

**Александрова К. В., Шкода О. С., Васильєв Д. А., Левіч С. В.,
Юрченко Д. М.**

ПРОСТІ БІЛКИ

**методичний посібник З ДИСЦИПЛІНИ «БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ»
ДЛЯ ВИКЛАДАЧІВ**

Запоріжжя, 2016

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БІОХІМІЇ ТА ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

**Александрова К. В., Шкода О. С., Васильєв Д. А., Левіч С. В.,
Юрченко Д. М.**

ПРОСТІ БІЛКИ

**методичний посібник з ДИСЦИПЛІНИ «БІОЛОГІЧНА
ХІМІЯ» ДЛЯ ВИКЛАДАЧІВ**

Запоріжжя, 2016

УДК 577.112.8(075)

ББК 28.072 я 73

П 82

Рекомендовано Центральною методичною радою ЗДМУ в якості методичного посібника з дисципліни «Біологічна хімія» для викладачів.

Автори:

Александрова К. В., Шкода О. С., Васильєв Д. А., Левіч С. В., Юрченко Д. М.

Рецензенти:

Прийменко Б. О. д.фарм.н., професор, професор кафедри органічної хімії Запорізького державного медичного університету;

Приходько О. Б. д.біол.н., доцент, завідувач кафедри медбіології, паразитології та генетики Запорізького державного медичного університету

Прості білки: Методичний посібник для викладачів / Александрова К. В., Шкода О. С., Васильєв Д. А., Левіч С. В., Юрченко Д. М., Запоріжжя, 2016.- 78 с.

Методичний посібник складений у відповідності до програми з біологічної хімії для проведення занять зі студентами вищих медичних навчальних закладів III-IV рівней аккредитації для спеціальності 7.12020101 «Фармація», що затверджена наказом МОН.

Методичний посібник рекомендований для використання при проведенні занять з дисципліни «Біологічна хімія».

УДК 577.112.8(075)

ББК 28.072 я 73

©Александрова К. В., Шкода О. С., Васильєв Д. А.,
Левіч С. В., Юрченко Д. М., 2016.

©Запорізький державний медичний університет

ЗМІСТ

1. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ.....	5
2. НАВЧАЛЬНІ ЦІЛІ ЗАНЯТТЯ №2.....	6
3. ВИХОВНІ ЦІЛІ.....	7
4. БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ.....	8
5. ЗМІСТ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ.....	9
6. ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ.....	10
7. АЛГОРИТМ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ.....	12
8. КОНТРОЛЬ ЗАКЛЮЧНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ З ТЕМИ.....	16
9. ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ.....	18
10 ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК-1».....	21
11 ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ ЗАНЯТТЯ.....	27
СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ БІЛКІВ.....	27
Загальна характеристика білків.....	27
Хімічна будова пептидів і білків.....	31
Класифікація і будова амінокислот.....	32
Пептиди.....	39
Будова і рівні організації білків.....	40
Фізико-хімічні властивості білків.....	59
Класифікація білків.....	70
ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПІДГОТОВКИ СТУДЕНТІВ.....	74
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	76

1. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ

Білки — важлива частина харчування тварин і людини, оскільки ці організми не можуть синтезувати повний набір амінокислот і повинні отримувати частину з них із білковою їжею. У процесі травлення протеолітичні ферменти руйнують спожиті білки, розкладаючи їх до рівня амінокислот, які використовуються при біосинтезі білків організму або піддаються подальшому розпаду для отримання енергії.

Значна кількість досліджень у медицині направлена на використання складних білків в якості терапевтичних препаратів та засобів діагностики захворювань. Фармацевтичне застосування складних білків почалося з природних білків отриманих з різноманітних живих організмів. Нові препарати створюються штучно, рекомбінантними методами або за допомогою проектування білків. Біофармацевтичні препарати, що знаходять широке використання, включають складні білки крові (наприклад, для лікування гемофілії), тромболітичні ферменти, гормони, цитокіни та фактори росту, білки імунної системи (інтерферони і антитіла, що використовуються для лікування інфекційних захворювань та деяких видів раку) і вакцини.

2. НАВЧАЛЬНІ ЦІЛІ ЗАНЯТТЯ №2

Отримати уявлення про етапи становлення біохімії як фундаментальної медико-біологічної науки та її зв'язків з фармацією, вивчити теоретичні положення про амінокислотний склад та рівні структурної організації простих та складних білків, їх фізико-хімічні властивості та функції в організмі, засвоїти деякі методи розділу білків із суміші, якісного та кількісного визначення білків і окремих амінокислот в біоматеріалі.

Необхідно знати:

1. Амінокислотний склад білків та пептидів.
2. Структурна організація білків.
3. Фізико-хімічні властивості білків. Реакції осадження білків. Денатурація.
4. Класифікація білків організму людини. Класифікація та характеристика простих білків.
5. Глобулярні білки: структура, фізико-хімічні властивості, розповсюдження в тканинах, біологічна роль. Чинники стійкості глобулярних білків в колоїдних розчинах.
6. Фібрилярні білки: структура, фізико-хімічні властивості, розповсюдження в тканинах, біологічна роль.
7. Загальні уявлення про методи розділення, виділення і очищення білкових препаратів: ультрацентрифугування, висолювання, діаліз, електрофорез, хроматографія.

Необхідно вміти:

1. Проводити якісні реакції на амінокислоти та білки.
2. Розділяти глобуліни та альбуміни методом висалювання.
3. Проводити реакції осадження білків.

3. ВИХОВНІ ЦІЛІ

Ознайомитися з предметом, завданням, основними етапами і сучасними напрямками розвитку біохімії, метою, методами та правилами безпеки проведення біохімічних досліджень, зв'язком біохімії з фармацією, основними принципами якісного та кількісного дослідження білків.

4. БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ

Дисципліни	Отримані навички
Попередні: Органічна хімія	Вміти класифікувати органічні речовини за будовою і складом. Описувати властивості органічних речовин та визначати функціональні групи.
Неорганічна хімія	Поняття про класи хімічних сполук, види хімічного зв'язку (ковалентний, водневий, Ван-дер-Ваальсову взаємодію), кислотність та основність. Вміти розраховувати константу кислотності.
Нормальна фізіологія	Поняття про регуляторну, рухливу, транспорту та інші функції білків
Фізична та колоїдна хімія	Поняття про діаліз, ультрафільтрацію, електрофорез. Основні поняття міцелярної теорії. Поняття про фактори, що впливають на стійкість міцели, ізоелектричну точку білка.
Патологічна фізіологія	Визначення норми та патології. Поняття про патологічні стани печінки, нирок. Поняття симптом і синдром.
Наступні Фармакотерапія, Клінічна фармакологія	Гіпопротеїнемія, гіперпротеїнемія, денатурація білків, електрофорез, спектрофотометричне визначення вмісту білку, функції білків, осадження білків.

5. ЗМІСТ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ

1. Будова, функції та класифікація протеїногенних амінокислот.
2. Структурна організація білкової молекули. Поняття про первинну, вторинну, третинну та четвертинну структуру білку.
3. Функції білків в організмі людини.
4. Класифікація простих білків організму людини.
5. Глобулярні білки: структура, фізико-хімічні властивості, поширення в тканинах, біологічна роль. Фактори стійкості глобулярних білків в колоїдних розчинах. Реакції осадження білків. Денатурація.
6. Фібрилярні білки: структура, фізико-хімічні властивості, поширення в тканинах, біологічна роль.

6. ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ

Етапи	Час (хв)	Навчальні матеріали		Місце проведення
		Зміст пункту плану	Обладнання	
1. Організаційний момент	5 хв	Перевірити присутніх, провести співбесіду щодо організації навчальної роботи на кафедрі (структуру занять, правила поведінки, порядок відробок заборгованостей, порядок проведення підсумкових занять тощо), провести екскурсію по кафедрі.		Кімната для навчання
2. Співбесіда з питань про будову, функції, класифікацію, методи, виділення, очищення, якісного і кількісного визначення протеїногенних амінокислот, простих та складних білків; організація проведення практикуму з теми заняття	15 хв	Провести пояснення важливих термінів: Амінокислота, пептидний зв'язок, білок, первинна, вторинна, третинна, четвертинна структура білка.	Підручник, Методичні рекомендації до практичного заняття, Таблиці структурної організації глобулярного білку, альфа-амінокислот.	Кімната для навчання
Поділити навчальну групу на 3 бригади. Зміст практичної роботи для кожної бригади: №1 : Якісні реакції на амінокислоти та білки (4 роботи) №2 : Висолювання альбумінів і глобулінів яєчного білку (одна робота) №3 : Осадження білків мінеральними кислотами та солями важких металів (дві роботи) Кожна бригада виконує свої роботи, але має вести протокол для всіх лабораторних робіт. Перерва: 10 хвилин				
3. Початок роботи студентів згідно тем лабораторних робіт	15 хв	Усі бригади виконують усі операції до постановки пробірок у термостат	Обладнання та реагенти до лабораторних робіт	Кімната для навчання
4. Контроль знань по темі заняття (письмова самостійна робота на паперових носіях)	20 хв	Початок часу інкубації у є початок письмової роботи для усіх бригад.	Картки з завданнями: 1) про класифікацію протеїногенних амінокислот, білків та про методи очищення та	кімната для навчання

			розділення білків (5 варіантів завдань)	
5. Продовження виконання практичної частини заняття	10 хв	Бригади №1, №2, №3 мають час закінчити проведення експериментів.	Протоколи для лабораторних робіт	кімната для навчання
6. Оформлення результатів лабораторних робіт	10 хв		Підручник, Практикуми	Кімната для навчання
7. Заключна співбесіда згідно результатів усіх типів робіт студентів на протязі заняття	15 хв	Перевірка та підпис протоколів лабораторних робіт, аналіз успішності студентів на занятті, інформування студентів про тему наступного заняття, видання завдань для самостійної роботи	Список літератури у допомогу для ліквідації недоліків у вивчанні теми	Кімната для навчання

АЛГОРИТМ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

Якісні реакції на білки та амінокислоти

Робота № 1. Біуретова проба (реакція Піотровського)

Принцип методу: У лужному середовищі розчин білка при взаємодії з іонами Cu^{2+} набуває синьо-фіолетового кольору, а продукти його неповного гідролізу - пептони - дають рожеве забарвлення. Біуретову реакцію здатні давати речовини, які містять не менш двох пептидних зв'язків.

Обладнання та реактиви: пробірки, піпетки, 1 % водний розчин яєчного білка, 10 % водний розчин NaOH, 1 % водний розчин CuSO_4 .

Хід роботи: до 5 крапель 1 % розчину яєчного білка чи досліджуваної рідини додають 5 крапель 10 % розчину NaOH, 2 краплі 1 % розчину CuSO_4 і все перемішують.

! Не можна додавати надлишку CuSO_4 , тому що синій осад $\text{Cu}(\text{OH})_2$ маскує характерне фіолетове забарвлення біуретового комплексу білка.

Очікуваний результат: Вміст пробірки повинен набути фіолетового кольору, що підтверджує наявність у досліджуваній рідині сполук, що містять не менше двох пептидних зв'язків.

Робота № 2. Сульфосаліцилова проба.

Принцип методу: Сульфосаліцилова кислота денатурує білки, утворюючи з ними нерозчинний комплекс білого кольору. Найчастіше цю реакцію використо-вують для доказу наявності білків у сечі пацієнтів.

Обладнання та реактиви: пробірки, піпетки, досліджуваний розчин, свіжовиготовлений 20 % розчин сульфосаліцилової кислоти.

Хід роботи: до 1 мл досліджуваної рідини додають 3 краплі свіжовиготовленого 20% розчину сульфосаліцилової кислоти.

Очікуваний результат: Спостерігають утворення білого осаду (або каламуті), кількість якого залежить від концентрації білка.

Робота № 3. Ксантопротейнова проба (реакція Мульдера)

Принцип методу: Реакція доводить наявність у білку ароматичних амінокислот: **Трп, Фен, Тир**. При додаванні до розчину білка концентрованої HNO_3 з'являється жовте забарвлення (продукти нітрування), яке при додаванні лугу переходить у помаранчеве (в лужному середовищі нітропохідні амінокислот утворюють солі хіноїдної структури, забарвлені в помаранчевий колір).

Обладнання та реактиви: пробірки, піпетки, тримач для пробірок, газовий пальник, розчин яєчного білка, розчин желатину, концентрований розчин нітратної кислот.

Хід роботи: Беруть дві пробірки і наливають: в першу – 5 крапель розчину яєчного білка. а в другу – 5 крапель розчину желатину. В обидві пробірки додають по 3 краплі концентрованої HNO_3 та обережно кип'ятять.

Очікуваний результат: В пробірці, що містить розчин яєчного білка, з'являється осад жовтого кольору, а в пробірці з желатином – дуже слабе забарвлення (желатин майже не містить ароматичних амінокислот).

Робота №4. Сульфгідрильна проба (реакція Фоля)

Принцип методу: Сульфгідрильні групи ($-\text{SH}$) амінокислотного залишку цистеїну в білку піддаються лужному гідролізу під дією одного з компонентів реактиву Фоля, у результаті чого відбувається відщиплення сірки у вигляді PbS чорного кольору.

Обладнання та реактиви: пробірки, піпетки, тримач для пробірок, газовий пальник, 1 % розчин білка, реактив Фоля.

Хід роботи: До 5 крапель 1% розчину білка (або досліджуваної рідини) додають 5 крапель реактиву Фоля, кип'ятять і дають постояти 1-2 хвилини.

Очікуваний результат: В пробірці спостерігають появу чорного осаду PbS , що підтверджує наявність сульфурвмісних амінокислот у складі білка.

Розділення білків

Робота №5. Розділення альбумінів і глобулінів яєчного білка методом висолювання.

Принцип методу: Висолювання – оборотна реакція осадження білків із розчинів за допомогою великих кількостей солей лужних і лужноземельних металів та солей амонію. При цьому, альбуміни осаджуються в насичених розчинах, а глобуліни – у напівнасичених, тому що молекулярна маса глобулінів більше, а розчинність менше, ніж у альбумінів.

Обладнання та реактиви: пробірки, піпетки, воронка, шпатель, фільтровальна бумага, розчин яєчного білка, насичений розчин амоній сульфату, подрібнений амоній сульфат, 10 % водний розчин NaOH, 1 % водний розчин CuSO₄.

Хід роботи: До 20 крапель нерозведеного яєчного білка додають 20 крапель насиченого розчину амоній сульфату й перемішують. Утворюється напівнасичений розчин амоній сульфату, у якому випадає осад яєчного глобуліну. Через 5 хвилин осад відфільтровують. У фільтраті залишається тільки яєчний альбумін. Для висолювання альбумінів до фільтрату додають подрібнений порошок амоній сульфату до повного насичення (тобто поки нова порція порошку залишиться нерозчиненою). Осад альбуміну, що випав, відфільтровують. З фільтратом проводять біуретову реакцію. Негативна реакція вказує на відсутність білку.

Очікуваний результат: Повне розділення яєчного білку на глобулін та альбумін, що підтверджується негативною біуретовою реакцією другого фільтрату.

Осадження білків

Робота №6. Осадження білків солями важких металів

Принцип методу: Білки при взаємодії з солями важких металів (Cu, Pb, Ag та ін.) утворюють нерозчинні у воді комплексні (хелатні) сполуки. Це зумовлено тим, що іони металів зв'язуються з функціональними групами

амінокислот у молекулі білка, в результаті чого руйнується просто-роста структура останнього і відбувається осадження денатурованого білка. Розчинення утвореного осаду при додаванні надлишку солей важких металів (крім AgNO_3 і HgCl_2) пояснюється адсорбцією іонів металу на поверхні денатурованого білка і виникненням позитивного заряду на частинках білка (адсорбційна пептизація). При цьому білок у розчині залишається денатурованим.

Обладнання та реактиви: пробірки, піпетки, розчин яєчного білка, 5 % водний розчин CuSO_4 , 5 % водний розчин $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$.

Хід роботи: В дві пробірки наливають по 5 крапель розчину яєчного білка і додають: в першу пробірку – 2 краплі 5% розчину CuSO_4 , в другу – 2 краплі 5% розчину $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$.

Очікуваний результат: В пробірках утворюється нерозчинний у воді осад. При додаванні до пробірок надлишків (5-10 крапель) відповідного осадника спостерігають розчинення осадів.

Робота №7. Осадження білків концентрованими мінеральними кислотами

Принцип методу: Концентровані мінеральні кислоти (HNO_3 , H_2SO_4 тощо) призводять до дегідратації білкових часток, що супроводжується порушенням просторової структури білка і випадінням його в осад.

Обладнання та реактиви: пробірки, піпетки, 1% розчин яєчного білка, концентрований розчин HNO_3 .

Хід роботи: В пробірку наливають 10 крапель розчину концентрованої HNO_3 . Тримавши пробірку під кутом 45° обережно нашаровують (по стінці пробірки) 5 крапель 1% яєчного білка. На межі двох рідин утворюється осад у вигляді білого кільця. Цей метод покладено в основу кількісного і якісного визначення білка в сечі.

Очікуваний результат: Утворення преципітації на межі розділу двох рідин.

КОНТРОЛЬ ЗАКЛЮЧНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ З ТЕМИ

Вариант 1

1. Дайте обоснование физических и химических свойств глобулярных белков с точки зрения их структуры.
2. Какое значение рН Вы выберете при разделении гистонов ($pI = 8,7$) от глобулинов ($pI = 6,8$) методом электрофореза? Опишите движение данных белков в электрическом поле при выбранном значении рН.

Вариант 2

1. Осадок белка был получен при действии на раствор белков насыщенным раствором хлорида натрия. Можно ли использовать полученный осадок белка для исследования биологической функции этого белка? Объясните свой ответ.
2. Дайте характеристику вторичной структуры белка α -спираль.

Вариант 3

1. Сравните структуру, физико-химические свойства глобулярных и фибриллярных белков.
2. Найдите отличия в принципах методов высаливание и осаждение белков минеральными кислотами.

Вариант 4

1. Сравните растворимость глобулярных и фибриллярных белков в солевых растворах. Объясните Ваш ответ с точки зрения знания их структуры.
2. Напишите структуру трипептида Ала-Фен-Асп. Укажите пептидные связи. Назовите значение заряда молекулы трипептида при $pH = 7$.

Вариант 5

1. Опишите строение четвертичной структуры белка, используя конкретный пример белка.
2. Согласны ли Вы с ниже указанным положением: «Альбумины первыми выпадают в осадок при высаливании раствора яичного белка, так как имеют большую молекулярную массу». Объясните Ваш ответ.

Вариант 6

1. Назовите типы связей, стабилизирующие третичную структуру глобулярного белка (используйте конкретный пример белка при объяснении).
2. Дайте отличия действия солей тяжелых металлов и аммония сульфата на раствор смеси белков.

9. ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

1. Укажіть якісну реакцію на пептидний зв'язок:

- A. Фоля
- B. Адамкевича
- C. Піотровського
- D. Міллона
- E. Мульдера

2. Укажіть амінокислоту, у якої відсутній асиметричний атом вуглецю:

- A. Ізолейцин
- B. Лейцин
- C. Валін
- D. Метіонін
- E. Гліцин

3. Виберіть із приведеного списку незамінну амінокислоту:

- A. Гліцин
- B. Лізин
- C. Серин
- D. Аланін
- E. Тирозин

4. Виберіть із приведених амінокислот замінну:

- A. Триптофан
- B. Метіонін
- C. Валін
- D. Лізин
- E. Глутамат

5. Назвіть гетероциклічну амінокислоту:

- A. Серин
- B. Лізин
- C. Метіонін
- D. Тирозин
- E. Триптофан

6. Укажіть рівень структурної організації білкової молекули, що зберігається після дії денатуруючих агентів:

- A. Вторинний
- B. Первинний
- C. Третинний
- D. Четвертинний
- E. Вторинний і третинний

7. Укажіть основні типи зв'язків, характерні для первинної структури білкової молекули:

- A. Гідрофобні
- B. Водневі
- C. Дисульфідні
- D. Іонні взаємодії
- E. Пептидні

8. Укажіть основні типи зв'язків, які характерні для вторинної структури білкової молекули:

- A. Гідрозв'язки
- B. Ефірні
- C. Пептидні
- D. Водневі
- E. Сили Ван-дер-Ваальса

9. Укажіть білки сироватки крові, що піддаються висолюванню при 50%-ному насиченні амоній сульфатом:

- A. Гістони
- B. Протаміни
- C. Глютеліни
- D. Альбуміни
- E. Глобуліни

10. Укажіть білки сироватки крові, які піддаються висолюванню при 100%-ному насиченні амоній сульфатом:

- A. Глобуліни
- B. Глютеліни
- C. Альбуміни
- D. Гістони
- E. Протаміни

10. ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК-1»

1. Хворого доставили в клініку в тяжкому стані після отруєння солями свинцю. Яка з перерахованих сполук може використовуватися як акцептор свинцю і, таким чином, зменшувати інтоксикацію організму?

- A. Полівітаміни
- B. Вода
- C. Розчин білку
- D. Розчин сахарози
- E. Анальгетики

2. Через яку групу відбувається приєднання фосфорної кислоти до білку в фосфопротеїнах?

- A. SH-групу цистеїну
- B. NH-групу лізину
- C. COO-групу глутаміну
- D. OH-групу серину
- E. CH-групу метіоніну

3. До складу білку входять протеїногенні амінокислоти. В яком положенні в їх структурі обов'язково повинна бути аміногрупа?

- A. δ -положенні
- B. ε -положенні
- C. α -положенні
- D. β -положенні
- E. γ -положенні

4. При термічній обробці їжі спостерігаються необоротні зміни просторової структури білку. Цей процес отримав назву:

- A. Ренатурація
- B. Висолювання
- C. Гідратація
- D. Денатурація
- E. Діаліз

5. Для одержання із підшлункової залози тварин ферменту амілази в чистому вигляді використовують метод афінної хроматографії з закріпленням на носії лігандом. Яка сполука використовується в якості ліганда?

- A. Глюкоза
- B. Крохмаль
- C. Сахароза
- D. Целюлоза
- E. Лактоза

6. Надходження поживних речовин в бактеріальну клітину здійснюється за допомогою різних механізмів. Одним із них є полегшена дифузія, яка здійснюється особливими білками-переносниками. Як вони називаються?

- A. Лігази
- B. Ізомерази
- C. Пермеази
- D. Ліази
- E. Оксиредуктази

7. До мембранних білків, що контактують з тою або іншою біологічно активною сполукою та передають інформацію всередині клітини, відносять:

- A. Білки-канали
- B. Білки-рецептори
- C. Глікокалікс
- D. Білки-ферменти
- E. Білки-насоси

8. До якого електроду буде переміщатися частка білка при електрофорезі, якщо його ізoeлектрична точка рівна 4,0, а рН складає 5,0?

- A. Анод
- B. Каломельний
- C. Хлорсрібний
- D. Катод
- E. Платиновий

9. Хворий знаходиться у відділені «штучна нирка». Вкажіть метод, який використовується для очищення його крові від низькомолекулярних сполук:

- A. Денатурація
- B. Висолювання
- C. Діаліз
- D. Гідроліз
- E. Електрофорез

10. Альфа-спіраль є однією із форм вторинної структури білку. Вкажіть, які зв'язки стабілізують цю структуру:

- A. Іонні

- B. Міжмолекулярні взаємодії
- C. Гідрофобні
- D. Водневі
- E. Пептидні

11. Ізоелектрична точка (ІЕТ) білку рівняється 8,3. При якому значенні рН електрофоретична рухливість макромолекули білку буде рівна нулю?

- A. 8,3
- B. 4,7
- C. 7,0
- D. 11,5
- E. 2,3

12. При вірусних інфекціях в організмі синтезується захисний білок – інтерферон. Одним з механізмів протівірусної дії інтерферону є:

- A. Стимуляція біосинтезу білків
- B. Стимуляція процесингу
- C. Гальмування біосинтезу білків
- D. Гальмування транскрипції
- E. Гальмування реплікації

13. До складу хроматину входять гістонові білки, які мають позитивний заряд. Яка з перерахованих амінокислот у великій кількості входить до складу гістонових білків колимаство входит в состав?

- A. Лізин
- B. Аланін
- C. Валін
- D. Треонін
- E. Серин

14. Амінокислоти, які містять у бічному радикалі гідроксильну групу, часто визначають у складі активного центру ферментів. Вкажіть таку амінокислоту:

- A. Серін
- B. Аланін
- C. Валін
- D. Цистеїн
- E. Фенілаланін

15. До складу нуклеопротейнів входить значна кількість білків, які мають лужний характер. Які білки виконують структурну функцію в складі хроматину?

- A. Протаміни і гістони
- B. Альбуміни і глобуліни
- C. Проламіни і глютеніни
- D. Гемоглобін і міоглобін
- E. Інтерферони та муцин

16. Ароматичні амінокислоти, що входять до складу природних білків, можна виявити специфічною реакцією:

- A. Ксантопротеїновою
- B. Біуретовою
- C. Фоля
- D. З реактивом Фелінга
- E. Нінгідриновою

17. Первинна структура білка утворюється при полімеризації амінокислот. Які зв'язки між залишками амінокислот характерні для цієї структури?

- A. Пептидні

- В. Гідрофобні
- С. Водневі
- Д. Електростатичні
- Е. Іонні взаємодії

18. Структурною особливістю фібрилярних білків є наявність декількох паралельних поліпептидних ланцюгів. Назвіть фібрилярний білок, що входить до складу волосся, шкіри, нігтів.

- А. Кератин
- В. Альбумін
- С. Протромбін
- Д. Глобулін
- Е. Гістон

19. При формуванні третинної структури більшості білків неполярні залишки амінокислот утворюють внутрішню гідрофобну частину глобули. Назвіть одну з таких гідрофобних амінокислот.

- А. Валін
- В. Лізин
- С. Аргінін
- Д. Глутамінова кислота
- Е. Аспарагінова кислота

20. Багато білків має четвертинну структуру, тобто складається із декількох поліпептидних ланцюгів. Вкажіть один з таких білків.

- А. Гемоглобін
- В. Міоглобін
- С. Альбумін
- Д. Еластин
- Е. Преальбумін

ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ ЗАНЯТТЯ

СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ БІЛКІВ

Білки, або протеїни – найважливіший клас біологічно активних речовин. Вони, як основа всього живого на Землі, здавна перебували в центрі уваги дослідників. Протягом двох століть, що налічує наука про білки, змінилося декілька концепцій про будову білків, які мало відповідали дійсності. В основному це було пов'язано з дуже низьким рівнем техніки експерименту в XIX і на початку XX століть. У наступні роки, у зв'язку з розробкою і застосуванням нових методів дослідження і обчислювальної техніки, це питання було практично вирішене. Вивчення структури великої кількості індивідуальних білків у зв'язку з їхньою біологічною функцією продовжується і сьогодні.

Загальна характеристика білків

Білки – це лінійні, спрямовані, інформаційні гетробіополімери, що побудовані з залишків α , L-амінокислот.

Білки виконують першорядну роль у побудові живих організмів та у забезпеченні процесів життєдіяльності. Вони зустрічаються скрізь, де є життя.

Ще в XIX столітті при вивченні хімічного складу різноманітних тварин і рослин вченими були виділені речовини, які нагадували за деякими властивостями яєчний білок. Так, при нагріванні вони згорталися і набували білого кольору.

У 1838 р. голландський хімік і лікар О.Мульдер першим спробував дати наукове обґрунтування білкам, визначив у них вміст нітрогену і дав їм назву «протеїни», як обов'язковому компоненту живих організмів.

Білки є основними структурними компонентами живих організмів і в кількісному відношенні посідають перше місце серед усіх макромолекул, які містяться в живій клітині. В організмі тварин білків міститься від 40 до 50% і

більше від сухої маси, менше у рослин – до 20–30%. У тканинах ссавців білки складають – 18–20%, тоді як нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди – 1–15%. Суха маса організму людини складається на 45-50% із білків, при цьому їх вміст досягає: у м'язах – 80%, у серці – 60%, печінці – 72%, легенях – 82%, нирках – 72%, селезінці – 84%, у кістках – 28%.

Але не тільки кількісні показники свідчать про важливу роль білків. Вони мають низку особливостей, не властивих іншим органічним сполукам, а саме:

- білки – найскладніші органічні сполуки в природі; кількість можливих різновидів білкових молекул може бути нескінченною, що необхідно для реалізації видової, органової й тканинної специфічності організмів;

- білкові сполуки, завдяки сукупності великої кількості функціональних груп і безлічі конформаційних станів, забезпечують різноманітність хімічних та інших перетворень, які лежать в основі біологічних функцій організмів;

- можливість взаємодії один з одним та з іншими сполуками, з утворенням білок-небілкових комплексів і внутрішньоклітинних біологічних структур, дозволяє білкам розпізнавати серед безлічі різних молекул клітини певну молекулу і вибірково сполучатися з нею. Це зумовлює структурну організацію (компаратменталізацію) речовини в живій клітині, спрямованість й послідовність хімічних перетворень у процесі метаболізму речовин;

- здатність відповідати на зовнішні і внутрішні впливи закономірною зміною конформації молекули, і відновлювати вихідний стан після припинення їх дії;

- наявність біокаталітичних (ферментативних) властивостей та інші якості забезпечують спільно з нуклеїновими кислотами передачу генетичної інформації, біосинтез білків та його регуляцію, ріст, диференціювання клітин і відтворення живих організмів.

Білки виконують різноманітні і надзвичайно важливі функції, наведені нижче.

1. **Каталітична, або ферментативна функція** – одна з головних функцій білкових сполук. Вона полягає у прискоренні хімічних перетворень розпаду і синтезу речовин, перенесенні окремих груп атомів, електронів, протонів від однієї речовини до іншої тощо. Як біокаталізатори ферменти-білки беруть участь у тисячах взаємопов'язаних і взаємозумовлених перетворень, які відбуваються в живій клітині і складають основу її метаболізму. Ця функція дозволяє вважати білки найважливішим класом біорегуляторів.

2. **Будівельна (структурна, пластична) функція**. Макромолекули білків складають структурну основу всіх тканин і органів, утворюють основу протоплазми будь-якої живої клітини.

3. **Регуляторна функція**. Вона забезпечує регуляцію обміну речовин у клітинах та інтеграцію обміну в різних клітинах цілого організму. Ряд гормонів за своєю будовою належать до білків або продуктів їх перетворення; вони беруть участь у регуляції різноманітних процесів, які протікають в організмі. Регуляторна дія білків не обмежується тільки каталітичною та гормональною. Деякі білки відіграють роль інгібіторів активності ферментів і таким шляхом регулюють їх дію. Відома група білків – регуляторів геному. В останні роки виділені і широко вивчаються специфічні білки й пептиди, пов'язані із процесами пам'яті, знеболювання, сну, поведінки і деякими психічними станами.

4. **Захисна функція**. Ряд білкових сполук допомагає організму боротися зі збудниками хвороб та деякими патологіями. Процес зсідання крові, який захищає організм від надмірної її втрати, проходить за участю багатьох білкових факторів. Внутрішні стінки органів травлення вистелені захисним шаром слизових білків-муцинів. Основу шкіри, що охороняє організм від багатьох зовнішніх впливів, складають білки (колаген).

5. **Транспортна функція.** Окремі групи білків здатні взаємодіяти з різноманітними сполуками і переносити їх. Так транспортуються в організмі нерозчинні у воді речовини (кисень, діоксид карбону, іони металів, ліпіди та ін.) і токсичні продукти (білірубін та ін.). Перенесення багатьох речовин через клітинні мембрани здійснюється за рахунок особливих білків-переносників.

6. **Рухова (механічна) функція.** Будь-які форми руху в живій природі забезпечуються білковими структурами клітин. Білки беруть участь у забезпеченні різних форм механічного руху – у скороченні і розслабленні м'язів, у роботі внутрішніх органів (серця, легенів, шлунка та ін.). Ці процеси відбуваються за участю таких білків, як актин, міозин, тропоміозин і ряду інших.

7. **Рецепторна функція.** Багато білкових сполук виконують важливу функцію вибіркового розпізнавання і приєднання окремих речовин. На поверхні клітинних мембран, а також усередині клітини розташовуються рецептори – білкові утворення, здатні вибірково взаємодіяти з різноманітними регуляторами (гормонами, медіаторами й іншими біологічно активними сполуками), зумовлюючи цілу низку специфічних ефектів.

8. **Поживна функція.** Цю функцію виконують так звані резервні, запасні білки, які є джерелом живлення плоду, клітин, які розвиваються. Білки – найважливіша складова частина їжі людини і корму тварин. Білку та його компонентам відводиться центральне місце і в проблемі створення синтетичної їжі, над розв'язанням якої працюють багато лабораторій світу.

9. **Знешкоджувальна функція.** Завдяки різноманітним функціональним групам білки можуть зв'язувати різні токсичні сполуки (важкі метали, алкалоїди, токсини та ін.) і знешкоджувати їх. На цьому засноване їхнє застосування як антидотів.

10. **Енергетична функція.** При повному окисненні одного грама білка виділяється близько 17,1 кДж енергії, що вказує на здатність білків брати участь у забезпеченні організму енергією. Але використання білків із цією

метою відбувається тільки у випадку нестачі основних джерел енергії – вуглеводів і ліпідів.

11. **Когенетична функція** (префікс «ко» в перекладі з латинської означає сумісність дії). Ця функція виконується складними білками – нуклеопротейнами. Самі білки – це негенетичний (неспадковий) матеріал, але вони допомагають нуклеїновим кислотам реалізувати здатність до перенесення генетичної інформації і відтворення.

Поряд із наведеними, білки виконують ще й інші функції: *енерготрансформуючу* – беруть участь у трансформації електричної й осмотичної енергії в хімічну (АТФ); *енергоосмотичну* – забезпечують утворення різниці електричних зарядів і градієнта концентрації іонів на мембрані; створюють онкотичний тиск; входять до складу *буферних* систем організму, впливаючи на кислотно-основну рівновагу крові, на рН.

На сьогодні досягнуто значних успіхів у розкритті структури великої кількості білків, у вивченні взаємозв'язку структури і функції білків, механізму їх участі у найважливіших процесах життєдіяльності організму, у розумінні основ патогенезу багатьох хвороб. Білки, пептиди, амінокислоти та їх похідні, які виявляють біологічну активність, знайшли застосування у фармації як лікарські засоби. Білки мають велике народногосподарське значення. Вони є найважливішими компонентами їжі людини і сільськогосподарських тварин. Хронічна нестача білків призводить до різноманітних захворювань, зменшуючи тим самим тривалість ті якості життя.

Хімічна будова пептидів і білків

Білки – це лінійні гетеробіополімери, що побудовані із залишків протеїногенних амінокислот. Як високомолекулярні органічні нітрогеновмісні сполуки, білки побудовані з великої кількості залишків амінокислот, сполучених між собою кислотно-амідним (пептидним) зв'язком у поліпептидний ланцюг або ланцюги, які мають складну просторову

організацію (конформацію) і виконують різноманітні функції живих організмів.

Класифікація і будова амінокислот

Під час повного кислотного, лужного або ферментативного гідролізу білків звільняються вільні амінокислоти.

Амінокислоти є похідними органічних карбонових кислот, у яких один або декілька атомів водню у вуглеводневому радикалі заміщені на аміногрупу. Залежно від розташування NH_2 -групи розрізняють α -, β -, γ - та інші амінокислоти. У живих організмах вони зустрічаються у вільному або зв'язаному стані в складі деяких біологічно активних речовин, але до складу білків входять лише α ,L-амінокислоти, у яких NH_2 -група приєднується до α -карбонового атома. Якщо амінокислота містить дві аміногрупи, то друга знаходиться, головним чином, біля найвіддаленішого (крайнього) атома стосовно α -карбонового атома.

Загальною ознакою, характерною для всіх амінокислот, які входять до складу білків, є наявність вільної карбоксильної групи і вільної незаміщеної аміногрупи біля α -карбонового атома. Крім цих двох, так званих функціональних груп, кожна амінокислота містить характерний тільки для неї радикал (R-групу). Хімічна природа радикалів різноманітна: від атома водню до циклічних сполук. Саме радикали визначають структурну і функціональну особливість амінокислот.

Загальний вигляд будови α -L-амінокислоти може бути поданий формулою (рис. 1):

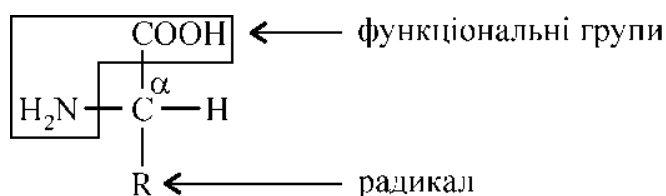


Рис. 1. Загальна структура α -L-амінокислоти

На даний час у природі виявлено більше 300 різних амінокислот. Проте деякі з них виявлені лише в певних біологічних спільнотах або в окремих організмах. В організмі людини міститься близько 60 амінокислот і їх похідних, але не всі вони входять до складу білків. Серед них виділено групу з 20 найважливіших амінокислот, які постійно зустрічаються в білкових сполуках. Амінокислоти, що входять до складу білків, одержали назву *протеїногенних* (стандартних). Серед них виділяють головні (їх всього 20) і рідкісні, які у більшості випадків є похідними тих же 20 амінокислот. Амінокислоти, які не беруть участі в побудові білків, так звані *непротеїногенні*, знаходяться в клітині або у вільному стані, або входять до складу інших небілкових сполук. Вони більш різноманітні, особливо ті, які містяться у вищих рослинах і грибах.

Амінокислоти класифікуються кількома способами залежно від ознаки, за якою відбувається їх розподіл на групи. Прийнято в основному три класифікації амінокислот: **структурна** – за будовою бокового радикалу; **електрохімічна** – за кислото-лужними властивостями амінокислот; **біологічна** (фізіологічна) – за мірою незамінності амінокислот для організму.

Відповідно до загальної формули α -амінокислоти відрізняються лише будовою R, згідно з чим вони поділяються на аліфатичні (ациклічні), циклічні. Кожна група підрозділяється на підгрупи. Так, амінокислоти аліфатичного ряду в залежності від кількості аміно- і карбоксильних груп поділяються на моноаміномонокарбонові, діаміномонокарбонові, моноамінодикарбонові, діамінодикарбонові.

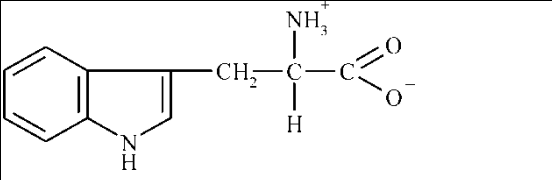
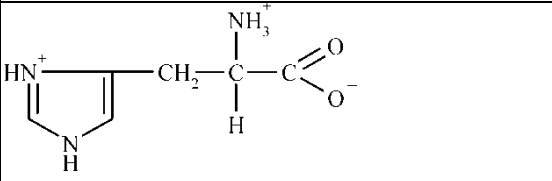
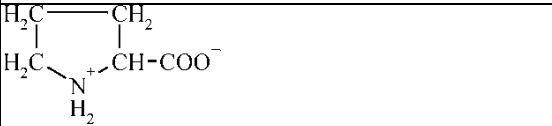
У свою чергу аліфатичні амінокислоти, залежно від наявності тієї чи іншої групи в радикалі, підрозділяють на такі підгрупи: гідрокси-, тіо-, амідовмісні та інші амінокислоти.

Хімічна структура, назва і скорочені трьохлітерні позначення амінокислот наведено в табл. 1.

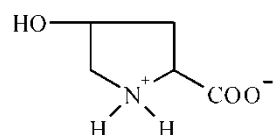
Класифікація протеїногенних амінокислот

Структурна формула	Назва	Позначення
I. АЦИКЛІЧНІ АМІНОКИСЛОТИ		
1. Аліфатичні незаміщені амінокислоти (моноаміномонокарбонові)		
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Гліцин (глікокол), α-амінооцтова кислота	Глі
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Аланін (α-амінопропіонова кислота)	Ала
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}-\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 \quad \text{H} \quad \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Валін (α-аміноізовалеріанова кислота)	Вал
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 \quad \text{H} \quad \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Лейцин (α-аміноізокапронова кислота)	Лей
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}-\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2 \quad \text{H} \quad \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Ізолейцин (α-аміно-β-метилвалеріанова кислота)	Іле
2. Аліфатичні заміщені амінокислоти		
а) Гідроксиамінокислоти		
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Серин (α-аміно-β-гідроксипропіонова кислота)	Сер
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{NH}_3^+ \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{OH} \quad \text{H} \quad \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Треонін (α-аміно-β-гідроксимасляна кислота)	Тре
б) Тіоамінокислоти		
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Цистеїн (α-аміно-β-тіопропіонова кислота)	Цис

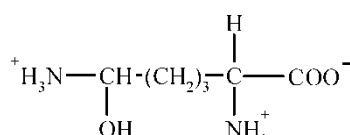
$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$	Метіонін (α-аміно-γ-метилтіомасляна кислота)	Мет
в) Карбоксиамінокислоти (моноамінодикарбонові кислоти)		
$\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_3^+}{\text{C}}}-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$	Аспарагінова (α-аміноянтарна кислота)	Асп
$\text{O}=\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_3^+}{\text{C}}}-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$	Глутамінова (α-аміноглутарова) кислота	Глу
г) Амінокислоти, які містять амідні групи		
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_3^+}{\text{C}}}-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$	Аспарагін (γ-амід-α-аміноянтарної кислоти)	Асн
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_3^+}{\text{C}}}-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$	Глутамін (δ-амід-α-аміноглутарової кислоти)	Глн
д) Діамінокислоти (діаміномонакарбонові кислоти)		
$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_3^+}{\text{C}}}-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$	Лізін (α, ε-діамінокапронова кислота)	Ліз
$\text{H}_3\text{N}^+-\underset{\text{NH}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_3^+}{\text{C}}}-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$	Аргінін (α-аміно-δ-гуанідиновалеріанова кислота)	Арг
II. ЦИКЛІЧНІ АМІНОКИСЛОТИ		
1. Ароматичні амінокислоти		
$\text{C}_6\text{H}_5-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_3^+}{\text{C}}}-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$	Фенілаланін (α-аміно-β-фенілпропіонова кислота)	Фен
$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_3^+}{\text{C}}}-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$	Тирозин (α-аміно-β-парагідроксифенілпропіонова кислота)	Тир
2. Гетероциклічні амінокислоти		

	Триптофан (α-аміно-β-індолілпропіонова кислота)	Трп або Три
	Гістидин (α-аміно-β-імідазолілпропіонова кислота)	Гіс
3. Циклічна імінокислота		
	Пролін (піролідин-α-карбонова кислота)	Про

Деякі амінокислоти, вже входячи до складу білків, можуть модифікуватися, тобто зазнавати певних хімічних перетворень, які призводять до зміни у структурі радикала. Вони не беруть безпосередньої участі у синтезі білків. Але їх можна знайти в гідролізаті білків. Так, у результаті процесу гідроксильовання, який відбувається в організмі, у бокові радикали лізину та проліну білка колагену вводяться ОН-групи з утворенням гідроксилізу та гідроксипроліну:



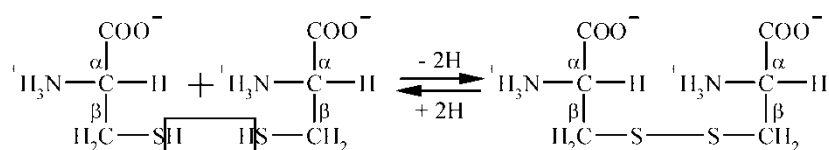
Гідроксипролін
(γ-гідроксипіролідин-α-карбонова кислота)



Гідроксилізін
(α,ε-діаміно-ε-гідрокси-капронова кислота)

Рис. 2. Структура гідроксилізу та гідроксипроліну

Внаслідок модифікаційних перетворень може відбуватися конденсація двох молекул цистеїну з утворенням дисульфіду – цистину (рис. 3).



Цистеїн-SH

Цистеїн-SH

Цистин (цис-S-S) (β,β'-дитіо-α, α'-діамінопропіонова кислота або ди-α-аміно-β-тіопропіонова кислота)

Рис. 3. Будова цистину

Цей процес має місце під час взаємодії цистеїнових залишків у поліпептидному ланцюзі: як усередині його, так і між поліпептидними ланцюгами, що спостерігається при формуванні просторової конформації білкової молекули.

За електрохімічними (кислотно-лужними) властивостями амінокислоти залежно від кількості NH_2 - і COOH - груп у молекулі поділяють на три групи: **кислі** – з додатковими карбоксильними групами в боковому радикалі (моноамінодикарбонові кислоти: аспарагінова і глутамінова); **лужні** – діаміномонокарбонові (лізин, аргінін) і гістидин; **нейтральні** – решта амінокислот, у яких боковий радикал не проявляє ні кислих, ні лужних властивостей. Деякі автори вважають, що у цистеїну і тирозину сульфгідрильна і гідроксильна групи в боковому радикалі мають слабковиражені кислі властивості.

Сучасна раціональна класифікація включає 4 класи амінокислот:

- **неполярні** (гідрофобні), бокові радикали яких не мають спорідненості з водою. До них відносяться аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан, пролін;

- **полярні** (гідрофільні) **незаряджені** – гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін, глутамін;

- **полярні негативно заряджені** – аспарагінова і глутамінова кислоти.

- **полярні позитивно заряджені** – лізин, аргінін, гістидин.

За біологічним (фізіологічним) значенням амінокислоти поділяють на три групи:

- **незамінні**, котрі не можуть синтезуватися в організмі з інших сполук, тому повинні обов'язково надходити з харчовими продуктами. Це незамінні добавки їжі. Незамінних амінокислот для людини вісім: треонін, метіонін, валін, лейцин, ізолейцин, лізин, фенілаланін і триптофан;

- **напівзамінні** амінокислоти можуть утворюватися в організмі, але не в достатній кількості, тому частково мають надходити з їжею. Для людини такими амінокислотами є аргінін, тирозин, гістидин;

- **замінні** амінокислоти синтезуються в організмі в достатній кількості з незамінних амінокислот та інших сполук. До них належить решта амінокислот.

Наведена біологічна класифікація амінокислот не є універсальною на відміну від попередніх і певною мірою є умовною, тому що залежить від виду організму. Однак абсолютна незамінність восьми амінокислот є універсальною для усіх видів організмів.

Амінокислоти – амфотерні сполуки, які містять дві протилежні за властивостями функціональні групи: карбоксильну й амінну. Тому у звичайних умовах у водних розчинах або кристалічному стані можлива взаємодія між ними з утворенням дипольних іонів або цвіттер-іонів.

За хімічними властивостями амінокислоти – амфотерні електроліти, тобто поєднують властивості і основ, і кислот. У залежності від рН середовища вони можуть мати кислі або основні властивості. У кислому середовищі ($\text{pH} < 7$) амінокислоти несуть позитивний заряд (катіони), оскільки надлишок протонів у середовищі пригнічує дисоціацію карбоксильних груп.

Усі α -амінокислоти, крім гліцину, оптично активні і можуть існувати у вигляді пари просторових ізомерів – енантіомерів D і L, оскільки α -карбоновий атом у них є *хіральним* (біля нього розташовані чотири різні функціональні групи).

У живих організмах розрізняють L- і D- форми амінокислот. Усі α -амінокислоти, які входять до складу білків тварин і людини, мають L-конфігурацію. У їхніх проекціях аміногрупа знаходиться ліворуч подібно до гідроксигрупи в L-гліцериновому альдегіді. Використання α -амінокислот L-ряду для біосинтезу білків людського організму має надзвичайно важливе

значення у формуванні їх просторової структури та виявленні біологічної активності. Із цим безпосередньо пов'язана стереоспецифічність дії ферментів-білків.

Залишки D- α -амінокислот входять до складу багатьох природних пептидів, насамперед – антибіотиків. D-амінокислоти знайдено у складі біополімерів клітинних стінок бактерій. Наприклад, залишок D-глутамінової кислоти входить до оболонки бактерій сибірської виразки.

Пептиди

Дуже важливою властивістю α -амінокислот є їхня здатність вступати в реакцію поліконденсації з виділенням молекули води за рахунок OH-групи α -карбоксилу однієї амінокислоти й одного водню α -NH₂-групи другої з утворенням ковалентного амідного зв'язку (-CO-NH-) між ними, який отримав назву пептидного. У його утворенні беруть участь тільки α -NH₂, та α -COOH групи сусідніх амінокислот. Утворені при цьому поліаміди називають пептидами. При взаємодії двох амінокислот утворюється дипептид, трьох – трипептид і так далі аж до утворення величезного поліпептиду. Умовно прийнято, що пептиди, які містять від 2 до 20 амінокислотних залишків, належать до олігопептидів; ті, що мають в молекулі від 20 до 50 амінокислотних залишків – до поліпептидів. Пептидні ланцюги, які об'єднують понад 50 амінокислот і мають молекулярну масу більшу за 6000, лежать в основі білків.

Назви пептидів складаються з назв амінокислот, які входять до їх складу. Кожний пептид або поліпептидний ланцюг будь-якої довжини має N-кінцеву амінокислоту, що містить вільну α -NH₂-групу і C-кінцеву амінокислоту, що містить вільну COOH-групу біля α -карбонового атома. Оскільки до складу пептидів α -амінокислоти входять у формі ацилів, то в назві пептидів вони набувають характерного для ацилів закінчення «-іл» замість «-ін», тобто «аланіл» замість «аланін», «аспарагіл» замість «аспарагін», «глутамініл» замість «глутамінової кислоти» і т.ін. Найменування пептидів складається з

назви першої N-кінцевої амінокислоти із закінченням «іл», наступних амінокислот із таким самим закінченням і повної назви C-кінцевої амінокислоти з вільною COOH-групою біля α -карбонового атома.

Будова і рівні організації білків

У 1888 р. О.Я.Данилевський, досліджуючи продукти розщеплення білків під впливом слабких лугів і проводячи біуретову реакцію, висловив низку цікавих ідей з приводу будови білкової молекули. Він уперше вказав на полімерний характер будови білків і на те, що розщеплення їх має гідролітичний характер, тобто здійснюється шляхом гідролізу. Ним було встановлено, що при добавленні до продуктів розпаду білка лужного розчину сульфату міді виникає синьо-фіолетове забарвлення. Таке ж забарвлення давав біурет ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$). О. Я. Данилевський припускав, що біуретова реакція зумовлена чергуванням груп $-\text{CO}-\text{NH}-$ у молекулі біуретового комплексу, тому запропонував теорію про те, що основними компонентами молекул білка необхідно вважати амінокислоти, котрі зв'язані між собою за допомогою груп $-\text{CO}-\text{NH}-$.

На початку XX ст. німецький учений Е. Фішер підтвердив гіпотезу Данилевського, здійснивши синтез поліпептиду, який складався з 18 амінокислот і вже мав деякі властивості білків (давав біуретову реакцію, розщеплювався ферментами тощо). Зв'язок, який утворювався між амінокислотами, Фішер назвав *пептидним*.

Молекули білків дуже складні. Для зручності їх вивчення були введені поняття про чотири рівні організації білкової молекули: первинний (лінійний поліпептидний ланцюг), вторинний (просторова спіралізація або утворення шарувато-складчастих структур з одного поліпептидного ланцюга або між ланцюгами), третинний (просторове укладання поліпептидного ланцюга в певному об'ємі внаслідок його вигинів), четвертинний (об'єднання поліпептидних ланцюгів у макромолекулу), а в останні роки ще надвторинні і доменні структури (проміжні).

Первинна структура білка являє собою лінійний ланцюг залишків α -амінокислот, які розташовані у певній послідовності в поліпептидному ланцюзі і з'єднані між собою пептидними зв'язками. Таким чином, **під первинною структурою білка розуміють кількість, склад і порядок розташування амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюзі**. Кожен білок має специфічну структуру, котра визначається генетичною інформацією. Основу первинної структури складають ковалентні пептидні зв'язки. Кількість різновидів білкових молекул у природі величезна, їхня різноманітність пов'язана з різним набором амінокислот, що входять до складу білка, і порядком їх чергування в поліпептидному ланцюзі. Так, уже з чотирьох амінокислот можна побудувати 24 різні тетрапептиди, із п'яти – 120 пентапептидів, з одинадцяти – 40 млн. ізомерів, а з 20 різних амінокислот теоретично може утворитися астрономічна кількість ізомерів (2×10^{18}), з урахуванням того, що кожна з цих амінокислот зустрічається тільки один раз. Кількість ізомерів ще більше зростає, якщо врахувати, що до складу білка входить не по одній молекулі певної амінокислоти, а більше. Крім того, деякі амінокислоти можуть бути відсутні зовсім. Але в живій природі реалізується тільки мала частка можливих ізомерів. Усі білки різні за своєю первинною структурою. Як уже було зазначено, потенціально можливе число таких структур практично необмежене. Вважають, що загальна кількість різних типів білків в усіх видів живих організмів становить величину порядку 10^{10} - 10^{12} . В організмі людини, за приблизною оцінкою, існує близько 100 тис. різних білків.

Вісь, хребет або стрижень усіх поліпептидних ланцюгів побудований однотипно і являє собою чергування атома нітрогену і двох атомів карбону, із яких до першого карбону приєднується атом водню і радикал відповідної кислоти (R), а до другого – оксогрупа (карбонільний залишок α -амінокислоти). Ця закономірність дозволяє легко записувати первинну структуру поліпептидного ланцюга білка, змінюючи тільки радикали залишків амінокислот (рис. 4).

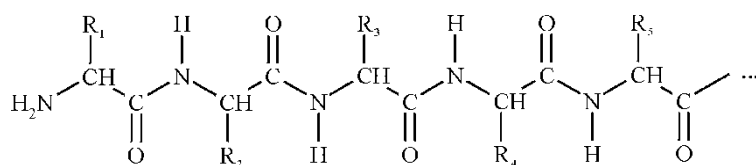


Рис. 4. Структура поліпептидного ланцюга

Отже, кожна ланка такого ланцюга представлена залишком тієї або іншої амінокислоти, і весь ланцюг розміщується в одній площині.

Поліпептидні ланцюги інколи модифікуються за кінцевими групами. Це відбувається, наприклад, при ацетилюванні (приєднанні залишку оцтової кислоти) до α -NH₂-групи в актині, міозині, цитохромі *c*, лактатдегідрогеназі та інших; формілюванні (бджолина отрута, мелітин), метилюванні в рибосомних білках кишкової палички. На С-кінці поліпептидного ланцюга в окремих випадках може відбуватися амідування з утворенням амідної групи (деякі гормони, бджолина отрута).

На даний час розшифровано амінокислотну послідовність приблизно 2500 білків: гемоглобінів, імуноглобулінів, цитохромів, білків рибосом, великої кількості ферментів (пепсин, хімотрипсин, лізоцим, альдолаза та ін.).

Успішне вивчення первинної структури білків обумовило їх хімічний синтез (наприклад, інсуліну, рибонуклеази та ін.).

Таким чином, первинна структура білка (поліпептидний ланцюг) – це загальна структурна формула білків. Проте будова білкової молекули складніша, що пов'язано з її просторовою організацією – конформаційними формами.

Вторинна структура білка являє собою впорядковану просторову конформацію поліпептидного ланцюга. Вона утворюється за рахунок водневих зв'язків між пептидними групами в одному поліпептидному ланцюзі або між сусідніми поліпептидними ланцюгами. При цьому конформація може набувати вигляду спіральних і шарувато-складчастих структур.

Вторинна структура представлена такими регулярними структурами, як α -спіраль, β -структура (складчастий шар або лист) та β -вигин. Певна частина поліпептидного ланцюга не має впорядкованої структури, такі ділянки називають аморфними, або безструктурними зонами. Отже, вторинна структура (рис. 5) – це форма і ступінь спіралізації поліпептидного ланцюга в просторі (спіральна конформація) і утворення ділянок β -структур в одному поліпептидному ланцюзі або, в основному, між поліпептидними ланцюгами (шарувато-складчаста конформація).

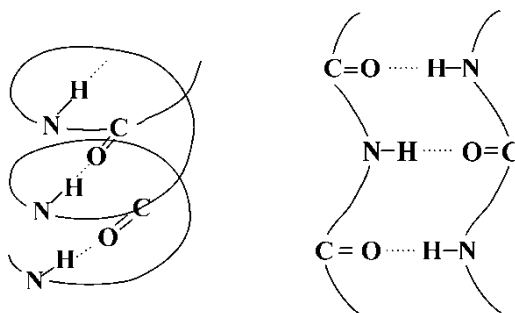


Рис. 5. Вигляд α -спіралі і β -структури

α -Спіраль. Спираючись на дані рентгеноструктурних досліджень пептидів і розрахункові дані, американські вчені Л.Полінг та Р.Корі (1950 р.) встановили, що для пептидів найвигіднішою конформацією є певна спіральозакручена структура, яку вони назвали α -спіраллю. Її можна уявити як закручену ліворуч або праворуч гвинтову драбину, в якій сходинками служать радикали амінокислот. У природних білках виявлено тільки праві α -спіралі.

При формуванні α -спіралі водневі зв'язки утворюються в поліпептидному ланцюзі між кожною карбонільною ($-\text{CO}-$) групою і четвертою за ходом ланцюга – NH -групою. На кожний виток припадає 3,6 амінокислотні залишки, крок спіралі дорівнює 0,54 нм, діаметр спіралі $\sim 0,5$ нм, кут підйому складає 26° . Водневі зв'язки орієнтовані вздовж осі спіралі, з'єднуючи її витки, а бокові радикали залишків амінокислот знаходяться на зовнішньому боці спіральної конформації і розташовані по

різні боки від її осі. Пептидні ланцюги набувають α -спіральної конформації довільно. Хоча енергія водневих зв'язків, які беруть участь в утворенні α -спіралі, порівняно невелика, значна кількість цих зв'язків забезпечує структурі стабільність, що призводить до виразного енергетичного ефекту, внаслідок чого α -спіральна конформація є досить стійкою і жорсткою. Стабільність структури залежить і від інших факторів, зокрема, від бокових радикалів залишків амінокислот, розташованих у різних ділянках поліпептидного ланцюга. Так, дослідження, проведені з поліпептидами амінокислот, наприклад, полілізином, поліаланіном та іншими, показали, що деякі амінокислоти (аланін, метіонін, лейцин, фенілаланін, тирозин, триптофан, гістидин) сприяють утворенню α -спіралі, інші – гліцин, серин, треонін, лізин, аргінін, аспарагінова і глютамінова кислоти – її дестабілізують. Залишки імінокислот проліну і гідроксипроліну не вкладаються в просторову спіралізацію α -структур, і вона порушується. Поліпептидний ланцюг на цих ділянках легко вигинається, оскільки не утримується в даному випадку другим водневим зв'язком. Наведені дані можуть бути однією з можливих причин того, що поліпептидний ланцюг у молекулах білка спіралізується не повністю. Ступінь спіралізації поліпептидного ланцюга у різних білків неоднаковий. Повністю спіралізовані поліпептидні ланцюги зустрічаються дуже рідко. Наприклад, α -кератин є повністю α -спіралізованим білком. Білок м'язів параміозин спіралізований на 96–100%, міоглобін і гемоглобін – 75%, альбумін сироватки крові – 50%, альбумін курячого яйця – 45%, лізоцим – 35%, пепсин – 38%, рибонуклеаза – 17%, хімотрипсин – 11%.

Крім α -спіралі, у білках виявлено інші типи спіралей, до витків яких входять 3,0 або 4,4 залишки амінокислот. Такі спіралі зустрічаються дуже рідко, в основному на коротких ділянках, утворюючи на кінцях α -спіралі 1-2 витки. Білки зі структурою α -спіралі можуть бути або глобулярними (альбуміни і глобуліни яєчного білка і молока, а також пепсин та ін.), або фібрилярними (міозин, еластин, α -кератин та ін.).

Слід відзначити, що внаслідок скручування поліпептидного ланцюга на спіралізованих ділянках білкової молекули виникають зони перерозподілу електронів. Вони можуть брати участь у передачі енергії збудження електронів, що має величезне значення для здійснення хімічних реакцій і трансформації одного виду енергії в інший.

β-Структура. Іншим різновидом вторинної структури білків є β-структура, яка називається також складчастим шаром, або листом (рис. 6).

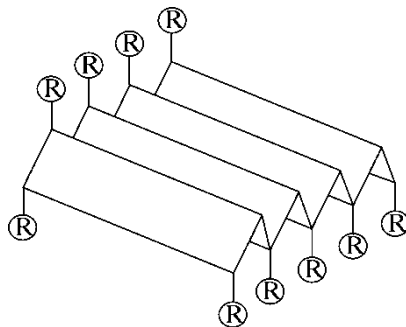


Рис. 6. Вигляд β-структури. Складчастий лист, де R – радикали амінокислот

Цей різновид вторинної структури має слабо вигнуту конфігурацію поліпептидного ланцюга. Вона формується за допомогою міжпептидних водневих зв'язків у межах окремих ділянок одного поліпептидного ланцюга, де водневі зв'язки будуть всередині поліпептидного ланцюга (коротка β-структура), або групою близько розташованих суміжних поліпептидних ланцюгів у молекулі, де водневі зв'язки будуть замикатися між ланцюгами (повна β-структура). У більшості випадків складчасті шари містять не більше шести поліпептидних ланцюгів. Ця структура нагадує міхи гармошки. Залежно від взаємної орієнтації ланцюгів розрізняють паралельні й антипаралельні β-структури (рис. 7). При цьому, якщо ланцюги паралельні, тобто мають однаковий напрямок від N- до С-кінця, то утворюється паралельний складчастий шар (наприклад, у β-кератину). Антипаралельні ланцюги (N-кінці спрямовані у протилежні боки) утворюють структуру антипаралельного складчастого шару (наприклад, у фіброїні шовку).

Антипаралельна структура утворюється в тому випадку, якщо складчастий ланцюг вигинається, робить поворот назад і йде вздовж самого себе у зворотньому напрямку, а в місці повороту утворюється так званий β -вигин – особливий вид вторинної структури. β -Вигини утворюються чотирма послідовно розміщеними амінокислотними залишками.

У складчастих ланцюгах число залишків на «виток» дорівнює 2 (в плоскому складчастому шарі) або 2,3 (у ледь скрученому шарі), радіус спіралі 0,1 нм. Відстань між ланцюгами складає 0,95 нм, а період ідентичності вздовж ланцюга – 0,70 нм для паралельних ланцюгів і 0,65 нм для антипаралельних. Доведено, що в складі β -структур рідко зустрічаються глутамінова кислота, аспарагін, гістидин, лізин, серин, пролін. Стабільність складчастого шару визначається, головним чином, міжпептидними водневими зв'язками. Інші типи зв'язку (див. нижче) майже не беруть у цьому участі, за винятком дисульфідних зв'язків, які виникають уперек у місцях знаходження залишків цистеїну. Наприклад, у β -кератині паралельні поліпептидні ланцюги додатково стабілізуються міжланцюжковими-S-S-зв'язками.

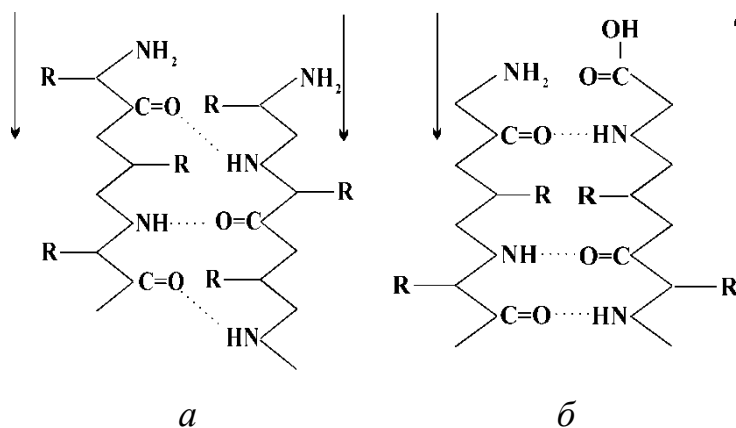


Рис. 7. Схематичне зображення β -структур: а – паралельні ланцюги; б – антипаралельні ланцюги

У білках можливі переходи α -структур у β -структури і навпаки внаслідок перебудови водневих зв'язків. Такий перехід виявлено в кератині –

білку волосся: α -кератин переходить у β -кератин. Під час миття волосся лужними миючими засобами легко порушується спіральна α -структура і він переходить у β -кератин (кучеряве волосся розпрямляється). У структурі багатьох білків одночасно присутні α -спіралі і β -структури (лізоцим, хімотрипсин, рибонуклеаза, лактатдегідрогеназа, інсулін та ін.).

Надвторинна структура і доменні білки

Методом рентгеноструктурного аналізу доведене існування ще двох рівней організації білкової молекули: надвторинна структура і доменні білки – проміжні між вторинними і третинними структурами.

Надвторинна структура зумовлена наявністю ансамблів взаємодіючих між собою вторинних структур. Це агрегати, у яких α -спіральні і β -структурні ділянки в білках взаємодіють одна з одною і між собою. Наприклад, надвторинною структурою є суперспіралізована α -спіраль, у якій два α -спіральні поліпептидні ланцюги скручуються між собою, створюючи ліву суперспіраль (рис. 8). Короткі ділянки цієї суперспіралі зустрічаються в глобулярних білках (бактеріородопсин, гемеритрин), але, як правило, у найбільш упорядкованій формі, у фібрилярних білках. У структурі кератину три α -спіральні ланцюги скручуються у надвторинну структуру, утворюючи первинний агрегат – протофібрили, які потім, у свою чергу, об'єднуються в більш складну організацію білків – мікрофібрили, що утворюють волосину. Така структура пояснює, чому шерсть є еластичною, легко розтягується і після зняття зусилля поступово відновлює свою довжину. Через те, що міжмолекулярні зв'язки слабкі, шерсть не відзначається міцністю.



Рис. 8. Схема структурної організації колагену: а – суперспіраль; б – проколаген

Колагенова спіраль. Колаген один з найпоширеніших білків організму людини, на його частку припадає близько 30% загальної кількості білка. Це волокнистий, нерозчинний у воді білок. Разом з іншими речовинами він утворює колагенові волокна, які складають основну масу сполучної тканини людини. Одиничний ланцюг колагену (первинна структура) містить близько тисячі амінокислотних залишків і схожий на ламану лінію, оскільки майже увесь поліпептидний ланцюг побудований із повторюваних триплетів складу (глі-про-про-ОН), тобто містить залишки антиспіральних амінокислот. Тому при формуванні вторинної структури він не може давати типових α -спіралей, які мають гвинтову симетрію, і має форму сильно витягнутої спіралі (α -ланцюга). Три паралельно витягнуті α -ланцюги скручуються у надвторинну структуру – суперспіраль (проколаген або тропоколаген), яка стабілізується водневими зв'язками між триплетами різних ланцюгів. Спіральні ланцюги сильно наближені один до одного, і в цілому суперспіраль має компактну структуру. Плоскі кільця проліну і гідроксипроліну, які регулярно чергуються вздовж ланцюга, як і міжланцюгові зв'язки між α -ланцюгами тропоколагену, надають їй жорсткості, тому колаген стійкий до розтягування.

Інша поширена група **супервторинних структур** – різні варіанти так званих $\beta\alpha\beta$ -структур, в яких α -спіраль взаємодіє із двома складчастими β -шарами. Найчастіше зустрічається структура $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, показана на рис. 9, а також $\beta\beta\beta$ (лактатдегідрогеназа, стафілококова нуклеаза, T_4 -лізоцим та ін.).

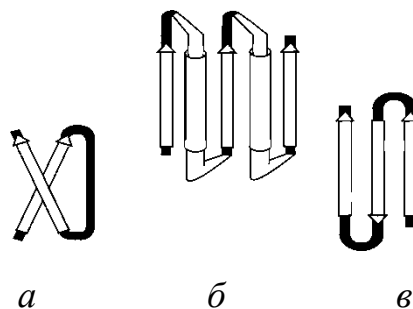


Рис. 9. Надвторинні структури білків: а – $\beta\zeta\beta$ -ланка; б – $\beta\alpha\beta\alpha\beta$; в – $\beta\beta\beta$. Стрілками позначені β -структури, циліндрами – α -спіралі, аморфні зони зафарбовано (с)

Багато великих глобулярних білків, утворених внаслідок певної просторової укладки одного поліпептидного ланцюга, містять структурно і функціонально відокремлені ділянки (ніби маленькі глобули), які мають певну автономію. Вони слабо взаємодіють між собою і одержали назву **доменів**, а вся молекула – **доменний білок**. У молекулі доменних білків ділянки, що містять фрагменти вторинної структури (α -спіралі, β -структури та їх сполучення), утворені одним і тим же поліпептидним ланцюгом і з'єднані між собою ніби короткими перемичками цього ж ланцюга.

У середньому до складу доменів входить 100–150 залишків амінокислот, що відповідає «маленькій глобулі» з поперечником приблизно 2,5 нм. Разом з тим, зустрічаються і значно більші домени. Найвірогідніше, що функціональні домени, у котрих молекулярна маса більша за 20000, містять кілька структурних доменів. У складі цілого ряду ферментів, наприклад, містяться відокремлені коферментзв'язуючі і каталітичні домени. Зараз домени вважають фундаментальними елементами структури білкової молекули, а співвідношення і характер компонування α -спіралей і β -шарів дозволяє зрозуміти значно більше з питань еволюції білкових молекул і філогенетичних зв'язків, ніж порівняння первинних структур.

Структурні домени і доменні білки за кількістю α -спіралей і β -структур, а також за характером розташування в доменах поділяють на кілька класів або груп:

1. α -Білки, у структурі яких переважають α -спіралі (міоглобін, гемоглобін, кальційзв'язуючі білки).
2. β -Білки, які побудовані, в основному, з антипаралельних β -шарів (хімотрипсин).

3. α + β -Білки. У структурі цих білків є ділянки, які повністю складаються з α -спіралей, і ділянки, повністю побудовані з β -шарів, в основному, з антипаралельних (інсулін, лізоцим, рибонуклеаза, цитохром b_5).

4. α/β -Білки: α -спіралі і β -структури чергуються за ходом ланцюга. При цьому більшість β -структур, переважно паралельних, локалізовані в центрі, де вони вигинаються, утворюючи жорстку основу (гексокіназа, карбоксипептидаза, лактатдегідрогеназа та ін.).

5. Доменні білки без виразної вторинної структури.

Третинна структура білків являє собою спосіб укладання поліпептидного ланцюга з елементами вторинної структури (α -спіралі і β -структури) у просторі, який досягається за рахунок взаємодії між радикалами залишків амінокислот. Для багатьох білків третинна структура еквівалентна повній просторовій структурі. Упакування третинної структури має свої закономірності, залежно від типу первинної структури поліпептидного ланцюга, від стану навколишнього середовища (водно-сольовий склад, рН, температура, взаємодія білка з іншими речовинами тощо). Третинна структура білка визначає форму білкової молекули, утворюючи або глобулу (глобулярні білки) або достатньо витягнуті волокна (фібрилярні білки). У глобулярних білків поліпептидний ланцюг вигинається в просторі, робить повороти в різних напрямках, складається в компактну, унікальну тривимірну конформацію, притаманну певному білку зі специфічною функцією (рис.10).

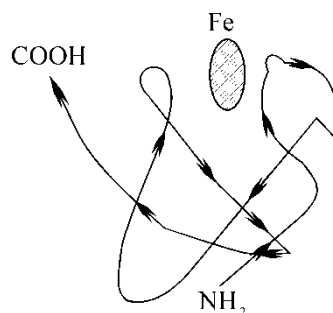


Рис.10. Третинна структура міоглобіну. Напрямок укладання поліпептидного ланцюга вказано стрілками.

У процесі укладання поліпептидний ланцюг намагається набутися енергетично вигідної форми, яка має мінімум вільної енергії. У водному середовищі молекули води, намагаючись утворити між собою водневі зв'язки, а також забезпечити гідратацію гідрофільних груп білка, виштовхують гідрофобні групи, які знаходяться у воді, примушуючи їх скручуватись і утворювати асоціати. Значна частина неполярних гідрофобних радикалів залишків амінокислот, таких як аланін, метіонін, валін, лейцин, ізолейцин, фенілаланін, триптофан та інші, які не мають спорідненості до води, ніби «уникаючи» її, занурюються у внутрішню частину глобули, утворюючи гідрофобне ядро, де майже немає води (жирні краплі) і де можуть відбуватися реакції в неводних умовах. Між гідрофобними групами ніяких особливих зв'язків не утворюється, можливе тільки виникнення ван-дер-ваальсових сил притягання, які отримали назву «гідрофобних взаємодій». Поряд із цим заряджені та гідрофільні залишки амінокислот, прагнучи зайняти якнайбільше місця у водному середовищі, зосереджуються переважно на поверхні глобули, контактуючи з водною фазою (рис. 11).

На важливість гідрофобних взаємодій у поліпептидному ланцюзі вперше вказали Д.Л.Талмуд і С.Є.Бреслер.

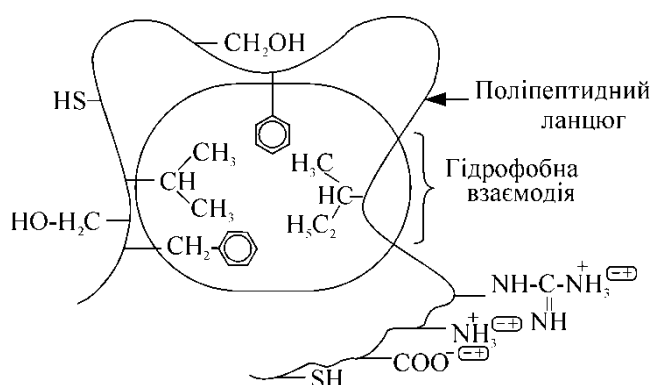


Рис.11. Утворення гідрофобної зони, $\oplus$ - диполі води

Заряджені групи на поверхні білкової глобули, як правило, сольватовані й оточені протиїонами, що збільшує розчинність білків у водному середовищі. Невелика частина гідрофобних радикалів може

знаходиться й на поверхні білкової молекули і, накопичуючись, утворювати «гідрофобні кластери», які мають значення при контактних взаємодіях. Полярні бокові радикали окремих амінокислот також можуть перебувати всередині глобули білкової молекули, утворюючи водневі зв'язки між собою або з поліпептидним кістяком.

У молекулі білка з третинною структурою зустрічаються спіралізовані ділянки (α -спіралі), шаруваті (β -структури) та ділянки у формі безладного клубка, тобто такі, що не мають будь-якої періодичної структури. Тільки правильне просторове укладання білка робить його активним: порушення його структури призводить до зміни властивостей білка і втрати біологічної активності.

У стабілізації третинної структури глобулярних білків беруть участь так звані «вторинні зв'язки», в основному слабкі (електростатичні, водневі, гідрофобні взаємодії) і в незначній кількості – ковалентні: дисульфідні, ізопептидні, ефірні (рис. 12).

До ковалентних зв'язків належать дисульфідні ($-S-S-$), які утворюються між боковими радикалами цистеїнів, що знаходяться на різних ділянках поліпептидного ланцюга (а); ізопептидні або псевдопептидні – між аміногрупами бічних радикалів лізину, аргініну (але тільки не $\alpha-NH_2$ -групами) і $COOH$ -групами бокових радикалів аспарагінової і глутамінової кислот. Звідси і назва цього типу зв'язку – подібний до пептидного. Ефірний зв'язок, який утворюється $COOH$ -групою дикарбонових кислот та OH -групою серину і треоніну, зустрічається зрідка. Водневі зв'язки виникають між двома електронегативними атомами, коли протон водню, ковалентно зв'язаний з одним із цих атомів, розташовується між ними (б). Існує велика кількість можливостей для утворення водневих зв'язків у білках, наприклад, між негативно зарядженим кислотним залишком моноамінодикарбонових кислот ($-COO^-$) і гідроксигрупами тирозину (б), серину, треоніну або NH_2 - і SH -групами бічних радикалів амінокислот і багато інших. Іонні або електростатичні взаємодії виникають під час контакту заряджених груп

бічних радикалів -NH_3^+ (лізин, аргінін, гістидин) і COO^- -групою аспарагінової і глутамінової кислот (а). Неполарні зв'язки або ван-дер-ваальсові взаємодії виникають між вуглеводневими радикалами амінокислот аланіну, валіну, лейцину, ізолейцину, фенілаланіну, триптофану (в).

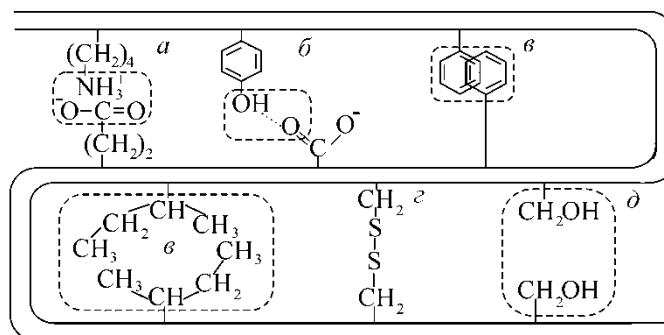


Рис. 12. Типи зв'язків між радикалами амінокислотних залишків у білковій молекулі а – електростатична взаємодія; б – водневі зв'язки; в – взаємодія неполярних бічних ланцюгів, викликана виштовхуванням ліпофільних радикалів у «суху зону» молекулами розчинника (так звана жирна крапля); г – дисульфідні зв'язки; д – диполь-дипольні взаємодії. Подвійна вигнута лінія позначає хребет поліпептидного ланцюга

Численні зв'язки між боковими радикалами визначають просторову конформацію білкової молекули. Конформація третинної структури є такою ж специфічною характеристикою даного білка, як і первинна структура.

Оскільки в глобулі амінокислоти зв'язані одна з одною як пептидними зв'язками (міцними), так і багатьма іншими слабкими зв'язками, білкова молекула не є абсолютно жорсткою структурою. У певних межах можливі незначні оборотні переміщення частин поліпептидного ланцюга відносно одна одної із розривом невеликої кількості слабких зв'язків і утворенням нових. Білкова молекула в розчині ніби пульсує в різних своїх частинах (ніби щупальці), наприклад, при утворенні активних центрів, у тому числі

ферментних. Ці зміни можна розглядати як тепловий (броунівський) рух, який не порушує основного плану конформації молекули.

Конформаційні зміни білків мають важливе значення для їх функцій у живій клітині. Невеликі зміни конформації білка спостерігаються під час взаємодії їх з іншими молекулами при виконанні біологічної функції. Наприклад, конформація міоглобіну (білка м'язів, який депонує кисень, див. далі) із приєднанням до нього киснем відрізняється від конформації міоглобіну у відсутності кисню. Приєднання кисню ніби «розпрямляє» структуру міоглобіну, і відбувається переміщення ділянки поліпептидного ланцюга, тобто дещо змінюється конформація міоглобіну.

Структурна організація фібрилярних білків має ряд особливостей у порівнянні з глобулярними білками. Якщо для глобулярного білка його третинна структура утворюється шляхом укладання в просторі одного поліпептидного ланцюга, а четвертинна – декількох ланцюгів, то у фібрилярних білків уже при формуванні вторинної структури беруть участь декілька поліпептидних ланцюгів. Молекули фібрилярних білків побудовані найчастіше з декількох поліпептидних ниток, які мають структуру α -спіралі (α -кератин, міозин), β -складчастих шарів (β -кератин, фіброїн шовку) або скручених у особливий вид спіралі – колагени (див.вище). Утворення поліпептидними ланцюгами довгих витягнутих за формою молекул і буде в цілому характеризувати третинну структуру фібрилярних білків.

Білки волосся, рогів, шкіри, покривних тканин (α -кератини) складаються із 3-7 паралельних поліпептидних ланцюгів (зв'язаних між собою дисульфідними зв'язками), які, скручуючись разом, утворюють суперспіраль. Із суперспіральних структур формуються мікрофібрили діаметром біля 0,2 нм. Кератини існують в α - і β -конформаціях. При обробці α -кератинів гарячим паром порушується система внутрішньоланцюгових водневих зв'язків у кожному поліпептидному ланцюзі, і при їхньому розтягненні вони переходять у стан β -складчастих структур (β -кератин). У

β -кератині водневі зв'язки утворюються між окремими поліпептидними нитками. Структура, подібна до β -кератину, лежить в основі будови м'язових білків міозину і тропоміозину. Схожу з β -кератином просторову структуру має також фіброїн натурального шовку. У фіброїні сусідні ланцюги тільки антипаралельні, і дисульфідних зв'язків між ланцюгами немає.

Неструктуровані білки. Далеко не всі водорозчинні білки мають упорядковану просторову структуру. Досить велика кількість білків (до 40 % у клітинах еукаріотів) не утворюють за фізіологічних умов жорсткої третинної структури, залишаючись невпорядкованими (неструктурованими), до 70 % білків мають у своєму складі окремі невпорядковані ділянки. Такі неструктуровані білки (або окремі ділянки глобулярних білків, часто розташовані на кінцях поліпептидного ланцюга, є, як правило, збідненими на гідрофобні амінокислоти, що й робить невпорядкований стан енергетично більш вигідним.

Загальною рисою неструктурованих білків є їхня здатність взаємодіяти з багатьма партнерами: це дозволяє таким білкам слугувати своєрідними платформами для збірки мультимолекулярних комплексів, виконуючи тим самим важливі функції в регуляції багатьох клітинних процесів. Часто зв'язування неструктурованого білка з іншими білками чи нуклеїновими кислотами приводить до утворення певної просторової структури, яка стабілізується цими новими взаємодіями. Утворення такої структури, у свою чергу, зумовлює формування робочої поверхні, що має спорідненість до наступної макромолекули: неструктурований білок (який стає структурованим унаслідок міжмолекулярних взаємодій) спрацьовує як своєрідний перемикач, необхідний для формування мультимолекулярного комплексу, задіяного до певного регуляторного акту.

Четвертинна структура білків. Білки, побудовані з одного поліпептидного ланцюга, мають тільки третинну структуру. Але багато білків складаються із декількох ідентичних або неідентичних поліпептидних ланцюгів, кожен з яких має свою третинну конформацію. Об'єднуючись,

вони утворюють єдиний функціональний комплекс із вищим рівнем організації – четвертинну структуру білка (рис. 13).

Білки, які мають четвертинну структуру, називають *олігомерними*. Кожний окремий поліпептидний ланцюг у складі олігомерного білка зветься *протомером*, або *субодиницею*. Деякі автори терміном «субодиниця» називають лише ту частину молекули, якій властива функціональна активність. Вона може бути представлена як одним протомером, так і декількома. Наприклад, у білка з чотирьох однакових субодиниць (a_4) протомером є мономер a , а білок із двох типів субодиниць (a_4b_4) має 2 протомери складу av .

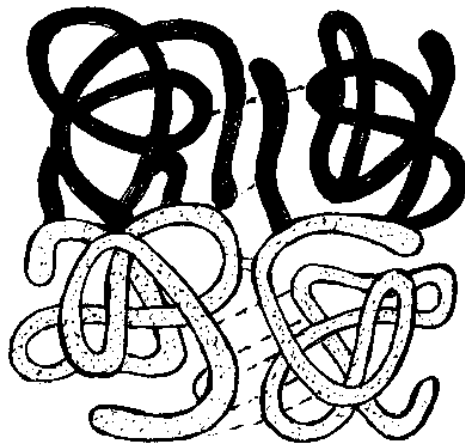


Рис. 13. Схема четвертинної структури білка

Олігомерні білки найчастіше побудовані з парного числа протомерів – від 2 до 4 (димери, тетрамери), рідше від 6 до 8, 10, 12 і більше з молекулярною масою в межах від декількох тисяч до 100000 дальтон. Олігомерні білки являють собою неподільне ціле і виконують біологічні функції, невластиві окремо взятим субодиницям. У разі дії на білки з четвертинною структурною організацією різних фізичних або хімічних факторів (сечовина, концентровані розчини нейтральних солей, органічні розчинники, детергенти, зміна рН середовища тощо) спостерігається дисоціація їх на окремі субодиниці. При цьому розриваються зв'язки, що стабілізують четвертинну структуру. Дисоціація часто буває оборотною: після вилучення відповідного агента субодиниці сполучаються між собою і четвертинна структура відновлюється. У цьому процесі важливим є те, що

при відновленні структури олігомерного білка відновлюється і його біологічна активність. У клітині існує певна рівновага дисоціації деяких олігомерних білків, при якій зберігається вміст олігомеру та його субодиниць у порівнюваних кількостях. У білків з четвертинним рівнем організації не змінюється основна конформація початкових третинних структур (глобулярна або фібрилярна). Наприклад, гемоглобін – це білок, що має четвертинну структуру і складається з чотирьох субодиниць. Кожна із субодиниць – глобулярний білок і в цілому гемоглобін також має глобулярну конформацію. Кератини – білки волосся і шерсті, які за третинною структурою належать до фібрилярних білків, мають фібрилярну конформацію четвертинної структури.

Отже, четвертинна структура білка – це спосіб взаємного розташування в просторі окремих поліпептидних ланцюгів у молекулі, а також характер зв'язку між ними.

Четвертинна структура стабілізується і підтримується в нативному стані, в основному за рахунок слабких нековалентних зв'язків (іонних і водневих) і гідрофобних взаємодій, котрі виникають між різними функціональними групами, розташованими на поверхні субодиниць. При цьому субодиниці взаємодіють між собою не будь-якою частиною своєї поверхні, а певною ділянкою – контактною поверхнею або площадкою. Контактні ділянки утворюють десятки зв'язків. Процес самозбирання відзначається високою специфічністю. Протомери певного четвертинного білка «знаходять» і «впізнають» один одного, сполучаючись лише між собою. Кожен протомер взаємодіє з іншим у десятках точок, тому помилкове сполучення практично неможливе. Взаємне впізнавання протомерів зумовлюється особливою структурою контактних ділянок, багатих на гідрофобні амінокислотні залишки («липкі» плями), котрі при з'єднанні протомерів утворюють гідрофобне ядро олігомерного білка. При цьому контактують різноіменно заряджені іонні групи і групи, здатні утворювати водневі зв'язки або гідрофобні взаємодії. Якщо у третинній структурі одного

з протомерів є виступ, то у іншого – у відповідному місці – заглиблення, в яке при контакті входить виступ. Такі взаємовідповідні контактні поверхні називають комплементарними, вони орієнтуються одна на одну за типом «ключ-замок». Отже, взаємодія між контактними поверхнями протомерів відбувається за принципом комплементарності – універсальним принципом, притаманним живій природі. Комплементарні взаємодії молекул (не лише білкових) складають основу багатьох біохімічних процесів в організмі.

Поняття про четвертинну структуру набуло особливого значення в останні роки. З'ясувалося, що, наприклад, у гемоглобіні і в деяких ферментів субодиниці структурно залежать одна від одної. Так, модифікація будь-якої субодиниці призводить до змін у третинній структурі інших субодиниць, що виявляється в особливостях їх біологічної функції. Четвертинній структурі належить велика роль у регуляції біологічної активності білків, оскільки вона є дуже чутливою до зовнішніх умов (концентрація речовин, рН, іонний склад, наявність біологічно активних сполук тощо). Незначні відхилення з боку цих факторів викликають зміни взаєморозташування субодиниць і у зв'язку із цим – зміни біологічної активності білка. Це явище є одним із основних механізмів регуляції обміну речовин (метаболізму), оскільки багато ферментів і деякі інші біологічно активні білки мають четвертинну структуру.

Сукупне використання, головним чином, РСА (рентгеноструктурного аналізу) і електронної мікроскопії, а також інших методів (визначення молекулярної маси, електрофорез, денатураційні дослідження і т.ін.) дало можливість встановити четвертинну структуру декількох сотень білків, у тому числі ферментів альдолази, піруваткінази, лактатдегідрогенази та багатьох інших. Прикладом білка з четвертинною структурою є фермент глутаматдегідрогеназа, молекула якої складається з 8 ідентичних субодиниць. Дисоціація їх досягається простим розбавленням середовища. Інший приклад: фермент лактатдегідрогеназа містить чотири субодиниці (типу Н і М), різні сполучення яких утворюють різні молекули ізоензимів. Фермент набуває активності лише при сполученні чотирьох субодиниць,

причому різні типи сполучень відрізняються і ступенем біологічної активності. Оболонку деяких вірусів утворюють білки, до складу яких входить величезна кількість субодиниць. Так, оболонка вірусу тютюнової мозаїки складається з 2130 однакових субодиниць, що розташовуються навколо однієї молекули рибонуклеїнової кислоти за типом гвинтової драбини. Класичним прикладом білків із четвертинною структурою є гемоглобін, молекула якого побудована з 4 субодиниць: двох α - і двох β -поліпептидних ланцюгів. Ці ланцюги утворюють надзвичайно впорядковану і компактну структуру. Гемоглобін має 4 гемогрупи, і являє собою унікальний зразок взаємовідношень між молекулярною структурою і функцією білка. Головна функція гемоглобіну полягає в перенесенні кисню з легенів у тканини. Англійський біохімік М.Перутц переконливо довів, що в процесі виконання своєї функції, тобто при приєднанні і втраті гемоглобіном кисню, конформація четвертинної структури зазнає закономірних змін: зв'язування кисню супроводжується стисканням молекули (між двома β -поліпептидними ланцюгами) за рахунок зближення окремих її ділянок. Віддача ж кисню призводить до відповідного збільшення об'єму молекули. Таким чином, молекула гемоглобіну, за образним виразом академіка В.О.Енгельгардта, ніби дихає, стискаючись і розширюючись подібно до того, як стискається й розправляється при диханні наша грудна клітка. Окрім того, чотири субодиниці гемоглобіну функціонують кооперативно, тобто зміни в одній субодиниці при приєднанні кисню, викликають зміни в другій і так далі, що полегшує поетапне зв'язування кисню.

Фізико-хімічні властивості білків

Виділення і очистка білків. Першим етапом виділення й очистки білків є вилучення їх із клітин. Спочатку клітини руйнують, перетворюючи їх на гомогенат за допомогою гомогенізаторів з лопатками, що обертаються, або товкачика, які виготовлені з інертного матеріалу – тефлону. Застосовують також метод розтирання із твердим матеріалом, наприклад, із

кварцовим піском. Існують методи руйнування клітин за допомогою поперемінного заморожування й розморожування. На всіх етапах виділення й очищення білків слід зважати на їх значну нестійкість, лабільність, схильність до втрати нативних властивостей. Дуже часто процес руйнування клітин супроводжується виділенням тепла, тому всі процедури необхідно проводити при знижених температурах (близько $+4^{\circ}\text{C}$) з метою запобігання теплової денатурації. Важливим є також підтримування активної реакції середовища у певному інтервалі; з цією метою середовище суспендування готують на буферних розчинах. Щоб усунути вплив різних іонів, використовують комплексоутворювачі – етилендіамінтетраацетат (ЕДТА або трилон Б) та ін. Щоб запобігти окисленню в білках SH-груп, у середовище додають відновники, наприклад цистеїн та ін. Для виділення білків клітинних органел останні спочатку одержують за допомогою ультрацентрифугування. Більшість білків у клітині знаходиться в сполученні з іншими речовинами або клітинними структурами, для їх кращої солюбілізації застосовують слабкі розчини детергентів – речовин з поверхневою активністю (дезоксихолат натрію та ін.) або деякі розчинники (ефір, бутанол тощо).

Білки екстрагують із матеріалу після його гомогенізації. У залежності від властивостей вилученого білка і мети дослідження застосовують різні розчинники: воду, сольові розчини, різноманітні буферні суміші, водно-спиртові розчини, слабкі кислоти або луги, органічні реагенти. Дуже часто екстракцію білка здійснюють у процесі гомогенізації матеріалу. Внаслідок екстракції отримують суміш білків та інших речовин, тому застосовують різні методи очистки (висолювання, ізоелектричне осадження, застосування органічних розчинників за низької температури від 5° до 10°C); використовується іонообмінна, адсорбційна або афінна хроматографія з різними адсорбентами, гельфільтрація на колонках, електрофорез. Застосовуючи різноманітні методи виділення й очистки білків, можна отримати індивідуальні білки з високим ступенем чистоти. Основними тестами на гомогенність отриманого білка є стабільний амінокислотний

склад, певна молекулярна маса, рух при електрофорезі у вигляді однієї смуги, вияв певної біоактивності.

Молекулярна маса. Молекулярна маса білків дуже велика – від декількох тисяч до мільйонів дальтон. Вважають, що сполуки з молекулярною масою < 6000 належать до поліпептидів, а > 50000 – 60000 – до олігомерів. Середнє значення молекулярної маси білків наведено у табл. 2. Найпоширенішими методами її визначення є ультрацентрифугування, гель-електрофорез, гель-фільтрація, осмометричний, дифузійний метод, РСА, метод електронної мікроскопії та ін. У 30-х роках ХХ ст., коли шведським вченим Т.Сведбергом була сконструйована ультрацентрифуга, почалося широке використання гравітаційних методів, або седиментаційного аналізу, котрий дозволяє спостерігати процес седиментації (осідання) часток. У сучасних ультрацентрифугах розвивається відцентрове прискорення, яке перевищує прискорення сили тяжіння в 500000 разів.

Амфотерні властивості білків. Білки є амфотерними електролітами, оскільки у складі їх молекули містяться як кислотні, так і лужні групи. Кислотно-основні властивості визначаються, головним чином, бічними радикалами амінокислот, здатними до іонізації. До іонізованих груп належать COO^- -групи бокових радикалів аспарагінової і глутамінової кислот, NH_3^+ -групи залишків лізину й аргініну. Іонізація решти груп у молекулах білка істотного значення не має, оскільки $\alpha\text{-NH}_2$ - і $\alpha\text{-COOH}$ -групи утворюють пептидні зв'язки, а кількість N- і С-кінцевих груп є незначною у зв'язку з великими розмірами молекул білка. Ступінь іонізації функціональних груп залежить від значення рН. У кислому середовищі іонізуються NH_2 -групи, у лужному середовищі – COOH . Тому білки у водному середовищі, подібно до амінокислот, мають властивості амфолітів: у кислому середовищі вони реагують як основи, у лужному – як кислоти. Білкам, як амфотерним електролітам, характерні буферні властивості в організмі, проте їх ємність за фізіологічних значень рН обмежена. Виняток становлять білки, що містять багато залишків гістидину, боковому радикалу якого притаманні буферні

властивості в інтервалі значень рН, близьких до фізіологічних. Таких білків мало. Так, гемоглобін, який містить до 8% гістидину, є потужним внутрішньоклітинним буфером в еритроцитах, завдяки чому і підтримує рН крові на сталому рівні. У залежності від знака заряду молекула білка в електричному полі пересуватиметься відповідно в бік катоду чи аноду. Додавання до розчину білка певної кількості іонів H^+ чи OH^- змінює рН середовища, внаслідок чого дисоціація одних груп пригнічується, а інших – посилюється.

Значення рН середовища, при якому білок не несе сумарного заряду й не рухається в електричному полі, називається *ізоелектричною точкою* (ІЕТ). Ізоелектричні точки деяких білків такі: пепсину – 1,0; казеїну – 4,8; гемоглобіну – 6,8; рибонуклеази – 7,8; лізоциму – 11,0 (див. також табл.2). ІЕТ вища за 7, якщо білок містить велику кількість залишків основних амінокислот, і менша за 7 при переважному вмісті кислих амінокислот. Для більшості глобулярних білків ІЕТ знаходяться у кислій зоні (4,5-6,5). Проте є й винятки. Наприклад, фермент пепсин, який виконує свою функцію в сильно кислому середовищі шлунка, має ІЕТ близько 1,0, а протамін – близько 12. ІЕТ білка характеризується низкою особливостей: в ІЕТ білок має найменшу розчинність і досить легко випадає в осад, втрачаючи здатність рухатися в електричному полі. Слід зазначити, що в ІЕТ білок випадає в осад у більшості випадків після додавання водовідбираючих речовин, котрі руйнують гідратну оболонку (спирту, ацетону, нейтральної солі та ін.). Знаючи ІЕТ індивідуальних білків, можна підібрати найкращі умови для їх осадження з біологічних рідин, тканинних екстрактів, які містять суміш різних білків, а також для одержання й очистки білкових препаратів. Наявність великої кількості точок дисоціації визначає і здатність білкових молекул до взаємодії з малими іонами, зокрема з іонами металів, іншими зарядженими молекулами, що дуже важливо для функціонування білка.

Здатність білків взаємодіяти як з аніонами, так і з катіонами має велике біологічне значення. Відомо, що транспорт іонів, наприклад, іонів

Cu^{2+} и Zn^{2+} забезпечується білками; деякі ферменти виявляють каталітичну дію тільки при наявності у складі їх молекули іонів металів. Важливу роль у багатьох фізіологічних процесах відіграє здатність білків зв'язувати катіон кальцію, що має безпосереднє значення в регуляції метаболічних процесів. Здатність білків утворювати з іонами металів комплекси використовується в медицині для усунення наслідків отруєння важкими металами. У цьому випадку дають випити розчин яєчного білка або молока, котрі зв'язують іони металів, перешкоджаючи їх всмоктуванню. Внаслідок наявності в складі білкової молекули великої кількості реакційноздатних груп, білки можуть брати участь в реакціях окислення, відновлення, солеутворення, ацетилювання, етерифікації, фосфорилування і т.ін. Усі ці реакції мають місце в живих організмах і забезпечують процеси їх життєдіяльності. Білки, як амфотерні поліелектроліти, виявляють в організмі буферні властивості, що має відношення до підтримання сталості рН.

Розчинність білка. Більшість білків – гідрофільні речовини, які добре розчиняються у воді. Переважна частина поверхні білкової молекули утворена групами, здатними до гідратації. Гідратація – це зв'язування диполів води з іонними й неіонними полярними групами білків. У дисоційованому стані іонні групи притягають молекули води за рахунок іон-дипольних взаємодій. Неіонні полярні бокові радикали амінокислот (серин, треонін, аспарагін, глутамін) утворюють із водою водневі зв'язки. Розчинність різних білків у воді і в різних розчинниках неоднакова і залежить від природи білка й розчинника, значення рН, температури, іонної сили тощо. Наприклад, альбуміни розчиняються у воді, а глобуліни – тільки в присутності електролітів, білки опорних тканин (кератини, колаген, еластин та ін.) не розчиняються у воді й сольових розчинах, у воді вони лише набрякають. Розчинність білків у воді зростає за невеликих концентрацій нейтральних солей (Na_2SO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та ін.). Цей ефект називають сольовим розчиненням. Нейтральні солі в малих концентраціях збільшують ступінь дисоціації іонізованих груп білка, екранують заряджені групи білкових молекул і цим зменшують білок-білкові

взаємодії. Високі концентрації нейтральних солей, навпаки, осаджують (висолюють) білки з водних розчинів; найактивніше це відбувається у ІЕТ білка. При цьому солі відтягують до себе від заряджених груп білка поляризовані молекули води і тим самим частково позбавляють білок гідратної оболонки, котра запобігає його осадженню з розчину.

Оскільки процес розчинення білків залежить від гідратації їхніх молекул, а наявність гідратної оболонки разом із зарядом є важливим фактором стабілізації молекули білка, то всі фактори, котрі послаблюють гідратацію білка або сприяють руйнуванню гідратних оболонок, зменшують таким чином розчинність білка й призводять до його осадження. У разі втрати білками гідратної оболонки виникають дипольні сили, котрі забезпечують агрегацію білкових молекул. Білки з високим дипольним моментом (глобуліни, міозин) випадають в осад за низьких концентрацій солей, а білки з низьким дипольним моментом – за високих концентрацій солей (альбуміни). Так, глобуліни випадають в осад у напівнасичених розчинах нейтральних солей, а альбуміни – при добавленні 100% насичених сольових розчинів. Знизити гідратацію білкових розчинів можна добавленням спирту, ацетону й інших органічних розчинників. Осадження білків органічними розчинниками за низьких температур, а також при висолюванні має оборотний характер. Після добавлення води і відновлення гідратних оболонок білок знову розчиняється і набуває початкового нативного стану, виявляючи електрофоретичну рухливість з тією ж біологічною активністю.

Оборотне осадження білків органічними розчинниками і методом висолювання використовують у фармацевтичній практиці для виділення білків і для їх розподілу на білкові фракції при одержанні очищених білкових, у тому числі, ферментних і гормональних препаратів, а також для одержання білків у кристалічному стані. Метод висолювання білків використовують у клініко-біохімічних лабораторіях для розподілу альбумінів і глобулінів і визначення їх співвідношення в сироватці крові. Осаджену

фракцію білка відділяють центрифугуванням, розчиняють і визначають кількісний вміст за допомогою різноманітних методів. У нормі альбуміно-глобулінове співвідношення (А/Г коефіцієнт) складає 1,5–2,3 і може змінюватися при патології, наприклад, при хронічних дифузних ушкодженнях печінки (гепатит і цироз), інфекційних захворюваннях, лихоманці, пневмонії, туберкульозі, ендокардиті, злоякісних процесах, амілоїдозі, коли збільшується вміст глобулінів.

Осмотичні властивості білків. Через високу молекулярну масу білки не здатні проникати крізь біологічні і штучні мембрани (наприклад, целофан, пергамент, висушені плівки колодію і т.ін.), що є зручним для очистки розчинів білка від низькомолекулярних органічних і неорганічних домішок. Такий процес називають діалізом. *Діаліз* – це особливий різновид розподілу речовин з використанням мембран, нездатних пропускати через свої пори високомолекулярні молекули. Діаліз використовують у біохімічних дослідженнях для очистки високомолекулярних сполук (білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів і т.ін.) від низькомолекулярних і у фармації для одержання лікарських препаратів, у тому числі і білкових. Метод діалізу використовується в практичній медицині для очистки крові від природних низькомолекулярних «шлаків» і токсичних сполук при захворюванні нирок і деяких отруєннях (апарат «штучна нирка»).

Нездатність білків дифундувати через напівпроникні мембрани спричиняє явище осмосу, тобто переміщення молекул води через мембрану в розчин білка. Якщо розчин білка відокремити від води целофановою мембраною, то, прагнучи досягти рівноваги, молекули води проникають у розчин білка. Це підвищує гідростатичний тиск (тиск стовпа води), який перешкоджає подальшій дифузії молекул води. Той тиск, або сила, яку треба прикласти, щоб зупинити осмотичний потік води, називається *осмотичним тиском*. Біологічні мембрани також непроникні для білка, тому осмотичний тиск, утворений білком, залежить від концентрації його усередині і поза

клітиною. Осмотичний тиск, зумовлений білком, називають також *онкотичним тиском*.

В'язкість розчинів білка. Для розчинів високомолекулярних молекул білка характерною є висока в'язкість. Підвищення його концентрації призводить до збільшення в'язкості розчину, оскільки зростають сили зчеплення між молекулами білка. В'язкість залежить від форми молекул. Розчини фібрилярних білків більш в'язкі, ніж глобулярних. На в'язкість розчинів сильно впливають температура і наявність електролітів. Із підвищенням температури в'язкість знижується. Додавання деяких солей, наприклад, кальцію, підвищує в'язкість, сприяючи зчепленню молекул за допомогою кальцієвих місточків. Іноді в'язкість білкового розчину збільшується настільки, що він втрачає текучість і набуває гелеподібного стану.

Денатурація білків. Під впливом фізичних (температура, ультразвук, іонізуюча радіація і т.ін.), хімічних (мінеральні й органічні кислоти, луги, органічні розчинники, важкі метали, алкалоїди, детергенти, деякі амідні, наприклад, сечовина та ін.) факторів відбуваються глибокі зміни в молекулі білка, пов'язані з порушенням четвертинної, третинної і вторинної структур, що спричиняє у свою чергу зміну фізико-хімічних і біологічних властивостей білка, тобто денатурацію. При денатурації білка має місце розрив цементуючих білкову молекулу вторинних зв'язків (водневих, дисульфідних, електростатичних, ван-дер-ваальсових та ін.). Це призводить до зміни просторової структури; глобула білка розкручується, на її поверхні збільшується кількість гідрофобних груп, тобто зменшуються гідрофільні властивості білка. Він стає більш гідрофобним, втрачає здатність розчинятися у звичайних для нього розчинниках і позбувається своїх біологічних функцій (ферментів, гормонів тощо). Після денатурації змінюється більшість фізико-хімічних властивостей білка: зменшується розчинність, збільшується кількість SH- та інших груп, посилюється в'язкість, з'являється більше хіральных атомів карбону,

змінюються оптичні властивості і константа седиментації. У структурі білка суттєво зменшується кількість α -спіралей і β -структур, зменшується кількість внутрішньомолекулярних водневих зв'язків і збільшується кількість цих зв'язків між білком і водою. Під час денатурації білка вивільняються реактивні групи, які в його нативному стані були не зовсім доступні (сульфгідрильні, фенольні, гідроксильні, імідазольні та ін.), що спричиняє зміну ІЕТ білків. Найчастіше вона зміщується у бік лужних значень рН. Денатурація білків супроводжується зростанням оптичної активності. Перетворення компактної молекули в безладний клубок, яке має місце при денатурації, призводить до того, що більшість пептидних зв'язків стають доступними для дії протеолітичних ферментів (трипсину, хімотрипсину та ін.). У зв'язку з цим протеоліз таких білків відбувається з більшою швидкістю, аніж нативних білків.\

При денатурації в більшості випадків первинна структура не порушується, тому після розкручування поліпептидного ланцюга (стадія нитки) він може знову стихійно скручуватися, утворюючи «випадковий клубок», тобто переходить до хаотичного стану (рис. 14). При цьому спостерігається агрегація білкових частинок і випадання їх в осад.

Повна денатурація білка в більшості випадків необоротна, на відміну від оборотної, за якої зміни в молекулі білка незначні, і білок за певних умов знову набуває своїх нативних властивостей (процес ренатурації). Наприклад, таке відбувається під час осадження білків органічними розчинниками – спиртом або ацетоном, якщо проводити його за низької температури, а потім швидко видалити осаджувач.

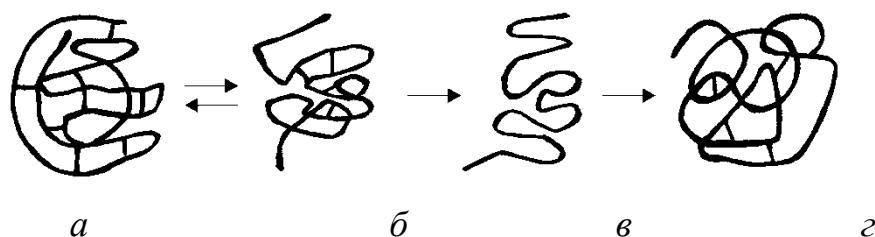


Рис. 14. Схема денатурації білка: а – нативна молекула; б – розгортання поліпептидного ланцюга; в – стадія нитки; г – випадковий клубок

Процес денатурації білків широко використовується в клініці, фармації і біохімічних дослідженнях для осадження білка в біологічному матеріалі з метою подальшого визначення в ньому небілкових і низькомолекулярних сполук; для встановлення наявності білка і його кількісного визначення; для знезараження шкіри і слизових покривів; для зв'язування солей важких металів під час лікування отруєнь солями ртуті, свинцю, міді тощо або для профілактики таких отруєнь на підприємстві.

Процес денатурації білків має місце під час прийому фармпрепаратів таніну і танальбіну, на чому ґрунтується їх в'язуча і протизапальна дія. В'язуча дія таніну зумовлена його здатністю осаджувати білки з утворенням щільних альбумінатів, які захищають від подразнення чутливі нервові закінчення тканин. При цьому зменшуються больові відчуття і відбувається безпосереднє ущільнення клітинних мембран, що зменшує вияв запальної реакції. Препарат танальбін – продукт взаємодії таніну з білком казеїном – на відміну від таніну не чинить в'язучої дії на слизову оболонку рота і шлунка. Лише після надходження в кишечник він розщеплюється, виділяючи вільний танін. Застосовується як в'язучий засіб при гострих і хронічних захворюваннях кишечника, особливо в дітей.

У фармацевтичній практиці використання процесів денатурації білка дозволяє контролювати якість білкових препаратів, наприклад, в ампулах.

Оптичні властивості білків. Як правило, усі білки, поглинають ультрафіолетове (УФ) світло у трьох зонах. Поглинання при довжині хвиль понад 250 нм з максимумом близько 280 нм зумовлюється наявністю виключно ароматичних амінокислот – фенілаланіну, тирозину, триптофану. Смуга поглинання, максимум якої знаходиться поблизу 190 нм, зумовлюється, головним чином, пептидними зв'язками. На перелічених

властивостях ґрунтується спектрофотометричний метод кількісного визначення білка. Він не дуже точний, оскільки кількість тирозину і триптофану в різних білках варіюється в досить широких межах. Незважаючи на недостатню точність, цей метод широко застосовують у сучасній біохімії, завдяки його простоті і швидкості виконання.

Білки є оптично-активними сполуками: вони обертають плоскополяризоване світло, яке проходить через їх розчин, і неоднаково поглинають ліве і праве циркулярно поляризоване світло. Зазначена властивість білків пояснюється наявністю в їх молекулі хіральних атомів карбону. Взаємодію з білками поляризованого світла вивчають за допомогою методів дисперсії оптичного обертання (ДОО), кругового дихроїзму (КД). Ці методи застосовують для загального опису вмісту спіральних структур у білках і дослідження конформаційних змін. Білкові розчини здатні також флуоресцювати – випускати квант світла при переході з електронного збудженого стану до основного. На цій властивості білків ґрунтується флуоресцентна спектроскопія. Флуоресценція характерна для таких амінокислотних залишків у молекулі білка, як фенілаланін, тирозин, триптофан. Вимірювання флуоресценції дає відомості про конформаційні перебудови білка в місцях приєднання лігандів, взаємодії з розчинниками, ступінь гнучкості молекули, міжмолекулярні відстані тощо.

Кількісні методи визначення білків використовуються у фармацевтичній практиці, у тому числі в контрольно-аналітичних лабораторіях для контролю білкових лікарських засобів (вакцин, сироваток, гаммаглобуліну, гістаглобуліну, гормонів, ферментів, білкових препаратів крові і та ін.), а також для визначення питомої активності ферментних препаратів.

Для кількісного визначення білків у лікарських засобах і біологічному матеріалі найчастіше використовують фотоколориметричні і спектрофотометричні методи, у деяких випадках кількість білка визначають

за вмістом загального нітрогену (нітрогенометрією), а також фотонейфелометрією.

У клініко-біохімічних лабораторіях з метою постановки діагнозу багатьох захворювань визначають концентрацію білка в біорідинах організму (кров, сеча, спинномозкова рідина, ексудати). У сироватці крові міститься суміш білків, які відрізняються за фізіологічним значенням, структурою і фізико-хімічними властивостями. На даний час відомо близько 100 різноманітних білків плазми крові. У нормі вміст загального білка в сироватки крові становить у дорослих 65–85 г/л (6,5–8,5 г%), у дітей до 6 років – 56–85 г/л або 5,6–8,5 г%.

Підвищення рівня концентрації білка до 120 г/л (гіперпротеїнемія) зустрічається рідко. Це спостерігається при деяких хронічних запальних процесах за рахунок утворення антитіл (поліартрит, ревматизм, мієломна хвороба – плазмоцитомі). Короткочасна відносна гіперпротеїнемія відзначається при стугненні крові через значні втрати рідини, наприклад, при посиленому потовиділенні, нестримному блюванні, холері, нецукровому діабеті, важких опіках і т.ін. Зниження кількості білка (гіпопротеїнемія) має місце при недостатньому надходженні білка з їжею (голодування), порушенні прохідності кишкового тракту, порушенні процесів біосинтезу білків в органах, ураженні печінки хімічними речовинами, мікроорганізмами, пухлинами, при втраті білка організмом (кровотеча, підвищена проникність судин, захворювання нирок, вагітність тощо).

Методам кількісного визначення білка належить значне місце в науково-дослідницьких експериментах.

Класифікація білків

Незважаючи на те, що хімічний склад і структура білків уже значною мірою вивчені, і прогрес у цій сфері продовжується, на даний час ще не створено ні чіткої номенклатури, ні дійсно наукової класифікації білків. Білки часто класифікують за випадковими ознаками: джерелами виділення білка, формою молекули, розчинністю у певних розчинниках, локалізацією

у певних органах і тканинах, амінокислотним складом тощо. Із загальної кількості білків виділяють ті чи інші вузькі або широкі групи. Так, характеризуючи білкові речовини за ступенем складності, серед них виділяють дві великі групи: **прості** і **складні білки**. До простих білків, або протеїнів, відносяться білки, котрі дають при гідролізі лише амінокислоти. Складні білки складаються із простого білка і додаткової групи небілкової природи. Складні білки поділяються на групи в залежності від будови небілкової частини – простетичної групи. За формою молекул білки ділять на **глобулярні** і **фібрилярні**. Існує також класифікація білків за їх розчинністю.

В останні роки зроблено спроби дати науково обґрунтовану класифікацію з урахуванням досягнень хімії та біохімії білків. Згідно з однією з них білки класифікуються за **функціями**, які вони виконують. За цією ознакою виділяють такі групи білків: каталітичні, білки-регулятори активності геному, захисні, токсичні, транспортні, скорочувальні, рецепторні, білки-інгібітори ферментів, білки вірусних оболонок, білки з іншими функціями. Хоча функціональна класифікація також має деякі недоліки, наприклад, при класифікації біфункціональних білків, проте вона дає можливість глибшого розуміння взаємозв'язку структури і функції молекул білка.

Прості білки розділяють на такі класи: **альбуміни**, **глобуліни**, **протаміни**, **гістони**, **проламіни**, **глутеліни**, **протеїноїди**.

Альбуміни. Це водорозчинні білки, які осаджуються при насиченні розчинів нейтральними солями, наприклад $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Альбуміни широко розповсюджені в природі. Вони складають біля 50% усіх білків плазми людини. Молекулярна маса альбумінів 35000–70000. Молекули їх мають еліпсоїдну форму, яка є компактнішою і симетричнішою, ніж у глобулінів. Для хімічного складу характерним є вміст лейцину (15%), значної кількості сірковмісних амінокислот, лізину, аспарагінової і глутамінової кислот, а також незначний вміст гліцину. Деякі альбуміни зовсім не містять цієї

амінокислоти (альбумін сироватки крові). Основні функції альбумінів – регуляція осмотичних процесів і транспорт. При зменшенні вмісту альбумінів порушується транспорт ліпідів. Вони регулюють також вміст у плазмі крові іонів Ca^{2+} , стероїдних гормонів, деяких лікарських препаратів (дикумарину, пеніциліну, аспірину), утворюючи з ними комплекси.

Глобуліни. Глобуліни, як і альбуміни, дуже поширені у складі тваринних і рослинних тканин. На відміну від альбумінів, глобуліни не розчиняються в концентрованих розчинах нейтральних солей. Із тканин їх виділяють за допомогою екстрагування 10% розчином солей. При підвищенні концентрації солей розчинність глобулінів зменшується, а в 50% розчині вони випадають в осад. Молекулярна маса глобулінів – 0,9-1,5 млн. Вони більш грубодисперсні і менш гідрофільні, ніж альбуміни. За хімічним складом глобуліни дещо відрізняються від альбумінів і містять більше гліцину (~5%) і меншу кількість сірковмісних амінокислот. Під час електрофорезу білки сироватки крові в залежності від рухливості розподіляються на декілька фракцій, серед яких альбуміни становлять 54–58%, фракція глобулінів неоднорідна і розділяється на α_1 -глобуліни (6–7%), α_2 -глобуліни (8–9%), β -глобуліни (13–14%), γ -глобуліни (11–12%). За допомогою імунофорезу білки сироватки крові можна розділити на 16–19 фракцій, кожна з яких виконує специфічну роль у процесах метаболізму.

Гістони. Це лужні білки з молекулярною масою 12000–30000, які містять 20–30% лужних амінокислот. Вони розчиняються у слабких кислотах, осаджуються спиртом, не містять триптофану і, у більшості випадків, цистеїну і цистину. Основна маса гістонів входить до складу хромосом ядер клітин і відіграє важливу роль у стабілізації ДНК. Певну роль вони виконують у процесах біосинтезу білків, оскільки є компонентами дезоксирибонуклеопротейнів ядра. Згідно з даними РСА й електронної мікроскопії гістони не знайдено в хромосомах тих організмів, які не мають сформованого клітинного ядра (прокаріот).

Протаміни. Це сильно лужні білки з низькою молекулярною масою (до 12000), завдяки чому деякі з них проходять через целофан при діалізі. Протаміни розчиняються в слабких кислотах, не осаджуються при кип'ятінні; у їх молекулі вміст діаміномонокарбонових кислот становить близько 80%, особливо багато аргініну. У протамінах не зустрічаються цистеїн, триптофан, аспарагін, найчастіше відсутні тирозин, фенілаланін, тому вони не дають багатьох кольорових реакцій на білок. Завдяки високому вмісту основних амінокислот протаміни являють собою полівалентний органічний катіон, що легко реагує з молекулами, які мають надлишок негативно заряджених груп, наприклад, із нуклеїновими кислотами. Протаміни надають ДНК біологічної інертності, що є необхідною умовою збереження спадкових властивостей організму. Протаміни широко розповсюджені в природі. Вони містяться в статевих клітинах тварин і людини і складають основну масу білків хроматину.

Проламіни. Ця група білків дуже поширена в рослинних організмах, добре розчиняється в 60–80% етиловому спирті, до їх складу входить багато проліну, а також глютамінової кислоти. У дуже незначній кількості до складу цих білків входять лізин, аргінін, гліцин.

Глютеліни. Як і проламіни, – це білки рослинного походження, добре розчинні в лужних розчинах (0,2–2% NaOH). До їх складу входить велика кількість глютамінової кислоти і лізину.

Протеїноїди. Це важкорозчинні білки, котрі не розчиняються у воді, розчинах солей та в розчинах кислот і лугів; для їх складу характерною є висока частка сірковмісних амінокислот. До протеїноїдів належать фібрилярні білки: кератини, колагени, фіброїни шовку та ін. Вони відрізняються високою стійкістю й еластичністю. Протеїноїди слабо розщеплюються ферментами кишкового тракту, тому погано засвоюються і сприяють процесам гниття в кишечнику.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПІДГОТОВКИ СТУДЕНТІВ

1. Білки: визначення, загальна характеристика. Структурні мономери білків. Стереохімія амінокислот. Назвати положення, в якому знаходиться аміногрупа у протейногенних амінокислот.

2. Структурна класифікація протейногенних амінокислот. Навести приклади.

3. Фізико-хімічна класифікація протейногенних амінокислот. Навести приклади. Назвати (тривіальні та раціональні назви) та написати структурні формули амінокислот, що зумовлюють кислотні властивості альбумінів плазми крові. Назвати функції альбумінів сироватки крові. Вказати, до чого призводить зменшення рівня альбумінів.

4. Біологічна (фізіологічна) класифікація протейногенних амінокислот. Навести приклади. Назвати та написати структурну формулу незамінної сірковмісної амінокислоти, що виявляє ліпотропну дію, описати механізм такої дії, назвати джерело цієї амінокислоти.

5. Первинна структура білкової молекули, визначення, зв'язки, що формують первинну структуру. Властивості пептидної групи. Вказати якісну реакцію на пептидні групи, яка використовується для кількісного визначення білка в клініці.

6. Вторинна структура білкової молекули; визначення, типи вторинної структури; зв'язки, що її стабілізують. Написати структурні формули, тривіальні і раціональні назви вказаних амінокислот.

7. Третинна структура білкової молекули, зв'язки, що її стабілізують.

8. Четвертинна структура білкової молекули, визначення, зв'язки, що її стабілізують. Назвати білок еритроцитів, що має четвертинну структуру. Навести приклад олігомерного білка, що має надмолекулярну структуру.

9. Перелічити й охарактеризувати функції білків в організмі, навести приклади.

10. Фізико-хімічні властивості білків: амфотерність, буферні й осмотичні властивості білків. Назвати амінокислоту, що забезпечує буферні властивості гемоглобіну в крові.

11. Розчинність білків; фактори, що впливають на їх розчинність. Ізоелектрична точка білків. Висолювання: визначення; принцип; речовини, що викликають висолювання; використання.

12. Електрофорез: визначення; принцип; властивість речовин, що лежить в основі даного методу; використання. Електрофоретичний розподіл білків плазми крові.

13. Діаліз: принцип; застосування.

14. Денатурація білка; фактори, що її викликають. Властивості денатурованих білків. Назвати препарат з денатуруючою властивістю, який використовується як в'язучий засіб при захворюваннях кишківника.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Базова

1. Біохімія: підручник./ за загальною редакцією проф. Зайгайка А. Л. та проф. Александрової К. В. – Харків: Форт, 2014. – 728 с.
2. Губський Ю.І. Біологічна хімія. - Київ-Тернопіль: Укрмед- книга, 2000. - 508 с.
3. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия.-М.:Медицина, 1990. – 528 с.
4. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача. - Екатеринбург:Урал. рабочий, 1994. - 384 с.
5. Губський Ю. І. Біоорганічна хімія. - Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. - 464 с.
6. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини. Підручник .-Тернопіль: Укрмедкнига, 2002.-744 с.
7. Кучеренко Н.Е., Бабенюк Ю.Д., Васильев А.Н. и др. Биохимия. К.: Выща шк. Изд-во при КГУ, 1988. - 432 с.
8. Николаев А.Я. Биологическая химия.- М.: Мед. информац. агентство, 1998. - 496 с.
9. Хмелевский Ю.В, Губский Ю.И., Зайцева С.Д. и др. Биологическая химия: Практикум. - К.: Вища шк., 1985. - 212 с.

Допоміжна

1. Балаболкин М.И. Эндокринология. - М.: Универсум паблишинг, 1998. – 582 с.
2. Боєчко Л.Ф., Боєчко Л.О. Основні біохімічні поняття, визначення та терміни: Навч. посібник. - К.: Вища шк., 1993. - 528 с.
3. Болдырев А.А. Введение в биохимию мембран: Учебн.пособие. М.: Высш. шк., 1986. - 112 с.
4. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т.- М.: Мир, 1985. - 1056 с.
5. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т. - М.: Мир, 1993. - т.1 - 381 с.; т.2 - 414 с.

6. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов. - М.: Медицина, 1985. - 432с.
7. Николс Д.Дж. Биоэнергетика. Введение в хемио-осмотическую теорию. – М.: Мир, 1985. - 190 с.
8. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. - М.: Мир, 1977. - 407 с.
9. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. - М.: Просвещение, 1987. - 815 с.
10. Парк Д. Биохимия чужеродных соединений. - М.: Медицина, 1973. - 288 с.
11. Розен В.Б. Основы эндокринологии. - М.: Высш. шк., 1984. - 336 с.
12. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. – М.: Наука, 1989. – 564с.
13. Тюкавкина Н. А., Бауков Ю. И. Биоорганическая химия. – М.: Медицина, 1985. – 480с.
14. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. - М.: Мир, 1986. - 374 с.
15. Хухо Ф. Нейрохимия: основы и принципы.- М.: Мир, 1990. - 384 с.
16. Черних В. П., Зіменковський Б. С., Грищенко І. С. Органічна хімія: у 3 кн. – Харків: Основа, 1997. – Кн. 1. – 145 с.; Кн. 2. – 480 с.; Кн. 3. – 256 с.
17. Руководство к лабораторным занятиям по биоорганической химии. / Под ред. Н.А.Тюкавкиной. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.
18. Halkerston I.D.K. Biochemistry: 2nd edition. The National medical series for independent study. - 1988. - 522 p.
19. Murray R.K, Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. . Harper`s Illustrated Biochemistry., LANGE medical books, 26-edition, India, 2006.-868 p.
20. Stryer L. Biochemistry. - W.H.Freeman and Company. New York. - 1995. - 1064 p.

Розглянуто і затверджено на засіданні циклової методичної комісії хімічних дисциплін Запорізького державного медичного університету (протокол №_____ від_____ 2015 року)

Копіювання та тиражування тільки з
письмової згоди ЗДМУ