

Міністерство охорони здоров'я України  
Запорізький державний медичний університет  
Кафедра біохімії та лабораторної діагностики

---



# **Будова та властивості простих і складних білків**

навчально-методичний посібник для студентів фармацевтичного факультету

спеціальність: 7.12020101 - «фармація»  
7.12020104 - «технології парфумерно-  
косметичних засобів»

Запоріжжя

2014

Навчально-методичний посібник «Будова та властивості простих і складних білків» для студентів фармацевтичного факультету спеціальностей 7.12020101 - «фармація» та 7.12020104 - «технології парфумерно-косметичних засобів» був розглянутий Центральною методичною радою Запорізького державного медичного університету і рекомендований в якості офіційного матеріалу (протокол № \_\_\_\_ від \_\_\_\_\_ 2014 р.).

Автори:

Професор Александрова Катерина Вячеславівна

Доцент Макоїд Ольга Борисівна

Старший викладач Шкода Олександр Станіславович

Асистент Черчесова Олександра Юріївна

Рецензенти:

Прийменко Борис Олександрович – професор кафедри органічної та біоорганічної хімії, д.фарм.н.

Приходько Олександр Борисович – завідувач кафедри біології медичної біології, паразитології та генетики, д.біол.н., доцент.

## **РОЗДІЛ I. АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД БІЛКІВ І ПЕПТИДІВ**

**Класифікація, номенклатура та ізомерія амінокислот**

**Якісні реакції на виявлення  $\alpha$ -амінокислот**

## **РІВНІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ БІЛКОВОЇ МОЛЕКУЛИ**

*Первинна структура білка*

*Вторинна структура білка*

*Третинна структура білків*

*Четвертинна структура білків*

## **ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ**

**Виділення і очистка білків**

**Ультрацентрифугування**

**Електрофорез**

**Хроматографія**

*Площинна хроматографія*

*Тонкошарова хроматографія*

*Колонкова хроматографія*

*Гель-фільтрація*

*Автоматизовані системи хроматографії*

**Діаліз**

**Молекулярна маса**

**Амфотерні властивості білків**

**Розчинність білка**

**Денатурація білків**

**Оптичні властивості білків**

*Принцип будови фотометрів та спектрофотометрів*

## **КЛАСИФІКАЦІЯ БІЛКІВ**

**Природні пептиди**

## **РОЗДІЛ II. СКЛАДНІ БІЛКИ**

**Хромопротеїни**

**Глікопротеїни**

**Ліпопротеїни**

**Нуклеопроетїни**

**Фосфопротеїни**

**Металопротеїни**

**ЗАПИТАННЯ І ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ**

**ТЕСТИ ЗАКЛЮЧНОГО КОНТРОЛЮ ЗНАНЬ**

**ВІДПОВІДІ НА ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ**

**ЛІТЕРАТУРА**

**ВСТУП**

## РОЗДІЛ І

### АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД БІЛКІВ І ПЕПТИДІВ

*Білки* - це високомолекулярні азотовмісні органічні сполуки, молекули яких побудовані із залишків амінокислот.

Друга назва цієї групи сполук – «протеїни» (від грецьк. *protos* – перший, важливий, вкрай необхідний). Цей термін найточніше відображає першочергове біохімічне значення цього класу речовин.

*Амінокислоти* – це похідні карбонових кислот, в яких один або кілька атомів Гідрогену у вуглеводному радикалі замінені на аміногрупу (NH<sub>2</sub>).

Загальна формула амінокислот:

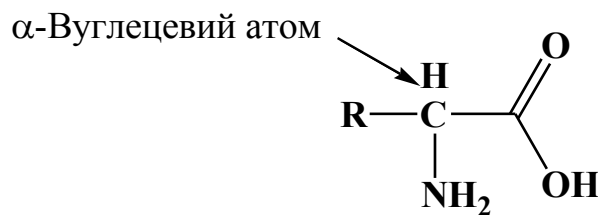


Рис. 1.1. Структура амінокислот

Амінокислоти, що входять до складу білків, мають аміногрупу, розміщену в  $\alpha$ -положенні вуглецевого ланцюга. У тканинах людини і тварин є амінокислоти, у яких аміногрупа не в  $\alpha$ -, а в  $\beta$ -положенні. Ці амінокислоти не входять до структури білка, а знаходяться у вільному стані або входять до складу інших сполук.

#### **Класифікація, номенклатура та ізомерія амінокислот**

Сьогодні існує кілька класифікацій амінокислот:

1. За будовою вуглецевого ланцюга.
2. За біохімічною роллю (здатність до синтезу в організмі).
3. За хімічною природою продуктів, які утворюють із амінокислот.

4. За полярністю радикалів.

**За будовою вуглецевого ланцюга** амінокислоти діляться на дві групи:

1. Ациклічні, аліфатичні (або амінокислоти жирного ряду).
2. Циклічні амінокислоти.

Кожна з цих груп амінокислот ділиться на підгрупи. Ациклічні амінокислоти залежно від кількості карбоксильних та аміногруп у їх молекулах діляться на чотири підгрупи:

1. *Моноамінокарбоніві*: С<sub>2</sub>-гліцин; С<sub>3</sub>-аланін, серин, цистеїн; С<sub>4</sub>-треонін; С<sub>5</sub>-валін, метіонін; С<sub>6</sub>-лейцин, ізолейцин.
2. *Моноамінодикарбоніві*: С<sub>4</sub>-аспаргінова кислота; С<sub>5</sub>-глутамінова кислота.
3. *Діаміномонокарбоніві*: С<sub>5</sub>-аргінін; С<sub>6</sub>-лізин.
4. *Діамінодикарбоніві*: цистин.

Група циклічних амінокислот ділиться на дві підгрупи:

- Карбоциклічні (ароматичні) амінокислоти – їхній цикл складається з атомів Карбону: фенілаланін, тирозин;
- Гетероциклічні амінокислоти: триптофан, гістидин, пролін, оксипролін. До складу їхніх циклів, окрім атомів Карбону, входять інші атоми (гетероатоми), найчастіше Нітрогену.

**За біохімічною роллю** амінокислоти поділяють на замінні та незамінні.

*Незамінні амінокислоти* життєво необхідні для нормального росту, розвитку та функціонування організму. Незамінність їх для росту пов'язана з тим, що організм тварин не здатний синтезувати їх з інших речовин. Основним джерелом  $\alpha$ -амінокислот для живого організму є харчові білки.

*Замінні амінокислоти* можуть синтезуватися в організмі з інших сполук.

**За хімічною природою продуктів, які утворюються з амінокислот в процесі їх обміну**, амінокислоти діляться на глікогенні, кетогенні та змішані. *Глікогенні амінокислоти*, вуглецевий скелет яких при розщепленні перетворюється на піруват,  $\alpha$ -кетоглутарат, сукциніл-КоА, фумарат або

оксалоацетат, - попередники глюкози. *Кетогенні амінокислоти*, вуглецевий скелет який при розщепленні перетворюється на ацетил-КоА та ацетоацетат, потім перетворюються на жирні кислоти й кетоніві тіла (табл. 1.1.)

Таблиця 1.1

### КЛАСИФІКАЦІЯ АМІНОКИСЛОТ

Глікогенні		Глікогенні та кетогенні	Кетогенні
Замінні	Аланін Аспартат Цистеїн Аспарагін Глутамат Гліцин Пролін Глутамін Серин	Тирозин	
Незамінні	Аргінін Гістидин Метіонін Треонін Валін	Ізолейцин Фенілаланін Триптофан	Лізин Лейцин

*За полярністю радикалів* амінокислоти поділяють за таким чином:

- Позитивно заряджені R-групи: L-Лізин, L-Гістидин, L-Аргінін.
- Ароматичні R-групи: L-Фенілаланін, L-Тирозин, L-Триптофан.
- Полярні незаряджені R-групи: L-Серин, L-Цистеїн, L-Глутамін, L-Треонін, L-Метіонін, L-Аспаргін.
- Негативно заряджені R-групи: L-Аспаргінова кислота, L-Глутамінова кислота.
- Неполарні R-групи: L- $\alpha$ -Аланін, L-Валін, L-Лейцин, L-Гліцин, L-Пролін, L-Ізолейцин.



Амінокислоти, в яких кількість аміногруп більша за кількість карбоксильних, називають *основними* (наприклад лізин), а при надлишку карбоксильних груп – *кислими* (наприклад глютамінова кислота).

### Ізомерія амінокислот.

Для амінокислот характерні структурна і просторова ізомерія. Структурна ізомерія зумовлена будовою вуглецевого ланцюга і положенням аміногрупи в радикалі. Оптична ізомерія пов'язана з тим, що в усіх амінокислотах є хоральний атом Карбону, зв'язаний з чотирма різними замісниками (рис. 1.2).

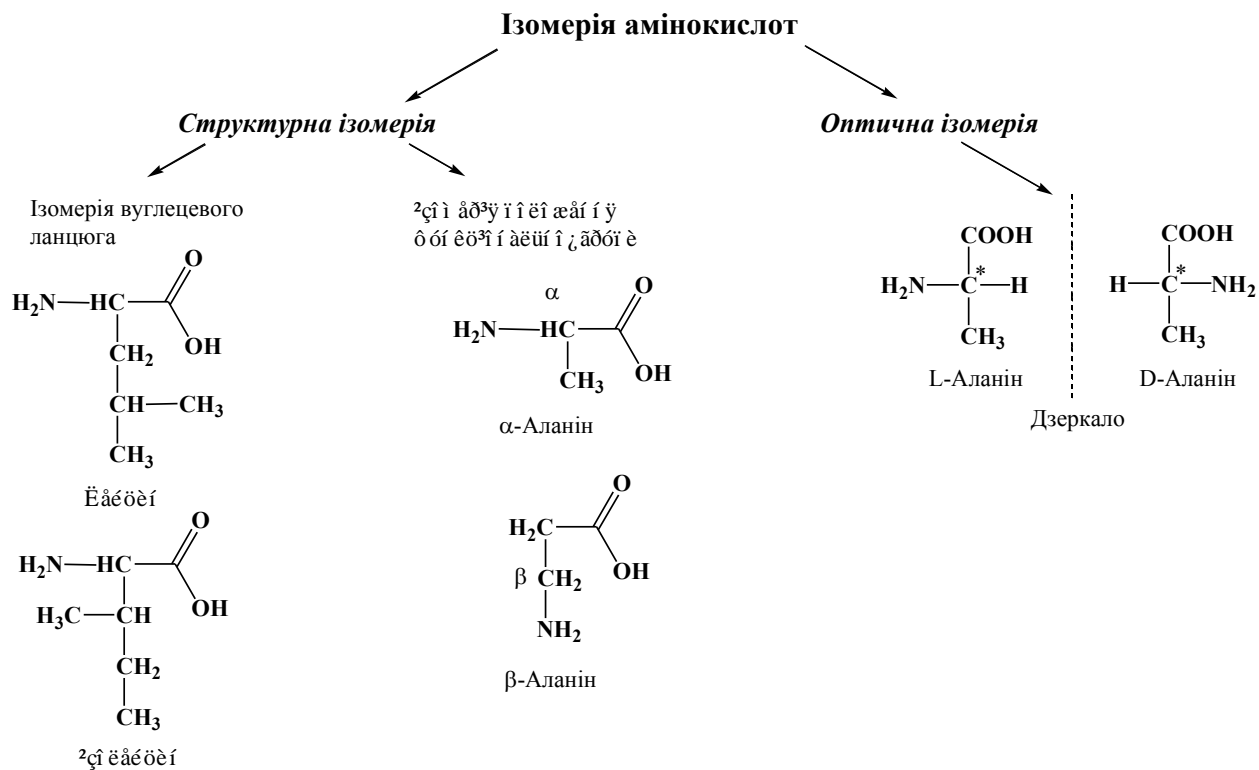


Рис. 1.2. Ізомерія амінокислот

Відносна конфігурація D- і L-амінокислот визначається, як і в гідроксикислот, за конфігураційним еталоном – гліцериновим альдегідом.

Майже всі природні α-амінокислоти, на відміну від вуглеводів, належать до L-ряду. α-Амінокислоти D-ряду іноді називають

«неприродними», тому вони не беруть участі у біосинтезі білків у організмі людини і тварин.

Амінокислоти, що належать до різних стереохімічних рядів, різняться за смаком. Амінокислоти D-ряду – гіркі або не мають смаку.

### **Якісні реакції на виявлення $\alpha$ -амінокислот**

1. **Ксантопротеїнова реакція** на виявлення ароматичних та гетероциклічних  $\alpha$ -амінокислот (фенілаланін, тирозин, гістидин, триптофан). Під дією концентрованої азотної кислоти відбувається нітрування бензольного ядра з утворенням нітросполук жовтого кольору.
2. **Нінгідринова реакція** на виявлення  $\alpha$ -амінокислот у складі білкових гідролізатів після їх хроматографічного поділу, що використовується в аналізі первинної структури білків і пептидів. Нінгідрин при нагріванні з  $\alpha$ -амінокислотами спричиняє їх декарбоксилювання з утворенням  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  та альдегіду – продукту окиснювального декарбоксилювання амінокислоти. У подальшому аміак, що вивільнився, реагує з відновленим нінгідрином, утворюючи комплекс синьо-фіолетового кольору з максимумом поглинання при  $\lambda_{\text{max}}=570$  нм.
3. **Реакція Фоля** – проба на сірковмісні амінокислоти (сульфгідрильна проба). При кип'ятінні розчину білка або відповідних амінокислот із лугом у присутності плюмбіту натрію утворюється чорно-бурий осад сульфїду свинцю.
4. **Біуретова реакція (реакція Піотровського)**. Білки і пептиди, що містять не менше як два пептидних зв'язки, з сульфатом міді в лужному середовищі утворюють сполуки, забарвлені у фіолетовий колір.
5. **Реакція Мілона** – специфічна реакція на тирозин (амінокислоту, що містить фенольний гідроксил). В умовах нагрівання фенолів та їх

похідних із реактиви Мілона (суміш нітратів ртуті (I) та (II)) утворюються ртутні похідні цегляно-червоного кольору.

6. **Реакція Сакагучі** – реакція, що застосовується для ідентифікації гуанідинової групи аргініну. При взаємодії гуанідину з  $\alpha$ -нафтолом та гіпохлоритом натрію в лужних умовах утворюються сполуки з червоним забарвленням.
7. **Реакція Ерліха** – застосовується для виявлення індольного кільця триптофану, яке при реакції з *n*-диметиламінобензальдегідом у кислому середовищі дає сполуки з фіолетовим забарвленням.

## **РІВНІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ БІЛКОВОЇ МОЛЕКУЛИ**

Розрізняють чотири рівні структурної організації білкової молекули (рис. 1.3). У табл. 1.2 наведені узагальнені дані про зв'язки, які стабілізують різні рівні організації білкової молекули. Усі вони взаємопов'язані, й послідовність залишків амінокислот (первинна структура) повністю визначає конформацію білкової молекули. Але прояви біологічної активності білків залежить від вищих рівнів їх структурної організації. З іншого боку, відомо, що навіть незначна зміна первинної структури (заміна одного амінокислотного залишку на інший) приводить до порушень просторової будови до радикальних змін біологічних властивостей білка. Наприклад, зміною первинної структури гемоглобіну зумовлене таке спадкове захворювання, як серповидноклітинна анемія (еритроцити мають форму серпа і втрачають здатність зв'язувати кисень). У хворих на цю недугу в  $\beta$  ланцюгу гемоглобіну (в нормі гемоглобін складається із  $2\alpha$  і  $2\beta$  поліпептидних ланцюгів), у положенні 6 від N-кінця замість глутамінової кислоти розміщена гідрофобна амінокислота валін. Це проявляється зниженням розчинності гемоглобіну та зменшенням здатності його зв'язувати кисень.

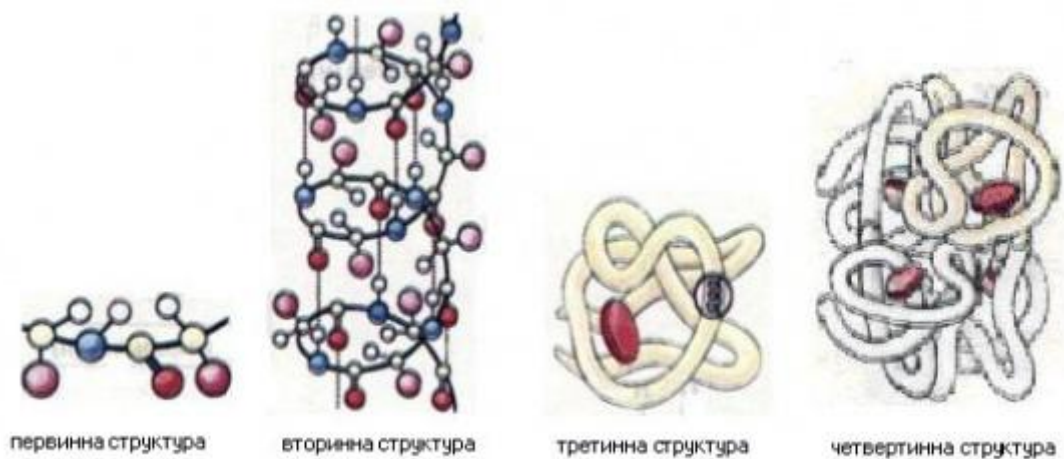


Рис. 1.3. Структурна організація білкової молекули

З усіх видів структурної організації особлива біологічна роль належить первинній структурі: вона визначає всі інші рівні організації.

Таблиця 1.2

**Характеристика зв'язків, які забезпечують структурну організацію білків**

Вид структури білка	Зв'язки, що стабілізують структуру
Первинна (лінійний поліпептидний ланцюг)	<u>Пептидні зв'язки</u> – між $\alpha$ -аміно- та $\alpha$ -карбоксильними групами амінокислот
Вторинна структура ( $\alpha$ -спіраль, $\beta$ -структура)	<u>Водневі зв'язки</u> – між пептидними групами (кожна перша і четверта) одного поліпептидного ланцюга або між пептидними групами суміжних поліпептидних ланцюгів; <u>Дисульфідні зв'язки</u> – між $-SH$ -групами в межах одного поліпептидного ланцюга
Третинна структура (глобулярна, фібрилярна)	<u>Дисульфідні зв'язки</u> – між боковими радикалами радикалами амінокислот різних ділянок поліпептидного ланцюга; <u>Водневі зв'язки</u> – між боковими радикалами амінокислот різних ділянок ланцюга; <u>Іонні (сольові) зв'язки</u> – між протилежно зарядженими групами бокових радикалів амінокислот пептидного ланцюга; <u>Гідрофобна взаємодія</u> – між аполярними

	радикалами амінокислот у водному середовищі
Червертинна структура білка	<u>Іонні зв'язки</u> – між протилежно зарядженими групами амінокислот кожної субодиниці; <u>Водневі зв'язки</u> – між боковими радикалами амінокислотних залишків кожної субстанції; <u>Гідрофобна взаємодія</u> – між аполярними радикалами амінокислот у водному середовищі

### ***Первинна структура білка***

Первинна структура білка являє собою лінійний ланцюг залишків  $\alpha$ -амінокислот, які розташовані у певній послідовності в поліпептидному ланцюзі і з'єднані між собою пептидними зв'язками (рис. 1.4). 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.

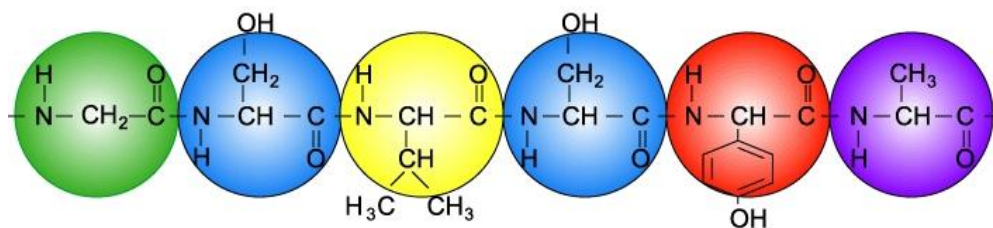


Рис. 1.4. Первинна структура білку

В організмі людини, заприблизною оцінкою, існує близько 100 тис. різних білків. Кістяк білкової молекули характеризується абсолютною однаковістю будови. При цьому радикали (R) амінокислотних залишків розташовані зовні, по обидва боки поліпептидного ланцюга в трансположенні. Стандартні значення міжатомних відстаней і валентних кутів у ньому представлені на рис. 1.5.

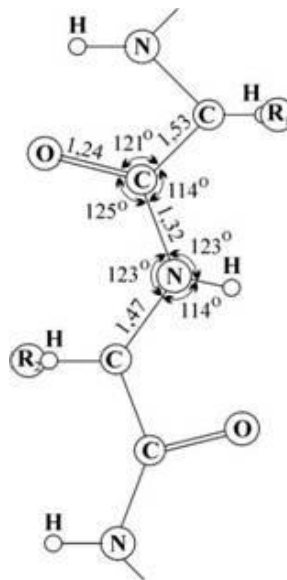


Рис. 1.5. Валентні кути і міжатомні відстані у витягнутому поліпептидному ланцюзі

На даний час розшифровано амінокислотну послідовність приблизно 2500 білків: гемоглобінів, імуноглобулінів, цитохромів, білківрибосом, 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.

### ***Вторинна структура білка***

Вторинна структура 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 (рис. 1.6).

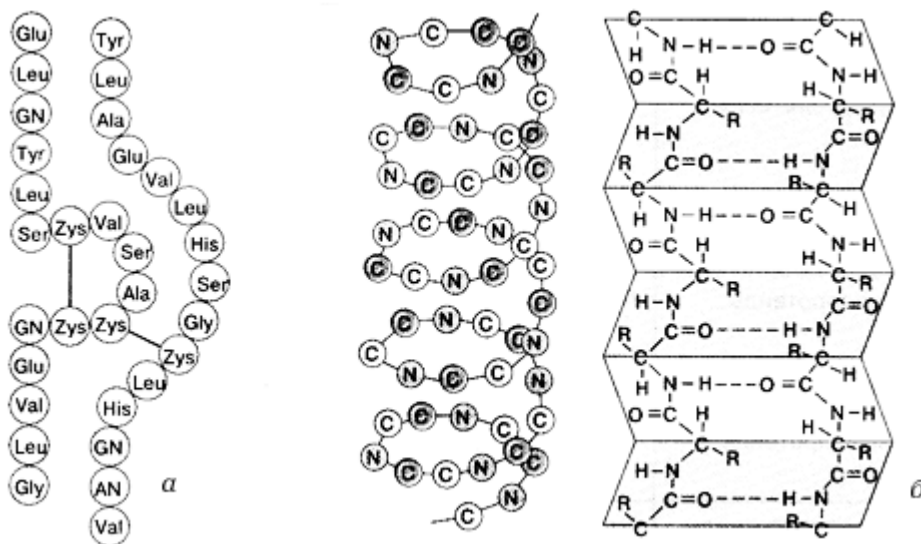


Рис. 1.6. Первинна (а) та вторинна (б) структура білків.

Вторинна структура представлена такими регулярними структурами, як  $\alpha$ -спіраль,  $\beta$ -структура (складчастий шар або лист) та  $\beta$ -вигин. Певна частина поліпептидного ланцюга не має впорядкованої структури, такі ділянки називають аморфними, або безструктурними зонами.

**$\alpha$ -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  $\alpha$ -спіраллю. У природних білках виявлено тільки праві  $\alpha$ -спіралі. Зовні  $\alpha$ -спіраль подібна до злегка розтягнутої спіралі електроплитки (рис. 1.7).

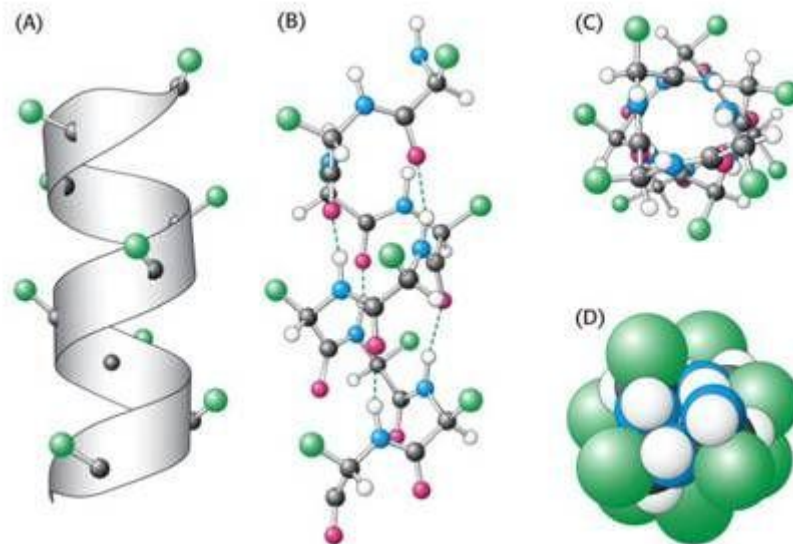


Рис. 1.7. Приклади  $\alpha$ -спіралі: А–схема, В–молекулярна структура, С–вид зверху, D–модель просторової структури.

При формуванні  $\alpha$ -спіралі водневі зв'язки утворюються в поліпептидному ланцюзі між кожною карбонільною (-CO-) групою і четвертою за ходом ланцюга – NH-групою. 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. На кожний виток спіралі припадає 3,6 амінокислотні залишки.

Пептидні ланцюги набувають  $\alpha$ -спіральної конформації довільно. Хоча енергія водневих зв'язків, які беруть участь в утворенні  $\alpha$ -спіралі, порівняно невелика, значна кількість цих зв'язків забезпечує структурі стабільність, що призводить до вираженого енергетичного ефекту, внаслідок чого  $\alpha$ -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, показали, що деякі амінокислоти (аланін, метіонін, лейцин, фенілаланін, тирозин, триптофан, гістидин) сприяють утворенню  $\alpha$ -спіралі, інші – гліцин, серин, треонін, лізин, аргінін,



аспарагінова і глутамінова кислоти – її дестабілізують. Залишки імінокислот проліну і гідроксипроліну не вкладаються в просторову спіралізацію  $\alpha$ -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 неповністю. Ступінь спіралізації поліпептидного ланцюга у різних білків неоднаковий. Повністю спіралізовані поліпептидні ланцюги зустрічаються дуже рідко. Наприклад,  $\alpha$ -кератин є повністю  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -спіралі 1-2 витки. Білки зі структурою  $\alpha$ -спіралі можуть бути або глобулярними (альбуміни і глобуліни яєчного білка і молока, а також пепсин та ін.), або фібрилярними (міозин, еластин,  $\alpha$ -кератин та ін.).

**$\beta$ -Структура.** Іншим різновидом вторинної структури білків є  $\beta$ -структура, яка називається також складчастим шаром, або листом. 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  $\beta$ -структура), або групою близько розташованих суміжних поліпептидних ланцюгів у молекулі, де водневі зв'язки будуть замикатися між ланцюгами (повна  $\beta$ -структура). У більшості випадків складчасті шари містять не більше шести поліпептидних ланцюгів. Залежно від взаємної орієнтації ланцюгів розрізняють паралельні й антипаралельні  $\beta$ -структури (рис. 8). При цьому, якщо ланцюги паралельні, тобто мають однаковий напрямок від N- до C-

кінця, то утворюється паралельний складчастий шар (наприклад, у  $\beta$ -кератину). Антипаралельні ланцюги (N-кінці спрямовані у протилежні боки) утворюють структуру антипаралельного складчастого шару (наприклад, у фіброїнішовку). 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  $\beta$ -вигин – особливий вид вторинної структури.  $\beta$ -Вигини утворюються чотирма послідовно розміщеними амінокислотними залишками (рис. 1.8).

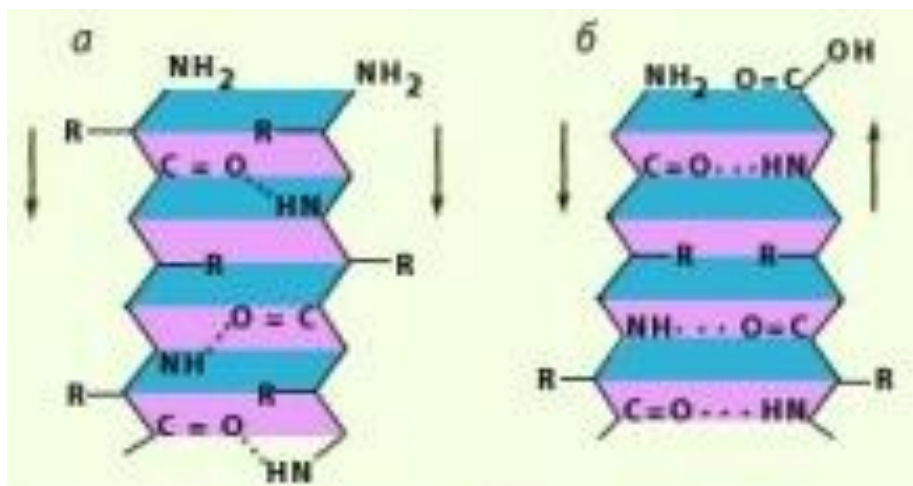


Рис. 1.8. Схематичне зображення  $\beta$ -структури: а- паралельні ланцюги; б – антипаралельні ланцюги.

Доведено, що в складі  $\beta$ -структур рідко зустрічаються глутамінова кислота, аспарагін, гістидин, лізин, серин, пролін. Стабільність складчастого шару визначається, головним чином, міжпептидними водневими зв'язками. Інші типи зв'язку майже не беруть у цьому участі, за винятком дисульфідних зв'язків, які виникають уперек у місцях знаходження залишків цистеїну.

У білках можливі переходи  $\alpha$ -структур у  $\beta$ -структури і навпаки внаслідок перебудови водневих зв'язків. Такий перехід виявлено в кератині – білку волосся:  $\alpha$ -кератин переходить у  $\beta$ -кератин. Під час миття волосся лужними миючими засобами легко порушується спіральна  $\alpha$ -

структура і він переходить у  $\beta$ -кератин (кучеряве волосся розпрямляється). У структурі багатьох білків одночасно присутні  $\alpha$ -спіралі і  $\beta$ -структури (лізоцим, хімотрипсин, рибонуклеаза, лактатдегідрогеназа, інсулін та ін.).

### ***Третинна структура білків***

Третинна структура білків являє собою спосіб укладання поліпептидного ланцюга з елементами вторинної структури ( $\alpha$ -спіралі і  $\beta$ -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.

У молекулі білка з третинною структурою зустрічаються спіралізовані ділянки ( $\alpha$ -спіралі), шаруваті ( $\beta$ -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.

Стабільність тривимірної структури забезпечують усі можливі типи зв'язків (дисульфідні, водневі, гідрофобні, іонні) (рис. 1.9). Рушійною силою виникнення тривимірної структури є взаємодія радикалів амінокислот із молекулами води. Гідрофобні радикали амінокислот ніби вдаються всередину білкової молекули. Гідрофільні групи виявляються орієнтованими

у бік води. В якийсь момент виникає термодинамічно найвигідніша конформація в ланцюзі, яка стабілізується. В такій формі молекула білка має мінімальну вільну енергію. Отже, в утворенні певної тривимірної структури важливу роль відіграють гідрофобні зв'язки і жорсткість пептидного зв'язку.

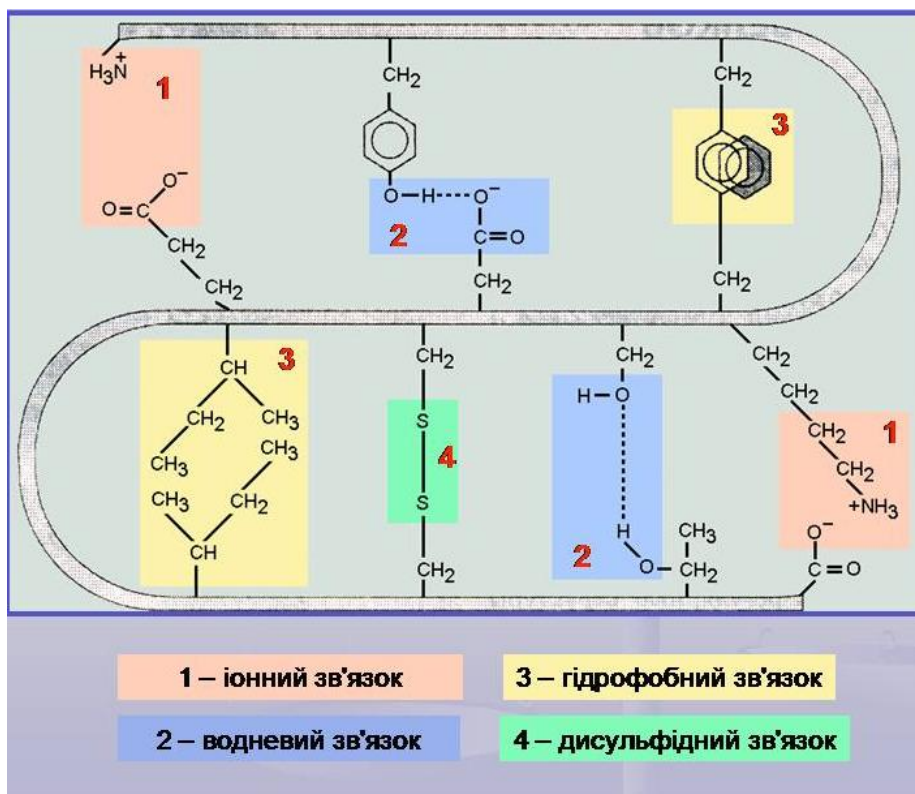


Рис. 1.9. Типи зв'язків, що стабілізують третинну структуру білкової молекули

Дисульфідні зв'язки (-S-S-) утворюються між боковими радикалами цистеїнів, що знаходяться на різних ділянках поліпептидного ланцюга (4); Водневі зв'язки виникають між двома електронегативними атомами, коли протон водню, ковалентно зв'язаний з одним із цих атомів, розташовується між ними (2). Існує велика кількість можливостей для утворення водневих зв'язків у білках, наприклад, між негативно зарядженим кислотним залишком моноамінодикарбонових кислот ( $-\text{COO}^-$ ) і гідроксигрупами тирозину (2), серину, треоніну або  $\text{NH}_2$ - і SH-групами бічних радикалів амінокислоти багато інших. Іонні або електростатичні взаємодії виникають під час контакту заряджених груп бічних радикалів  $-\text{NH}_3^+$  (лізин, аргінін, гістидин) і  $\text{COO}^-$

групою аспарагінової і глутамінової кислот (1). Гідрофобні зв'язки або вандер-ваальсові взаємодії виникають між вуглеводневими радикалами амінокислот аланіну, валіну, лейцину, ізолейцину, фенілаланіну, триптофану (3).

### ***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.

Білки, які мають четвертинну структуру, називають ***олігомерними***. Кожний окремий поліпептидний ланцюг у складі олігомерного білка зветься ***протомером***, або ***субодиницею***.

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.

Наявність усіх чотирьох рівнів структурної організації не обов'язкова для кожного білка. Обов'язковою структурою для всіх білків є первинна структура. Багато біологічно активних білків (наприклад ферменти) мають третинну структуру, оскільки саме на цьому рівні структурної організації формуються активні центри, що характеризуються специфічністю дії ферментів.

## **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 (дезоксихолатнатрію 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  $5^{\circ}$  до  $10^{\circ}\text{C}$ ); 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.

## Ультрацентрифугування

Ультрацентрифугування являє собою метод розділення та дослідження високомолекулярних сполук із застосуванням ультрацентрифуги. Примітно, що саме з використанням седиментації ультрацентрифугуванням в градієнті густини було доведено напівконсервативний механізм редуплікації ДНК, відкрито рибосоми та їх субодиничну структуру. Пік популяризації методу приходився на 50-60 рр. минулого сторіччя з наступним занепадом у 80-х рр. В 90-х рр. метод пережив своє друге народження з винаходом автоматизованих аналітичних ультрацентрифуг та алгоритмів опису процесу переносу речовини в гравітаційному полі ультрацентрифуги.

Принципово, ультрацентрифугування ділиться на препаративне та аналітичне. Задачею препаративного є розділення речовин та їх очистка. Аналітичне застосовується для оцінки седиментаційних властивостей біологічних макромолекул та інших речовин: константа седиментації, молекулярна маса та константа дифузії. В аналітичному центрифугуванні застосовуються ротори та реєструючі системи особливої конструкції, що дозволяють безперервно спостерігати за седиментацією матеріалу в центробіжному полі (до 70 тис об/хв.; 500 тис x g).

Одним з простих підходів, що обумовлюють можливість проведення такої оцінки є метод «середньої точки». При таких дослідженнях лунка центрифуги містить розчин, концентрація якого постійна по всій довжині лунки. В процесі центрифугування частки рухаються під дією гравітаційної сили, меніск освітлюється та формується рухомий фронт. За швидкість руху фронту стандартно приймається зміна радіальної координати в середній точці. Цей метод може бути застосовано виключно для «ідеальних» розчинів, тобто однакових макромолекул, що не взаємодіють. У випадку наявності двох макромолекул з вираженими відмінностями в молекулярній масі можливий розрахунок двох констант седиментації, що характеризуватимуть окремо кожен тип молекул. Однак, у випадку, коли молекулярно-ваговий розподіл наперед невідомий, застосування підходу «середньої точки» може



призвести до великих похибок. А тому в практиці аналітичного центрифугування не застосовується. Окрім того, одним з умов проведення є наявність на седиментограмі плато та базової лінії, що обмежує можливості методу в дослідженні білків з молекулярною масою до 30кДа.

Для грубої характеристики полідисперсних систем найбільш застосованим є метод «других моментів», що дає седиментаційний коефіцієнт вагового усереднення.

Процес транспорту речовини в ультрацентрифузі описується рівнянням Лама, однак, воно не має аналітичного рішення. Його точне вирішення може бути лише для двох умовних варіантів: відсутність дифузії та відсутність седиментації. Однак, сучасні комп'ютерні методи дозволяють змодельовати рішення для різних граничних умов (метод Холде-Вайшета, заснований на явищі, що седиментація речовини пропорційна першому ступеню часу, а дифузія – його квадратному кореню; метод Стаффорда, де седиментаційні коефіцієнти розраховуються з часових похідних седиментаційного профілю). Алгоритми реалізовані в комп'ютерних програмах аналізу аналітичного ультрацентрифугування (седиментограм), зокрема розробки Національного інституту здоров'я США SEDFIT, що є у безкоштовному доступі.

## Електрофорез

В медико-біологічних дослідженнях електрофорез використовується для розділення за певними характеристиками біомолекул (білків, нуклеїнових кислот) з метою їх ідентифікації.

Протягом електрофорезу на заряджені біомолекули діють декілька сил. Основна – електричний потенціал, або напруга (вольтаж), поля, що визначає величину заряду поміщеної в поле частинки і спонукає до руху негативно заряджені частинки (аніони) до позитивно зарядженого електроду (аноду), а позитивно заряджені катіони – до негативного катода. Через наявність сили тертя більш великі за розміром та асиметричні молекули будуть переміщатись під дією електричного поля з меншою швидкістю (рис. 1.10).

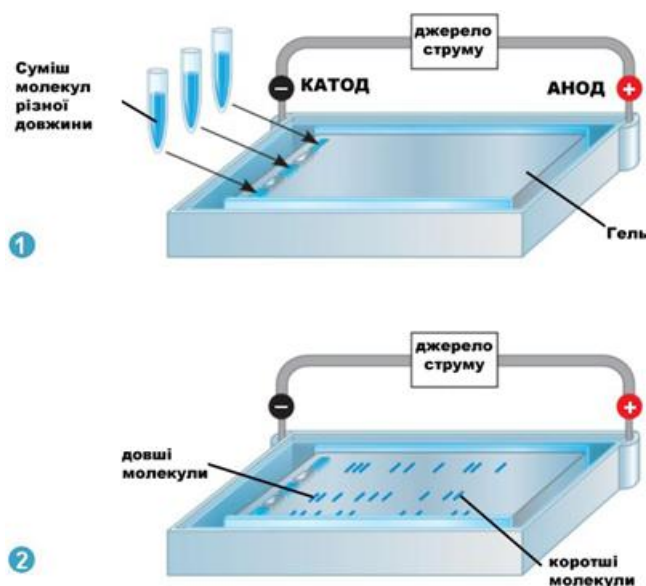


Рис. 1.10. Схема електрофоретичного розділення молекул білків

Сили, що діють на біомолекули протягом електрофорезу можна частково контролювати, змінюючи напругу електричного поля, модифікуючи в'язкість, кислотність (рН) буферного розчину та властивості роздільного середовища (гелю) біозразку.

На рух біомолекул також впливає плинність буферу через пори роздільного середовища. Буфер рухається у протилежному напрямку від

негативно заряджених молекул біозразку і, таким чином, може порушувати рух молекул з малою магнітудою заряду, переносячи їх з собою (електро- чи ендосмос).

Напруга вибирається таким чином, щоб мінімізувати нагрівання й випаровування буферного розчину при максимальному розділенні молекул, що мігрують через пори роздільного середовища. Ідеально підібране роздільне середовище не має електричної чи хімічної взаємодії з молекулами зразку й, таким чином, виступає лише у ролі «фільтра біомолекул» за розміром та формою. Основними роздільними середовищами є агароза, поліакриламід та ацетат целюлози.

В окремих випадках, наприклад, при дослідженні білків, після електрофорезу може виникнути необхідність фіксації розділених фракцій біомолекул у матриці роздільного середовища з метою запобігання їх втрати при наступному фарбуванні гелю. З цією метою роздільне середовище може бути витримане у оцтовій чи трихлороцтовій кислотах, або нагріте до температури денатурації білків. Протеїни у агарозному гелі можуть бути осаджені сольовими розчинами.

В подальшому роздільне середовище проходить етап фарбування з метою ідентифікації специфічних категорій біомолекул. Барвник, що використовується для фарбування, вибирається, виходячи з задач дослідження. Протеїни можуть бути візуалізовані з використанням нінгідрину, що виявляє аміногрупи; Пунцовим S (Ponceau S), який використовується для неспецифічної візуалізації протеїнів на ацетаті целюлози; Coomassie brilliant blue та amino black специфічні до протеїнів; Sudan black та oil red O – до ліпопротеїнів. Для візуалізації нуклеїнових кислот може бути використано нітрат срібла, етидію бромід, SYBR Green чи інші інтеркалюючі барвники, що вбудовуються між подвійними ланцюгами полінуклеотидів. Після фарбування візуалізація відбувається шляхом зйомки роздільного середовища з використанням гель-документуючих систем при опроміненні світлом з певною довжиною хвилі, специфічною до вибраного

барвника. Наступна обробка отриманого зображення дозволяє визначити молекулярну вагу досліджуваних біоломекул, а денситометричний аналіз – концентрацію біомолекул у фракції. Обидва аналізи вимагають одночасного використання стандартів молекулярної ваги та концентрацій при постановці електрофорезу. Перенос продукту з гелю на нітроцелюлозну мембрану дозволяє проводити специфічну ідентифікацію протеїнів чи нуклеїнових кислот з використанням проб, мічених радіоактивною чи флуоресцентною міткою (блотінг).

Окремим різновидом електрофорезу є 2D-електофорез, першим етапом якого є ізоелектрофокусування вихідного зразку (наприклад, за градієнтом рН, приклад якого наведено на рис. 1.11).

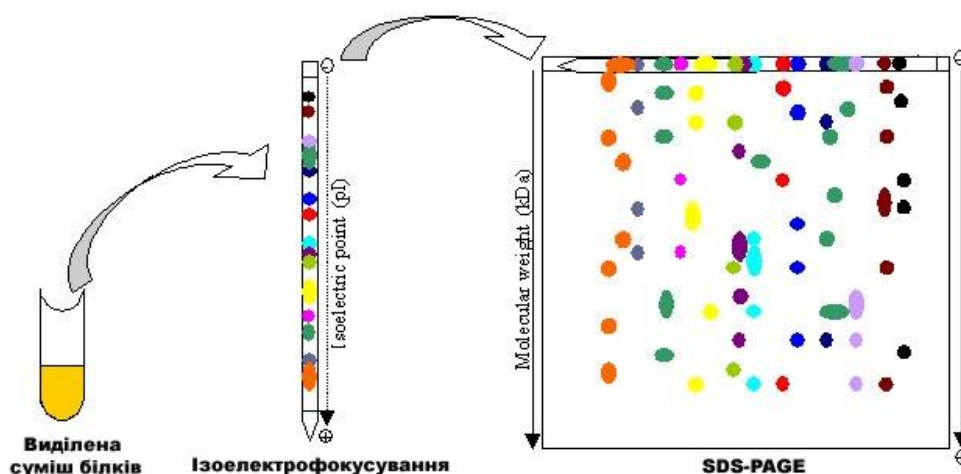


Рис. 1.11. Схема проведення 2D-електофорезу з використанням поліакриламідного гелю у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE).

## Хроматографія

Хроматографія являє собою техніку розділення біомолекул на основі їхнього відносного розподілу між двома різними фазами. Розділення

відбувається на стаціонарній (нерухомій) фазі під впливом мобільної (рухомої) фази та базується на розчинності біомолекул та їх взаємодії з цими двома фазами.

#### *Номенклатура хроматографії.*

У залежності від природи взаємодії, яка зумовлює розділення компонентів між елюентом та нерухомою фазою, розділяють такі основні види хроматографії – адсорбційну, роздільну, іонообмінну, ексклюзивну (молекулярно-ситову) та осаджувальну.

Адсорбційна хроматографія базується на різній здатності адсорбенту (речовини з розвинутою поверхнею) сорбувати різні речовини, які розділяються. Розподільна хроматографія базується на різній розчинності компонентів суміші у нерухомій фазі (високо кипляча рідина нанесена на твердий макропористий носій) та елюенті. Проте слід зважати на те, що при розподільному механізмі розділення на переміщення зон компонентів також частково впливає їх адсорбційна взаємодія з твердим сорбентом. Іонообмінна хроматографія базується на різниці констант іонної рівноваги між нерухомою фазою (іонітом) і компонентами суміші, яка розділяється.

Ексклюзивна хроматографія поділяється на гель-проникну, у якій елюент є неводним розчинником та гель-фільтраційну, де елюент – вода. Осаджувальна хроматографія базується на різній здатності компонентів, що розділяються, випадати в осад на твердій нерухомій основі.

Відповідно до агрегатного стану елюенту розрізняють газову та рідинну хроматографію. У залежності від агрегатного стану нерухомої фази хроматографія буває газо-адсорбційною (нерухома фаза – твердий сорбент) та газорідинною (нерухома фаза - рідина). В свою чергу рідинна хроматографія розділяється на рідинно-адсорбційну і рідинно-рідинну. Рідинно-рідинна та газорідинна хроматографії відносять до розподільної хроматографії, а до рідинної адсорбційної відносять паперову та тонкошарову хроматографії.

Крім цього розрізняють також колонкову та площинну хроматографії.

### ***Площинна хроматографія***

При площинній хроматографії розділення відбувається на площині чи пласкій поверхні. Мобільною / рухомою фазою, як правило, виступає рідина. Переміщення рухомої фази при даному різновиді хроматографій відбувається за рахунок капілярних сил. Стаціонарною / нерухомою фазою можуть бути дрібні гранули, полімерний гель, папір тощо. Площинна хроматографія поділяється на тонкошарову та паперову.

У тонкошаровій хроматографії шар гранульованого сорбенту наноситься на скляну, металеву або пластикову пластинку; у випадку паперової хроматографії за основу використовується спеціальний папір.

Розділення залежить від розчинності досліджуваної речовини в розчиннику, полярності розчинника і розчиненої речовини (у зразку). Візуалізація розділеного зразку відбувається завдяки хімічній реакції, що спричиняє зміну кольору. Щільність кольорових бендів може бути співставлена з концентрацією досліджуваної речовини шляхом денситометричного аналізу.

### ***Тонкошарова хроматографія***

При даному виді хроматографії у якості сорбенту використовується гель на основі діоксиду кремнію (кварцу), оксиду алюмінію, поліакриламідний чи крохмальний гель, нанесений на стаціонарну фазу, як правило, скляну, металеву чи пластикову пластинку. Рухомою фазою є рідкий розчинник. Фракції розчиненої речовини разом з розчинником рухаються вгору по стаціонарній фазі під дією капілярних сил. Спеціально підібрані хімічні компоненти, додані до нерухомої фази, спричиняють хімічну реакцію з розділеними фракціями біомолекул, обумовлюючи зміну кольору та отримання типових хроматограф (рис. 1.12).

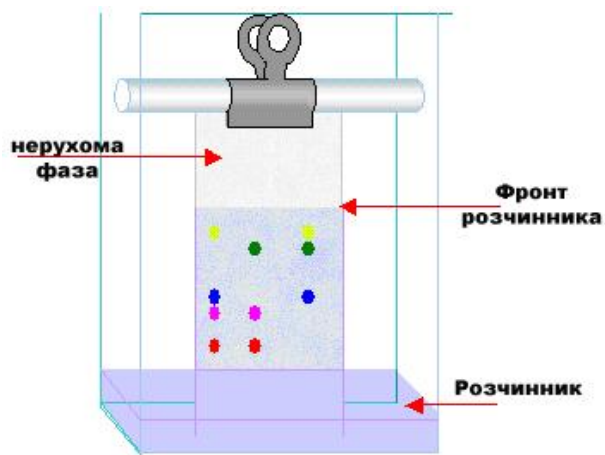


Рис. 1.12. Схема тонкошарової хроматографії.

У якості модифікацій методу розрізняють зворотно-фазову тонкошарову хроматографію та хроматографію високого тиску. У зворотно-фазовій хроматографії використовується зв'язана тонкошарова кварцова фаза, що є більш полярною за рухома фазою, і використовується для розділення полярних сполук.

### ***Колонкова хроматографія***

При колонковій хроматографії сорбентом заповнюють спеціальні трубки – колонки, а рухома фаза рухається всередині колонки під дією гравітації та завдяки перепаду тиску. Різновидом колонкової хроматографії є капілярна, коли тонкий шар сорбенту наноситься на внутрішню поверхню трубки-капіляра.

Різні речовини, що розчинені у зразку, будуть переміщатися з різною швидкістю, адсорбуватися в колонці та вимиватися з неї окремо. Шляхом використання різних розчинників можна досягти розділення, вимиваючи певні окремі сполуки з наступною їх спектрофотометричною оцінкою.

Адсорбційна колонкова хроматографія заснована на високо специфічній взаємодії розчиненої речовини з солідними частинками стаціонарної фази. Цей підхід використовується для сорбції та розділення основних чи лужно заряджених речовин (наприклад, розділення різних типів гемоглобіну).

У роздільній колонковій хроматографії розчинена речовина у зразку взаємодіє з інертною, хімічно нереактивною солідною основою, що містить тонку плівку адсорбованої рідини. Розділення базується на електростатичній взаємодії чи утворенні водневих зв'язків між розчиненими речовинами та стаціонарною фазою, а також на різниці у розчинності досліджуваних речовин у рухомій та стаціонарній фазах.

При іон-обмінній хроматографії зразок розводиться з буфером з метою отримання розчиною речовиною електричного заряду. Принцип методу заснований на різниці в розчинності речовин у двох фазах та величині електричних зарядів. Змінюючи рН рухомої фази, можна досягти елюції специфічно заряджених частинок розчиною речовини.

У випадку стеричної ексклюзійної колонкової (гель-фільтраційної) хроматографії молекули розділяються в колонці за розміром на основі їх різної проникності у пори нерухомої фази. При цьому, першими вимиваються молекули більшого розміру, що здатні проникати у мінімальну кількість пор стаціонарної фази. Останніми вимиваються речовини з невеликими розмірами молекул, що вільно проникають у пори. Сама стаціонарна фаза є хімічно інертною і не взаємодіє з речовинами, що розділяються.

### ***Гель-фільтрація***

Метод гель-фільтрації (або гель-проникної хроматографії) дозволяє розділяти білки за величиною та формою молекул. Розділення проводять в хроматографічних колонках, заповнених сферичними частинками набряклого гелю (розміром 10-500 мкм) з полімерних матеріалів. Частинки гелю проникні завдяки внутрішнім каналам, що характеризуються певним середнім діаметром. Суміш білків вносять в колонку з гелем та елюють буферним розчином. Білкові молекули, не здатні проникати у гранули гелю, будуть переміщуватись з високою швидкістю. Середні та малі білки будуть, у тій чи іншій мірі, утримуватись гранулами гелю. На виході з колонки елюат



збирають у вигляді окремих фракцій. Об'єм виходу того чи іншого білка визначається, переважно, його молекулярною масою.

### *Автоматизовані системи хроматографії*

Серед форм колонкової хроматографії, що, на сьогодні, забезпечені автоматизацією процесу та зчитуванням результату, можна виокремити рідинну хроматографію високого тиску (високоєфективна), газову хроматографію та газову хроматографію з детекцією результатів шляхом мас-спектрометрії. Аналізатор дозволяє виводити на монітор, у вигляді графіку, величину сигналу детектору у розрізі часу. Автоматизовані методи хроматографії, у порівнянні зі звичайними, дозволяють проводити більш чутливі та специфічні дослідження, однак вимагають висококваліфікованих й високоосвічених операторів, стандартизації методів обробки зразку, протоколів, документації тощо.

Високоєфективна рідинна хроматографія (високого тиску) (ВЕРХ) є однією з найбільш ефективних автоматизованих методів, в основі якого лежить участь компонентів зразку в системі Ван-дер-Вальсових взаємодій (переважно міжмолекулярних) на межі розподілу фаз. Використання в аналізі високого тиску (до 400 бар) значно пришвидшує проведення аналізу. Сепаровані фракції можуть бути проаналізовані з використанням детекторів різного типу (ультрафіолетового, діодно-матричного, флуоресцентного, електрохімічного, рефрактометричного та мас-селективного), сигнал з якого виводиться у вигляді графіку абсорбції у розрізі часу. При якісному аналізі для ідентифікації речовини використовується показник часу утримування її колонкою. Кількісний аналіз забезпечується алгоритмом розрахунку, що співвідносить площу під піком шуканої речовини до аналогічного показника відомого стандарту чи калібрувального розчину.

За механізмом розділення рідинна хроматографія високого тиску ділиться на адсорбційну, роздільну, іон-обмінну, ексклюзивну тощо. Однак, в

практичній роботі, розділення часто проходить за кількома механізмами одночасно.

Виділяють 2 основні типи ВЕРХ: нормально- та зворотно-фазову. У випадку нормально-фазової хроматографії стаціонарна фаза є більш полярною за рухому, тому у складі елюенту переважає неполярний розчинник: гексан, хлороформ. При зворотно-фазовій хроматографії стаціонарна фаза менш полярна за рухому. В таких випадках у складі елюенту майже завжди присутня вода, що дозволяє досягти окремих переваг: більш повного розчинення біологічно-активних сполук у рухомій фазі, маже всі рухомі фази взаємно перемішуються, можливе використання градієнтного елюювання та майже завжди можливе використання УФ-детекції.

Типова схема будови рідинного хроматографа наведена на рис. 1.13.

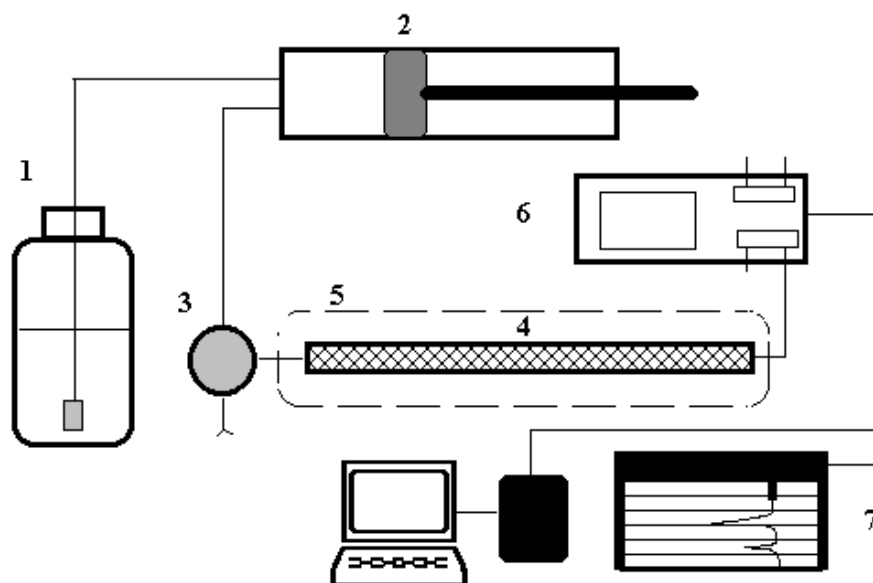


Рис. 1.13. Принципова схема будови хроматографа для ВЕРХ.

1 – резервуар, 2 – насос, 3 – інжектор, 4 – колонки ВЕРХ, 5 – термостат, 6 – детектор, 7 – реєструючий пристрій.

Газова хроматографія використовується з метою розділення летючих компонентів. У якості мобільної фази використовується інертний газ, як правило, гелій, що не взаємодіє зі зразком та стаціонарною фазою. В

залежності від різновиду газової хроматографії, стаціонарна фаза може являти собою твердий носій (діоксид кремнію, оксид алюмінію) (газово-твердофазна) чи рідину, що оточує інертну основу (газово-рідиннофазна). Шляхом нагрівання досягається випаровування зразку, який потім подається з газом-носієм до розігрітої колонки, де й проходить розділення. В газовій хроматографії до кожного зразку додається внутрішній стандарт з метою урахування флуктуації в колонці, температури порту інжекції та змін у газовому потоці. Розділені частинки потрапляють до полум'яно-іонізаційного детектору, що створює електронний сигнал. Конструктивно, можуть бути використані інші види детекторів, на кшталт термоіонного, фотоіонізаційного чи детектора електронного захвату. Однак, одним з найбільш точних детекторів є мас-спектрометр, що дозволяє фракціонувати молекули з подальшим електромагнітним розділенням за спектром розподілу мас.

Електронний сигнал детектору виводиться на моніторі у вигляді піку, за площею та висотою якого можна оцінювати концентрацію певної хімічної сполуки, а за часом його появи проводити ідентифікацію сполуки шляхом встановлення часу утримування, що є унікальною її характеристикою.

Схема будови газового хроматографа наведена на рис. 1.14.

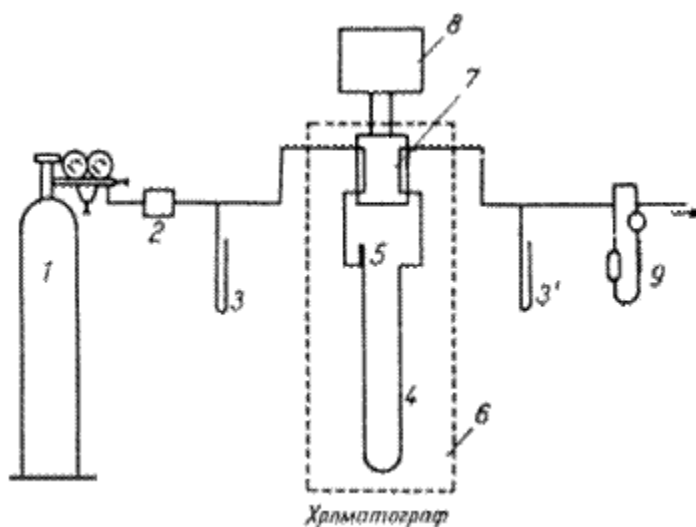


Рис. 1.14. Принципова схема будови газового хроматографа.

1 – балон високого тиску з газом-носієм, 2 – стабілізатор потоку, 3 – манометри, 4 – хроматографічна колонка, 5 – пристрій для внесення зразку, 6 – термостат, 7 – детектор, 8 – реєструючий пристрій, 9 – детектор витрати газу.

Роздільна здатність автоматизованих систем хроматографії та широкий спектр ідентифікованих речовин обумовив їх широке використання в фармакологічних, токсикологічних, криміналістичних та інших видах досліджень.

### **Діаліз.**

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.

### **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.

Найпоширенішими методами її визначення є ультрацентрифугування, гель-електрофорез, гель-фільтрація, осмометричний, дифузійний метод, метод електронної мікроскопії та ін.

### **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  $\text{COO}^-$ -групи бокових радикалів аспарагінової і глутамінової кислот,  $\text{NH}_3^+$ -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 C-кінцевих груп є незначною у зв'язку з великими розмірами молекул білка. Ступінь іонізації функціональних груп залежить від значення рН. У кислому середовищі іонізуються  $\text{NH}_2$ -групи, у лужному середовищі –  $\text{COOH}$ . Тому білки у водному середовищі, подібно до амінокислот, мають властивості амфолітів: у кислому середовищі вони реагують як основи, у лужному – як кислоти. У залежності від знака заряду молекула білка в електричному полі пересуватиметься відповідно в бік катоду чи аноду. Додавання до розчину білка певної кількості іонів  $\text{H}^+$  чи  $\text{OH}^-$  змінює рН середовища, внаслідок чого дисоціація одних груп пригнічується, а інших – посилюється.

Залежно від рН середовища та відношення кислих і основних амінокислот у структурі білка, білки в розчині мають позитивний або негативний заряд.

Значення рН середовища, при якому білок не несе сумарного заряду й не рухається в електричному полі, називається ізоелектричною точкою (ІЕТ). 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.

Внаслідок наявності в складі білкової молекули великої кількості реакційно здатних груп, білки можуть брати участь в реакціях окислення, відновлення, солеутворення, ацетилювання, етерифікації, фосфорилювання та 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 білків сильно залежить від концентрації солей (від іонної сили). У дистильованій воді білки, частіше за все, матимуть погану розчинність, однак, зі збільшенням іонної сили розчинність білків зростатиме. При цьому, чим більша кількість гідратованих неорганічних іонів зв'язується з поверхнею білка, тим меншою стає ступінь його агрегації (засолювання). За високої іонної сили молекули білків лишаються гідратуючих оболонок, що призводить до їх агрегації та випадінню білка в осад (висолювання). Використовуючи різницю в розчинності, можна з використанням звичайних солей розділити (фракціонувати) суміш білків. Типовий графік розчинності білків в залежності від концентрації солі наведений на рис.1.15.

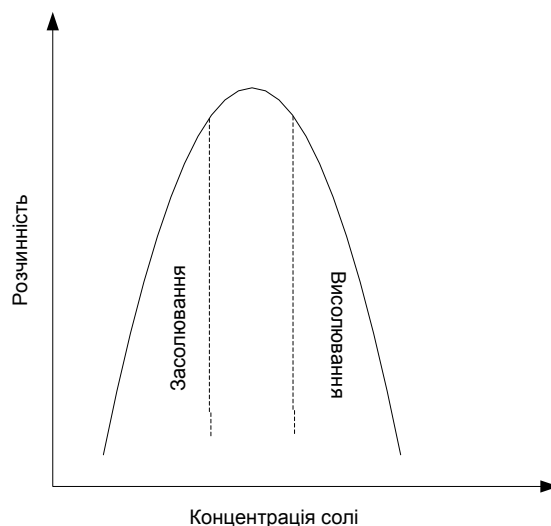


Рис.1.15. Залежність розчинності білків від концентрації солі

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 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  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 гідrataцію 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 гідrataцію 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. Оборотно 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 висолоювання 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.

### **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 вуглецю, змінюються оптичні властивості і константа седиментації. У структурі білка суттєво зменшується кількість  $\alpha$ -спіралей і  $\beta$ -структур, зменшується кількість

внутрішньомолекулярних водневих зв'язків і збільшується кількість цих зв'язків між білком і водою. Під час денатурації білка вивільнюються 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. 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.

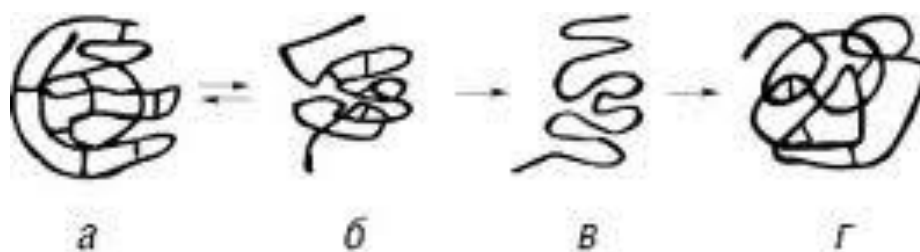


Рис. 1.16. Схема денатурації білка:

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.

### **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. В інфрачервоній (ІЧ) частині спектра (760-10000 нм) поглинають світло всі білки. ІЧ-спектроскопію широко використовують для визначення відносного вмісту  $\alpha$ -спіралей,  $\beta$ -структур та аморфних ділянок у білковій молекулі. 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 вуглецю. 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 т.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 азоту (азотометрією), а також фотонейтриметрією.

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 – плазмоцитома). Короткочасна відносна гіперпротеїнемія відзначається при стисненні 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.

### ***Принцип будови фотометрів та спектрофотометрів.***

Оптичні прилади, що вимірюють поліхроматичний світловий потік (7012 нм) у видимому діапазоні світла, носять назву фотоелектроколориметрів. Прилади, що вимірюють поліхроматичний світловий потік в ультрафіолетовому, видимому та інфрачервоному діапазонах, називають фотометрами (рис. 1.17). А прилади, що розділять світловий потік та дозволяють проводити його виміри на будь-якій довжині хвиль в межах оптичного діапазону – спектрофотометрами (рис. 1.18). Дослідження можуть виконуватися за одно- та двопроменевою схемами.

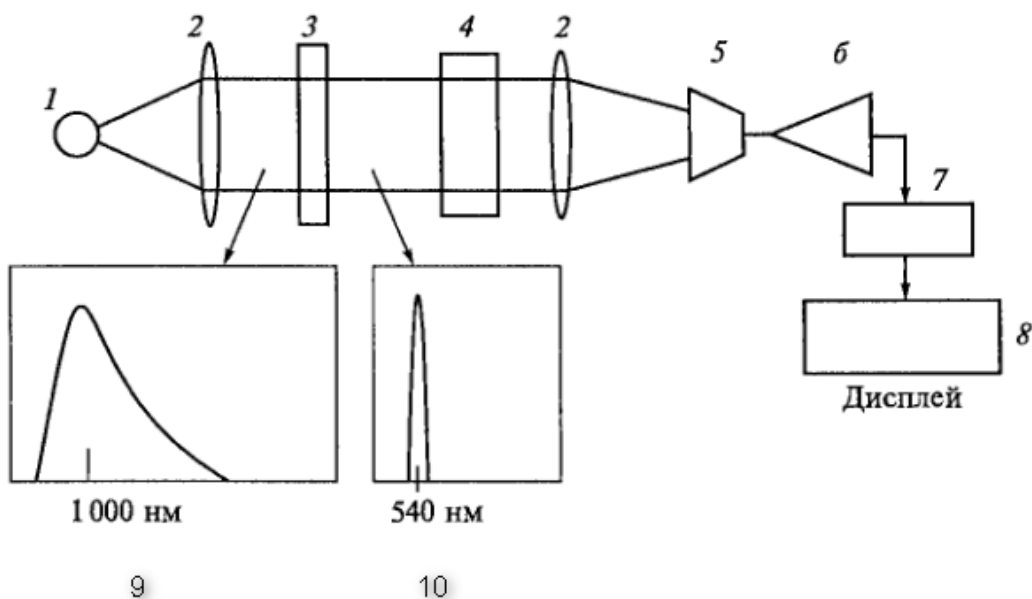


Рис. 1.17. Типова будова фотометру.

1 – джерело світла, 2 – лінза, 3 – світлофільтр, 4 – оптична кювета, 5 – фотоприймач, 6 – підсилювач, 7 – мікропроцесор, 8 – дисплей, 9 – спектр світла до світлофільтра, 10 – спектр після світлофільтра.

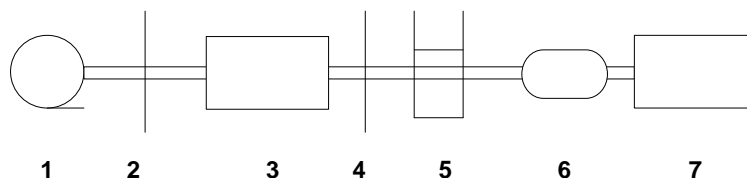


Рис. 1.18. Схема будови однопроменевого спектрофотометру.

1 – джерело світла, 2 – вхідна щілина, 3 – монохроматор, 4 – вихідна щілина, 5 – кювета, 6 – детектор, 7 – вимірювальний пристрій.

При однопроменевому методі визначають інтенсивність світлового потоку, коли кювета містить лише розчинник, а потім - з розчином з наступним вирахуванням величини за чистим розчинником. Таким чином, дослідження фонового контролю та зразку розділені у часі, що може провокувати похибки у випадку нестабільності джерела світла. При двопроменевому методі обидва дослідження виконують одночасно за рахунок того, що джерело світла генерує два промені однакової інтенсивності, один з яких проходить через чистий розчинник, інший – через зразок з наступним порівнянням їх інтенсивності.

Джерело світла у фотометрі залежить від робочого діапазону довжин хвиль дослідження. З цією метою можуть використовуватись різні типи ламп, а саме: вольфрамowo-галогенові, дейтерієві дугові, ксенонові, дугові ртутні (ртутно-кварцеві), світлодіоди та лазери.

Виділення області спектру є принциповим етапом дослідження, оскільки для різних речовин характерне поглинання на різних довжинах хвиль. Для виділення відповідних інтервалів та довжин світла можуть бути використані різні оптичні засоби: дзеркала, лінзи, світлофільтри,

монохроматори. Необхідні спектральні ділянки виділяють за допомогою світлофільтрів та монохроматорів. Світлофільтри дозволяють пропускати світло лише певного діапазону хвиль, у той час як за допомогою монохроматора можна визначити повний спектр, отриманий від проби.

Спектральна ширина смуги світла, що залежить від якості монохроматора, пристрою дисперсії світла та вихідної щільності, визначає роздільну здатність спектрофотометру, тобто – його здатність диференціювати два дуже близьких один до одного піки.

Кювета – оптичний компонент більшості фотометрів та спектрофотометрів. Кювети мають точну внутрішню ширину, що забезпечує можливість їх порівняння за цим параметром. Для вимірювань в області УФ-спектру використовують лише кварцеві чи кремнієві кювети. Одноразові пластмасові можуть бути додатково використані в якості пробірок для виконання підготовчих операцій та аналізу. Проточні кювети додатково інтегровані з автоматичним чи напівавтоматичним пристроєм їх заповнення.

При проходженні через кювету світловий промінь досягає детектору, який перетворює потік світла у потік електронів. В якості детекторів можуть бути використані фотоелементи, фотоопори, фотодіоди та фотопримножувачі. Принцип дії фотоелементів базується на явищі фотоефекту і заключається у тому, що під дією світла речовина (як правило, одновалентний метал) випускає електрони, що в безповітряному просторі лампи направляються від фотокатода до анода.

Якщо вивільнення електронів відбувається у напівпровідниках, то такі фотоелементи з внутрішнім фотоефектом носять назву фотопорів. Фотодіод являє собою приймач оптичного випромінювання, що перетворює світло, яке потрапило на його фоточутливу ділянку, в електричний заряд за рахунок «р-п»-переходу (електронно-дірковому). Фотопримножувачі дозволяють визначати довжини хвиль в широких межах. Коли фотон входить до детектору, він вдаряється об металічну поверхню, вивільняючи один чи більше електронів з поверхні. Електрони вдаряються об другу металічну

поверхню, вивільняючи ще більшу кількість електронів. Через близько десятків таких етапів електронний потік виміряють для розрахунку кількості фотонів, що потрапили до детектору.

Серед вимірювально-реєструючих пристроїв виділяють відображаючи, реєструючи, друкуючі, аналогові та цифрові. У відображаючих модулях результат дослідження визначається за шкалою механічного чи електричного відлікового пристрою. Реєструючі прилади виконують автоматичну графічну реєстрацію результату. Аналого-цифрові перетворювачі, що вбудовані у більшість сучасних фотометрів, поряд з друкуючими пристроями (принтерами) дозволяють отримувати результат у роздрукованому вигляді безпосередньо в одиницях концентрації чи активності аналіту.



## КЛАСИФІКАЦІЯ БІЛКІВ

Незважаючи на те, що хімічний склад і структура білків у певній мірі 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 групини білкової 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 цим 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.

Інша спроба полягає в класифікації білків відповідно до *особливостей їх вторинної і третинної структур*. Згідно з цією класифікацією серед глобулярних білків виділено 4 класи:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\alpha+\beta$ -, і  $\alpha/\beta$ -білки. До класу  $\alpha$ -

білків відносять глобулярні білки, які містять лише  $\alpha$ -спіралі в кількості не менше 60% від поліпептидного ланцюга, до складу якого вони входять; до класу  $\beta$ -білків – ті, що містять тільки  $\beta$ -структури, найчастіше не менше двох антипаралельних ланцюгів. До класу  $\alpha+\beta$ -білків відносять білки, що містять ті чи інші структури в межах одного й того ж поліпептидного ланцюга (причому один домен складається з  $\alpha$ -спіралей, а інший – із  $\beta$ -шарів), до класу  $\alpha/\beta$ -білків – ті, що містять чергування вздовж поліпептидного ланцюга  $\alpha$ -спіралей і  $\beta$ -структур, або один чи декілька  $\beta$ -шарів, оточених декількома  $\alpha$ -спіралями кожен. Більшість білків згідно з цією точкою зору належать до  $\alpha/\beta$ -класу, якому зачисельністю трохи поступається  $\beta$ -клас;  $\alpha$ -клас і  $\alpha+\beta$ -клас менш поширені, аніж два перші (за Ю.Б.Филиповичем, 1985 р.). Слід мати на увазі, що є нечисленні глобулярні білки, цілком позбавлені будь-якої вторинної структури, тому їх не можна віднести ні до одного із вищезазначених класів.

Прості білки розділяють на такі класи: ***альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони, проламіни, глютеліни, протейноїди.***

***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  $\text{Ca}^{2+}$ , стероїдних гормонів, деяких лікарських препаратів (дикумарину, пеніциліну, аспірину), утворюючи з ними комплекси.

**Глобуліни.** Глобуліни, як і альбуміни, дуже поширені у складітваринних 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  $\alpha_1$ -глобуліни (6–7%),  $\alpha_2$ -глобуліни (8–9%),  $\beta$ -глобуліни (13–14%),  $\gamma$ -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 біологічній інертності, що є необхідною умовою збереження спадкових властивостей організму. Протаміни широко розповсюджені в природі. Вони містяться в статевих клітинах тварин і людині 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.

### **Природні пептиди**

У живих організмах виявлено досить багато вільних пептидів. Частина з них утворюється в певних умовах у результаті часткового ферментативного гідролізу, а частина – зустрічаються як вільні сполуки, не зв'язані зі структурою білка. Інтерес до природних пептидів зумовлений їх надзвичайно високою біологічною активністю. Багато з них мають виразну фармакологічну дію і становлять інтерес як лікарські засоби.

На відміну від білкових поліпептидів природні пептиди більш різноманітні за складом: досить часто мають залишки D-амінокислот,  $\beta$ -амінокислот, містять циклічні фрагменти, розгалужені ланцюги тощо. Природні пептиди залежно від характеру дії та походження поділяються на декілька груп:

- пептиди, яким властива гормональна активність (вазопресин, окситоцин, кальцитонін, глюкагон, кортикотропін та ін.);
- регуляторні пептиди (пептиди гіпоталамуса – ліберини і статини; пептиди м'язів – ансерин, карнозин та ін.);
- нейропептиди мозку (енкефалін, ендорфін, скотофобін, пептиди пам'яті, сну і т.д.);
- пептиди, які беруть участь у процесах травлення (гастрин, секретин та ін.);
- тканинні гормони (ангіотензин, брадикінін, калідин, атріопептиди та ін.);
- антибіотики (граміцидини А, В, С і актиноміцин Д та ін.);
- алкалоїди (ерготамін, пандамін та ін.).

Таким чином, біологічна активність більшості пептидів пов'язана з їх регуляторною функцією, причому точки прикладання їх дії і ефективність в організмі є дуже різноманітними.

Ансерин і карнозин є дипептидами, які містяться в м'язах людини і тварин. До їхнього складу входять незвичайні амінокислоти  $\beta$ -аланін і метилгістидин. Вони підвищують ефективність іонних насосів м'язової клітини й амплітуду м'язових скорочень.

Трипептид глутатіон ( $\gamma$ -глутамініл-цистеїл-гліцин; глу-цис-глі; Г-SH) – один із найпоширеніших пептидів, міститься в усіх клітинах тварин і людини, рослин і бактерій.

Глутатіон захищає сульфгідрильні (-SH) групи білків від окислення, входить як небілкова частина до складу деяких ферментів (як кофермент), бере участь у механізмі транспорту амінокислот через клітинні мембрани

кишкового епітелію та інших клітин у складі ферменту  $\gamma$ -глутамініл-трансферази, яка знаходиться в мембрані. Береучасть у розкладанні пероксиду водню, що утворюється в еритроцитах внаслідок обмінних процесів або аутоокислення лікарських препаратів, і в детоксикації низки сторонніх для організму сполук (ксенобіотиків), у тому числі лікарських препаратів, шляхом кон'югації (об'єднання) з ними. При цьому утворюються парні, більш розчинні у воді сполуки, які легко виводяться через нирки.

До вільних пептидів належать тканинні гормони – калідин і брадикінін, що утворюються шляхом розщеплення загального попередника кініногену. Вони збільшують проникність капілярів і є найсильнішими збудниками больових відчуттів. Брадикінін – лінійний нонапептид: арг-про-про-глі-фен-сер-про-фен-арг; калідин відрізняється від нього наявністю ще одного амінокислотного залишку з N-кінця – лізину.

Нейропептиди містяться, переважно, у головному мозку. До них належить група так званих опіоїдних пептидів, оскільки вони взаємодіють із тими ж рецепторами, що й опіатні речовини (наприклад, морфін) і близькі до них за своєю дією. Представниками їх є  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ендорфіни,  $\alpha$ - і  $\beta$ -неоендорфіни, динорфін, пентапептиди метіоніненкефалін (тир-глі-глі-фен-мет) та лейцин-енкефалін, який відрізняється від першого останньою амінокислотою: замість метіоніну в лейцин-енкефаліні знаходиться лейцин, що відображено у їхній назві. Опіоїдні пептиди справляють модулюючий вплив на передачу нервових імпульсів у ряді відділів центральної нервової системи (ЦНС). Велику кількість рецепторів зв'язування ендопіоїдів знайдено в гіпоталамусі, таламусі, нейрогіпофізі і ряді інших відділів ЦНС, вони зустрічаються й у периферичній нервовій системі. Ендопіоїди беруть участь у регуляції процесів, пов'язаних зі сприйняттям болю, впливають на серцево-судинну діяльність, стресові реакції та на деякі інші фізіологічні функції. Під час знеболювання голковколлюванням відбувається підвищення їх вмісту в спинно-мозковій рідині, що свідчить про активацію цієї системи. На особливу увагу заслуговує синтез опіоїдних пептидів як лікарських

засобів, що виявляють знеболюючу дію і використовуються як замітники наркотичних препаратів. На даний час деякі з опіюїдних пептидів отримані синтетичним шляхом, проте виявилось, що після введення в організм вони швидко руйнуються ферментами. Для підвищення стабільності їх захищають шляхом заміни окремих амінокислот L-ряду на залишки D-амінокислот або створення різних модифікацій амінокислот, які входять до складу опіюїдних пептидів. Подібна заміна лише трохи зменшує їх біоактивність, проте сприяє пролонгованій дії препарату.

Останнім часом з екстрактів тканини передсердя тварин і людини були виділені атріопептиди, які беруть участь у регуляції тонуусу серцево-судинної системи й електролітичного обміну. Фізіологічний ефект їх виявився протилежним стосовно системи ренін-ангіотензин-альдостерон. Атріопептиди розширюють судини, підсилюють клубочкову фільтрацію, стимулюють виведення натрію і хлоридів за рахунок пригнічення їх реабсорбції в каналцях. Атріопептиди (від лат. atrio – передсердя) побудовані з різної кількості залишків амінокислот – від 23 до 100, але для виявлення біологічного ефекту обов'язковою є присутність у молекулі 17-членного кільця, яке утворюється за рахунок дисульфідного зв'язку між залишками цистеїну.

Кейлони (хейлони) – це тканиноспецифічні гормони місцевої дії, представлені пептидами або білками. Вони пригнічують мітотичну активність інших клітин, попереджують їх злоякісний ріст. Пептидні антибіотики мають антибактеріальну дію і використовуються як лікарські засоби. Так, граміцидин А (циклодекапептид) є іонофором і діє на біологічні мембрани, утворюючи комплекси з іонами металів, чим порушує регуляцію іонної проникності в мембранах бактерій.

Пептидно-білкову природу мають багато токсичних речовин: токсини отруйних грибів, отрути змій, скорпіонів, бджіл. Найчастіше вони блокують біосинтез білка в клітинах еукаріот. З іншого боку, в деяких грибах у тих же тканинах містяться й антитоксини, які ущільнюють мембрани клітин печінки

і знижують їх проникність для токсинів. Вивчення токсинів і антитоксинів становить інтерес у світлі пошуку сполук, які знешкоджують токсини.

Крім переліченого, деякі пептиди виконують низку інших, дуже важливих і цікавих функцій. Так, відкрито гормони, які відповідають за індукцію сну; пептиди, які беруть участь у процесах пам'яті і розумового розвитку, у набутті умовних рефлексів. Простежується зв'язок між відхиленнями психічної діяльності людини від норми і вмістом певних пептидів у мозку.



## РОЗДІЛ II

### СКЛАДНІ БІЛКИ

Важливими компонентами живих організмів, які містяться в них у значній кількості, є складні білки. Окрім амінокислот, до їх складу входить ще небілковий компонент.

Молекула складного білка визначається терміном – «холопротеїн». Холопротеїн складається з апопротеїну (поліпептиду) та небілкового компоненту – простетичної групи (від гр. *prostheto* – приєдную, додаю):

**холопротеїн=апопротеїн +простетична група**

Небілковий компонент (простетична група) може по-різному сполучатися з білковим компонентом. В одних випадках він міцноприєднується до поліпептидного ланцюга за допомогою ковалентних зв'язків (гемоглобін, родопсин, флавопротеїни та ін.), в інших – небілковий компонент з'єднується з білком за допомогою сил слабких взаємодій, як, наприклад, в нуклеопротеїнах та ліпопротеїнах крові. Такі представники складних білків мають властивість легко дисоціювати в розчинах на складові компоненти.

В якості простетичної групи до складних білків можуть входити біомолекули, що належать до різних класів органічних сполук (вуглеводи, ліпіди та ін.). Іноді небілкові компоненти складних білків представлені неорганічними молекулами (залишками ортофосфатної кислоти) і, навіть, атомами металів (Феруму, Купруму, Молібдену тощо).

Включення до складу молекули білка небілкового компоненту надає їй особливі властивості, що не характерні для вільного поліпептидного ланцюга. Так, приєднання ліпиду викликає появу гідрофобної ділянки, за рахунок чого молекула білка набуває здатності вбудовуватися в гідрофобний шар клітинної мембрани; приєднання гема надає молекулі здатності зв'язувати кисень та переносити електрони, а кон'югація з поліпептидним

ланцюгом олігосахариду сприяє збільшенню тривалості існування білка в цитоплазмі клітини, оскільки в такому вигляді гальмується його гідроліз протеолітичними ферментами.

Сполучення простетичної групи з поліпептидним ланцюгом викликає зміну конформації останнього. В результаті чого:

- змінюється структура активних ділянок білкової молекули (активних центрів ферментів, ділянок зв'язування рецепторних білків та білкових гормонів). І, як наслідок цього, модулюються каталітичні властивості ферментів, спорідненість рецепторів до їх лігандів та лігандів до рецепторів;

- змінюється стійкість білка до гідролізу протеолітичними ферментами та до дії факторів денатурації;

- формуються умови для зворотнього скріплення лігандів, а, значить, для їхнього транспорту в організмі та клітині;

- виникає можливість для вбудови білків у певні внутрішньоклітинні мембрани і забезпечення, тим самим, компартменталізації процесів обміну речовин всередині клітини тощо.

Таким чином, природа простетичної групи складного білка набуває вирішального значення у визначенні його властивостей, функцій та локалізації в клітині. З нею пов'язане і все різноманіття світу складних білків. Саме будова небілкового компонента використовується в якості класифікаційної ознаки при об'єднанні складних білків в однорідні групи.

Виходячи з цього, всі складні білки, в залежності від хімічної структури їх небілкового компонента, поділяються на:

- хромопротеїни (забарвлені білки), до складу яких входять:
  - гемопротеїни, що включають в свій склад різні види гема;
  - хлорофілпротеїни (магній-порфірини), простетичною групою яких є хлорофіл;
  - флавопротеїни, що містять у своєму складі флавінову групу;

– ретинальпротеїни, що включають в свій склад вітамін А в альдегідній формі тощо;

- глікопротеїни, що включають у свій склад вуглеводи;
- ліпопротеїни, що включають у свій склад ліпіди;
- нуклеопроетїни, що включають у свій склад нуклеїнові кислоти;
- фосфопроетїни, що включають у свій склад залишки ортофосфатної кислоти;
- металопротеїни, що включають у свій склад атоми металів.

Слід зауважити, що представлена вище класифікація дуже умовна. Це пояснюється тим, що в залежності від використаної ознаки, одні й ті ж білки можуть бути віднесені до різних груп. Так, наприклад, гемопротеїни, з одного боку, належать до хромопротеїнів, бо їх розчини мають характерне червоне забарвлення; з іншого боку, вони відносяться до металопротеїнів, оскільки містять в своєму складі атом Феруму. Фосфопроетїни зазвичай існують у формі кальцієвих солей, внаслідок чого також можуть бути віднесені до металопротеїнів.

Розглянемо особливості будови, характерні властивості та біологічну роль окремих представників різних груп складних білків.

### **Хромопротеїни**

До хромопротеїнів (від гр.*chroma* – барва) належать гетерогенні білки, забарвлення яких залежить від природи простетичної групи. Так, наприклад, гемопротеїни забарвлені в червоний колір, родопсини – в помаранчевий, флавопротеїни – в жовтий, церулоплазмін – в блакитний тощо.

Хромопротеїни надзвичайно поширені у тваринному (залізопорфіриновмісні білки) і рослинному (магнійпорфіриновмісні білки) світі. Білки, що містять залізопорфіринові комплекси, створюють підгрупу хромопротеїнів, яка має назву гемопротеїни.

*Гемопротеїни* - група білків, до структури яких в якості простетичної групи входить гем. Їх представниками є гемоглобін, міоглобін, цитохроми, каталаза та пероксидази.

*Гемоглобін* входить до складу еритроцитів і заповнює більшу частину їх внутрішньоклітинного простору. Його основна функція пов'язана з транспортом газів (кисню та вуглекислого газу) в організмі. Крім цього, він бере участь у підтримці кислотно-лужного балансу в організмі людини і тварин, створюючи найпотужнішу гемоглобінову буферну систему крові.

В даний час досить добре вивчені його структура та властивості. У дорослої людини в крові розрізняють такі фізіологічні типи гемоглобіну:

1. Гемоглобін A<sub>1</sub> (HbA<sub>1</sub> – від англ. *adult*– дорослий), вміст якого становить 96 % від загальної кількості Hb.
2. Гемоглобін A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) - вміст становить до 2,5 %.
3. Фетальний гемоглобін (HbF від англ. *fetus*- плід) складає 1,5 - 2 %.

Головним же чином HbF - гемоглобін плоду та новонароджених, оскільки в крові новонародженої дитини його вміст становить до 80 %, але в перші 3 місяці після народження HbF майже повністю замінюється на HbA.

На рис. 2.1 схематично представлена будова молекули гемоглобіну.

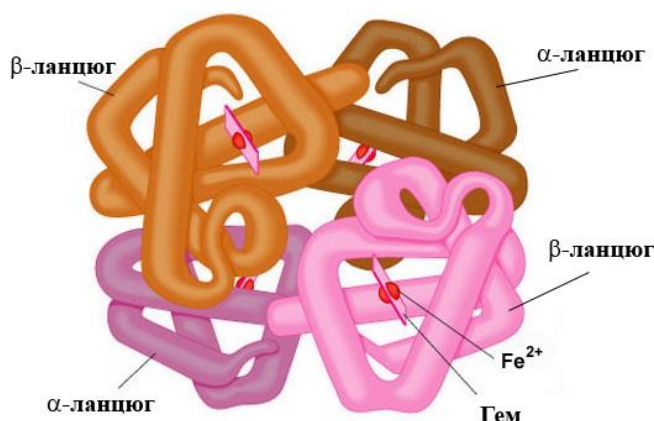


Рис. 2.1. Модель молекули гемоглобіну (HbA<sub>1</sub>)

Молекула гемоглобіну дорослої людини  $HbA_1$ , складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів, кожен з яких пов'язаний з одним гемом. Білкова частина молекули гемоглобіну має назву "глобін".

До складу  $HbA_1$  входять  $2\alpha$ - та  $2\beta$ -ланцюги, які є продуктами експресії двох різних генів і тому мають різну первинну структуру. До складу  $\alpha$ -ланцюга входить 141, а до складу  $\beta$ -ланцюга - 146 амінокислотних залишків. За просторовою структурою обидва типи ланцюгів нагадують молекулу міоглобіну (рис. 7). Схематично гемоглобін  $A_1$  записують так:  $HbA_1 = \alpha_2\beta_2$ . В гемоглобіні  $A_2$  замість  $\beta$  субодиниці знаходиться  $\delta$ :  $HbA_2 = \alpha_2\delta_2$ , а у фетальному гемоглобіні -  $\gamma$ , тобто  $HbF = \alpha_2\gamma_2$ .

При утворенні четвертинної структури гемоглобіну виникають численні нековалентні зв'язки між окремими поліпептидними ланцюгами глобіну. Найбільша їх кількість утворюється між різними типами ланцюгів ( $\alpha$  -  $\beta$ ,  $\alpha$  -  $\delta$ ,  $\alpha$  -  $\gamma$ ). Ці зв'язки переважно мають характер гідрофобних взаємодій, які виникають між радикалами окремих амінокислот (лейцин, валін, фенілаланін та ін.).

Небілковий компонент гемоглобіну – гем. Основою будови гему є порфірин. Порфірин складається з чотирьох пірольних кілець, з'єднаних між собою  $\alpha$ -метиновими містками ( $-\text{CH}=\text{}$ ). У залежності від хімічної природи груп, які знаходяться в бічному ланцюзі, порфірини мають багато ізомерів. З можливих 15 ізомерів протопорфіринів найпоширенішим виявився протопорфірин IX. Він має в положеннях 4 метильні, 2 вінільні та 2 пропіонільні групи (рис. 2.2 А). Хелатний комплекс протопорфірину IX з  $\text{Fe}^{2+}$  називається протогемом IX або гемом.

Атом Феруму, що входить у структуру гема, утворює два ковалентні зв'язки з атомами Нітрогену двох пірольних кілець і два координаційні зв'язки з двома атомами Нітрогену двох інших пірольних кілець в площині протопорфіринового кільця. Крім цього, він бере участь в утворенні ще двох координаційних зв'язків, які розташовані перпендикулярно до площини протопорфіринового кільця (рис. 2.2 Б).

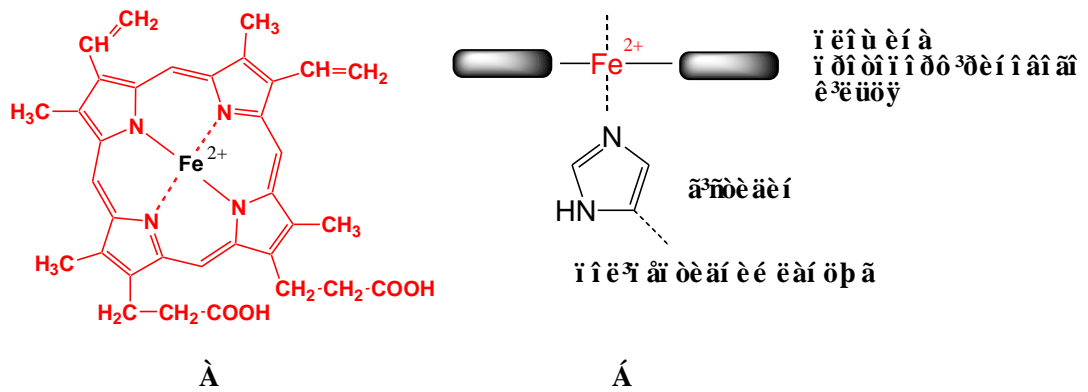


Рис. 2.2. Зв'язки атома Феруму в гемі гемоглобіну. А - вид зверху; Б - вид збоку (координаційний зв'язок над площиною кільця вільний)

П'ятий координаційний зв'язок атома Феруму забезпечує приєднання гема до залишку гістидину, який входить в поліпептидні ланцюги глобіну.

Шостий координаційний зв'язок бере участь у приєднанні до гему різних лігандів (молекули кисню, чадного газу або інших сполук). Саме використання шостого координаційного зв'язку атома Феруму гема набуває особливого значення для оборотного приєднання молекули кисню. Процес взаємодії молекули кисню з гемоглобіном можна описати у вигляді наступного рівняння (рис. 2.3):

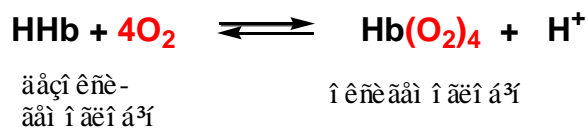


Рис. 2.3. Приєднання кисню до гемоглобіну

В результаті приєднання кисню до катіону  $\text{Fe}^{2+}$  гему утворюється *оксигемоглобін* (рис. 2.4).

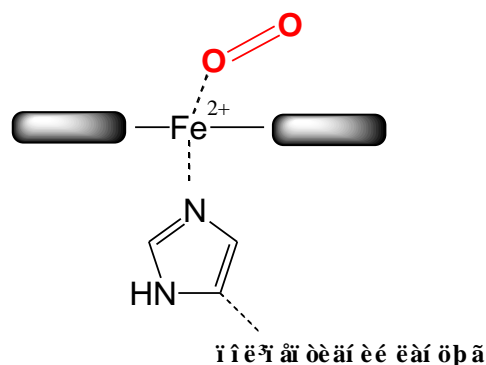


Рис. 2.4. Схема приєднання кисню до гема при утворенні оксигемоглобіну

Процес утворення оксигемоглобіну супроводжується зміною конформації його поліпептидних ланцюгів. Найбільш виражені зрушення відбуваються в області гема. У початковому стані в структурі дезоксигемоглобіну атом Феруму виступає за площину протопорфіринового кільця в бік залишку гістидину (рис. 5). При приєднанні кисню відбувається втягування атома Феруму в площину кільця. Це сприяє зміні просторової укладки поліпептидного ланцюга, пов'язаного з гемом. У результаті виникнення подібних конформаційних зрушень у молекулі оксигемоглобіну змінюється характер взаємодії поліпептидних ланцюгів один з одним. Молекула оксигемоглобіну стає більш компактною, ніж молекула дезоксигемоглобіну.

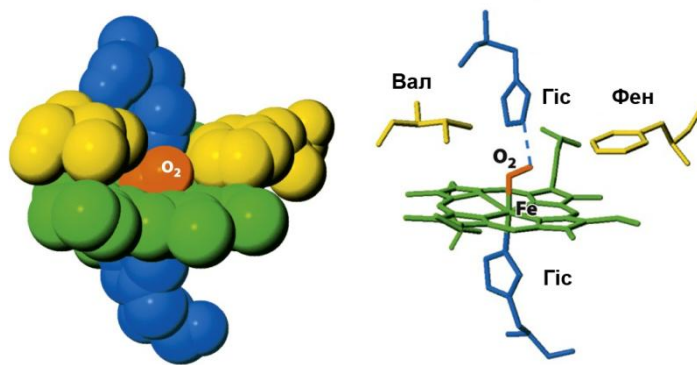


Рис. 2.5. Зміна конформації поліпептидного ланцюга гемоглобіну в результаті приєднання кисню до гему (Berg J.M. et al., 2006)

Зміна конформації поліпептидних ланцюгів при приєднанні кисню супроводжується зміною спектральних властивостей білкової молекули, а також її кольору: розчин дезоксигемоглобіну має темно-червоний, а оксигемоглобіну - яскраво-червоний колір. З цієї причини з'являються характерні відмінності в кольорі венозної (збагаченої дезоксигемоглобіном) та артеріальної (збагаченої оксигемоглобіном) крові.

Конформаційна перебудова поліпептидного ланцюга, що виникає внаслідок приєднання однієї молекули кисню до гему, сприяє різкому

підвищенню спорідненості інших трьох гемів молекули гемоглобіну до кисню, полегшуючи його зв'язування.

Процес утворення оксигемоглобіну є оборотним і знаходиться під контролем численних факторів. Особливе значення з них мають  $H^+$ ,  $CO_2$ ,  $Cl^-$  та 2,3-дифосфогліцерат. При збільшенні їх концентрації різко знижується здатність гемоглобіну зв'язувати кисень.

Оксигемоглобін являє собою нестійку сполуку, яка розпадається вже при зниженні концентрації кисню в середовищі. З цієї причини, утворення оксигемоглобіну відбувається в легневих капілярах, яким властивий високий парціальний тиск кисню. При переміщенні еритроциту з легенів в інші (периферичні) тканини внутрішніх органів, оксигемоглобін розпадається з виділенням кисню, оскільки парціальний тиск кисню в них значно менший, ніж в легенях.

Процес розпаду оксигемоглобіну зі звільненням кисню в периферичних тканинах посилюється ще й за рахунок підвищення в них концентрації  $H^+$  (нижчого, ніж в легенях рН) та збільшення вмісту вуглекислого газу. Це обумовлено інтенсивною течією в них окисно-відновних процесів, пов'язаних з тканинним диханням.

Регуляторний вплив вуглекислого газу і  $H^+$  на зв'язування та звільнення кисню гемоглобіном пояснюється ефектом Бора. В основі механізму ефекта Бора лежить існування зворотного взаємозв'язку між процесами зв'язування кисню та звільнення  $H^+$  гемоглобіном. Властивість гемоглобіну оборотно зв'язувати кисень та спрямовано транспортувати його від легень до тканин внутрішніх органів залежить від величини парціального тиску кисню ( $pO_2$ ) в навколишньому середовищі (рис. 2.6).



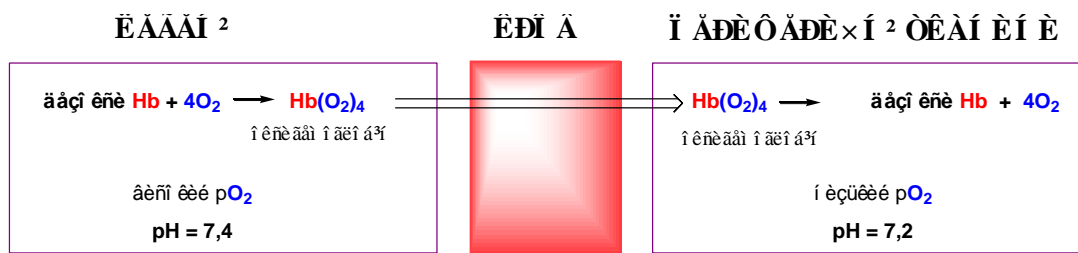
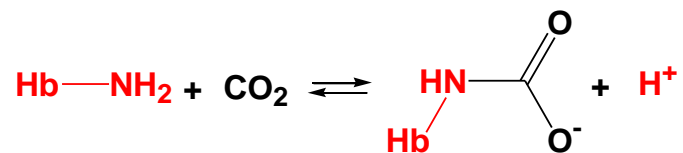


Рис. 2.6. Спрямований транспорт кисню між легенями й периферичними тканинами

Наступним похідним гемоглобіну є *карбгемоглобін*, який утворюється при взаємодії Hb із вуглекислим газом. В цій сполуці CO<sub>2</sub> приєднується не до катіону Феруму Fe<sup>2+</sup>, а до NH<sub>2</sub>-групи глобіну:



За таким способом із тканин організму до легень транспортується до 10 - 15 % CO<sub>2</sub>. Реакція зворотна - утворення карбгемоглобіну відбувається в тканинах організму, а його розпад - у легенях.

Ще одним похідним гемоглобіну є *карбоксигемоглобін* (HbCO) - сполука гемоглобіну з чадним газом. Вона більш стійка, ніж оксигемоглобін. Тому при одночасному вдиханні суміші кисню і чадного газу в крові переважно утворюється карбоксигемоглобін:



Тобто високотоксичний чадний газ має значно більшу спорідненість до гемоглобіну, ніж кисень. Реакція утворення HbCO може перебігати зворотно тільки за умов високої концентрації кисню. Якщо в повітрі міститься від 0,05 % до 1 % CO, то 95 % гемоглобіну переходить у форму HbCO. Тяжке отруєння настає навіть тоді, коли в повітрі є 0,1 % CO.

Під дією окислювачів у гемоглобіні може відбуватися окиснення катіону  $\text{Fe}^{2+}$  до катіону  $\text{Fe}^{3+}$ , що супроводжується утворенням *метгемоглобіну* (єдиний  $\text{Hb}$ , що містить катіон  $\text{Fe}^{3+}$ ). Метгемоглобін також не здатний зв'язувати і переносити кисень, тобто його фізіологічна дія аналогічна дії  $\text{CO}$ . Але незначне утворення метгемоглобіну менш небезпечне, ніж  $\text{HbCO}$ . Тому метгемоглобіноутворювачі використовують як антидоти для лікування отруєнь ціанідами. Метгемоглобін може зв'язувати до 30 % смертельної дози  $\text{HCN}$  з утворенням малотоксичної сполуки *ціанметгемоглобіну*. Сприяють утворенню метгемоглобіну метиленова синька, натрій нітрит та інші окисники, які здатні перетворювати катіон  $\text{Fe}^{2+}$  гему у катіон  $\text{Fe}^{3+}$ , що супроводжується переходом червоного забарвлення розчину у коричневе (за умов кислої реакції).

У теперішній час для виявлення отруєнь  $\text{CO}$  або метгемоглобіноутворювачами користуються спектральним аналізом крові у видимій частині елекромагнітного випромінювання. Смуги поглинання  $\text{HbO}_2$  і  $\text{HbCO}$  дуже подібні та розміщені у жовтій та зеленій частинах спектра, але при цьому у  $\text{HbCO}$  вони зміщені в бік коротких довжин хвиль. Смуга поглинання метгемоглобіну розташована в червоній частині спектра.

Крім фізіологічних типів гемоглобіну існують і аномальні  $\text{Hb}$ , які різняться або за складом ланцюгів, або за складом амінокислотних залишків у ланцюгах. Такі аномальні гемоглобіни позначають великими літерами латинського алфавіту або за місцем, де вперше був виявлений даний дефект ( $\text{HbS}$ ,  $\text{HbC}$ ,  $\text{HbM}$  тощо). Патологічні стани, що розвиваються внаслідок наявності таких форм гемоглобіну, називаються *гемоглобінози*. За механізмом виникнення молекулярного дефекту гемоглобінози поділяються на *гемоглобінопатії* та *таласемії*.

*Гемоглобінопатії* зазвичай пов'язані зі зміною первинної структури поліпептидних ланцюгів гемоглобіну (амінокислотні заміни, делеції або вставки). З аномальних типів гемоглобіну, що викликають гемоглобінопатії, найчастіше зустрічається серпоподібноклітинний гемоглобін ( $\text{HbS}$ ), який

виявлений у хворих на серпоподібноклітинну анемію. Хімічний дефект при захворюванні на серпоподібноклітинну анемію був розкритий В. Генгредом. Він полягає в заміні однієї єдиної амінокислоти, а саме глутамінової, у 6-му положенні з N-кінця  $\beta$ -ланцюгів молекули гемоглобіну на валін. Це результат мутації в молекулі ДНК, яка кодує синтез  $\beta$ -ланцюга гемоглобіну.

Інша важлива група порушень, пов'язаних з аномаліями гемоглобіну – таласемії (*гемолітична анемія*). Для них характерно утворення аномальних форм гемоглобінів за рахунок зниження швидкості синтезу  $\alpha$ -ланцюгів гемоглобіну ( $\alpha$ -таласемії) або  $\beta$ -ланцюгів ( $\beta$ -таласемії), що призводить до анемії, яка може набувати дуже важкої форми.

*Міоглобін* є білком, що міститься у складі клітин скелетної мускулатури. Його функція пов'язана з депонуванням кисню в м'язі. Дуже багаті на міоглобін скелетні м'язи морських тварин, що достатньо часу проводять під водою. Великий вміст міоглобіну дозволяє їм запасати значну кількість кисню і тим самим забезпечувати підтримку життєдіяльності при тривалому зануренні. Велика кількість міоглобіну міститься в червоних скелетних м'язах та міокарді людини.

Молекула міоглобіну складається з одного поліпептидного ланцюга, що містить 153 амінокислотні залишки, і пов'язаного з ним гема. Поліпептидний ланцюг має характерне глобулярне укладання в просторі. Гем розташований в гідрофобній щілині, яка утворюється в процесі формування третинної структури білкової частини молекули (рис. 2.7). Він приєднується до атома Нітрогену гістидинового залишку поліпептидного ланцюга. Стабілізація зв'язку простетичної групи та поліпептидного ланцюга відбувається за рахунок взаємодії між тетрапірольним кільцем гема і неполярними амінокислотними радикалами, що формують гідрофобну щілину.

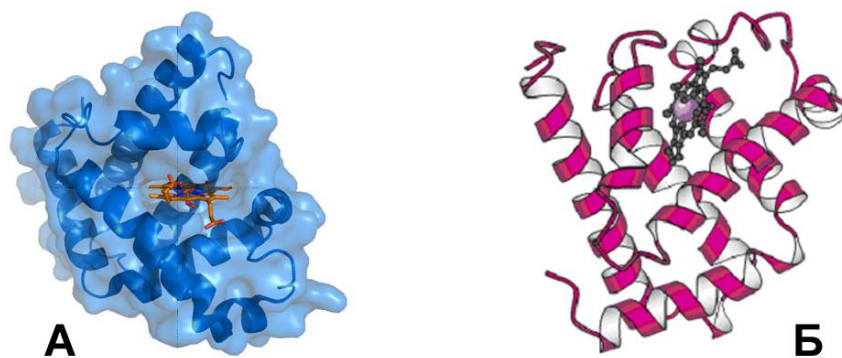


Рис. 2.7. Тривимірна структура молекули міоглобіну – А (червоним позначено положення гема в молекулі) та її модель – Б (Berg J.M. et al., 2006)

Середній вміст міоглобіну (Mb) становить 0,3% від маси тіла і підвищується у м'язовій тканині при тривалих фізичних навантаженнях. Приблизно так, як це відбувається при утворенні оксигемоглобіну, молекула кисню оборотно приєднується до міоглобіну за рахунок виникнення шостого координаційного зв'язку. При цьому утворюється оксиміоглобін (рис. 2.8).

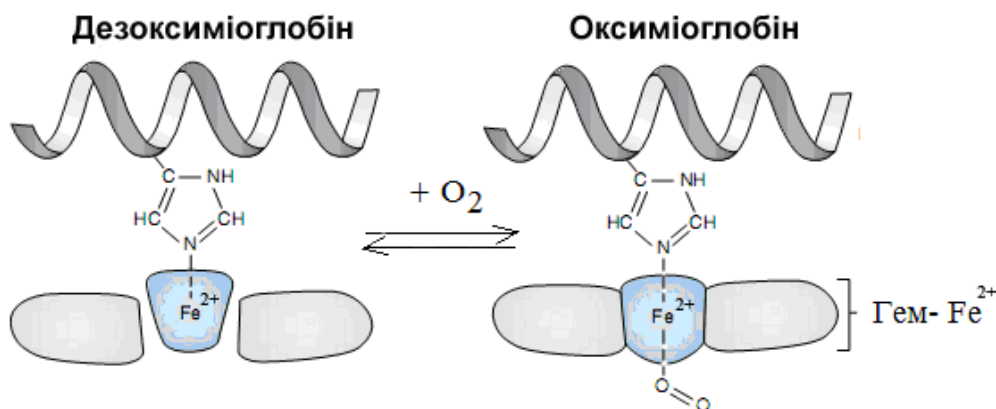


Рис. 2.8. Механізм приєднання кисню до молекули міоглобіну (Smith C. et al., 2005, зі змін.)

Міоглобін зв'язує  $O_2$  у 5 разів швидше, ніж гемоглобін і створює запас кисню у м'язах. Подібно до Hb міоглобін утворює похідні з чадним газом та

ціанідами. За рахунок міоглобіну м'язи набувають червоного кольору, а сам Mb (за даними спектральних досліджень) характеризується широкою смугою поглинання при довжині хвилі 564 нм. Кількість кисню, який зв'язується з міоглобіном («відсоток насичення»), залежить від концентрації кисню в середовищі, яке безпосередньо оточує молекулу білка (цю концентрацію виражають як  $pO_2$  – парціальний тиск кисню). В умовах кисневого голодування (наприклад, у разі великого фізичного навантаження) кисень звільняється з комплексу з міоглобіном і надходить до мітохондрій м'язових клітин, де здійснюється синтез АТФ (окисне фосфорилування).

Серед гемопротейнів особливе місце займають *цитохроми*. Вони входять до складу ланцюгів транспорту електронів мітохондрій, ендоплазматичного ретикулума та хлоропластів. Наявність у простетичній групі (гемі) цитохромів атома Феруму (що може змінювати валентність) забезпечує їх участь в транспорті електронів між окремими переносниками цих ланцюгів. Подібно міоглобіну цитохроми містять 1 молекулу гема в розрахунку на 1 поліпептидний ланцюг.

Відомо близько 30 різних цитохромів, які за спектрами поглинання поділяються на групи *a*, *b*, *c*, *d* (рис. 2.9). Всі вони є похідними протопорфірину IX. Особливості будови гема зумовлюють відмінності у прояві оптичних властивостей цитохромів та значеннях їх редокс-потенціалів. Крім структури бічних радикалів порфіринів, цитохроми відрізняються один від одного будовою білкової частини та способом приєднання гему до білків.

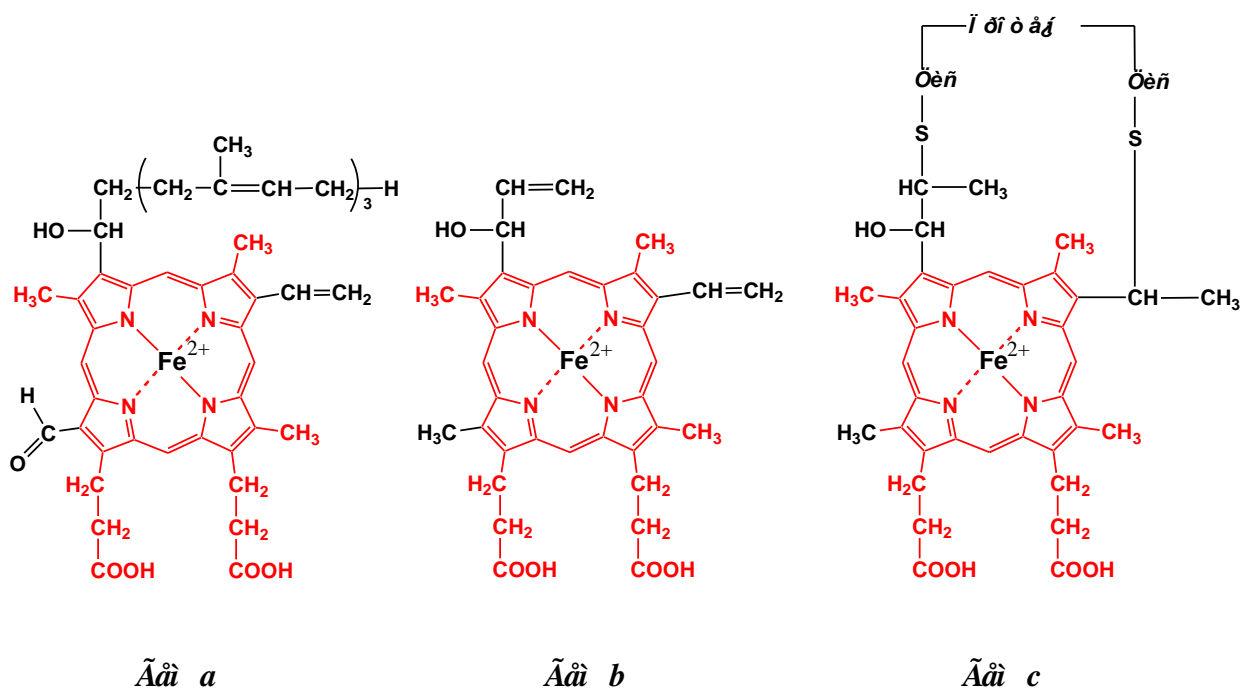


Рис. 2.9. Різновиди гему, що входить до структури цитохромів

В різних типах цитохромів гем по-різному з'єднується з поліпептидним ланцюгом. Наприклад, цитохроми типу с, на відміну від інших, містять міцно зв'язаний з апопротеїном гем. Він ковалентно приєднується за рахунок двох вінілових радикалів до сульфгидрильних груп цистеїнових залишків поліпептидного ланцюга (рис. 2.9). *Цитохром с* є компонентом дихального ланцюга мітохондрій. Нижче представлено модель цитохрому с, що створена на основі детального вивчення його третинної структури (рис. 2.10).

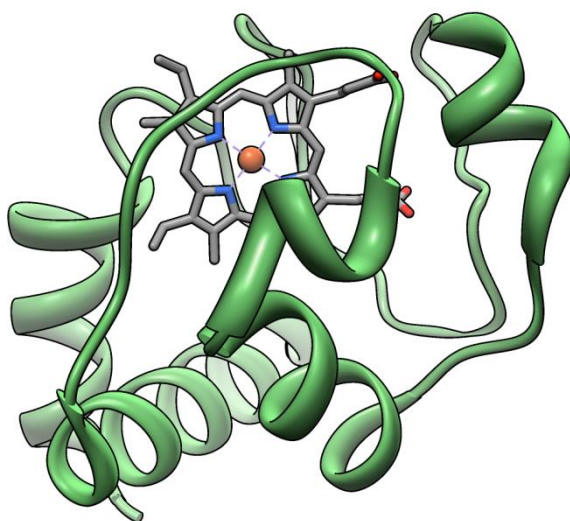


Рис. 2.10. Модель цитохрому с (Bushnell et al., 1990)

В ендоплазматичному ретикулумі печінки міститься ще один широко розповсюджений цитохром – *цитохром P<sub>450</sub>*, названий так тому, що вперше був відкритий у Філадельфії (Philadelphia), США, а комплекс його відновленої форми з СО має максимум поглинання при 450 нм. Цитохром P<sub>450</sub> містить протогем, подібний до цитохромів групи b, і бере участь у знешкодженні гідрофобних чужорідних для організму молекул (ксенобіотиків). Він є термінальним компонентом мікросомального оксигеназного ланцюга, що забезпечує окиснення ксенобіотиків. Окремі різновиди цього цитохрому задіяні у синтезі холестеролу, стероїдних гормонів та ненасичених вищих жирних кислот.

В хлоропластах рослин міститься представник цитохромів – *цитохром f*. Він має виключно рослинне походження та відіграє важливу роль у перенесенні електронів по електронотранспортному ланцюгу фотосистеми II хлоропластів.

Окрім цитохромів, гемоглобіну та міоглобіну до гемопротеїнів належать також широко розповсюджені в тваринних та рослинних організмах ферменти *каталаза* та *пероксидази*, що захищають їх від пошкоджуючої дії Гідроген пероксиду (пероксиду водню).

Каталаза являє собою один з найбільш активних ферментів, що міститься в спеціальних внутрішньоклітинних структурах – пероксисомах.

Пероксидази, на відміну від каталази, окрім пероксиду водню каталізують розпад органічних пероксидів. Вони широко розповсюджені в різноманітних внутрішньоклітинних компартментах, в т.ч. в мітохондріях та цитозолі.

Завершуючи розгляд гемопротеїнів, слід відзначити їх загальну властивість – всі вони мають характерний максимум поглинання світла у видимій ділянці спектра. За рахунок цього їх розчини набувають характерного забарвлення.

*Флавопротеїни*. Являють собою складні білки, до складу яких в якості простетичної групи входить похідне рибофлавіну – вітаміну B<sub>2</sub>. Рибофлавін

складається з трициклічної сполуки ізоалоксазину та спирту рибітолу, звідки і походить його назва (рис. 2.11).

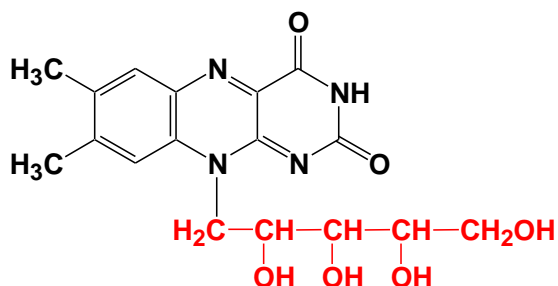


Рис. 2.11. Будова молекули рибофлавіну

Флавінова простетична група може бути представлена у вигляді ФАД (флавінаденіндинуклеотиду) чи ФМН (флавінмононуклеотиду). За допомогою ковалентних зв'язків вона приєднується до поліпептидного ланцюга білка. Залишок рибофлавіну в складі простетичної групи флавінових дегідрогеназ має властивість акцептувати та віддавати атоми Гідрогену. З цієї причини флавінові дегідрогенази беруть участь у багатьох окисно-відновних процесах в клітині. Усі флавінові коферменти в окисненій формі забарвлені в жовто-оранжевий колір та мають характерні смуги поглинання з максимумом у ділянках 370 та 450 нм.

Велика кількість флавінових дегідрогеназ є мембранозв'язаними білками. Вони приймають участь у транспорті електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій та електронотранспортному ланцюгу ендоплазматичного ретикулума (НАДН-дегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа, НАДФН-залежний флавопротеїн мікросомального оксигеназного ланцюга та ін.).

Слід зазначити, що флавопротеїни являють собою дуже складно побудовані молекули білків. Окрім флавінової групи, вони містять й інші небілкові компоненти. Так, до структури сукцинатдегідрогенази додатково входять ще 3 FeS-центри та гем типу *b*. На рис. 2.12 представлено структуру молекули сукцинатдегідрогенази. Поряд із мембранозв'язаними



зустрічаються також і розчинні флавінові дегідрогенази. Вони локалізуються в цитоплазмі клітин. До них належить широко розповсюджений фермент ксантинооксидаза (див. далі), яка містить атом Молібдену, що входить до складу молібденоптерину.

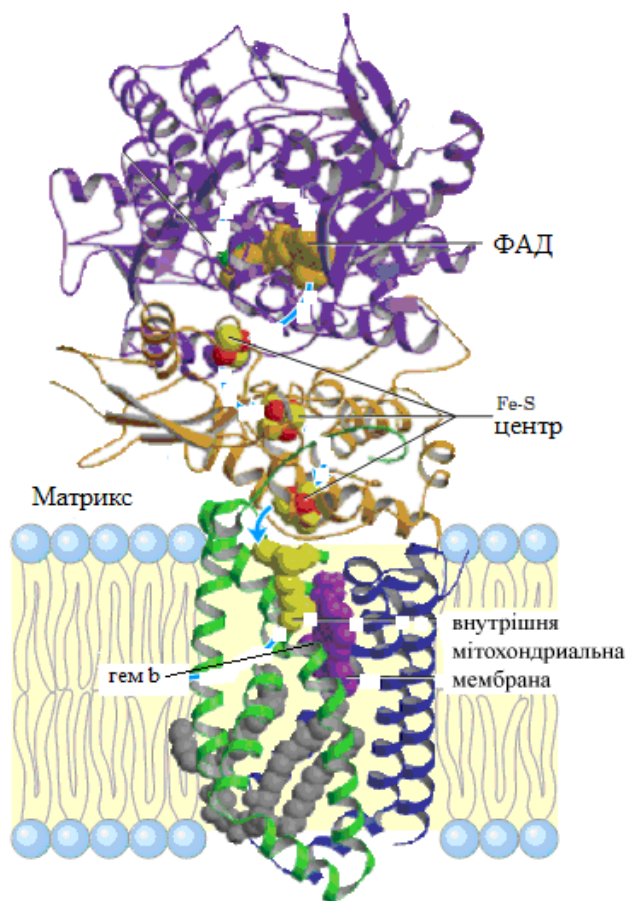


Рис. 2.12. Сукцинатдегідрогеназа мітохондрій. Молекула складається з 4 субодиниць: двох, що вбудовані у внутрішню мітохондріальну мембрану та двох, що звернені до мітохондріального матриксу. В якості небілкових компонентів до сукцинатдегідрогенази входять: флавінова простетична група – ФАД, 3 FeS- центри й гем типу *b* (Nelson D.L., Cox M.M., 2004)

*Родопсини* - складні білки, у яких апопротеїн (опсин) зв'язаний з простетичною групою, що представлена *цис*-ізомером ретиналю (альдегідної форми вітаміну А) (рис. 2.13 та 2.14):

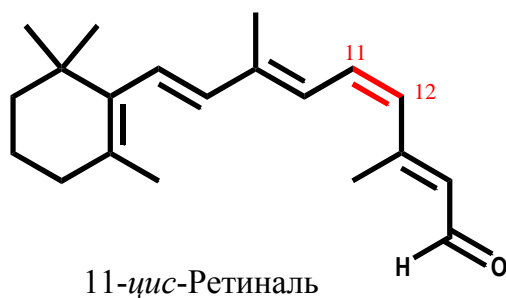


Рис. 2.13. Структура 11-*цис*-ретиналю

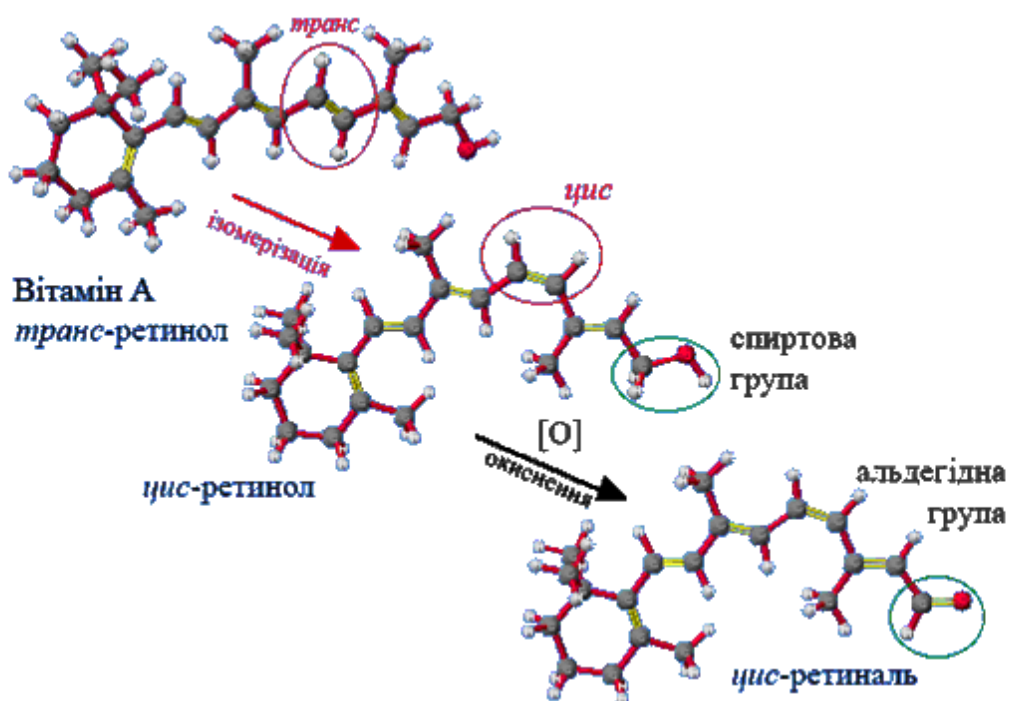


Рис. 2.14. Утворення 11-*цис*-ретиналю з вітаміну А

Простетична група приєднується до залишку лізину поліпептидного ланцюга опсину, утворюючи при цьому сполуку типу шиффової основи (рис. 2.15).

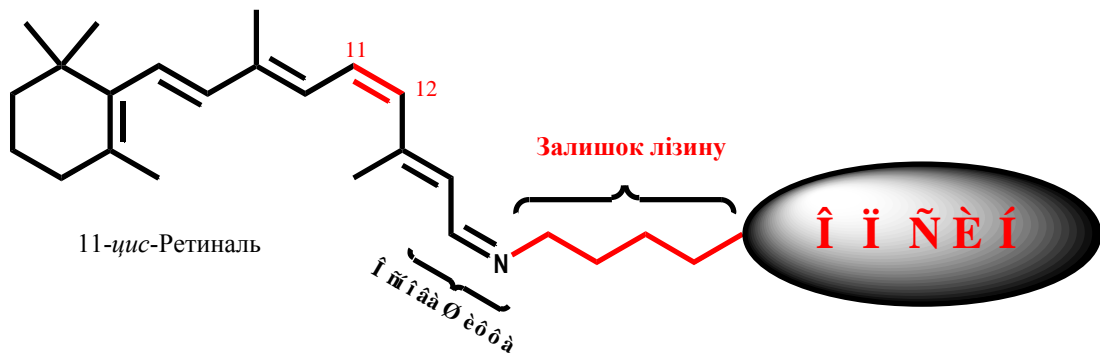


Рис. 2.15. Сполучення 11-*цис*-ретиналя з лізиновим залишком опсину шляхом утворення шиффової основи

Сітківка ока людини містить рецепторні клітини двох типів – палички та колбочки. *Палички* відрізняються великою світлочутливістю, призначені для зору при малій освітленості (забезпечують сутінковий та нічний зір), і дають чорно-білу картину. *Колбочки* забезпечують кольоровий і денний зір. В паличках молекула родопсину жорстко вбудована в мембрану диску фоточутливих клітин сітківки ока. Поліпептидний ланцюг опсину укладено таким чином, що він утворює 7 спіральних фрагментів, які наскрізь перетинають мембрану. При цьому залишок ретиналю опиняється в товщі мембрани (рис. 2.16).

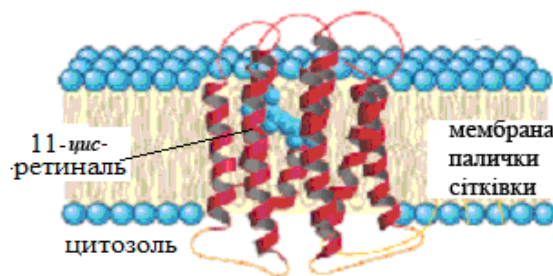


Рис. 2.16. Розташування родопсину в мембрані палички сітківки ока. З центральною частиною опсину в товщі мембрани зв'язаний залишок 11-*цис*-ретиналю (Nelson D.L., Cox M.M., 2004)

Під впливом кванту світла видимої ділянки спектру відбувається ізомеризація 11-*цис*-ретиналю в *транс*-ретиналь. Шиффова основа лізину з даним ізомером ретиналю існувати не може. Тому родопсин розкладається на

вільний опсин та *транс*-ретиналь, що зумовлює його участь в процесі світлосприйняття. Родопсин забарвлений у червоний колір, який йому надає *цис*-ретиналь. При освітленні родопсин знебарвлюється, оскільки утворюється *транс*-ретиналь (безбарвна сполука).

В спеціальних фоточутливих клітинах сітківки ока - колбочках, які забезпечують процес кольорового зору, присутні 3 ізомерні форми родопсину. Вони є продуктами експресії різних генів і тому відрізняються один від одного за первинною структурою поліпептидного ланцюга. Їх характерною властивістю є відмінності в максимумі спектру поглинання компонентів видимого світла – синього, зеленого та червоного (рис. 2.17).

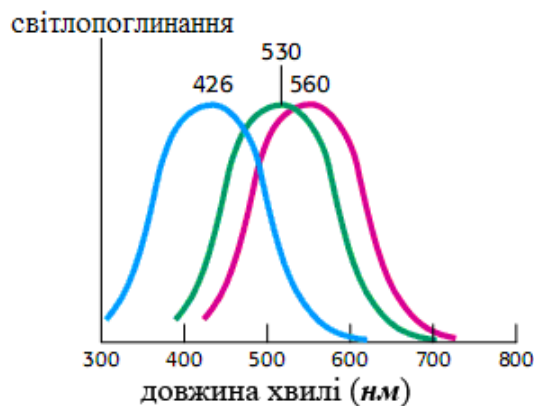


Рис. 2.17. Спектр поглинання трьох різних ізоформ родопсинів колбочок сітківки ока

Відмінності в максимумі спектру поглинання дозволяють ізомерним формам родопсину розкладатися під впливом кванту світла із різною довжиною хвилі, що й лежить в основі процесу кольорового світлосприйняття.

*Магній-порфірин* (хлорофіл) – світлочутливий пігмент, який забезпечує фотосинтезуючу активність рослин (див. Фотосинтез).

## Глікопротеїни

До глікопротеїнів належать складні білки, що містять у своїй структурі міцно пов'язані залишки вуглеводів. Усі глікопротеїни поділяються на дві групи:

- *власне глікопротеїни* (містять до 4 % вуглеводних компонентів);
- *протеоглікани* (колишня назва мукопротеїни – містять до 90 - 95 % і більше вуглеводних компонентів).

Глікопротеїни являють собою одну з найбільш поширених в живих організмах груп складних білків. До них належать деякі гормони, велика кількість мембранозв'язаних білків, а також розчинні внутрішньоклітинні білки, що знаходяться в цитоплазмі, матриксі мітохондрій, нуклеоплазмі та ін. Окремі фактори транскрипції, фактори росту (*еритропоетин*) та гормони (*тиреотропний, фолікулостимулюючий, лютеїнізуючий*) виявляють функціональні властивості тільки у формі глікопротеїнів. Більшість білків крові також являє собою глікопротеїни і серед них *імуноглобуліни*, окремі *фактори згортання крові* тощо. Глікопротеїни шлунково-кишкового тракту (*муцини*) є основою різних слизів і виконують захисну функцію, послабляючи механічне та хімічне подразнення клітин травного тракту різними факторами, що потрапляють із поживними речовинами. До біологічно активних глікопротеїнів відносяться *інтерферони*, які синтезуються в клітинах у відповідь на збудження екзогенним стимулятором; вони наділені противірусними й протипухлинними властивостями та мають клітинно- й імунорегуляторну дію.

Вуглеводний компонент глікопротеїнів може бути представлений окремими моносахаридними або олігосахаридними залишками, які мають лінійну або розгалужену структуру (рис. 2.18); при цьому, у молекулі глікопротеїну часто міститься не один, а відразу кілька олігосахаридних залишків.

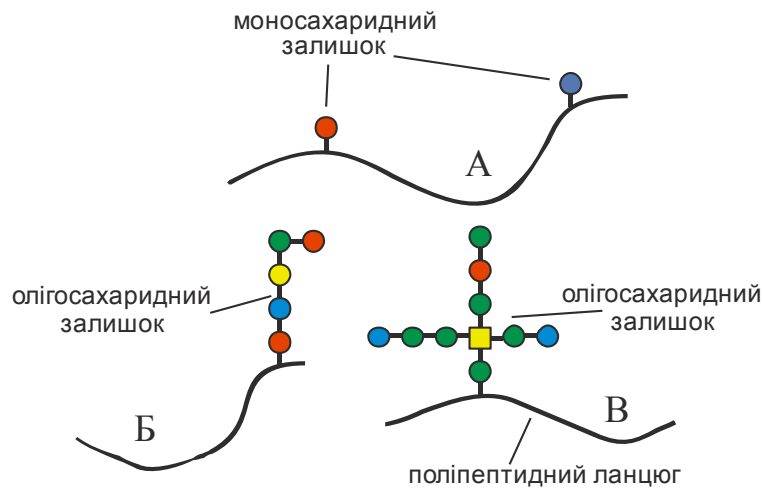


Рис. 2.18. Різновиди вуглеводних компонентів, що зустрічаються в глікопротеїнах (А – окремі моносахаридні залишки; Б – лінійний олігосахарид; В – розгалужений олігосахарид)

На рис. 2.19 схематично представлена структура молекули ферменту підшлункової залози - *еластази*, яка містить у своєму складі два олігосахаридних ланцюга.

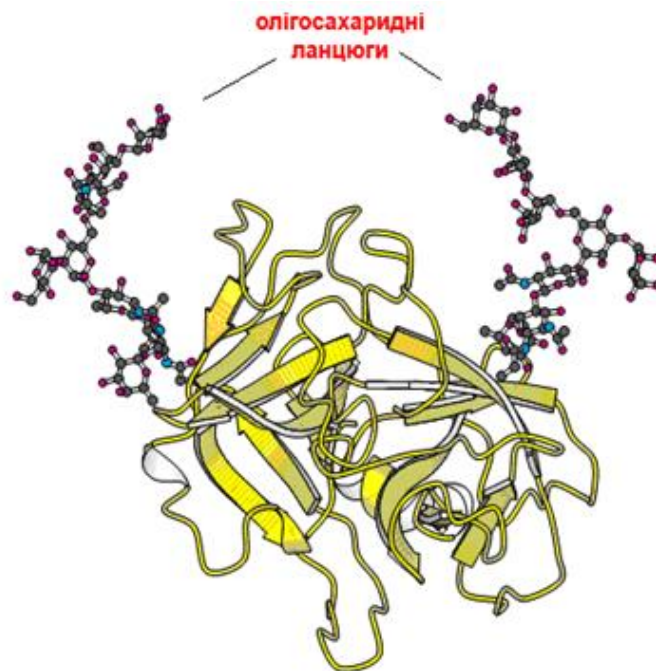


Рис. 2.19. Модель молекули еластази (BergJ.M. et al., 2006)

До складу вуглеводного компонента глікопротеїнів найчастіше входять моносахаридні залишки глюкози, галактози, манози, фукози, N-ацетилгалактозаміну, N-ацетилглюкозаміну, а також похідні нейрамінової кислоти. Зв'язок між простетичною групою і апопротеїном в різних глікопротеїнах здійснюється через одну з трьох амінокислот: аспарагін, серин, треонін.

Існує два основних типи зв'язку між вуглеводним та білковим компонентами у глікопротеїнах. До першого з них належить O-глікозидний, а до другого – N-глікозидний зв'язок відповідно. Переважним типом зв'язку вуглеводного компонента з білковою частиною є N-глікозидний. Він виникає між C<sup>1</sup>-ОН радикалом моносахаридного залишку та аміногрупою бокового ланцюга аспарагіну (рис. 2.20):

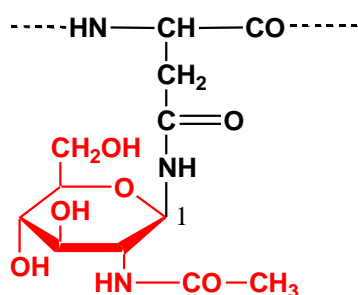


Рис. 20. N-глікозидний зв'язок між N-ацетилглюкозаміном та залишком аспарагіну, що включений до поліпептидного ланцюгу білка

У формуванні O-глікозидного зв'язку між вуглеводом та білком, як правило, беруть участь включені в поліпептидний ланцюг залишки серину (рис. 2.21). Приєднання вуглеводного компонента за допомогою цього типу зв'язку може відбуватися також із залишком треоніну, а в деяких білках - із залишком нестандартної амінокислоти гідроксипроліну.

Включення вуглеводного компонента до складу білка зумовлює зміну конформації його поліпептидного ланцюга, за рахунок чого він набуває нових властивостей. З одного боку, білок стає стійкішим до гідролітичної дії протеолітичних ферментів, а з другого - набуває можливості специфічної взаємодії з іншими білками і сигнальними молекулами різного роду. Останнє

визначається інформацією, що закладена в самій структурі олігосахаридних ланцюгів.

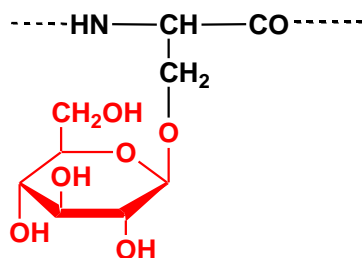


Рис. 2.21. O-глікозидний зв'язок між глюкозою та залишком серину, що включений до поліпептидного ланцюга білка.

Оскільки глікопротеїни мають здатність специфічно приєднувати сигнальні молекули, вони відіграють важливу роль у процесі обміну інформацією між клітиною і зовнішнім середовищем. У зв'язку з цим глікопротеїни входять до складу рецепторів, розташованих на зовнішній поверхні клітинної мембрани (плазмалемі). Крім того, вони формують особливе гіллясте утворення на клітинній мембрані - глікокалікс, яке відіграє важливу роль у забезпеченні міжклітинних взаємодій, адгезії клітин та транспорті в клітину катіонів.

Одним з найбільш вивчених мембранних глікопротеїнів є *глікофорин А*, що у значних кількостях міститься в мембрані еритроцитів. Близько 60% маси глікофорину А становить вуглеводний компонент. Амінокислоти з гідрофобними радикалами пронизують товщу мембрани. Гідрофільна частина поліпептидного ланцюга, що містить олігосахаридні залишки, знаходиться зовні мембрани. У структурі цього білка 16 олігосахаридних ланцюгів, що містять в цілому близько 70 моносахаридних залишків. Сполучення 15 із 16 олігосахаридних ланцюгів з поліпептидним ланцюгом апобілку здійснюється за допомогою O-глікозидного зв'язку і лише 1-го - за допомогою N-глікозидного зв'язку (рис. 2.22).



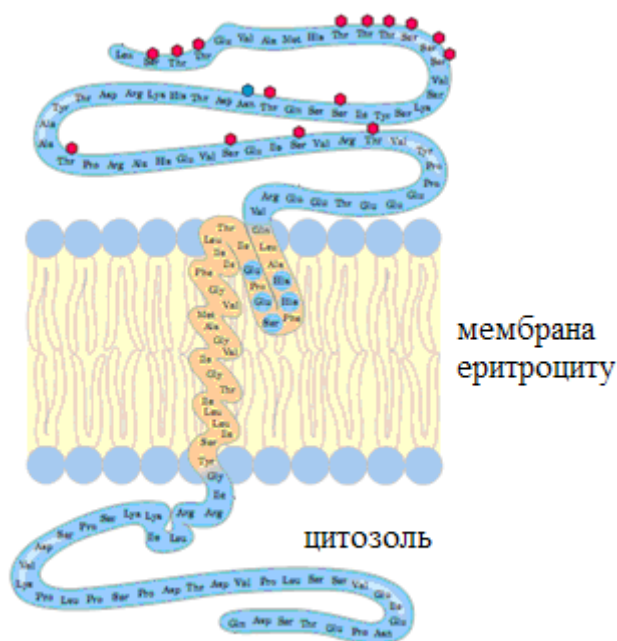


Рис. 2.22. Схема будови глікофोरину А та його розташування в мембрані еритроцитів. Червоним кольором позначені олігосахаридні залишки, що сполучені з поліпептидним ланцюгом О-глікозидним зв'язком, синім - N-глікозидним зв'язком (Nelson D.L., Cox M.M., 2004, зі змін.)

До складу олігосахаридних ланцюгів глікофोरину А входить велика кількість сіалової кислоти, яка при рН крові існує у вигляді аніону. Внаслідок цього, негативного заряду набуває і вся гідрофільна частина поліпептидного ланцюга, що розташована над поверхнею еритроциту. Численні молекули глікофोरину А надають всій мембрані еритроциту значний негативний заряд, що попереджає адгезію еритроциту з іншими клітинами крові та клітинами стінки кровоносних судин.

До представників складних білків, що містять у своєму складі вуглеводний компонент (крім глікопротеїнів), належать ще й протеоглікани. Слід зауважити, що ці білки істотно відрізняються один від одного за будовою, функціями та локалізацією в організмі тварин.

Як було зазначено вище, на частку вуглеводного компонента в протеогліканах може припадати до 95% від загальної маси молекули. На відміну від глікопротеїнів, простетична група яких представлена

олігосахаридами, до складу протеогліканів входять глікозаміноглікани (кислі мукополісахариди), що являють собою розгалужені гетерополісахариди.

Молекула глікозаміногліканів утворена дисахаридними залишками, що повторюються. До їх складу, зазвичай, входять похідні аміногексоз (D-глюкозамін або D-галактозамін) та уронові кислоти (глюкуронова кислота, галактуронова кислота тощо). Наявність великої кількості уронових кислот в глікозаміногліканах надає їм кислі властивості та обумовлює появу вираженого негативного заряду на молекулі. До найбільш поширених глікозаміногліканів, що входять до складу протеогліканів, відносяться гіалуронова та хондроїтинсульфатна кислоти, кератансульфати, гепарин та ін. (рис.2.23).

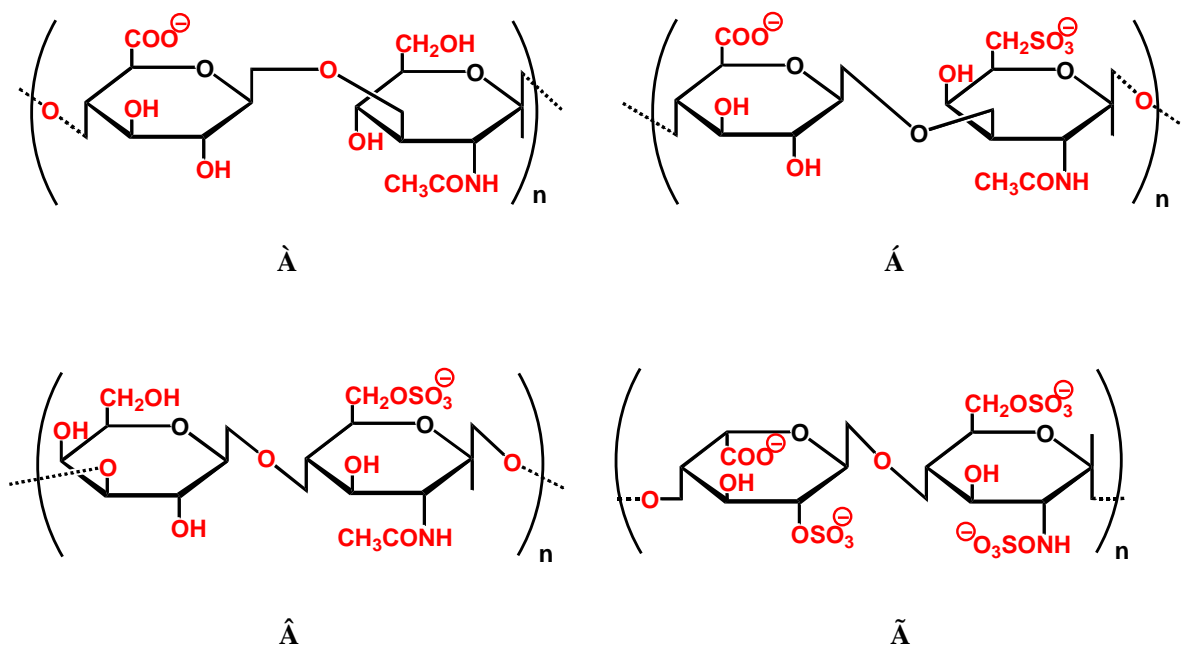


Рис. 2.23. Структура глікозаміногліканів: гіалуронова кислота (А), хондроїтин-6-сульфатна кислота (Б), кератансульфат II (В) та гепарин (Г)

Приєднання глікозаміногліканів до поліпептидних ланцюгів забезпечується за рахунок міцних ковалентних N- і O-глікозидних зв'язків. При цьому O-глікозидний зв'язок виникає між залишками ксилуози або N-ацетилгалактозаміну та серином поліпептидних ланцюгів. N-глікозидний зв'язок у протеогліканів формується між залишками N-ацетилглюкозаміну та

амідною групою аспарагіну. У сполученні глікозаміноглікану з білком, як правило, бере участь специфічний трисахаридний компонент, що містить два залишки галактози і один залишок ксилуози (рис. 2.24).

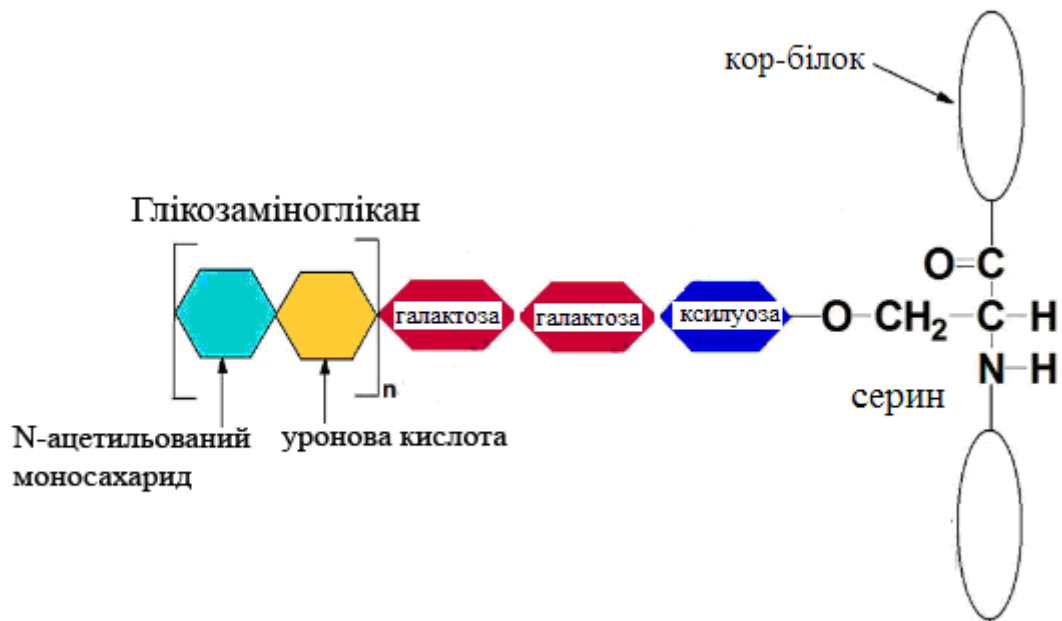


Рис. 2.24. Приєднання глікозаміноглікану через трисахаридний залишок до серину, включеному до складу поліпептидного ланцюга

Як було зазначено вище, молекула протеоглікану має складну гіллясту структуру. Типова молекула протеоглікану складається з центрального поліпептидного ланцюга – кору (від англ. *core* – серцевина, ядро), до якого приєднані різні глікозаміноглікани, переважно хондроїтинсульфати, кератансульфати (рис. 2.25 А). Далі, за умов взаємодії в міжклітинному матриці сполучної тканини, утворюються складні протеогліканові комплекси з молекулою гіалуронової кислоти посередені та бічними ланцюгами протеогліканів («ялинка з ялинок»). Встановлено, що з однією молекулою гіалуронової кислоти може сполучатися до 150 молекул сульфатованих протеогліканів (рис. 2.25 Б).

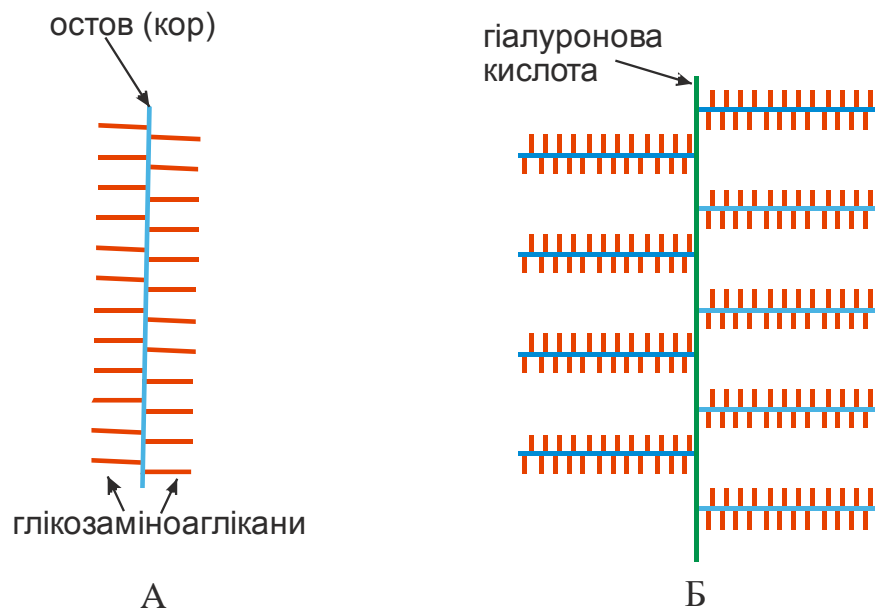


Рис. 2.25. Будова протеоглікану (А) та фрагмент комплексу гіалуронової кислоти з протеогліканами (Б)

Глікозаміногліканові компоненти протеогліканів (як полівалентні аніони) зв'язують значну кількість екстрацелюлярного  $\text{Na}^+$  та, відповідно,  $\text{H}_2\text{O}$ , що зумовлює механізм участі тканинних протеогліканів у регуляції водно-сольового обміну.

Протеоглікани мають тваринне походження. Більша їх частина розташована в матриксі міжклітинної речовини. Невелика кількість може бути пов'язана із зовнішньою поверхнею клітинних мембран. Протеоглікани, які пов'язані з клітинними мембранами, відіграють важливу роль в адгезії клітин, а також приймають участь у передачі інформації до клітини ззовні. На теперішній час встановлено, що окремі протеоглікани виступають у ролі рецепторів; беруть участь у транспорті макромолекул (антитромбіну) і навіть надмолекулярних сполук (ліпопротеїнів плазми крові).

### Ліпопротеїни

До ліпопротеїнів належать складні білки, у яких в якості небілкового компоненту виступають різноманітні ліпіди (вищі жирні кислоти,

фосфоліпіди, похідні ізопрену тощо). Найбільше значення в біохімії мають ліпопротеїни, в складі яких ліпіди знаходяться в плазмі крові людини, та ліпопротеїни, що є інтегральними компонентами біологічних мембран.

Наявність у молекулі складного білка гідрофобного (ліпідного) компонента забезпечує можливість його вбудовування в ліпідний бішар клітинних мембран. До складу ліпопротеїнів мембран часто входять залишки пальмітинової або міристинової кислот. У деяких випадках обидві жирні кислоти одночасно включаються до складу одного білка. До подібних ліпопротеїнів відноситься фермент індукцибельна NO-синтаза.

Залишок міристинової кислоти зазвичай приєднується до вільної аміногрупи N-кінцевої амінокислоти поліпептидного ланцюга білка (рис. 2.26). На відміну від міристинової, пальмітинова кислота приєднується до поліпептидного ланцюга шляхом утворення тіоестерного зв'язку із залишком цистеїну. Таким чином, залишок пальмітинової кислоти входить до складу білка рецептора трансферину (рис. 2.26).

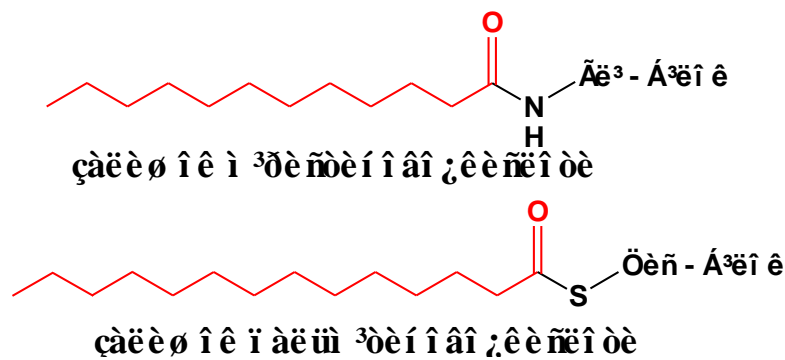


Рис. 2.26. Приєднання залишку міристинової та пальмітинової кислот до поліпептидного ланцюга ліпопротеїну

Зазвичай у структурі ліпопротеїнів виявляються похідні ізопрену, до яких, зокрема, належить лінійний терпен фарнезил (рис. 2.27). Ізопреноїди вбудовуються до складу молекули ліпопротеїну за рахунок утворення

тіоестерного зв'язку із залишком цистеїну, що розташований з С-кінця поліпептидного ланцюга.

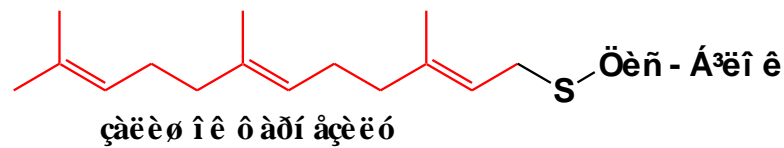


Рис. 2.27. Приєднання залишку фарнезилу до поліпептидного ланцюга ліпопротеїну

До складу деяких ліпопротеїнів входить залишок фосфоліпиду - фосфатидилінозитулу. Він сполучається з поліпептидним ланцюгом в ділянці її С-кінця, за рахунок послідовного зв'язування з N-ацетилглюкозаміном, трьома залишками манози та фосфатоетаноламіном (рис. 2.28). Подібна гліколіпідна структура утворює своєрідний якір ліпопротеїну, який жорстко фіксує його в ліпідному бішарі клітинної мембрани. В такому стані білок виявляється на її зовнішній (екстраклітинній) поверхні. Представниками подібних ліпопротеїнів є ферменти: лужна фосфатаза та 5'-нуклеотидаза.



Рис. 2.28. Схема будови молекули ліпопротеїну, що містить в складі залишок фосфатоетаноламіну (GN - N-ацетилглюкозамін, M3 - три послідовно зв'язаних залишки манози, I - залишок інозитулу)

Як вже зазначалося раніше, у більшості своїй ліпопротеїни є мембранозв'язаними білками. Ліпідний компонент дозволяє їм жорстко вбудовуватися в гідрофобний шар мембрани і тому виконувати характерну для них функцію в безпосередній близькості від неї (рис. 2.29). Зв'язування

білка з мембраною збільшує його локальну концентрацію в клітині і підвищує ефективність взаємодії з іншими мембранними білками й субстратами.

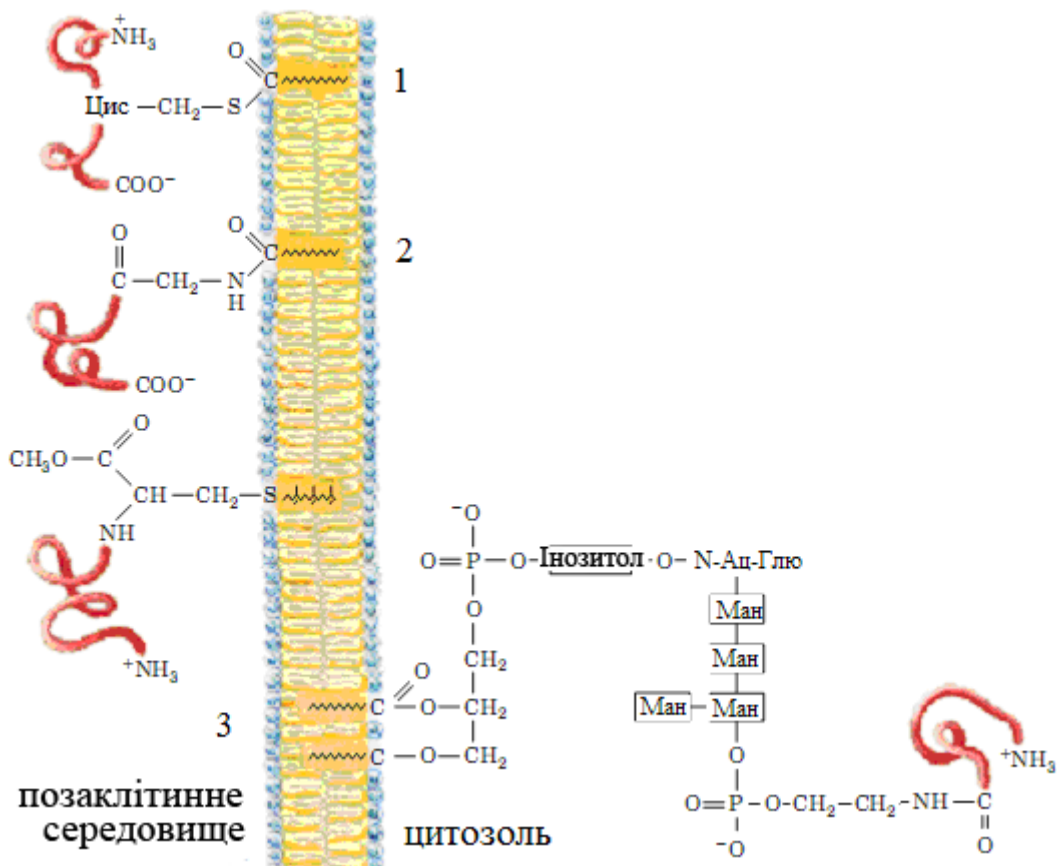


Рис. 2.29. Топографія різних типів ліпопротеїнів в клітинній мембрані. Ліпопротеїни, що містять в структурі: 1 – міристинову кислоту; 2 – пальмітинову кислоту; 3 – фосфатидилінозитол (за Nelson D.L., Cox M.M., 2004)

У наш час активно створюються лікарські засоби, які здатні модифікувати ліпопротеїни та тим самим пригнічувати можливість їхнього приєднання до клітинних мембран. Наприклад, при введенні до організму 2-гідроксиміристинової або 2-бромпальмітинової кислот відбувається глибока зміна обміну речовин в клітинах, у зв'язку з чим представляється перспективним їх використання для лікування онкологічних захворювань.

До ліпопротеїнів належать також ліпопротеїни плазми крові, які є надмолекулярними сферичними частинками, що складаються з білків і

ліпідів. Між компонентами ліпопротеїнів крові відсутні міцні ковалентні зв'язки. Взаємозв'язок між білками й ліпідами в них забезпечується за рахунок сил слабких взаємодій – переважно гідрофобних, водневих та ван-дер-ваальсових зв'язків.

Значення ліпопротеїнів крові полягає в тому, що вони забезпечують транспорт гідрофобних молекул (ліпідів) в організмі людини і тварин. Як відомо, ліпіди нездатні розчинятись у полярних розчинниках і, в тому числі, в плазмі крові. Тому їх перенесення в крові можливо тільки в складі переносників - ліпопротеїнів.

Ліпопротеїнова частка має міцелярну структуру. Вона складається з гідрофільної оболонки та гідрофобного ядра (рис. 2.30).

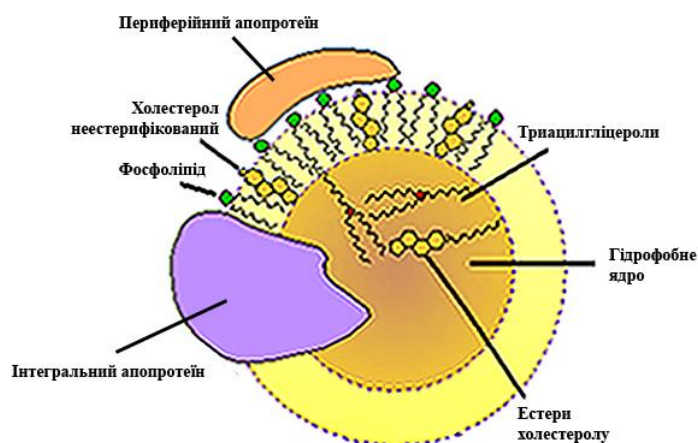


Рис. 2.30. Схема будови ліпопротеїнів плазми крові (Губський Ю.І., 2007)

До складу гідрофільної оболонки входять білкові молекули (апопротеїни), а також полярні групи окремих ліпідів - фосfolіпідів і холестеролу. Гідрофільна оболонка ліпопротеїнової частинки знаходиться в контакті з водою. Гідрофобне ядро утворене неполярними ліпідними молекулами - тригліцеролами, естерами холестеролу, а також неполярними функціональними групами фосfolіпідів і холестеролу. На відміну від гідрофільної оболонки, гідрофобне ядро повністю ізольовано від контакту з полярними молекулами води. За рахунок цього формується стійка у воді



частинка, що має форму міцели. У її складі гідрофобні ліпідні молекули транспортуються по крові.

Ліпопротеїнові частки відрізняються одна від одної за співвідношенням ліпідів і білків, що входять до їх складу. З цієї причини вони розрізняються за щільністю та величиною електричного заряду.

За щільністю ліпопротеїни крові розподіляються на такі основні класи:

- ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ);
- ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ);
- ліпопротеїни проміжної щільності (ЛППЩ);
- ліпопротеїни дуже низької щільності (ЛПДНЩ);
- хіломікрони.

Нижче в таблиці 2.1 наведені відомості щодо щільності, а також ліпідного та білкового складу основних класів ліпопротеїнів крові:

*Таблиця 2.1*

### Компонентний склад ліпопротеїнів

Клас ліпопротеїнів	Щільність (г/см <sup>3</sup> )	Вміст білка (%)	Вміст ліпідів (%)			
			ХЛ	ЗХЛ	ФЛ	ТАГ
ЛПВЩ	1,06 – 1,21	50	3 – 4	16	20 – 30	3 - 10
ЛПНЩ	1,02 – 1,06	20 – 25	8	35 – 40	15 – 20	7 - 10
ЛППЩ	1,01 – 1,02	15 - 20	8	25 - 30	23	25 - 30
ЛПДНЩ	0,95 – 1,01	5 – 10	5 – 10	10 – 15	15 – 20	55 – 65
Хіломікрони	<0,95	1,5 – 2,5	2 – 3	3 – 5	7 – 9	85 – 90

Примітка: ХЛ – вільний холестерол, ЗХЛ – зв'язаний холестерол, ФЛ – фосфоліпиди, ТАГ – триацилгліцероли.

Ліпопротеїни різняться також за електрофоретичною рухливістю: при рН 8,6 хіломікрони залишаються на місці нанесення, ЛПДНЩ мігрують попереду фракції β-глобулінів сироватки крові, ЛПНЩ – разом з β-глобулінами, ЛПВЩ – з α-глобулінами.

Різні класи ліпопротеїнів крові переважно забезпечують транспорт окремих ліпідів в організмі людини та тварин.

Розвиток цілого ряду серцево-судинних захворювань (ішемічної хвороби серця, атеросклерозу тощо) супроводжується зміною ліпопротеїнового складу крові. Тому його вивчення відіграє важливу роль в діагностиці цих захворювань.

## Нуклеопротейни

До нуклеопротейнів належать складні білки, у яких в якості небілкового компонента виступають нуклеїнові кислоти. В залежності від типу нуклеїнової кислоти, всі вони поділяються на:

- рибонуклеопротейни;
- дезоксирибонуклеопротейни.

Нуклеопротейни широко розповсюджені в клітині. Переважними місцями їх локалізації є ядро, цитоплазма та мітохондрії. Роль нуклеопротейнів зумовлюється функцією їх складових компонентів, тобто білків і нуклеїнових кислот, а саме: поділ клітин, синтез білка, збереження та передача спадкової інформації.

Назва нуклеопротейнів походить від лат. *nucleus*(ядро). Уперше вони були виділені Ф. Мішером у 1872 р. з ядер лейкоцитів.

Сполучення між нуклеїновою кислотою та білком відбувається за допомогою нековалентних зв'язків. Воно забезпечується електростатичними взаємодіями між негативно зарядженими молекулами нуклеїнових кислот та позитивно зарядженими молекулами білків.

Негативний заряд нуклеїнової кислоти зумовлюється великою кількістю залишків ортофосфатної кислоти, які формують каркасмолекули.

Білковий компонент нуклеопротейнів у людини та тварин переважно представлений гістонами та протамінами (лужні білки з  $pH_i = 10$ ). Характерною особливістю їх будови є присутність в поліпептидних

ланцюгах великої кількості діаміномонокарбонових кислот, до числа яких належить аргінін та лізин. Частка цих амінокислот може сягати до 25 % від маси білка.

Особливе значення серед простих білків, що входять до складу дезоксирибонуклеопротейнів, належить гістонам. В клітинах зустрічається 5 класів цих білків. Їх представники відрізняються один від одного за вмістом амінокислотних залишків аргініну й лізину та локалізацією в нуклеосомі (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

### Гістони ядерного хроматину

Тип	Молекулярна маса, кДа	Вміст лізину, %	Вміст аргініну, %	Локалізація в нуклеосомі
H <sub>1</sub>	21,0	29	1,5	Інтерлінкерна ДНК
H <sub>2A</sub>	14,5	11	9,5	Кор нуклеосоми
H <sub>2B</sub>	13,7	16	6,5	Кор нуклеосоми
H <sub>3</sub>	15,3	10	13,5	Кор нуклеосоми
H <sub>4</sub>	11,3	11	14,0	Кор нуклеосоми

При фізіологічних значеннях рН внутрішньоклітинного середовища радикали лізину та аргініну акцептують протон та набувають позитивного заряду. Внаслідок цього значного позитивного заряду набуває вся молекула гістону в цілому.

В інтерфазних клітинах, що не діляться, дезоксирибонуклеопротейни утворюють особливу ядерну субстанцію – *хроматин*, який містить близько 60 % білка, 35 % ДНК та 5 % РНК. Хроматин представлений хроматиновими волокнами, що утворюють особливі структури – нуклеосоми. Нуклеосоми мають форму намиста. При їх формуванні нуклеїнова кислота обмотує комплекси з 8 різноманітних гістонів - по 2 молекули гістонів H<sub>2A</sub>, H<sub>2B</sub>, H<sub>3</sub> і H<sub>4</sub>, які формують ядро нуклеосоми – нуклеосомний кор. На цей кор майже двічі (1,75 витка) щільно намотана подвійна спіраль ДНК, довжиною близько 150 нуклеотидних пар. Між нуклеосомами розташовується лінкерна

ділянка ДНК, довжиною до 50 нуклеотидних пар, яка пов'язана з гістоном  $H_1$ , що захищає ці ланки від дії нуклеаз. Утворення нуклеосом дозволяє щільно упакувати надзвичайно довгу молекулу ДНК всередині ядра клітини (рис. 2.31).

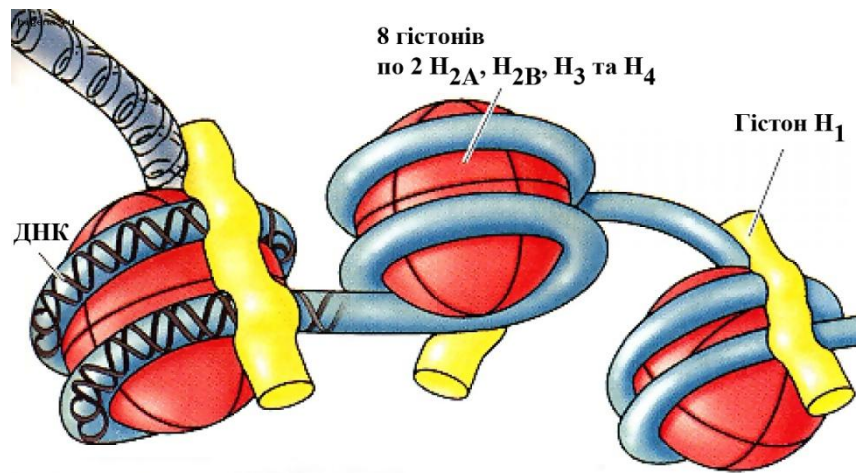


Рис. 2.31. Будова нуклеосоми (The Columbia Electronic Encyclopedia, 6th ed., 2008)

В клітинних ядрах, що діляться, дезоксирибонуклеопротейни утворюють особливі структури - *хромосоми* (рис. 2.32).

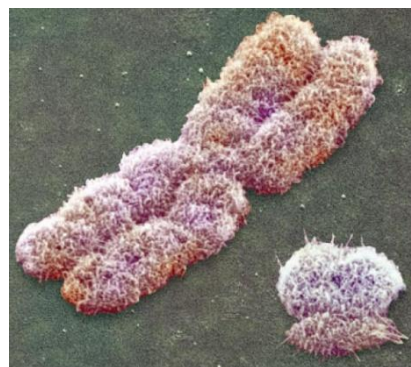


Рис. 2.32. Вид X та Y-хромосоми в світловий мікроскоп (Huntington F. Willard, 2003)

До складу хромосоми входять гістони та негістонові основні білки, а також одна дволанцюгова молекула ДНК. До ядра клітини кожного виду

живих організмів входить певна, характерна для нього, кількість хромосом. Так, наприклад, в ядрах соматичних клітин організму людини міститься 46, щура – 38, жаби – 26 хромосом.

Рибонуклеопротейни беруть участь в утворенні рибосом. До складу рибосом входить декілька десятків білків та декілька різновидів РНК. Комплекси рибосомальної РНК з білками формують велику і малу субчастки рибосоми, які оборотно зв'язуються разом.

З нуклеопротейнами і, відповідно, нуклеїновими кислотами безпосередньо зв'язані такі біологічні процеси, як: мітоз, мейоз, ембріональний та злоякісний ріст тощо.

### **Фосфопротейни**

До фосфопротейнів належать складні білки, що в якості небілкового компонента мають залишки ортофосфатної кислоти. Вони приєднуються за допомогою складноефірного зв'язку до гідроксильних груп  $\beta$ -оксіамінокислот: серину й треоніну, що входять до складу поліпептидного ланцюга (рис. 2.33А). Рівень фосфопротейнів у клітині залежить в значній мірі від регулюючої дії ферментів, що каталізують фосфорилування (протейнкінази) та дефосфорилування (протейнфосфатази). Ці білки знаходяться в молоці, ікрі риб, жовтку курячого яйця. Велика кількість фосфопротейнів міститься в ЦНС.

Найбільш поширеним серед фосфопротейнів є білок молока *казеїн*, на частку якого припадає до 80 % всіх білків молока. До складу молока казеїн входить у формі кальцієвої солі (рис. 2.33Б).

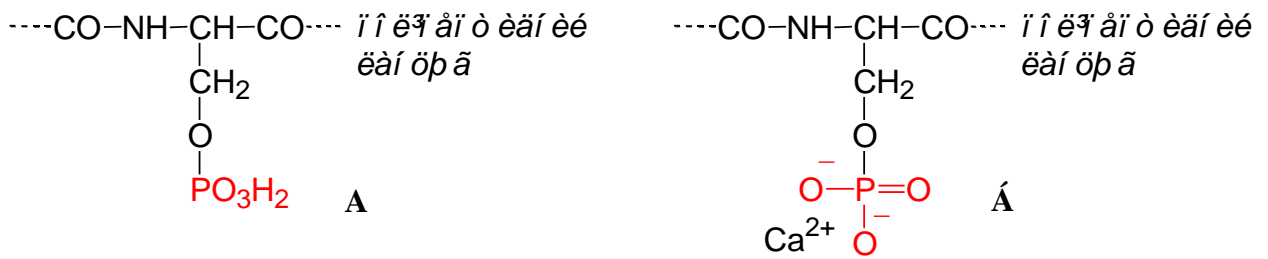


Рис. 2.33. Приєднання залишку ортофосфатної кислоти до серину поліпептидного ланцюга фосфопротеїну (А) та утворення кальцієвої солі (Б)

Казеїн має порівняно невелику молекулярну масу - близько 20 кДа. Його характерною особливістю є високий вміст залишків проліну в поліпептидному ланцюзі. З цієї причини поліпептидний ланцюг казеїну при формуванні вторинної структури переважно набуває конформації, що відповідає  $\beta$ -структурі.

Даний білок має харчове значення. Воно особливо велике в ранньому дитячому віці, коли казеїн є практично єдиним джерелом замінних і незамінних амінокислот для інтенсивно зростаючого організму дитини. У шлунку грудних дітей виробляється спеціальний фермент - ренін (хімозин), який каталізує гідролітичний розпад казеїну. Слід зауважити, що перетравлення казеїну не вимагає присутності соляної кислоти в шлунковому соку. Цей білок виявляється легко доступним для дії протеїназ, навіть у нативному (не денатурованому) стані. У процесі його розпаду утворюються біологічно активні пептиди, які мають регуляторний вплив на травну систему організму новонародженого.

Крім казеїну, до фосфопротеїнів належать: *вітеліни* - білки яєчного жовтка, *овальбумін* - білок курячого яйця, *іхтулін* - білок ікри риб та багато інших.

Розглядаючи фосфопротеїни, необхідно звернути особливу увагу на те, що багато внутрішньоклітинних білків можуть оборотно включати до свого складу залишок ортофосфатної кислоти. В якості його донора виступає молекула АТФ. Включення до складу білка кислоти (фосфорилування білка)

змінює конформацію його поліпептидного ланцюга і, як наслідок, його властивості. З цієї причини оборотне фосфорилування внутрішньоклітинних білків виступає в якості одного із закріплених в процесі еволюції шляхів регуляції каталітичної активності ферментів, а також спорідненості рецепторних білків до їх лігандів. У зв'язку з цим фосфопротейни надзвичайно поширені в живих організмах. Вони містять зв'язаний лабільний фосфат, який є необхідним для виконання клітиною ряду біологічних функцій. Фосфопротейни також є цінним джерелом енергетичного та пластичного матеріалу в процесах ембріогенезу та розвитку організму.

### Металопротейни

До металопротейнів належать білки, які містять атоми (іони) металів, найчастіше у вигляді складних металоорганічних комплексів (наприклад, Ферум - у складі гема, Кобальт - у складі кобаламіну тощо).

Якщо білок містить у своєму складі окремі атоми металів, то їх сполучення з амінокислотними залишками поліпептидного ланцюга відбувається за рахунок координаційних зв'язків.

Представниками металопротейнів є такі широко поширені білки:

- *феритин* й *трансферин*, а також *залізо-сірчані білки* дихального ланцюга мітохондрій (містять  $Fe^{2+}$ );
- *алкогольдегідрогеназа*, *РНК-полімераза* й *ДНК-полімераза*, *матриксні металопротейнази* (містять  $Zn^{2+}$ );
- *цитохромоксидаза*, *супероксиддисмутаза* й *церулоплазмін* (містять  $Cu^{2+}$ );
- *ксантиноксидаза* і *нітрогеназа* (містять  $Mo$ );
- *метилмалоніл-КоА-мутаза* (містить  $Co^{2+}$ );
- *Mn-супероксиддисмутаза* (містить  $Mn^{2+}$ ) та багато інших.

Металопротейни часто проявляють каталітичні властивості. Вони, як правило:

- входять до активного центру фермента (його каталітичну частину) і беруть безпосередню участь у каталізі;
- забезпечують зв'язування активного центру фермента з субстратом;
- виступають у ролі донорів й акцепторів електронів в окисно-відновних реакціях.

Розглянемо особливості будови деяких представників металопротеїнів. *Залізо-сірчані білки дихального ланцюга мітохондрій.* Включають до свого складу один або кілька атомів Феруму, пов'язаних з атомами неорганічної сірки або атомами Сульфуру, що входять до складу залишків цистеїну поліпептидного ланцюга апопротеїну (рис. 2.34).

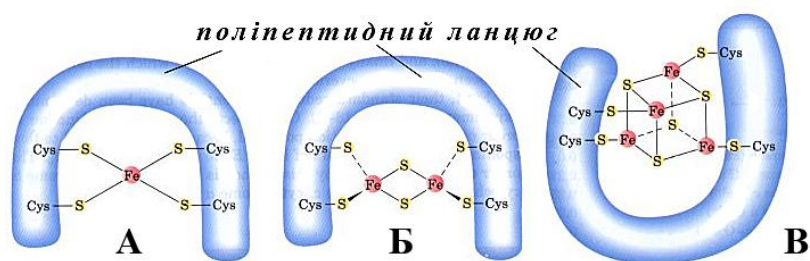


Рис. 2.34. Залізо-сірчані кластери (центри): А – залізо-сірчаний центр типу (FeS), що містить 1 атом Fe; Б – залізо-сірчаний центр типу (Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>), що містить 2 атоми Fe; В – залізо-сірчаний центр типу (Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>), що містить 4 атоми Fe (Nelson D.L., Cox M. M., 2004)

Оскільки Ферум є металом змінної валентності, він забезпечує участь залізо-сірчаних білків в окисно-відновних процесах і, в тому числі, перенесенні електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій.

*Феритин.* Це дуже великий за масою білок, що складається з 24 поліпептидних ланцюгів, які утворюють його окремі субдиниці (рис. 2.35). Об'єднані в спільну молекулу, субдиниці формують оболонку, що оточує центральне ядро, яке містить складний гідроксиферум(II) ортофосфат. Одна молекула феритину може зв'язувати від 4000 до 5000 атомів Феруму, тому його молекулярна маса сягає 747 000 кДа.



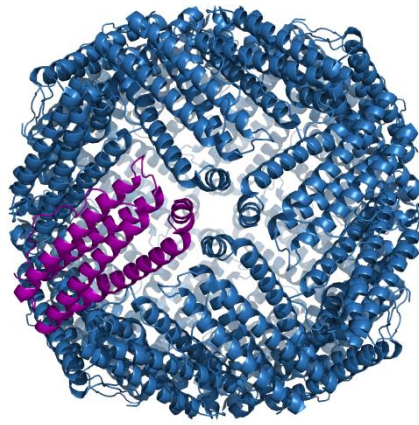


Рис. 2.35. Модель молекули феритину (Granier T. et al., 2003)

Феритин міститься в цитоплазмі клітин ретикулоендотеліальної системи (печінка, селезінка, кістковий мозок, слизова оболонка кишечника). Він бере участь в депонуванні заліза в організмі, переважно в клітинах печінки.

*Cu-Zn-супероксиддисмутаза.* Являє собою фермент, який знаходиться в цитозолі клітин еукаріот. Забезпечує дисмутацію (розпад) супероксидного аніон-радикалу і, з цієї причини, захист клітини від пошкодження вільними радикалами. Cu-Zn-супероксиддисмутаза є гомодимером. Вона складається з двох ідентичних поліпептидних ланцюгів (рис. 2.36), кожен з яких приєднує до себе по одному атому Цинка та Купруму. Атоми металів зв'язуються із залишками гістидину й аспарагінової кислоти та створюють локальний позитивний заряд в активному центрі ферменту. За рахунок цього негативно заряджена молекула субстрату (супероксид-аніону) набуває можливості сполучатися з активним центром.

Крім Cu-Zn-супероксиддисмутази, відомі інші форми цього ензиму, що містять у своєму складі інші метали. Так бактеріальна супероксиддисмутаза містить у складі атом Мангану.

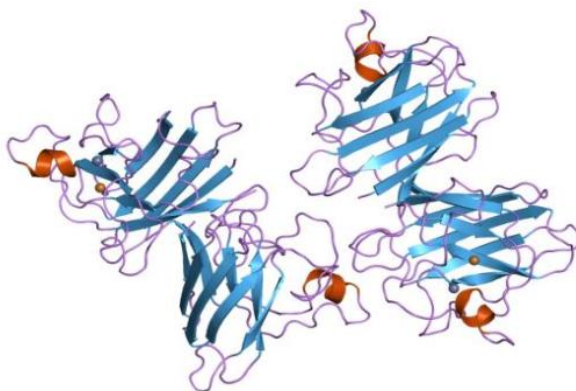


Рис. 2.36. Модель димеру Cu-Zn-супероксиддисмутази

*Ксантиноксидаза.* Являє собою великий білок з двома атомами Молібдену (рис. 2.37), 8 атомами Феруму, які формують в апопротеїні залізо-сірчані центри, та двома флавіновими простетичними групами (ФАД).

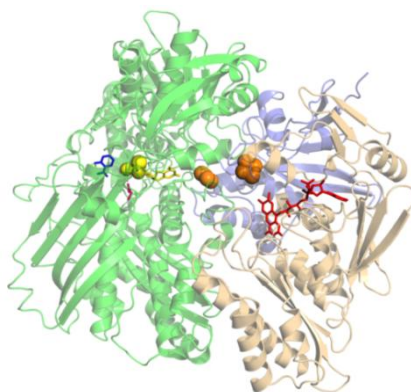


Рис. 2.37. Модель молекули ксантиноксидази (атом Молібдену помічено жовтим кольором) ( )

Атоми Молібдену формують структуру молібденоптерина, який добувається до складу каталітичної частини активного центру фермента (рис. 2.38).

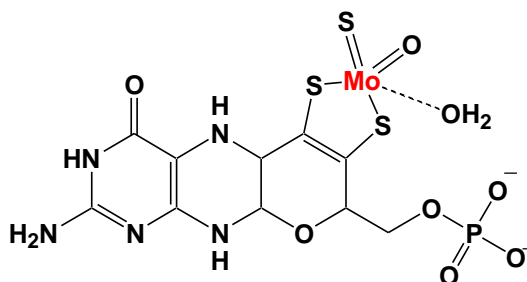


Рис. 2.38. Положення атома Молібдену в складі молібденоптерина

Ксантинооксидаза міститься в цитоплазмі клітин і відіграє важливу роль у розпаді пуринових азотистих основ.

*Церулоплазмін.* Церулоплазмін є великим білком плазми крові, до складу якого входить Купрум, завдяки чому він має характерне блакитне забарвлення. Церулоплазмін містить до 95 % загальної кількості атомів Купруму у крові людини та бере участь в транспорті цього металу в організмі.

Молекула церулоплазміну складається з одного поліпептидного ланцюга, з яким зв'язано 4 олігосахаридних залишки та 6-7 атомів Купруму (іони  $\text{Cu}^{2+}$ ), які сполучені з залишками гістидину у складі апопротеїну (рис. 2.39).

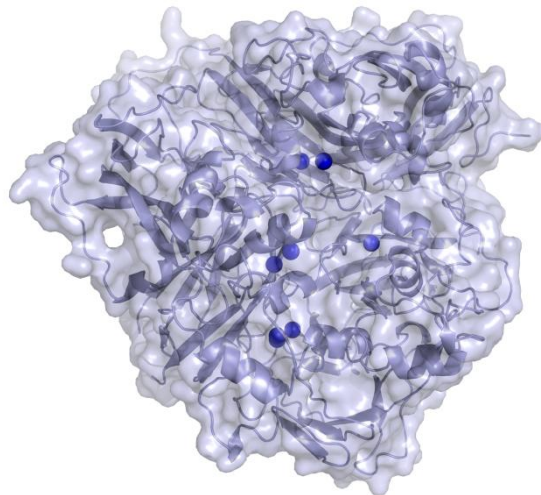


Рис. 2.39. Модель молекули церулоплазміну крові людини. Синім кольором позначені атоми Купруму (Zaitseva I. et al, 1996)

Церулоплазмін проявляє слабку каталітичну властивість. Він каталізує реакцію окиснення відновленого катіону Феруму ( $\text{Fe}^{2+}$ ) і тому набуває ще однієї назви – *фероксидаза*.

Згідно з сучасним уявленням церулоплазмін відіграє важливу роль в метаболізмі Феруму в організмі людини та виконує роль антиоксиданта. Крім крові, він в значній кількості міститься в тканинах внутрішніх органів та головному мозку.

Завершуючи розгляд складних білків, слід ще раз звернути увагу на їх надзвичайно широке розповсюдження в живих організмах. Це пов'язано з тим, що вони виступають в ролі ферментів, транспортних білків, рецепторів та регуляторів процесів обміну речовин. Окремі білки, частіше ферменти, можуть лише на деякий час приєднувати до себе небілковий компонент та при цьому набувати нових властивостей, необхідних для виконання їх функцій. Разом із тим, білкова частка інших складних білків міцно приєднує до себе простетичну групу одразу ж після синтезу поліпептидного ланцюга і в такому вигляді постійно присутня в клітині.

В деяких випадках молекула складного білка долучає до свого складу тільки один небілковий компонент. Разом із тим, досить часто білок містить одночасно кілька різних за хімічною структурою небілкових компонентів. До числа таких білків належать деякі флавопротеїни, ксантинооксидаза, церулоплазмін, казеїн, цитохромоксидаза та багато інших. Особливо велика кількість складних білків міститься в нервовій тканині.

## ЗАПИТАННЯ І ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Амінокислотний склад білків. Класифікація, номенклатура та ізомерія амінокислот.
2. Якісні реакції на виявлення  $\alpha$ -амінокислот та білків.
3. Сучасні уявлення про рівні структурної організації білків.
4. Характеристика хімічних зв'язків, які відповідають за формування просторових структур білкових молекул.
5. Фізико-хімічні властивості білків.
6. Методи виділення та очистки білків.
7. Використання методів висолювання, діалізу, електрофорезу в технології одержання білкових препаратів.
8. Методи кількісного визначення білків.
9. Класифікація білків. Прості білки. Білки та пептиди як лікарські засоби
10. Загальна характеристика та класифікація складних білків.
11. Хромопротеїни: будова, функції. Характеристика окремих представників.
12. Глікопротеїни: класифікація, будова, функції окремих представників.
13. Ліпопротеїни: класифікація, будова. Ліпопротеїни плазми крові.
14. Металопротеїни: загальна характеристика, представники.

## ТЕСТИ ЗАКЛЮЧНОГО КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ

- Через яку групу відбувається приєднання фосфорної кислоти до білків фосфопротеїнах?
  - SH-групу цистеїну
  - NH-групу лізину
  - COO-групу глутаміну
  - OH-групу серину
  - SH-групу метіоніну
- До складу білка входять протеїногенні амінокислоти. У якому положенні в їх структурі обов'язково повинна бути аміногрупа?
  - $\delta$ -положенні
  - $\varepsilon$ -положенні
  - $\alpha$ -положенні
  - $\beta$ -положенні
  - $\gamma$ -положенні
- При термічній обробці їжі спостерігаються незворотні зміни просторової структури білка. Цей процес отримав назву:
  - Ренатурація
  - Висолювання
  - Гідратація
  - Денатурація
  - Діаліз
- Для отримання з підшлункової залози тварин ферменту амілази в чистому вигляді застосовують метод афінної хроматографії із закріпленим на носії лігандом. Яку речовину використовують у якості ліганду?
  - Глюкозу
  - Крохмаль
  - Сахарозу
  - Целюлозу
  - Лактозу
- До якого електроду буде рухатись частка білку при електрофорезі, якщо його ізоелектрична точка дорівнює 4,0, а рН становить 5,0?
  - Аноду
  - Каломельного
  - Хлоросрібного
  - Катоду
  - Платинового
- Хворий перебуває у відділенні «штучна нирка». Вкажіть метод, який використовується для очищення його крові від низькомолекулярних сполук:
  - Денатурація
  - Висолювання
  - Діаліз
  - Гідроліз
  - Електрофорез
- Альфа-спіраль є однією з форм вторинної структури білка. Вкажіть, які зв'язки стабілізують цю структуру:
  - Іонні
  - Міжмолекулярної взаємодії
  - Гідрофобні
  - Водневі
  - Пептидні
- Ізоелектрична точка (ІЕТ) білка дорівнює 8,3. При якому значенні рН електрофоретична рухливість макромолекули білка дорівнюватиме нулю?
  - 8,3

- В. 4,7  
С. 7,0  
D. 11,5  
E. 2,3
9. Одним з показників обміну речовин в організмі є рівень загального білка в сироватці крові. Яка реакція зазвичай використовується в клінічних лабораторіях для визначення вмісту білку?
- А. Біуретова  
В. Нінгідрінова  
С. Ксантопротеїнова  
D. Фоля  
E. Нітропруссидна
10. Гемоглобін транспортує кисень в організм і виводить вуглекислий газ з нього. Вкажіть до якого класу складних білків він відноситься.
- А. Металопротеїнів  
В. Нуклеопротеїнів  
С. Ліпопротеїнів  
D. Глікопротеїнів  
E. Хромопротеїнів
11. У клінічній практиці для фракціонування білків сироватки крові та інших біологічних рідин використовується метод висолювання. Які сполуки застосовуються для цієї мети?
- А. Детергенти  
В. Солі важких металів  
С. Кислоти  
D. Солі лужних металів  
E. Луги
12. Вкажіть рівень структурної організації білкової молекули, який зберігається після дії денатуруючих агентів:
- А. Первинний  
В. Вторинний  
С. Третинний  
D. Четвертинний  
E. Вторинний і третинний
13. Вкажіть основні типи зв'язків, характерні для первинної структури білкової молекули:
- А. Пептидні  
В. Гідрофобні  
С. Водневі  
D. Дисульфідні  
E. Іонні взаємодії
14. Вкажіть білок крові, що містить у своєму складі мідь:
- А. Церулоплазмін  
В. Фібриноген  
С. Тромбін  
D. Альбумін  
E. Фібринолізин
15. У біохімічних лабораторіях використовують різні методи фракціонування білкових сумішей. Вкажіть метод, який ґрунтується на розходженні у величині і знаку поверхневого заряду молекул білків:
- А. Гель-фільтрація  
В. Афінна хроматографія  
С. Іонна хроматографія  
D. Електрофорез  
E. Ультрацентрифугування
16. У клініці для парентерального білкового харчування, використовують фармпрепарати

- гідролізату білків. Поживна цінність гідролізолатів визначається за наявності комплексу незамінних амінокислот. Вкажіть, яка з перерахованих амінокислот відноситься до незамінних:
- A. Метіонін
  - B. Цистеїн
  - C. Аланін
  - D. Серін
  - E. Гліцин
17. Структурною особливістю фібрилярних білків є наявність декількох паралельних поліпептидних ланцюгів. Назвіть фібрилярний білок, який входить до складу волосся, шкіри, нігтів.
- A. Кератин
  - B. Альбумін
  - C. Протромбін
  - D. Глобулін
  - E. Гістон
18. Розчинність більшості глобулярних білків у водних розчинах обумовлена наявністю на їх поверхні:
- A. Полярних залишків амінокислот
  - B. Неполярних залишків амінокислот
  - C. Пептидних груп
  - D. Бензольних радикалів
  - E. Гетероциклічних радикалів
19. Якою специфічною реакцією можна визначити ароматичні амінокислоти, що входять до складу природних білків:
- A. Ксантопротеїною
  - B. Біуретовою
  - C. Фоля
  - D. З реактивом Фелінга
  - E. Нінгідриною
20. Вкажіть білки сироватки крові, що піддаються висолуванню при 50% насиченні сульфатом амонію:
- A. Гістони
  - B. Протаміни
  - C. Глютеліни
  - D. Альбуміни
  - E. Глобуліни
21. Вкажіть білки сироватки крові, що піддаються висолуванню при 100% насиченні сульфатом амонію:
- A. Глобуліни
  - B. Глютеліни
  - C. Альбуміни
  - D. Гістони
  - E. Протаміни
22. Для білкових молекул як для біополімерів характерним є утворення декількох рівнів структурної організації. Вкажіть рівень структурної організації для гемоглобіну:
- A. Четвертинна структура
  - B.  $\beta$ -Складчаста структура
  - C. Третинна структура
  - D. Первинна структура
  - E. Вторинна структура
23. Виберіть показник, який не впливає на величину ізоелектричної точки білка:



- А. рН середовища  
 В. Іони солей  
 С. Концентрація білка  
 D. Іони дисоціації води  
 Е. Домішки хлориду натрію
24. Виберіть якісну реакцію на  $\alpha$ -аміногрупу амінокислот, що входять до складу білкової молекули:
- А. Троммера  
 В. Нітропруссидна  
 С. Биуретова  
 D. Ксантопротеїнова  
 Е. Нінгідринова
25. Вкажіть білки, що входять до складу сироватки крові:
- А. Гістони + протаміни  
 В. Альбуміни + глобуліни  
 С. Проламіни + глютеліни  
 D. Пепсин + пепсиноген  
 Е. Трипсин + трипсиноген
26. 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  
 D. Глутамінова кислота  
 Е. Аспарагінова кислота
27. Вкажіть якісну реакцію на пептидний зв'язок:
- А. Фоля  
 В. Адамкевича  
 С. Піотровського  
 D. Миллона
- Е. Мульдера
- 28.3 метою профілактики тромбозів хворому призначений антикоагулянт гепарин. Небілкова частина цього протеоглікану представлена:
- А. Гетерополісахаридами  
 В. Олігосахаридами  
 С. Гомополісахаридами  
 D. Моносахаридами  
 Е. Ліпідами
29. Укажіть принцип, який покладений в основу класифікації складних білків:
- А. Амінокислотний склад  
 В. Розчинність  
 С. Хімічна природа апопротеїну  
 D. Хімічна природа простетичної групи  
 Е. Здатність до денатурації
30. Назвіть білки, які входять до складу дезоксирибонуклеопротеїнів:
- А. Проламіни  
 В. Глютеліни  
 С. Глобуліни  
 D. Альбуміни  
 Е. Гістони
31. Із наведеного списку виберіть складний білок - хромопротеїн:
- А. Вірус тютюнової мозаїки  
 В. Гемоглобін  
 С. Казеїноген  
 D. Вітелін  
 Е. Іхтулін
32. Укажіть складний білок, який виконує захисну функцію проти

вірусної інфекції і при пухлинних поразках:

- A. Феритин
- B. Глутатіон
- C. Глюкагон
- D. Інтерферон
- E. Секретин

33.Ліпопротеїни – це складні білки, що входять до складу біологічних мембран і плазми крові. Укажіть основну функцію ліпопротеїнів плазми крові:

- A. Енергетична
- B. Пластична
- C. Транспортна
- D. Регуляторна
- E. Каталітична

34.Виберіть із запропонованого списку фосфопротеїн:

- A. Каталаза
- B. Гемосидерин
- C. Трансферин
- D. Інтерферон
- E. Казеїноген

35.Укажіть речовину, яка надає слині в'язкий слизовий характер, виконує захисну функцію та запобігає механічному пошкодженню слизової оболонки ротової порожнини?

- A. Муцин
- B. Глюкоза
- C. Калікреїн
- D. Амілаза
- E. Лізоцим

## ВІДПОВІДІ НА ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

1. D  
2. C  
3. D  
4. B  
5. A  
6. C  
7. D  
8. A  
9. A  
10. E

11. D  
12. A  
13. A  
14. A  
15. D  
16. A  
17. A  
18. A  
19. A  
20. E

21. C  
22. A  
23. C  
24. E  
25. B  
26. A  
27. C  
28. A  
29. D  
30. E

31. B  
32. D  
33. C  
34. E  
35. A

## ЛІТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
2. Биохимия: Учебник / [Авдеева Л. В., Алейникова Т. Л., Андрианова Л. Е. и др.]; под ред. чл.-корр. РАН, проф. Е. С. Северина. - [5-е изд.]. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2008. – 768 с.
3. Біологічна хімія з біохімічними методами дослідження: підручник / О. Я. Склярів, Н. В. Фартушок, Л. Д. Сойка, І. С. Смачило. – К.: Медицина, 2009. – 352 с.
4. Біологічна хімія: Підручник / [Вороніна Л. М., Десенко В. Ф., Мадієвська Н. М. та ін.]; за ред. проф. Л. М. Вороніної. – Ч.: Основа; Видавництво НФАУ, 2000. – 608 с.
5. Гонський Я. І. Біохімія людини: Підручник / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук, М. І. Калинський. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – 744 с.
6. Губський Ю. І. Біологічна хімія. Підручник / Ю. І. Губський. – Київ-Вінниця: НОВА КНИГА, 2007. – 656 с.
7. Давидов В. В. Основи біохімії: Посібник для вузів / В. В. Давидов, А. І. Божков. – Харків: Федорко, 2008. – 296 с.
8. Комиссаров Г. Г. Фотосинтез: физико-химический подход [2-е изд.] / Г. Г. Комиссаров. - Эдиториал УРСС, 2006. – 224 с.
9. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3 т.; пер. с англ. / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – Т. 2. – 1985. – 368 с.
10. Николаев А. Я. Биологическая химия: Учебник. - [3-е изд.] / А. Я. Николаев. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство, 2007. – 568 с.
11. Чиркин А. А. Биохимия: учебное руководство / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. – М.: Мет. лит., 2010. – 624 с.
12. Berg J. M. Biochemistry / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. – N-Y: W. H. Freeman and Company, 2006. - 1512 p.
13. Biochemistry, 4th Edition by Donald Voet, Judith G. Voet, 2011, 1520 p.

14. Bushnell G. W. High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c / G. W. Bushnell, G. V. Louie, G. D. Brayer – J. Mol Biol. - 1990, Jul. 20. - № 214 (2). – P. 585-595.
15. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion / C. Enroth, B. T. Eger, K. Okamoto - PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. – 2000. - vol. 97.- P. 10723-10728.
16. Endothelial Cell-Surface F1-Fo ATP Synthase is Active in ATP Synthesis and is Inhibited by Angiostatin / [T. L. Moser, D. J. Kenan, T. A. Ashley et al.]. - Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 2001. – № 98. - 6656-6661.
17. Huntington F. Willard Genome biology: Tales of the Y chromosome. – Nature. – 2003. - № 423. – P. 810-813.
18. Mariana Ruiz Villarreal, 2006 [en.wikipedia.org]
19. Marks A. Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach, 2nd ed. / A. Marks, C. Smith, M. Lieberman – Lippincott Williams and Wilkins, 2005. – 977 p.
20. Nelson D. L. Lehninger Principles of Biochemistry, fourth edition / D. L. Nelson, M. M. Cox. – New York: Worth Publishers, 2004. – 1119 p.
21. Structural description of the active sites of mouse L-chain ferritin at 1.2 Å resolution / [T. Granier, B. Langlois d'Estaintot, B. Gallois et al.]. - J. Biol. Inorg. Chem. - January 2003. - № 8 (1–2). – P. 105–111.
22. Structure solution and molecular dynamics refinement of the yeast Cu, Zn enzyme superoxide dismutase / K. Djinovic, G. Gatti, A. Coda et al. - ACTA CRYSTALLOGR., SECT. B. – 1991. – vol. 47. – P. 918-927.
23. The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: Nature of the copper centres / I. Zaitseva, V. Zaitsev, G. Card et al. - J. Biol. Inorg. Chem. – 1996. – № 1. – P. 15-23.
24. Антонова О. С. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии / О. С. Антонова, Н. А. Корнева, Ю. В. Белов, В. Е. Курочкин // Научное приборостроение. – 2010. – Т. 20, №1. – С. 3-9.

- 25.Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л. А. Остерман. - Москва: Наука, 1981 – 288 с.
- 26.Molecular biology in cellular pathology / J. Crocker, P. G. Murray, ed. – Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2003 – 380 p.
- 27.Smith C. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach / C. Smith, A. Marks, M. Lieberman. - Lippincott Williams & Wilkins, 2004. – 919 [P.207-316] p.
- 28.Viljoen G. J. Molecular diagnostic PCR handbook / G. J. Viljoen, L. H.Nel, J. R.Crowther. – Dordrecht: Springer, 2005. – 307 p.