, Encoding a Krebs Cycle Enzyme, Cause Early-Onset Severe Encephalopathy // Am. J. Hum. Genet. 2017. V.5, №100(1). P. 151 – 159.
4. Ryan D.G., O'Neill L.AJ. Krebs Cycle Reborn in Macrophage Immunometabolism //Annu. Rev. Immunol. – 2020. – №26(38). – P.289 – 313.

Тема № 6. Дослідження процесів біологічного окиснення, окисного фосфорилювання та синтезу АТФ. Дослідження дії інгібіторів та роз'єднувачів окисного фосфорилювання та синтезу АТФ.

Мета заняття: Засвоїти основні принципи організації дихального ланцюга мітохондрій. Знати роль окисно-відновних ферментів у тканинному диханні. Засвоїти основні принципи хеміосмотичної теорії Мітчела. Оволодіти методом визначення активності каталази в крові, навчитись використовувати цей показник з діагностичною метою.

Актуальність теми: Окисно-відновні ферменти забезпечують перебіг реакцій, пов'язаних з перенесенням електронів та протонів і лежать в основі утворення макроергічних сполук. Дослідження їх функціонування важливе для глибокого розуміння механізмів тканинного дихання і його ролі при різних функціональних станах організму. Хеміосмотична теорія окисного фосфорилювання пояснює молекулярні механізми генерації АТФ в ході біологічного окиснення. При деяких патологічних процесах, які супроводжуються гіпоксією, може відбуватися неповне відновлення молекули кисню в дихальному ланцюзі та накопичення гідрогену пероксиду, розщеплення якого каталізує фермент каталаза. Тому визначення її активності є важливим критерієм для оцінки антиоксидантного стану організму.

Компетентності фахові:

- ілюструвати структурно-функціональні особливості ланцюга транспорту електронів у вигляді схеми;
- аналізувати роль біологічного окиснення, тканинного дихання та окисного фосфорилювання в генерації АТФ за аеробних умов;
- порівнювати дію інгібіторів і роз'єднувачів окисного фосфорилювання природного та синтетичного походження, їх фізіологічне значення;
- експериментально досліджувати активність окисно-відновних ферментів за умов норми та при патологічних процесах;
- аргументувати роль та механізми спряження біологічного окиснення та окисного фосфорилювання для синтезу АТФ;
- встановити значення основних засад хеміосмотичної теорії окисного фосфорилювання для розуміння механізмів утворення АТФ;
- оцінювати показник активності каталази крові в клініко-діагностичних цілях з метою передбачення його значення в системі пероксидне окислення ліпідів - антиоксидантна активність;
- аргументувати необхідність проведення оцінки стану організму з урахуванням активності каталази крові.

Базові знання:

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія, біофізика.

Отримані навички: знати механізм окиснювально-відновних реакцій, вміти писати структурні формули основних класів коферментів; знати стандартні окиснювально-відновлювальні потенціали, вміти писати схеми утворення вільних радикалів.

Теоретичні питання

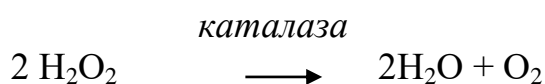
1. Біологічне окиснення субстратів в клітинах. Реакції біологічного окиснення та їх функціональне значення. Характеристика дегідрогеназ, оксидаз, оксигеназ (моно- та діоксигеназ).

2. Піридинзалежні дегідрогенази. Будова НАД⁺ і НАДФ⁺. Їх значення у реакціях окиснення та відновлення. Флавінзалежні дегідрогенази. Будова ФАД і ФМН. Їх роль у реакціях окиснення та відновлення.
3. Убіхінон, будова та його роль у реакціях окиснення та відновлення.
4. Цитохроми та їх роль у тканинному диханні. Будова їх простетичної групи.
5. Молекулярна організація ланцюга транспорту електронів (дихального ланцюга) мітохондрій. Принцип розташування компонентів дихального ланцюга згідно показників редокс-потенціалу. Послідовність переносників електронів у повному і вкороченому дихальному ланцюгу.
6. Надмолекулярні комплекси дихального ланцюга внутрішніх мембран мітохондрій. Регуляція тканинного дихання (дихальний контроль): залежність тканинного дихання від концентрації АДФ; значення співвідношення АТФ/АДФ у тканинах.
7. Окисне фосфорилювання – молекулярний механізм генерації АТФ в процесі біологічного окиснення. Основні положення хеміосмотичної теорії Мітчела. Схема хеміосмотичного механізму спряження транспорту електронів у дихальному ланцюгу з синтезом АТФ. Молекулярна будова та принцип дії АТФ-синтази.
8. Пункти спряження транспорту електронів та фосфорилювання. Коефіцієнт окисного фосфорилювання.
9. Інгібітори транспорту електронів в дихальному ланцюгу мітохондрій, їх вплив на синтез АТФ.
10. Роз'єднувачі транспорту електронів та окисного фосфорилювання в дихальному ланцюгу мітохондрій, їх вплив на синтез АТФ. Вільне, нефосфорилуюче окиснення.
11. Активні форми кисню (пероксид гідрогену, супероксидний аніон-радикал, гідроксильний радикал, синглетний кисень); механізм їх утворення та інактивації.

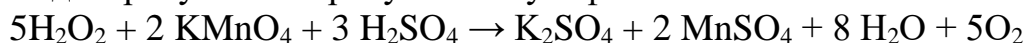
Практична робота

Дослід 1. Кількісне визначення активності каталази в крові.

Принцип методу. Каталаза – фермент класу оксидоредуктаз, що каталізує розщеплення гідрогену пероксиду на воду і кисень:

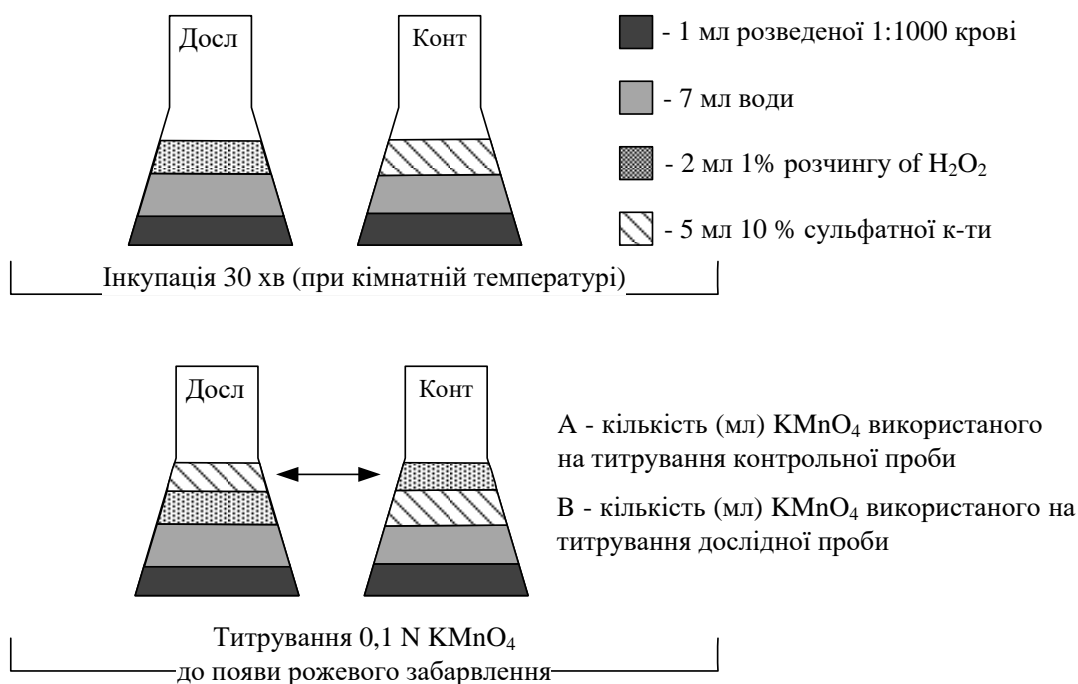


Метод кількісного визначення активності каталази базується на визначенні кількості гідрогену пероксиду, перетвореного ферментом за певний проміжок часу. Гідроген пероксиду розкладається каталазою, а його надлишок відтитровують за присутності сульфатної кислоти:



Матеріальне забезпечення: розведена кров (1:1000), дистильована вода, 1%-ний розчин H_2O_2 , 10 % розчин сульфатної кислоти, 0,1 н розчин $KMnO_4$, колбочки, піпетки, бюретка.

Хід роботи. Розведену кров (1:1000) наливають по 1 мл у дві колбочки, додають по 7 мл дистильованої воли, в дослідну пробу додають 2 мл 1 % H_2O_2 , а в контрольну – 5 мл 10 % розчину сульфатної кислоти. Дія каталази в кислому середовищі припиняється (у контрольній пробі), оскільки її рН оптимум – 7,4. Колбочки залишають на 30 хв. при кімнатній температурі. Потім до дослідної проби додають 5 мл 10 % розчину H_2SO_4 , а до контрольної – 2 мл 1 % р-ну H_2O_2 . Вміст колбочок титрують 0,1н р-ном $KMnO_4$ до появи стійкого рожевого забарвлення.



Каталазне число (Кч) розраховують за формулою:

$$Кч = (A - B) \times 1,7$$

А – кількість мл 0,1 н р-ну $KMnO_4$, яка пішла на титрування контрольної проби;

В – кількість в мл 0,1 н р-ну $KMnO_4$, яка пішла на титрування дослідної проби.

У нормі каталазне число становить 10-15 одиниць.

Каталазне число – це кількість гідрогену пероксиду (мг), що розкладається в 1 мкл досліджуваної крові.

Пояснити отриманий результат. Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. У нормі інтенсивність процесів ПОЛ регулюється системою антиоксидантного захисту. Найважливішими компонентами антирадикального і антипероксидного захисту є ензими, які каталізують реакції між активованими формами кисню, здійснюють розпад гідропероксидів. Серед цих ензимів важливе місце займає каталаза,

біологічна роль якої полягає у захисті організму від шкідливого впливу гідрогену пероксиду, що утворюється при внутрішньоклітинному окисненні різних сполук.

Антиоксидантні реакції у механізмі захисних процесів організму є провідними і найбільш потужними, оскільки вони не тільки запобігають розвитку вільнорадикальних реакцій, але й забезпечують ефективність елімінації кінцевих метаболітів пероксидного окиснення із залученням їх до енергетичного обміну, тим самим підтримуючи високу активність синтетичних процесів, у тому числі ензимів супероксиддисмутази (СОД), каталази та глутатіонпероксидази (ГПО), які відповідно формують другий і третій ступені захисту. Крім запобігання нагромадженню пероксидів, такий антиоксидантний захист стабільно підтримує високу активність окисно-відновних процесів внаслідок утворення кисню при перетворенні супероксиду в пероксид за участю СОД і гідролізу його каталазою та глутатіонпероксидазою.

В нормі активність каталази в крові людини 25,5-52,2 мкат/л, а каталазне число становить в крові 10-15 одиниць. Однак визначення каталазного числа без одночасного визначення кількості еритроцитів є недоцільним, оскільки кількість фермента є залежною від кількості еритроцитів. Тому в клініці використовують не каталазні числа, а показник каталази, в якому чисельником є каталазне число, а знаменником – кількість еритроцитів в 1 мл крові. Цей показник становить у нормі $2-3 \times 10^{-6}$.

Підвищення активності каталази спостерігається при хронічній серцевій недостатності, перціозній анемії та інших макроцитарних анеміях, при введенні в організм кофеїну, алкоголю, ацетонових тіл. Зниження активності цього ензиму спостерігається при злоякісних пухлинах, інфекційних захворюваннях, таких як черевний тиф, скарлатина, малярія, туберкульоз легень.

Дослід 2. Вивчення окисного фосфорилювання в мітохондріях та дії роз'єднувача – 2,4-динітрофенолу на цей процес.

Принцип методу. Визначення неорганічного фосфату ґрунтується на здатності амонію молібдату в кислому середовищі приєднувати залишок фосфорної кислоти з утворенням амонію фосфату. Амонію фосфат під дією відновника – аскорбінової кислоти утворює продукти, забарвлені в синій колір. В процесі окисного фосфорилювання Φ_n вилучається з інкубаційного середовища, а тому інтенсивність синього забарвлення розчину зменшується.

Матеріальне забезпечення: щойно виділені мітохондрії з м'язів кроля; суміш № 1 – 0,08 моль KH_2PO_4 , 0,255 моль KCl , 0,05 моль MgCl_2 розчиняють в дистильованій воді, додають 0,1 М розчин KOH до $\text{pH} = 7,4$ та доводять об'єм в мірній колбі до 1 л; суміш № 2 – водний розчин глюкози з АТФ, що містить 90 мг глюкози та 30 мг АТФ в 1 мл; гексокіназа в 1 %-му розчині глюкози (0,8 мг гексокінази в 1 мл); 5 %-й розчин сукцинату калію; 5 %-й розчин оцтової кислоти; 10 %-й розчин трихлорацетатної кислоти (ТХАК); 1 %-й розчин динітрофенолу; 2,5 %-й розчин молібдата амонію в 10 М розчині H_2SO_4 (2,5 г

молібдата амонію розчиняють в 50 мл 20 М розчину H_2SO_4 і доводять об'єм водою до 100 мл); 5 %-й розчин аскорбінової кислоти.

Хід роботи. Три пробірки – контрольну, дослідну № 1 та дослідну № 2 заповнюють реактивами за таблицею:

Вміст пробірок	Пробірки		
	Контроль	Дослід №1	Дослід №2
Суміш № 1, мл	1,0	1,0	1,0
Суміш № 2, мл	0,5	0,5	0,5
Гексокіназа, мл	0,5	0,5	0,5
Сукцинат калію, мл	0,5	0,5	0,5
2,4-динітрофенол, краплі	---	---	2
Суспензія мітохондрій, мл	---	0,5	0,5
Суспензія мітохондрій після кип'ятіння, мл	0,5	---	---
Розчин ацетатної кислоти, краплі	2	---	---
Інкубація в термостаті 15 хв при температурі 37°C			
Розчин ТХАК, мл	1,0	1,0	1,0
Молібдат амонію, мл	0,5	0,5	0,5
Аскорбінова кислота, мл	0,5	0,5	0,5
Результати: спостерігають за появою синього забарвлення			

Ацетатна кислота додається для повноти денатурації білка в контрольній пробірці. Після інкубації в термостаті протягом 15 хв при 37°C в кожену пробірку додають по 1 мл 10 %-го розчину ТХАК; по 0,5 мл 2,5 %-го розчину молібдату амонію та по 0,5 мл 5 %-го розчину аскорбінової кислоти. Впродовж 20 хвилин спостерігають за появою синього забарвлення.

Зробити висновки.

Клініко-діагностичне значення. Визначення коефіцієнту окисного фосфорилювання використовується з метою характеристики ефективності процесів енергопродукції в тканинах в нормі та при патології. Порушення синтезу АТФ спостерігають за умов дії на організм людини і тварин багатьох патогенних факторів хімічного (зокрема, природні та синтетичні токсини, лікарські засоби, тощо), біологічного (гормони, антибіотики, проміжні продукти метаболізму) та фізичного (іонізуюча радіація) походження. Всі вони спричиняють роз'єднання дихання та окисного фосфорилювання за рахунок порушення здатності створювати та підтримувати електрохімічний протонний потенціал на внутрішній мембрані мітохондрій.

Контрольні питання до практичної роботи теми 6

1. У новонароджених, на відміну від дорослих, міститься деяка кількість бурого жиру. Поясніть таку особливість будови організмів різного віку, якщо відомо, що бурий жир містить велику кількість мітохондрій, а вихід АТФ у ньому в перерахунку на атом поглинутого кисню становить менше одиниці.
2. Дослідити процес окисного фосфорилювання в мітохондріях, пояснити, на чому він базується. Які фармакологічні та фізіологічні сполуки є роз'єднувачами дихання і фосфорилювання? Пояснити біохімічний механізм їх дії.
3. Спряження тканинного дихання з окисним фосфорилюванням відбувається за наявності електрохімічного градієнту іонів H^+ між матриксом та міжмембранним простором. Якими властивостями мають володіти речовини, що роз'єднують процеси дихання та фосфорилювання?

Інструктивно-методичні матеріали до теми №6

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Біологічне окиснення субстратів в клітинах. Реакції біологічного окиснення та їх функціональне значення. Характеристика дегідрогеназ, оксидаз, оксигеназ (моно- та діоксигенази).

1.1. Дати визначення ключовим словам:

Біологічне окиснення - це...

Окиснення – це..

Відновлення - це...

Відновлювальний еквівалент – це ...

1.2.Зазначити принципові особливості біологічного окиснення та його функції

1.3. Представити реакції біологічного окиснення із зазначенням назв реакцій і ферментів

Види окисно-відновних ферментів	Особливість механізму дії	Хімізм реакції	Приклад
Дегідрогенази			
Оксидази			
Оксигенази: - монооксигенази - диоксигенази			

2. Піридинзалежні дегідрогенази. Будова НАД⁺ і НАДФ⁺. Їх значення у реакціях окиснення та відновлення. Флавінзалежні дегідрогенази. Будова ФАД і ФМН. Їх роль у реакціях окиснення та відновлення.

2.1. написати структурні формули НАД⁺ і НАДФ⁺, вказати окиснену і відновлену форми активних структур та пояснити механізм перенесення відновлювальних еквівалентів

2.2. Написати структурні формули ФАД і ФМН, вказати окиснену і відновлену форми активних структур та пояснити механізм перенесення

відновлювальних еквівалентів

2.3. Вказати на зв'язок між білковою (апоферментом) та небілковою частиною у складі дегідрогеназ та навести приклади метаболічних процесів, в яких вони беруть участь

3. Убіхінон, будова та його роль у реакціях окиснення та відновлення.

3.1. Написати структурну формулу убіхінону (коензиму Q), вказати окиснену і відновлену форми активної структури та пояснити механізм перенесення відновлювальних еквівалентів

3.2. Вказати на зв'язок між білковою (апоферментом) та небілковою частиною у складі убіхінону та навести приклади метаболічних процесів, в яких бере участь цей хінон

4. Цитохроми та їх роль у тканинному диханні. Будова їх простетичної групи.

4.1. Написати структурну формулу простетичної групи цитохромів, вказати окиснену і відновлену форми активної структури та пояснити механізм перенесення електронів

4.2. Вказати на зв'язок між білковою (апоферментом) та небілковою частиною у складі цитохромів, вказати класи (групи) цитохромів та охарактеризувати їх особливості

5. Молекулярна організація ланцюга транспорту електронів (дихального ланцюга) мітохондрій. Принцип розташування компонентів дихального ланцюга згідно показників редокс-потенціалу. Послідовність переносників електронів у повному і вкороченому дихальному ланцюгу.

5.1. Дати визначення

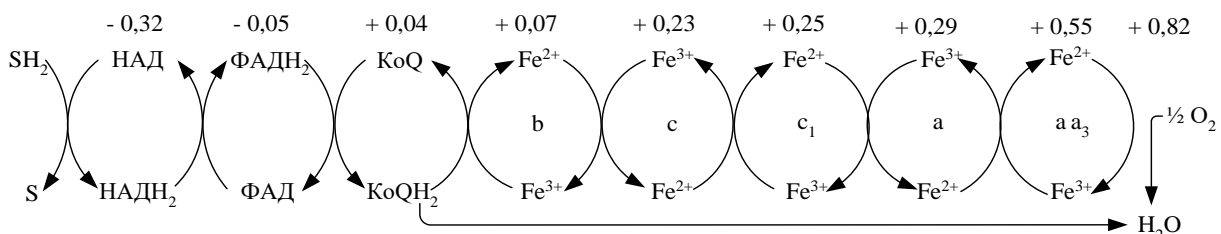
Дихальний ланцюг - це...

5.2. Навести схему організації повного та вкороченого дихального ланцюга мітохондрій; вказати їх основні відмінності.

5.3. Заповнити таблицю

Особливості складу дихального ланцюга	Послідовність компонентів	Субстрати
Повний		
Вкорочений		

5.3. Написати рівняння Нернста та вказати на роль редокс-потенціалів у транспорті електронів і протонів.



6. Надмолекулярні комплекси дихального ланцюга внутрішніх мембран мітохондрій. Регуляція тканинного дихання (дихальний контроль): залежність тканинного дихання від концентрації АДФ; значення співвідношення АТФ/АДФ у тканинах.

6.1. Описати будову чотирьох комплексів дихального ланцюга внутрішніх мембран мітохондрій та вказати їх функції. Позначити комплекси (I- IV) на схемі дихального ланцюга.

6.2. Заповнити таблицю.

Нумерація комплексів дихального ланцюга	Назви комплексів дихального ланцюга	Хімічний склад комплексів	Перенесення електронів від якого компонента	Перенесення електронів до якого компонента
I			НАДН	КоQ
II				
III			КоQH ₂	
IV				O ₂

6.3. Дати визначення

Дихальний контроль – це ...

АТФ/АДФ – це ...

7. Окисне фосфорилування – молекулярний механізм генерації АТФ в процесі біологічного окиснення. Основні положення хеміосмотичної теорії Мітчела. Схема хеміосмотичного механізму спряження транспорту електронів у дихальному ланцюгу з синтезом АТФ. Молекулярна будова та принцип дії АТФ-синтази.

7.1. Дати визначення ключовим словам:

Субстратне фосфорилування - це...Наприклад...

Окисне фосфорилування – це...

Спряження дихання та окисного фосфорилування – це...

7.2. Назвати основні положення хеміосмотичної теорії окисного фосфорилування.

7.3. Зазначити важливість двох складових електрохімічного протонного градієнта (представити у вигляді схеми).

7.4. Описати будову та принцип дії АТФ-синтази.

8. Пункти спряження транспорту електронів та фосфорилування. Коефіцієнт окисного фосфорилування.

8.1. Представити схему локалізації трьох пунктів спряження транспорту електронів та фосфорилування.

8.2. Представити схему хеміосмотичного механізму спряження транспорту електронів у дихальному ланцюгу з синтезом АТФ.

8.3. Дати визначення коефіцієнта окисного фосфорилування та вказати його значення при окисненні субстратів повного і вкороченого дихальних ланцюгів у мітохондріях.

9. Інгібітори транспорту електронів в дихальному ланцюгу мітохондрій, їх вплив на синтез АТФ.

9.1. Представити схему дихального ланцюга мітохондрій зі зазначенням пунктів дії інгібіторів транспорту електронів (вказати основні сполуки) та інгібіторів окисного фосфорилування (вказати основні сполуки).

Комплекси дихального ланцюга, АТФ-аза	Інгібітори
I	
II	
III	
IV	
АТФ-аза	

10. Роз'єднувачі транспорту електронів та окисного фосфорилювання в дихальному ланцюгу мітохондрій, їх вплив на синтез АТФ. Вільне, нефосфорилююче окиснення.

10.1. Дати визначення

Роз'єднувачі окисного фосфорилювання – це...

Навести приклади.

10.2. Представити схему дихального ланцюга мітохондрій зі зазначенням пунктів дії роз'єднувачів транспорту електронів та окисного фосфорилювання (вказати основні сполуки)

10.3. Дати визначення

Вільне окиснення - це ...

Навести приклади.

11. Активні форми кисню (пероксид гідрогену, супероксидний аніон-радикал, гідроксильний радикал, синглетний кисень); механізм їх утворення та інактивації.

11.1. Вказати основні активні форми кисню та написати механізм їх утворення.

11.2. Представити схему перетворення активних форм кисню та механізмів захисту від них; дати характеристику системі антиоксидантного захисту.

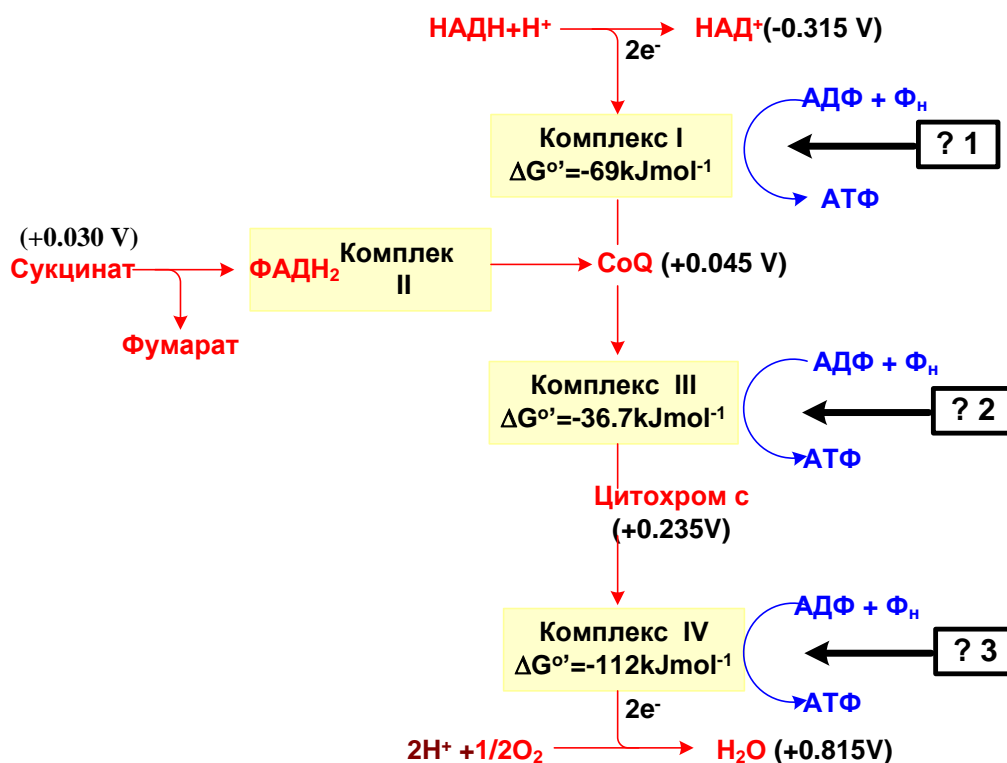
Заповнити таблицю

Активні форми кисню	Фермент антиоксидантного захисту	Реакція знешкодження	Коротка характеристика ферментів: особливості будови, ізоферменти, субклітинна/клітинна локалізація, специфічність дії
	Супероксиддисмутаза		
	Каталаза		
	Глутатіонпероксидаза		

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 6

1. При попаданні в організм ціанідів їх поведінка нагадує стан задухи і через декілька хвилин може наступити смерть. Поясніть причини та механізм даного явища.
2. Деякі фармацевтичні засоби, які використовуються для схуднення, по своїй суті є роз'єднувачами окиснення і фосфорилування. Обґрунтуйте їх терапевтичну дію.
3. Гіперфункція щитоподібної залози призводить до підвищення основного обміну. Поясніть механізм даного ефекту.
4. При обстеженні хворого встановлено, що каталазне число крові у нього становить 6 умовних одиниць при нормі 10-15 одиниць. Як оцінити такі результати? Чи виникає при цьому небезпека для організму?
5. У новонароджених на відміну від дорослих організмів міститься тканина бурий жир. Поясніть такі особливості в будові організмів різного віку, враховуючи що бурий жир містить велику кількість мітохондрій, жирні кислоти є субстратом дихального ланцюга, а вихід АТФ в цій тканині у перерахунку на атом поглинутого кисню становить менше одиниці.
6. Назвіть інгібітори окисного фосфорилування, що діють в пунктах 1,2 та 3 дихального ланцюга:



Ситуаційні клінічні задачі до теми 6

1. 68-річна жінка в стані гіпертонічної кризи перебуває на лікуванні у відділенні інтенсивної терапії впродовж 48 годин з внутрішньовенним введенням нітропрусиду натрію. Артеріальний тиск пацієнтки знизився до нормального рівня, проте вона скаржиться на пекучі відчуття в горлі та роті, що завершуються нудотою і блювотою, діареєю, збудженням та задишкою. Медсестра звернула увагу на солодкий мигдалевий запах у видиху. В

артеріальній крові виявлено істотний газовий метаболічний ацидоз. Тест сироватки крові виявив метаболіт нітропрусида, тіоціанат, в токсичних дозах.

- Яка причина вказаних симптомів?
- Який біохімічний механізм цієї проблеми?
- Яке лікування призначене за цих умов?

2. 27-річний чоловік надійшов у відділення невідкладної допомоги з ознаками і симптомами гострого апендициту. Він був відправлений в операційну для невідкладного видалення апендиксу. Коли пацієнт був підготовлений до операції, йому ввели галотан – інгаляційний анестезуючий засіб. Через дві хвилини після введення наркозу у пацієнта спостерігали значне підвищення температури, ригідність м'язів, тахіпноє. Аналіз артеріальної крові показав газовий метаболічний ацидоз, а електролітний склад сироватки крові – гіперкаліємію. Медсестра негайно повідомила родичів про стан пацієнта. Родичі згадали, що інша особа в їхній родині мала аналогічну реакцію під час операції та померла. Лікар поставив діагноз – злаякісна гіпертермія (ЗГ).

- Яка біохімічна основа цього захворювання?
- Яке лікування найкраще вибрати в цих умовах?

Посилання на відео:

1. <https://www.youtube.com/watch?v=rdF3mnyS1p0>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=ajZajFrCjtA&feature=related>
3. <https://www.youtube.com/watch?v=3y1dO4nNaKY>
4. <https://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/animations/oxidative-phosphorylation/index.html>

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Калію ціанід, що потрапив в організм пацієнта, викликав смерть через кілька хвилин на фоні явищ гіпоксії. Найімовірнішою причиною токсичної дії ціаніду було гальмування активності:	А.* Цитохромоксидази В. НАДН-дегідрогенази С. АТФ-синтетази D. НАДФН-дегідрогенази Е. АТФ-ази	
2	Організми, які в процесі еволюції не створили захисту від H_2O_2 , можуть жити лише в анаеробних умовах. Які з перелічених нижче ферментів можуть руйнувати Гідрогену пероксид?	А.* Пероксидаза та каталаза В. Оксигенази та гідроксилази С. Цитохромоксидаза, цитохром v_5 D. Оксигеназа та каталаза	

		Е. Флавінзалежні оксидази	
3	До лікарні доставлений хворий з отруєнням інсектицидом - ротеноном. Яка ділянка мітохондріального ланцюга переносу електронів блокується цією речовиною? :	А. *НАДН-коензим Q-редуктаза В. Коензим Q-цитохром C-редуктаза С. АТФ-синтетаза D. Сукцинат-коензим Q-редуктаза Е. Цитохром C-оксидаза	
4	В процесі метаболізму в організмі людини виникають активні форми кисню, у тому числі супероксидний аніон-радикал . Цей аніон інактивується за допомогою ферменту:	А.* Супероксиддисмутази В. Каталази С. Пероксидази D. Глутатіонпероксидази Е. Глутатіонредуктази	
5	При тиреотоксикозі підвищується продукція тиреоїдних гормонів Т ₃ і Т ₄ , спостерігають схуднення, тахікардія, психічна збудливість та ін. Як саме впливають тиреоїдні гормони на енергетичний обмін у мітохондріях клітин?	А. *Роз'єднують процеси окиснення та окисного фосфорилування В. Блокують дихальний ланцюг С. Активують субстратне фосфорилування D. Блокують субстратне фосфорилування Е. Активують окисне фосфоритування	

Індивідуальна самостійна робота студентів.

1. Порушення синтезу АТФ в умовах дії на організм людини патогенних факторів хімічного, біологічного та фізичного походження.
2. Роль цитохромів та коензиму Q в процесах метаболізму клітини.

Рекомендована література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-те вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.

6. Скляр О.Я., редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Скляр О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Скляр О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Скляр О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред. Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Hansen S, Birkedal H, Wibrand F. Taurine and regulation of mitochondrial metabolism. // Adv Exp Med Biol. 2015. T.883, №1. С. 397 – 405.
2. Остапів Р. ., Манько В. В. Дихання та окисне фосфорильовання мітохондрій тканин щурів за перорального введення таурину // Фізіол.журнал. 2015. Т.61, № 6. С. 104 – 114.
3. Вплив донора сірководню NaHS на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів / Семенихіна О.М., Струтинська Н.А., Будько А.Ю., та ін. // Фізіол. журнал, 2013. Т.59, № 2. С. 9 – 17.
4. Тарасова К. В., Французова С. Б. Вікові особливості енергетичного забезпечення міокарда: активаторів калієвих - АТФ – каналів // Пробл. старения и долголетия. 2013. Т. 22, № 3. С. 234 – 248.
5. Hansen S, Birkedal H, Wibrand F. Taurine and regulation of mitochondrial metabolism. // Adv Exp Med Biol. 2015. T.883, №1. С. 397 – 405.
6. Guo H., Rubinstein J.L. Structure of ATP synthase under strain during catalysis// Nat. Commun. – 2022. – №13(1). – P.2849 - 2858.
7. Ulker P. Extracellular ATP activates eNOS and increases intracellular NO generation in Red Blood Cells/Ulker P., Özen N., Abdullayeva G., Köksoy S., Yaraş N., Basrali F.// Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2018. – № 68(1). – P.89 -101.

РОЗДІЛ 3. МЕТАБОЛІЗМ ВУГЛЕВОДІВ В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ, РЕГУЛЯЦІЯ ОБМІНУ ВУГЛЕВОДІВ

Тема № 7. Особливості травлення вуглеводів. Дослідження гліколізу – анаеробного окиснення вуглеводів.

Мета заняття: Засвоїти основні принципи внутрішньоклітинного анаеробного та аеробного окиснення глюкози та біохімічні шляхи їх регуляції. Знати роль ферментів та коферментів для перебігу реакцій гліколізу. Оволодіти особливостями перебігу реакцій синтезу АТФ (субстратного фосфорилування та гліколітичної оксидоредукції).

Актуальність теми: Перетворення вуглеводів у процесах обміну речовин відіграє важливу роль в енергозабезпеченні організму. У процесі гліколізу та спиртового бродіння внаслідок фосфоролітичного розпаду вуглеводів утворюється АТФ, молочна та пірвіноградна кислоти. Зміни останніх у крові, мають важливе діагностичне значення.

Компетентності фахові:

- засвоїти основні принципи внутрішньоклітинного анаеробного окиснення глюкози та біохімічні шляхи їх регуляції;
- знати роль коферментів та ферментів у перебігу реакцій гліколізу;
- засвоїти особливості перебігу реакцій субстратного фосфорилування та синтезу АТФ;
- пояснювати біохімічні шляхи внутрішньоклітинного анаеробного окиснення глюкози;
- аналізувати особливості реакцій гліколізу, що проходять з використанням енергії АТФ;
- аналізувати особливості перебігу реакцій субстратного фосфорилування та синтезу АТФ;
- пояснювати роль коферментів та ферментів у проходженні реакцій гліколізу;
- аналізувати механізми регуляції анаеробного окиснення вуглеводів;
- пояснювати значення вуглеводів для організму людини;
- аргументувати необхідність проведення оцінки функціонального стану організму з урахуванням вмісту молочної кислоти в крові та сечі.

Базові знання:

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія.

Отримані навички: вміти писати структурні перетворення метаболітів в процесі анаеробного окиснення глюкози та спиртового бродіння.

Теоретичні питання

1. Біохімічні механізми процесів травлення вуглеводів у травному тракті. Специфічність ензимів травлення, оптимальні умови їх дії. Всмоктування продуктів гідролізу вуглеводів у тонкій кишці.

2. Спадкові ензимопатії процесів травлення вуглеводів (недостатність дисахаридаз: лактази, сахарази та ізомальтази, порушення мембранного транспорту гексоз, всмоктування глюкози та галактози).
3. Глюкоза, як важливий метаболіт вуглеводного обміну: загальна схема джерел і шляхів перетворення глюкози в організмі.
4. Анаеробне окиснення глюкози. Вклад робіт Г.Ембдена, О.Мейєргофа, Я. Парнаса у дослідженні гліколізу. Хімізм реакцій та характеристика ферментів анаеробного та аеробного гліколізу.
5. Енергетична цінність анаеробного окиснення глюкози. Характеристика реакцій субстратного фосфорилування.
6. Характеристика ферментативних реакцій гліколітичної оксидоредукції.
7. Лактатдегідрогеназна реакція. Особливості її перебігу та регуляції в різних тканинах і органах.
8. Механізми регуляції активності реакцій анаеробного окиснення глюкози. Ефект Пастера, його молекулярна основа.
9. Спиртове бродіння, ферментативні реакції.

Практична робота

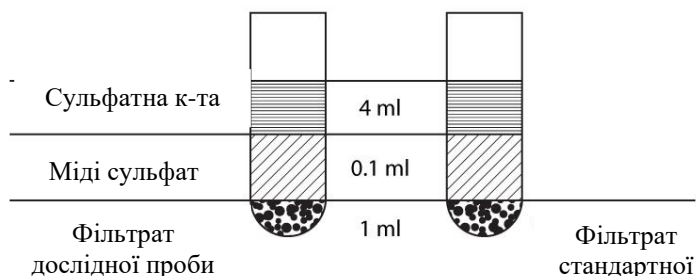
Дослід 1. Кількісне визначення молочної кислоти в сироватці крові за методом Бюхнера.

Молочна кислота в організмі є кінцевим продуктом гліколізу і глікогенолізу – анаеробних процесів окиснення глюкози та глікогену. Значна кількість молочної кислоти утворюється в м'язах, поступає в кров, переноситься до серцевого м'яза та в печінку, де окиснюється.

Принцип методу. Молочна кислота при нагріванні з концентрованою сульфатною кислотою перетворюється в оцтовий альдегід, який при взаємодії з гідрохіноном утворює сполуку червоно-коричневого кольору. Кількість молочної кислоти визначають колориметрично на ФЕКу при синьому світлофільтрі ($\lambda = 380$ нм).

Матеріальне забезпечення: сироватка крові, 5 % розчин метафосфатної кислоти, 10 % розчин міді сульфату, кальцію гідроксид в порошку, концентрована сульфатна кислота, 20 % розчин гідрохінону, стандартний розчин молочної кислоти, дистильована вода, пробірки з притертими корками на 15 мл, скляні лійки, скляні палички, фільтри, водяна баня, газовий пальник, ФЕК.

Хід роботи. У дві сухі пробірки наливають по 6 мл дистильованої води. Потім в першу додають 1 мл стандартного розчину молочної кислоти, в другу – 1 мл сироватки крові. Для осадження білків вносять в кожну пробірку по 1 мл метафосфатної кислоти, струшують та залишають на кілька хвилин, після чого відфільтровують. До фільтратів додають по 1 мл 10 % розчину міді сульфату та по 0,5 г кальцієвих паличками, через 5 хв відфільтрують



Відмірюють по 1 мл фільтрату в пробірки з притертими корками, додають по 0,1 мл 10 % розчину міді сульфату та по 4 мл концентрованої сульфатної кислоти. Пробірки ставлять у киплячу водяну баню на 1,5 хв. Після охолодження додають по 0,1 мл 20 % спиртового розчину гідрохінону, добре перемішують та кип'ятять 15 хв. Пробірки охолоджують та колориметрують при синьому світлофільтрі ($\lambda = 380$ нм).

Розрахунки: Концентрацію молочної кислоти розраховують за формулою:

$$C = \frac{C_{\text{СТАНД.}} \times A_{\text{ДОСЛІДУ}}}{A_{\text{СТАНД.}}}$$

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

$C_{\text{СТАНД.}}$ – концентрація молочної кислоти в стандартному розчині.

$A_{\text{СТАНД.}}$ – оптична густина стандартного розчину молочної кислоти.

$A_{\text{ДОСЛІДУ}}$ – оптична густина дослідної проби.

Оцінити отриманий результат. Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. Концентрація в крові здорової людини молочної кислоти становить 1 - 2 ммоль/л. Збільшення вмісту молочної кислоти може бути пов'язане з виконанням людиною інтенсивної м'язової праці за короткий проміжок часу без достатнього надходження кисню. При цьому не проходить в достатній мірі окисне декарбоксілювання пірувату до ацетил-КоА, а тільки утворення лактату. Останній може використатися у відновному періоді при достатньому надходженні кисню. Збільшення концентрації молочної кислоти спостерігається при гострому гнійному запальному ураженні тканин, важкій анемії, епілепсії, тетанії, правці, гіпоксії, пов'язаній з серцевою та легеневою недостатністю, злякисних новоутвореннях, захворюваннях печінки (гострих гепатитах, цирозі печінки), цукровому діабеті, нирковій недостатності, гострому септичному ендокардиті, поліомієліті, лейкозах, інтенсивних і тривалих м'язових навантаженнях та ін.

Для більшості наведених станів (лактоацидоз) збільшується співвідношення лактат / ПВК, найчастіше воно становить 10:1.

Контрольні питання до практичної роботи теми 7

1. Пояснити принцип методу визначення кінцевого продукту анаеробного гліколізу – молочної кислоти (метод Бюхнера).
2. При яких патологічних станах кількість молочної кислоти збільшується в крові?
3. У чому полягає принцип методу визначення концентрації молочної кислоти в крові за Бюхнером?
4. Хворий знаходиться в стані шоку. Вміст молочної кислоти в крові 10 ммоль/л. Оцініть цей показник. До яких наслідків це може призвести?

5. У спортсмена після змагань підвищився вміст молочної кислоти в крові. Чи можна вважати це патологією? Відповідь обґрунтуйте.

Інструктивно-методичні матеріали до теми №7

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Біохімічні механізми процесів травлення вуглеводів у травному тракті. Специфічність ензимів травлення, оптимальні умови їх дії. Всмоктування продуктів гідролізу вуглеводів у тонкій кишці.
 - 1.1. Представити послідовність травлення вуглеводів в усіх відділах КШТ, вказати специфічність ензимів травлення та оптимальні умови їх дії.
2. Спадкові ензимопатії процесів травлення вуглеводів (недостатність дисахаридаз: лактази, сахарази та ізомальтази, порушення мембранного транспорту гексоз, всмоктування глюкози та галактози).
 - 2.1. Вказати спадкові хвороби зумовлені дефектами ферментів травлення вуглеводів.
3. Глюкоза, як важливий метаболіт вуглеводного обміну: загальна схема джерел і шляхів перетворення глюкози в організмі.
 - 3.1. Представити схему джерел і шляхів перетворення глюкози в організмі.
 - 3.2. Вказати роль різних шляхів перетворення глюкози в організмі.
4. Анаеробне окиснення глюкози. Вклад робіт Г.Ембдена, О.Мейєргофа, Я. Парнаса у дослідженні гліколізу. Хімізм реакцій та характеристика ферментів анаеробного та аеробного гліколізу.
 - 4.1. Зазначити особистий вклад кожного з дослідників процесу гліколізу.
 - 4.2. Написати реакції перетворення глюкози в аеробному та анаеробному гліколізі.
5. Енергетична цінність анаеробного окиснення глюкози. Характеристика реакцій субстратного фосфорилування.
 - 5.1. Вказати та пояснити ферментативні реакції гліколізу, що проходять з використанням енергії.
 - 5.2. Вказати та пояснити ферментативні реакції субстратного фосфорилування.
 - 5.3. Вказати сумарну кількість АТФ утвореного під час перебігу анаеробного гліколізу.
6. Характеристика ферментативних реакцій гліколітичної оксидоредукції.
 - 6.1. Вказати та пояснити ферментативні реакції гліколітичної оксидоредукції.
7. Лактатдегідрогеназна реакція. Особливості її перебігу та регуляції в різних тканинах і органах.
 - 7.1. Написати лактатдегідрогеназну реакцію, пояснити механізм її регуляції та описати особливості перебігу в різних тканинах.
 - 7.2. Написати структуру всіх ізоферментів лактатдегідрогенази та вказати їх локалізацію в організмі людини.

7.3. Пояснити клініко-діагностичне значення визначення активності ізоферментів ЛДГ

8. Механізми регуляції активності реакцій анаеробного окиснення глюкози. Ефект Пастера, його молекулярна основа.

8.1. Описати механізми регуляції анаеробного окиснення глюкози.

8.2. Заповнити таблицю

Регуляторний фермент гліколізу	Механізми регуляції		
	Фосфорилювання/ Дефосфорилювання	Індукція (↑)/ репресія (↓) транскрипції гена	Алостерична регуляція

8.3. Дати визначення ефекту Пастера. Вказати суть молекулярної основи даного ефекту.

9. Спиртове бродіння, ферментативні реакції.

9.1. Написати реакції спиртового бродіння. Пояснити де вони відбуваються та описати особливості їх перебігу.

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 7

1. Гліколіз – це анаеробний шлях розпаду глюкози, що відбувається за допомогою низки послідовних реакцій. Вкажіть яку реакцію гліколізу каталізує ензим фосфофруктокіназа?
2. Вкажіть реакції гліколізу, що протікають із затратою енергії у вигляді АТФ
3. В експерименті показано, що при саркомі Ієнсена споживання глюкози з привідної до пухлини артерії значно збільшується, має також місце приріст вмісту молочної кислоти у відвідній артерії . Про що свідчить дане явище?
4. У крові хворого виявлено підвищення цукерок у змішаній слині тимчасово підвищується рівень лактату. Активація якого біохімічного призводить до цього?
5. У дріжджоподібних організмів відбувається процес близький до гліколізу – спиртове бродіння. Що є кінцевим продуктом спиртового бродіння?

Ситуаційні клінічні задачі до теми 7

1. 2-х річну дівчинку направили до гематолога після того, як педіатр виявив сильну анемію поєднану зі спленомегалією та жовтяницею. Її мати розповіла ймовірну про історію про «проблеми з кров`ю у сім`ї », але точної причини захворювання не знала. Електрофорез Hb був нормальним, проте загальний аналіз крові виявив гомоцитарну анемію, кількість лейкоцитів та тромбоцитів була нормальною. На периферичному мазку крові було багато

химерних еритроцитів, в тому числі, клітини різної форми. Було поставлено діагноз: дефіцит піруваткінази.

- Яка біохімічна основа цього захворювання?
- Як успадковується це порушення?

2. Під час гострого інфаркту міокарда надходження кисню до серця зменшується, змушуючи клітини міокарда переходити на анаеробне окислення глюкози.

- Активність яких ферментів підвищується за рахунок підвищення концентрації АМФ?
- Поясніть регуляцію гліколізу.

Посилання на відео:

1. [erhttp://highed.mheducation.com/sites/0072507470/student_view0/chapter25/animation_how_glycolysis_works.html](http://highed.mheducation.com/sites/0072507470/student_view0/chapter25/animation_how_glycolysis_works.html)
2. <https://www.youtube.com/watch?v=hDq1rhUkV-g>
3. https://www.youtube.com/watch?v=6s_XP8w6E0k

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Біоенергетика мозку характеризується значною залежністю від постачання киснем. Який субстрат окислення має найбільше значення для забезпечення енергією мозку?	А. Глюкоза В. Жирні кислоти С. Кетоніві тіла D. Гліцерол-3-Ф Е. Фосфоенолпіруват	
2	Еритроцит для своєї життєдіяльності потребує енергію у вигляді АТФ. Який процес забезпечує цю клітину необхідною кількістю АТФ?	А* Анаеробний гліколіз В Аеробне окислення глюкози С Пентозний цикл D Бета-окислення жирних кислот Е Цикл трикарбонових кислот	
3	Анаеробне розщеплення глюкози до молочної кислоти регулюється відповідними ферментами. Вкажіть, який фермент є головним регулятором цього процесу?	А* Фосфофруктокіназа В Глюкоо-6-фосфатізомераза С Альдолаза D Енолаза Е Лактатдегідрогеназа	
4	Еритроцити людини не містять	А* Анаеробний гліколіз	

	мітохондрій. Який основний шлях утворення АТФ в цих клітинах?	В Аеробний гліколіз С Окиснювальне фосфорилування D Креатинкіназна реакція E Аденілаткіназна реакція	
5	Активація якого процесу в клітинах пухлини шлунка є найбільш вірогідною причиною появи в шлунковому соці молочної кислоти?	A*. Анаеробного гліколізу B. Пентозофосфатного шляху C. в-окислення жирних кислот D. Аеробного окислення глюкози E. Глюконеогенезу	

Індивідуальна самостійна робота студентів.

1. Особливості регуляції обміну гліколізу в нормі та при патології.
2. Молекулярна основа ефекту Пастера та Крептрі.

Література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярєва О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Склярєв ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ПІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Склярєв ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. – 432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.: Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірна, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред. Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Prins M. I. Glucose metabolism in pediatric brain injury // Child. New Syst. 2017. V.33, №10. P. 1711 – 1718.
2. Brito MD, Silva LFSE, Siena A, Chipara M, Sarkar S, Rosenstock TR. Методи Mol Biol. 2021; 2240: 207-230. doi: 10.1007/978-1-0716-1091-6_15. PMID: 33423236
3. Samokhina E, Popova I, Malkov A, Ivanov AI, Papadia D, Osypov A, Molchanov M, Paskevich S, Fisahn A, Zilberter M, Zilberter Y. Chronic inhibition of brain glycolysis initiates epileptogenesis. J Neurosci Res. 2017 Nov;95(11):2195-2206. doi: 10.1002/jnr.24019. Epub 2017 Feb 2. PMID: 28150440.
4. Нові способи підтримки або порушення метаболічного гомеостазу. Ву Дж. J Mol Cell Biol. 1 жовтня 2017; 9 (5): 351. doi: 10.1093/jmcb/mjx049.
5. Порівняльне геномне дослідження генів метаболізму вуглеводів/глюкози: від риб до ссавців. Zhang Y, Qin C, Yang L, Lu R, Zhao X, Nie G. BMC Genomics. 2018 11 квітня;19(1):246. doi: 10.1186/s12864-018-4647-4.
6. Роль передачі сигналів цАМФ і фосфодіестерази в здоров'ї та захворюваннях печінки. Валанг Б., Макклейн С., Барве С., Гобеджішвілі Л. Стільниковий сигнал. 2018 вересень; 49: 105-115. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.06.005. Epub 2018 11 червня. PMID: 29902522 Безкоштовна стаття РМС. огляд.
7. Антиварбургський ефект мелатоніну: запропонований механізм для пояснення його інгібування багатьох захворювань. Рейтер Р.Дж., Шарма Р., Розалес-Коррал С. Int J Mol Sci. 14 січня 2021 р.; 22 (2): 764. doi:10.3390/ijms22020764. PMID: 33466614 Безкоштовна стаття РМС. огляд.
8. Метаболічні наслідки неелектрогенного обміну АТФ/АДФ у ракових клітинах: Механічна основа ефекту Варбурга. Лемастерс Дж. Дж. Biochim Biophys Acta Bioenerg. 1 липня 2021; 1862 (7): 148410. doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148410. Epub 2021, 13 березня. PMID: 33722515 Безкоштовна стаття РМС. огляд.
9. Rubin RP. Carl and Gerty Cori: A collaboration that changed the face of biochemistry. J Med Biogr. 2021 Aug;29(3):143-148. doi: 10.1177/0967772019866954. Epub 2019 Sep 2. PMID: 31475888
10. Korga A, Ostrowska M, Iwan M, Herbet M, Dudka J. Inhibition of glycolysis disrupts cellular antioxidant defense and sensitizes HepG2 cells to doxorubicin treatment. FEBS Open Bio. 2019 May;9(5):959-972. doi: 10.1002/2211-5463.12628. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30973680; PMCID: PMC6487699 Dimitriadis GD, Leighton B, Parry-Billings M, West D, Newsholme EA. Effects of hypothyroidism on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in the soleus muscle of the rat. Biochem J. 1989 Jan 15;257(2):369-73. doi: 10.1042/bj2570369. PMID: 2649073; PMCID: PMC1135589.
11. Rodríguez C, Puente-Moncada N, Reiter RJ, Sánchez-Sánchez AM, Herrera F, Rodríguez-

- Blanco J, Duarte-Olivenza C, Turos-Cabal M, Antolín I, Martín V. Regulation of cancer cell glucose metabolism is determinant for cancer cell fate after melatonin administration. *J Cell Physiol.* 2021 Jan;236(1):27-40. doi: 10.1002/jcp.29886. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32725819.
12. Kim SY. Targeting cancer energy metabolism: a potential systemic cure for cancer. *Arch Pharm Res.* 2019 Feb;42(2):140-149. doi: 10.1007/s12272-019-01115-2. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30656605.
 13. Націлювання на метаболізм глюкози для придушення прогресування раку: перспектива антигліколітичної терапії раку. Абдель-Вахаб А.Ф., Махмуд В., Аль-Харізі Р.М. *Pharmacol Res.* 2019 груд.;150:104511. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104511. Epub 2019 31 жовт. PMID: 31678210 огляд.
 14. Emini Veseli B, Perrotta P, Van Wielendaele P, Lambeir AM, Abdali A, Bellosta S, Monaco G, Bultynck G, Martinet W, De Meyer GRY. Small molecule 3PO inhibits glycolysis but does not bind to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3). *FEBS Lett.* 2020 Sep;594(18):3067-3075. doi: 10.1002/1873-3468.13878. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32620030.
 15. Kryzstofiak A, Szymonowicz K, Hlouschek J, Xiang K, Waterkamp C, Larafa S, Goetting I, Vega-Rubin-de-Celis S, Theiss C, Matschke V, Hoffmann D, Jendrossek V, Matschke J. Metabolism of cancer cells commonly responds to irradiation by a transient early mitochondrial shutdown. *iScience.* 2021 Oct 28;24(11):103366. doi: 10.1016/j.isci.2021.103366. PMID: 34825138; PMCID: PMC8603201.
 16. Korga A, Ostrowska M, Iwan M, Herbet M, Dudka J. Inhibition of glycolysis disrupts cellular antioxidant defense and sensitizes HepG2 cells to doxorubicin treatment. *FEBS Open Bio.* 2019 May;9(5):959-972. doi: 10.1002/2211-5463.12628. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30973680; PMCID: PMC6487699
 - Dimitriadis GD, Leighton B, Parry-Billings M, West D, Newsholme EA. Effects of hypothyroidism on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in the soleus muscle of the rat. *Biochem J.* 1989 Jan 15;257(2):369-73. doi: 10.1042/bj2570369. PMID: 2649073; PMCID: PMC1135589.
 17. Kim SY. Targeting cancer energy metabolism: a potential systemic cure for cancer. *Arch Pharm Res.* 2019 Feb;42(2):140-149. doi: 10.1007/s12272-019-01115-2. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30656605.
 18. Emini Veseli B, Perrotta P, Van Wielendaele P, Lambeir AM, Abdali A, Bellosta S, Monaco G, Bultynck G, Martinet W, De Meyer GRY. Small molecule 3PO inhibits glycolysis but does not bind to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3). *FEBS Lett.* 2020 Sep;594(18):3067-3075. doi: 10.1002/1873-3468.13878. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32620030

Тема № 8. Дослідження аеробного окиснення глюкози та альтернативних шляхів обміну моносахаридів.

Мета заняття: Знати механізми перетворення моносахаридів до кінцевих продуктів із звільненням енергії в аеробних умовах. Знати структурно-функціональні особливості, послідовність реакцій та роль мультиферментного піруватдегідрогеназного комплексу для аеробного перетворення глюкози. Засвоїти послідовність ферментативних реакцій та значення пентозофосфатного шляху окиснення глюкози. Оволодіти особливостями метаболічних шляхів перетворення фруктози і галактози в організмі людини.

Актуальність теми: Обмін вуглеводів охоплює весь складний процес перетворення вуглеводів від поступлення їх в організм, травлення та всмоктування в клітині, до утворення кінцевих продуктів – CO₂ і H₂O.

Етапи катаболізму вуглеводів у клітині включають утворення, в аеробних умовах, пірувату який у вигляді ацетильної групи інтегрується в КоА з утворенням ацетил – КоА, що окиснюється до CO_2 і H_2O в циклі трикарбонних кислот (циклі Кребса).

Серед альтернативних шляхів обміну глюкози важливе місце належить пентозофосфатному (фосфоглюконатному) шляху, важливим продуктом якого є НАДФН, що постачає відновні еквіваленти для реакцій синтезу жирних кислот, стероїдів; та рибозо-5-фосфату необхідного для синтезу нуклеїнових кислот.

Одночасно з глюкозою в клітині катаболізується фруктоза та галактоза, порушення метаболізму яких зумовлюється ензимопатіями (фруктозо-1-фосфатальдолази та галактозо-1-фосфат-уридилтрансферази).

У процесі обміну вуглеводів утворюються метаболіти, визначення яких у крові та сечі використовується для діагностики і контролю за лікуванням.

Компетентності фахові:

- пояснювати роль мультиферментного піруватдегідрогеназного комплексу для аеробного перетворення глюкози;
- уміня аналізувати особливості метаболічних шляхів перетворення фруктози і галактози в організмі людини;
- засвоїти послідовність ферментативних реакцій та значення пентозофосфатного шляху окиснення глюкози;
- уміня пояснювати механізми перетворення моносахаридів до кінцевих продуктів із звільненням енергії в аеробних умовах;
- аналізувати структурно-функціональні особливості мультиферментного піруватдегідрогеназного комплексу;
- пояснювати послідовність ферментативних реакцій та значення пентозофосфатного шляху окиснення глюкози;
- пояснювати причини порушень метаболічних шляхів перетворення фруктози і галактози в організмі людини та дати клінічну характеристику цим захворюванням;
- вміня проводити визначення вмісту піровиноградної кислоти та застосовувати результати для діагностики найбільш розповсюджених захворювань.

Базові знання:

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія.

Отримані навички: вміти писати реакції аеробного перетворення глюкози, окисного декарбоксилування пірувату; окислення глюкози в пентозофосфатному циклі; шляхи перетворення фруктози та галактози в організмі в нормі та при патології.

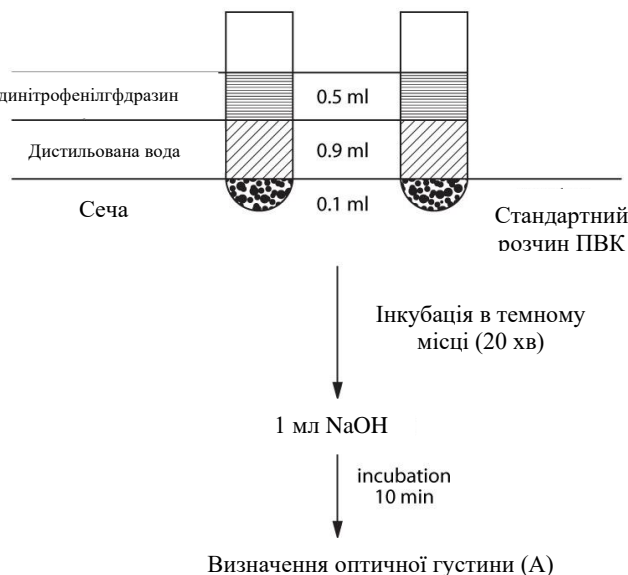
Теоретичні питання

1. Характеристика етапів аеробного окиснення глюкози.
2. Окиснювальне декарбоксилування піровиноградної кислоти:
 - будова мультиферментного піруватдегідрогеназного комплексу;

зabarвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації ПВК і визначається колориметрично.

Матеріальне забезпечення: сеча, стандартний розчин пірувату (ПВК) – 625мг в100 мл води, 0,1 % розчин 2,4- динітрофенілгідразину в 2 н розчині соляної кислоти, 12 % розчин гідроксиду натрію, дистильована вода, штатив з пробірками, піпетки, ФЕК.

Хід роботи. Беруть 2 пробірки, в 0,1мл розчину ПВК, а потім в дистильованій воді. Після цього динітрофенілгідразину, змішують і на додають по 1 мл 12 % розчину колориметрують на ФЕКу проти конт (λ = 380 нм).



Розрахунок: концентрацію ПВК вирах

$$C_{\text{ДОСЛ.}} = \frac{C_{\text{СТАНД.}} \times A_{\text{ДОСЛ.}} \times V}{A_{\text{СТАНД.}} \times a}$$

де:

$C_{\text{ДОСЛ.}}$ – концентрація ПВК у сечі

$C_{\text{СТАНД.}}$ – концентрація стандартного розчину ПВК;

$A_{\text{ДОСЛ.}}$ – оптична густина досліджуваної проби;

$A_{\text{СТАНД.}}$ – оптична густина стандарту;

V – добова кількість сечі;

a – 0,1 мл сечі, взятої для аналізу.

Порівняти отриманий результат з нормативними величинами. Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. У крові здорової людини міститься 45-115 мкмоль/л ПВК, з сечею за добу виділяється 15-25 мг ПВК. Вміст ПВК у крові (разом з молочною кислотою) підвищується при посиленій м'язовій праці, а також при деяких патологічних станах, що супроводжується судомою (тетанія, епілепсія, правець). Збільшується виділення ПВК з сечею при B_1 -вітамінній недостатності, серцевій недостатності, токсикозах, захворюваннях печінки, інсулінзалежному цукровому діабеті, діабетичному кетоацидозі, дихальному алкалозі, уремії, гепатоцеребральній дистрофії, гіперфункції гіпофізарно-адреналової і симпатико-адреналової систем, а також після введення камфори, стрихніну, адреналіну. До збільшення ПВК призводять токсична дія ацетилсаліцилової кислоти, отруєння ртуттю, миш'яком, сурмою.

Вміст ПВК різко підвищується у спинномозковій рідині при травматичних захворюваннях ЦНС, запальних процесах: менінгіті, абсцесі мозку. Під впливом наркозу рівень ПВК у крові дещо знижується. Всі фактори, які зумовлюють збільшення концентрації ПВК, як правило, призводять до зростання рівня молочної кислоти.

Таким чином, основною причиною нагромадження в крові піровиноградної та молочної кислот є порушення їх наступного ферментативного перетворення у звичайні продукти розпаду внаслідок різних причин.

Контрольні питання до практичної роботи теми 8

1. Пояснити принцип визначення вмісту піровиноградної кислоти в біологічній рідині колориметричним методом.
2. При яких патологічних станах збільшується кількість пірувату в сечі? Пояснити причини збільшення пірувату в сечі.
3. У хворого виявлено 5,15 ммоль/л молочної кислоти та 0,35 ммоль/л піровиноградної кислоти. При яких станах підвищуються їх кількісні величини?
4. Вміст ПВК в сечі складає 45 мг/добу. Дати оцінку результатам. Які можливі причини та наслідки такого стану?

Інструктивно - методичні матеріали до теми №8

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Характеристика етапів аеробного окиснення глюкози.
 - 1.1. Представити схему шляхів поетапного аеробного перетворення глюкози в організмі людини.
2. Окиснювальне декарбоксілювання піровиноградної кислоти:
 - будова мультиферментного піруватдегідрогеназного комплексу;
 - особливості функціонування піруватдегідрогеназного комплексу;
 - механізм реакції окисного декарбоксілювання пірувату;
 - роль вітамінів та коферментів у перетворенні пірувату в ацетил-КоА.
 - 2.1. Описати будову мультиферментного піруватдегідрогеназного комплексу.
 - 2.2. Написати реакції механізму окисного декарбоксілювання піровиноградної кислоти (із зазначенням назв метаболітів і ферментів);
 - 2.3. Назвати вітаміни та коферменти, що беруть участь у перетворенні пірувату в ацетил-КоА .
3. Енергетична цінність аеробного (повного) окиснення глюкози до CO_2 . Порівняльна характеристика біоенергетики аеробного та анаеробного окиснення глюкози.
 - 3.1. Розрахувати енергетичну цінність аеробного (повного) окиснення глюкози до CO_2 . Послідовно вказати кожен етап перетворення із зазначенням енергетичного виходу у вигляді АТФ.
 - 3.2. Порівняти біоенергетику аеробного та анаеробного окиснення глюкози.
4. Пентозофосфатний цикл (ПФЦ) окиснення глюкози:
 - схема реакцій окиснювальної та неокиснювальної стадій ПФЦ;

- роль ферментів та коферментів у перебігу реакцій ПФЦ;
- біологічне значення ПФШ;
- порушення ПФШ в еритроцитах; ензимопатії глюкозо-6-фосфатдегідрогенази.

4.1. Написати послідовність реакцій стадій ПФЦ (окиснювальної та ізомерних перетворень), вказати їх ферменти та коферменти.

4.2. Описати біологічне значення ПФШ.

4.3. Описати порушення функціонування ПФШ в еритроцитах; вказати причини та наслідки ензимопатій глюкозо-6-фосфатдегідрогенази.

4.4. На схемі підписати назви ферментів, що каталізують наведені реакції.

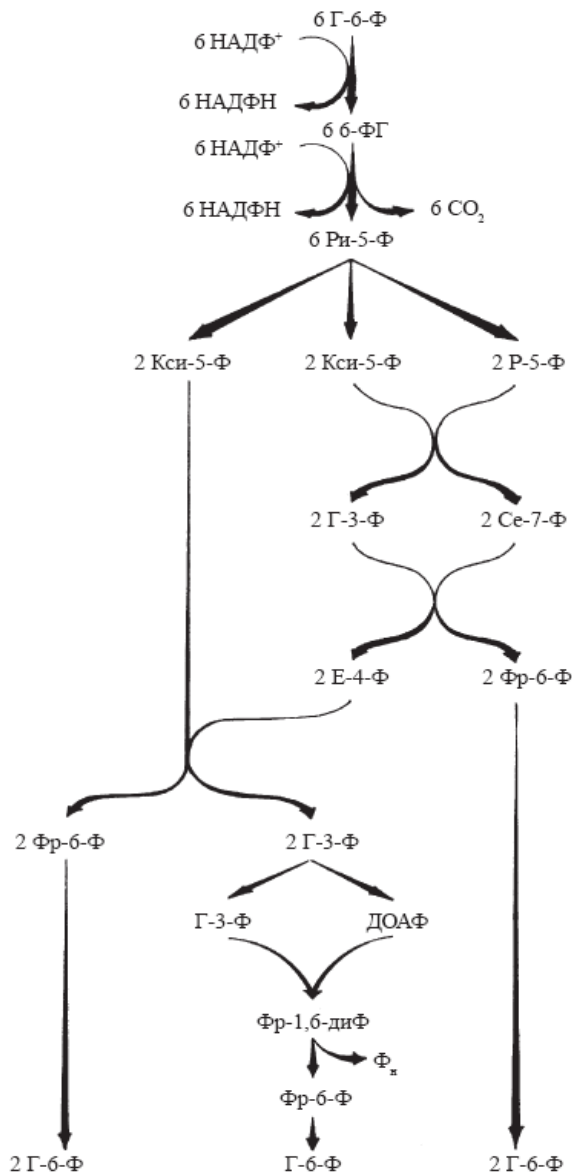


Схема реакцій пентозофосфатного циклу. Позначення: Г-6-Ф — глюкозо-6-фосфат; 6-Ф-Г — 6-фосфоглюконат; Ри-5-Ф — рибулозо-5-фосфат; Кси-5-Ф — ксилозо-5-фосфат; Р-5-Ф — рибозо-5-фосфат; Г-3-Ф — гліцеральдегід-3-фосфат; ДОАФ — діоксиацетонфосфат; Се-7-Ф — седугеттулозо-7-фосфат; Ер-4-Ф — еритрозо-4-фосфат; Фр-6-Ф — фруктозо-6-фосфат; Фр-1,6-диФ — фруктозо-1,6-дифосфат.

5. Ферментативні реакції перетворення фруктози в організмі людини. Спадкові ензимопатії обміну фруктози.

- 5.1. Написати реакції перетворення фруктози в організмі людини.
- 5.2. Написати реакцію ендogenous синтезу фруктози з глюкози та сорбітолу.
- 5.3. Пояснити значення синтезу фруктози у сім'яниках та особливості метаболізму в кришталику ока в нормі та при патології.
- 5.2. Вказати причини та наслідки ензимопатій метаболізму фруктози.

Заповнити таблицю

Ензимопатії обміну фруктози	Вказати назву фермента, генетичний дефект синтезу якого є причиною патології	Клінічні прояви, біохімічні ознаки
Фруктоземія		
Непереносимість фруктози		

6. Ферментативні реакції перетворення галактози в організмі людини. Спадкові ензимопатії обміну галактози.

6.1. Написати реакції перетворення галактози в організмі людини. Вказати існуючі ензимопатії обміну галактози.

7. Малат-аспартатний шлях переносу гліколітичного НАДН₂ в мітохондрії.

7.1. Пояснити суть малат-аспартатного шляху та представити схему механізму (з назвами метаболітів та ферментів). Вказати органи і тканини в яких функціонує цей шлях.

8. Гліцеролфосфатний човниковий механізм переносу гліколітичного НАДН₂ в мітохондрії.

8.1. Пояснити суть гліцеролфосфатного шляху та представити схему механізму (з назвами метаболітів і ферментів). Вказати органи і тканини в яких функціонує цей шлях.

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 8

1. Чому хворим з серцево-судинною недостатністю та ознаками ацидозу призначають кокарбоксілазу?
2. Вміст пірувату в сечі пацієнта складає 45 мг/добу при нормі 15 – 25 мг. Дати оцінку результату. Які можливі причини та наслідки такого стану?
3. Встановлено, що у хворого загальмоване окисне декарбоксілювання пірувату. Скільки молекул АТФ недоотримує організм при такому окисненні однієї молекули глюкози?
4. У хворих зі зниженою активністю глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в еритроцитах спостерігається підвищена чутливість до окиснювачів, а також порушується відновлення метгемоглобіну. Яка причина такого стану?
5. Розрахуйте вміст фруктози в крові дорослої людини, якщо він становить 0,4% середньої концентрації глюкози в крові. Який зв'язок між обміном

фруктози і глюкози. Які ви знаєте захворювання, пов'язані з порушенням обміну фруктози?

Ситуаційні клінічні задачі до теми 8

1. 3-х річного хлопчика було доставлено у відділення невідкладної допомоги після кількох епізодів блювання та млявості. Педіатр був стурбований його неспроможністю нормально розвиватися і можливою печінковою недостатністю, а також періодичними епізодами блювання та млявості. Після того, як був зібраний ретельний анамнез, встановлено, що ці епізоди виникають після прийому певних видів їжі, особливо з вмістом фруктози. Рівень цукру перевіряли у відділенні невідкладної допомоги і він був дуже низьким.

- Який найімовірніший діагноз у дитини?
- Що є біохімічною основою даних клінічних симптомів?
- Яке лікування даного розладу?

1. Вагітна жінка, що страждає на лактозну хворобу поцікавилася, чи може вона годувати дитину, не вживаючи молока чи молочних продуктів?

- Яку пораду слід їй дати?

Посилання на відео:

1. <https://www.youtube.com/watch?v=g16JbgN7Xtk>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=yHmAARLd4yE>
3. <https://www.youtube.com/watch?v=9h0i-ZUQDsM>

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Біосинтез пуринового кільця відбувається на рибозо-5-фосфаті шляхом нарощування атомів азоту і вуглецю та замикання кілець. Який процес слугує джерелом рибозо фосфату?	А. *Пентозофосфатний цикл В. Глікогеноліз С. Гліколіз D. Глюконеогенез E. Глікогенез	
2	У експериментальних тварин з раціону харчування виключили ліпоєву кислоту, що призвело в них до інгібування піруватдегідрогеназного комплексу. Чим є ліпоєва кислота для цього ферменту?	А. *Коферментом В. Інгібітором С. Аlostеричним регулятором D. Продуктом E. Субстратом	

3	В організмі людини відновлений НАДФН ₂ потрібний для біосинтезу жирних кислот, холестерину, знешкодження аміаку та ксенобіотиків. В результаті яких реакцій він утворюється?	А. *Пентозофосфатного циклу В. Гліколізу С. Циклу Кребса D. Мікросомального окиснення E. Окиснення жирних кислот	
4	Новонароджена дитина відмовляється від їжі, в неї розвивається блювання, пронос, а через деякий час – помутніння кристалика (катаракта). Про нестачу якого ензиму це свідчить?	А. *Галактозо-1-фосфатуридилтрансфери В. Глюкозо-6-фосфатази С. Гексокінази D. Галактокінази E. Глікогенсинтази	
5	Спадкове несприйняття фруктози виявляється втратою свідомості, блюванням, ушкодженням печінки та нирок. З відсутністю якого ензиму пов'язане це захворювання?	А. *Фруктозо-1-фосфатальдолази В. Фосфофруктокінази С. Фосфорилази D. Глутатіонредуктази E. Галактозо-1-фосфатуридилтрансфери	

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Причини, прояви вроджених та набутих порушень пентозофосфатного циклу
2. Порушення обміну галактози та фруктози. Молекулярна основа, клінічні прояви.

Література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярєва О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Склярєв ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ПІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.

6. Скляр О.Я., редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Скляр О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Скляр О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Скляр О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред. Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Comparison of the effect of the aerobic glycolysis inhibitor dichloroacetate and the Krebs cycle inhibitor ZW6 cellular and humoral alloimmunity / Elefteriadis T., Pissas G., Mavropoulos V., Stefanidis J. // Biomed. Rep. 2017. № 7(5). P. 439 – 444.
2. NAD⁺, сенолітики чи піруват для здорового старіння? Чжоу FQ. Nutr Metab. 26 жовтня 2021;14:11786388211053407. doi:10.1177/11786388211053407. eCollection 2021.PMID: 34720589 . огляд.
3. Hosios Aaron M., Vander Heiden Matthew G. Окисно-відновні потреби проліферуючих клітин ссавців. Журнал біологічної хімії. 2018; 293 (20): 7490–7498. doi: 10.1074/jbc.TM117.000239. - DOI - PMC - PubMed
4. Rubin RP. Carl and Gerty Cori: A collaboration that changed the face of biochemistry. J Med Biogr. 2021 Aug;29(3):143-148. doi: 10.1177/0967772019866954. Epub 2019 Sep 2. PMID: 31475888
5. Ramos-Ibeas P, Barandalla M, Colleoni S, Lazzari G. Ролі антиоксиданту пірувату в фібробластах людини та ембріональних стовбурових клітинах. Мол. Стільниковий. біохім. 2017; 429: 137-150. doi: 10.1007/s11010-017-2942-z. - DOI - PubMed
6. Cui Q, Wen S, Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach: recent updates. Future Med Chem. 2017 Jun;9(9):929-949. doi: 10.4155/fmc-2017-0011. Epub 2017 Jun 21. PMID: 28636410.
7. Gao M, Huang J, Jiang X, Yuan Y, Pang H, Luo S, Wang N, Yao C, Lin Z, Pu D, Zhang S,

- Sun P, Liu Z, Xiao Y, Wang Q, Hu Z, Yin H. Regulation of aerobic glycolysis to decelerate tumor proliferation by small molecule inhibitors targeting glucose transporters. *Protein Cell*. 2020 Jun;11(6):446-451. doi: 10.1007/s13238-020-00725-7. PMID: 32410006; PMCID: PMC7251022.
8. Henkenius K, Greene BH, Barckhausen C, Hartmann R, Märken M, Kaiser T, Rehberger M, Metzelder SK, Parak WJ, Neubauer A, Brendel C, Mack E. Maintenance of cellular respiration indicates drug resistance in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2017
 9. Wang Z, Zhang F, Liu W, Sheng N, Sun H, Zhang J. Impaired tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial aerobic respiration during isoproterenol induced myocardial ischemia is rescued by bilobalide. *J Pharm Anal*. 2021 Dec;11(6):764-775. doi: 10.1016/j.jpha.2020.08.008. Epub 2020 Aug 26. PMID: 35028182; PMCID: PMC8740385Nov;62:56-63. doi: 10.1016/j.leukres.2017.09.021. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28985623.
 10. Abdel-Wahab AF, Mahmoud W, Al-Harizy RM. Targeting glucose metabolism to suppress cancer progression: prospective of anti-glycolytic cancer therapy. *Pharmacol Res*. 2019 Dec;150:104511. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104511. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31678210.
 11. Kulkarni PP, Tiwari A, Singh N, Gautam D, Sonkar VK, Agarwal V, Dash D. Aerobic glycolysis fuels platelet activation: small-molecule modulators of platelet metabolism as anti-thrombotic agents. *Haematologica*. 2019 Apr;104(4):806-818. doi: 10.3324/haematol.2018.205724. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30381300; PMCID: PMC6442984.
 12. Zhou W, Ramachandran D, Mansouri A, Dailey MJ. Glucose stimulates intestinal epithelial crypt proliferation by modulating cellular energy metabolism. *J Cell Physiol*. 2018 Apr;233(4):3465-3475. doi: 10.1002/jcp.26199. Epub 2017 Nov 1. PMID: 28926104.
 13. Hingst JR, Bruhn L, Hansen MB, Rosschou MF, Birk JB, Fentz J, Foretz M, Viollet B, Sakamoto K, Færgeman NJ, Havelund JF, Parker BL, James DE, Kiens B, Richter EA, Jensen J, Wojtaszewski JFP. Exercise-induced molecular mechanisms promoting glycogen supercompensation in human skeletal muscle. *Mol Metab*. 2018 Oct;16:24-34. doi: 10.1016/j.molmet.2018.07.001. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30093357; PMCID: PMC6158101.

Тема № 9. Дослідження катаболізму та біосинтезу глікогену. Регуляція обміну глікогену, біосинтез глюкози – глюконеогенез.

Мета заняття: Знати механізми гормональної регуляції обміну глікогену в м'язах і печінці та засвоїти особливості реакцій синтезу й розпаду глікогену. Оволодіти основними принципами регуляції та особливостями перебігу реакцій глюконеогенезу.

Актуальність теми: Глікоген є основною молекулярною формою запасання вуглеводів в організмі людини і тварин, що акумулюється у вигляді внутрішньоклітинних гранул, переважно в печінці та м'язах. В організмі людини існують регуляторні механізми, що контролюють координовані зміни процесів синтезу та розпаду глікогену в умовах змін режимів харчування, переходу організму від стану спокою до активної діяльності. Важливим є розуміння процесів регуляції реакцій глікогенолізу та глікогенезу, які відіграють важливу роль у підтримці сталого рівня глюкози в крові, а також виникнення патологічних процесів обміну глікогену.

Компетентності фахові:

- уміння пояснювати особливості реакцій синтезу й розпаду глікогену;

- інтерпретувати каскадні механізми АТФ-залежної регуляції активностей глікогенфосфорилази і глікогенсинтетази;
- оволодіти особливостями перебігу реакцій глюконеогенезу;
- інтерпретувати основні принципи регуляції глюконеогенезу;
- пояснювати особливості реакцій розпаду та біосинтезу глікогену;
- аналізувати механізми гормональної регуляції обміну глікогену в м'язах та печінці;
- пояснювати генетичні порушення метаболізму глікогену;
- аналізувати особливості перебігу реакцій та субстрати глюконеогенезу;
- пояснювати та вміти трактувати механізми регуляції глюконеогенезу;
- вказати значення визначення вмісту глікогену в печінці для діагностики найбільш розповсюджених захворювань;
- вміння проводити практичну роботу з виявлення глікогену в печінці;
- вміння проводити якісну реакцію на крохмаль.

Базові знання

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія

Отримані навички: вміти писати реакції синтезу та розпаду глікогену; метаболічні шляхи глюконеогенезу; обхідні шляхи гліколізу.

Теоретичні питання

1. Особливості перебігу та механізм ферментативних реакцій глікогенезу.
2. Глікогеноліз, реакції спільні та відмінні із гліколізом.
3. Каскадні механізми АТФ-залежної регуляції активностей глікогенфосфорилази і глікогенсинтетази.
4. Особливості гормональної регуляції обміну глікогену в м'язах та печінці.
5. Спадкові порушення ферментів синтезу та розпаду глікогену. Глікогенози, аглікогенози, їх характеристика, причини виникнення.
6. Особливості метаболізму вуглеводних компонентів глікокон'югатів.
7. Генетичні порушення метаболізму глікокон'югатів (глікозидози).
8. Глюконеогенез. Визначення, субстрати, компартменталізація ферментів, послідовність реакцій, біологічне значення процесу.
9. Механізми регуляції глюконеогенезу в організмі людини.
10. Незворотні реакції гліколізу та їх обхідні шляхи.
11. Взаємозв'язок гліколізу та глюконеогенезу. Глюкозо-лактатний (цикл Корі), глюкозо-аланіновий цикли.

Практична робота

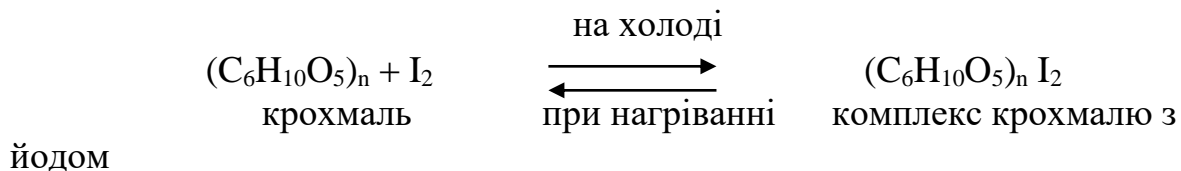
Дослід 1. Якісна реакція на крохмаль.

Принцип методу. При взаємодії крохмалю з йодом утворюються комплексні адсорбційні сполуки, які забарвлюються в синій колір.

Матеріальне забезпечення: 1 %-й розчин крохмалю, розчин Люголю (розчин йоду в йодиді калію), штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи. В пробірку вносять 0,5 мл розчину крохмалю та додають 1-2 краплі розчину Люголя. Спостерігають появу синього забарвлення. Синє забарвлення пояснюється адсорбцією йоду крохмалем і утворенням комплексних сполук крохмалю з йодом.

Це можна виразити за допомогою схеми:



Зробити висновок.

Дослід 2. Виявлення глікогену в печінці.

Принцип методу. Глікоген, як і крохмаль, з йодом утворює забарвлені сполуки (крохмаль темно-синього кольору, глікоген – червоно-бурого). Різниця у забарвленні визначається кількістю амілози (синє забарвлення з йодом) і амілопектину (червоне забарвлення з йодом) у молекулах полісахаридів.

Матеріальне забезпечення: печінка свіжа або свіжозаморожена, розчин Люголю (розчин йоду в йодиді калію), 1 % розчин ацетатної кислоти, фарфорова ступка, водяна баня, паперові фільтри, штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи. 0,5 г свіжозамороженої печінки поміщають у склянку, подрібнюють ножицями, заливають 4 мл кип'яченої дистильованої води, переносять у пробірку та кип'ятять протягом 2-3 хв (для інактивації ферментів). Пізніше вміст пробірки переливають у фарфорову ступку та розтирають до отримання однорідної маси. Цей гомогенат розводять 1 мл дистильованої води, переносять у пробірку та кип'ятять на водяній бані 20 хв, додаючи воду по краплях по мірі википання рідини. Для повнішого осадження білків киплячу рідину підкислюють 5-10 краплями 1 % розчину ацетатної кислоти. Осад білка відділяють фільтруванням через змочений водою паперовий фільтр. До фільтрату додають 2-3 краплі розчину Люголю. За наявності у досліджуваному матеріалі глікогену розчин набуває характерного червоно-бурого забарвлення.

Клініко-діагностичне значення. Глікоген – полісахарид, який є основним резервом вуглеводів в організмі. Головне депо для глікогену – печінка та м'язи. Норма в крові – 16,2 – 38,7 мг/л.

Підвищення концентрації глікогену в крові спостерігають при інфекційних захворюваннях, хворобах крові, що супроводжуються лейкоцитозом, діабеті, новоутвореннях.

Зниження концентрації характерне для дітей з гострими гепатитами. Важливе клінічне значення має цитохімічне визначення рівня глікогену в клітинах крові, кісткового мозку та печінці.

Контрольні питання до практичної роботи теми 9

1. Виявлення глікогену в печінці. Яке біологічне значення має нагромадження глікогену у печінці? В яких тканинах ще накопичується в організмі людини глікоген?
2. Поясніть, чому гомополісахариди крохмаль і глікоген дають в реакції з йодом різне (відповідно сине і червоно-буре) забарвлення.
3. У хворого судоми у м'язах при напруженій роботі, а поза тим відчуває себе здоровим. При біопсії м'язової тканини виявлено значний надлишок глікогену. Концентрація глюкози в крові нижче норми. Про недостатність якого ферменту слід думати?
4. Відомо, що глікоген, який становить енергетичний запас організму, відкладається про запас у печінці та м'язах, але не створює резерву в такій важливій тканині як мозок, яка у великій кількості використовує глюкозу. Поясніть, чому глікоген не запасується у мозку?

Інструктивно-методичні матеріали до теми №9

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Особливості перебігу та механізм ферментативних реакцій глікогенезу.
 - 1.1. Вказати місце перебігу синтезу глікогену;
 - 1.2. Представити послідовність ферментативних реакцій цього процесу;
 - 1.3. Описати місця депонування та особливості мобілізації глікогену в різних органах.
2. Глікогеноліз, реакції спільні та відмінні із гліколізом.
 - 2.1. Представити реакції (із зазначенням назв метаболітів і ферментів) глікогенезу та вказати реакції спільні та відмінні із гліколізом.
3. Каскадні механізми АТФ-залежної регуляції активностей глікогенфосфорилази і глікогенсинтетази.
 - 3.1. Представити схему АТФ-залежної регуляції активностей глікогенфосфорилази і глікогенсинтетази.
4. Особливості гормональної регуляції обміну глікогену в м'язах та печінці.
 - 4.1. Написати схему гормональної регуляції обміну глікогену.
 - 4.2. Вказати особливості впливу інсуліну, глюкагону та адреналіну на обмін глікогену в м'язах та печінці.
5. Спадкові порушення ферментів синтезу та розпаду глікогену. Глікогенози, аглікогенози, їх характеристика, причини виникнення.
 - 5.1. Дати визначення
глікогенози – це...
аглікогенози – це...
 - 5.2. Назвати спадкові порушення синтезу глікогену, дати характеристику, вказати причину виникнення захворювання.
 - 5.3. Дати визначення

Хвороба Гірке – це...

Хвороба Андерсена – це...

5.4. Заповнити таблицю

Тип	Тривіальна назва	Недостатність ферменту	Ушкоджені органи і тканини	Структура глікогену	Клінічні прояви
0	Хвороба Льюїса	Глікогенсинтаза			
I	Хвороба Гірке				
II					
III					
IV					
V					
VI					
VII					

6. Особливості метаболізму вуглеводних компонентів глікокон'югатів.

6.1. Вказати особливості синтезу N-зв'язаних глікопротеїнів.

6.2. Вказати особливості синтезу O-зв'язаних глікопротеїнів.

6.3. Дати характеристику синтезу гліколіпідів.

6.4. Описати процес катаболізму глікокон'югатів.

7. Генетичні порушення метаболізму глікокон'югатів (глікозидози).

7.1. Дати визначення

глікозидози (мукополісахаридозів) – це...

7.2. Назвати спадкові порушення метаболізму глікокон'югатів, дати характеристику, вказати причину виникнення захворювання.

7.3. Заповнити таблицю «Класифікація мукополісахаридозів»

Форма мукополісахаридозу (МПС)	Тривіальна назва хвороби	Недостатність ферменту	Діагностика: глікозамін глікани сечі	Фенотип/ Клінічні прояви
МПС I: - I H - I S - I H/S	- синдром Гурлер - синдром Шейє - синдром Гурлер-Шейє			
МПС II	синдром Хантера (Гунтера)			
Гарголізм об'єднання МПС I і II				
МПС III:	синдром Санфіліппо			

- A - B - C - D				
МПС IV: - A - B	синдром Моркіо			
МПС VI	синдром Марото-Ламі			
МПС VII	Синдром Слая			

7.4. Заповнити таблицю

Типи фенотипів МПС	Характеристика фенотипів	Форми МПС
Гурлер - подібний		МПС I, II, III, VI, VII
Моркіо - подібний		МПС IV A і B

8. Глюконеогенез. Визначення, субстрати, компартменталізація ферментів, послідовність реакцій, біологічне значення процесу.

Дати визначення:

глюконеогенез- це...

8.2. Вказати субстрати, що можуть слугувати попередниками синтезу глюкози.

8.3. Написати реакції глюконеогенезу із зазначення їх клітинної локалізації.

8.4. Вказати біологічне значення глюконеогенезу.

9. Механізми регуляції глюконеогенезу в організмі людини.

9.1. Описати механізми регуляції глюконеогенезу в організмі людини.

9.2. Заповнити таблицю

Регуляторний фермент глюконеогенезу	Механізми регуляції		
	Фосфорилювання/ Дефосфорилювання	Індукція (↑)/ репресія (↓) транскрипції гена	Алостерична регуляція

10. Незворотні реакції гліколізу та їх обхідні шляхи.

10.1. Написати незворотні реакції гліколізу та їх обхідні шляхи – реакції глюконеогенезу (із зазначенням метаболітів і ферментів).

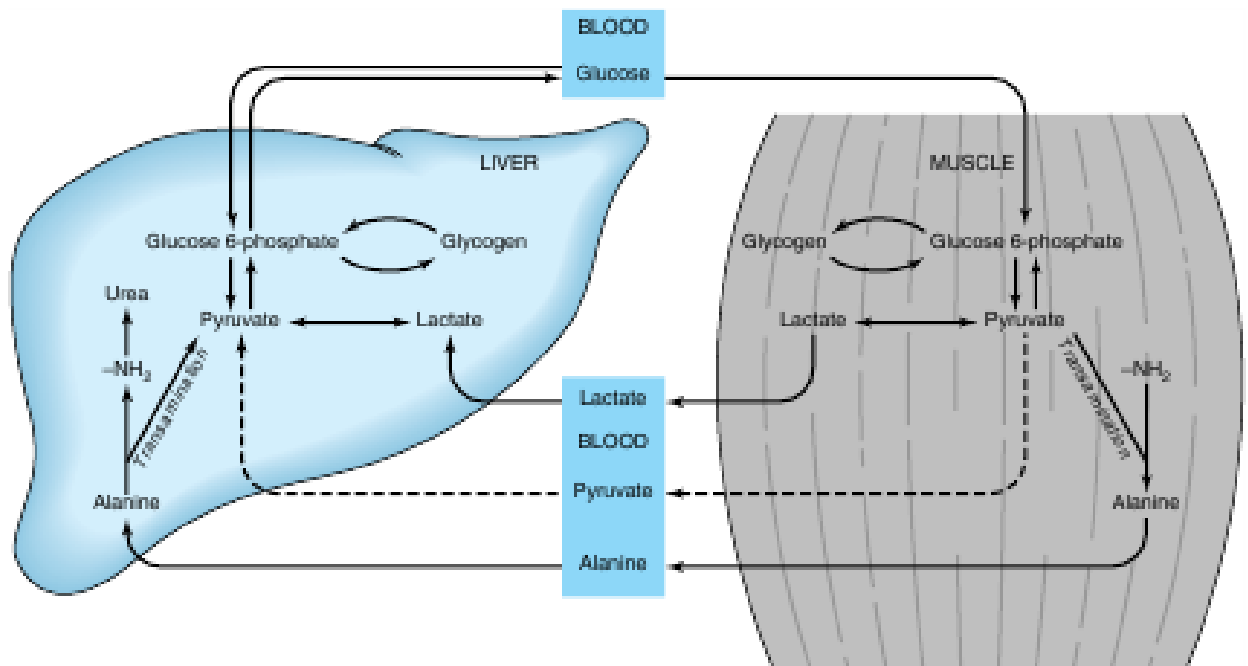
11. Взаємозв'язок гліколізу та глюконеогенезу. Глюкозо-лактатний (цикл Корі), глюкозо-аланіновий цикли.

11.1. Пояснити взаємозв'язок між гліколізом та глюконеогенезом.

11.2. Дати визначення та описати функціонування глюкозо-лактатного циклу.

11.3. Дати визначення та описати функціонування глюкозо-аланінового циклу.

11.4. Пояснити значення взаємозв'язку гліколізу та глюконеогенезу для організму



Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 9

1. Відомо, що глікоген, який становить енергетичний запас організму, відкладається про запас у печінці та м'язах, але не створює резерву в такій важливій тканині як мозкова, яка у великій кількості використовує глюкозу. Поясніть, чому глікоген не накопичується у мозку?
2. Після фізичного навантаження у спортсмена різко підвищився рівень молочної кислоти у крові, але через 1 годину цей показник був вже у нормі. Як можна пояснити швидку нормалізацію лактату у крові? Який процес активується у печінці після значних фізичних навантажень?
3. Людина голодувала протягом доби, проте рівень глюкози крові залишався у нормі. Пояснити механізм підтримання сталого рівня глюкози крові протягом доби повного голодування.
4. Людина голодувала тривалий час, в неї зменшилась вага, зменшилась кількість м'язової маси, проте рівень глюкози крові залишався у нормі. Пояснити механізм підтримання сталого рівня глюкози крові протягом тривалого голодування.
5. У дитини спостегаються гіпоглікемія і швидка м'язова втомлюваність. Поясніть молекулярні механізми розвитку глікогенозів, які характеризуються такими ознаками.

Ситуаційні клінічні задачі до теми 9

1. 12-ти річна дівчинка має сильно збільшений живіт. В анамнезі були часті епізоди слабкості, пітливості та блідості, що зникали після прийому їжі. Дитина розвивалася повільно. Сиділа у віці 1-го року, ходила без допомоги у віці 2-х років, погано займалася у школі. Фізичне обстеження виявило нормальні артеріальний тиск, температуру, частоту пульсу, але низьку вагу (23кг) Печінка збільшена, щільна і опущена в таз. Селезінка та нирки не пальпуються. Всі інші фізичні обстеження не виявили відхилень. Лабораторні дослідження виявили низький рівень глюкози, рН та підвищення вмісту лактату, тригліцеридів, кетонних тіл, підвищення вмісту вільних жирних кислот. Біопсія печінки виявила високий вміст глікогену. Структура печінкового глікогену була нормальною. Ензимний аналіз біопсійного матеріалу виявив зниження активності глюкозо-6-фосфатази.

- Який найімовірніший діагноз?
- Яка біохімічна основа клінічних симптомів?
- Яке лікування захворювання?

2. 14- річна школярка, яка незадоволена своєю зовнішністю, два дні голодувала, щоб одягнути сукню (на розмір меншу, ніж фактичний), яку вона придбала для танцювальної вечірки.

- Який орган (тканина) є джерелом глюкози, що синтезується за допомогою глюконеогенезу?

Посилання на відео:

1. <https://www.wiley.com/college/boyer/0470003790/animations/gluconeogenesis/gluconeogenesis.htm>
2. <https://www.wiley.com/college/fob/quiz/quiz15/15-22.html>
3. https://www.wiley.com/college/boyer/0470003790/animations/cori_cycle/cori_cycle.htm

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Глікоген, що потрапив в організм з їжею, гідролізувався в ШКТ. Який кінцевий продукт утворився в результаті цього процесу?	А * Глюкоза В Лактат С Лактоза D Галактоза Е Фруктоза	
2	Авідин є сильним специфічним інгібітором біотинних ферментів. Яка з нижчеприведених реакцій буде блокуватися при додаванні	А * Піруват----- Оксалоацетат В Глюкоза-----Піруват С Оксалоацетат-----Глюкоза	

	авідину до клітинного гомогенату?	Д Глюкоза-----Рибозо-5-фосфат Е Лактат-----Піруват	
3	У хворого, виснаженого голодуванням, в печінці та нирках посилюється процес:	А *Глюконеогенезу В Синтезу сечовини С Синтезу білірубіну D Утворення гіпурової кислоти Е Синтезу сечової кислоти	
4	Хвороба Гірке - це захворювання, при якому спостерігається накопичення глікогену в печінці та нирках. Дефіцит якого ферменту є причиною цього захворювання?	А *Глюкозо-6-фосфатази В Глікогенфосфорилаза С Кінази фосфорилази D Фосфоглюкомутаза Е Глюкокіназа	
5	Глікоген – полісахарид, що має здатність нагромаджуватися в печінці та м'язах. Процеси синтезу та розпаду глікогену в клітинах регулюються завдяки включенню механізмів фосфорилювання ключових ферментів обміну глікогену	А. *Глікогенсинтази і глікогенфосфорилази В. Глікогенфосфорилази і ліпази С. Глікогенсинтази і протеїнкінази D. Фосфопротеїнфосфатази і протеїнкінази Е. Аденілатциклази і ліпази	

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Особливості регуляції обміну глікогену
2. Спадкові порушення обміну глікокон'югатів. Біохімічна основа їх виникнення, класифікація та особливості клінічного перебігу мукополісахаридозів.

Література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.

4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ПІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “ Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред. Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Stephens FB, Tsintzas K. Metabolic and molecular changes associated with the increased skeletal muscle insulin action 24-48 h after exercise in young and old humans. Biochem Soc Trans. 2018 Feb 19;46(1):111-118. doi: 10.1042/BST20170198. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29330356.
2. Jensen R, Ørtenblad N, Stausholm MH, Skjaerbaek MC, Larsen DN, Hansen M, Holmberg HC, Plomgaard P, Nielsen J. Glycogen supercompensation is due to increased number, not size, of glycogen particles in human skeletal muscle. Exp Physiol. 2021 May;106(5):1272-1284. doi: 10.1113/EP089317. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33675088.
3. Katz A. A century of exercise physiology: key concepts in regulation of glycogen metabolism in skeletal muscle. Eur J Appl Physiol. 2022 Aug;122(8):1751-1772. doi: 10.1007/s00421-022-04935-1. Epub 2022 Mar 30. PMID: 35355125; PMCID: PMC9287217.
4. Cai Y, Guo H, Fan Z, Zhang X, Wu D, Tang W, Gu T, Wang S, Yin A, Tao L, Ji X, Dong H, Li Y, Xiong L. Glycogenolysis Is Crucial for Astrocytic Glycogen Accumulation and Brain Damage after Reperfusion in Ischemic Stroke. iScience. 2020 May 6;23(5):101136. doi: 10.1016/j.isci.2020.101136. Epub ahead of print. PMID: 32446205; PMCID: PMC7240195
5. Tarnopolsky MA. Myopathies Related to Glycogen Metabolism Disorders.

- Neurotherapeutics. 2018 Oct;15(4):915-927. doi: 10.1007/s13311-018-00684-2. PMID: 30397902; PMCID: PMC6277299
6. Pederson BA. Structure and Regulation of Glycogen Synthase in the Brain. Adv Neurobiol. 2019;23:83-123. doi: 10.1007/978-3-030-27480-1_3. PMID: 31667806.
 7. Krysztofiak A, Szymonowicz K, Hlouschek J, Xiang K, Waterkamp C, Larafa S, Goetting I, Vega-Rubin-de-Celis S, Theiss C, Matschke V, Hoffmann D, Jendrosseck V, Matschke J. Metabolism of cancer cells commonly responds to irradiation by a transient early mitochondrial shutdown. iScience. 2021 Oct 28;24(11):103366. doi: 10.1016/j.isci.2021.103366. PMID: 34825138; PMCID: PMC8603201.
 8. Nawaz A, Zhang P, Li E, Gilbert RG, Sullivan MA. The importance of glycogen molecular structure for blood glucose control. iScience. 2020 Dec 16;24(1):101953

Тема № 10. Дослідження механізмів метаболічної та гормональної регуляції обміну вуглеводів. Цукровий діабет.

Мета заняття: Знати роль гормонів у регуляції та підтриманні постійного рівня глюкози в крові. Засвоїти особливості порушень обміну вуглеводів, жирів, білків за цукрового діабету.

Актуальність теми: Концентрація глюкози в крові залежить від рівноваги між надходженням її в кров і споживанням тканинами. Оскільки виведення глюкози з організму в нормі є досить незначне, то підтримка постійності її концентрації у відносно вузьких межах за значних коливань надходження з їжею забезпечується процесами обміну в тканинах. Система регуляторних механізмів включає гормони інсулін, глюкагон, адреналін, глюкокортикоїди, а також взаємодії між тканинами: печінкою, м'язами, мозком та ін.

Компетентності фахові:

- уміння трактувати основні джерела та аналізувати шляхи використання глюкози крові;
- уміння аналізувати роль гормонів у регуляції та підтриманні постійного рівня глюкози в крові;
- інтерпретувати причини та особливості порушень обміну вуглеводів, жирів, білків за цукрового діабету;
- пояснювати роль різних метаболічних шляхів у підтримці постійного рівня глюкози в крові;
- уміння пояснювати порушення метаболізму вуглеводів за цукрового діабету.
- пояснити клініко-діагностичне значення визначення рівня цукру в кров;
- ознайомитись з принципом роботи глюкометра;
- уміння побудувати криву цукрового навантаження за показниками глюкози в крові;
- уміння опрацювати результати показників та застосовувати їх для діагностики порушень вуглеводного обміну.

Базові знання

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія.

Отримані навички: вміти пояснити передумови проведення глюкозо-толерантного тесту.

Теоретичні питання

1. Біохімічні процеси, що забезпечують сталий рівень глюкози в крові. Роль різних шляхів обміну вуглеводів у регуляції рівня глюкози в крові.
2. Роль печінки в обміні вуглеводів.
3. Ендокринна регуляція обміну вуглеводів:
 - інсулін, будова, механізм дії, роль в обміні вуглеводів;
 - адреналін та глюкагон, механізми їх регулюючої дії на обмін вуглеводів;
 - глюкокортикоїди, їх вплив на обмін вуглеводів;
 - соматотропін, особливості впливу на вуглеводний обмін.
4. Характеристика гіпер-, гіпоглікемії та глюкозурії.
5. Інсулінзалежна та інсуліннезалежна форми цукрового діабету. Біохімічні критерії цукрового діабету.
6. Характеристика порушень вуглеводного, ліпідного, білкового обмінів за цукрового діабету.
7. Біохімічні тести для оцінки цукрового діабету (цукор в крові та сечі, кетонів тіла в крові та сечі, білок в сечі, глікозильований гемоглобін, C-пептид). Тест на толерантність до глюкози. Представити криву цукрового навантаження, пояснити її особливості для людей з нормальною та порушеною толерантністю до глюкози.

Практична робота

Дослід 1. Ознайомлення з роботою глюкометра. Побудова кривої цукрового навантаження за показниками рівня цукру в крові натще, через 1-у та 2-і години після цукрового навантаження.

Визначення концентрації глюкози в крові проводять за глюкозооксидазним методом.

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

Фізіологічні гіперглікемії спостерігають при емоційних стресах, споживанні великої кількості вуглеводів з їжею. Патологічні гіперглікемії найчастіше пов'язані з захворюваннями ендокринної системи, спостерігаються при цукровому діабеті, пухлинах кори наднирників та гіпофізу, важких розладах функції печінки, гіперфункції щитовидної залози, органічних ураженнях нервової системи.

Гіпоглікемія виникає при аденомі острівцевого апарату підшлункової залози внаслідок підвищеної продукції інсуліну β -клітинами, недостатній функції щитовидної залози, наднирників, гіпофізу. Крім того, гіпоглікемія може бути викликана голодуванням, важкою фізичною працею,

передозуванням інсуліну при лікуванні, порушенням всмоктування вуглеводів, захворюванням нирок, які супроводжуються зниженням ниркового порогу для глюкози.

Особливе значення має дослідження цукрового навантаження на рівень цукру в крові. Метод цукрового навантаження дозволяє виявити приховані форми діабету, порушення глікогенутворювальної функції печінки та вплив інсуліну на обмін вуглеводів, також має особливе значення для диференціації панкреатичної та ренальної глюкозурії.

Суттєве клініко-діагностичне значення має діагностичний тест на кетонів тіла в крові та сечі. Наприклад, кетонурія при ІЗЦД I типу вказує на загрозу кетоацидозу. Відсутність кетонемії або кетонурії під час коматозних станів дозволяє виключити кетоацидозну кому, як причину порушення. Необхідно мати на увазі, що й інші метаболічні стани: голодування, алкогольний кетоацидоз, вживання їжі багаті на жири та гарячка можуть призвести до утворення кетонових сполук та появи кетонурії (кетонемії).

Після побудови кривої оцінити толерантність організму до глюкози. Порахувати коефіцієнт Бодуена.

Контрольні питання до практичної роботи теми 10

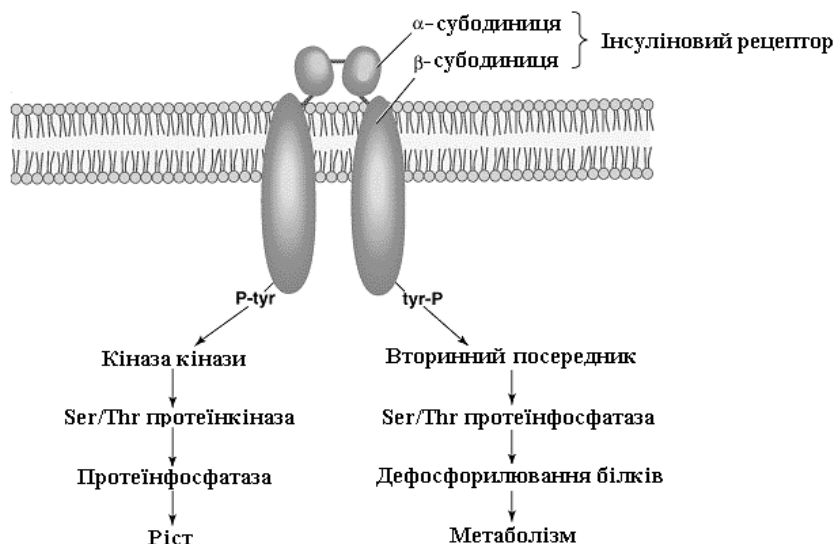
1. Який нормальний вміст глюкози в крові людини при визначення глюкозооксидазним методом?
2. Визначення рівня глюкози в крові є одним з найважливіших біохімічних досліджень для діагностики цукрового діабету. З метою встановлення концентрації цукру в крові користуються глюкозооксидазним методом. Поясніть принцип цього методу.
3. У деяких людей після цукрового навантаження вміст глюкози в крові може зменшуватись нижче вихідного рівня. Поясніть чому?

Інструктивно-методичні матеріали до теми №10

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Біохімічні процеси, що забезпечують сталий рівень глюкози в крові. Роль різних шляхів обміну вуглеводів у регуляції рівня глюкози в крові.
 - 1.1. Представити схему шляхів утворення та використання глюкози в організмі людини; зазначити їх роль у підтриманні сталого рівня глюкози в крові
2. Роль печінки в обміні вуглеводів.
 - 2.1. Вказати в чому полягає вуглеводна функція печінки і завдяки яким метаболічним процесам(що перебігають в печінці) вона реалізується.
3. Ендокринна регуляція обміну вуглеводів:
 - інсулін, будова, механізм дії, роль в обміні вуглеводів;
 - адреналін та глюкагон, механізми їх регулюючої дії на обмін вуглеводів;

- глюкокортикоїди, їх вплив на обмін вуглеводів;
 - соматотропін, особливості впливу на вуглеводний обмін.
- 11.1. Описати будову інсуліну, дати характеристику гормональної активності; перелічити біохімічні механізми впливу на обмін вуглеводів.
- 11.2. Пояснити будову і механізм дії інсулінових рецепторів за схемою.



- 3.2. Дати характеристику гормональної активності адреналіну та глюкагону і описати біохімічні механізми їх впливу на обмін вуглеводів.
- 3.3. Дати гормональну характеристику глюкокортикоїдів та вказати біохімічні механізми їх впливу на обмін вуглеводів.
- 3.4. Дати гормональну характеристику соматотропіну та вказати біохімічні механізми його впливу на обмін вуглеводів.

4. Характеристика гіпер-, гіпоглікемії та глюкозурії.

4.1. Дати визначення словам:

Гіперглікемія - це...

Гіпоглікемія – це...

Глюкозурія – це...

4.2. Описати вищевказані метаболічні стани. Вказати причини гіперглікемії при цукрових діабетах I та II типу. Назвати патології та патологічні стани, при яких може спостерігатися гіперглікемія та гіпоглікемія. Пояснити причини таких змін.

5. Інсулінзалежна та інсуліннезалежна форми цукрового діабету. Біохімічні критерії цукрового діабету.

5.1. Дати визначення інсулінзалежному цукровому діабету та вказати причину його виникнення і характерні для нього клініко-біохімічні прояви.

5.2. Дати визначення інсуліннезалежному цукровому діабету та вказати причину його виникнення і характерні для нього клініко-біохімічні прояви.

5.3. Вказати біохімічні критерії цукрового діабету.

5.4. Пояснити біохімічні основи наведених симптомів цукрового діабету за схемою.



6. Характеристика порушень вуглеводного, ліпідного, білкового обмінів за цукрового діабету.

6.1. Дати характеристику порушень вуглеводного, обміну за цукрового діабету.

6.2. Характеристика порушень ліпідного обміну за цукрового діабету.

6.3. Характеристика порушень білкового обміну за цукрового діабету.

7. Біохімічні тести для оцінки цукрового діабету (цукор в крові та сечі, кетонів тіла в крові та сечі, білок в сечі, глікозильований гемоглобін, С-пептид). Тест на толерантність до глюкози. Представити криву цукрового навантаження, пояснити її особливості для людей з нормальною та порушеною толерантністю до глюкози.

7.1. Дати клінічну характеристику визначення вмісту цукру в крові та сечі у хворого на цукровий діабет.

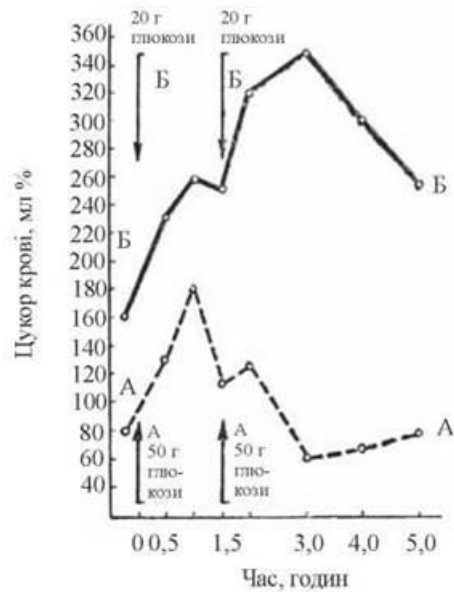
7.2. Дати клінічну характеристику визначення вмісту кетонів тіл в крові та сечі.

7.3. Дати клінічну характеристику визначення вмісту білка в сечі.

7.4. Дати клінічну характеристику визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну в крові.

7.5. Дати клінічну характеристику визначення вмісту С-пептиду в крові.

7.6. Описати тест на толерантність до глюкози та побудову цукрової кривої. Провести порівняльну характеристику цукрових кривих здорової людини та хворої на цукровий діабет.



Пояснити особливості кривих цукрового навантаження у здорової людини та з порушеною толерантністю до глюкози станом на 1-у і 2-у години після навантаження глюкозою.

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 10

1. Під час обстеження хворого виявлено, що концентрація глюкози в крові становить 4,5 ммоль/л. Про що свідчить цей результат?
2. Хворого доставлено в медичний заклад у коматозному стані. Зі слів супровідників вдалося з'ясувати, що хворий знепритомнів під час тренування на завершальному етапі марафонської дистанції. Яку кому діагностовано? Пояснити відповідь
3. Хвора 46 років, скаржиться на сухість в роті, спрагу, часте сечовипускання. При біохімічному дослідженні крові – гіперглікемія. У сечі – глюкоза, кетонів тіла. Пояснить причину змін у хворого на цукровий діабет.
4. До лікаря звернувся хворий із скаргами на постійну спрагу. Виявлена гіперглікемія, поліурія та підвищений вміст 17-кетостероїдів у сечі. Для якого захворювання характерними є такі зміни? Пояснить відповідь.
5. У крові пацієнта вміст глюкози натщесерце був 5,65 ммоль/л. Через 1 год. після цукрового навантаження становив 8,55 ммоль/л, а через 2 години – 4,95 ммоль/л. Як оцінити отримані результати?

Ситуаційна клінічна задача до теми 10

1. Жінка 50-ти років скаржиться у своїй поліклініці на надмірну спрагу, споживання рідини та сечовипускання. Вона заперечує будь які симптоми інфекції сечовидільних шляхів. На огляді: жінка з ожирінням, не має гострих стресів. В іншому фізичний вигляд нормальний. Аналіз сечі: великий вміст глюкози сироватки: 18 ммоль/л (324 мг/дл).

- Який найімовірніший діагноз?
- Які ще органи органів можуть бути причетні до захворювання?
- Яка біохімічна основа цього захворювання?

Посилання на відео:

1. <https://www.youtube.com/watch?v=OYH1deu7-4E>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=XfyGv-xwjII>
3. <https://www.youtube.com/watch?v=jxbbBmbvu7I>
4. <https://www.youtube.com/watch?v=OXAc3eOjqCk>

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Використання глюкози відбувається шляхом її транспорту з екстрацелюлярного простору через плазматичну мембрану в середину клітини. Цей процес стимулюється гормоном:	A*Інсуліном B Глюкагоном C Тироксином D Альдостероном E Адреналіном	
2	Хвора з цукровим діабетом в анамнезі, госпіталізована до клініки в прекоматозному стані кетоацидотичного типу. Збільшення вмісту якого метаболіту призвело до цього?	A.*Ацетоацетату B.α-кетоглутарату C.Цитрату D.Малонату E.Аспартату	
3	5. При цукровому діабеті збільшується вміст кетонових тіл у крові, що призводить до метаболічного ацидозу. З якої речовини синтезуються кетоніві тіла?	A*Ацетил-КоА B Сукциніл-КоА C Пропіоніл-КоА D Малоніл-КоА E Метилмалоніл-КоА	
4	У хворого цукровим діабетом після ін'єкції інсуліну наступила втрата свідомості, судоми. Яким може бути результат біохімічного аналізу крові на вміст цукру?	A*1,5 ммоль/л B 8,0 ммоль/л C 10,0 ммоль/л D 3,3 ммоль/л E 5,5 ммоль/л	
5	При обстеженні жінки, що хвора на цукровий діабет 1-го типу, виявлено порушення білкового обміну, що при біохімічному	*A.Підвищення протеолізу B. Гіперпротеїнемія C.Зменшення концентрації амінокислот у крові	

	дослідженні проявляється аміноацидемією, а клінічно уповільненням загоєння ран і зменшенням біосинтезу антитіл. Який з перерахованих механізмів викликає розвиток ацидемії?	D.Підвищення онкотичного тиску в плазмі крові E.Збільшення вмісту ліпопротеїдів високої щільності	
--	---	--	--

Індивідуальна самостійна робота студентів

- 1.Методи діагностики та принципи біохімічної корекції цукрового діабету.
2. Біохімічні основи сучасних методів лікування цукрового діабету.

Література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-те вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ПІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Шашкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполит, 2019. – 148 с.

5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Tamminen ER, Kraeva N, Figueroa L, Manno C, Ibarra CA, Klip A, Riazi S, Rios E. Intracellular calcium leak lowers glucose storage in human muscle, promoting hyperglycemia and diabetes. *Elife*. 2020 May 4;9:e53999. doi: 10.7554/eLife.53999. PMID: 32364497; PMCID: PMC7282812.
2. Mohebbi H, Campbell IT, Keegan MA, Malone JJ, Hulton AT, MacLaren DPM. Hyperinsulinaemia and hyperglycaemia promote glucose utilization and storage during low- and high-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2020 Jan;120(1):127-135. doi: 10.1007/s00421-019-04257-9. Epub 2019 Nov 9. PMID: 31707476; PMCID: PMC6969862
3. Associations of Moderate Low-Carbohydrate Diets With Mortality Among Patients With Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study
4. Zhenzhen Wan, Zhilei Shan, Tingting Geng, Qi Lu, Lin Li, Jiawei Yin, Liegang Liu, An Pan, Gang Liu *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 107, Issue 7, July 2022, Pages e2702–e2709, <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac235>
5. Computational Analysis of Plant-Derived Terpenes as α -glucosidase Inhibitors for the Discovery of Therapeutic Agents against Type 2 Diabetes Mellitus panel Mohibullah Shah^{1†} Sidra Bashir^{1†} Samavia Jaan¹ Haq Nawaz¹ Umar Nishan² Sumra Wajid Abbasi³ Syed Babar Jamal³ Asifullah Khan⁴ Sahib Gul Afridi⁴ Anwar Iqbal⁵ South Afr *Journal of Botany* Volume 143, December 2021, Pages 462-473

РОЗДІЛ 4. МЕТАБОЛІЗМ ЛІПІДІВ В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ. РЕГУЛЯЦІЯ ОБМІНУ ЛІПІДІВ

Тема № 11. Особливості травлення ліпідів. Дослідження катаболізму і біосинтезу триацилгліцеролів та фосфоліпідів. Внутрішньоклітинний ліполіз та молекулярні механізми його регуляції.

Мета заняття: Вивчити процеси біосинтезу фосфоліпідів і триацилгліцеролів та основні шляхи внутрішньоклітинного метаболізму ліпідів. Вміти визначити вміст фосфоліпідів, активність ліпази та оцінити отримані показники.

Актуальність теми: Знання основних шляхів внутрішньоклітинного метаболізму ліпідів за умов нормального функціонування людського організму та впливу патологічних факторів необхідно студентам медичних ВУЗів для подальшого вивчення патфізіології, фармакології та інших предметів, а також для майбутньої професійної діяльності.

Компетентності фахові:

- трактувати біохімічні функції простих і складних ліпідів в організмі: участь в побудові та функціонуванні біологічних мембран клітин,

запасна, енергетична функції, використання в якості попередників в біосинтезі біологічно активних сполук ліпідної природи;

- пояснювати основні шляхи внутрішньоклітинного метаболізму ліпідів;
- пояснювати ферментативні реакції катаболізму та біосинтезу триацилгліцеролів;
- трактувати ферментативні реакції синтезу фосфоліпідів та сфінголіпідів;
- аналізувати основні шляхи метаболізму ліпідів в умовах нормального функціонування людського організму та при патології;
- пояснювати гормональну регуляцію обміну ліпідів.

Базові знання

Дисципліна: біоорганічна та біологічна хімія.

Отримані навички: вміти писати структурні формули простих і складних ліпідів, реакції синтезу та катаболізму триацилгліцеролів, схему реакцій метаболізму сфінголіпідів.

Теоретичні питання

1. Біологічні функції простих і складних ліпідів в організмі людини (запасна, енергетична, участь в терморегуляції, біосинтетична).
2. Біохімічні механізми процесів травлення ліпідів у травному тракті. Специфічність ензимів травлення, оптимальні умови їх дії. Значення жовчних кислот в процесах травлення. Всмоктування продуктів травлення ліпідів. Особливості травлення ліпідів у немовлят та дорослих людей.
3. Порушення процесів травлення та всмоктування ліпідів. Стеаторея, її види та діагностика.
4. Участь ліпідів у побудові та функціонуванні біологічних мембран клітин. Рідинно-мозаїчна модель біомембран. Ліпосоми. Використання ліпосом у медицині.
5. Адипоцити жирової тканини та їх роль в обміні ліпідів і біоенергетичних процесах в організмі.
6. Катаболізм триацилгліцеролів: характеристика внутрішньоклітинного ліполізу, його біологічне значення; ферментативні реакції; механізми регуляції активності триацилгліцеролліпази; нейрогуморальна регуляція ліполізу за участю адреналіну, норадреналіну, глюкагону, інсуліну; енергетика окиснення триацилгліцеролів.
7. Біосинтез триацилгліцеролів та фосфоліпідів, значення фосфатидної кислоти.
8. Метаболізм сфінголіпідів. Генетичні аномалії обміну сфінголіпідів – сфінголіпідози. Лізосомальні хвороби.

Практична робота

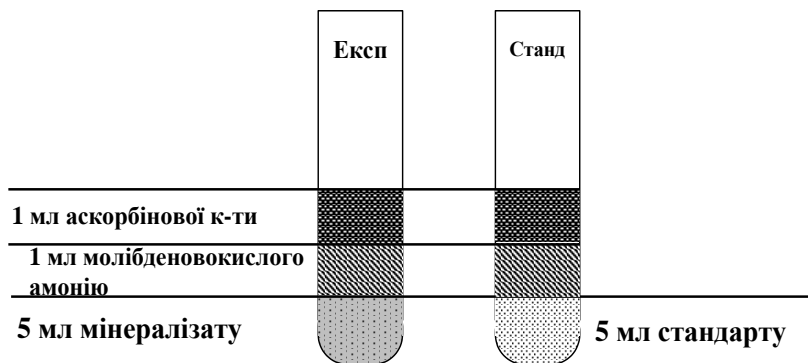
Дослід 1. Кількісне визначення фосфоліпідів у сироватці крові.

Принцип методу. Фосфоліпіди осаджуються трихлорацетатною кислотою (ТХАК) разом з білками крові. У осаді після мінералізації визначають вміст фосфору.

Матеріальне забезпечення: сироватка крові, 10 % розчин ТХАК, 56 % розчин хлорної кислоти, розчин амонію молібденовокислого, 1% розчин аскорбінової кислоти, стандартний розчин $\text{KН}_2\text{PО}_4$ (0,05 мг в 1 мл), центрифужні пробірки, центрифуга, водяна баня, фотоелектроколориметр (ФЕК), піпетки, пробірки, мікропіпетки.

Хід роботи. У центрифужну пробірку наливають 0,2 мл сироватки крові, 2 мл дистильованої води. Додають 3 мл 10 % розчину ТХАК і через 1-2 хв центрифугують протягом 5 хв при 2000-3000 об/хв. Надосадову рідину зливають, не струшуючи пробірку. До осаду, що містить ліпопротеїни, додають 1 мл 56 % розчину HClO_4 і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 20-30 хв (до знебарвлення розчину).

Після закінчення мінералізації у пробірку до осаду наливають 5 мл води (5 мл розчину мінералізатору), 1 мл молібденовокислого амонію та 1 мл 1 % розчину аскорбінової кислоти і перемішують. Одночасно реакцію проводять зі стандартним розчином фосфору. До 5 мл стандартного розчину (0,05 мг/мл) додають 1 мл амонію молібденовокислого та 1 мл 1 % розчину аскорбінової кислоти і перемішують. Через 15-20 хв розчини колориметрують на ФЕКу, використовуючи червоний світлофільтр і кювети на 10 мм проти води.



Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{Загальні ліпіди сироватки} = \frac{\text{Ад} \times 0,05}{\text{Аст} \times 0,2} \times 25 \text{ мг/мл або г/л}$$

Ад – оптична густина дослідної проби;

Аст – оптична густина стандартного розчину;

0,05 – вміст фосфору в стандартному розчині (мг/мл);

0,2 – об'єм взятої для дослідження сироватки;

25 – перерахунок на загальні фосфоліпіди.

Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. Вміст загальних фосфоліпідів у сироватці крові 1,5-3,6 г/л, а лецитину – 0,75-1,2 г/л. Загальну концентрацію фосфоліпідів визначають за вмістом ліпідного фосфору, на долю якого

припадає 4 % відносно молярної маси фосфоліпідів (0,1-0,15 г/л). Важливим показником є індекс фосфоліпід/холестерол, який за фізіологічних умов становить 1–1,5. Цей індекс знижується при атеросклерозі, гіпертонічній хворобі, хворобах печінки.

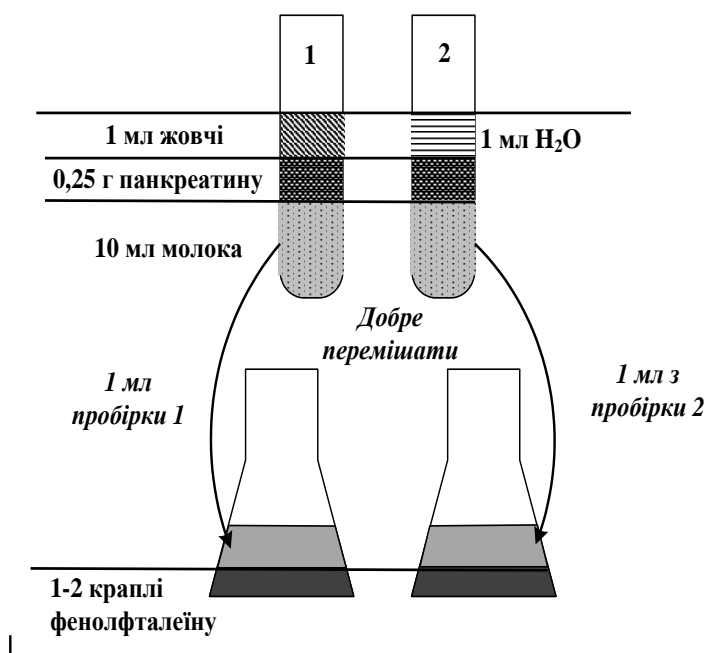
Визначення вмісту ліпідів у крові має важливе діагностичне значення. Підвищення рівня фосфоліпідів у сироватці крові (гіперфосфоліпідемія) спостерігається при важкій формі цукрового діабету (у 2-2,5 разів), нефрозах, застійній жовтяниці та ін. Зниження рівня фосфоліпідів (гіпофосфоліпідемія) спостерігається при атеросклерозі, малокрів'ї, гарячкових станах, аліментарній дистрофії, захворюваннях печінки. Недостатнє надходження з їжею ліпотропних факторів (холіну, етаноламіну, метіоніну, інозиту) або недостатнє їх ендогенне утворення призводить до гальмування синтезу фосфоліпідів і до жирової інфільтрації печінки.

Дослід 2. Вплив жовчі на активність панкреатичної ліпази.

Принцип методу. Активність ліпази оцінюють за утворенням у результаті гідролізу жиру жирних кислот, кількість яких визначають титруванням лугом у присутності фенолфталеїну. Гідроліз жирів найзручніше спостерігати на прикладі витяжки з підшлункової залози (джерело ліпази) і молока як субстрату, жир якого знаходиться в емульгованому стані і швидко розщеплюється на гліцерин і жирні кислоти. Якщо в пробу долити жовч, то ліпаза активується і гідроліз жиру протікає швидше.

Матеріальне забезпечення: панкреатин, молоко кип'ячене і попередньо розведене 1:1, жовч, 0,5 % спиртовий розчин фенолфталеїну, 0,05 н NaOH, водяна баня або термостат, мікробюретки, піпетки.

Хід роботи. У дві пробірки або колбочки наливають по 5 мл молока та по 0,25 г панкреатину. В одну пробірку доливають 1 мл води, а в другу – 1 мл жовчі. Вміст пробірок добре перемішують. З кожної пробірки відбирають по 1 мл суміші в інші пробірки, додають 1-2 краплі 0,5 % розчину фенолфталеїну і відразу ж титрують 0,05 н розчином натрію гідроксиду до появи слаборожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 секунд. Потім ці пробірки із залишком суміші вміщують у водяну баню або термостат при 37



Титрувати 0,05 N NaOH до появи слаборожевого забарвлення, що не зникає впродовж 30 секунд

С. Через кожні 10-15 хв з них відбирають по 1 мл суміші і проводять титрування, як і попереднього разу. Роблять 4-5 таких визначень. Результати виражають в мл розчину лугу, який затрачається на титрування.

Отримані дані вносять в таблицю і будують криву, відкладаючи по осі абсцис час у хв, а по осі ординат – кількість NaOH в мл, який пішов на титрування.

Умови дослідження	0 хв	15 хв	30 хв	45 хв	60 хв
	Кількість NaOH, мл				
Ліпаза, активована жовчю					
Ліпаза без жовчі					

Клініко-діагностичне значення. Перетравлювання ліпідів відбувається у дорослих людей в кишці, в першу чергу, під дією активної панкреатичної ліпази. Шлункова ліпаза є активною лише у немовлят і діє тільки на емульговані ліпіди молока. Для повноцінного травлення в дорослих організмах ліпіди повинні бути емульгованими. Головними емульгаторами ліпідів в людському організмі є компоненти жовчі. Жовчні кислоти окрім емульгаційної функції, виконують також функцію активатора панкреатичної ліпази. Так як панкреатична ліпаза є основним ензимом для перетравлення ліпідів, зміни її активності викликають порушення певних ланок ліпідного обміну. Дефіцит панкреатичної ліпази викликає панкреатогенну стеаторею, яку спостерігають при хронічному панкреатиті, спадковій гіпоплазії pancreas, спадковому чи набутому дефіциті панкреатичної ліпази, а також при муковісцидозі. Порушення синтезу та секреції жовчі супроводжується зниженням вмісту жовчних пігментів у калі (знебарвлений кал) та значним зростанням нерозщеплених жирів калу. Порушення емульгування, травлення і всмоктування ліпідів та жиророзчинних вітамінів спостерігаються при захворюваннях печінки, жовчного міхура або жовчних шляхів (жовчокам'яна хвороба).

Контрольні питання до практичної роботи теми 11

1. Вивчення активності ліпази підшлункової залози. Які сполуки в організмі активують ліпазу?
2. У чому полягає принцип методу визначення фосфоліпідів у сироватці крові? Вказати вміст загальних фосфоліпідів за умов норми.

3. При лабораторному обстеженні у хворого виявили стеаторею. Вкажіть фермент, недостатність дії якого призвела до виникнення цього симптому?
4. Людина тривалий час обмежує вживання продуктів, що містять фосфоліпіди. До яких метаболічних порушень це може призвести?
5. Концентрація фосфоліпідів у крові становить 0,7 г/л. Як називається такий стан і про які метаболічні порушення свідчить?

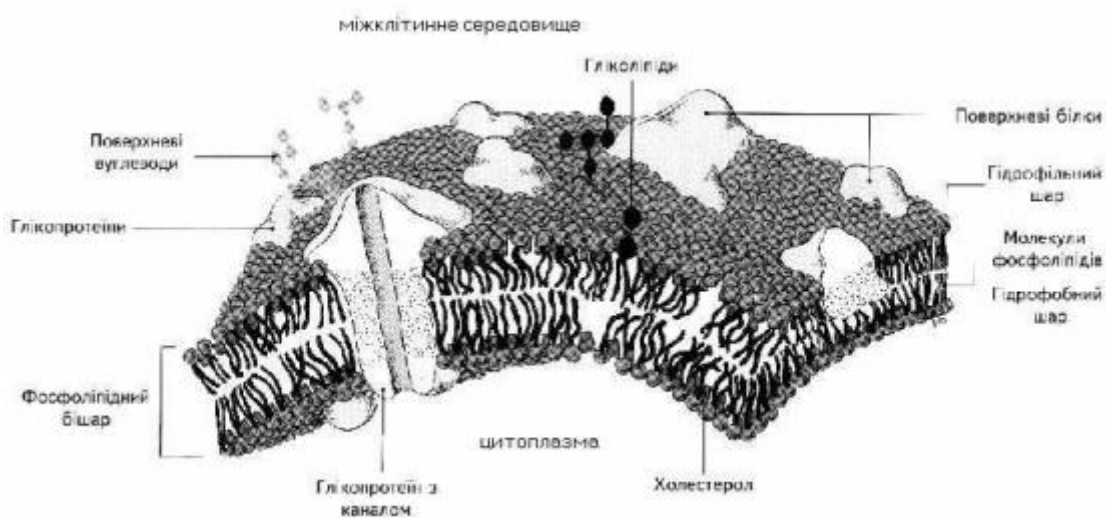
Інструктивно-методичні матеріали до теми №11

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

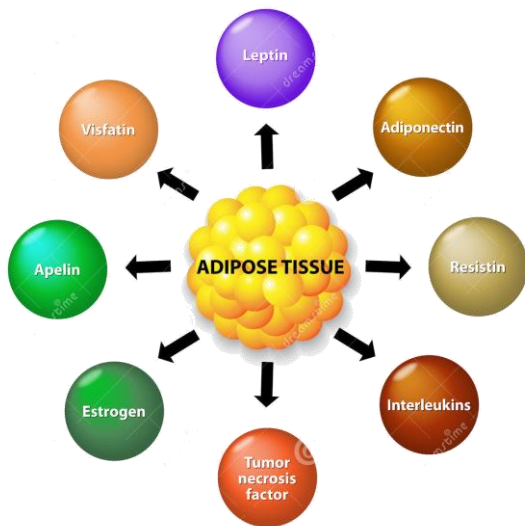
1. Біологічні функції простих і складних ліпідів в організмі людини (запасна, енергетична, участь в терморегуляції, біосинтетична).
 - 1.1. Представити класифікацію ліпідів.
 - 1.2. Перечислити основні функції ліпідів.
2. Біохімічні механізми процесів травлення ліпідів у травному тракті. Специфічність ензимів травлення, оптимальні умови їх дії. Значення процесів емульгування.
 - 2.1. Навести ферменти травлення ліпідів, оптимум дії цих ферментів у шлунку та кишці.
 - 2.2. Заповнити таблицю

Ліполітичні ферменти	Місце дії	Реакція, яку каталізують	Особливості Функціонування (рН оптимум, активатори, інгібітори)
Лінгвальна ліпаза			
Шлункова ліпаза			
Панкреатична ліпаза			
Панкреатична коліпаза			
Панкреатична фосфоліпаза A ₂			
Кишкова ліпаза			
Кишкова фосфоліпаза A ₁			
Кишкова фосфоліпаза C			
Кишкова фосфоліпаза D			
Холестеролестераза			

- 2.3. Дати визначення поняття емульгування жирів, класифікацію та будову жовчних кислот.
3. Участь ліпідів у побудові та функціонуванні біологічних мембран клітин. Рідинно-мозаїчна модель біомембран. Ліпосоми, їх використання в медицині.
- 3.1. Описати молекулярні компоненти біомембран.
- 3.2. Описати молекулярну організацію біомембран:
- міцели
 - мономолекулярні шари
 - біномолекулярні шари
- 3.3. Пояснити моделі будови біомембран: за Даніелі-Даусоном, Стейном-Даніелі та рідинно-мозаїчна модель Сінгер-Ніколсона.



- 3.4. Описати біофізичні властивості мембран:
- плинність та в'язкість ліпідної фази
 - рухомість окремих компонентів
 - асиметрія мембранної структури
4. Адипоцити жирової тканини та їх роль в обміні ліпідів і біоенергетичних процесах в організмі.
- 4.1. Описати роль адипоцитів в обміні ліпідів.
- 4.2. Пояснити значення жирової ткнини як ендокринного органу.



4.3. Описати етапи циркуляторного транспорту і депонування ліпідів у жировій тканині:

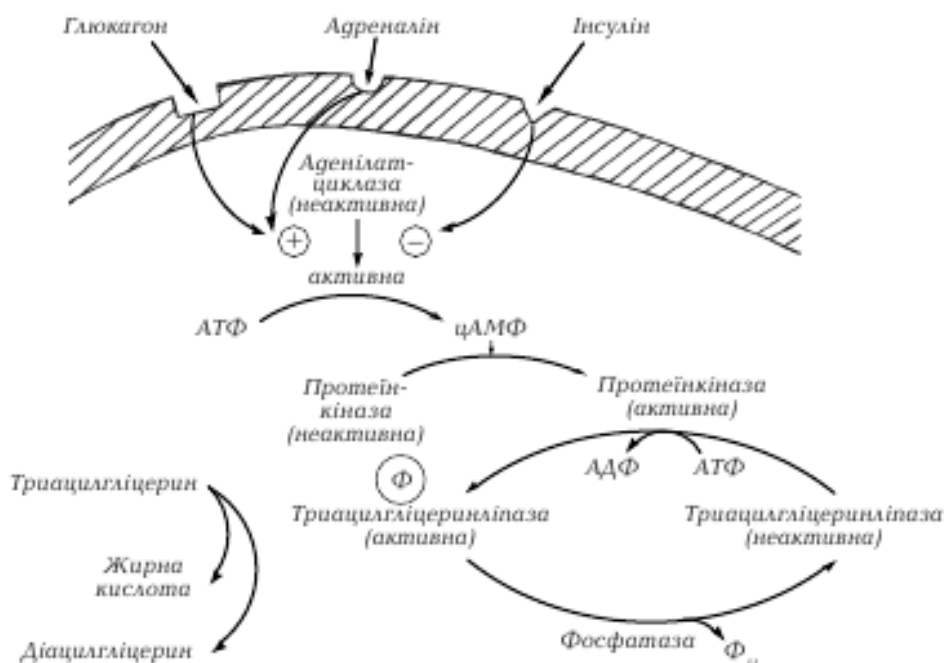
- розщеплення ліпідів у травному тракті
- всмоктування продуктів гідролізу ентероцитами
- реетерифікація ВЖК з утворенням триацилгліцеролів
- формування хіломікронів
- гідроліз нейтральних жирів ліпопротеїнліпазою ендотелію
- депонування ліпідів у жировій тканині.

5. Катаболізм триацилгліцеролів: характеристика внутрішньоклітинного ліполізу, його біологічне значення; ферментативні реакції; механізми регуляції активності триацилгліцеролліпази; нейрогуморальна регуляція ліполізу за участю адреналіну, норадреналіну, глюкагону, інсуліну; енергетика окиснення триацилгліцеролів.

5.1. Написати послідовність реакцій катаболізму триацилгліцеролів, вказати ензими, що каналізують реакції катаболізму.

5.2. Вказати регуляторний фермент та молекулярну основу регуляції його активності. Намалювати схему каскадної регуляції активності тригліцеридліпази адипоцитів.

5.3. Пояснити відмінність механізмів та біологічних ефектів глюкагону, адреналіну та інсуліну на процеси ліполізу і ліпогенезу.



5.3. Описати гормональні механізми регуляції ліполізу за участю:

- адреналіну, норадреналіну, глюкагону
- інсуліну
- соматотропіну.

5.4. Порахувати енергетичний ефект окиснення тристеарилгліцеролу

6. Біосинтез триацилгліцеролів і фосфоліпідів, значення фосфатидної кислоти.

6.1. Написати ферментативні реакції біосинтезу триацилгліцеролів.

Вказати особливості біосинтезу триацилгліцеролів в адипоцитах.

6.2. Написати ферментативні реакції біосинтезу фосфогліцеринів.

6.3. Намалювати схемою метаболічну карту шляхів синтезу триацилгліцеролів і фосфогліцеринів.

7. Метаболізм сфінголіпідів. Генетичні аномалії обміну сфінголіпідів – сфінголіпідози. Лізосомальні хвороби.

7.1. Представити схему біосинтезу сфінголіпідів.

7.2. Представити схему катаболізму сфінголіпідів.

1.3. Описати причини і прояви генетичних аномалій обміну сфінголіпідів.

1.4. Заповнити таблицю.

Сфінголіпідози	Порушення синтезу фермента	Біохімічні зміни, речовини, що накопичуються	Клінічні симптоми
Хвороба Німана-Піка			
Хвороба Тея-Сакса або гангліозидоз G_{M2}			
Хвороба Сандхоффа			

Хвороба Гоше або глюкоцереброзидний ліпідоз			
Хвороба Краббе			
Лейкодистрофія метахроматична			
Хвороба Фабрі			
Гангліозидоз G _{M1} або генералізований гангліозидоз			

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 11

1. Людина тривалий час обмежує вживання продуктів, які містять фосфоліпиди. До яких метаболічних порушень це може призвести?
2. Концентрація фосфоліпідів у сироватці крові становить 0,7 г/л. Які метаболічні порушення можуть при цьому спостерігатись?
3. Чому тригліцериди є більш ефективним запасом енергії, ніж глікоген?
4. Людина звикла споживати багато солодоців. Як це впливає на обмін ліпідів?
5. Людина вилучила зі своєї дієти вуглеводи. Як це вплинуло на обмін ліпідів?

Ситуаційні клінічні задачі до теми 11

1. Єврейська пара, які етнічно походили із території Східної Європи звернулася у клініку з метою пренатальної консультації після випадку зі смертю їхньої дитини у ранньому віці. Вони повідомили, що члени їхньої родини страждають від спадкового генетичного захворювання. Їх новонароджена дитина була нормального розміру із дещо більшою окружністю голови, діагностована червона пляма на сітківці ока та важке прогресуюче неврологічне захворювання із порушенням моторних функцій та подальша смерть. Аутопсія підтвердила хворобу Тей-Сакса.

- Для якого генетичного захворювання характерна дана клінічна картина?
- Порушення якого біохімічного процесу лежить в основі даної хвороби?

2. 9-річного хлопця батьками до ставлено до відділення швидкої допомоги після 2-х днів болю в животі з нудотою та блювотою. Біль у животі локалізувався в епігастральній ділянці, що іррадіював у спину. У минулому у хлопчика відзначались подібні симптоми, але жоден не такий сильний. Його батьки не спостерігали лихоманки та диспептичних явищ. У відділенні швидкої допомоги пацієнт афебрильний зі збільшеною печінкою, селезінкою. На спині та сідницях хлопчика спостерігається наявність жовто-білих папул. Показники лабораторних досліджень наступні: підвищений рівень амілази та ліпази.

Лабораторні дослідження, проведені після госпіталізації, виявили підвищений рівень тригліцеридів та знижену активність ліпопротеїналіпази.

- Яка етіологія виникнення болу в животі у хлопчика?
- Який ймовірний біохімічний процес лежить в основі даної патології?
- Яка роль ліпопротеїналіпази у розвитку даного захворювання?

Посилання на відео:

1. <https://study.com/academy/lesson/lipogenesis-process-function.html>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=BVxeeiR7JB0>

Приклад вирішення клінічної задачі

Умова	Розв'язок
<p>Немовля, народжене на 29 тижні гестації має утруднене дихання, що виникло невдовзі після пологів. Мати новонародженого не отримувала медичної опіки під час вагітності. Фізикальне обстеження виявляє тахіпноє, міжреберні ретракції, розширення ніздрів під час дихання, ціаноз. Рентгенологічне дослідження виявило, що легені мають дифузний землистий вигляд. Дитину заінтубовано і розпочато терапію киснем. Який показник найімовірніше знижений в цього малюка порівняно з доношеними дітьми.</p>	<p>Відповідь: Фосфатидилхолін (ФХ)</p> <p>У недоношеної дитини утруднене дихання свідчить про використання допоміжних дихальних м'язів. Рентгенографія демонструє, що легені м'яють дифузний землистий вигляд. Ці дані свідчать про діагноз респіраторний дистрес-синдром (РДС) новонароджених. РДС новонароджених зумовлений низьким рівнем сурфактанту – природного колоїду, що знижує поверхневий натяг в альвеолах і полегшує дихання дітей.</p> <p>Легеневий сурфактант складається з фосфоліпідів (85%), білків (10%) і нейтральних жирів (5%). Близько 75% фосфоліпідів сурфактанта становить фосфатидилхолін (лецитин), тобто він є основним компонентом легеневого сурфактанта. Співвідношення ФХ : сфінгомієлін в амніотичній рідині є маркером зрілості легенів плода. Швидкість утворення сфінгомієліну є практично стабільною під час вагітності, а ФХ – змінюється в залежності від кількості сурфактанта, що виробляється пневмоцитами типу II на 36 тижні вагітності. Низький рівень ФХ вказує на незрілість легень. Сурфактант, що продукується пневмоцитами типу II, вистилає альвеоли. Знижуючи поверхневий натяг, сурфактант запобігає руйнуванню (злипання) альвеол. Оскільки недоношені діти можуть мати дефіцит сурфактанта, в них високий ризик для РДС новонароджених.</p>

--	--

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	В отруті змій міститься речовина, яка при потраплянні в організм людини викликає гемоліз еритроцитів. При аналізі крові, було виявлено велику кількість лізолецитину. Вкажіть, який фермент призводить до нагромадження у крові лізолецитину:	А. *Фосфоліпаза А ₂ В. Фосфоліпаза А ₁ С. Фосфоліпаза С D. Фосфоліпаза D E. Нейрамінідаза	
2	У хворого плазма крові має молочний колір через високий вміст хіломікронів. При цьому спостерігається порушення розщеплення триацилгліцеролів. Дефект активності якого фермента спостерігається у пацієнта?	А. *Ліпопротеїнліпази В. Амілази С. Трипсину D. Холестеролестерази E. Лактази	
3	Ацетилсаліцилову кислоту використовують при лікуванні ревматизму. На який процес впливає ацетилсаліцилова кислота?	А. *Синтез простагландинів В. Розпад глюкози С. Синтез глікогену D. Синтез амінокислот E. Розпад жирів	
4	Препарат “Лінетол” використовується у медичній практиці для корекції ліпідного обміну. Яка незамінна жирна кислота (поліненасичена) входить до його складу?	А. *Лінолева В. Пальмітинова С. Масляна D. Стеаринова E. Капронова	
5	Для стимуляції пологової діяльності породіллі лікар призначив простагландин E ₂ . З якої сполуки синтезуються простагландини?	А *Арахідонової кислоти В Фосфатидної кислоти З Пальмітинової кислоти D Стеаринової кислоти E Глютамінової кислоти	

1. Метаболізм сфінголіпідів в нормі та при патології; клінічне значення, порушення обміну сфінголіпідів.
2. Біологічні функції поліненасичених жирних кислот, джерела та їх застосування у клінічній практиці.

Рекомендована література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірна, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Гула Н.М. Жирні кислоти та їх похідні при патологічних станах: [монографія] / Н.М. Гула, В.М. Маргітич. - К.: Наукова думка, 2009. - 336 с.

2. Ковальчук І. М. Зміни жирнокислотного складу загальних ліпідів тканин печінки і міокарда щурів за умов попереднього застосування донора сірководню під впливом малих доз іонізуючого випромінювання [Електронний ресурс] / І. М. Ковальчук, М. Р. Гжегоцький, С. М. Ковальчук // Експериментальна і клінічна медицина. - 2018. - № 2-3. - С. 5-15. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/eikm_2018_2-3_3
3. Пиршев К. О. Особливості структурної організації ліпідів плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.04 / Пиршев Кирило Олександрович ; НАН України, Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна. - Київ, 2019. - 25 с.
4. Строй О. А. Показники ліпідного обміну у дітей та їх взаємозв'язок із забезпеченістю вітаміном D [Електронний ресурс] / О. А. Строй, Л. В. Сліпачук // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. - 2020. - № 2. - С. 178-182. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zkem_2020_2_30
5. Alkaade S. A primer on exocrine pancreatic insufficiency, fat malabsorption, and fatty acid abnormalities / S. Alkaade, A.A. Vareedayah / The American journal of managed care. – 2017. – Vol. 23, Suppl. 12. – P. S203.
6. Venuti E. Bile salt stimulated lipase: Inhibition by phospholipids and relief by phospholipase A₂ / E. Venuti, D. Shishmarev, P.W. Kuchel et al. / Journal of Cystic Fibrosis. – 2017. – P. 1-4.
7. Сибірня Н.О. Основи глікобіології: [монографія] / Н.О. Сибірня, А.І. Шевцова, Г.О. Ушакова, І.В. Бродяк, І.М. Пісменецька; за ред. проф. Н.О. Сибірної // – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2015. – 492 с.

Тема № 12. β-Окиснення та біосинтез жирних кислот. Дослідження обміну жирних кислот та кетонових тіл.

Мета заняття: Вивчити процеси біосинтезу та окиснення жирних кислот. Знати метаболізм кетонових тіл в нормі та при патології і вміти визначати їх вміст у сечі.

Актуальність теми: Окиснення ліпідів та метаболізм кетонових тіл є важливою складовою метаболізму, що забезпечує організм людини резервами метаболічного палива у вигляді енергії АТФ. Визначення вмісту кетонових тіл в крові та сечі має важливе значення для діагностики ряду патологічних процесів.

Компетентності фахові:

- вміти трактувати β-окиснення вищих жирних кислот;
- вміти трактувати біосинтез вищих жирних кислот та регуляцію процесу біосинтезу на рівні ацетил-КоА-карбоксилази та на рівні синтетази жирних кислот;
- вміти аналізувати метаболізм кетонових тіл;
- вміти пояснювати механізми надмірного зростання вмісту кетонових тіл при цукровому діабеті та голодуванні;
- знати принцип якісної реакції на ацетон та ацетоацетатну кислоту (проба Ланге, проба Герхарда) та вміти інтерпретувати отримані дані;
- знати принцип методу визначення кількості кетонових тіл в сечі та вміти інтерпретувати отримані результати.

Базові знання

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія

Отримані навички: вміти писати структурні формули жирних кислот і кетонів, послідовність реакцій біосинтезу та окиснення жирних кислот, синтезу і утилізації кетонів.

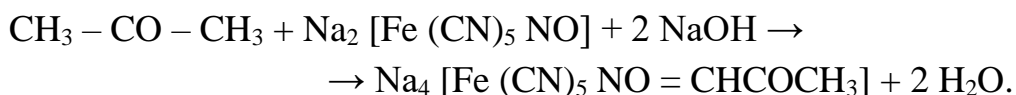
Теоретичні питання

1. β -Окиснення вищих жирних кислот (ВЖК):
 - локалізація процесу β -окиснення жирних кислот;
 - активація жирних кислот. Роль карнітину в транспорті жирних кислот в мітохондрії;
 - послідовність ферментативних реакцій β -окиснення жирних кислот;
 - енергетика бета-окиснення жирних кислот.
2. Механізм окиснення гліцеролу, енергетика цього процесу.
3. Біосинтез вищих жирних кислот:
 - локалізація біосинтезу вищих жирних кислот;
 - метаболічні джерела синтезу жирних кислот;
 - стадії синтезу насичених жирних кислот;
 - характеристика синтетази ВЖК, значення ацилтранспортуючого білка, біотину;
 - джерела НАДФН + H^+ , необхідного для біосинтезу жирних кислот;
 - послідовність ферментативних реакцій біосинтезу вищих жирних кислот;
 - регуляція процесу біосинтезу на рівні ацетил-КоА-карбоксилази та на рівні синтетази жирних кислот;
 - елонгація насичених жирних кислот;
 - утворення ненасичених жирних кислот.
4. Метаболізм кетонів:
 - ферментативні реакції біосинтезу кетонів;
 - реакції утилізації кетонів, енергетичне значення;
 - метаболізм кетонів в умовах патології. Механізми надмірного зростання вмісту кетонів при цукровому діабеті та голодуванні;
 - поняття – кетоацидоз, кетонемія, кетонурія.

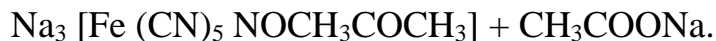
Практична робота

Дослід 1. Якісна реакція на ацетон (проба Ланге).

Принцип методу. Ацетон з натрію нітропрусидом у лужному середовищі утворюють продукти реакції, забарвлені у червоний колір:



Під дією концентрованої ацетатної кислоти утворюється продукт вишнево-червоного кольору:



Ацетоацетатна кислота (в енольній формі) здатна утворювати з ферумом хлориду (III) комплексну сполуку вишнево-червоного кольору (Проба Герхарда).

Матеріальне забезпечення: сеча хворого на цукровий діабет та сеча здорової людини, 10 % розчин натрію нітропрусиду (свіжоприготований), крижана ацетатна кислота, 10 % розчин NaOH, 50 % розчин амонію сульфату, концентрований розчин аміаку, 10 % розчин феруму хлориду (III), піпетки, пробірки, лійка, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

Беруть 2 пробірки. Наливають по 0,5 мл досліджуваної сечі: у першу пробірку - здорової людини, у другу – хворого на цукровий діабет з кетонурією. В обидві додають по 0,5 мл розчину натрію гідроксиду і 5-7 крапель натрію нітропрусиду. Спостерігають за появою червоного забарвлення в другій пробірці, що приймає вишневий відтінок після додавання декількох крапель концентрованої ацетатної кислоти.

Дослід 2. Кількісне визначення кетонових тіл у сечі.

Принцип методу. Див. попередній дослід пробу Ланге.

Матеріальне забезпечення: див. попередній дослід пробу Ланге.

Хід роботи. Беруть 5 пробірок. У всі, крім першої, наливають по 1мл дистильованої води. У першу та другу пробірки додають по 1 мл сечі хворого на цукровий діабет. Таким чином, у першій пробірці сеча не розведена, а в другій розведена у двічі. Після перемішування з другої пробірки відбирають 1 мл суміші і переносять у третю пробірку, з третьої в четверту і т. д. З останньої пробірки 1 мл виливають для вирівнювання об'єму з іншими пробірками. Таким чином, сеча розводиться у 2, 4, 8 (і т. д.) разів.

Потім у кожен пробірку додають по 8 крапель 50 % розчину амонію сульфату для збільшення густини розчинів по 8 крапель ацетатної кислоти (концентрованої) та натрію нітропрусиду. Вміст пробірок перемішують і у кожен з них обережно по стінках, починаючи з останньої пробірки, нашаровують приблизно по 1 мл концентрованого аміаку (реактив відбирати обережно лише за допомогою гумової груші, працюючи з ним під витяжною шафою). Спостерігаючи за пробірками, позначають ту з них, у якій при максимальному розведенні сечі впродовж 3-4 хв ще помітне фіолетове кільце на межі рідин. Звернути увагу, що для успішного проведення дослідження аміак необхідно нашаровувати обережно, по стінках. Акцентувати увагу на час отримання фіолетового кільця.

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = 0,85 \times A \times 15,$$

де X – концентрація ацетону в сечі, мг/добу;

0,85 – емпіричне число;

A – розведення сечі;

15 – перерахунок на добову сечу 1500 мл.

Після проведення розрахунків зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. У здорової людини в крові вміст кетонів – 34–430 мкмоль/л, за добу з сечею виділяється 20–54 мг. Це переважно ацетоацетатна і β -оксималяна кислоти. Різка зростання концентрації кетонів супроводжується порушенням кислотно-основного стану і розвитком метаболічного кетоацидозу, що є небезпечним, в першу чергу, для нормального функціонування клітин головного мозку.

Підвищення концентрації кетонів у крові (кетонемія) і появу їх у сечі (кетонурія) спостерігають при цукровому діабеті, тиреотоксикозі, ураженні печінки, важких інтоксикаціях, голодуванні. Зниження концентрації кетонів тіл не має клінічного значення.

Контрольні питання до практичної роботи теми 12

1. Пояснити принцип методу виявлення ацетону (кетонів тіл) в сечі реакцією з нітропрусидом натрію. Значення виявлення кетонів тіл в крові та сечі для медицини.
2. У чому полягає принцип методу визначення кетонів тіл (проба Ланге)?
3. Вказати вміст кетонів тіл в крові у нормі
4. На чому ґрунтується виявлення кетонів тіл за пробою Герхардта?
5. У добовій сечі виявлено 120 мг кетонів тіл. Які причини та наслідки такого стану для організму?

Інструктивно-методичні матеріали до теми №12

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. β -окиснення жирних кислот: локалізація процесу; активація жирних кислот; роль карнітину в транспорті жирних кислот у мітохондрії; послідовність ферментативних реакцій та енергетика β -окиснення жирних кислот.
 - 1.1. Представити схему ферментативних реакцій β -окиснення жирних кислот та вказати локалізацію процесу.
 - 1.2. Написати реакцію активації жирних кислот; участь карнітину в перенесенні довголанцюгових жирних кислот через внутрішню мембрану мітохондрій. Намалювати схему човникового механізму.
 - 1.3. Підписати назви ензимів, які беруть участь у трансмембранному перенесенні жирних кислот.



1.3. Показати схему розрахунку енергетичної вартості β -окиснення жирних кислот на прикладі пальмітинової та стеаринової кислот.

2. Механізм окиснення гліцеролу, енергетика цього процесу.

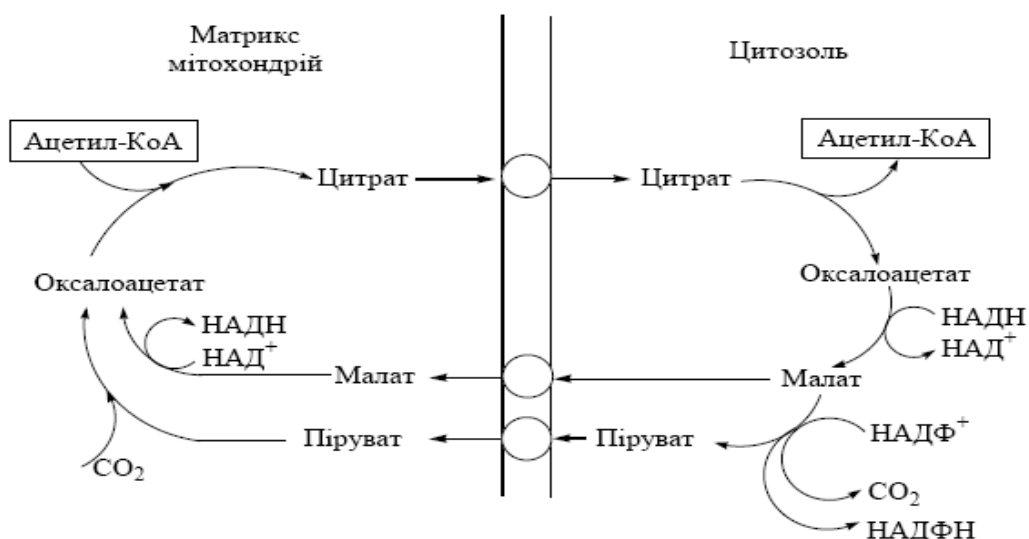
2.1. Представити схему ферментативних реакцій окиснення гліцеролу до пірувату.

2.2. Пояснити енергетику окиснення гліцеролу до кінцевих продуктів .

3. Біосинтез вищих жирних кислот: локалізація біосинтезу вищих жирних кислот; метаболічні джерела синтезу жирних кислот; стадії синтезу насичених жирних кислот; характеристика синтетази ВЖК, значення ацилтранспортуючого білка, біотину; джерела НАДФН, необхідного для біосинтезу жирних кислот; послідовність ферментативних реакцій біосинтезу вищих жирних кислот; регуляція процесу біосинтезу на рівні ацетил-КоА-карбоксилази та на рівні синтетази жирних кислот; елонгація насичених жирних кислот; утворення ненасичених жирних кислот.

3.1.Зазначити локалізацію процесу синтезу ВЖК; метаболічні джерела синтезу жирних кислот та джерела НАДФН.

3.2. Пояснити механізм транспорту ацетил-КоА з мітохондрій у цитозоль клітини із зазначенням ферментів, які беруть участь в цьому процесі.



3.3. Описати будову синтетази жирних кислот, значення АСР, біотину та написати реакцію синтезу малоніл-КоА.

3.4. Описати стадії синтезу насичених жирних кислот.

3.5. Описати регуляцію процесу біосинтезу на рівні ацетил-КоА-карбоксилази та синтетази жирних кислот; пояснити механізм елонгації насичених жирних кислот.

3.6. Написати реакції біосинтезу моно- та поліненасичених жирних кислот в організмі людини. Представити метаболічну карту біосинтезу ненасичених і насичених жирних кислот ферментативними системами людського організму

4. Метаболізм кетонових тіл: ферментативні реакції біосинтезу кетонових тіл; реакції утилізації кетонових тіл, енергетичне значення; метаболізм кетонових тіл в умовах патології. Механізми надмірного зростання вмісту кетонових тіл при цукровому діабеті та голодуванні; поняття – кетоацидоз, кетонемія, кетонурія.

4.1. Написати ферментативні реакції біосинтезу кетонових тіл.

4.2. Описати ферментативні реакції утилізації кетонових тіл, навести їх енергетичне значення для міокарду, кори наднирників та головного мозку.

4.3. Метаболізм кетонових тіл в умовах патології; механізми надмірного зростання вмісту кетонових тіл при цукровому діабеті та голодуванні

4.4. Дати визначення поняттям:

- кетоацидоз – це ...

- кетонемія – це ...

- кетонурія – це ...

Вказати нормативні показники кетонових тіл у крові та сечі, принципи методів їх визначення.

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 12

1. У печінці відбувається синтез кетонових тіл із жирних кислот. Як утворюється ацетоацетат з пальмітинової кислоти? Скільки молекул АТФ виділяється при цьому перетворенні?
2. У раціоні людини відсутні рослинні олії. До чого це може призвести?
3. У крові дорослого пацієнта виявлено високу концентрацію вільних жирних кислот. Які метаболічні порушення можуть бути причиною цього?
4. Для підвищення результатів спортсмену рекомендували застосовувати препарат, який містить у собі карні тин. Який процес в найбільшому ступені активується карнітином?
5. У хворого на цукровий діабет у крові виявлено ацетон. Яким чином він утворюється в організмі?

Ситуаційна клінічна задача до теми 12

1. Дівчину-підлітка було госпіталізовано через скарги на часту втому під час заняття гімнастикою. Невролог виявив м'язову слабкість у руках і ногах дівчинки. Коли очевидного діагнозу не вдалося поставити була проведена біопсія м'язів дівчинки. Показники лабораторних досліджень наступні: підвищений рівень триацилгліцеридів, етерифікованих довголанцюговими жирними кислотами. Біопсія м'язів встановила наявність значної кількості ліпідних вакуолей.

- Який ймовірний діагноз у дівчинки?
- Що стало причиною розвитку даних симптомів?

Посилання на відео:

1. <http://nutrition.jbpub.com/resources/animations.cfm?id=23&debug=0>
2. rookscole.cengage.com/chemistry_d/templates/student_resources/shared_resources/animations/carnitine/carnitine1.html
3. https://www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/animations/fatty_acid_metabolism/fatty_acid_metabolism.htm
4. https://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/animations/fatty_acid/index.html
5. https://www.metabolic-database.com/html/citrate_shuttle_animation.html

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Жирні кислоти, як висококалорійні сполуки зазнають перетворень у мітохондріях у результаті яких утворюється велика кількість енергії. Якими шляхами проходять ці процеси ?	A *Бета - окиснення B Декарбоксілювання C Трансамінування D Дезамінування E Відновлення	
2	При цукровому діабеті і голодуванні в крові збільшується вміст ацетонових тіл, що використовуються в якості енергетичного матеріалу. Назвіть речовину, з якої вони синтезуються:	A *Ацетіл-КоА B Сукциніл-КоА C Цитрат D Малат E Кетоглутарат	
3	Для активації та переносу ВЖК крізь мітохондріальну мембрану необхідна вітаміноподібна сполука. Вкажіть її.	A *Карнітин B Біотин C Рибофлавін D Убіхінон E Тіамін	

4	Хворому на ішемічну хворобу серця лікар рекомендував вживати поліненасичені вищі жирні кислоти. Яка з наведених жирних кислот є поліненасиченою?	А*Арахідонова В Олеїнова С Пальмітинова D Стеаринова Е Пальмітоолеїнова
5	Для роботи серцевого м'язу необхідна енергія. Вказати, який субстрат є основним джерелом енергії в працюючому м'язі?	А*Жирні кислоти В Амінокислоти С Молочна кислота D Піровиноградна кислота Е (-Кетоглутарова кислота)

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Вроджені та набуті порушення ліпідного обміну.
2. Первинна та вторинна недостатність карнітину, причини виникнення, основні симптоми та лікування.

Література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.: ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.

3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомпозит, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Гоженко А. І. Роль білкового та ліпідного обмінів в енергетичному забезпеченні організму [Електронний ресурс] / А. І. Гоженко, Ю. М. Гришко, С. М. Граматюк // Клінічна та експериментальна патологія. - 2019. - Т. 18, № 3. - С. 107-116. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/kep_2019_18_3_20
2. Гула Н.М. Жирні кислоти та їх похідні при патологічних станах: [монографія] / Н.М. Гула, В.М. Маргітич. - К.: Наукова думка, 2009. - 336 с.
3. Курята О. В., Гречаник М. М. Вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот на показники ліпідного спектра крові, динаміку рівня лептину та функцію ендотелію у хворих на ішемічну хворобу серця у поєднанні з неалкогольним стеатозом печінки // Семейная медицина. 2018. № 3. С. 19-24.
4. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/simmed_2018_3_6
5. Ледяев М.Я. Роль L-карнитина в лечении постнатальной гипотрофии у недоношенных детей после выписки из неонатологического стационара / М.Я. Ледяев, Т.Е. Заячникова / Вопросы практической педиатрии. – 2017. – Т.12. – С. 7-12.
6. Cook G.A. Streptozotocin diabetes increases mRNA expression of ketogenic enzymes in the rat heart / G.A. Cook, E.N. Lavrentyev, K. Pham et al. / Biochim. Biophys. Acta. – 2017. – Vol. 2. – P. 307-312.
7. Lehmann D. Muscle Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency: A Review of Enzymatic Controversy and Clinical Features / D. Lehmann, L. Motlagh, D. Robaa et al. / Int. J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18. – P. 82.

Тема № 13. Біосинтез та біотрансформація холестеролу. Патології ліпідного обміну: стеаторея, атеросклероз, ожиріння. Транспортні форми ліпідів – ліпопротеїни плазми крові.

Мета заняття: Вивчити шляхи біотрансформації холестеролу та основні порушення ліпідного обміну. Зрозуміти природу вільнорадикальних реакцій, механізми реакцій пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та значення їх у біологічних процесах у нормі та при патології.

Актуальність теми: Порушення процесів біотрансформації холестеролу зумовлює ряд захворювань, серед яких атеросклероз, ожиріння та інші. Тому дослідження показників ліпідного обміну є необхідним для діагностики та лікування різних захворювань.

Утворення вільних радикалів та продуктів ПОЛ є необхідною ланкою в нормальному метаболізмі. У нормі інтенсивність процесів ПОЛ регулюється системою антиоксидантного захисту. Порушення співвідношення між

активністю про- і антиоксидантних систем проявляється у вигляді різних патологічних процесів, що і пояснює необхідність їх вивчення.

Компетентності фахові:

- вміти трактувати етапи біосинтезу холестеролу та пояснювати регуляцію синтезу холестеролу в організмі людини;
- вміти аналізувати шляхи біотрансформації холестеролу: етерифікацію, утворення жовчних кислот, стероїдних гормонів, вітаміну D₃; екскреція холестеролу з організму;
- вміти аналізувати зміни в системі циркуляторних транспортних ліпідів: хіломікронів (ХМ), ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ), ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) в нормі та при патологіях, пояснювати їх функціональне значення;
- вміти трактувати біохімічні основи виникнення та розвитку генетичних аномалій обміну ліпідів, ліпопротеїнів, холестеролу (ліпопротеїнемії), а також набутих порушень обміну ліпідів: атеросклерозу, ожиріння, цукрового діабету;
- знати причини порушення ліпідного обміну: атеросклерозу, цукрового діабету, ожиріння, стеатореї;
- знати природу вільнорадикальних реакцій, механізми реакцій перекисного окислення ліпідів та значення їх у біологічних процесах у нормі та при патології;
- вміти пояснювати механізми порушення співвідношення між активністю про- і антиоксидантних систем організму;
- знати принцип методу визначення наявності жовчних кислот (реакція Петенкофера); вміти інтерпретувати отримані дані;
- знати принцип методу визначення вмісту малонового діальдегіду у сироватці крові;
- вміти пояснювати отримані результати при визначенні активності каталази та концентрації малонового діальдегіду.

Базові знання

Дисципліна: біоорганічна та біологічна хімія

Отримані навички: вміти писати послідовність реакцій синтезу холестеролу, структурні формули продуктів реакцій вільнорадикального окиснення.

Теоретичні питання

1. Біосинтез холестеролу в організмі людини:
 - локалізація цього процесу, значення;
 - етапи синтезу холестеролу;
 - ферментативні реакції синтезу мевалонової кислоти;
 - регуляція синтезу холестеролу.
2. Шляхи біотрансформації холестеролу (етерифікація, утворення жовчних кислот та стероїдних гормонів, синтез вітаміну D₃, екскреція з організму).
3. Будова ліпопротеїнів крові. Характеристика основних класів ліпопротеїнів плазми крові.

4. Особливості метаболізму ліпопротеїнів крові.
5. Патології ліпідного обміну:
 - атеросклероз: механізми розвитку, роль генетичних факторів, гіперхолестеринемії, класифікація ВООЗ;
 - порушення ліпідного обміну при цукровому діабеті;
 - патологічні процеси обміну ліпідів, які ведуть до розвитку ожиріння;
 - жировий гепатоз, ліпотропні фактори.
6. Процеси пероксидного окиснення ліпідів та механізми дії ензимів антиоксидантного захисту:
 - процеси ліпідної пероксидації в нормі та за умов патології;
 - регуляція вільнорадикальних реакцій в організмі людини;
 - характеристика антиоксидантів та прооксидантів, їх значення для перебігу реакцій пероксидації ліпідів. Антиоксиданти - ферменти і вітаміни
 - роль глутатіону, глутатіонпероксидази в захисті від пероксидного окиснення ліпідів.

Практична робота

Дослід 1. Визначення вмісту аскорбінової кислоти в сечі як показника забезпеченості організму антиоксидантом.

Принцип методу. Аскорбінова кислота в певних умовах легко віддає пару електронів та протонів, а отже є добрим відновником. Інші речовини – окисно-відновні індикатори при переході з окисненої форми у відновлену здатні змінювати своє забарвлення. Так, 2,6-дихлорфеноліндофенол при взаємодії з аскорбіновою кислотою відновлюється і змінює забарвлення із синього на рожеве.

Матеріальне забезпечення: досліджувана сеча, концентрована CH_3COOH , 2,6-дихлорфеноліндофенол, дистильована вода, колбочки, піпетки, бюретка.

Хід роботи.

У дві колбочки відмірюють по 5 мл свіжої сечі, додають 5 крапель концентрованої CH_3COOH і одну з них титрують 2,6-дихлорфеноліндофенолом до утворення стійкого рожевого забарвлення. Розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу приготований так, що 1 мл його реагує з 0,1 мг аскорбінової кислоти. Середній добовий діурез становить 1500 мл. Визначивши кількість затраченого на титрування 2,6-дихлорфеноліндофенолу, розраховують кількість вітаміну С, яка виділяється з сечею за добу.

Розрахунок кількості вітаміну С проводять за формулою:

$$X = \frac{1500 \times a}{5} ,$$

де: 1500 – добовий діурез в мл;

а – кількість вітаміну С, що відповідає витраченому на титрування 2,6-дихлорфеноліндофенолу;

5 – кількість сечі в мл, яку досліджують.

Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. Аскорбінова кислота є компонентом не ферментативної антиоксидантної системи організму людини. В нормі у крові дорослої людини вміст аскорбінової кислоти становить 39,7 – 113,6 мкмоль/л. Для оцінки С-вітамінної забезпеченості організму в клінічній практиці визначають вміст аскорбінової кислоти у крові та сечі, у харчовій промисловості її вміст відповідно у продуктах харчування.

Аскорбінова кислота і продукти її розпаду виводяться з організму із сечею. У здорової людини за добу із сечею виводиться 20 – 35 мг або 113,55 – 170,33 мкмоль вітаміну С. Підвищений розпад аскорбінової кислоти зустрічається при гіпоацидному гастриті, виразковій хворобі, ентериті. Виділення вітаміну С нижче від норми свідчить про С-гіповітаміноз. Гіповітаміноз С призводить до зниження антиоксидантної активності організму, посиленню процесів пер оксидного окиснення та виникнення захворювання – цинги, що супроводжується синюшністю губ, нігтів, кровоточивістю ясен, блідістю і сухістю шкіри, точковими підшкірними крововиливами, розхитуванням і випадінням зубів, болями в суглобах, повільним загоєнням ран.

Дослід 2. Якісна реакція на жовчні кислоти (реакція Петенкофера)

Принцип методу. Реакція базується на утворенні забарвлених продуктів конденсації у разі взаємодії жовчних кислот з оксиметилфурфуролом. Останній утворюється з фруктози, що є продуктом гідролізу внаслідок додавання до сахарози концентрованої сульфатної кислоти.

Матеріальне забезпечення: жовч, 20 % розчин сахарози, концентрована H_2SO_4 , пробірки.

Хід роботи. У пробірку наливають 10 крапель жовчі, додають 10 крапель свіжоприготовленого розчину сахарози і обов'язково струшують. На розчин, що містить жовч, обережно, по стінках, нашаровують приблизно 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Через 5 – 10 хв на межі розподілу рідин утворюється осад жовчних кислот і з'являється червоно-фіолетове кільце. У разі легкого струшування рідина набуває вишнево-червоного забарвлення.

Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. Головним емульгатором ліпідів є жовч, яка містить жовчні кислоти, що утворюються в печінці (10-15 г за добу). До них належать: холева, дезоксихолева, хенодезоксихолева, літохолева та інші, які виділяються з жовчю у вільному стані, у вигляді солей та парних жовчних кислот, які зв'язані з гліцином або з таурином. Жовчні кислоти емульгують ліпіди, активують панкреатичну ліпазу, беруть активну участь у процесі всмоктування жирних кислот, утворюють холеїнові комплекси, стабілізують холестерол. Дефіцит жовчі в кишці може бути пов'язаний із порушенням її

синтезу і виведення, тобто захворюваннями печінки (механічна жовтяниця, гепатити, цироз), жовчного міхура або жовчних шляхів (жовчокам'яна хвороба, пухлини жовчовивідних шляхів). При копрологічних дослідженнях спостерігають зменшення або відсутність у калі жовчних пігментів (ахолічний кал) та високий вміст мил, особливо кальцієвих.

Дослід 3. Визначення процесів ліпідної пероксидації в тканинах. Визначення вмісту малонового діальдегіду.

Принцип методу. Метод ґрунтується на тому, що за високої температури в кислому середовищі малоновий діальдегід (МДА) реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) з утворенням забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 532 нм.

Матеріальне забезпечення: сироватка крові, фосфатний буфер рН 7,4; 1мМ КМnО₄, 1 мМ FeSO₄, 20 % розчин трихлорацетатної кислоти (ТХАК), 1н хлоридна кислота, 0,7 % тіобарбітурова кислота, бутанол, центрифуга, водяна баня, спектрофотометр, пробірки.

Хід роботи. До 3 мл фосфатного буфера (рН 7,4) додають 0,2 мл сироватки; 0,5 мл 1мМ КМnО₄, перемішують, а через 10 хв додають 0,5 мл 1 мМ FeSO₄. Після цього додають 1 мл 20 % ТХАК і центрифугують 10 хв при 3000 об/хв. Далі до 2 мл супернатанту додають 0,5 мл 1н НСІ та 1 мл 0,7 % тіобарбітурової кислоти. Суміш витримують 20 хв на киплячій водяній бані (95-100°C). Після різкого охолодження в пробірку вносять 3 мл бутанолу, ретельно перемішують розчин і центрифугують 10 хв при 3000 об/хв.

Оптичну густину розчину визначають спектрофотометрично при 532 нм. Вміст МДА виражають в мкМ/мл сироватки.

Розрахунок проводять за формулою:

$$C = A \times 52,88 / 0,2 ,$$

де А – оптична густина розчину;
52,88 – коефіцієнт перерахунку;
0,2 – кількість мл сироватки крові в пробі.

Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. Утворення вільних радикалів та продуктів ПОЛ є необхідною ланкою нормального метаболізму, що корелює з активністю мембранозв'язаних електронтранспортних та енерго-трансформуючих систем, сприяє оновленню клітинних мембран, бере участь у регуляції активності мембранозв'язаних ферментів, біосинтезі простагландинів, лейкотрієнів, піноцитозі.

Вміст МДА (ТБК-активних продуктів) у крові здорових людей становить 6,2-8,3 мкмоль/л. Надмірна інтенсифікація ПОЛ призводить до порушення перебігу хімічних процесів, клітин і наростання системної поліорганної патології. Збільшення вмісту МДА спостерігається при атеросклерозі, ішемічній хворобі серця та печінки, гіпертонічній хворобі, під впливом іонізуючого опромінення, а також під час старіння. Зниження вмісту МДА

спостерігається при хронічній серцевій недостатності, онкологічних захворюваннях, тощо.

Контрольні питання до практичної роботи теми 13

1. Пояснити принцип методу виявлення жовчних кислот (реакція Петенкофера).
2. Яке біологічне значення жовчних кислот?
3. Якою якісною реакцією можна виявити жовчні кислоти в біологічних рідинах?
4. За активністю яких ензимів оцінюють надійність антиоксидантного захисту?
5. Про що може свідчити підвищена концентрація малонового діальдегіду у сироватці крові хворих?

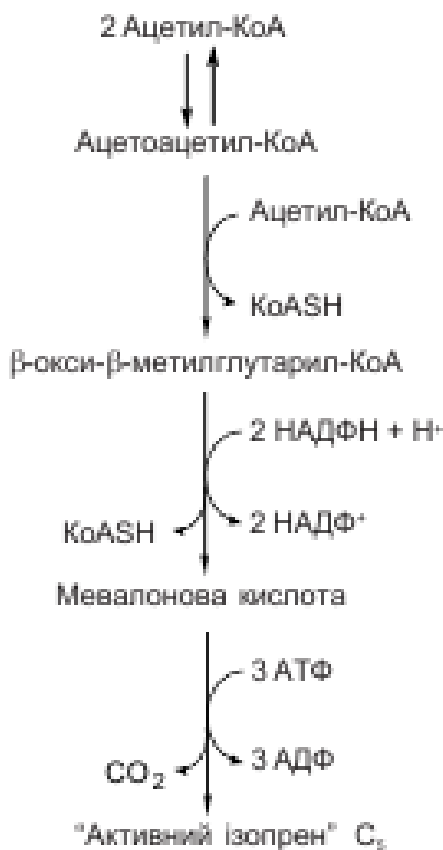
Інструктивно-методичні матеріали до теми №13

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Біосинтез холестеролу в організмі людини: локалізація цього процесу, значення; етапи синтезу холестеролу; ферментативні реакції синтезу мевалонової кислоти; регуляція синтезу холестеролу.

1.1. Представити ферментативні реакції синтезу мевалонової кислоти та метаболічну карту біосинтезу холестерину.

1.2. Підписати назви ферментів, що каталізують перший етап синтезу холестеролу.



1.3. Пояснити особливості перебігу другого та третього етапів синтезу холестеролу. Представити формулу холестеролу.

1.4. Вказати внутрішньоклітинну та органну локалізацію біосинтезу холестеролу в організмі людини та його значення.

1.3. Описати регуляцію біосинтезу холестеролу.

2. Шляхи біотрансформації холестеролу (етерифікація, утворення жовчних кислот та стероїдних гормонів, синтез вітаміну D₃, екскреція з організму).

2.1. Представити шляхи етерифікації холестерину: зовнішньо- та внутрішньоклітинна етерифікація, ензими, які забезпечують її здійснення.

2.2. Представити основні шляхи біотрансформації холестеролу:

- етерифікація,
- утворення жовчних кислот та стероїдних гормонів,
- синтез вітаміну D₃.

Намалювати метаболічну карту біотрансформації холестерину.

2.3. Описати шляхи екскреції холестеролу з організму.

3. Будова ліпопротеїнів крові. Характеристика основних класів ліпопротеїдів плазми крові.

3.1. Пояснити загальний принцип побудови ліпопротеїнів крові з використанням схеми. Пояснити особливості розташування різних класів ліпідів у ліпопротеїновій структурі.

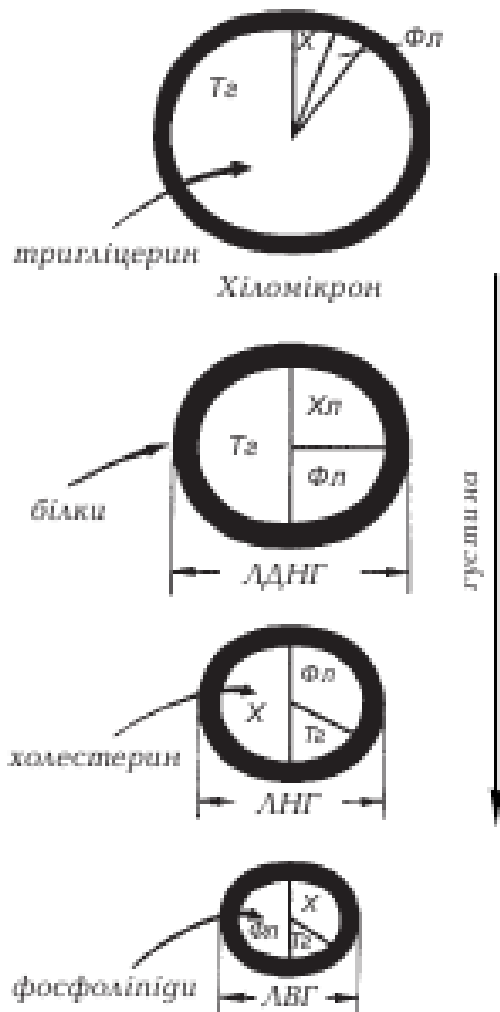


3.2. Навести класифікацію ліпопротеїнів плазми крові. Описати особливості будови різних класів ліпопротеїнів. Заповнити таблицю.

Класи ліпопротеїнів крові за щільністю	Класи ліпопротеїнів крові за електрофоретичною рухливістю	Хімічний склад	Основні аполіпопротеїни	Місце синтезу ЛП
ХМ				

ЛПДНЩ				
ЛППЩ				
ЛПНЩ				
ЛПВЩ				

3.3. Пояснити особливості якісного та кількісного ліпідного складу різних ліпопротеїнів крові за схемою.



4. Особливості метаболізму ліпопротеїнів крові.

4.1. Представити ендогенний і екзогенний шляхи метаболізму різних класів транспортних форм ліпідів плазми крові.

5. Патології ліпідного обміну: атеросклероз – механізми розвитку, роль генетичних факторів, гіперхолестеринемії, класифікація ВООЗ; порушення ліпідного обміну при цукровому діабеті; патологічні процеси обміну ліпідів, які ведуть до розвитку ожиріння; жировий гепатоз, ліпотропні фактори.

5.1. Зазначити класифікацію гіперліпопротеїнемій за ВООЗ.

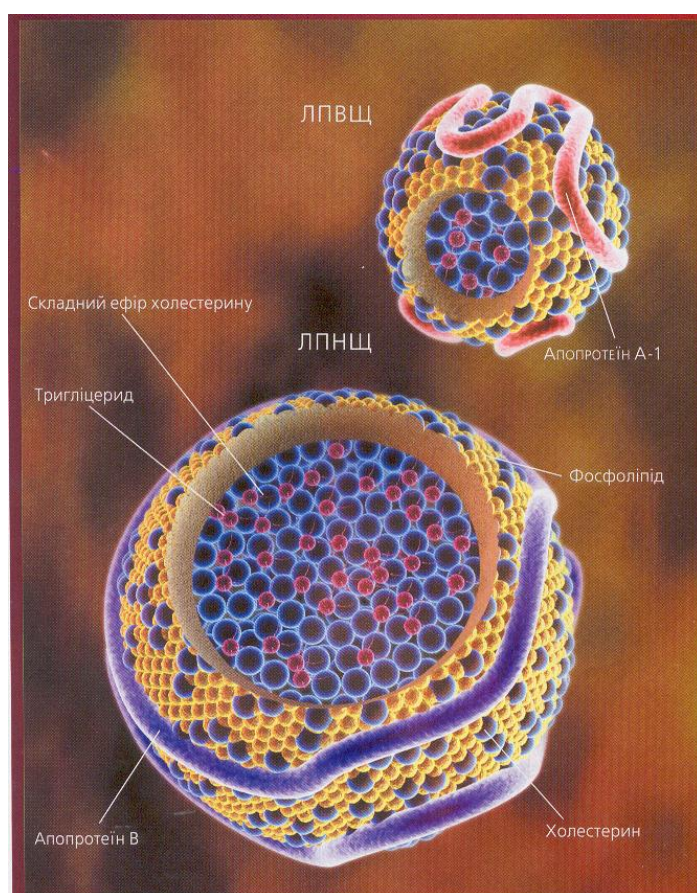
Дати визначення гіперліпопротеїнемій. Навести класифікацію гіперліпопротеїнемій за механізмом походження (спадкові, набуті).

Заповнити таблицю.

Тип дисліпо-протеїнемії (за G. Thompson, 1991)	Зміни складу ЛП крові	Холестерин плазми	Триацил-гліцерол и плазми	Причини первинних (вроджених) ліпо-протеїнемій	Причини набутих ліпо-протеїнемій
I					
IIa					
IIb					
III					
IV					
V					

5.2. Описати механізми розвитку атеросклерозу, роль генетичних факторів.

5.3. Пояснити атерогенну роль ЛПНЩ та антиатерогенну роль ЛПВЩ



5.4. Пояснити біохімічні основи дії антиатеросклеротичні препарати.

№ з/п	Вплив на метаболізм холестеролу	Антиатеросклеротичні препарати
1	Пригнічення всмоктування холестеролу в кишці	
2	Гальмування реакцій синтезу	

	холестеролу (інгібітори β -ГМГ-редуктази)	
3	Активація метаболізму холестеролу	
4	Стимуляція екскреції холестеролу з організму	

5.4. Описати порушення ліпідного обміну при цукровому діабеті.

5.5. Дати визначення ожирінню, вказати причини ожиріння. Пояснити роль лептину в розвитку ожиріння.

5.6. Дати визначення

Жировий гепатоз – це...

Описати біохімічні причини і наслідки жирового гепатозу.

5.7. Дати визначення

Ліпотропні фактори – це...

Вказати речовини, що відносяться до ліпотропних факторів та механізм їх дії.

6. Процеси пероксидного окиснення ліпідів та механізми дії ензимів антиоксидантного захисту: процеси ліпідної пероксидації в нормі та за умов патології; регуляція вільнорадикальних реакцій в організмі людини; характеристика антиоксидантів та прооксидантів, їх значення для перебігу реакцій пероксидації ліпідів. Антиоксиданти – ферменти і вітаміни. Роль глутатіону, глутатіонпероксидази в захисті від пероксидного окиснення ліпідів.

6.1. Представити механізми реакцій вільнорадикального окиснення та пероксидного окиснення ліпідів.

6.2. Навести характеристику ферментативної та неферментної системи антиоксидантного захисту організму.

6.3. Вказати механізми регуляції про- та антиоксидантних процесів в організмі.

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 13

1. У хворого виявлено активацію процесів ПОЛ. Чи змінюються при цьому процеси окисного фосфорилування?

2. Вітамін Е відіграє важливу роль у системі антиоксидантів, виявляє стабілізуючу дію на стан біліпідного шару мембран. На чому ґрунтується його дія?

3. У крові підвищена концентрація малонового диальдегіду. Які можливі причини та наслідки цього?

4. При аналізі крові виявлено високий вміст холестеролу в β -ліпопротеїдній фракції. Які причини та можливі наслідки її для організму?

5. Вміст холестерину в крові складає 12 ммоль/л. Пояснить цей результат, зазначивши можливі причини і наслідки для організму.

Ситуаційні клінічні задачі до теми 13

1. 48-річний чоловік доставлений у клініку через біль у ділянці серця. Він повідомив, що його батько помер від серцевого нападу у віці 46 років, а його старший брат також переніс інфаркт у цьому ж віці та постійно приймає ліки для зниження рівня холестерину. Пацієнт періодично повідомляє про болі в грудній ділянці та задишку під час піднімання сходами. Фізикальний огляд є нормальним, проведено електрокардіограму (ЕКГ). Показники лабораторних досліджень наступні: рівень холестерину 350 мг/дл (при нормі 200). Розпочато терапію препаратами механізм дії яких спрямованай на біосинтез холестерину.

- Вкажіть лімітуючий етап у процесі біосинтезу холестерину?
- Який клас лікарських засобів призначений лікарем?

2. 49-річна жінка госпіталізована в клініку для планового огляду. Пацієнтка приймає ловастатин. Показники лабораторних досліджень вказують на зниження рівня холестерину. Пацієнтку цікавить чи потрібно продовжувати курс лікування та побічні ефекти можуть розвинути на фоні прийому ліків. Лікар пояснив, що даний препарат пригнічує активність ферменту біосинтезу холестерину.

- Який механізм дії даного препарату.

Посилання на відео:

1. <https://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/animations/lipoproteins/index.html><https://www.youtube.com/watch?v=BVxeeiR7JB0>
2. <http://tube.medchrome.com/2011/05/lipoprotein-metabolism-animation-video.html>
3. <https://www.wiley.com/college/boyer/0470003790/animations/cholesterol/cholesterol.htm>

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Ті організми, які в процесі еволюції не створили захисту від H ₂ O ₂ , можуть жити лише в анаеробних умовах. Які з перелічених ферментів можуть руйнувати пероксид водню?	A*Пероксидаза та каталаза B Оксигенази та гідроксилази C Цитохромоксидаза, цитохром b5 D Оксигеназа та каталаза E Флавінзалежні оксидази	
2	Хворому 65 років з ознаками загального ожиріння жирової дистрофії печінки рекомендована	A*Метіонін B Холестерин C Глюкоза	

	дієта, збагачена ліпотропними речовинами, серед яких важливе значення має:	D Вітамін С Е Гліцин	
3	Під час аналізу крові виявлено високий вміст холестерину в ліпопротеїнах низької щільності (ЛПНЩ). Які можливі наслідки для організму цього явища?	A* Виникнення атеросклерозу B Цукрового діабету C Ожиріння D Гіпертонія E Жовтяниця	
4	В процесі лікування парадонтозу застосовують антиоксидант природного та штучного походження. Вкажіть, яка з наведених природних сполук використовується в якості антиоксидантного засобу?	A* Токоферол B Тіамін C Глюконат D Піридоксин E Холін	
5	У пацієнта, що перебував у зоні радіаційного ураження, в крові збільшилась концентрація малонового діальдегіду, гідропероксидів. Причиною даних змін могло послужити:	A* Збільшення в організмі кисневих радикалів і активація ПОЛ B Збільшення кетонових тіл C Збільшення молочної кислоти D Збільшення холестерину E Зменшення білків крові	

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Реалізація біохімічної ролі оксиду азоту.
2. Оксидативний стрес, його причини, прояви і можливість корекції.

Рекомендована література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-те вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. СклярOVA О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. СклярOV ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. СклярOV ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.

8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірна, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Бедзай А. О. Особливості порушення ліпідного обміну, ліпідотранспортної системи та системного запалення у практично здорових жінок залежно від звички куріння [Електронний ресурс] / А. О. Бедзай, Т. М. Соломенчук, О. М. Колінковський // Львівський клінічний вісник. - 2020. - № 3. - С. 19-24. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/lkv_2020_3_5
2. Дутка Р. Я. Діагностична цінність та кореляційна взаємозалежність показників ендокринного та ліпідного обміну при метаболічному синдромі, ускладненому хронічною ішемічною хворобою серця і цукровим діабетом 2-го типу [Електронний ресурс] / Р. Я. Дутка, Н. В. Чмир // Буковинський медичний вісник. - 2018. - Т. 22, № 4. - С. 27-34. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/bumv_2018_22_4_6
3. Ефективність метаболічного впливу S-аденозилметіоніну та мельдонію на показники ліпідного спектра крові та інсулінорезистентності за коморбідного перебігу неалкогольного стеатогепатиту, ожиріння та хронічної хвороби нирок I–II стадій / О. С. Хухліна, А. А. Антонів, О. С. Воевідка, О. Б. Кузьмінська // Запорожский медицинский журнал. 2018. Т. 20, № 1. С. 51-57. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zmzh_2018_20_1_11
4. Кедик А. В. Стан ліпідного обміну у пацієнтів з ожирінням та коморбідною патологією, які мешкають у різних висотних регіонах Закарпаття : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.02 / Кедик Антоніна Володимирівна ; Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького. - Львів, 2019. - 21 с.
5. Метаболічний синдром: механізми розвитку та перспективи антиоксидантної терапії: [монографія] / А. Л. Загайко [и др.]. - Х. : Видавництво НФаУ ; Х. : Золоті сторінки, 2007. - 216 с.
6. Серкова В. К. Ліпіди крові як критерій коронарного атеросклерозу у хворих хронічним

- обструктивним захворюванням легень [Електронний ресурс] / В. К. Серкова, А. А. Лілевська, В. О. Романова // Вісник проблем біології і медицини. - 2019. - Вип. 2(1). - С. 196-199. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2019_2\(1\)_43](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2019_2(1)_43)
7. Сірчак Є. С. Корекція порушень ліпідного обміну у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки [Електронний ресурс] / Є. С. Сірчак, В. І. Грига, С. С. Сірчак // Проблеми клінічної педіатрії. - 2020. - № 1-2. - С. 47-52. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/pkr_2020_1-2_8
 8. Чернацька О. М. Особливості ліпідного обміну в осіб з артеріальною гіпертензією і цукровим діабетом 2-го типу // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. 2018. Т. 6, № 2. С. 238–244. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/VSU_med_2018_6_2_9
 9. Binder C.J. Lipid modification and lipid peroxidation products in innate immunity and inflammation / C.J. Binder // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2017. – Vol. 1862. – P. 369-370.
 10. Helgadottir A. Variants with large effects on blood lipids and the role of cholesterol and triglycerides in coronary disease / A. Helgadottir, S. Gretarsdottir, G. Thorleifsson et al. // Nature genetics. – 2016. – Vol. 48. – P. 634-639.
 11. Kats D. Abstract MP37: The Triglyceride to High-density Lipoprotein Cholesterol Ratio, an Estimate of Insulin Resistance, is Associated with Incident Coronary Heart Disease / D. Kats, J.W. Knowles, G.M. Reaven et al. // The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. – 2016. – Vol.133. – P. AMP37.
 12. Smriti K. Role of salivary malondialdehyde in assessment of oxidative stress among diabetics / K. Smriti, K.M. Pai, V. Ravindranath et al. // Journal of oral biology and craniofacial research. – 2016. – Vol. 6. – P. 42-45.
 13. Yang W.S. Ferroptosis: death by lipid peroxidation / W.S. Yang, B.R. Stockwell // Trends in cell biology. – 2016. – Vol. 26. – P. 165-176.

РОЗДІЛ 5. МЕТАБОЛІЗМ АМІНОКИСЛОТ В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ. РЕГУЛЯЦІЯ ОБМІНУ АМІНОКИСЛОТ.

Тема № 14. Дослідження травлення білків у ШКТ. Дослідження загальних шляхів перетворень амінокислот (трансамінування, дезамінування, декарбоксілювання).

Мета заняття: Вивчити загальні шляхи перетворення амінокислот, оволодіти методами ідентифікації їх метаболітів. Вміти інтерпретувати отримані показники.

Актуальність теми: Обмін білків є центральною ланкою всіх біохімічних процесів, знання і розуміння загальних шляхів перетворень амінокислот, їх метаболітів та визначення активності ферментів, що беруть участь у цих перетвореннях є критеріями для оцінки обміну білків.

Компетентності фахові:

- вміти трактувати біохімічні закономірності внутрішньоклітинного метаболізму амінокислот: процеси дезамінування, трансамінування, декарбоксілювання, пояснювати біологічну дію утворених біологічних амінів: серотоніну, гістаміну, гама-аміномасляної кислоти, тощо;

- вміти трактувати причини зростання активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази, значення коефіцієнту де Рітиса.

Базові знання

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія

Отримані навички: вміти писати структурні формули амінокислот, реакції дезамінування, декарбоксілування, трансамінування, біосинтезу глутатіону та креатину.

Теоретичні питання

1. Травлення білків у шлунку. Активація протеолітичних ферментів шлунку, специфічність їх дії, особливості травлення білків у шлунку немовлят та дорослих людей. Хімізм утворення гідрохлоридної кислоти, її роль.
2. Кислотність шлункового соку в нормі та при патології, клініко-діагностичне значення визначення в шлунковому соці молочної кислоти, крові, *Helicobacter pylori*. Гормональна регуляція секреції шлункового соку (гастрит, гістамін).
3. Перетравлення білків у тонкій кишці: активація протеолітичних ферментів підшлункової залози та тонкої кишки, специфічність дії. Вплив секретину і холецистокініну (панкреозиміну) на хімічний склад панкреатичного соку.
4. Механізми всмоктування продуктів гідролізу білків у тонкій кишці.
5. Гниття білків у товстій кишці.
6. Шляхи утворення та підтримання пулу вільних амінокислот в організмі людини. Загальні шляхи перетворення вільних амінокислот.
7. Дезамінування амінокислот:
 - типи реакцій дезамінування амінокислот і їх кінцеві продукти;
 - механізм окиснювального дезамінування амінокислот;
 - оксидази L- і D-амінокислот: їх ферментативна активність, коферменти, специфічність дії, рН оптимуми;
 - глутаматдегідрогеназа: будова ферменту, механізм глутаматдегідрогеназної активності, біологічне значення.
8. Трансамінування амінокислот:
 - механізм реакції трансамінування;
 - характеристика трансаміназ: субстрати ферментів трансамінування, коферменти;
 - трансдезамінування – механізм непрямого дезамінування L-амінокислот.
 - локалізація трансаміназ в органах і тканинах; клініко-діагностичне значення визначення активності трансаміназ крові (аланінамінотрансферази і аспартатамінотрансферази).
9. Декарбоксілування амінокислот:
 - характеристика декарбоксилаз: субстрати і коферменти;
 - реакції утворення біогенних амінів (γ -аміномасляна кислота, гістамін, серотонін, дофамін), їх біологічне значення;

- декарбоксілювання амінокислот у процесі гниття білків у кишківнику;
- механізм окиснення біогенних амінів.

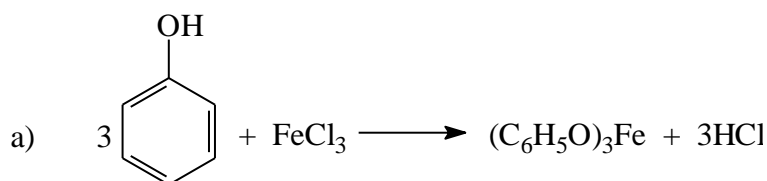
Практична робота

Дослід № 1. Реакція на молочну кислоту (реакція Уффельманна)

Принцип методу: молочна кислота в присутності заліза феноляту (реактив Уффельманна), забарвленого у фіолетовий колір, утворює заліза лактат жовто-зеленого кольору:

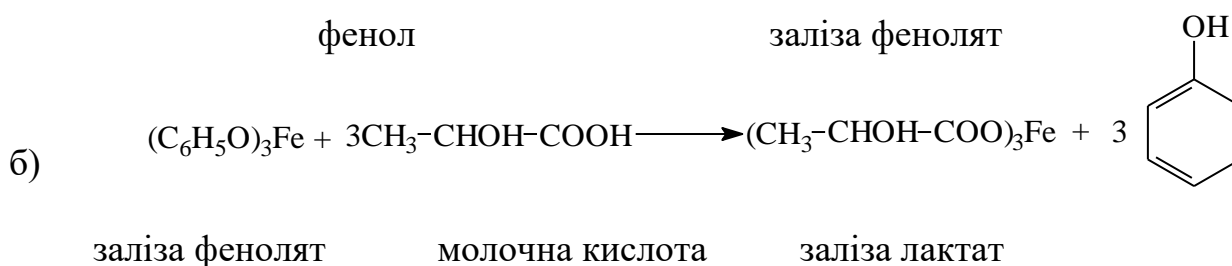
Матеріальне забезпечення: патологічний шлунковий сік, 1 % розчин фенолу, 3 % розчин FeCl₃, піпетки, пробірки, штатив.

Хід роботи: До 5 мл 1% розчину фенолу додають 2 – 3 краплі 3 % розчину заліза хлорного. Утворюється заліза фенолят фіолетового кольору, до якого додають по краплях патологічний шлунковий сік, в якому відсутня вільна хлоридна кислота. При наявності в шлунковому соку молочної кислоти утворюється жовто-зелене забарвлення внаслідок утворення заліза лактату .



фенол

заліза фенолят



заліза фенолят

молочна кислота

заліза лактат

Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. Виявлення молочної кислоти в шлунковому соку проводять з метою дослідження інтенсивності процесів молочнокислого бродіння в шлунку (непрямий доказ відсутності чи низької концентрації хлоридної кислоти). Існує думка, що наявність молочної кислоти в шлунковому соку є наслідком метаболічних процесів ракових клітин.

Дослід № 2. Уреазний метод виявлення в шлунковому соку *Helicobacter pylori*.

Принцип методу: у гастробіоптаті виявляють ензим уреазу, яка каталізує гідроліз сечовини. Аміак, що утворюється, зміщує рН розчину в лужний бік і в присутності фенолфталеїну утворюється рожеве забарвлення.

Матеріальне забезпечення: патологічний шлунковий сік, 0,5 % спиртовий розчин фенолфталеїну, 1 % розчин сечовини, піпетки, пробірки, штатив.

Хід роботи: До 1 – 2 мл патологічного шлункового соку додають 1 – 2 мл сечовини і 2 – 3 краплі фенолфталеїну. Вміст пробірок перемішують, залишають на декілька хвилин при кімнатній температурі і спостерігають за появою рожевого забарвлення в пробірці.

Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. За умов норми шлунок натще майже не містить бактеріальної флори. Не зважаючи на бактерицидну дію хлоридної кислоти, у шлунку в невеликій кількості наявні ентерококи, молочнокислі бактерії, стрептококи, стафілококи, гриби, а кількість мікроорганізмів не перевищує 1 000 мікробних тіл у 1 мл шлункового соку. Мікробна флора шлунка змінюється при дуодено-гастральному рефлюксі та зниженні моторики тонкої кишки. Спіралеподібний грамнегативний мікроорганізм *Helicobacter pylori* (Hр) може спричинювати розвиток хронічних захворювань травного тракту. Основною причиною цього є висока адгезивна спорідненість цих бактерій до мембран епітеліальних клітин слизової оболонки шлунка, яка створює умови для дії бактеріальних ензимів, що виділяються Hр у великій кількості (уреаза, ліпаза, фосфоліпаза, протеаза та каталаза) і пошкоджують слизову оболонку. Hр виявляють при виразці дванадцятипалої кишки у 92 – 100 % хворих, гастритах – у близько 90 %, виразці шлунка – у 70 – 80 %, раку шлунка – до 80 %, диспепсії без виразок у 40 – 70 % хворих.

Дослід 3. Визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) уніфікованим динітрофенілгідразиним методом Райтмана-Френкеля.

Принцип методу. У результаті реакції трансамінування під дією АлАТ утворюються піруват і глутамат. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину в лужному середовищі утворюється гідразон піровиноградної кислоти червоно-бурого забарвлення, інтенсивність якого прямопропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти і є показником активності АлАТ.

Матеріальне забезпечення: 0,4 М розчин NaOH, субстратний розчин (29,2 мг б-кетоглутарової кислоти і 1,78 мг D,L-аланіну розчиняють в 1 М NaOH до отримання рН 7,4, розчин переливають у мірну колбу на 100 мл і доводять 0,1 М фосфатним буфером до мітки). 0,1% розчин 2,4-динітрофенілгідразину, фотоелектроколориметр, термостат або водяна баня, холодильник, штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи.

А) Кількісне визначення піровиноградної кислоти:

У дві пробірки (дослідну і контрольну) вносять по 0,5 мл свіжорозмороженого субстратного розчину і ставлять у термостат при температурі 37⁰С на 5 хв. Потім у дослідну пробірку додають 0,1 мл досліджуваної сироватки, а в контрольну – 0,1 мл води і обидві пробірки ставлять в термостат при 37⁰С на 30 хв. Після інкубації пробірки виймають та в обидві додають по 0,5 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину, перемішують і

витримують 20 хв при кімнатній температурі. Потім додають в обидві пробірки по 5 мл 0,4 М NaOH, перемішують і залишають на 10 хв при кімнатній температурі для розвитку забарвлення. Інтенсивність забарвлення визначають на фотоелектроколориметрі при зеленому світлофільтрі ($\lambda = 500-560$ нм) у кюветі з товщиною шару 10 мм проти контрольної проби.

Кількість утвореної пірвіноградної кислоти (у мкг) знаходять за калібрувальним графіком або за формулою (I):

$$X = 10 \times A \quad (I),$$

де: A – визначена оптична густина.

В) Активність АЛАТ вираховують за формулою (II):

$$\text{АЛАТ} = \frac{X \times 2 \times 10}{88} \quad (II),$$

де: X – кількість пірвіноградної кислоти, знайденої за калібрувальним графіком або за формулою I, мкг;

2 – коефіцієнт перерахунку на 1 год інкубації;

10 – коефіцієнт перерахунку на 1 мл сироватки;

88 – маса 1 мкмоль пірвіноградної кислоти.

Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. Трансамінази є внутрішньоклітинними ферментами. Зростання їх концентрації в крові свідчить про синдром цитолізу – порушення цілісності клітин. У цитоплазмі клітин концентрація АЛАТ переважає над концентрацією АсАТ, але в мітохондріях є специфічна ізоформа АсАТ. Тому при захворюваннях запального типу (порушення проникності клітинних мембран) у сироватці крові в більшій мірі зростає активність АЛАТ, а при захворюваннях некротичного типу (руйнування не тільки клітин, але й органел, зокрема, мітохондрій) переважає активність АсАТ.

Активність АсАТ у крові зростає через 4-6 год. після інфаркту міокарда і звичайно повертається до норми на 3-7 день. При стенокардії АсАТ залишається в нормі.

Найвища активність АЛАТ характерна для захворювань печінки – особливо в інкубаційному періоді інфекційного гепатиту.

Зниження нормальних показників амінотрансфераз у плазмі може бути при недостатності вітаміну В₆, а також при нирковій недостатності.

Діагностично важливим є одночасне визначення активності АЛАТ і АсАТ та розрахунок коефіцієнта де Рітіса – АсАТ/АЛАТ, який в нормі дорівнює приблизно 1,3. При інфекційному гепатиті він нижчий норми, при інфаркті міокарда – вищий норми.

Нормативні величини: для АЛАТ – 28-190 нмоль/(с·л), 0,1-0,68 мкмоль/(год.мл) при 37 °С або 11,4 МО/л.

Контрольні питання до практичної роботи теми 14

1. Пояснити процес переамінування з використанням глутамінової та піровиноградної кислот. Написати рівняння відповідних реакцій.
2. Пояснити принцип методу визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази. Значення визначення цих ферментів для медицини.
3. Яке клініко-діагностичне значення визначення активності трансаміназ крові?
4. Пояснити причини появи у шлунковому соці молочної кислоти.
5. Пояснити клініко-діагностичне значення визначення *Helicobacter pylori* у шлунковому соці.

Інструктивно-методичні матеріали до теми №14

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Травлення білків у шлунку. Активація протеолітичних ферментів шлунку, специфічність їх дії, особливості травлення білків у шлунку немовлят та дорослих людей. Хімізм утворення гідрохлоридної кислоти, її роль.
 - 1.1. Дати визначення
ендопептидази – це... Навести приклади
екзопептидази – це... Навести приклади
 - 2.2. Охарактеризувати ферменти шлункового соку за схемою:
 - назва,
 - особливості будови,
 - рН оптимум,
 - особливості активації (при наявності),
 - специфічність дії.
2. Кислотність шлункового соку в нормі та при патології, клініко-діагностичне значення визначення в шлунковому соці молочної кислоти, крові, *Helicobacter pylori*. Гормональна регуляція секреції шлункового соку (гастрит, гістамін).
 - 2.1. Написати реакції утворення хлоридної кислоти.
 - 2.2. Перелічити основні функції хлоридної кислоти в шлунку.
 - 2.3. Дати визначення поняттям:
загальна кислотність – це..., за умов норми становить...
зв'язана HCl – це..., за умов норми становить...
вільна HCl – це..., за умов норми становить...
 - 2.4. Дати характеристику кислотності (у базальну і стимульовану фазу секреції) за показниками рН метрії:
 - за умов норми,
 - при гіперацидності,
 - при гіпоацидності,
 - при анацидності.

3. Перетравлення білків у тонкій кишці: активація протеолітичних ферментів підшлункової залози та тонкої кишки, специфічність дії. Вплив секретину і холецистокініну (панкреозиміну) на хімічний склад панкреатичного соку.
 - 3.1. Охарактеризувати протеолітичні ферменти підшлункового соку та тонкої кишки за схемою:
 - назва,
 - особливості будови,
 - рН оптимум,
 - особливості активації (при наявності),
 - специфічність дії.
4. Механізми всмоктування продуктів гідролізу білків у тонкій кишці.
 - 4.2. Охарактеризувати процес котранспорту амінокислот.
 - 4.3. Схематично відобразити механізм дії гама-глутамільного циклу, пояснити.
5. Гниття білків у товстій кишці.
 - 5.1. Дати визначення поняттю «гниття білків у товстій кишці».
 - 5.2. Написати реакції утворення скатолу, індолу, крезолу, фенолу, путресцину, кадаверину, агматину.
6. Шляхи утворення та підтримання пулу вільних амінокислот в організмі людини. Загальні шляхи перетворення вільних амінокислот.
 - 6.1. Представити схему шляхів утворення та підтримання пулу вільних амінокислот в організмі людини.
 - 6.2. Дати визначення ключовим словам:
 - Дезамінування амінокислот - це...*
 - Трансамінування амінокислот – це..*
 - Декарбоксілування амінокислот - це...*
7. Дезамінування амінокислот: типи реакцій дезамінування амінокислот і їх кінцеві продукти; механізм окиснювального дезамінування амінокислот; оксидази L- і D-амінокислот: їх ферментативна активність, коферменти, специфічність дії, рН оптимуми; глутаматдегідрогеназа: будова ферменту, механізм глутаматдегідрогеназної активності, біологічне значення.
 - 7.1. Представити реакції 4 типів дезамінування (відновне, гідролітичне, внутрішньо молекулярне, окисне) із зазначенням назв метаболітів і ферментів;
 - 7.2. Представити реакцію окисного дезамінування;
 - 7.3. Описати механізм дії оксидаз L- і D-амінокислот, хімізм реакцій, рН оптимуми, коферменти
 - 7.4. Описати будову глутаматдегідрогенази, механізм глутаматдегідрогеназної активності, біологічне значення, зазначити відмінність структури, рН оптимуму та хімізму глутаматдегідрогеназної реакції у порівнянні з оксидазами інших L-амінокислот
8. Трансамінування амінокислот: механізм реакції трансамінування; характеристика трансаміназ: субстрати ферментів трансамінування, коферменти; трансдезамінування – механізм непрямого дезамінування L-

амінокислот; локалізація трансаміназ в органах і тканинах; клініко-діагностичне значення визначення активності трансаміназ крові (аланінамінотрансферази і аспартатамінотрансферази).

8.1. Написати реакції трансамінування для аланінамінотрансферази і аспартатамінотрансферази в два етапи (через утворення шифових основ).

8.2. Охарактеризувати трансамінази, субстрати трансаміназ та їх коферменти

8.3. Намалювати схему непрямого дезамінування L-амінокислот за участю глутаматдегідрогенази

3.4. Описати клініко-діагностичне значення визначення АлАТ та АсАТ крові, коефіцієнта де Рітіса із зазначенням відповідних норм.

9. Декарбоксилування амінокислот: характеристика декарбоксилаз: субстрати і коферменти; реакції утворення біогенних амінів (гама-аміномасляна кислота, гістамін, серотонін, дофамін), їх біологічне значення; декарбоксилування амінокислот у процесі гниття білків у кишківнику; механізм окиснення біогенних амінів.

9.1. Дати характеристику декарбоксилазам: субстрати і коферменти

9.2. Навести приклади реакцій утворення фізіологічно активних сполук – гормонів, медіаторів, а саме – гама-аміномасляної кислоти, гістаміну, серотоніну, дофаміну та пояснити їх біологічне значення в нормі і при патології, шляхи їх використання як фармпрепаратів.

9.3. Заповнити таблицю

	Серин	Триптофан	Тирозин	Глутамінова кислота	Гістидин
Продукти декарбоксилування					
Біологічно активні речовини					
Структурні формули					
Фізіологічна роль					

9.4. Намалювати схему окиснення біогенних амінів в клітинах печінки за участі моноаміноксидази (МАО) мітохондрій. Вказати доцільність використання фармпрепаратів – блокаторів МАО. Вказати особливість будови та механізму дії діаміноксидаз – ДАО.

5

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 14

1. Хворий 55 років госпіталізований зі скаргами на болі в лівій половині грудної клітки, задишку в стані спокою з діагнозом – інфаркт міокарда. Результати лабораторних аналізів: креатинкіназа – 12 мкмоль/хв.л (норма 0-6); АсАТ – 60 мкмоль/(хв.л) (норма 2-20); ЛДГ – 15 мкмоль/(год.мл) (норма 8,8-

4,0). Чи підтверджується діагноз на основі проведеного лабораторного обстеження?

2. У хворого 60 років є клінічні ознаки інфаркту міокарда. Визначення активності яких ферментів сироватки крові підтвердять діагноз?

3. До лікаря звернувся хворий, у якого виражені алергічні симптоми: висипи на тілі, набряки обличчя, свербіння. З утворенням якого біогенного аміну це пов'язано?

4. Хворий 45 років скаржиться на загальну слабкість, швидку стомлюваність. При аналізі крові встановлено зниження активності амінотрансфераз та декарбоксилаз амінокислот. Які вітаміни необхідно призначити для нормалізації метаболізму?

5. Чому визначення коефіцієнта де Рітца є більш діагностично інформативним для визначення цитолізу ніж окремі показники активності трансаміназ крові?

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	В лікарню потрапила дитина 7 років у стані алергічного шоку, який розвився після укусу оси. В крові підвищена концентрація гістаміну. Внаслідок якої реакції утворюється цей амін?	А.*Декарбоксилювання В.Дегідрування С.Дезамінування D.Гідроокислення E.Відновлення	
2	При декарбоксилюванні амінокислот утворюються біогенні аміни. Назвіть, який з них відноситься до медіаторів запалення?	А. * Гістамін В. Адреналін С. ГАМК D. Таурин E. Дофамін	
3	Біогенні аміни: гістамін, серотонін, ДОФамін та інші – дуже активні речовини, які впливають на різноманітні фізіологічні функції організму. В результаті якого процесу утворюються біогенні аміни в тканинах організму ?	А.* Декарбоксилювання амінокислот В. Дезамінування амінокислот С. Трансамінування амінокислот D. Окислення амінокислот E. Відновного реамінування	
4	В психіатрії для лікування ряду захворювань ЦНС використовують біогенні аміни. Вкажіть препарат цієї групи, який являється	А.*Гама-аміномасляна кислота В.Гістамін С.Серотонін	

	медіатором гальмування.	Д.Дофамін Е. Таурин	
5	Перетравлення білків у шлунку є початковою стадією розщеплення білків у травному тракті людини. Назвіть ферменти, які беруть участь в перетравленні білків у шлунку:	А. *Пепсин, гастриксин В. Трипсин, катепсини С. Хімотрипсин, лізоцим Д. Ентероптидаза, еластаза Е. Карбоксипептидаза, амінопептидаза	

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Синтез та розпад біогенних амінів в нормі та при патології.
2. Клініко-діагностичне значення визначення трансаміназ.

Рекомендована література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.

3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомпозит, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Харів М. І. Динаміка активності амінотрансфераз сироватки крові щурів за оксидативного стресу та дії ліпосомального препарату/ М. І. Харів // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина - 2016.- т. 7, № 1- С. 3-7.
2. Раєцька Я. Б. Активність амінотрансфераз у сироватці крові щурів при злякисному рості карциноми Герена за умов введення антиоксидантного препарату / Я. Б. Раєцька, Т. В. Ішук, О. О. Моргаєнко, Л. І. Остапченко // Медична хімія. - 2013. - т. 15, № 4. - С. 41-44.
3. Мещишен І. Ф. Вплив мелатоніну на глікозилювання гемоглобіну в крові та функціонування глутатіонової системи в печінці алоксандіабетичних щурів / І. Ф. Мещишен, І. М. Яремій, О. Ю. Кушнір // Світ медицини та біології. - 2012. - № 2. - С. 128-130.
4. Egger L, Ménard O, Baumann C, Duerr D, Schlegel P, Stoll P, Vergères G, Dupont D, Portmann R. Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic in vitro digestion systems with in vivo data Food Res Int. 2019 Apr;118:32-39. doi: 10.1016/j.foodres.2017.12.049. Epub 2017 Dec 18. PMID: 30898349
5. Ozel B, Zhang Z, He L, McClements DJ. Digestion of animal- and plant-based proteins encapsulated in κ-carrageenan/protein beads under simulated gastrointestinal conditions. Food Res Int. 2020 Nov;137:109662. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109662. Epub 2020 Sep 18. PMID: 33233241

Тема № 15. Дослідження процесів детоксикації аміаку та біосинтезу сечовини. Біосинтез глутатіону та креатину.

Мета заняття: Знати шляхи утворення, транспортування та знешкодження аміаку в організмі людини. Засвоїти методи визначення сечовини у біологічних рідинах, вміти інтерпретувати отримані дані.

Актуальність теми: В процесі обміну амінокислот утворюються метаболіти, визначення яких у крові та сечі може бути використано для діагностики і контролю за лікуванням.

Компетентности фахові:

- трактувати метаболічні закономірності утворення та знешкодження аміаку, циркуляторного транспорту аміаку, біосинтезу сечовини;
- знати принцип методу визначення сечовини у сечі; вміти інтерпретувати отримані дані;
- оволодіти методом кількісного визначення креатиніну в сироватці крові;

- знати принцип методу визначення креатиніну в сечі кольоровою реакцією Яффе (метод Поппера і співавторів) та вміти інтерпретувати отримані результати;
-
- вміти трактувати метаболічні закономірності утворення та знешкодження аміаку, циркуляторного транспорту аміаку, біосинтезу сечовини;
- вміти аналізувати зміни в системах транспорту та знешкодження аміаку при генетичних аномаліях ферментів його метаболізму.

Базові знання

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія

Отримані навички: вміти писати структурні формули амінокислот, сечовини.

Теоретичні питання

1. Загальні шляхи метаболізму безазотистого скелета амінокислот в організмі людини. Глюкогенні та кетогенні амінокислоти.
2. Шляхи утворення аміаку. Токсичність аміаку та механізми його знешкодження. Циркуляторний транспорт аміаку (глутамін, аланін).
3. Біосинтез сечовини: ферментні реакції; генетичні дефекти ферментів (ензимопатії) синтезу сечовини.
4. Глутатіон, будова та роль в обміні органічних пероксидів.
5. Утворення креатину та креатиніну, клініко-біохімічне значення порушень їхнього обміну.

Практична робота

Дослід 1. Уніфікований метод визначення креатиніну за кольоровою реакцією Яффе (метод Поппера і співавторів)

Принцип методу. В результаті реакції креатиніну і пікринової кислоти в лужному середовищі утворюється кольорова сполука, інтенсивність забарвлення якої прямопропорційна концентрації креатиніну.

Матеріальне забезпечення: Насичений розчин пікринової кислоти (2 г пікринової кислоти розчиняють в 100 мл гарячої (70-80°C) дистильованої води) залишають на добу при кімнатній температурі, фільтрують, зберігають у темному посуді; основний стандартний розчин креатиніну (8,8 мМ 100 мг креатиніну розчиняють в 100 мл 0,1 н розчину хлоридної кислоти) зберігають у холодильнику з притертим корком; 10% розчин їдкою натрію; 0,1 н розчин хлоридної кислоти; центрифуга, водяна лазня, фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Хід роботи:

1. Контрольна проба: до 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти додають 0,2 мл розчину 10 % NaOH і доводять водою до 10 мл.
2. Дослідна і стандартна проби: беруть 2 пробірки. У першу (дослід) додають 2 мл сироватки, у другу (стандарт) - 2 мл робочого стандартного

розчину. До обох пробірок додають по 6 мл прозорого насиченого розчину пікринової кислоти, перемішують. Через 5 хв пробірки поміщають на 15-20 с в кип'ячу водяну баню, охолоджують. Вміст дослідної пробірки центрифугують (або фільтрують). В окремі пробірки відбирають по 4 мл.

До 4 мл стандартної проби та дослідного супернатанту додають по 0,2 мл розчину NaOH, перемішують і доводять водою до 10 мл. Через 10 хв проби колориметрують при зеленому світлофільтрі (довжина хвилі 530 нм) у кюветі з товщиною шару 20 мм проти контрольної проби.

Розраховують концентрацію креатиніну (X) за формулою :

$$X = \frac{A_{\text{досл.}}}{A_{\text{ст.}}} \cdot 0,088 \text{ ммоль/л} \quad \text{або} \quad X = \frac{A_{\text{досл.}}}{A_{\text{ст.}}} \cdot 88 \text{ (мкмоль/л)}$$

де: $A_{\text{досл.}}$ – екстинкція дослідної проби;

$A_{\text{ст.}}$ – екстинкція стандартної проби;

0,088 ммоль/л (88 мкмоль/л) – концентрація креатиніну в стандартній пробі.

Зробити висновки.

Клініко-діагностичне значення. Креатинін – кінцевий продукт обміну креатину. Концентрація креатиніну в крові є досить постійною величиною, що відображає м'язову масу і не залежить від харчування та інших факторів. Креатинін не реабсорбується в ниркових каналцях, тому з діагностичною метою використовується його визначення в крові та сечі для оцінки швидкості клубочкової фільтрації нирок.

У нормі вміст креатиніну у жінок – 0,044-0,097 ммоль/л або 44-97 мкмоль/л; у чоловіків – 0,044-0,115 ммоль/л або 44-115 мкмоль/л. Підвищені показники можуть бути на фоні приймання нефротоксичних препаратів, при лейкемії, гемолізі, кетоацидозі, занижені – при жовтяниці.

Підвищена концентрація креатиніну в крові спостерігається при гострих і хронічних захворюваннях нирок, активній акромегалії, гігантизмі, гіпертиреозі. Зниження даного показника може спостерігатись протягом I і II триместрів вагітності, а також при зменшенні м'язової маси (обумовленому віком або м'язовою дистрофією).

Дослід 1. Визначення вмісту сечовини в сечі.

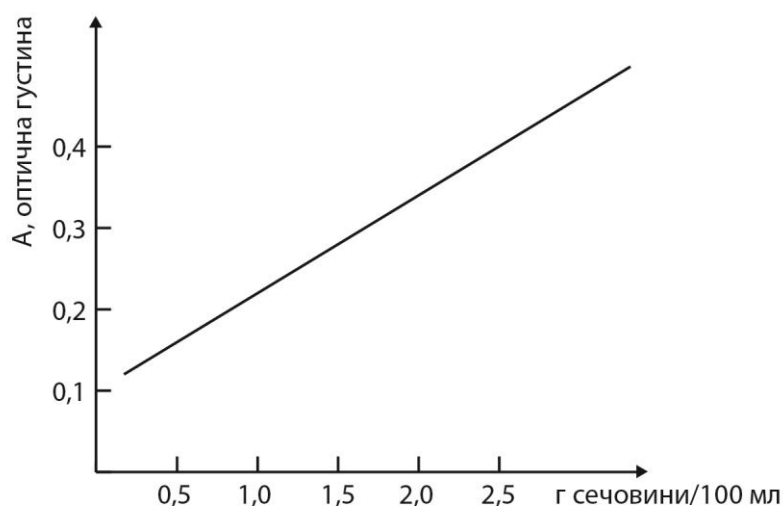
Принцип методу. Метод базується на здатності сечовини, що містить аміногрупи, утворювати з парадиметиламінобензальдегідом в кислому середовищі комплексну сполуку, забарвлену в жовтий колір. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації сечовини в досліджуваній сечі і визначається фотоколориметрично.

Матеріальне забезпечення: сеча; 2 %-ний розчин парадиметиламінобензальдегіду (ПДМАБА); стандартний розчин сечовини (2,5 %); ФЕК, піпетки, мікропіпетки, сухі пробірки.

Хід роботи. У пробірку наливають 0,2 мл сечі, додають 1,2 мл розчину ПДМАБА і ретельно перемішують. Через 15 хв пробу фотометрують в сухих кюветах шириною 3 мм (синій світлофільтр, $\lambda = 450-480$ нм) проти води. Для

визначення вмісту сечовини в сечі користуються калібрувальним графіком. При побудові калібрувального графіку використовують стандартні розчини сечовини (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 г сечовини в 100 мл). Беруть по 0,2 мл кожного стандарту, обробляють так само, як і сечу, і аналогічно фотометрують). Розраховують кількість сечовини в г/добу. Добовий діурез становить в середньому 1500 мл.

Коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (ммоль/добу) дорівнює 16,65.



Пояснити отримані результати. Зробити висновок.

Клініко-діагностичне значення. Синтез сечовини відбувається в печінці (цитозоль і мітохондрії) головним чином з аміаку, який утворюється при дезамінуванні амінокислот, розпаді пуринових і піримідинових нуклеотидів. За добу з сечею здорової людини виділяється 20-35 г або 333-583 ммоль сечовини. В нормі вміст сечовини в сироватці крові становить 3,3- 8,3 ммоль/л.

Відхилення від нормального вмісту залежать від інтенсивності процесів синтезу сечовини та її виведення.

Збільшення вмісту сечовини в сироватці крові є однією з головних ознак порушення видільної функції нирок. Крім того, зростання рівня сечовини у сироватці крові може бути нениркового походження – при втраті організмом рідини (блювання, пронос, зневоднення), при посиленому розпаді білків (гостра жирова дистрофія печінки).

Зменшення вмісту сечовини може спостерігатися при захворюваннях печінки (паренхіматозна жовтяниця, цироз печінки) внаслідок порушення синтезу сечовини в печінці.

Підвищений вміст сечовини у сечі спостерігається при дефіциті білка в їжі, при злоякісній анемії, гарячці, інтенсивному розпаді білків в організмі, після прийому саліцилатів, при отруєнні фосфором.

Знижений вміст сечовини у сечі спостерігається при цирозі печінки, паренхіматозній жовтяниці, нефриті, ацидозі, уремії.

Контрольні питання до практичної роботи теми 15

1. Пояснити принцип визначення креатиніну в сечі кольоровою реакцією Яффе. За яких умов спостерігається збільшення або зменшення кількості креатиніну в сечі?
2. Чому нормативні величини креатиніну для жінок і чоловіків відрізняються?
3. Принцип визначення сечовини в сечі кольоровою реакцією з парадиметиламінобензальдегідом. Який вміст сечовини у крові та сечі здорової людини? Написати реакції утворення сечовини в організмі.
4. У пацієнта зі сечею виділяється 10 г сечовини за добу. Оцініть отриманий показник. Які можливі причини його?
5. У пацієнта вміст сечовини в крові та сечі вище норми. Оцініть отриманий показник. Які можливі причини такого стану?

Інструктивно-методичні матеріали до теми №15

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Загальні шляхи метаболізму безазотистого скелета амінокислот в організмі людини. Глюкогенні та кетогенні амінокислоти.

1.1. Представити схему включення вуглецевих скелетів природних амінокислот у цикл лимонної кислоти. Вказати пункти окислення амінокислот у цитратному циклі

1.2. Дати визначення ключовим словам:

Глюкогенні амінокислоти – це ...

Кетогенні амінокислоти – це ...

Подати у вигляді таблиці поділ амінокислот на глюкогенні, кетогенні та глюко- та кетогенні.

Амінокислоти	Глікогенні	Гліко-кетогенні	Кетогенні
Замінні			
Незамінні			
Частково замінні			
Умовно замінні			

2. Шляхи утворення аміаку. Токсичність аміаку та механізми його знешкодження. Циркуляторний транспорт аміаку (глутамін, аланін).

2.1. Представити головні шляхи утворення аміаку

2.2. Вказати нормальну концентрацію вільного аміаку в плазмі крові і причини гіперамоніємії.

2.3. Вказати молекулярні форми транспорту аміаку з органів і тканин до печінки.

2.4. Описати механізми знешкодження аміаку.

3. Біосинтез сечовини: ферментні реакції; генетичні дефекти ферментів (ензимопатії) синтезу сечовини.

3.1. Дати визначення

Орнітиновий цикл- це...

- 3.2. Написати реакції орнітинового циклу із зазначення їх клітинної локалізації
- 3.3. Описати можливі ензимопатії орнітинового циклу із зазначенням клініко-біохімічних критеріїв цих патологій.
4. Глутатіон, будова та роль в обміні органічних пероксидів.
 - 4.1. Написати формулу глутатіону.
 - 4.2. Представити схему взаємодії глутатіону з пероксидом за участю глутатіонпероксидази та зворотнього відновлення глутатіону за участю глутатіонредуктази. Пояснити значення глутатіону для попередження перекисного окиснення ліпідів.
5. Утворення креатину та креатиніну, клініко-біохімічне значення порушень їхнього обміну.
 - 5.1. Написати реакції I і II стадій синтезу креатину та вказати локалізацію їх перебігу, назвати необхідні для синтезу амінокислоти.
 - 5.2. Написати реакції синтезу креатинфосфату та креатиніну.
 - 5.3. Пояснити клініко-біохімічне значення порушень обміну креатину та креатиніну.

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 15

1. У пацієнта вміст сечовини у добовій сечі становить 75 г. Оцініть отриманий показник. Які можливі причини його?
2. У дитини спостерігаються порушення функцій центральної нервової системи. Клініко-біохімічними дослідженнями виявлено гіперамоніємію та уремію. Попередній діагноз – спадкова гіперамоніємія, зумовлена порушенням синтезу сечовини. Ензимопатія якого ензиму може спричинити це захворювання?
3. У немовля спостерігається креатинурія. Назвати можливі причини даного стану.
4. У пацієнта спостерігається енцефалопатія, причиною якої є гіперамоніємія. Накопичення якого метаболіту спричиняє набряк мозку при цьому. Поясніть механізм розвитку енцефалопатії при гіперамонієміях.
5. Глутамат та аргінін входять до складу лікарських засобів. Поясніть вплив цих амінокислот на функціонування орнітинового циклу.

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	Вільний аміак – токсична речовина, особливо для клітин	А. *Глутамат В. Лізин	

	нервової системи. Вкажіть, яка з наведених амінокислот бере участь у знешкодженні аміаку в тканині головного мозку.	С. Пролін D. Аланін E. Гістидин	
2	Хворому з прогресуючою м'язовою дистрофією було проведено біохімічне дослідження сечі. Поява якої речовини у великій кількості в сечі може підтвердити захворювання м'язів у даного хворого?	A. *Креатину B. Порфіринів C. Сечовини D. Гіпурової кислоти E. Креатиніну	
3	Після травми печінки у хворого з'явилися симптоми отруєння аміаком за типом печінкової коми. Як аміак діє на енергозабезпечення ЦНС?	A. *Блокування ЦТК внаслідок зв'язування альфа-кетоглутарату B. Гальмування гліколізу C. Інактивація ферментів дихального ланцюга D. Гальмування бета-окиснення жирних кислот E. Інгібування окисного фосфорилування	
4	Основна маса азоту з організму виводиться у вигляді сечовини. Зниження активності якого ферменту в печінці призводить до гальмування синтезу сечовини і нагромадження амоніаку в крові і тканинах?	A. Карбамоїлфосфатсинтаза B. Аспаратамінотрансфераза C. Уреаза D. Амілаза E. Пепсин	
5	Хворому з прогресуючою м'язовою дистрофією було проведено біохімічне дослідження сечі. Поява якої речовини у великій кількості в сечі може підтвердити захворювання м'язів у даного хворого?	A. Креатину B. Порфіринів C. Сечовини D. Креатиніну E. Гіпурової кислоти	

Індивідуальна самостійна робота студентів

1. Особливості функціонування орнітинового циклу в нормі та при патології.

Рекомендована література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.
2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірна, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред. Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Іваночко Р.Б., Л.П. Білецька О.Я.Склярів Зміни показників системи l-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2014. – № 1. – С. 66-71.
2. Милославський Д. К. Сучасні погляди на роль і місце лікувально профілактичної дієтики при захворюваннях внутрішніх органів / Д. К. Милославський // Український терапевтичний журнал. - 2016. - № 3. - С. 83-92.
3. Huidobro E JP, Tagle R, Guzmán AM. Estimation of glomerular filtration rate with creatinine. Rev Med Chil. 2018 Mar;146(3):344-350. doi: 10.4067/s0034-98872018000300344. PMID: 29999105
4. Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. JBRA Assist Reprod. 2018 Mar 1;22(1):61-66. doi: 10.5935/1518-0557.20180003.

Тема № 16. Специфічні шляхи обміну амінокислот. Спадкові та набуті порушення специфічних шляхів обміну амінокислот. Аміноцидурії, їх причини та наслідки.

Мета заняття: Знати специфічні шляхи обміну амінокислот. Засвоїти методи визначення фенілпіровиноградної кислоти у біологічних рідинах, вміти інтерпретувати отримані дані.

Актуальність теми: Специфічний обмін амінокислот відіграє суттєву роль у загальному обміні речовин як клітини, так й організму. У результаті обміну амінокислот утворюються біологічно активні сполуки, які у свою чергу регулюють ряд біохімічних та фізіологічних процесів в організмі людини.

Компетентності фахові:

- пояснювати особливості функціонування загальних шляхів метаболізму амінокислот та спеціалізованих перетворень сірковмісних амінокислот та триптофану;
- знати патології азотистого обміну; пояснювати причини їх виникнення;
- вміти трактувати функціонування спеціалізованих перетворень сірковмісних амінокислот та їх порушень;
- вміти трактувати функціонування спеціалізованих перетворень триптофану та зміни в метаболізмі за умови різних патологічних станів;
- пояснювати особливості функціонування загальних шляхів метаболізму безазотистих скелетів амінокислот та спеціалізованих перетворень циклічних амінокислот;
- пояснювати біохімічні основи виникнення і проявів генетичних аномалій обміну циклічних амінокислот та аналізувати причини нагромадження проміжних продуктів їх обміну при фенілкетонурії, алкаптонурії, альбінізмі;
- знати принцип якісної реакції на фенілпіровиноградну кислоту (проба Фелінга), вміти інтерпретувати позитивний результат проби Фелінга;

Базові знання

Дисципліна: біологічна та біоорганічна хімія

Отримані навички: вміти писати послідовності метаболічних реакцій обміну сірковмісних амінокислот, аргініну, триптофану.

Теоретичні питання

1. Спеціалізовані шляхи обміну ациклічних амінокислот. Обмін гліцину та серину. Роль тетрагідрофолату (Н₄-фолату) в переносі одновуглецевих фрагментів. Інгібітори дигідрофолатредуктази як протипухлинні засоби.
2. Особливості обміну амінокислот з розгалуженими ланцюгами; лейциноз.
3. Участь коферментних форм вітамінів Н та В₁₂ в метаболізмі амінокислот з розгалуженими ланцюгами.
4. Специфічні шляхи метаболізму циклічних амінокислот фенілаланіну та тирозину, послідовність ферментативних реакцій.
5. Спадкові ензимопатії обміну циклічних ациклічних амінокислот фенілаланіну та тирозину – фенілкетонурія, алкаптонурія, альбінізм.
6. Обмін сірковмісних амінокислот; реакції метилювання. Роль S – аденозилметіоніну у реакціях трансметилювання. Коензими вітамінів Н та В₁₂ в метаболізмі сірковмісних амінокислот.
7. Обмін аргініну; біологічна роль оксиду азоту, NO – синтаза.
8. Обмін триптофану: кінуреніновий та серотоніновий шляхи.
9. Азотистий баланс організму. Патології азотистого обміну: квашіоркор, аміноацидурії, цистиноз, цистинурія.

Практична робота

Дослід 1. Дослід 1. Проба Фелінга. Якісна реакція на фенілпіровиноградну кислоту.

Принцип методу. Фенілпіровиноградна кислота утворює з іонами трьохвалентного феруму комплексну сполуку, забарвлену у синьо-зелений колір.

Матеріальне забезпечення: сеча хворого на фенілкетонурію, 5 %-ний розчин феруму хлориду, крапельниці, фільтри, піпетки.

Хід роботи. До 2 мл свіжовідфільтрованої сечі наливають 8-10 крапель 5 % розчину FeCl₃. За наявності у сечі фенілпіровиноградної кислоти через 30-60 сек з'являється синьо-зелене забарвлення, яке зникає поступово протягом 5-30 хв в залежності від концентрації фенілпіровиноградної кислоти в сечі.

Клініко-діагностичне значення. Вроджена відсутність у дітей в печінці ферменту фенілаланін-4-монооксигенази призводить до блокування окиснення фенілаланіну в тирозин і, відповідно, всіх подальших метаболічних перетворень тирозину. Нагромадження у крові та тканинах фенілаланіну та продуктів його розпаду, в тому числі фенілпіровиноградної кислоти, викликає інтоксикацію організму. Наслідком цього є порушення нормального розвитку мозку і важкі нервові розлади. Діагностичним критерієм цього спадкового захворювання є підвищений вміст фенілаланіну в крові, наявність

фенілпіровиноградної кислоти в сечі. В нормі концентрація фенілаланіну в крові дітей в середньому становить: до 1 місяця – 0,133 ммоль/л, від 1 місяця до 1 року – 0,095 ммоль/л, від 1 року до 14 років – 0,115 ммоль/л.

Пробу на фенілпіровиноградну кислоту можна проводити на фільтрувальному папері. Смужку фільтрувального паперу змочують сечею, висушують на повітрі і наносять краплю 10% розчину FeCl_3 . Позитивна проба дає синьо-зелене забарвлення. Аналогічну пробу можна проводити на сухій або мокрій дитячій пелюшці.

Контрольні питання до практичної роботи теми 16

1 Принцип методу проби Фелінга (якісна реакція на фенілпіровиноградну кислоту). При якому захворюванні фенілпіровиноградна кислота з'являється в сечі?

2. У лікарню привезли дворічну дитину. Після споживання їжі в неї часто виникає блювота. Дитина відстає у масі тіла, фізичному та розумовому розвитку. Волосся темне, але є сиве пасмо. Проба сечі після додавання FeCl_3 набула зеленого забарвлення. Результати кількісного аналізу сечі такі: вміст фенілаланіну – 7 ммоль/л за норми 0,01; вміст фенілпірувату – 4,8 ммоль/л за норми 0; вміст фенілліактату – 10,3 ммоль/л за норми 0. Про яке порушення метаболізму свідчать отримані дані? Що можна порекомендувати для нормалізації метаболізму стосовно лікувального харчування у цьому випадку?

3. У маленьких дітей хворих на квашіоркор у перші дні після переведення на повноцінну дієту спостерігається втрата ваги. Поясніть причину цього феномену.

Інструктивно-методичні матеріали до теми №16

Алгоритм до підготовки теоретичних питань:

1. Спеціалізовані шляхи обміну ациклічних амінокислот: обмін гліцину та серину; роль тетрагідрофолату (H_4 -фолату) в переносі одновуглецевих фрагментів; інгібітори дигідрофолатредуктази як протипухлинні засоби.

1.1. Написати схему біохімічних перетворень гліцину та серину,

1.2. Описати роль тетрагідрофолату (H_4 -фолату) в переносі одновуглецевих фрагментів

1.3. Написати схему механізму антипухлинної дії сполук, що блокують синтез дТМФ. Пояснити механізм дії похідних птерину: аміноптерину та метатрексату – інгібіторів дигідрофолатредуктази.

2. Особливості обміну амінокислот з розгалуженими ланцюгами; лейцином

2.1. Написати схему трьох реакцій перетворення амінокислот з розгалуженими ланцюгами.

- 2.2. Описати симптоми хвороби кленового сиропу, вказати дефектний ген та відповідний ензим, що відсутній при даній патології.
3. Специфічні шляхи метаболізму циклічних амінокислот фенілаланіну та тирозину, послідовність ферментативних реакцій.

3.1. Написати реакції метаболізму фенілаланіну в мозковій частині наднирникових залоз до катехоламінів.

3.2. Написати реакції метаболізму фенілаланіну в шкірі до утворення меланіну.

3.3. Написати реакції метаболізму фенілаланіну в щитоподібній залозі до утворення тиреоїдних гормонів.

3.4. Написати реакції метаболізму фенілаланіну до ацетоацетату.

3.5. Написати реакції метаболізму фенілаланіну до фенілпірувату і фенілацетату.

4. Спадкові ензимопатії обміну циклічних ациклічних амінокислот фенілаланіну та тирозину – фенілкетонурія, алкаптонурія, альбінізм.

4.1. Написати схему шляхів метаболізму циклічних амінокислот з вказанням пунктів метаболічного блоку, що призводять до виникнення фенілкетонурії, алкаптонурії, альбінізму.

4.2. Дати визначення:

Фенілкетонурія – це...

Алкаптонурія – це...

Альбінізм – це...

4.3. Заповнити таблицю

Ензимопатологія	Частота захворювання В Україні	Нестача ферменту	Біохімічні зміни	Клінічні прояви	Діагностика
Фенілкетонурія	1:7 000 (носійство мутантного гену 2-3%)				
Алкаптонурія	1:60 000				
Альбінізм	1:17 000 - 1:20 000 (1,5%)				

5. Обмін сірковмісних амінокислот; реакції метилювання. Роль S – аденозилметіоніну у реакціях трансметилювання.

5.1. Представити послідовність ферментативних реакцій обміну сірковмісних амінокислот.

6. Коензими вітамінів H та B₁₂ в метаболізмі сірковмісних амінокислот та в метаболізмі амінокислот з розгалуженими ланцюгами.

6.1. Написати схему катаболізму спільного інтермедіату валіну, лейцину та метіоніну – пропіоніл-КоА,

- 6.2. Зазначити участь коферментних форм вітамінів Н та В₁₂ у метаболізмі цих амінокислот.
7. Обмін аргініну; біологічна роль оксиду азоту, NO – синтаза.
- 7.1. Представити схему реакцій обміну аргініну
- 7.2. Написати реакції ферментативного утворення оксиду азоту.
- 7.3. Пояснити механізм функціонування NO – синтази. Дати характеристику різним видам NO – синтаз.
8. Обмін триптофану: кінуреніновий та серотоніновий шляхи.
- 8.1. Представити послідовність ферментативних реакцій обміну триптофану через кінуреніновий та серотоніновий шляхи
- 8.2. Дати характеристику порушення метаболізму триптофану при карциноїдному синдромі
- 8.3. Дати характеристику порушень метаболізму при хворобі Хартнупа
9. Патології азотистого обміну: квашіоркор, аміноацидурії, цистиноз, цистинурія.
- 9.1. Дати визначення ключовим словам:
Квашіоркор – це...
Аміноацидурії – це...
Цистиноз – це...
Цистинурія – це...
- 9.2. Описати причини і прояви аміноацидурій.

Матеріали до самоконтролю

Ситуаційні задачі до теми 16

1. У крові пацієнта віком 50 років спостерігається високий рівень серотоніну, в сечі - різке зростання 5-оксііндоліацетатної кислоти. Порушення метаболізму якої амінокислоти може спричинити такі зміни?
2. Метильні групи (-CH₃) використовуються в організмі для синтезу таких важливих сполук як креатин, холін, адреналін, інші. Яка з незамінних амінокислот, є джерелом цих груп?
3. Людина захворіла на пелагру. При опитуванні стало відомо, що впродовж тривалого часу вона харчувалася переважно кукурудзою, мало вживала м'яса. Дефіцит якої речовини у кукурудзі спричинив розвиток хвороби?
4. У хворого з діагнозом “злоякісний карциноїд” різко підвищений вміст серотоніну в крові. З якої амінокислоти може утворитися даний біогенний амін?
5. Оксид азоту утворюється при участі складної Ca²⁺-залежної ферментної системи, що називається NO-синтазою. З якої амінокислоти утворюється оксид азоту?
6. У крові пацієнта віком 50 років спостерігається високий рівень серотоніну, в сечі – різке зростання 5-оксііндоліацетатної кислоти. Порушення метаболізму якої амінокислоти може спричинити такі зміни?

7. У хворого сеча має специфічний запах кленового сиропу. Який біохімічний дефект є причиною цього захворювання?

Ситуаційна клінічна задача до теми 16

1. Мати однорічної дівчинки принесла її на огляд в педіатричне відділення, оскільки помітила відхилення в розвитку. Також вона зауважила дивний запах сечі малечі та відсутність пігментації волосся та шкіри. Огляд дівчинки підтвердив наявність м'язової гіпотонії та мікроцефалії. Зібрана сеча дитини мала «мишачий» запах.

- Який діагноз можна поставити?
- Порушення яких біохімічних процесів стали причиною гіпопігментації волосся та шкіри?

Приклад вирішення клінічної задачі

Умова	Розв'язок
<p>Дитину принесли на огляд до педіатра через значну затримку розвитку. Батьки не провели пренатальні скринінгові тести. Педіатр призначає генетичне обстеження, яке виявляє дві мутантні копії ферменту, відповідального за гідроксилування амінокислоти, що, в свою чергу, необхідно для синтезу іншої амінокислоти. Назвіть цей фермент.</p>	<p>Відповідь: Фенілаланін-4-монооксигеназа</p> <p>Огляд педіатра підтвердив розвиток у дитини фенілкетонурії (ФКУ). ФКУ належить до спадкових порушень обміну незамінної амінокислоти фенілаланіну (ФА). Дефіцит ферменту фенілаланін-4-монооксигенази чи його кофермента тетрагідротіоптерину призводить до нагромадження ФА в організмі. Рівень ФА в плазмі зростає до 20 мг% вже до кінця першого тижня життя. Далі він підвищується і стабілізується біля 40 мг%. Посилюється виділення з сечею ФА, продуктів його трансамінування: фенілпірувату, фенілоцтової кислоти (спричиняє запах сечі), фенілмолочної кислоти. Ці метаболіти разом з надлишком ФА порушують метаболізм та викликають ушкодження клітин головного мозку. Дитина при народженні виглядає здоровою. Відставання у психічному розвитку може відбуватися поступово і стає помітним тільки через кілька місяців. Ранні симптоми захворювання – блювота, підвищена дратівливість, екзема і судоми. У старшому віці неліковані діти стають гіперактивними, здійснюють безцільні рухи, ритмічні погойдування. При об'єктивному обстеженні привертає увагу те, що дитина виглядає білявою, може бути світла шкіра і блакитні очі. У деяких хворих з'являється себорейна чи екзематозна шкірна висипка. Від них відходить</p>

	незвичний запах фенілоцтової кислоти, який характеризують як запліснявілий, мишачий чи вовчий. Поведінка їх змінена: виглядають то добродушними і привітними, то нервовими і запальними. ФКУ можна ефективно лікувати, зменшуючи споживання ФА і збільшуючи споживання тирозину і за потребою тетрагідроптерин.
--	---

Тести інтегрального іспиту Крок-1

Пояснити, чому вибрана відповідь є правильною, а інші дистрактори є неправильними.

№ з/п	Умова тестового завдання	Правильна відповідь та дистрактори	Пояснення
1	При алкаптонурії у сечі хворого знайдено велику кількість гомогентизинової кислоти (сеча темніє на повітрі). Вроджений дефект якого ферменту має місце?	А. *Оксидази гомогентизинової кислоти В. Аланінамінотрансферази С. Тирозинази D. Фенілаланін-4-монооксигенази Е. Тирозинамінотрансферази	
2	У дитини в крові підвищена кількість фенілпіровіноградної кислоти. Який вид лікування потрібен при фенілкетонемії?	А. *Дієтотерапія В. Вітамінотерапія С. Ферментотерапія D. Антибактеріальна терапія Е. Гормонотерапія	
3	Одна з форм вродженої патології супроводжується гальмуванням перетворення фенілаланіну в тирозин. Біохімічною ознакою хвороби є накопичення в організмі деяких органічних кислот, у тому числі кислоти:	А. *Фенілпіровіноградної В. Лимонної С. Піровіноградної D. Молочної Е. Глутамінової	
4	У дитини грудного віку спостерігається потемніння склер, слизових оболонок, вушних раковин, виділена сеча темніє на повітрі. У крові та сечі виявлено	А. *Алкаптонурія В. Альбінізм С. Цистинурія D. Порфірія Е. Гемолітична анемія	

	гомогентизинову кислоту. Який найбільш імовірний симптом?		
5	При інтенсивній роботі в м'язах утворюється значна кількість аміаку. Яка амінокислота відіграє основну роль в транспортуванні його в печінку та використовується в реакціях глюконеогенезу?	А. *Аланін В. Аргінін С. Лізин А. D. Орнітин Е. Аспарат	

Самостійна індивідуальна робота студентів

Рекомендована література:

1. Шляхи метаболізму фенілаланіну; спадкові ензимопатії обміну фенілаланіну.
2. Порушення метаболізму сірковмісних амінокислот – цистинурія, цистиноз. Гомоцистинурія.

Рекомендована література

Основна:

1. Біологічна хімія: підручник. (ВНЗ IV р.а.)/ Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда та ін. – Київ: Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біохімія. Підручник для студ. фарм. спеціальн. / За ред. А.А.Загайка, К.В.Александрової. – Харків, Форт, 2014. – С. 85-98, 344-351, 358.
4. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.
5. Скляров ОЯ, Фартушок НВ, Бондарчук ТІ. Біологічна хімія. Тернопіль: ТДМУ; 2015. С. 173-99.
6. Скляров ОЯ, редактор. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі. Львів: друкарня ЛНМУ; 2015. 454 с.
7. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “Medicine”, 2021. -544 p.
8. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
9. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
10. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
11. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
12. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
13. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Додаткова:

1. Біохімічні показники в нормі і при патології. Довідник / за ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2007. – 318 с.

2. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О.Я. – Київ: Медицина, 2006. -432 с.
3. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О.Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.
4. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
5. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
6. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірна, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред. Н.О.Сибірної – Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
7. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
8. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.

Наукова фахова:

1. Никонов В. В. Клиническое наблюдение больной с печеночным вариантом острой перемежающейся порфирии / В.В. Никонов, И.Б. Савицкая, В. И. Ивлева // Медицина – 2014. – №3 (58).- С. 154-158.
2. Фоменко І.С. Дослідження впливу нестероїдних протизапальних препаратів на процеси ліпопероксидації та активність NO-синтази в слизовій оболонці шлунка та тканині підшлункової залози / І.С. Фоменко, Т.І.Бондарчук, О.Я. Скляров // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2014. – 21, №2. – С. 207-210.
3. Maruhashi T, Higashi Y. Cardiovascular risk in patients receiving antihypertensive drug treatment from the perspective of endothelial function. Hypertens Res. 2022 May 20. doi: 10.1038/s41440-022-00936-x. Online ahead of print.
4. Armenis I, Kalotychoy V, Tzanetea R, Konstantopoulos K, Rombos I. The effect of endothelial Nitric Oxide Synthase G894T and T786C polymorphisms on Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha expression in Sickle Cell Disease. Nitric Oxide. 2021 Jun 1;111-112:31-36. doi: 10.1016/j.niox.2021.03.004. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33812003

ЛІТЕРАТУРА

1. Біологічна хімія: підручник. / Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда [та ін.]; за ред. І.В.Ніженковської. - Вінниця : Нова книга, 2021. – 648 с.
2. Біохімія людини: підручник / Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук; за ред. Я.І.Гонського. – 3-тє вид., випр. і допов. -Тернопіль: Укрмедкнига, 2020.-736 с.
3. Біологічна хімія: підручник / О.Я.Скляров, Н.В.Фартушок, Т.І.Бондарчук. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2020. – 706 с.
4. Біологічна хімія: навч.- метод. посіб. частина 1 / [О.Я.Скляров, Т.М.Макаренко, Л.П.Білецька та ін.]; за ред. Склярова О.Я. - Видавництво ЛНМУ, 2021. – 185 с.
5. Біологічна хімія: навч.- метод. посіб. частина 2 / [О.Я.Скляров, Т.М.Макаренко, Л.П.Білецька та ін.]; за ред. Склярова О.Я. - Видавництво ЛНМУ, 2018. – 153 с.
6. Біологічна хімія: підручник / за ред. О. Б. Столяр – К.: КНТ, 2020. – 368 с.
7. Клінічна біохімія: у 3 томах; підручник. Т.1. /за ред. Г.Г. Луньової - Львів: Магнолія 2006, 2021. – 400 с.
8. Клінічна біохімія: у 3 томах; підручник. Т.2. /за ред. Г.Г. Луньової - Львів: Магнолія 2006, 2021. – 400 с.
9. Клінічна біохімія: у 3 томах; підручник. Т.3. /за ред. Г.Г. Луньової - Львів: Магнолія 2006, 2021. – 400 с.
10. Посібник з біологічної хімії „Крок-1. Стоматологія”: навч.посіб./ за ред. Склярова О.Я., Гайової А.В. – К.:ВСВ „Медицина”, 2019. – 360 с.

11. Скоробагатова З.М., Сташкевич М.А., Матвієнко А.Г. Біохімія. Короткий курс. Частина 1. Навчальний посібник. – К.: Біокомполіт, 2019. – 148 с.
12. Скоробагатова З.М. Атлас метаболічних шляхів. К.:Академперіодика; 2017. - 76 с.
13. Функціональна біохімія: підручник / Н.О.Сибірня, Г.Я.Гачкова, І.В.Бродяк та ін.; за ред Н.О.Сибірної –Львів, ЛНУ ім.І.Франка, 2018. – 644 с.
14. Biological and Bioorganic Chemistry: in 2 books: Textbook/ Yu.I. Gubsky, I.V.Nizhenkovska, M.M.Korda. – Kyiv:AUS “ Medicine”, 2021. -544 p.
15. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
16. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
17. McKee T., McKee J.R.. Biochemistry. The molecular basis of life. Seventh edition. Oxford University Press, 2019. 448 p.
18. MCQs in biochemistry 2nd edition / A. Ya. Sklyarov et al.: Lviv: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Press, 2020. 319 p.
19. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8-th edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2021. 1328 p.
20. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, co-published with Book and Allied, 2017. 788 p.

Допоміжна:

1. Деякі молекулярні механізми розвитку статин-асоційованої міопатії / А.Л.Загайко, Т.О. Брюханова // Український біофармацевтичний журнал. – 2017. - №3. – С. 4-10.
2. Полювання вчених на коронавірус SARS-COV-2, що викликає COVID-19: наукові стратегії подолання пандемії./ С.В.Комісаренко // Вісн.НАН України. -2020, №8. – С. 29-71.
3. Combs G.F., McClung J.P. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Academic Press; 6th edition.2022. 774 p.
4. COVID-19: cytokine storm and anticytokine therapy. Bondar, M., Pylypenko, M., & Loskutov, O.// EMERGENCY MEDICINE, 2021. - 17(2), 6–13. <https://doi.org/10.22141/2224-0586.17.2.2021.230629>
5. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Rom. — Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 2020. — 467 p.
6. Lehninger A. Principles of Biochemistry / David L.Nelson, Michael Cox. — New York : W. H. Freeman and Company, 2021. — 1260 p.
7. Lieberman M.. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. LWW; 5th edition. 2017. P. 1008
8. Lorch M.. Biochemistry: A Very Short Introduction. Oxford University Press. 2021. 160 p.
9. Major coagulation disorders and parameters in COVID-19 patients/ Azadeh Teimury, Mahshid Taheri Khameneh, Elahe Mahmoodi Khaledi// Eur J Med Res . 2022 Feb 15;27(1):25. doi: 10.1186/s40001-022-00655-6.
10. Miesfeld R.L., McEvoy M.M .Biochemistry. W. W. Norton & Company; Second edition. 2021. 1392 p.
11. Moore J.T., Langley R.H. Biochemistry For Dummies. For Dummies; 3rd edition. 2022. 368 p.
12. Neidle S. Principles of Nucleic Acid Structure / S. Neidle. — 2nd ed. — Academic Press, 2021. — 336 p.
13. Pratt Ch., Cornely K. Essential Biochemistry. Wiley; 5th edition. 2021. 816 p
14. Ronner P., Netter`s Essential Biochemistry. Elsevier, 2018. 482 p
15. Szabo S. COVID-19: New disease and chaos with panic, associated with stress // Праці НТШ Медичні науки. – 2020, т. 59, № 1. – С. 41 – 62.