

ЗМІСТ

Розділ 6. БІЛКИ І АМІНОКИСЛОТИ.....	6
6.1. ОСНОВНІ СТРУКТУРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БІЛКА.....	7
6.2. СИНТЕЗ БІЛКА.....	10
6.3. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ.....	13
6.4. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ БІЛКІВ.....	14
6.5. КЛАСИФІКАЦІЯ ТА ОБМІН БІЛКІВ.....	22
6.6. ПЕРЕТРАВЛЕННЯ, ВСМОКТУВАННЯ ТА ПЕРЕТВОРЕННЯ БІЛКІВ У ОРГАНІЗМІ.....	26
6.7. КІНЦЕВИЙ ЕТАП БІЛКОВОГО ОБМІНУ – НЕБІЛКОВІ АЗОТИСТІ КОМПОНЕНТИ КРОВІ.....	27
6.8. ПОРУШЕННЯ ОБМІНУ АМІНОКИСЛОТ.....	37
6.9. ДИСПРОТЕЇНЕМІЇ.....	43
6.10. ПАРАПРОТЕЇНЕМІЇ.....	51
6.11. ПРОТЕЇНУРІЇ.....	53
6.12. ПРІОННІ ЗАХВОРЮВАННЯ І ХАРЧУВАННЯ.....	55
Тести до розділу “Білки і амінокислоти”.....	58
Відповіді до тестових завдань до розділу “Білки і амінокислоти”.....	60
Література.....	61
Розділ 7. КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ ОБМІНУ ПУРИНОВИХ І ПІРИМІДИНОВИХ МОНОНУКЛЕОТИДІВ ТА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ В ОРГАНІЗМІ ЛЮДИНИ	62
7.1. СКЛАД І КЛАСИФІКАЦІЯ МОНОНУКЛЕОТИДІВ ТА НУКЛЕОЗИДІВ, З ЯКИХ СИНТЕЗУЮТЬСЯ НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ.....	62
7.2. БІОСИНТЕЗ ПУРИНОВИХ ТА ПІРИМІДИНОВИХ НУКЛЕОТИДІВ.....	63
7.3. КАТАБОЛІЗМ ПУРИНІВ І ПІРИМІДИНІВ.....	66
7.4. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕЗУ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДІВ ІЗ РИБОНУКЛЕОТИДІВ.....	68
7.5. ПЕРЕТВОРЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ДО КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ ОБМІНУ.....	68
7.6. ПОРУШЕННЯ БІОСИНТЕЗУ МОНОНУКЛЕОТИДІВ.....	69
7.7. ВРОДЖЕНІ ТА НАБУТІ РОЗЛАДИ ОБМІНУ ПУРИНІВ ТА ПІРИМІДИНІВ.....	70
Запитання до розділу «Клінічна біохімія обміну пуринових і піримідинових мононуклеотидів та нуклеїнових кислот в організмі людини».....	73
Тестові завдання до розділу «Клінічна біохімія обміну пуринових і піримідинових мононуклеотидів та нуклеїнових кислот в організмі людини».....	74
Відповіді на тестові завдання до розділу «Клінічна біохімія обміну пуринових і піримідинових мононуклеотидів та нуклеїнових кислот в організмі людини»:.....	76
Література.....	77
Розділ 8. ПОРФІРИНИ І ПІГМЕНТИ ГЕМУ	83
8.1. ОБМІН ПОРФІРИНІВ У НОРМІ.....	78
8.2. СТАДІЇ БІОСИНТЕЗУ ГЕМУ.....	79
8.3. ПАТОЛОГІЯ ОБМІНУ ПОРФІРИНІВ. ПОРФІРІЇ.....	81
8.4. МЕТАБОЛІЗМ ГЕМОГЛОБІНУ.....	92
8.5. МЕТАБОЛІЗМ БІЛРУБІНУ.....	93
8.6. ПРИЧИНИ ГІПЕРБІЛРУБІНЕМІЇ.....	96
8.7. ПОРУШЕННЯ ОБМІНУ ПІГМЕНТІВ ЗА ПАРЕНХІМАТОЗНИХ ЖОВТЯНИЦЬ.....	97
8.8. ПОРУШЕННЯ ОБМІНУ ПІГМЕНТІВ ЗА ХОЛЕСТАТИЧНИХ ЖОВТЯНИЦЬ (застійних, механічних, обтураційних).....	98
8.9. ПОРУШЕННЯ ОБМІНУ ПІГМЕНТІВ ЗА ГЕМОЛІТИЧНИХ ЖОВТЯНИЦЬ.....	99
8.10. ФУНКЦІОНАЛЬНІ ГІПЕРБІЛРУБІНЕМІЇ (пігментні гепатози).....	100
Запитання до розділу «Порфірини і пігменти гему».....	104
Тестові завдання до розділу «Порфірини і пігменти гему».....	105

Ситуаційні задачі до розділу «Порфірини і пігменти гему».....	106
Відповіді до тестових завдань до розділу «Порфірини і пігменти гему».....	107
Відповіді до ситуаційних задач до розділу «Порфірини і пігменти гему».....	108
Література.....	110
Розділ 9. БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ: БІОГЕННІ АМІНИ, ЕЙКОЗАНОЇДИ, РЕНІН-АНГІОТЕНЗИНОВА СИСТЕМА, КАЛІКРЕЇН-КІНІНОВА СИСТЕМА.....	112
9.1. БІОГЕННІ АМІНИ.....	112
9.2. ПРОСТАГЛАНДИНИ, ТРОМБОКСАНИ І ЛЕЙКОТРИЄНИ.....	121
9.3. РЕНІН-АНГІОТЕНЗИНОВА СИСТЕМА.....	123
9.4. КІНІНИ ТА КІНІНОВА СИСТЕМА.....	128
Запитання до розділу «Біологічно активні речовини: біогенні аміни, ейкозаноїди, ренін-ангіотензинова система, калікреїн-кінінова система».....	131
Тестові завдання до розділу «Біологічно активні речовини: біогенні аміни, ейкозаноїди, ренін-ангіотензинова система, калікреїн-кінінова система».....	132
Ситуаційні задачі до розділу «Біологічно активні речовини: біогенні аміни, ейкозаноїди, ренін-ангіотензинова система, калікреїн-кінінова система».....	134
Відповіді до розділу «Біологічно активні речовини: біогенні аміни, ейкозаноїди, ренін-ангіотензинова система, калікреїн-кінінова система».....	135
Відповіді на ситуаційні задачі до розділу «Біологічно активні речовини: біогенні аміни, ейкозаноїди, ренін-ангіотензинова система, калікреїн-кінінова система».....	136
Література.....	137
Розділ 10. ВОДА І ЕЛЕКТРОЛІТИ.....	138
10.1. ОСМОТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ.....	140
10.2. РОЛЬ МІНЕРАЛЬНИХ РЕЧОВИН В ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ ОРГАНІЗМУ.....	143
Контрольні питання до теми «Вода і електроліти».....	151
Тестові завдання до теми «Вода і електроліти».....	152
Література.....	154
Розділ 11. КИСЛОТНО-ОСНОВНИЙ СТАН ОРГАНІЗМУ ТА ГАЗИ КРОВІ.....	155
11.1. КИСЛОТНО-ОСНОВНИЙ СТАН КРОВІ.....	155
11.2. РІВНЯННЯ ГЕНДЕРСОНА-ГАССЕЛЬБАХА.....	155
11.3. ПОКАЗНИКИ ОЦІНКИ КИСЛОТНО-ЛУЖНОГО СТАНУ І ГАЗІВ КРОВІ.....	156
11.4. БУФЕРНІ СИСТЕМИ КРОВІ.....	157
11.5. РЕГУЛЯЦІЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СТАНУ.....	160
11.6. ОБМІН ГАЗІВ У ЛЕГЕНЯХ.....	164
11.7. АЦИДОЗ І АЛКАЛОЗ.....	165
Запитання до розділу “Кислотно-основний стан організму та газів крові”.....	170
Тестові завдання до розділу “Кислотно-основний стан організму та газів крові”.....	171
Відповіді на тестові питання до розділу “Кислотно-основний стан організму та газів крові”.....	173
Література.....	174
Розділ 12. МЕТАБОЛІЗМ ЗАЛІЗА БІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЗАЛІЗА У ЗАБЕЗПЕЧЕННІ ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ ОРГАНІЗМУ.....	175
12.1. РОЗПОДІЛ ЗАЛІЗА В ОРГАНІЗМІ.....	175
12.2. БІОХІМІЧНІ ТЕСТИ, ЯКІ ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ МЕТАБОЛІЗМ ЗАЛІЗА В ОРГАНІЗМІ ЛЮДИНИ.....	183
Запитання до розділу «Метаболізм заліза»:.....	191
Тестові завдання до розділу «метаболізм заліза».....	192
Ситуаційні задачі до розділу «метаболізм заліза».....	194
Відповіді до тестових задач до розділу «Метаболізм заліза»:.....	195
Відповіді до ситуаційних задач до розділу «Метаболізм заліза».....	196
Література.....	197

Розділ 13. БІОХІМІЯ ВІТАМІНІВ.....	199
13.1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІТАМІНІВ, ЇХ РОЛЬ В ОРГАНІЗМІ ЛЮДИНИ ТА КЛАСИФІКАЦІЯ.....	199
13.2. ЖИРОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ.....	200
13.3. ВОДОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ ТА КОФЕРМЕНТИ.....	205
13.4. ПРИЧИНИ ГІПО- ТА АВІТАМІНОЗІВ.....	211
13.5. ВЗАЄМОДІЯ ВІТАМІНІВ.....	213
13.6. ПРОВІТАМІНИ. АНТИВІТАМІНИ. ВІТАМІНІЗАЦІЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ.....	215
Запитання до розділу «Біохімія вітамінів»:.....	216
Тестові завдання до розділу «Біохімія вітамінів»:.....	217
Ситуаційні задачі до розділу «Біохімія вітамінів»:.....	219
Відповіді на тестові завдання до розділу «Біохімія вітамінів»:.....	221
Відповіді на ситуаційні задачі до розділу «Біохімія вітамінів»:.....	222
Література.....	223
Розділ 14. ЕНЗИМОДІАГНОСТИКА І ЕНЗИМОПАТОЛОГІЯ.....	224
14.1. ОСНОВИ ЕНЗИМОДІАГНОСТИКИ.....	224
14.2. МЕТОДИЧНІ ОСНОВИ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ.....	226
14.3. КЛІНІКО-ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ВИЗНАЧЕННЯ ОКРЕМИХ ФЕРМЕНТІВ.....	227
Запитання до розділу «Ензимодіагностика і ензимопатологія»:.....	247
Тести до розділу «Ензимодіагностика і ензимопатологія»:.....	248
Ситуаційні задачі до розділу «Ензимодіагностика і ензимопатологія»:.....	249
Відповіді до тестових завдань до розділу «Ензимодіагностика і ензимопатологія»:.....	250
Відповіді до ситуаційних задач до розділу «Ензимодіагностика і ензимопатологія»:.....	251
Література.....	252
Розділ 15. ТРАВНА СИСТЕМА.....	253
15.1. ТРАВНІ ФЕРМЕНТИ В РІЗНИХ ВІДДІЛАХ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ, ВКЛЮЧАЮЧИ ЕКЗОКРИННІ ФУНКЦІЇ ПЕЧІНКИ І ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ.....	254
15.2. СКЛАД І ВЛАСТИВОСТІ СЛИНИ ТА ШЛУНКОВОГО СОКУ.....	256
15.3. ЖОВЧ: СЕКРЕЦІЯ, ВЛАСТИВОСТІ.....	262
15.4. СЕКРЕЦІЯ РІДИНИ І ЕЛЕКТРОЛІТІВ.....	264
15.5. АБСОРБЦІЯ ТА ТРАНСПОРТ.....	267
15.6. ГОРМОНИ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ (APUD - СИСТЕМА).....	272
15.7. МАЛЬАБСОРБЦІЯ.....	278
15.8. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ШКТ.....	282
15.9. ВРОДЖЕНІ І НАБУТІ РОЗЛАДИ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ.....	291
15.10. ЕКЗОКРИННІ ФУНКЦІЇ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ.....	297
15.11. ГОСТРИЙ ПАНКРЕАТИТ.....	307
15.12. ХРОНІЧНИЙ ПАНКРЕАТИТ. ЛАБОРАТОРНА ДИФЕРЕНЦІЙНА ДІАГНОСТИКА ПАНКРЕАТИТІВ.....	311
15.13. ПЕЧІНКА І ЖОВЧНА ПРОТОКА.....	317
15.14. ФІЗІОЛОГІЯ, НОРМАЛЬНІ І ПОРУШЕНІ ФУНКЦІЇ ПЕЧІНКИ, МЕТАБОЛІЗМ, СИНТЕЗ, БІОТРАНСФОРМАЦІЯ, ЕКСКРЕЦІЯ.....	319
15.15. ОБМІН БІЛПРОБУНУ. КИШКОВО-ПЕЧІНКОВА ЦІРКУЛЯЦІЯ ЖОВЧНИХ КИСЛОТ.....	330
15.16. ФЕРМЕНТИ ПЕЧІНКИ. АМІНОТРАНСФЕРАЗИ СИРОВАТКИ КРОВІ.....	337
15.17. БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ОЦІНКИ ФУНКЦІЙ ПЕЧІНКИ. СИНДРОМАЛЬНА БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПРОБ ПЕЧІНКИ.....	344
15.18. ФУНКЦІОНАЛЬНА БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНИХ НОЗОЛОГІЧНИХ ФОРМ ЗАХВОРЮВАНЬ ГЕПАТОБІЛІАРНОЇ СИСТЕМИ (ГЕПАТИТ, ЦИРОЗ, ХОЛЕСТАЗ, НЕКРОЗ ТА СПАДКОВА ПАТОЛОГІЯ).....	352
Запитання до розділу «ТРАВНА СИСТЕМА».....	364
Тестові завдання до розділу «ТРАВНА СИСТЕМА».....	365
Відповіді на тестові завдання до розділу «ТРАВНА СИСТЕМА».....	368
Література.....	369

Розділ 6. БІЛКИ І АМІНОКИСЛОТИ

(доктор мед. наук, проф. Липкан Г. М. – НМАПО;

кандидат біол. наук Сілонов С. Б. – НМАПО;

кандидат мед. наук Кривенко Є. О. – НМАПО).

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

АС – азот сечовини

АТФ –аденозинтрифосфорна кислота

АФП – альфа-фетопротейн

Бета-2-МіГ – бета-2-мікроглобулін

ГАГ – глікозаміноглікани

ГГН – гострий гломерулонефрит

ГН – гострий нефрит

ГТХ – глікопротеїд Тамма-Хорсфалла

ГЕВРХ – губчата енцефалопатія великої рогатої худоби

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДНП – дезоксирибонуклеопротейни

ЕФГ – електрофореграма

ЗА – залишковий азот

З - ІОК – 3-індолілоцтова кислота (3- ІОК)

Ig – імуноглобуліни

КІТи – Набори реактивів промислового виготовлення для сатураційного аналізу

М – молекулярна маса білку

Hb – гемоглобін

НС – нефротичний синдром

Hp – гаптоглобін

ВСТУП

Білки – найбільш поширені зі всіх класів біомолекул. Вони знаходяться у складі усіх клітинних компонентів людини, тварин, мікроорганізмів, рослин (ядра, біомембрани, цитоплазма) та міжклітинних структур. Кількість білків *E. Coli* – 3 000, в організмі людини – біля 5 000 000; всього у різних організмах, які входять у біосферу землі – 10^{10} – 10^{12} різних білків [Губський Ю. І., 2000; Липкан Г. Н., 2013, 2019].

6.1. ОСНОВНІ СТРУКТУРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БІЛКУ

У 1838 р. за поданням шведського хіміка Й. Я. Берцеліуса, групу азотвміщуючих органічних речовин, які були виділені із різних рослинних і тваринних тканин назвали “протеазами” (від грецького – protos – перший, головний). Частіше ці високомолекулярні сполуки називають білками, по аналогії з білком курячого яйця, який під час денатурації біліє. Білки займають центральне місце у структурі живої матерії і грають першорядну роль у її функціонуванні. Для живих організмів характерне дуже широке різномайття білкової молекули. Кожний організм відрізняється від іншого унікальним набором білків. Основна маса білків є структурним компонентом клітин, кількісно створюючи більшу частину матеріалу тканин живого організму (до $\frac{3}{4}$ сухої маси клітин).

6.1.1. Функції та склад білків

Білки виконують у організмі ряд різнобічних функцій:

- 1) переносять кисень;
- 2) приймають участь у скороченні м'язів;
- 3) входять до складу гормонів;
- 4) білки – антитіла захищають організм від інфекцій;
- 5) приймають участь у фізичних і хімічних процесах, які лежать у основі життєдіяльності клітин і регулюються каталітично активними білками-ферментами;
- 6) білки є факторами, які знаходяться в основі генетичної інформації, без білків ДНК не може подовжуватися життя;

З великої кількості природних білків (тільки у людини їх знайдено 5×10^6) точна будова відома не більш як для тисячі.

До білків належать біологічні макромолекули з молекулярною масою від 5–6 тисяч до кількох мільйонів кДа.

До складу білків входить: вуглець (карбоген) (50,6–54,5%), кисень (оксиген) (21,5–23,5%), водень (гідроген) (6,5–7,3%), Але на відміну від вуглеводів та ліпідів, білки завжди вміщують азот (нітроген) (15,0–17,6%) та сірку (0,3–2,5%). В незначних кількостях до складу білків можуть входити залізо, йод, магній, марганець, мідь, фосфор, цинк,

Зважаючи на те, що вміст азоту у білках більш – менш постійний (у середньому – 16%), він став критерієм для розробки методів визначення загального білку плазми.

Азот у білку представлений аміногрупою – NH_2 , яка і є основною структурною одиницею білку і відрізняє його від інших сполук. Під час гідролізу білку (шляхом дії лугів, кислот, ферментів) утворюється суміш амінокислот.

Амінокислота вміщує дві основних хімічних складових: карбоксильну групу – COOH та аміногрупу – NH_2 : Це – обов'язкові складові частини амінокислот.

Окрім цих двох груп до складу амінокислот можуть входити гідроксильні радикали, ароматичні кільця, гетероциклічні сполуки, сульфгідрильні групи та т.і. Амінокислоти, які входять до складу білків, відносяться до амінокислот L-ряду. Білки усіх живих організмів складаються з 20 основних амінокислот.

З білку організму людини виділені α -амінокислоти, тобто амінокислоти, у яких аміно- і карбоксильна групи стоять біля одного і того ж вуглецевого атому. В залежності від кількості наявних у молекулі аміних та карбоксильних груп розрізняють наступні амінокислоти:

1) **моноаміномонокарбовні**: гліцин, аланін, серин, треонін, валін, лейцин, ізолейцин, цистин і цистеїн;

2) **моноамінодикарбовні**: аспарагінова, глутамінова. Амідні цих кислот мають велике значення в обміні речовин.

3) **диаміномонокарбовні**: лізин, оксилізін, аргінін, орнітин;

До групи ароматичних амінокислот відносять фенілаланін, тирозин, триптофан і тиронін (який входить тільки до складу тіреоглобуліну).

До складу молекул амінокислот можуть входити або однакова кількість карбоксильних і амінних груп, або одна з них може кількісно переважати. Тому водні розчини моноаміномонокарбонових кислот мають нейтральну реакцію, моноамінодикарбонових кислот – кислу, а діаміномонокарбонових кислот – лужну.

У водному розчині група COOH віддає атом водню та діє як кислота ($-\text{COO}^-$). Група NH_2 , зв'язуючи іони водню, набуває лужних властивостей ($-\text{NH}_3^+$).

Кислотно-лужними властивостями амінокислот визначаються і фізико-хімічні властивості білків, від яких залежать методи їх розділення, ідентифікації, кількісного аналізу.

Кристалічні амінокислоти плавляться або руйнуються при високих температурах (вище за 200°C). Більшість їх добре розчиняється у воді, має невиражений солодкуватий смак. Усі амінокислоти, виключаючи гліцин – оптично активні.

Функціональні групи амінокислот ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$) та їх бокових ланцюгів можуть вступати у реакції одна з іншою, з ліпідами, вуглеводами, а також у реакції, які призводять до утворення амідів, складних ефірів та інших органічних сполук.

Виявлені специфічні реакції, які призводять до утворення пофарбованих комплексів, що дозволяє ідентифікувати окремі амінокислоти.

Ні одна з амінокислот не поглинають світла у видимій області спектру і лише три з них – тирозин, триптофан і фенілаланін мають значне поглинання в ультрафіолетовій області (275–285 нм). Всі інші амінокислоти поглинають світло у області 220 нм.

Молекули білків мають від 50 до 2500 амінокислотних залишків. У одному ланцюжку їх буває до 600. Амінокислоти зв'язані пептидним зв'язком, який представляє собою амідний зв'язок, утворений під час взаємодії α -карбоксильних і α -аміногруп сусідніх амінокислотних залишків (з утворенням молекули води). За хімічною структурою пептидний зв'язок є ковалентним, дуже міцним і може бути виявлений хімічною (біуретовою) реакцією.

Побудовані таким чином полімери називають пептидами, а приставки ди-, три-, тетра- відповідають кількості залишків амінокислот у їх молекулах. Речовини, які включають 20 і більше амінокислот утворюють поліпептиди.

Визначення поліпептиду завжди починають з амінокислоти, яка несе вільну аміногрупу (N – кінцевої амінокислоти), і завершують амінокислотою, яка має вільну карбоксильну групу (C – кінцевою амінокислотою).

Деякі пептиди, які складаються з 8–11 та більше амінокислотних залишків, синтезовані і добре вивчені. Їм часто притаманні специфічні функції та чітко виражена специфічна біологічна активність.

В залежності від специфічної дії та походження пептиди розділяють на чотири групи: 1) пептиди, яким притаманна гормональна активність: вазопресин, глюкагон, кальцитонін, меланостимулюючий гормон, окситоцин, рилізінг-фактори, АКТ (адренкортикотропін);

2) пептиди, які приймають участь у процесах травлення: гастрин, секретин;

3) вазоактивні пептиди, які регулюють судинний тонус, кров'яний тиск, функцію дихання (ангіотензин, брадикінін, калідин);

4) нейропептиди.

6.1.2. Структура молекули білка

В молекулі білку вивчені чотири рівні організації (структури): первинна, вторинна, третинна, четвертинна структура.

6.1.2.1. Первинна структура білка

Основу первинної структури складає ковалентний зв'язок, тому поряд с терміном “первинна структура” застосовується термін “ковалентна структура”.

Первинна структура білка визначається складом, послідовністю і кількістю амінокислот. У зв'язку з тим, що можна велику кількість разів переставляти, міняти склад і кількість амінокислот, то і кількість можливих первинних структур білка неможливо обчислити.

Суттєвим підтвердженням поліпептидної теорії будови білків є можливість чисто хімічними методами проводити синтез білків з вже відомою структурою. В наш час розшифрована первинна структура біля 1000 різних білків. Першими з них були інсулін, який включає 51 амінокислотний залишок, рибонуклеаза (124 залишки), лізоцим (121 залишок), міоглобін (153), гемоглобін (α -ланцюг – 141; β -ланцюг – 146), цитохром (104 амінокислотних залишка).

Кожний індивідуальний гомогенний білок має унікальну первинну структуру. Заміщення амінокислот призводить до структурних перебудов і зміни фізико – хімічних властивостей білків. В деяких ферментах, яким притаманні схожі властивості, зустрічаються і ідентичні пептидні структури, частіше за все у їх активних центрах (трипсин, хімотрипсин).

Амінокислотний склад білків суттєво відрізняється один від іншого.

6.1.2.2. Вторинна структура білка

Визначається впорядкованим розміщенням пептидних ланцюгів утворених пептидними зв'язками. Утворення цих зв'язків зумовлює ряд просторових (3D) конформацій (структур) укладки поліпептидного ланцюга в ході фолдингу, що є результатом взаємодії функціональних груп, які є його компонентами, положення яких фіксоване водневими та дисульфідними зв'язками. Сульфгідрильні групи (-SH) цистеїну здатні взаємодіяти одна з іншою у внутрішньому просторі молекули з утворенням дисульфідного з'єднання, притягуючи тим самим деякі частини поліпептидного ланцюга один до іншого і укорочуючи його. Відомі хіміки Л. Полінг (двічі лауреат Нобелівської премії) і Корі встановили, що більша частина білкових ланцюжків скручена у вигляді спіралі. Термін "вторинна структура" відноситься як до витягнутої і спіралью скрученої конформації поліпептидних ланцюгів – α -спіраль, так і до β -структур. Більшість білкових молекул мають α -спіраль де на один виток α -спіралі припадає 3,6 амінокислотних залишка та у якій кожен атом водню притягується до негативно зарядженого атому кисню водневими зв'язками. Водневі зв'язки не міцні легко рвуться без залучення значної кількості енергії, але забезпечують стабільність макромолекул завдяки своїй багаточисельності. Не міцні водневі зв'язки дозволяють утворювати комплекс двох молекул. Зв'язки такого типу утворюються між ферментом і субстратом, антигеном і антитілом, транспортною та інформаційною РНК. Кількість спеціалізованих частин ланцюга залежить від конформації білка. α -Спіральна структура – найбільш стійка конформація пептидного скелету, що відповідає мінімуму вільної енергії.

Деякі білки також утворюють структури складчастого типу – β -структури (β -складчастий шар) за рахунок утворення множини водневих зв'язків між атомами пептидних груп лінійних областей одного поліпептидного ланцюга, що утворює згини, або між різними поліпептидними ланцюгами. (зигзагоподібну, витягнуту), які більш характерні для фібрилярних білків (кератин волосся), але зустрічаються і у деяких ферментів (карбоксіпептидази).

α -Спіраль, та β -структури виявлені в глобулярних і фібрилярних білках. За вмістом α -спіралей та β -структур білки відносять до одного з 4 типів. I тип – вторинна структура представлена виключно α -спіралями (гемоглобін, міоглобін). II тип – поєднує наявні α -спіралі, та β -структури. III тип – представлений виключно β -структурами (супероксид-дисмутаза). IV тип – містить незначну кількість регулярних вторинних структур, що дає можливість згинатись і тим самим змінювати конформацію.

Окремим видом вторинної структури є суперспіраль колагену, що утворена 3 спіралізованими ланцюгами тропоколагену. На один виток цієї суперспіралі припадає 3,3 амінокислотні залишки.

6.1.2.3. Третинна структура білка

В нативному стані білкам притаманна дуже компактна високоспецифічна структура, яка власне і зумовлює ферментативну активність білків. Таким чином під третинною

структурою мається на увазі спосіб орієнтації поліпептидного ланцюга з наявною вторинною структурою, його розміщення у просторі. Спіраль згинається, закручується завдяки дії іонних, водневих, гідрофобних зв'язків, та взаємодій, які виникають між вільними аміногрупами, а також у результаті намагання всього ланцюга змінити напрям у точках, де стабільність α -структури порушена. Кількість і розміщення у молекулі білка дисульфідних зв'язків впливають на стабілізацію його третинної структури. Суттєвим фактором в утворенні третинної структури є наявність в молекулі білка гідрофобних часточок, які утворюються неполярними аміногрупами. Ці частини молекули, відштовхуючись від наявних біля них молекул води, починають взаємодіяти одна з іншою у внутрішньому просторі білкової молекули.

Загальна формула молекули білка пов'язана з його функціональною і структурною роллю у клітині.

Фібрилярні білки – це білки, молекули яких утворюють подовжені волокна у структурі тканин, як правило, несуть значне механічне навантаження. Мають відносно незначну кількість звивів, петель.

Глобулярні білки – мають сферичну форму, більш налагоджену для взаємодії з невеликими молекулами або для вбудови у мембрани. В молекулах таких білків переважають альфа-спіралі або бета-структури, петлі та звиви ланцюгів, закріплені дисульфідними містками, що надають їм форму заплутаного клубка.

6.1.2.4. Четвертинна структура

Її мають складні білки, які формуються з багатьох поліпептидних ланцюгів (субодиниць). Субодиниці можуть бути однаковими, або відрізнятися за амінокислотним складом. Наприклад, глутаматдегідрогеназа складається із восьми однакових субодиниць, розгалужити які можна звичайним розбавленням. Лактатдегідрогеназа і гемоглобін включають по чотири різні субодиниці і активні тільки при об'єднанні всіх чотирьох субодиниць. Субодиниці структурно залежать одна від іншої. Модифікація однієї з них впливає на третинну структуру інших трьох. Це явище лежить в основі алостеричного ефекту, який відомий для деяких ферментів.

“Активна” структура носить назву нативної конформації білка. Вона визначає фізико-хімічні властивості білка, його специфічність і функцію. В той же час структура багатьох білків визначається їх функцією. В цьому можна впевнитись на прикладі структури ферментів, імуноглобулінів, транспортних білків плазми і т.і.

6.2. СИНТЕЗ БІЛКА

Синтез білка є однією з центральних проблем біології. У результаті багаточисельних експериментів встановлено, що носієм спадкової інформації є ДНК. Закодована у хімічній структурі ДНК генетична інформація трансформується у фенотипові ознаки живих організмів, які передаються у спадок. ДНК програмує синтез білків, які визначають специфічність структури тканин і органів.

6.2.1. Нуклеїнові кислоти

Детальний опис структури ДНК був зроблений у 1953 р. Дж. Уотсоном та Ф. Кріком. За даними рентгеноструктурного аналізу вони розробили макромолекулярну модель структури ДНК, за якою молекула ДНК має два ланцюга мононуклеотидів, які утворюють подвійну спіраль з однією для двох ланцюгів віссю. Остовом кожного ланцюга є залишки фосфорної кислоти і дезоксирибози, які вбудовані одна за іншою. Пентоза і кислота знаходяться зовні. До вуглецевих залишків приєднуються аденін А, гуанін Г, цитозин Ц, тимін Т. Обидва ланцюги зв'язані один з іншим через посередництво азотистих основ водневими зв'язками. Водневі зв'язки направлені від NH_2 – групи аденіну до OH – групи тиміну і від

NH₂ – групи гуаніну до OH – групи цитозину. В одному ланцюгу мононуклеотидів послідовність основ може бути любою, а в іншій вона знаходиться у запрограмованій послідовності від послідовності азотистих основ у першому ланцюгу. Тому, якщо аденіну першого ланцюга відповідає тимін другого, то тиміну першого – аденін другого (**правило комплементарності Чаргаффа**). В кількісному відношенні A = T і G = C. Нитки у ДНК – антипаралельні.

Описані вище нуклеїнові кислоти входять у складу нуклеопротейнів як простетичні групи. Це складні, викомолекулярні сполуки. Під час їх гідролізу утворюються пуринові та піримідинові основи, пентози і фосфорна кислота. За характеристикою пентози, які входять до складу нуклеїнових кислот, їх поділяються на дві групи – рибонуклеїнові (РНК) і дезоксирибонуклеїнові (ДНК).

До складу молекули ДНК входять аденін, гуанін (пуринові основи), цитозин, тимін (піримідинові основи) дезоксирибоза (рибоза з видаленою групою OH) і фосфорна кислота. Молекулярна маса ДНК складає 4–6 мільйонів.

До складу молекули РНК входять аденін, гуанін, цитозин, урацил (замість тиміну), рибоза і фосфорна кислота.

Серед рибонуклеїнових кислот виділяють декілька форм. Молекулярна маса РНК складає 25 000–30 000 кДа, іноді досягаючи 2 000 000 кДа, молекули їх побудовані з 5–6 тисяч мононуклеотидів. три форми РНК: інформаційну (іРНК), транспортну (тРНК) і рибосомну (рРНК).

Нуклеїнові кислоти – це полімери нуклеотидів. Мононуклеотид вміщує вуглевод, фосфорну кислоту і одну з основ. Кількість мононуклеотидів, які знаходяться у складі молекул нуклеїнових кислот, різні. Окремі мононуклеотиди у молекулі нуклеїнової кислоти зв'язані один з іншим дієфірним зв'язком (зв'язок пентози з фосфорною кислотою).

Кожен ланцюг подвійної спіралі може бути матрицею для побудови комплементарного ланцюга (за участю ферменту ДНК-полімерази). Запропонована робоча гіпотеза згідно з якою основи ДНК є носіями коду, тобто інформації про структуру того чи іншого білка, який синтезується у даній клітині. Генетична інформація знаходиться у хДНК (хромосомній ДНК). Сама ДНК безпосередньої участі у синтезі білка не приймає, але визначає точну послідовність амінокислот у різних білках. Вона повністю локалізована у ядрі і лише незначна кількість може бути у мітохондріях. Для одного біологічного виду кількість ДНК однакова у всіх соматичних клітинах. Для кожного організму характерний визначений нуклеотидний склад ДНК.

В сперматозоїдах і ядрах соматичних клітин ДНК зв'язана з гістонами та протамінами.

6.2.2. Синтез білка частково проходить у цитоплазмі та ядερцях при наявності необхідного набору амінокислот, АТФ, гуанозинтрифосфорної кислоти, ферментів, суворо специфічних для кожної амінокислоти, розчинної низькомолекулярної ДНК. В наш час виділені основні напрямки передачі генетичної інформації, які включають: а) реплікацію – синтез ДНК на матриці ДНК при участі ДНК-полімерази; б) транскрипцію – синтез іРНК на матриці ДНК за участі ДНК-залежної РНК-полімерази. Інформація щодо цього білка, закодована у лінійній послідовності нуклеотидів, переноситься з ДНК на іРНК. Ланцюг іРНК представляє собою точну копію одного із ланцюгів ДНК. Але, замість дезоксирибози в її склад включена рибоза, замість тиміну – урацил; в) трансляцію, переклад інформації яку має іРНК, на “мову” білка.

У 70-ті роки минулого століття було встановлено, яким чином чотири азотистих основи (А, Г, Ц, Т) відповідають за синтез білка, якщо до його складу можуть включатися виключно 20 різних амінокислот. Було доведено, що тасмниця коду була закладена у чіткому співвідношенні нуклеотидів. Розміщення сполучень амінокислот у поліпептидному ланцюгу визначається хімічним складом іРНК, у якій знаходиться по три нуклеотиди, які кодуєть одну амінокислоту. Ці ділянки одержали назву **кодонів** чи **триплетів**. Чотири варіанти основ

можуть утворювати комбінації по три 64 рази, тобто утворюють 64 кодони. Було встановлено, що кожний кодон відповідає конкретній амінокислоті.

Синтез білка проходить у рибосомах, які, рухаючись поруч з іРНК, зчитують генетичну інформацію, тому у рибосомі є дві ділянки: одна (пептидильна) – для зв'язування амінокислот, друга (аміноацильна), яка зв'язує тРНК з іРНК.

За 1 секунду у білок включається 200 000 залишків амінокислот. тРНК вносить активовані амінокислоти у рибосому (у пептидильну ділянку), де вони з'єднуються одна з іншою у необхідній послідовності, утворюючи поліпептидний ланцюг. Цей процес проходить у кодованому порядку тільки тоді, коли триплет тРНК приєднується до відповідного антикодону іРНК. Специфічність кожного кодону пов'язана, в основному, з послідовністю перших двох нуклеотидів, третій нуклеотид менш визначальний.

6.2.3. Регуляція синтезу білка

Клітини живих організмів здатні синтезувати значну кількість різних білків, але дуже специфічних, необхідних клітині. Синтез білка регулюється зовнішніми і внутрішніми умовами, що диктують клітинам кількісний і якісний склад білка, необхідний для виконання фізіологічних функцій.

Відомо, що у біосинтезі білків приймають участь три типи генів: структурні, ген – оператор і ген – регулятор.

6.2.4. Структурні гени визначають первинну структуру білка, який синтезується. У ланцюгу ДНК вони служать матрицею для біосинтезу іРНК, яка надходить у рибосому і являється матрицею для синтезу білка.

Синтез іРНК на структурних генах ДНК контролюється конкретною часткою – транскриптом. **Транскриптон** – це одиниця транскрипції, що являє собою ділянку між промотором і термінатором утворену переважно одним геном – оператором. Він слугує пусковим механізмом для функціонування структурних генів. Діяльність оперона знаходиться під контролем іншої частки ланцюга ДНК-гена-регулятора. У зв'язку з тим, що ген-регулятор і структурні гени знаходяться у різних частинах ланцюга ДНК, зв'язок між ними здійснює посередник – речовина білкового або іншого характеру, названа репресором.

Репресор може зворотно з'єднуватись з оператором, блокуючи синтез іРНК і через нього – білка. Ген-регулятор через репресор запускає або зупиняє діяльність структурних генів. Зв'язуючись з низькомолекулярними речовинами, названими індукторами і ефекторами, репресор втрачає можливість зв'язування з геном-оператором, який виходить з під контролю гена-регулятора, внаслідок чого починається синтез іРНК. При цьому індуктор викликає зміни структури білка репресора. Якщо репресор (білок з молекулярною масою більш як 150 000 кДа) не зв'язаний з індуктором, він блокує ген-оператор і синтез іРНК припиняється. Метаболіти, зв'язуючи репресор, перетворюють його в неактивну форму. Структурні гени виходять з-під контролю і починають синтезувати необхідну іРНК.

У клітинах, які диференційовані, наявний більш тонкий механізм контролю діяльності РНК і синтезу білка. Синтез білка фактично знаходиться в залежності від репресора. Навколишнє середовище, гормони, можуть загальмувати синтез білка або індукувати, тобто активувати ген-оператор.

На синтез білка впливають також інші фактори (антибіотики, етиловий спирт та інші хімічні речовини, інфекції, радіація), внаслідок чого виникають зміни у послідовності амінокислотного складу у молекулі білка – мутації. Можливо, що за неправильне розміщення амінокислот відповідає іРНК. Генна мутація викликає значні зміни у властивостях білків (наприклад, гемоглобінопатії). Особливо часто ці зміни виявляються під час дослідження активності ферментів.

Порушення практично любого ланцюга, який приймає участь у синтезі білка, завжди призводить до патологічних змін. Клінічні прояви хвороби визначаються природою і функцією білка, синтез якого порушений.

6.3. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ.

Білки – високомолекулярні полімери. Розчиняючись у воді, вони утворюють не істинні, а колоїдні розчини, тому що розміри білкових молекул такі ж, як і розміри колоїдних частинок (0,001–0,1 нм). Значна частина білків не розчиняється у воді, тому при виділенні білків із тканин або біологічних рідин застосовують слабкі розчини солей, кислот, лугів.

Розчинність білків визначається їх природою, конформацією. Для білків характерна висока в'язкість розчинів, незначна дифузія, здатність до набухання. Розчини білка мають всі властивості колоїдних розчинів: у відбитому світлі вони здаються мутними (виникає опалесценція, дають ефект Тиндаля); частинки білка не можуть проникати скрізь штучні мембрани (целофан, колоїд), і біомембрани рослинних та тваринних тканин. Колоїдні розчини білків стійкі. Ці їх властивості широко використовуються у лабораторній діагностиці з метою їх виявлення та розділення.

Білки, які мають високу спорідненість до води і молекули яких найбільш гідратовані, легко розчиняються. Гідратація білків обумовлена полярними властивостями молекул води. Диполі води обгортають частинки у вигляді водної (гідратної) оболонки. Поступово ця оболонка перетворюється у неорієнтовану водну субстанцію. Гідратація визначає сутність розчинності різних речовин у воді.

Білки є основними сполуками у живому організмі, які зв'язують воду. Мірою їх гідратації і розчинності слугує співвідношення полярних (гідрофільних) і неполярних (гідрофобних) груп. До полярних відносяться групи -ОН, -NH₂, -СО, -СООН. Розчинність білків знаходиться у прямій залежності від кількості полярних білкових ланцюгів і їх заряду. Маючи різний амінокислотний склад, в залежності від переважання в їх молекулах дикарбонових (глутамінової, аспарагінової) або діаміномонокарбонових (лізину, аргініну) амінокислот у водних розчинах вони мають властивості слабких кислот або основ. Більшість природних білків (альбуміни, глобуліни) мають кислотний характер у водному розчині і несуть негативний заряд. Білки основного характеру мають позитивний заряд.

Під час додавання кислоти до водного розчину білку його кислотна дисоціація знижується. Якщо білок має кислотний характер, то може наставати момент, коли кислотна дисоціація дорівнює основній. Частинка білка буде мати однакову кількість позитивних і негативних зарядів. Значення рН, при якому заряд білку електронейтральний, називають ізоелектричною точкою та позначають pI. Ізоелектрична точка білка залежить від кількості і природи заряджених груп у молекулі. Молекула білка заряджена позитивно, якщо рН < pI, і негативно, якщо рН > pI. В ізоелектричній точці білок не переміщається ні до аноду, ні до катоду, він легко випадає в осад, тому що при знятті заряду призупиняється взаємодіювання частинок. Ці властивості білків широко застосовуються для фракціонування і виділення окремих компонентів суміші білків.

Продовжуючи добавляти кислоту, можна зміти кислотну дисоціацію ще більше і білок набуває позитивного заряду. Частинки білка перезаряджаються.

Ізоелектрична точка є важливою характеристикою білків. У більшості білків вона знаходиться у межах рН = 5,5–7,0 (але у пепсині, наприклад, рН = -1). Білки можна розрізнити за ізоелектричною точкою.

Нейтральні солі у низьких концентраціях підвищують розчинність білків, у високих – зменшують і викликають утворення осаду. Нейтральні солі – віднімають воду. Під дією концентрованих розчинів нейтральних солей білки висолюються. Якщо до осаду, який утворився під час висолювання осаду долити воду, білки знову розчиняються. При цьому у

структурі білків змін немає. Метод висолювання широко застосовується у лабораторіях для виділення та ідентифікації білків та їх фракцій.

Нейтральні солі здатні підвищувати розчинність білків за рахунок електростатичної взаємодії іонів цих солей з зарядженими групами білків. Кожна іонна група білка має шар сольових іонів протилежного заряду. Розчинність білків підвищується при додаванні гліцину. Гліцин – амінокислота, найменша за розмірами у порівнянні з іншими амінокислотами. Її розмір – 0,42 нм. Вона не набагато більша за розмірами, ніж молекула води (0,3 нм) і у 2,3 (0,95; 0,42) разів менша молекули АТФ [Чекман І. С., 2009].

Під дією етилового спирту, ефіру, ацетону (розчинників, які знижують діелектричну постійну води) – розчинність зменшується. Ці властивості застосовують для фракціонування білків плазми крові. Під час зниження температури розчинність білків плазми зменшується, але якщо для висолювання застосовують сульфат натрію, то, навпаки, при зниженні температури розчинність підвищується, тому що у цьому випадку сульфат натрію у розчині кристалізується і його концентрація зменшується. Висолювання сульфатом натрію проводять при температурі 20 °С і ненабагато вище.

У середовищі, рН якого нижче ізоелектричної точки, білок зв'яже значну кількість негативних (СГ) а в лужньому середовищі – позитивних (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) іонів. Під дією різних впливів – температури, хімічних факторів (солей важких металів, концентрованих кислот, сечовини), радіоактивного опромінення, зміни рН – білки можуть підлягати структурним змінам, втрачати нативні властивості, тобто змінюються до денатурації.

6.3.1. Денатурація – втрата білками першорядних властивостей внаслідок змін просторової структури молекул. Під час денатурації втрачається серологічна специфічність активності ензимів, білки втрачають здатність утримувати O_2 та Hb . Змінюється форма, об'єм, антигенна активність молекул, втрачається їх здатність поглинати світло, змінюється розчинність, електрофоретична рухливість, кількість функціональних SH-груп, підвищується в'язкість білкових розчинів. Більшість білків денатуруються при температурі більш як 50–60 °С. Під час денатурації руйнуються, в основному, нековалентні зв'язки, тому остов поліпептидного ланцюгу залишається, утворюючи безладні структури. Процес денатурації незворотний, але при дії денатуруючого агенту короткий час, можливе повернення до попередньої структури.

На процесах висолювання та денатурації основані реакції ідентифікації, виявлення та кількісного визначення білків. У лабораторній практиці білки осаджують нагріванням у слабкокислому середовищі, органічними розчинниками (ацетоном, етиловим спиртом, ефіром), концентрованими мінеральними кислотами і найбільш часто – органічними кислотами (сульфосаліциловою, трихлороцтовою) і солями важких металів.

Молекулярна маса білка (M) є фізичною константою, яка визначає його фізико-хімічні властивості. Вона може бути визначена гравіметричними, осмометричними, оптичними, електрофоретичними методами. Часто застосовують методи седиментаційного аналізу.

Значно простіше визначити молекулярну масу білка (M) методом тонкошарової гель-фільтрації. Шлях, який проходить білок крізь шар сефадексу, знаходиться у логарифмічній залежності від молекулярної маси білка. Знаючи M декількох відомих білків, можна зв'язати її з пройденим шляхом, побудувати графік і визначити M невідомого білка. При цьому немає необхідності виділяти цей невідомий білок у чистому вигляді. Таким чином, ідентифікувати білки можна за їх молекулярною масою.

6.4. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ БІЛКІВ

Вивчення білків починається з їх виділення. З метою виділення і очистки розчинних білків, їх екстрагують з клітин, після чого осаджують, міняючи концентрацію солей, рН середовища або добавляючи органічний розчинник. За допомогою цих методів у більшості

випадків одержують білки у кристалічному вигляді. Більшість білків дуже чутливі до нагрівання, дії кислот та лугів. Щоб не допустити денатурацію білка, в процесі його виділення необхідно працювати при низьких температурах. Швидкість денатурації зменшується при додаванні нейтральних солей, тому більшість білків зберігають у насичених розчинах солей у холодильнику. Для роботи використовують центрифуги з охолодженням і холодні кімнати. При низьких температурах зменшується також загроза негативної дії на білки бактерій. Найкращий спосіб довготривалого зберігання розчинів білків – заморозка та зберігання білків у холодильнику при температурі від -18°C до -20°C . Біологічна активність препаратів при цьому практично не змінюється. Необхідно пам'ятати, що розчини деяких білків (ліпопротеїдів, антитіл) при багаторазовій заморозці та розморожуванні можуть піддаватись денатурації.

З метою виділення розчинних білків раніше широко застосовували метод фракціонування у нейтральних солях сульфату амонію. Пізніше був запропонований метод фракціонування за допомогою органічних розчинників. Виділення чистих білків у ряді випадків прискорюють за допомогою вибіркової денатурації окремих білків суміші. В подальшому одержану фракцію білка часто необхідно очистити від солей і і сконцентрувати. З метою очистки екстрактів білку сечі від солей необхідно провести діаліз, тобто відокремити високомолекулярні компоненти (білки) від низькомолекулярних солей.

Найкращим матеріалом для діалізу є целофан, розміри пор якого стандартні. При найбільш простому способі діалізу целофановий мішечок з розчином білка (сечі) поміщають у великий об'єм дистильованої води. Завдяки великій щільності солі швидко “стікають” вниз і переміщуються з мішечка в дистильовану воду, внаслідок різниці у градієнті концентрації з обох боків мембрани.

Після діалізу розчину білка його необхідно сконцентрувати. Великі об'єми піддають ліофільній сушці на відповідному обладнанні (зразок заморожують та повільно розморожують в умовах вакууму). Невелику кількість піддають процесу вивітрювання. Для цього целофановий (діалізний) мішечок з білком обдувають повітрям з вентилятора.

Можна сконцентрувати розчини білків шляхом повторної заморозки і відтанення. Кристали льоду, в яких немає білка, спливають на поверхню розчину. Розчин білка який загустів, зливають. Повторюючи цю операцію кілька разів, можна досягти високої концентрації білка. Таким чином були одержані кристали гемоглобіну. Найкращим методом концентрування значних об'ємів білка є його ліофілізація.

В останні роки широко концентрують білки на сефадексах (різні типи декстранових гелів).

Методи розділення білків основані на використанні розбіжностей у їх фізико-хімічних властивостях: молекулярній масі, величині заряду, розчинності, абсорбції, ізоелектричній точці.

Для розділення і ідентифікації білків застосовують перелік методів: електрофорез, хроматографія, ультрацентрифугування, імунохімічні методи, мембранна фільтрація.

6.4.1. Електрофоретичні методи

Електрофоретичні методи аналізу широко застосовуються у клініко-діагностичних лабораторіях.

Електричний заряд білків у залежності від рН середовища може бути позитивним або негативним, тому у електричному полі молекули рухаються або до аноду, або до катоду. Це явище було застосоване Тізеліусом з метою розділення окремих компонентів суміші білків, зокрема з метою вивчення білкових фракцій крові.

Рух молекул білка в електричному полі залежить від багатьох складових: відстань, на яку вони рухаються від стартової лінії, визначається величиною заряду, молекулярною масою, напругою, силою струму і опору електричного поля, силами міжмолекулярного тертя.

Наявність струму у розчині між електродами обумовлена тільки іонами буфера і зразка. Швидкість їх руху пропорційна силі струму, падінню напруги у підтримуючому середовищі і обернено пропорційна опорю, який залежить від розмірів носія та іонної сили буферу. Опір зростає зі збільшенням довжини носія і зменшується зі збільшенням його ширини.

Щоб результати були відтворюваними, сила струму у процесі електролізу не повинна мінятися. При однаковій напрузі поля швидкість міграції буде залежати від розміру часток, їх електричного заряду і рН буферного розчину. Якщо компоненти досліджуваного білка відрізняються за цими ознаками, вони можуть розділятися методом електрофорезу.

Білки плазми у лужному середовищі набувають негативного заряду у зв'язку з дисоціацією карбоксильних груп залишків амінокислот, у кислому середовищі дисоціація карбоксильних груп припиняється і білки мають позитивний заряд. Білки плазми розділяють у буферних системах, які мають лужну реакцію. У буферних розчинах, рН яких відповідає ізоелектричній точці білка, заряд його дорівнює нулю і білок у цьому випадку налишається на місці нанесення. З віддаленням від ізоелектричної точки, швидкість міграції білка збільшується. Білок, який рухається як єдина маса, може розглядатись як гомогенний. При стабільному режимі швидкість руху білка від лінії старту є величиною постійною.

Відстань, на яку переміщуються білки, настільки стабільні, що одні і тіж результати можна одержати на різних апаратах для електрофорезу (при однакових умовах режиму). Підбираючи рН буферного розчину, одержують оптимальні умови для розподілу суміші білків.

Методи електрофорезу мають такі основних типи: 1) метод межі, яка вільно рухається (**фронтальний електрофорез**); 2) **зональний електрофорез**.

6.4.1.1. Метод фронтального електрофорезу, який був розроблений Тізеліусом, дає можливість встановити відсотковий вміст білкових фракцій сироватки крові. Він обумовив появу таких клінічно важливих понять, як пара- і диспротеїнемії. Складна побудова приладу обмежувала широке застосування методу Тізеліуса.

6.4.1.2. Зональний електрофорез здійснюється на носіях (підтримуюче середовище), які необхідні для підтримки стабільності електрофоретичних зон, які можуть легко руйнуватися під впливом теплової конвекції і різниці у відносній щільності буферного і білкового розчинів. У якості носія застосовують папір, картон, крохмаль, агар, ацетатцелюлозу, крохмальний, або акриламідний гелі. Всі перелічені матеріали, в яких виконується електрофоретичне розділення, здатні адсорбувати речовини, які розділяються. Зональний електрофорез фактично є комбінацією двох методів: хроматографії і електрофорезу.

Методи зонального електрофорезу розподіляють за носієм

6.4.1.3. Електрофорез на папері

При застосуванні цього методу розподілення білка на фракції залежить тільки від його заряду. У лужному буферному розчині білки розділяються на 5–6 фракцій. Якщо умови електрофорезу стабільні, (іонна сила буферного розчину дорівнює 0,1 і рН = 8,9) швидше за всі фракції до аноду рухається альбумін. За ним у черзі у порядку зменшення швидкості міграції – альфа-1; альфа-2; бета- і гама-глобулінові фракції.

Практично лабораторія будь-якої лікарні дозволяє дослідити динаміку білкових фракцій при різних захворюваннях. Технічні вимоги для всіх приладів практично однакові. Основна умова у розділенні білків пов'язана з безумовним дотриманням режиму електрофорезу. Рух білків від стартової лінії повинен бути залежним тільки від величини заряду.

Стабільність електрофоретичних умов досягається застосуванням джерел струму з постійним електричним режимом. На рух фракцій білка в електричному полі можуть діяти

різні фактори: продукти електролізу, неоднаковий рівень буферного розчину в електродних трубках, його об'єм, явища ендоосмосу і реофорезу. Останній фактор обумовлюється безперервним випарюванням води, яке може викликати рух рідини до центру смуги і зміщення зони білка. Випарювання може призводити до збільшення концентрації солей буферного розчину і порушення електропровідності. Щоб уникнути цих явищ, виготовляють камери незначних розмірів, які дуже швидко насичуються парами. З цією ж метою застосовують електричний струм незначної сили.

Зі збільшенням іонної сили буферу, сила струму, обумовлена переносом іонів буферу підвищується, іонів зразка – зменшується. Швидкість міграції досліджуваного зразка білка знижується, кількість тепла, яке виділяється, збільшується.

Якщо іонна сила буферу низька, сила струму, обумовлена переносом іонів буферу, зменшується, іонів білка – збільшується; міграція білка прискорюється, при цьому загальна сила струму і виділення теплоти – зменшуються.

При виборі джерела електричного струму, необхідний стабілізатор, який підтримує постійну силу струму незалежно від коливань напруги у електричній мережі, в якій знаходиться електрофоретичний прилад. В якості джерела постійного електричного струму використовують випрямляючу установку, яка дає струм силою 50–100 мА. Режим встановлюють з розрахунку 0,1–0,5 мА на 1 см² (не більше 250 В при силі струму 2–4 мА на смугу паперу шириною 4 см). Режим роботи визначається задачами дослідження.

Якість паперу також впливає на процес електрофорезу. Папір повинен бути гігроскопічний: кількість води, яку папір абсорбує, повинна у 130–200 разів перевищувати її особисту масу. Такий папір має низьку зольність (55–70 мг на 100 г) і незначний вміст органічного азоту (10 мг%). Найкращі сорти паперу – “Ватман” № 1 і 3. Добре розділення одержують на хроматографічному папері середньої щільності.

Об'єм досліджуваного матеріалу залежить від ширини паперової смуги. Звичайно наносять 0,5–0,8 мг зразку, на смужку завширшки 4 см наносять 10–50 мкл розчину.

Адсорбція альбумінів на папері є одним з основних джерел похибок при електрофорезі. Не рекомендується працювати з розчинами білка низької концентрації (менш як 1%).

Після електрофоретичного розділення білкові фракції фіксують на папері і виявляють за допомогою спеціального фарбування. Спеціальними методами фарбування можна виявляти також ліпо- і глікопротеїди.

Тривалість електрофорезу на папері складає 6–18 годин.

Метод електрофорезу на папері має деякі недоліки, які залежать від методів індикації і кількісного визначення білку у зонах.

Під час сушки паперових носіїв у сушильній шафі підвищення температури збільшує абсорбцію фарби альбумінами, які в силу своїх природних властивостей зв'язують її більше ніж глобуліни. Якщо сушити електрофореграми при кімнатній температурі, то відношення А/Г, яке дорівнює ½ під час гарячої сушки, стає рівним 0,75. Крамер і Тізеліус ввели поправочний коефіцієнт для глобулінів (1,6), але в клініко-діагностичних лабораторіях ці доповнення, як правило, не беруться до уваги. Похибка може бути пов'язана з прямим фотометруванням внаслідок порушення закону лінійної залежності між концентрацією фарбника і значенням оптичної щільності, із-за нерівномірності розгалуження фарбника у структурі паперової стрічки.

Великий досвід показує, що метод інколи не зовсім точний. Етапність виконання окремих операцій не виключає можливості похибки (зміни вольтажу у електричній мережі, сорту паперу, порушення часу проведення електрофорезу, явища абсорбції і т.і.).

6.4.1.4. Електрофорез у крохмальному гелі

У 1955 р. Смітіс запропонував використати у якості носія крохмальний гель, якому притаманні значні розділяючі властивості. Точність електрофорезу у крохмальному гелі набагато вища ніж на папері, тому що адсорбційні явища у гелі менш виражені. Гель є

молекулярним ситом. Білкові компоненти проходять в ньому за двома незалежними механізмами, які залежать від молекулярної маси, або щільності заряду білка. Час електрофорезу у крохмальному гелі, в середньому, 4 години.

Деякі методичні складнощі (приготування однорідної структури гелю, гідроліз крохмалю, збірка приладу, фарбування і кількісне визначення фракцій) не дають широко розповсюджувати цей метод, тому його застосовують для більш тонкого аналізу.

Замість п'яти класичних фракцій сироватки крові електрофорез у крохмальному гелі дає можливість одержувати 8–10 фракцій.

Метод дає можливість визначити чистоту, гомогенність виділеного білка з метою визначення окремих білків: гаптоглобіну, трансферину, церулоплазміну (застосовується у практиці світової медицини), атипичних форм гемоглобіну. За допомогою методу електрофорезу у крохмальному гелі можна виділити кілька різних компонентів білка, який за даними інших методів розділення є гомогенним. Цей метод також застосовується для діагностики парaprотейемій.

6.4.1.5. Електрофорез в агаровому гелі

Агаровий гель – зручне підтримуюче середовище для зонального електрофорезу, тому що у 1,0–1,5% му агаровому гелі білки мігрують у такій же мірі, як і при вільному електрофорезі. Цей метод має більшу можливість розділення у порівнянні з електрофорезом на папері.

Білки добре фарбуються у агарі, а прозорість агарового шару дає змогу безпосереднього фотоелектроколориметричного вимірювання концентрації білків. Від застосування методу у лабораторіях інколи відмовляються у зв'язку з трудомісткістю аналізу.

6.4.1.6. Електрофорез в акриламідному гелі

Акриламідний гель деякі автори відносять до найбільш перспективного носія. Гелеві стовпчики складаються з трьох полімерів різної концентрації, які нашаровуються один на інший.

У нижньому шарі мілкопористого гелю відбувається розділення зразка. В середньому шарі крупнопористого гелю зразок електрофоретично концентрується. У третьому, верхньому шарі, на який наноситься зразок, внесений матеріал стабілізується.

Складові компоненти акриламідного гелю готуються за стандартом.

Гель прозорий, пружний термостабільний. Його роздільну здатність можна змінювати в залежності від мети роботи, від 2 до 30%, у зв'язку з тим, що пористість його залежить від концентрації мономеру. Ефект молекулярного сита, наявного у акриламідному гелі, дає високу роздільну здатність. Розділення у гелі проходить за рахунок відмінностей у молекулярній масі та щільності заряду. Гелю не притаманний іоногенний характер, тому не виникають явища ендосмосу і взаємодії білків зі структурою гелю. Напрямок руху частинок залежить від ізоелектричної точки білка і значення рН буферного розчину. Кількість фракцій сироватки крові у нормі – 30 і при патології – до 42. Час електрофорезу – 2–3 години.

6.4.1.7. Електрофорез на ацетатцелюлозній мембрані

Основна перевага методу – простота операцій. Ацетатцелюлоза – адекватне підтримуюче середовище, яке знайшло широке застосування. Методи його обробки такі ж прості, як і обробка паперу, умови електрофорезу аналогічні, але розділення білків при цьому проходить швидше і чіткіше. Для аналізу досить 5–10 мкг білка (0,1–10 мкл розчину). Білки, ліпо – і глікопротеїди дуже добре фарбуються на ацетатцелюлозній мембрані, тому кількісне визначення фракцій не викликає ніяких труднощів. Кількість фракцій на ацетатцелюлозі така ж, як і на папері.

6.4.2. Імунохімічні методи

Імунохімія дає змогу вивчати хімічні аспекти імунітету, хімії антитіл, антигенів, їх взаємодії. Висока специфічність і чутливість імунологічних реакцій дає змогу застосовувати їх з метою дослідження білків з необхідною ефективністю.

Принцип імунологічної реакції базується на взаємодії антигену з імунною сироваткою, яка має специфічні антитіла (імуноглобуліни), при цьому в результаті реакції формується високомолекулярний комплекс (преципітат), який складається з молекул антигену і антитіла. Реакція преципітації залежить від концентрації антигену, температури, рН, іонної сили середовища. Найбільше розведення імунної сироватки, при якому ще здійснюється реакція преципітації з антигеном, називають **титром сироватки**.

Розроблені в останні десятиріччя методи дозволили використовувати антитіла, як дуже чутливі і специфічні реактиви, які застосовують для якісного і кількісного аналізу білків, визначення їх гомогенності, ідентифікації компонентів у білкових сумішах. Частіше за все використовують два методи: преципітацію у гелі і зв'язування мічених речовин.

6.4.2.1. Преципітація у гелі

У прозорому желеподібному середовищі утворюється градієнт концентрації обох компонентів; у тому місці, де їх кількість еквівалентна, випадає осад. Створена зона преципітації проглядається неозброєним оком. Його форма, розгалуження є свідками складу і концентрації антигену. Найбільш часто зустрічаються у клініко – діагностичних лабораторіях чотири варіанти методу:

6.4.2.2. Радіальна дифузія за Манчінні

Прозорий гель у чашці Петрі обробляється антитілами. В ньому вирізаються лунки, у які заливають досліджуваний розчин. Антиген дифундує з лунки у гель, і в тому місці, де концентрація антитіла і антигену еквівалентні, утворюється кільцева зона преципітації. Радіус її тим більший, чим вища концентрація білка.

6.4.2.3. Подвійна імунодифузія за Оухтерлоном

Розчин антитіл вносять у спеціальну лунку у гелі, яка знаходиться поблизу лунки з антигеном. Обидві речовини дифундують назустрі одна іншій, утворюючи градієнт концентрації – антиген – антитіло.

6.4.2.4. Ракетний електрофорез

Пластинку з гелем перед дослідом обробляють антитілами і в лунку вносять досліджувану рідину. Антиген рухається під впливом електричного поля. Утворення преципітату проходить швидше, зона преципітації має характерну форму, яка нагадує ракету. Доріжка від лунки до верхівки зони приблизно пропорційна концентрації антигену.

6.4.2.5. Класичний імуноелектрофорез за Грабарем, виявляє широкий антигенний спектр досліджуваної рідини. Білки сироватки шикуються у лінію згідно своїй електрофоретичній рухомості, після чого проводять зустрічну імунодифузію у напрямку, перпендикулярному до напрямку полівалентної імунної сироватки. В результаті утворюється складна система дуг преципітації.

6.4.2.6. Метод зв'язування мічених речовин (сатураційний аналіз, метод конкурентного зв'язування)

В утворення комплексу антиген – антитіло включається увесь досліджуваний антиген і певна кількість міченої речовини. Вони конкурують за ліганд – речовину, яка здатна досить вибірково зв'язуватись з досліджуваною хімічною речовиною. При цьому немає різниці між досліджуваною речовиною і його мченим аналогом. Ліганд додають у такій кількості, щоб

його зв'язуюча активність була повністю насичена. Чим більш у пробі досліджуваної речовини, тим менше зв'язується міченої речовини. Комплекс відділяють від вільних інградієнтів і за кількістю мітки визначають вміст антигену.

В клінічній біохімії метод конкурентного зв'язування застосовують з метою визначення гормонів білкової та небілкової природи, індивідуальних білків (міоглобін, бета-2-мікроглобулін, фібриноген, антитіл до мікроорганізмів, вірусів), лікарських сполук і токсичних речовин. В якості ліганду застосовують антитіла, специфічні транспортні білки органів – мішеней (транскортин). Білкові речовини зручно мітити за допомогою радіоактивного йоду – ізотопу ^{125}I .

Приготування реактивів для сатураційного аналізу складне, тому застосовують набори реактивів промислового виготовлення – КІТи (від англійського Kit – набір інструментів). Використання радіоактивних мічених речовин пов'язане з необхідністю мати спеціально обладнану лабораторію, тому все більш широко застосовуються метод конкурентного зв'язування, в якому досліджувана речовина мічена ферментом. Таким способом мітять відносно крупні молекули.

Під час відділення зв'язаних з лігандом речовин від їх вільних форм, беруть до уваги відмінність у молекулярній масі комплексу і вільних форм речовини, яка визначається (гель-фільтрацією, електрофорезом, осаджуючи їх поліетиленгліколем). Найбільш ефективна попередня адсорбція ліганду на твердій фазі (бронацетилполіетилені) і метод подвійних антитіл, коли комплекс осаджується після додавання антитіл, які вироблені до білка самого ліганду. Вільні форми видаляють на специфічних сорбентах (целюлозі, амберліті, силікагелі, активованому вугіллі).

Визначення білка за допомогою ензима, зв'язаного з імуносорбентом ЕЛІСА (EnzymeLinkedImmunesorbentAssay), – одна з модифікацій методу подвійних антитіл, де відсутня конкуренція між сполукою, яка визначається і його міченим варіантом. Утворюється комплекс, де досліджуваний білок адсорбується на первинних антитілах, а на його вільній поверхні фіксуються вторинні антитіла. Фермент фіксується на антитілах, які утворились проти імуноглобулінів вторинних антитіл. Кількість ферменту (пероксидази), пропорційна кількості білка, який визначається. Після закінчення усіх адсорбцій і відмивання надлишку білків, які не прореагували, проводять ферментативну реакцію. У присутності пероксиду водню і фенілєндіаміну пероксидаза окислюється, після чого вимірюють інтенсивність фарбування.

6.4.3. Методи хроматографії

Вперше методи хроматографії були запроваджені у 1903 р. М. С. Цветом. Останній розробив основні принципи розділення хімічних сполук на адсорбентах. Це були сорбційно-динамічні методи, які дозволяли швидко виділити окремі речовини з суміші в залежності від основи сорбенту. Загальним принципом для всіх видів хроматографії є наявність двох фаз: рухомої і нерухомої (стаціонарної).

Рухома фаза може бути рідкою, газоподібною, а нерухома – твердою речовиною або рідиною. Розподіл речовини між фазами залежить від її фізико-хімічних властивостей, розчинності, кількості заряду, розміру і форми молекул.

Методи хроматографії дозволяють розділяти речовини, близькі за своїми властивостями, очищувати їх від домішок, визначати молекулярну масу, ідентифікувати невідомі сполуки, виділяти окремі білки у нативному стані.

Хроматографію розділяють на 4 основні види: 1) адсорбційну; 2) іонообмінну; 3) гель-фільтрацію (молекулярну фільтрацію); 4) розподільну.

У чистому вигляді ці методи застосовуються дуже рідко, частіше вони комбінуються по 2–3 види. Наприклад для одних речовин хроматографія на папері є розподільною, для інших адсорбційною, тому цей вид хроматографії відноситься до адсорбційно-розподільної.