

БІОХІМІЯ ФЕРМЕНТІВ. АСПЕКТИ МЕДИЧНОЇ ЕНЗИМОЛОГІЇ

*Навчально-методичний посібник
для підготовки до практичних занять з біологічної хімії
(для студентів медичних та стоматологічного факультетів)*

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Харківський національний медичний університет

О. А. Наконечна, Р. О. Бачинський

БІОХІМІЯ ФЕРМЕНТІВ.
АСПЕКТИ МЕДИЧНОЇ ЕНЗИМОЛОГІЇ

*Навчально-методичний посібник
для підготовки до практичних занять з біологічної хімії
(для студентів медичних та стоматологічного факультетів)*

Харків
ХНМУ
2020

Затверджено
Вченою радою ХНМУ.
Протокол № 7 від 31.08.2020.

Рецензенти:

- Перський Є. Є.* – доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри біологічної хімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.
Кравченко В. М. – доктор біологічних наук, професор кафедри біологічної хімії Національного фармацевтичного університету.

Наконечна О. А., Бачинський Р. О.

- Н 21 Біохімія ферментів. Аспекти медичної ензимології : навч.-метод. посібник для підготовки до практичних занять з біологічної хімії (для студентів медичних та стоматологічного факультетів) / О. А. Наконечна, Р. О. Бачинський. – Харків, 2020. – 48 с.

У навчально-методичному посібнику підсумовані сучасні дані про хімічну природу ферментів, механізм ферментативних реакцій, дії активаторів та інгібіторів. Представлено матеріали щодо кінетики ферментативних реакцій, регуляції активності ферментів, структури та функцій ізоферментів. Окремо охарактеризовано мультиферментні комплекси, розкрито їх структуру та функції. Окремий розділ присвячено опису сучасних досягнень, напрямів та перспектив медичної ензимології. Враховуючи потребу в конкретизації знань при відповідях на окремі питання з біохімії ферментів та основ медичної ензимології при підготовці студентів медичних та стоматологічного факультетів до практичних занять з відповідних тем автори пропонують навчально-методичний посібник, який може бути доповненням при вивченні курсу біологічної хімії та клінічної біохімії, а також сприятиме більш успішній підготовці до складання єдиного державного кваліфікаційного іспиту – ЄДКІ.

УДК 577.15:61(075.8)

ЗМІСТ

Список скорочень	4
Вступ	5
Основна частина	5
Основні методи вивчення структури ферментів	5
Поняття каталізу, енергії активації, теорії біокаталізу, закони біокаталізу	5
Хімічна природа ферментів	7
Відмінність ферментів від неорганічних каталізаторів	8
Кінетика ферментативних реакцій	13
Структура простих і складних ферментів	15
Одиниці виміру активності та кількості ферментів	18
Номенклатура ферментів	19
Класифікація ферментів	19
Механізм ферментативних реакцій	22
Механізми каталізу	23
Типи ферментативних реакцій	24
Структура та функції ізоферментів	25
Мультиферментні комплекси, їх структура та функції	27
Регуляція активності ферментів	29
Активатори та інгібітори	32
Медична ензимологія	37
Теоретичні питання	42
Тестові завдання для самоконтролю	43
Література	48

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АДФ	– аденозиндифосфат
АКТГ	– адренокортикотропний гормон
АлАТ	– аланінамінотрансфераза
АМФ	– аденозинмонофосфат
АсАТ	– аспаратамінотрансфераза
АТФ	– аденозинтрифосфат
АХЕ	– ацетилхолінестераза
ГАФД	– гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа
ГТП	– гамма-глутамілтранспептидаза
ГДФ	– гуанозиндифосфат
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
КК	– креатинкіназа
КоА	– кофермент (коензим) А
КФК	– креатинфосфатфосфокіназа
ЛДГ	– лактатдегідрогеназа
НАД ⁺	– нікотинамідаденіндинуклеотид окиснений
НАДН+Н ⁺	– нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
НАДФ ⁺	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат окиснений
НАДФН+Н ⁺	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
ПВК	– пірвіноградна кислота
ПФ	– піридоксальфосфат
РНК	– рибонуклеїнова кислота
СЖК	– синтетаза жирних кислот
ТГФК	– тетрагідрофолієва кислота
ТДФ	– тіамідиндифосфат
ТМФ	– тіамідинмонофосфат
ТПФ	– тіамінпірофосфат
ТТФ	– тіамінтрифосфат
УДФ	– уридиндифосфат
ФАД	– флавінаденіндинуклеотид окиснений
ФАДН ₂	– флавінаденіндинуклеотид відновлений
ФМН	– флавінмононуклеотид
цАМФ	– циклічний аденозин-3', 5'-монофосфат

ВСТУП

Організм може жити та розвиватися тільки за умов перебігу в ньому реакцій, пов'язаних з енергозабезпеченням процесів синтезу та розпаду речовин. Всі процеси, які відбуваються в організмі, відрізняються швидкістю та скоординованістю.

Хімічні процеси в організмі каталізуються особливими речовинами – біокаталізаторами – *ферментами* або *ензимами*. Зараз встановлено, що немає жодного процесу в організмі, який би відбувався без участі ферментів. Травлення, енергозабезпечення, синтез структурних компонентів клітин і тканин, ріст, розмноження, м'язове скорочення, згортання крові та інші процеси пов'язані з роботою ферментів. Термін *фермент* (від лат. *fermentation* – кипіння, бродіння) вперше увів у науку голландський вчений XVII ст. Я. Б. Ван-Гельмонт для речовин, що стимулюють перетворення виноградного соку на вино. При цьому відбувається виділення бульбашок газу, що нагадує кипіння. Цей процес назвали ферментацією, а речовини, що його спричиняють – ферментами. Дещо пізніше був запропонований ще один термін – *ензими* (від грец. *en zyme* – у дріжджах). Зараз обидва терміни вживаються як синоніми. Одною з найважливіших проблем сучасної біохімії є розвиток науки про ферменти, ензимології.

Історичний нарис. Початок розвитку ензимології пов'язують з відкриттям у 1814 р. К. Кірхгофом перетворення крохмалю на цукор під дією водних витягів із паростків ячменю. Діючий початок із цих витягів був виділений у 1833 р. А. Пайеном і Ж. Персо. Ним виявився фермент амілаза. У 1836 р. Т. Шванн виявив і описав пепсин, того ж року І. Пуркін та І. Паппенгейм дали характеристику трипсину. У 1897 р. брати Г. і Е. Бухнери виділили з дріжджів розчинний препарат (зимазу), що спричинив спиртове бродіння. Цим був покладений кінець спору Л. Пастера (він вважав, що процес бродіння можуть викликати тільки цілісні живі клітини) і Ю. Лібіха (вважав, що бродіння пов'язано з особливими речовинами). У кінці XIX ст. Е. Фішер запропонував першу теорію специфічності ферментів. У 1913 р. Л. Міхаеліс та М. Ментен сформулювали загальну теорію кінетики ферментативних реакцій. У кристалічному вигляді перші ферменти були отримані Дж. Самнером у 1926 р. (уреаза) і Дж. Нортропом у 1930 р. (пепсин). Уперше первинну структуру ферментів встановили У. Стейн та С. Мур у 1960 р. для рибонуклеази А, а в 1969 р. Р. Мерріфілд здійснив хімічний синтез цього ферменту. Просторову будову (третинна структура) ферментів уперше встановив Д. Філіпс у 1965 р. для лізоциму. У другій половині XX ст. каталітична активність була відкрита також у деяких пре-іРНК, їх назвали «рибозими».

ОСНОВНА ЧАСТИНА

Основні методи вивчення структури ферментів

Структуру ферментів вивчають методами хімічної модифікації, спектроскопії, рентгенівського структурного аналізу ядерного магнітного резонансу, електронного парамагнітного резонансу тощо. Цінні результати отримані методом сайт-специфічного мутагенезу, заснованого на спрямованій заміні амінокислот у білковій молекулі методами генної інженерії. Зараз нараховується понад 3000 ферментів, встановлена їх природа, для деяких і структура, для багатьох – існування різних молекулярних форм – ізоферментів.

Поняття каталізу, енергія активації, теорія біокаталізу, основні закони біокаталізу

Основні фактори, що впливають на швидкість хімічних реакцій:

1. Природа реагуючих речовин.
2. Концентрація реагуючих речовин (для газів – тиск).
3. Температура.
4. Наявність каталізатора.

На швидкість хімічних процесів може впливати також подрібнення (для твердих речовин), опромінення та інші фактори.

Каталіз – зміна швидкості реакції під впливом невеликих добавок специфічних речовин, кількість яких у ході реакції не змінюється. У каталітичних процесах швидкість основної реакції може і збільшуватися, і зменшуватися. Відповідно до цього каталітична дія може бути

позитивною та негативною. Речовини, які прискорюють реакцію, називаються *каталізаторами*, а ті, що уповільнюють – *інгібіторами*. До інгібіторів належать різні консерванти, антиоксиданти, їх використовують у тих випадках, коли потрібно зменшити швидкість таких процесів, як гниття, уповільнити протікання реакцій.

Для каталітичних реакцій характерні деякі особливості. Як правило, каталізатор вводиться в систему в дуже невеликих кількостях порівняно з масою реагентів. Проте ефективність дії цих невеликих добавок надзвичайно висока. У результаті реакції каталізатор залишається в хімічно незмінному стані і не витрачається, тобто участь каталізатора в реакції не відображається загальним стехіометричним рівнянням. Проте фізично каталізатор змінюється.

На сьогодні не існує єдиної теорії каталізу. Доповнюють одна одну й відображають суть вчення про каталіз наступні теорії:

Теорія утворення проміжного комплексу: $A + K \rightarrow AK$, $AK + B \rightarrow AB + K$, де А, В – початкові речовини; К – каталізатор; АК – проміжний комплекс. Проміжні сполуки утворюються на поверхні каталізатора.

Адсорбційна теорія. Каталітична активність обумовлена здатністю каталізатора адсорбувати реагенти на активних центрах.

Мультиплетна теорія передбачає утворення мультиплетного комплексу на активному центрі каталізатора, в результаті чого виділяється енергія, необхідна для розриву старих зв'язків.

Незважаючи на різноманітність теорій каталізу ферменти та каталізатори небілкової природи підлягають *загальним законам каталізу* та мають наступні спільні властивості:

1. Не впливають на глибину перебігу реакції, тобто на її рівновагу і константу рівноваги. Вони лише прискорюють реакцію.

2. За своєю дією є селективними, тобто вибірковими. Вони прискорюють тільки одну або дві-три з великої кількості можливих реакцій.

3. Після реакції залишаються хімічно незмінними і в тій же кількості, що й до реакції.

4. Прискорювальна роль каталізатора пояснюється утворенням активованих перехідних комплексів, до складу яких входить каталізатор. Активований комплекс, утворений за участю каталізатора, має нижчу енергію активації, ніж активований комплекс, що виникає за відсутності каталізатора.

Відомо, що для перебігу хімічної реакції необхідно, щоб реагуючі речовини мали сумарну енергію вище, ніж величина енергетичного бар'єра реакції.

Для характеристики величини енергетичного бар'єру С. Арреніус увів поняття *енергії активації* (E_A) – *мінімальна енергія, яка необхідна для перебігу реакції*. Подолання енергії активації в хімічних реакціях досягається збільшенням енергії взаємодіючих молекул, наприклад, нагріванням, опроміненням, підвищенням тиску, або зниженням потрібних для реакції витрат енергії (тобто E_A) за допомогою каталізаторів (*табл. 1*).

Таблиця 1

Зміна енергії активації під дією каталізаторів

Реакція	Схема реакції	Каталізатор	Енергія активації, кДж/моль
Гідроліз сахарози	$C_6H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$ глюкоза фруктоза	Іони H_3O^+ Фермент амілаза	1090 46
Розкладання гідроген пероксиду	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Без каталізатора Платина Фермент каталаза	75 54 8,4

За наявності каталізатора (ферменту) змінюється шлях, по якому відбувається сумарна реакція, а тому змінюється її швидкість. Збільшення швидкості каталітичної реакції пов'язано з меншою енергією активації нового шляху реакції (*рис. 1*).

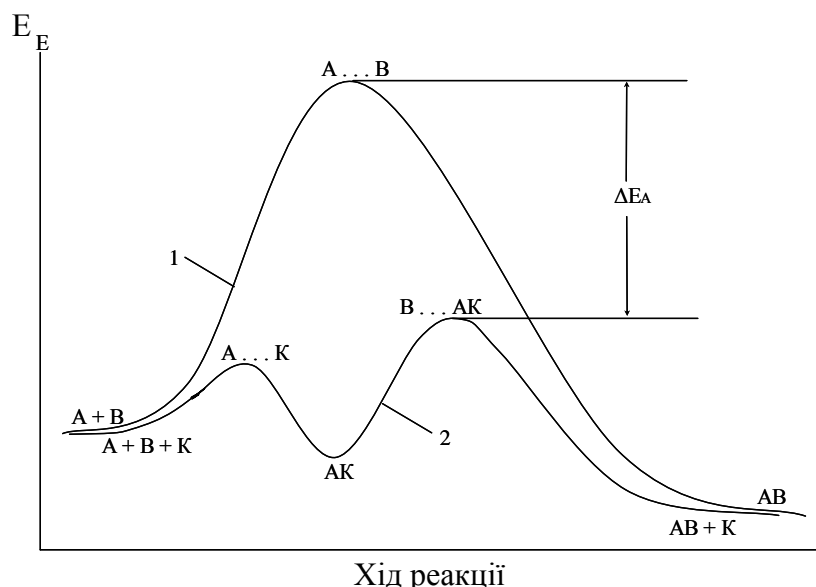


Рис. 1. Зменшення енергії активації під дією каталізатора

Примітка: А, В – початкові речовини; К – каталізатор (ензим); АК – проміжний комплекс; А...К та В...АК – активовані комплекси; ΔE_A – зміна енергії активації.

На *рис. 1* показана енергетична діаграма ходу реакції за відсутності (*крива 1*) та наявності (*крива 2*) каталізатора. Очевидно, в останньому випадку енергія активації реакції знижується на величину ΔE_A .

Енергія активації каталітичного процесу значно менша, ніж некаталітичного, що пояснює вищу швидкість реакції за участю каталізатора. Інгібітори збільшують E_A і тим самим зменшують швидкість реакції.

Окрім зміни E_A каталізатор також збільшує вірогідність сприятливої орієнтації молекул у момент зіткнення, розташовуючи молекули потрібним чином.

Для організму притаманний лише практично один фактор, що впливає на швидкість хімічних процесів – наявність каталізатора (ферменту).

Хімічна природа ферментів

Ферменти є біокаталізаторами білкової природи. Каталізуючи переважну більшість біохімічних реакцій в організмі, ферменти регулюють обмін речовин і енергії, відіграючи тим самим важливу роль в усіх процесах життєдіяльності. Усі функціональні прояви живих організмів (дихання, м'язове скорочення, передача нервового імпульсу, розмноження і т. д.) забезпечуються дією ферментних систем. *Ферменти – це функціональні одиниці клітинного метаболізму.*

Таким чином, **ферменти** – специфічні речовини білкової природи, наявні у тканинах і клітинах усіх живих організмів і здатні в багато разів прискорювати хімічні реакції, що відбуваються в них. Тобто, за хімічною природою ферменти – це білки, виняток – рибозими (пре-іРНК). Ферментам властиві усі особливості структурної організації білків. Вони мають чотири рівні організації: первинний, вторинний, третинний і четвертинний. Ферменти з четвертинною структурою, а їх більшість, складаються з *протомерів (субодиниць)*. Ферментам притаманні фізико-хімічні властивості білків, а саме:

1. Висока молекулярна маса.
2. Розщеплення до амінокислот під час гідролізу.
3. Амфотерність.
4. Утворення колоїдоподібних розчинів.
5. Вони не стійкі до впливу високих температур та солей важких металів.
6. Проявляють антигенні властивості.
7. Піддаються фракціонуванню та ін.

Головним доказом білкової природи ферменту є втрата активності при дії протеолітичних ферментів. При дії пепсину або трипсину на будь-який фермент він втрачає свою каталітичну активність.

Відмінність ферментів від неорганічних каталізаторів

Ферменти мають специфічні властивості, які відрізняють їх від інших каталізаторів. Ці відмінності пов'язані з особливостями будови ферментів. До особливостей ферментативного каталізу відносяться:

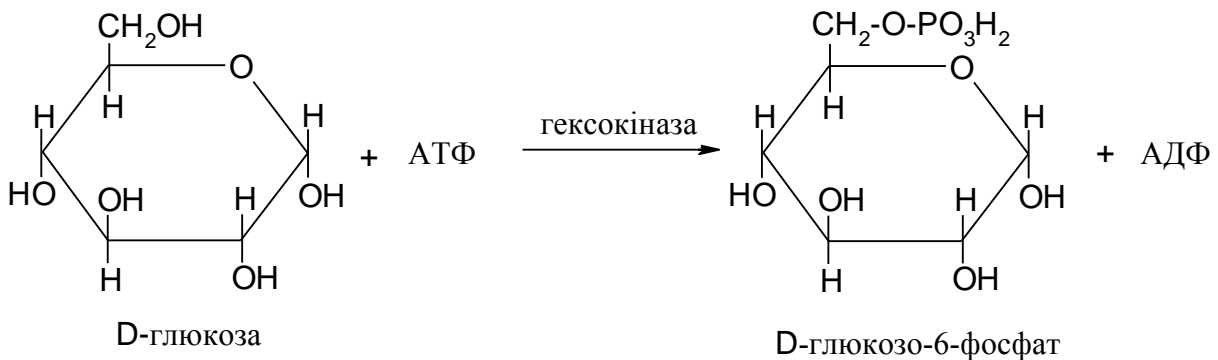
1. Висока ефективність. Швидкість ферментативного каталізу набагато вища, ніж небіологічного. Ферменти здатні знижувати енергію активації біохімічних процесів у 2–3 рази більше порівняно з можливістю зниження E_A неорганічними каталізаторами, тому ферменти діють у 10^3 – 10^6 разів швидше, ніж небіологічні каталізатори (див. табл. 1). Ферменти підвищують швидкість реакцій, що каталізуються ними, у 10^8 – 10^{20} разів. Наприклад, уреаза прискорює гідроліз сечовини у 10^{14} разів. Одна молекула ферменту за 1 хв може каталізувати до мільйона молекул речовини. Ця швидкість каталізу недосяжна для небіологічних каталізаторів. Така ефективність пояснюється, по-перше, *концентраційним фактором* – активною сорбцією ферментом субстрату, що еквівалентно збільшенню його концентрації. Концентраційний фактор збільшує швидкість у тисячі разів. По-друге, ферменти проявляють *орієнтаційний ефект*, що також збільшує швидкість. Фермент здатний зв'язувати молекулу субстрату таким чином, що хімічний зв'язок, на який діє фермент, розташовується не тільки безпосередньо близько від каталітичної групи, але й правильно орієнтованим відносно неї. Це різко збільшує ймовірність ефективного зіткнення. Упорядковане розміщення субстратів призводить до зниження ентропії і, відповідно, сприяє зменшенню енергії активації. І по-третє, ферменти мають *поліфункціональний ефект* – на молекулу субстрату одночасно діють кілька атакуючих груп ферменту.

2. Специфічність. Заснована на комплементарності структури субстрату і активного центру ферменту. За мірою специфічності ферменти поділяють на такі основні види.

А. Стереохімічна субстратна специфічність. Фермент каталізує перетворення тільки одного з можливих стереоізомерів субстрату.

За наявності в субстрату декількох стереоізомерів фермент проявляє абсолютну специфічність до одного з них. В організмі людини спостерігається специфічність до таких стереоізомерів:

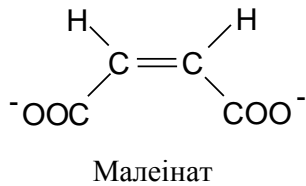
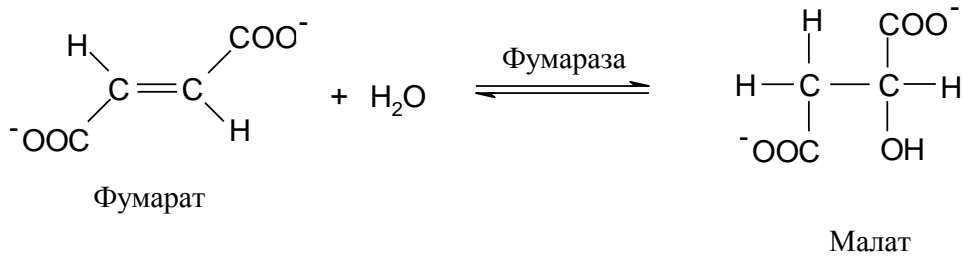
Стереоспецифічність до D-моносахаридів. Більшість моносахаридів і продуктів їх обміну в організмі людини відносять до D-стереоізомерів. Ферменти, що забезпечують їх метаболізм, мають специфічність до D-, а не до L-моносахаридів.



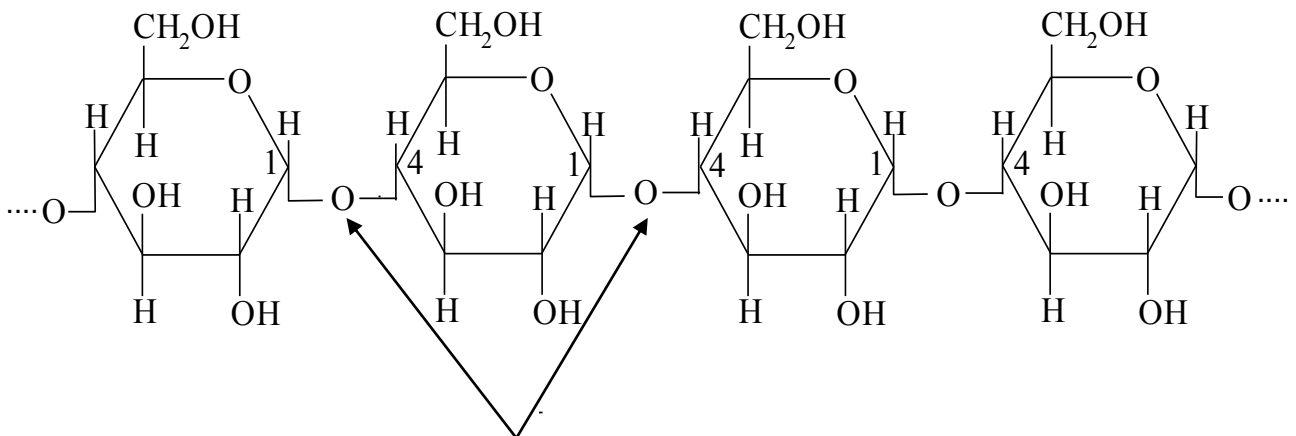
Стереоспецифічність до L-амінокислот. Білки людини складаються з амінокислот L-ряду. Більшість ферментів, які забезпечують перетворення амінокислот, мають стереоспецифічність до L-амінокислот.



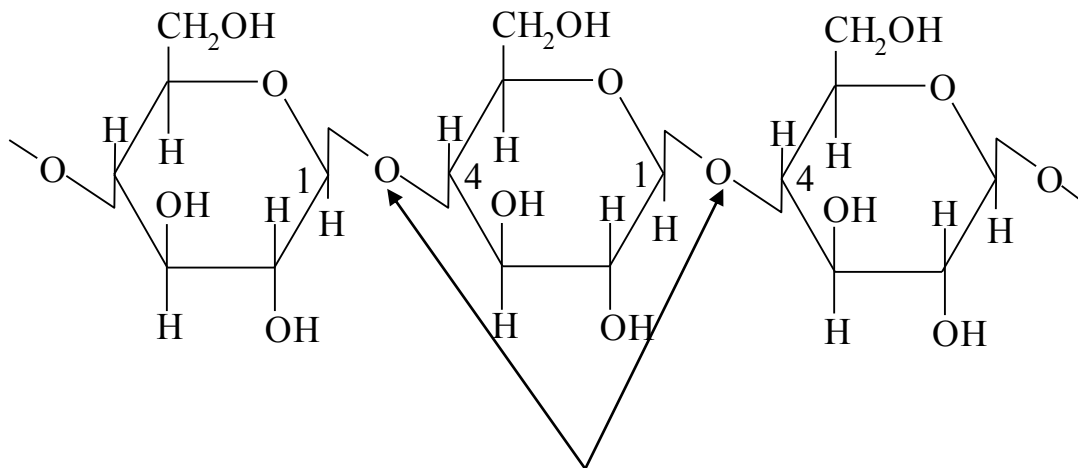
Стереоспецифічність до цис-транс-ізомерів. Фермент фумараза діє тільки на фумарат (транс-ізомер). Малейнат (цис-ізомер фумарату) не є субстратом фумарази.



Стереоспецифічність до α - та β -глікозидних зв'язків. Фермент амілаза діє тільки на α -глікозидні зв'язки, що дозволяє гідролізувати крохмаль та глікоген (полімери глюкози). Залишки глюкози в цих полімерах з'єднані α -глікозидними зв'язками. Целюлоза – також полімер глюкози, але залишки глюкози в ньому з'єднані β -глікозидними зв'язками. У результаті відсутності у людини ферментів, що специфічні до β -глікозидних зв'язків, целюлоза не гідролізується в кишечнику людини і не може служити джерелом глюкози.

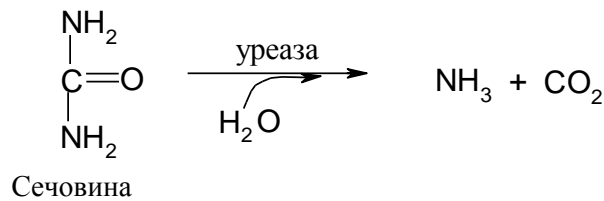


α -1,4-глікозидні зв'язки
Амілоза (фракція крохмалю)

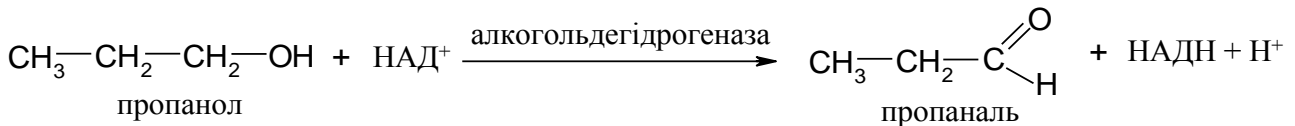
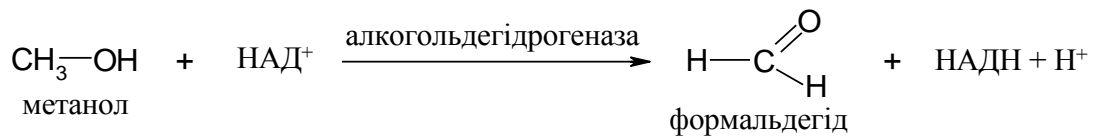
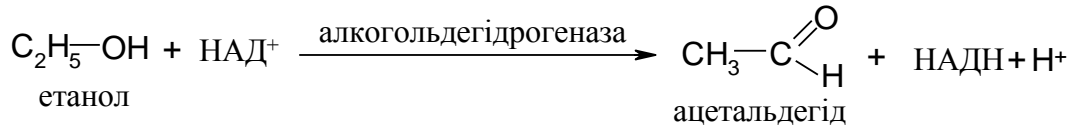


β -1,4-глікозидні зв'язки
Целюлоза (клітковина)

Б. Абсолютна субстратна специфічність. Фермент каталізує тільки одну речовину. Наприклад, розщеплення сечовини уреазой.



В. Абсолютна групова субстратна специфічність. Каталітичне перетворення подібної хімічної групи. Наприклад, ОН-групи. Алкогольдегідрогеназа окислює до альдегідів одноатомні спирти (етанол, метанол, пропанол).



Г. Відносна групова субстратна специфічність. Фермент специфічно діє на окремі зв'язки певної групи субстратів. Наявність пептидного зв'язку, наприклад:

- пепсин каталізує розрив пептидного зв'язку, утвореного аміногрупами ароматичних амінокислот;
- тромбін розщеплює пептидний зв'язок тільки між аргініном і гліцином.

Д. Відносна субстратна специфічність – перетворення субстратів з деякими загальними ознаками. Наприклад, цитохром Р-450 окислює тільки гідрофобні речовини, яких налічується близько 7 000.

Каталітична специфічність. Фермент каталізує перетворення приєднаного субстрату за одним з можливих шляхів його перетворення. Ця властивість забезпечується будовою каталітичної ділянки активного центру ферменту і називається *каталітичною специфічністю, або специфічністю шляху перетворення субстрату*. Так, молекула глюкозо-6-фосфату у клітинах печінки людини – субстрат 4 різних ферментів: фосфоглюкомутази, глюкозо-6-фосфатфосфатази, фосфоглюкозоізомерази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Але через особливості будови каталітичних ділянок цих ферментів відбувається різне перетворення цієї сполуки з утворенням 4 різних продуктів (рис. 2):

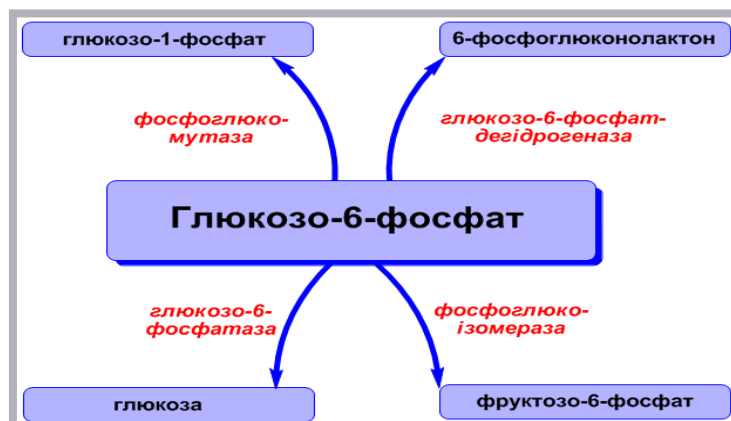


Рис. 2. Специфічність шляхів перетворення глюкозо-6-фосфату

3. М'які умови перебігу реакцій:

А. Термолабільність. З підвищенням температури середовища швидкість ферментативної реакції збільшується, досягаючи максимуму за певної оптимальної температури, а далі спадає до нуля (рис. 3). Для більшості хімічних реакцій справедливий закон Я. Вант-Гоффа: з підвищенням температури на кожні 10 °С швидкість реакції збільшується у 2–3 рази. Ця закономірність є справедливою і для ферментів, однак тільки в обмеженій ділянці значень температур, в основному в інтервалі від 0 до 50 °С.

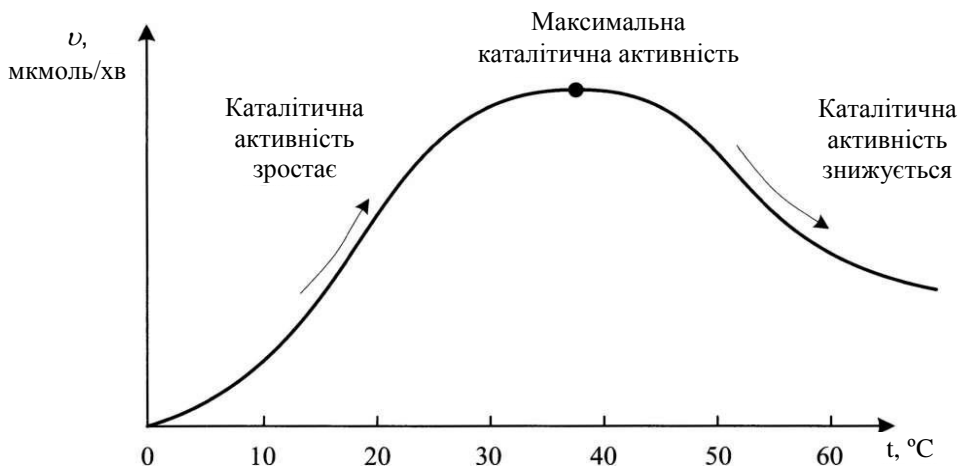


Рис. 3. Графік залежності швидкості ферментативної реакції від температури

Біохімічні процеси в живому організмі відбуваються у вузькому інтервалі температур 36–42 °С (для людини). За вищих температур відбувається процес денатурації білків, а за нижчих – перебіг ферментних процесів сповільнюється, що пов'язано зі збільшенням в'язкості внутрішньо- та міжклітинних рідин.

Є й термостабільні ферменти. Наприклад, аденілаткіназа витримує короткочасну температуру 100 °С без інактивації. Мікроорганізми, що мешкають у гарячих джерелах, містять багато білків, у тому числі й ферменти, що мають високу термостабільність. Такі ферменти є глікопротеїнами, оскільки вуглеводний компонент надає білку термостійкості. Окремі ферменти інактивує холод. Проте деякі ферменти не підпорядковуються цим закономірностям. Так, фермент каталаза найактивніший за температур, що наближаються до 0 °С.

Вплив температури на активність ферментів важливий для розуміння процесів життєдіяльності. Зі зниженням температури деякі тварини впадають у стан сплячки, або анабіозу. Швидкість ферментативних реакцій у цьому стані сповільнюється, що забезпечує малу витрату накопичених організмом поживних речовин і зниження активності клітинних функцій. Зігрівання тіла прискорює перебіг ферментативних реакцій і повертає організм тварин до активної діяльності.

Штучне охолодження організму, так звану гібернацію, використовують у клініці для проведення хірургічних операцій, зокрема у кардіохірургії. Охолодження тіла уповільнює швидкість ферментативних реакцій, що сприяє зменшенню витрат речовин і тривалішому збереженню життєздатності клітин організму.

Підвищення температури тіла, наприклад, при інфекційних захворюваннях, прискорює біохімічні реакції, що каталізуються ферментами. Неважко підрахувати, що підвищення температури тіла на кожен градус збільшує швидкість реакції приблизно на 20 %. За високих температур, близько 39–40 °С, марнотратне використання ендогенних субстратів у клітинах хворого організму обов'язково потребує їх надходження з їжею. Крім того, за температури близько 40 °С частина найбільш термолабільних ферментів може інактивуватися, що порушує природний перебіг біохімічних процесів. Отже, знання термозалежності ферментативних реакцій дає змогу використовувати їх у практичній діяльності лікаря;

Б. Залежність каталітичної активності ферменту від величини рН.

Швидкість ферментативних реакцій при збільшенні рН різко зростає і, досягнувши певного максимуму, знову різко падає. Концентрація іонів H^+ , за якої швидкість реакції мак-

симальна, є оптимальною для функціонування даного ферменту. Оптимум рН для різних ферментів неоднаковий. Проте значна частина ферментів клітин має оптимум рН, близький до нейтрального.

Для кожного ферменту існує певний вузький інтервал рН середовища, що є оптимальним для проявів його вищої активності. Наприклад, оптимальне значення рН для пепсину – 1,5–2,5; трипсину – 6,5–7,5; амілази слини – 6,8–7,2; аргінази – 9,7–10; кислій фосфатази – 4,5–5,0; сукцинатдегідрогенази – 9,0.

Ферменти глікоконезу для своєї каталітичної активності потребують меншого значення рН, ніж ферменти гліколізу, що закономірно поєднується із закисленням організму при голодуванні.

Залежність швидкості ферментативної реакції від рН свідчить переважно про стан функціональних груп активного центру ферменту. Зміна рН середовища впливає на іонізацію функціональних груп амінокислотних залишків активного центру, які беруть участь або у зв'язуванні субстрату (в контактній ділянці), або в його перетворенні (у каталітичній ділянці). Тому специфічний вплив рН може бути зумовлений зміною спорідненості субстрату до ферменту або каталітичної активності ферменту чи тим і іншим разом.

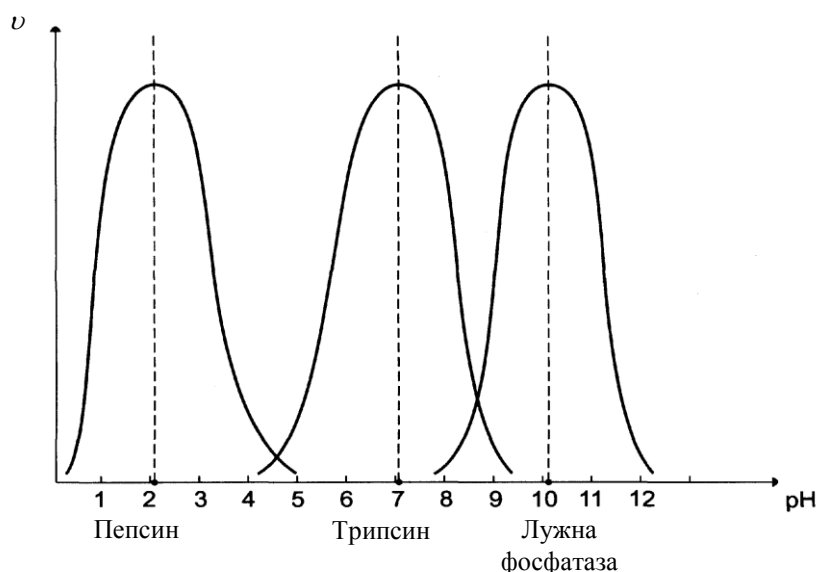


Рис. 4. Залежність швидкості ферментативної реакції від рН середовища

4. Регуляція швидкості реакції.

Зазвичай кожен метаболічний шлях має свої ключові ферменти, які називають регуляторними, оскільки завдяки їм відбувається регуляція швидкості всього шляху. Ці ферменти можуть каталізувати початкові або незворотні, або найповільніші реакції, вони також розташовуються в точках розгалуження метаболічного шляху. Впливаючи на такі ферменти модифікаторами (активаторами чи інгібіторами) можна змінити швидкість перебігу не лише однієї реакції, а й усього метаболічного шляху.

В *табл. 2* наведено схожість та відмінність дії неорганічних каталізаторів та ферментів.

Таблиця 2

Схожість та відмінність ферментів і неорганічних каталізаторів

Схожість	Відмінність
<ol style="list-style-type: none"> 1. Каталізують тільки енергетично можливі реакції. 2. Не змінюють напрямку реакції. 3. Прискорюють настання рівноваги реакції, але не зрушують її. 4. Не витрачаються у процесі реакції 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Висока швидкість ферментативної реакції. 2. Висока специфічність. 3. Прояв активності у м'яких умовах. 4. Можливість регулювання швидкості реакції. 5. Швидкість ферментативної реакції пропорційна кількості ферменту. 6. Ферменти є білками, що мають велику Mr (від 10 тис. до 1 млн а.о.м.).

Схожість	Відмінність
	Ферментативні реакції проходять без утворення побічних продуктів. Кооперативність, жорстка послідовність ферментативних реакцій

Будь-які зміни зовнішнього чи внутрішнього середовища вимагають включення адаптаційних процесів, що реалізуються, першою чергою, через зміну швидкості тієї чи іншої ферментативної реакції. Докладно про те, як здійснюється контроль метаболізму шляхом регуляції активності ферментів, описано у розділі «Регуляція активності ферментів».

Кінетика ферментативних реакцій

Залежність швидкості ферментативних реакцій від концентрації субстрату та ферменту.

Рівняння Міхаеліса–Ментен. Константа Міхаеліса, її визначення та значення

Дія ферментів, як було сказано вище, полягає у зниженні енергії активації реакції. Тут визначальну роль відіграє утворення проміжного продукту (інтермедіату) між метаболізуючою речовиною S (субстратом) і ферментом (ензимом) E та утворення активованого комплексу (фермент-субстратного): $S + E = [ES]$.

Цей комплекс не є хімічною сполукою як такою. У ньому ще не зникли існуючі в молекулах вихідних речовин зв'язки і не утворилися нові. Відбулася тільки деформація електронних хмар атомів, які взаємодіють у напрямку утворення нових зв'язків, а колишні, внаслідок цього, ослаблені. По суті, в результаті тісного контакту «фермент–субстрат» досягається необхідна орієнтація й зближення реагуючих груп у межах активного центру, що створюється певною конфігурацією білкової молекули. У цей активний центр входить реагуюча з ферментом молекула – субстрат. Реакція переходить із міжмолекулярного режиму у внутрішньомолекулярний, котрий виключає ентропійні втрати.

Високий енергетичний бар'єр некаталітичного процесу розбивається як мінімум на два менших, тому що в цьому випадку реагуючі частки виявляються зближеними й зорієнтованими ще до початку реакції. У результаті енергетична діаграма реакції складається із двох максимумів, що відповідають двом різним фермент-субстратним комплексам і трьох мінімумів, що відповідають субстрату, інтермедіату й продуктам (рис. 5а).

Характерною рисою ферментативного каталізу є те, що швидкість ферментативної реакції збільшується до певної постійної величини (v_{max}). Типова крива залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату C_s (при $C_F = const.$) представлена на рис. 5б. Як видно при низьких концентраціях субстрату реакція має по ньому перший порядок, а при високих – нульовий і швидкість стає максимальною.

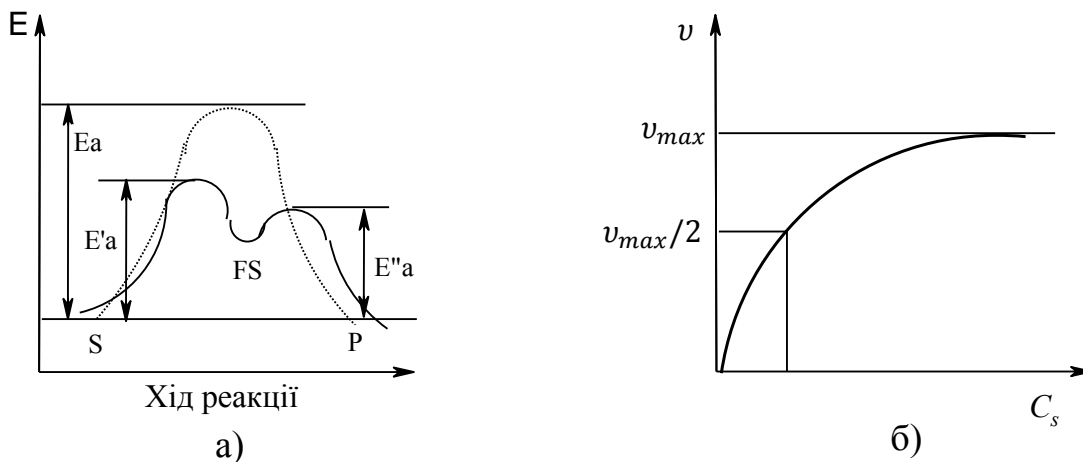
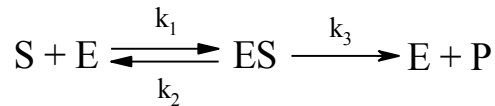


Рис. 5. Ферментативна реакція: а – енергетична діаграма ферментативної реакції; б – залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату

У 1913 році Л. Міхаеліс і М. Ментен висунули теорію, що пояснює цю залежність. Ферментативний процес можна представити схемою:



де E і S – фермент (ензим) і субстрат; P – продукт реакції; k_1 – константа швидкості утворення інтермедіату; k_2 – константа швидкості його розпаду; k_3 – константа швидкості переходу проміжного комплексу в продукт реакції й фермент.

Швидкості перебігу всіх стадій можна записати таким чином:

$$v_1 = k_1[E][S]; \quad v_2 = k_2[ES]; \quad v_3 = k_3[ES]$$

У стані рівноваги:

$$k_1[ES] = k_2[ES] + k_3[ES] = (k_2 + k_3)[ES]$$

Розв'язуючи це рівняння відносно ES і розуміючи, що початкова швидкість утворення продукту пропорційна концентрації проміжного комплексу $v_0 = k_3[ES]$, знайдемо вираження для швидкості ферментативної реакції:

$$v_3 = \frac{k_3[E][S]}{K_M + [S]},$$

або, використовуючи величину максимальної швидкості, тобто швидкості, при якій фермент повністю існує у вигляді комплексу [ES]: $[E]_0 = [ES]$, одержуємо:

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]},$$

де $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$ – константа Міхаеліса (K_M). Її величина залежить від pH, температури й природи субстрату. У кінетичних дослідженнях K_M визначається експериментально й дорівнює тій концентрації субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює половині максимальної:

$$v = \frac{v_{max}}{2} = K_M,$$

Кінетична константа k_3 у рівнянні $v_{max} = k_3[E]_0$ називається числом обертів ферменту, що показує кількість молекул субстрату, що перетворились на продукт реакції в одиницю часу (за секунду) в умовах, коли весь фермент перебуває у вигляді комплексу [ES]. Число обертів більшості ферментів становить $0,5 \times 10^4 \text{ с}^{-1}$.

Але, наприклад, для карбоангідрази, як одного з найактивніших ферментів, число обертів складає $6 \times 10^5 \text{ с}^{-1}$. Це означає, що 10^{-6} М розчин карбоангідрази може каталізувати утворення 0,6 моля H_2CO_3 з CO_2 та H_2O за секунду, тобто, $v_{max} = 0,6$ моль/л·с.

Як було зазначено раніше, при низьких концентраціях субстрату реакція має по ньому перший порядок, а при високих – нульовий і швидкість стає максимальною. Отже, для двох граничних випадків можемо записати:

$$v = (v_{max}/K_M)[E] - \text{коли } [E] \ll K_M;$$

$$v = v_{max} - \text{коли } [E] \gg K_M$$

K_M та v_{max} – важливі характеристики ферменту.

v_{max} постійна для кожного ферменту та характеризує ефективність його дії.

K_M відрізняється для різних ферментів та характеризує спорідненість ферменту відносно субстрату.

При оцінці спорідненості ферменту до субстрату слід пам'ятати, що чим нижче K_M , тим швидше та переважніше субстрат зв'язується з ферментом, тобто тим вище його спорідненість до даного субстрату.

Значення константи Міхаеліса, величина максимальної швидкості й число обертів ферменту приводяться як кількісні характеристики ферментативної реакції конкретної фермент-субстратної системи в певних умовах.

У медичній практиці активність ферментів визначають з метою діагностики захворювань і контролю за процесом лікування, оскільки зміна активності ферментів у патологічних станах є виявом функціональних змін в організмі.

Так, за зміною активності ферменту аспартатамінотрансферази (АСТ) в крові можна діагностувати інфаркт міокарда в перші години захворювання з більшою точністю, ніж за допомогою методу ЕКГ. Збільшення активності ферменту АЛТ (аланінамінотрансферази) є надійним діагностичним критерієм гепатиту та цирозу печінки, а підвищення активності альфа-амілази в сечі – ознакою запалення підшлункової залози.

Структура простих і складних ферментів

Поняття про апофермент, кофактор, кофермент і простетичну групу.

Вітамінні кофактори. Особливості структури активного центру простих і складних ферментів. Алостеричний центр

Як і білки, ферменти поділяються на прості і складні.

Прості, або однокомпонентні, ферменти містять у своєму складі тільки амінокислоти. Наприклад, пепсин, трипсин, лізоцим, уреаза.

Складні ферменти (холоферменти) мають у своєму складі білкову частину, яка складається з амінокислот – **апофермент**, і небілкову – **кофактор**. Молекулярний комплекс білкової частини апоферменту та кофактора називається **холоферментом** (рис. 6).

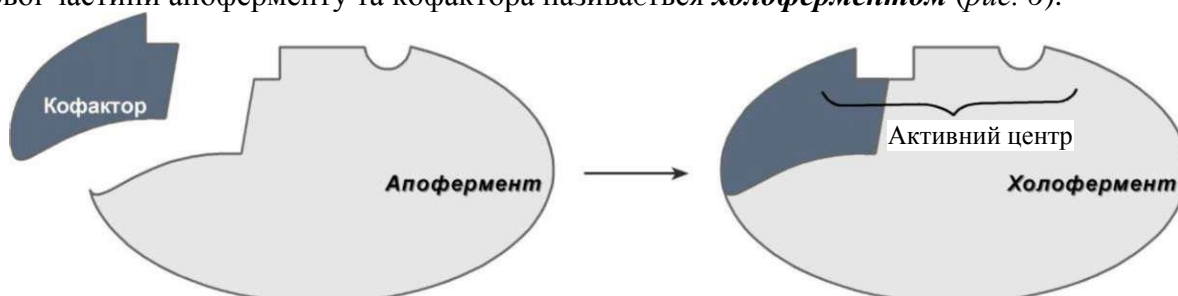


Рис. 6. Схема формування складного ферменту (холоферменту)

Кофактори – біоорганічні сполуки небілкової природи, що є необхідними для здійснення каталітичної активності ферменту, тобто перетворення субстрату в каталітичному акті. Органічні кофактори зазвичай називають **коферментами**, більшість з них є похідними вітамінів.

Роль **кофакторів** можуть відігравати біоорганічні сполуки різної хімічної природи або іони металів (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cu^{1+} та ін.). Кофактори можуть сполучатися з білковою частиною (апоферментом) міцно, ковалентними зв'язками – в цьому випадку вони є **простетичними групами** ферментного білка (піридоксальфосфат, ліпоєва кислота тощо) або утворюють комплекси з апоферментом лише в ході каталітичного процесу за допомогою нековалентних фізико-хімічних зв'язків – **коферменти** ($НАД^+$, $НАДФ^+$ та ін.).

Коферменти відповідно до їх хімічної природи поділяють на дві групи: **вітамінні** та **невітамінні**.

Найчастіше коферментами виступають похідні вітамінів (табл. 3).

Таблиця 3

Класифікація коферментів

Найважливіші коферменти

Коферментна форма	Вітамін, що бере участь	Групи, що підлягають перенесенню
Нікотинамідаденіндинуклеотид ($НАД^+$)	Нікотинамід, вітамін РР	Атоми водню (електрони)
Нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат ($НАДФ^+$)	Нікотинамід, вітамін РР	Атоми водню (електрони)
Флавінмононуклеотид, рибофлавінфосфат (ФМН)	Рибофлавін, вітамін B_2	Атоми водню (електрони)
Флавінаденіндинуклеотид (ФАД)	Рибофлавін, вітамін B_2	Атоми водню (електрони)
Коензим А (КоА)	B_3 (пантотенова кислота)	Ацильні, ацетильні та інші групи
Тетрагідрофолієва кислота (ТГФК)	B_9 (фолієва кислота)	Метильні, метиленові, формільні групи

Коферментна форма	Вітамін, що бере участь	Групи, що підлягають перенесенню
Карбоксибіотин	Вітамін Н, біотин, вітамін В ₇	Двоокис вуглецю (активна форма СО ₂)
Тіаміндифосфат (ТДФ) Тіамінтрифосфат (ТТФ) Тіамінмонофосфат (ТМФ)	Тіамін, вітамін В ₁	Альдегіди та кетони
Піридоксальфосфат (ПФ)	Піридоксин, вітамін В ₆	Аміногрупи Карбоксильні групи Карбоксильні групи – реакції відщеплення (елімінування) та конденсації у бокових ланцюгах амінокислот
Дезоксіденозил- та метилкобаламін (В ₁₂ -коферменти)	Ціанкобаламін, вітамін В ₁₂	Реакції ізомеризації та переміщення метильних груп
Убіхінон (коензим Q)	Вітамін Q (убіхінон)	Атом гідрогену, протони та електрони

Вихідними речовинами для утворення коферментів першої групи є вітаміни, тому недостатнє надходження їх в організм із їжею відразу позначається на синтезі цих коферментів, унаслідок чого порушується і функція відповідних складних ферментів. Коферменти другої групи утворюються з проміжних продуктів обміну, тому нестачі цих коферментів у фізіологічних умовах не буває, і функція ферментів, з якими вони пов'язані, не порушується.

Невітамінні коферменти:

1. Нуклеотидні (УДФ-глюкоза, інші нуклеотидні похідні вуглеводів, спиртів тощо).
2. Фосфати моносахаридів (глюкозо-1,6-дифосфат, 2,3-дифосфогліцерат).
3. Металопорфіринові (геми).
4. Пептидні (глутатіон).

Кофактори в ході реакцій виконують наступні функції:

– беруть участь у формуванні третинної структури білка та забезпечують комплементарність між ферментом та субстратом;

– можуть безпосередньо залучатися в реакції як ще один субстрат. У цій ролі зазвичай виступають органічні коферменти. Їх участь у реакції іноді зводиться до того, що вони виступають як донори або акцептори визначених хімічних груп.

Відомо, що більш ніж 25 % із відомих ферментів є металовмісними або металозалежними. Ферменти, що містять у своєму складі метали, без них не будуть проявляти хімічної активності. *Металоферменти* зустрічаються в різних класах ферментів. Іон металу може входити в активний центр ферменту або бути зв'язаним із залишками амінокислот апоферменту, що розміщені на певній відстані від активного центру. Крім участі в окисно-відновних процесах метали сприяють формуванню вищих структур апоферменту, які також є необхідними для функціонування ферменту. Ці структури стабілізуються шляхом утворення сольових містків між іонами металів і карбоксильними групами амінокислот. Такі функції здебільшого виконують метали постійної валентності. Наприклад, іони кальцію стабілізують альфа-амілазу, іони цинку – алкогольдегідрогеназу (за відсутності цинку остання дисоціює на субодиниці й втрачає активність) (рис. 7).

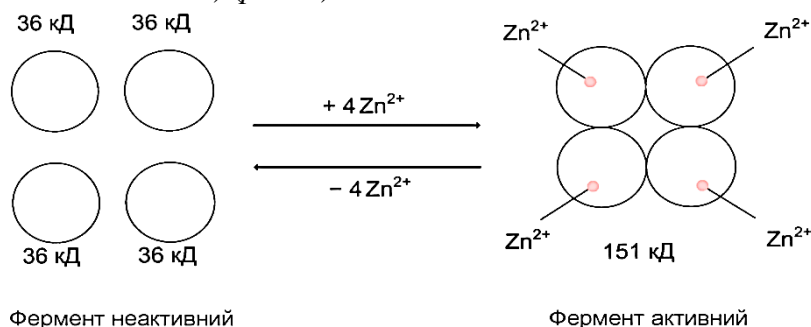


Рис. 7. Стабілізація четвертинної структури алкогольдегідрогенази йонами цинку

Наведемо приклади ферментів, що містять як кофактори метали (табл. 4).

Таблиця 4

Металоферменти та відповідні метали-кофактори

Фермент	Метал
Алкогольдегідрогеназа, вугільна ангідраза	Цинк
Аргіназа, амінопептидаза	Марганець
Аскорбатоксидаза	Мідь
Цитохромоксидаза	Мідь, залізо
Ксантинооксидаза	Молібден
Фосфатаза	Магній
Супероксиддисмутаза	Мідь, цинк

Багато ферментних білків складаються з декількох **субодиниць (протомерів)**, що являють собою різні поліпептидні ланцюги, сполучені нековалентними зв'язками – **олігомерні ферменти**.

Кожна із субодиниць або окремі їх частини відіграють певну роль у процесі функціонування ферменту. Прості (однокомпонентні) ферменти здійснюють ферментативне перетворення субстрату з участю власне білкової молекули. Безпосередню участь у реакції бере не весь поліпептидний ланцюг ферменту, а тільки незначна його частина, що близько прилягає до субстрату. У ферментативну реакцію включається тільки декілька залишків амінокислот. Ці залишки можуть розташовуватися в поліпептидному ланцюзі як поруч, так і далеко один від одного, але просторово вони повинні бути досить зближені.

Наприклад, фермент рибонуклеаза, що розщеплює РНК, має структуру, яка скріплюється чотирма дисульфідними зв'язками (на рисунку заштриховано). У каталітичному центрі ферменту у 12 і 119 положенні поліпептидного ланцюга знаходяться два залишки гістидину, але вони просторово зближені і можуть спричиняти розрив молекули РНК. На близькій відстані від залишків гістидину знаходиться ще 5 залишків основних амінокислот, які, очевидно, можуть фіксувати РНК під час реакції (рис. 8).

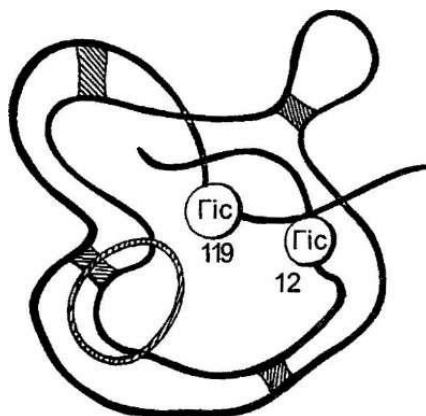


Рис. 8. Схема структури рибонуклеази

Та частина молекули ферменту, яка сполучається із субстратом, називається **активним центром ферменту**. Активний центр відповідає за специфічну спорідненість ферменту із субстратом, утворення фермент-субстратного комплексу і каталітичне перетворення субстрату. У складі активного центру простого ферменту знаходиться приблизно 15–21 залишків амінокислот. Активний центр утворюють залишки таких амінокислот, як серин, цистеїн, гістидин, тирозин, лізин та деякі інші, що надають ферменту як просторової, так і електричної спорідненості із субстратом. В утворенні тимчасового комплексу між ферментом і субстратом важлива роль належить дисульфідним, іонним, а також слабким зв'язкам (водневі зв'язки, гідрофобна взаємодія).

Активний центр складних (двокомпонентних) ферментів містить у своєму складі як кофермент, так і ту частину апоферменту, що просторово прилягає до нього. Кофермент при цьому може відповідати за утворення зв'язку із субстратом, формування третинної або четвертинної структури апоферменту і каталітичне перетворення субстрату. Ферменти можуть мати 1, 2, 3 і більше активних центрів, що залежить від кількості протомерів (субодиниць), які входять у його структуру.

В активному центрі ферменту умовно розрізняють так звану *каталітичну ділянку*, де відбувається каталітичне перетворення субстрату, і контактну, або *якірну*, що зв'язує фермент з субстратом. Схема розташування складових компонентів активного центру показана на *рис. 9*.

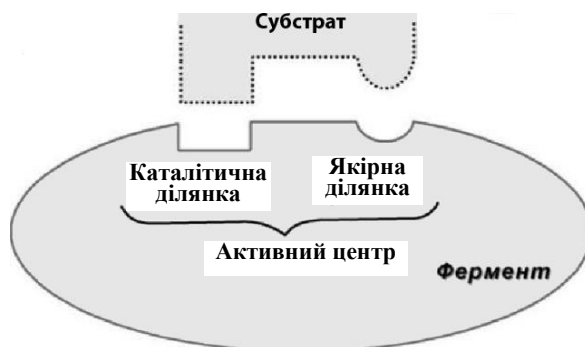


Рис. 9. Схематичне зображення ділянок активного центру ферменту

За утворення активного центру ферменту, як і за його каталітичну дію, відповідає третинна структура білкової молекули. Отже, при порушенні третинної структури (денатурація) просторово роз'єднуються поєднані амінокислотні залишки, що утворювали активний центр і, як наслідок, фермент втрачає активність.

Алостеричні центри.

Крім активних центрів, у ферментах можуть бути ще так звані *алостеричні центри* (від грец. *allos* – інший, другий; *stereo* – просторовий, структурний). Алостеричні центри служать місцем впливу на фермент різних регуляторних чинників, тому їх ще називають регуляторними центрами, а речовини, що взаємодіють з алостеричним центром, отримали назву ефекторів (*рис. 10*).

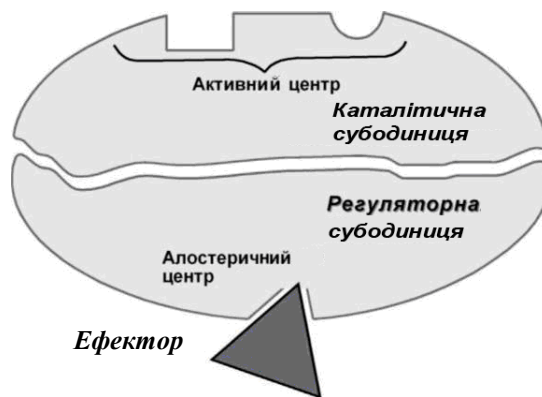


Рис. 10. Схематичне зображення алостеричного ферменту

Приєднання до алостеричного центру ефектора призводить до певних структурних змін в активному центрі та, як наслідок, до пригнічення або підвищення активності ферменту. Ефекторами можуть служити продукти ферментативних реакцій, гормони, медіатори нервової системи, метали. Фермент може мати декілька алостеричних центрів. Важливо зазначити, що алостеричні й активні центри у ферментах просторово відокремлені, тобто знаходяться один від одного на певній відстані.

Одиниці виміру активності та кількості ферментів

Оскільки кількість ферменту в біологічному об'єкті в більшості випадків визначити неможливо, для характеристики швидкості біохімічної реакції, що каталізується певним ферментом, за умов сталості інших показників середовища (фізико-хімічних параметрів, концентрації активаторів та інгібіторів) користуються значеннями **активності ферменту**.

Одиниці активності ферментів – умовні величини, що базуються на лінійній залежності швидкості ферментативної реакції від кількості ферменту (або кількості його молекул, що перебувають у каталітично активному стані).

1. У біохімічній практиці загальноприйнятими є **одиниці активності ферменту**.

Одиницею активності ферменту (U – unit; англ.) є така його кількість, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв:

$$1 U = 1 \text{ мкмоль/хв.}$$

2. При використанні одиниць системи СІ (SI) активність ферменту виражають в *каталах* (кат). 1 катал – така кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 моля субстрату за 1 с:

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль/с.}$$

3. Розповсюдженою одиницею є *питома активність ферменту*, яка визначається кількістю одиниць ферментної активності, що припадають на 1 мг білка в біологічному об'єкті ($U/\text{мг}$ білка).

У медичній ензимології активність ферменту часто виражають в *одиницях* (U) на 1 л біологічної рідини, що досліджується, – сироватки крові, слини, сечі тощо ($U/\text{л}$).

Ферменти, що містяться у клітинах, тканинах і органах, екстрагують. Під час екстракції додають необхідні стабілізатори ферментів, які оберігають їх від інактивації. Екстракт з біологічного матеріалу використовують для визначення ферментів. Плазма або сироватка крові та інші біологічні рідини є готовими розчинами ферментів, тому їх відразу використовують для визначення.

Номенклатура ферментів

Назву ферментів за тривіальною номенклатурою утворюють так: спочатку називають *субстрат*, на який діє фермент, потім *тип реакції*, яку він каталізує, і додають закінчення *-аза*. Наприклад, назва ферменту, що каталізує окиснення спиртів, утворюється так:

Алкоголь + дегідрогенізація + -аза = Алкогольдегідрогеназа.

Для деяких давно відомих ферментів залишають раніше вживані традиційні назви, наприклад: пепсин, трипсин, каталаза, амілаза тощо.

У 1961 р. Міжнародна комісія з номенклатури ферментів представила на V Міжнародному біологічному конгресі проект номенклатури, побудований на строго наукових принципах. Проект був затверджений конгресом, і нова номенклатура міцно увійшла до ферментології. Згідно з цією номенклатурою назву ферментів складають з хімічної назви субстрату і назви тієї реакції, яку каталізує фермент. Якщо хімічна реакція, що прискорюється ферментом, супроводжується перенесенням угруповання атомів від субстрату до акцептора, назва ферменту включає також хімічну назву акцептора.

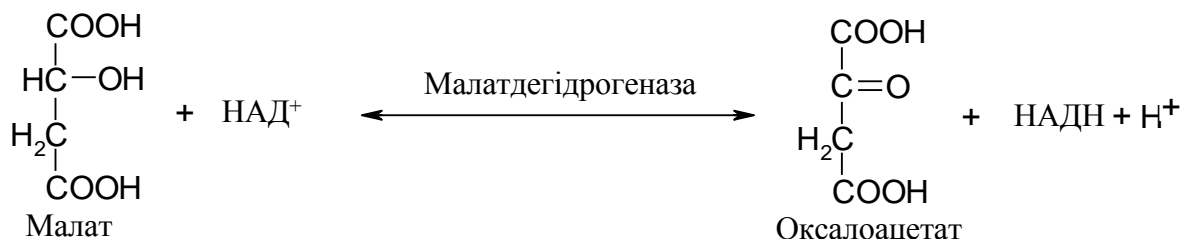
Наприклад, піридоксальфермент, що каталізує реакцію трансамінування між L-аланіном і α -кетоглутаровою кислотою, має назву L-аланін-2-оксоглутарат-амінотрансфераза. У даній назві відмічено відразу три особливості: 1) субстратом є L-аланін; 2) акцептором служить 2-оксоглутарова кислота; 3) від субстрату до акцептора передається аміногрупа.

Класифікація ферментів

Віднесення ферменту до певного класу залежить від того, який тип хімічної реакції він каталізує. Усі ферменти поділяють на шість основних класів, які в свою чергу ще поділяють на певні підкласи. Деякі найважливіші класи ферментів та їх окремі представники наведено в *табл. 5*.

Оксидоредуктази – ферменти, що каталізують реакції окиснення-відновлення за участю 2 субстратів (перенос електронів або атомів водню з одного субстрату на інший). Субстрат, який окислюється оксидоредуктазами, розглядають як донор водню. Це дуже поширений клас, що налічує близько 480 ферментів, які відіграють важливу роль в енергетичних процесах. Оксидоредуктази поділяють на 17 підкласів. Наведемо приклади найпоширеніших підкласів.

Дегідрогенази. У цей підклас входять ферменти, що каталізують реакції дегідрування (відщеплення гідрогену). Акцептором електронів виступають коферменти НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН. Всі ферменти цього підкласу виявляють високу субстратну специфічність. Приклад реакції:



Таблиця 5

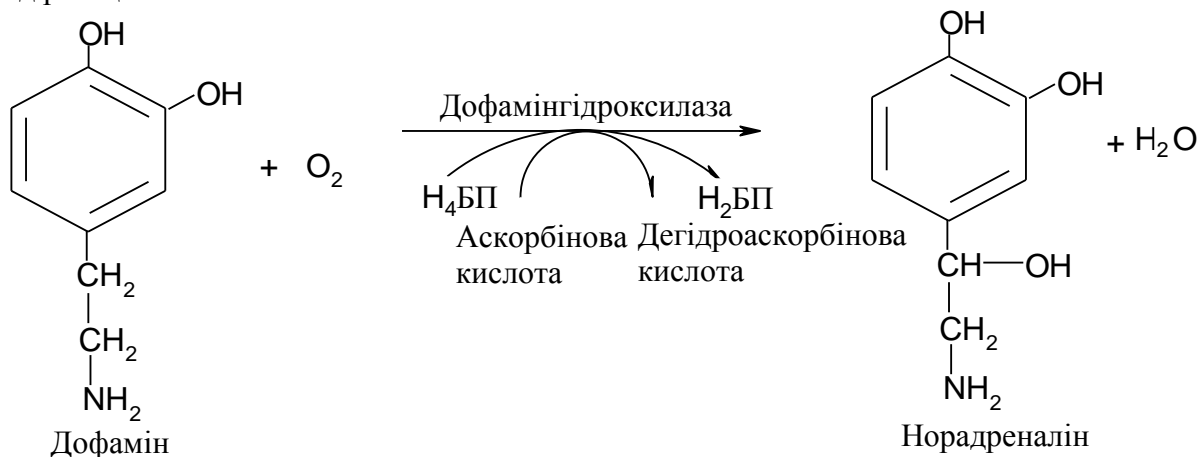
Класифікація ферментів

№	Клас	К-сть	Тип хімічного перетворення	Приклади ферментів та їх дія
1	Оксидоредуктази	480	Окисно-відновні реакції	Лактатдегідрогеназа – перетворення лактату на піруват. Оксигенази – приєднання молекули кисню до субстрату. Пероксидази – перетворення пероксидних продуктів на окиснений субстрат
2	Трансферази	480	Перенесення функціональних груп від одного субстрату до іншого та іонів крізь біологічні мембрани	Амінотрансфераза – перенесення аміногруп. Піруваткіназа – перенесення фосфатної групи. Na ⁺ ,K ⁺ -АТФ-ази – транспорт іонів Na ⁺ , K ⁺ крізь мембрану
3	Гідролази	460	Розрив зв'язків у субстратах з приєднанням води (гідроліз)	АТФ-аза – гідроліз АТФ. Амілаза – гідроліз вуглеводів. Пепсин – гідроліз білків
4	Ліази	230	Розрив зв'язків у субстратах без приєднання води або окиснення	Піруватдекарбоксилаза – перетворення пірвіноградної кислоти на ацетальдегід і вуглекислий газ
5	Ізомерази	80	Перетворення субстрату на його ізомер	Глюкозофосфатізомераза – перетворення глюкозо-6-фосфату на фруктозо-6-фосфат
6	Лігази (синтетази)	80	Реакції сполучення двох молекул (синтез) з використанням енергії АТФ	Аспарагінесинтетаза – утворення аспарагіну з аспартату і амоніаку

Оксидази. Акцептором електрона є молекула O₂. Приклад реакції, що каталізується цитохромоксидазою:

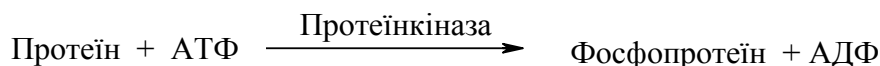
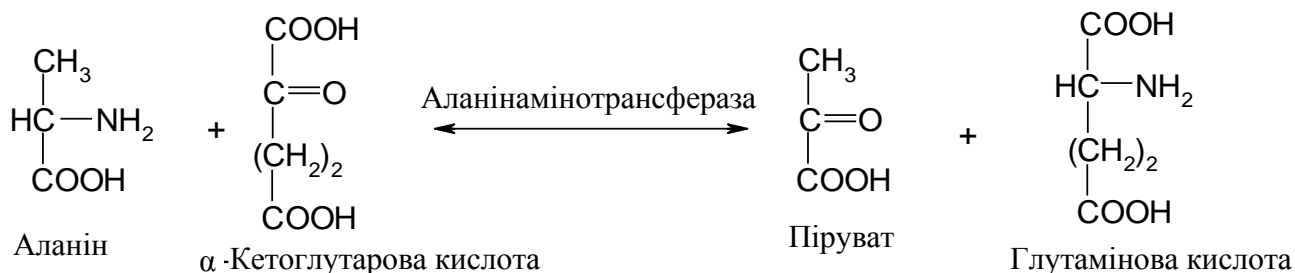


Оксигенази (гідроксилази) – атом окисену з молекули O₂ приєднується до субстрату. Приклад реакції:

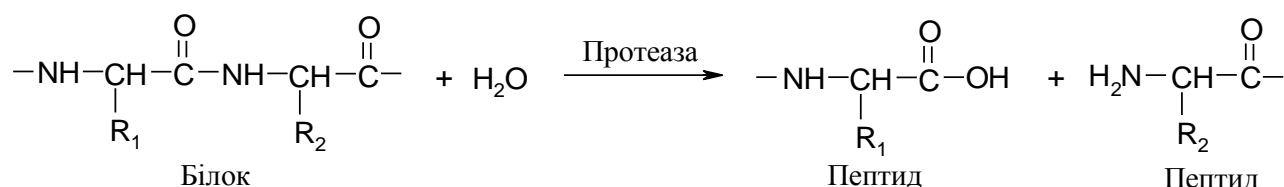


Систематичну назву ферментів цього класу складають так: донор, акцептор-оксидоредуктаза.

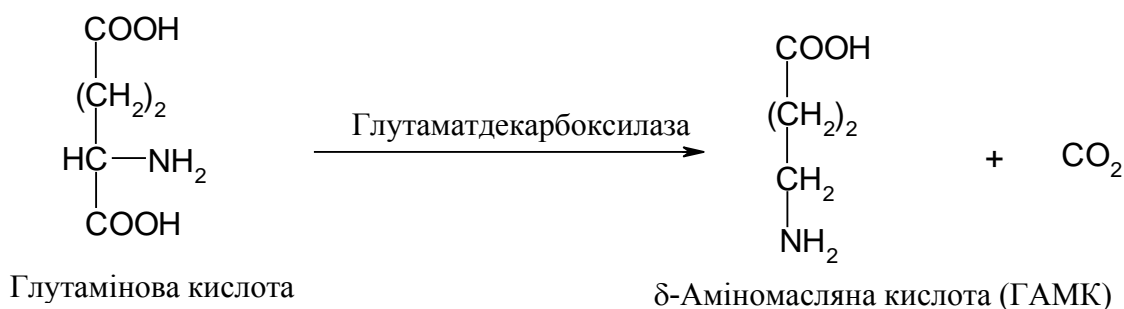
Трансферази – так само поширені ферменти, як і оксидоредуктази. Вони беруть участь у реакціях взаємоперетворення різних речовин, синтезі мономерів, знешкодженні природних і синтетичних сполук. Ці ферменти каталізують реакції перенесення різних груп від одного субстрату (донора) до іншого (акцептора). Трансферази поділяють на 8 підкласів залежно від будови груп, які вони переносять. Ферменти, що каталізують перенесення метильних груп, називають *метилтрансферазами*, аміногруп – *аміотрансферазами* і т. д. Систематичну назву складають за зразком: акцептор—група—трансфераза або донор—група—трансфераза. Найчастіше донором у реакціях, що каталізуються трансферазами, є кофактор, що містить групу, яка підлягає перенесенню. Приклади реакцій:

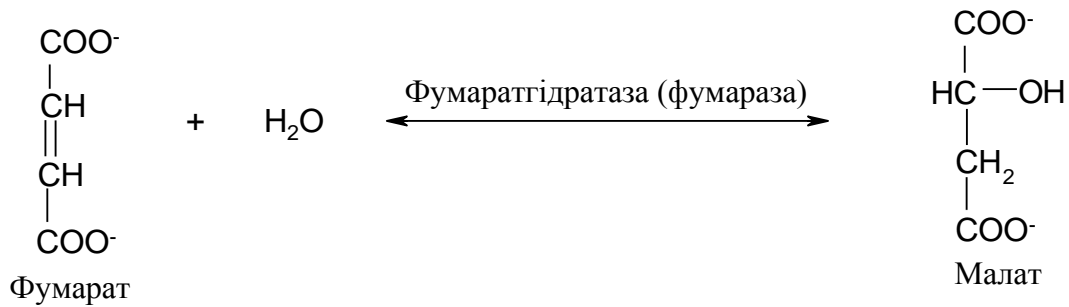


Гідролази – ферменти, що каталізують розщеплення зв'язків у субстратах з приєднанням води. Клас гідролаз налічує близько 460 ферментів. Зокрема, це травні ферменти, ферменти, що входять до складу лізосом та інших органел клітини, де вони сприяють розпаду великих біомолекул на прості. Ферменти цієї групи поділяють на 11 підкласів. Тривіальну назву гідролаз утворюють шляхом приєднання до назви субстрату закінчення *-аза*. Систематична назва обов'язково містить термін *гідролаза*. Загалом їх також можна віднести до трансфераз, оскільки гідроліз можна розглядати як перенесення специфічної групи субстрату, що є донором, на молекулу води, що виступає акцептором. Проте роль води як акцептора вважають головною в дії цих ферментів, тому їх виділено в окремий клас гідролаз. Приклад реакції:

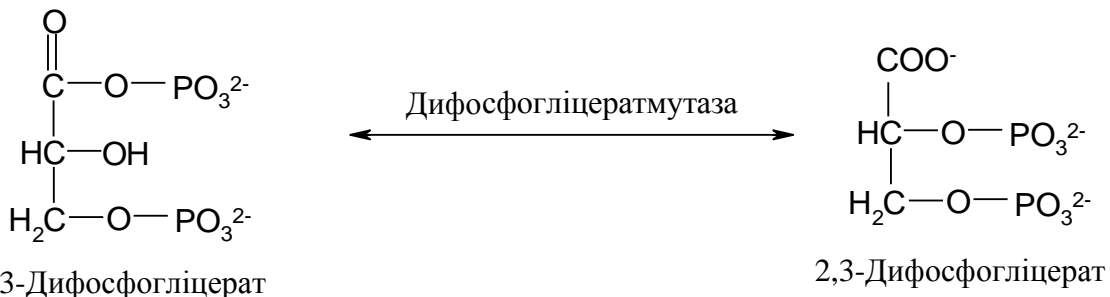
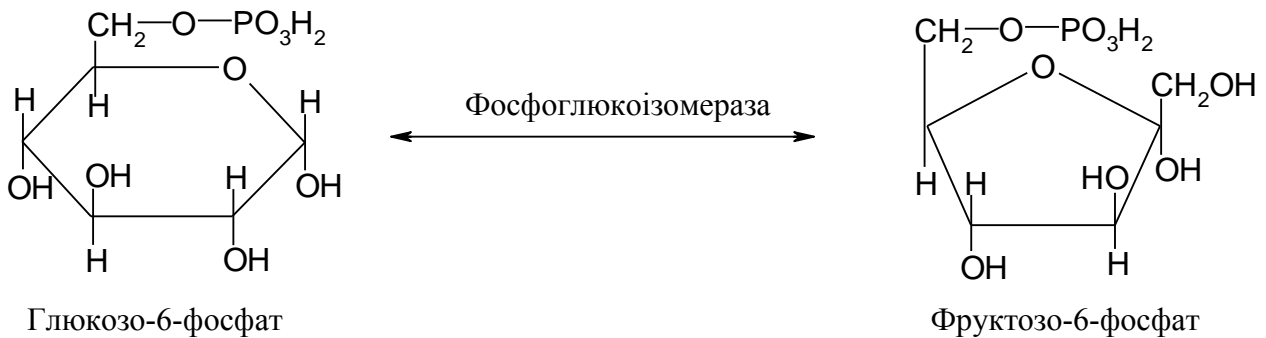


Ліази – ферменти, що каталізують реакції відщеплення від субстратів негідролітичним шляхом певних груп (CO₂, H₂O, -NH₂, -SH₂ та ін.), або ті, що приєднують молекулу води по подвійним зв'язкам. Систематичну назву утворюють за принципом субстрат—група—ліаза. У тривіальних назвах ліаз вказують особливість участі груп у реакціях: *карбоксилаза* (приєднання карбоксильної групи), *дегідратаза* (видалення молекули води від субстрату) тощо. Приклади реакцій:





Ізомерази – ферменти, що каталізують перетворення в межах однієї молекули. Вони зумовлюють внутрішньомолекулярні перебудови. Це невелика група ферментів (трохи більше 80), яка відіграє важливу роль у відновленні біологічної активності молекул, у переключенні використання метаболітів на різних шляхах обміну речовин. Ізомеразы поділяють на п'ять підкласів. Назви ферментів складають залежно від типу реакції ізомеризації: *мутази, таутомеразы, рацемазы, епімеразы, ізомеразы* і т. д. Приклади реакцій:



Лігази (синтетази) – ферменти, що каталізують сполучення двох молекул з використанням енергії фосфатного зв'язку. Джерелом енергії в реакціях, каталізованих синтетазами, є АТФ або інші нуклеозидтрифосфати. Лігази (всього їх налічується близько 80) поділяють на п'ять підкласів. Приклад реакції:



Механізм ферментативних реакцій

За всю історію ензимології було запропоновано багато гіпотез, що пояснювали механізм дії ферментів. Більшість із них має суто історичний характер і не витримала випробувань у світлі нових даних про структуру ферментів та їх активного й алостеричного центрів. За-

слуговує уваги гіпотеза, що запропонована на початку XX ст. О. Варбургом і У. Бейлісом. Її значення полягає в тому, що вона пов'язувала механізм дії ферментів із дією неорганічних каталізаторів. Ця гіпотеза пояснювала, що поверхня ферменту служить місцем для адсорбції реагентів. За цих умов різко зростає кількість молекул субстрату, що припадає на одиницю площі ферменту, а отже, за законом діючих мас зростає і швидкість реакції. Також припускалось, що в результаті зв'язування субстрату з активним центром ферменту відбуваються механічні зміни молекул субстрату, що призводить до більшої реакційної здатності. Але *адсорбційна гіпотеза* не могла пояснити специфічності дії ферментів.

Для пояснення специфічності дії ферментів у 1894 р. Е. Фішер запропонував гіпотезу, яку ще й досі називають гіпотезою «ключа і замка» або гіпотезою «шаблону». В основі специфічності, за цією гіпотезою, лежить жорстка просторова відповідність субстрату і активного центру ферменту. За Е. Фішером реакція можлива тільки в тому випадку, якщо просторово субстрат підходить до ферменту як ключ до замка. Якщо субстрат (ключ) просторово відрізняється від структури активного центру ферменту (замок), то реакція не відбувається. Але і ця гіпотеза (*гіпотеза відповідності*) не може пояснити різні види специфічності, бо важко уявити собі ситуацію, коли декілька ключів (субстратів) підходять до одного замка (ферменту). Тому ця гіпотеза у 1958 р. була замінена і доповнена гіпотезою вимушеної співвідповідності (*гіпотеза індукованої адаптації ферменту до субстрату, «рука-рукавичка»*) Д. Кошленда. Згідно з цією гіпотезою конфігурація ферменту і його активного центру є гнучкою й еластичною, що змінюється під впливом субстрату, тобто субстрат індукує у ферменті зміни конфігурації молекул відповідно до власної структури. Але приєднання субстрату до ферменту може спричинити зміни активного центру, при яких він утворює із субстратом неактивний комплекс, і тоді реакція не відбувається. На *рис. 11* представлені зміни структури активного центру ферменту, що можуть спричинитись субстратом (за Д. Кошлендом):

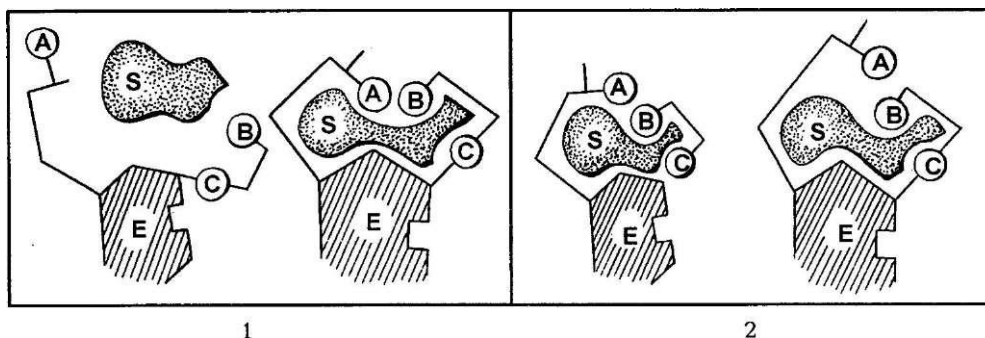


Рис. 11. Зміни структури активного центру ферменту, спричинені субстратом (схема за Д. Кошлендом): А, В, С – функціональні групи активного центру; Е – фермент; S – субстрат; 1 – активний комплекс; 2 – неактивний комплекс

Механізми каталізу

1. Кислотно-основний каталіз. В активному центрі ферменту знаходяться групи специфічних амінокислотних залишків, які є донорами або акцепторами протонів. Такі групи є потужними каталізаторами багатьох біохімічних реакцій.

Таблиця 6

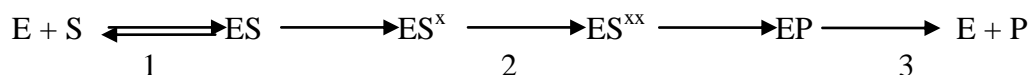
Донори та акцептори протонів

Донори	Акцептори
-COOH	-COO ⁻
-NH ₃ ⁺	-NH ₂
-SH	-S ⁻

2. Ковалентний каталіз. Ферменти реагують зі своїми субстратами, утворюючи за допомогою ковалентних зв'язків нестабільні фермент-субстратні комплекси, з яких у ході внутрішньомолекулярних перебудов утворюються продукти реакції.

Згідно з гіпотезою Міхаеліса–Ментен ферментативна реакція завжди супроводжується утворенням проміжної короткоіснуючої сполуки – фермент-субстратного комплексу. Процес

утворення комплексу описується рівнянням і має декілька стадій перебігу, кожній з яких притаманні свої особливості:



1-а стадія – зв'язування субстрату з активним центром ферменту, тобто утворення фермент-субстратного комплексу (ES);

2-а стадія – перетворення первинного фермент-субстратного комплексу на один або декілька активних фермент-субстратних комплексів (ES^x та ES^{xx});

3-я стадія – відокремлення продуктів реакції від активного центру ферменту і вивільнення ферменту та продукту (E та P).

Перша стадія за тривалістю найкоротша: вона проходить майже миттєво. За цей час субстрат орієнтується навколо активного центру й утворює з ним короткоіснуючу, неміцну проміжну сполуку. На 2-й стадії, яка є найповільнішою, відбувається «розхитування» зв'язків у молекулі субстрату, розрив їх та утворення нових із каталітичним центром ферменту. Знижується енергія активації субстрату, що зумовлює зростання швидкості його перетворення. Третя стадія за тривалістю наближається до 1-ї, і швидкість її перебігу залежить від дифузії продукту в середовище. На *рис. 12* представлена схема утворення проміжного фермент-субстратного комплексу.

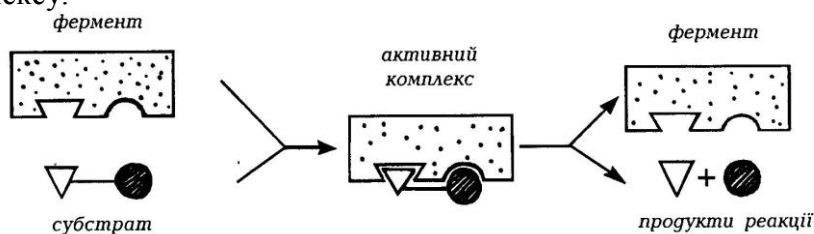


Рис 12. Схема утворення проміжного фермент-субстратного комплексу

Достовірність утворення фермент-субстратного комплексу, постульованого вперше Л. Міхаелісом, зараз доведена експериментально, математично та методами ЕПР і ЯМР (електронного парамагнітного резонансу і ядерного магнітного резонансу). Перші докази існування фермент-субстратного комплексу були одержані в лабораторії Д. Кейліна. Сучасні методи дослідження дозволяють визначити для ряду ферментативних реакцій константи швидкості утворення фермент-субстратних комплексів та їх дисоціації на фермент і продукти.

Встановлено, що в утворенні фермент-субстратних комплексів беруть участь водневі зв'язки, електростатичні та гідрофобні взаємодії. Досліджуючи рівняння Міхаеліса–Ментен, можна також вивчити кінетику ферментативних реакцій, встановити порядок реакції та стежити за впливом різних чинників на перебіг ферментативного процесу. Загалом прискорення хімічних реакцій відбувається завдяки тому, що ферменти забезпечують правильну орієнтацію молекули субстрату біля каталітичного центру, надають для каталізу протон-донорні та протон-акцепторні групи, утворюють за допомогою ковалентних зв'язків нестабільні проміжні сполуки із субстратом і викликають напруження в молекулі субстрату або її деформацію.

Типи ферментативних реакцій

1. «Пінг-понг» (рис. 13). Фермент спочатку взаємодіє із субстратом А, відбираючи у нього окремі хімічні групи і перетворюючи його на відповідний продукт. Потім до ферменту приєднується субстрат В, який одержує ці хімічні групи. Прикладом є реакції перенесення аміногруп від амінокислот на кетокислоти.

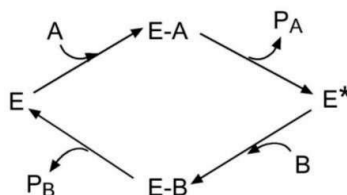


Рис. 13. Ферментативна реакція за типом «пінг-понг»

2. «Послідовних реакцій» (рис. 14). До ферменту послідовно приєднуються субстрати А і В, утворюючи «потрійний комплекс», після чого здійснюється каталіз. Продукти реакції також послідовно відщеплюються від ферменту.

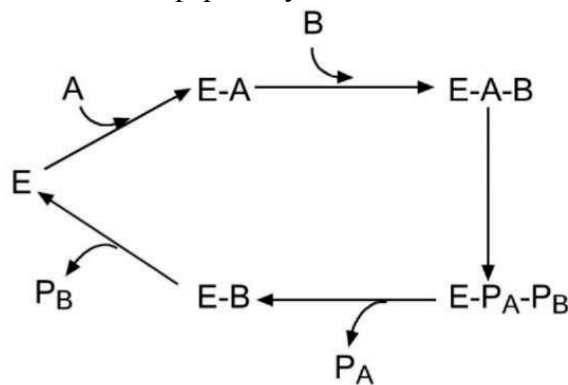


Рис. 14. Ферментативна реакція за типом «послідовних реакцій»

3. «Випадкових взаємодій» (рис. 15). Субстрати А і В приєднуються до ферменту в будь-якому порядку, неврегульовано, і після каталізу так само відщеплюються.

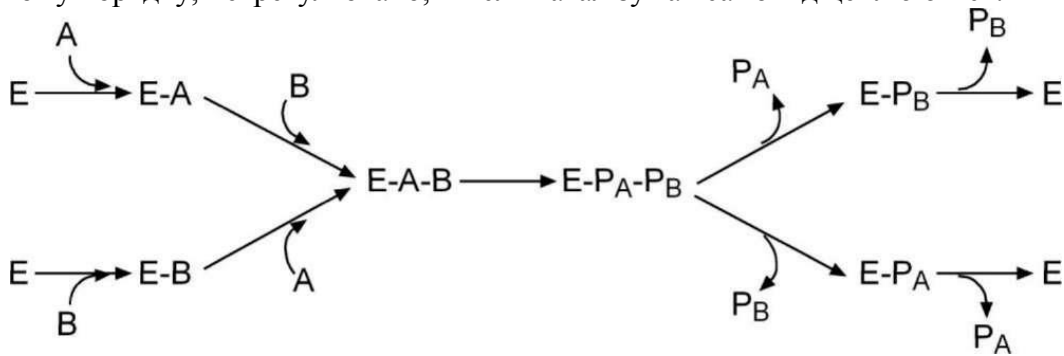


Рис. 15. Ферментативна реакція за типом «випадкових взаємодій»

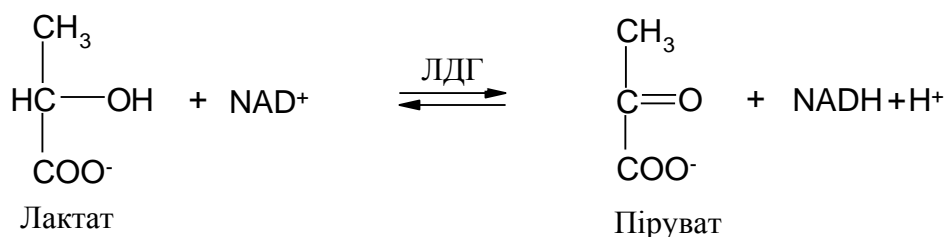
Структура та функції ізоферментів

Ферменти, що каталізують одну і ту ж хімічну реакцію, але відрізняються за первинною структурою, називають **ізоферментами**, або ізоензимами. Вони каталізують один і той же тип реакції з принципово однаковим механізмом, але відрізняються один від одного кінетичними параметрами, умовами активації, особливостями зв'язку апоферменту і коферменту.

Природа появи ізоферментів різноманітна, але найчастіше обумовлена відмінностями у структурі генів, що кодують ці ізоферменти. Отже, ізоферменти розрізняються за первинною структурою білкової молекули і, відповідно, за фізико-хімічними властивостями. На відмінностях у фізико-хімічних властивостях засновані методи визначення ізоферментів.

За своєю структурою ізоферменти в основному є олігомерними білками. Причому та або інша тканина переважно синтезує певні види протомерів. У результаті певної комбінації цих протомерів формуються ферменти з різною структурою – ізомерні форми. Виявлення певних ізоферментних форм ферментів дозволяє використовувати їх для діагностики захворювань (ЛДГ, КК, АСТ та ін.).

Фермент лактатдегідрогеназа (ЛДГ) каталізує оборотну реакцію окислення лактату (молочної кислоти) до пірувату (піровиноградної кислоти):



Лактатдегідрогеназа – олігомерний білок з молекулярною масою 134 000 Да, що складається з 4 субодиниць 2 типів: М (від англ. *muscle* – м'яз) і Н (від англ. *heart* – серце). Комбінація цих субодиниць лежить в основі формування 5 ізоформ лактатдегідрогенази (рис. 16, А). ЛДГ₁ і ЛДГ₂ найбільш активні у серцевому м'язі і нирках, ЛДГ₄ і ЛДГ₅ – у скелетних м'язах і печінці. В інших тканинах є різні форми цього ферменту.

Ізоформи ЛДГ відрізняються електрофоретичною рухливістю, що дозволяє встановлювати тканинну приналежність ізоформ ЛДГ (рис. 16, Б).

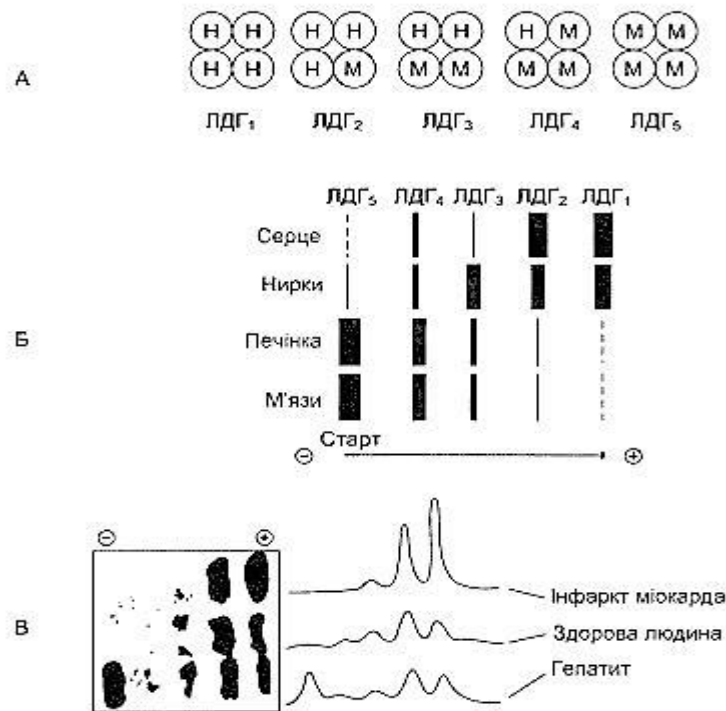


Рис. 16. Ізоформи лактатдегідрогенази:

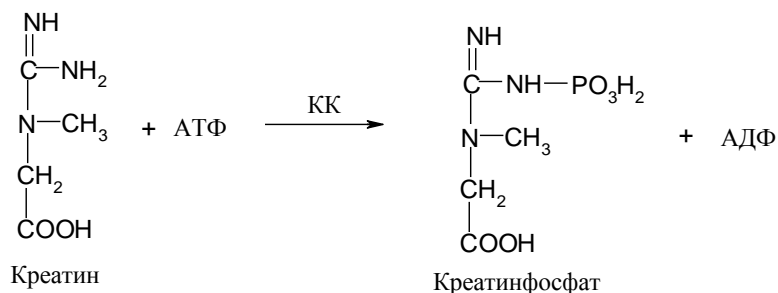
А – будова різних ізоформ ЛДГ; **Б** – розподіл на електрофореграмі і відносні кількості ізоформ ЛДГ у різних органах; **В** – кількість ізоформ ЛДГ у плазмі крові в нормі і при патології (електрофореграми – ліворуч і фотометричне сканування – праворуч)

Поява в еволюції різних ізоформ ЛДГ обумовлена особливостями окислювального метаболізму тканин. Ізоферменти ЛДГ₄ і ЛДГ₅ (М-типи ЛДГ) працюють ефективно в анаеробних умовах, ЛДГ₁ і ЛДГ₂ (Н-типи) – в аеробних, коли піруват швидко окислюється до CO₂ і H₂O, а не відновлюється до молочної кислоти.

При певних захворюваннях проводять дослідження активності ЛДГ у плазмі крові. У нормі активність ЛДГ складає 170–520 ОД/л. Підвищення активності ЛДГ спостерігається при гострих ураженнях серця, печінки, нирок, а також при мегалобластних і гемолітичних анеміях.

Для встановлення діагнозу потрібне дослідження ізоформ ЛДГ у плазмі крові методом електрофорезу. На рис. 16, В представлені електрофореграми плазми крові здорової людини, хворого на інфаркт міокарда і хворого на гепатит. Виявлення у плазмі крові тканинноспецифічних ізоформ ЛДГ використовують як діагностичний тест ушкодження цієї тканини.

Ізоформи креатинкінази. Креатинкіназа (КК) каталізує реакцію утворення креатинфосфату:



Молекула КК – димер, що складається із субодиниць двох типів: М (від англ. *muscle* – м'яз) і В (від англ. *brain* – мозок). З цих субодиниць утворюються 3 ізоферменти – ВВ, МВ, ММ. Ізофермент ВВ знаходиться переважно в головному мозку, ММ – у скелетних м'язах і МВ – у серцевому м'язі. Ізоформи КК мають різну електрофоретичну рухливість (рис. 17).

Активність КК у нормі не повинна перевищувати 90 МО/л. Визначення активності КК у плазмі крові має діагностичне значення при інфаркті міокарда (відбувається підвищення рівня МВ-ізоформи). Кількість ізоформи ММ може підвищуватися при травмах і ушкодженнях скелетних м'язів. Ізоформа ВВ не може проникнути через гематоенцефалічний бар'єр, тому у крові практично не визначається навіть при інсультах і діагностичного значення не має.

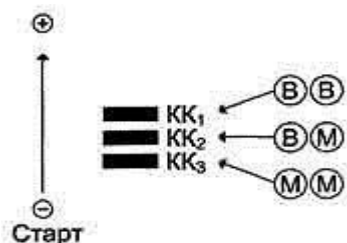


Рис. 17. Структура і електрофоретична рухливість різних ізоформ креатинкінази

Мультиферментні комплекси, їх структура та функції

Однією з принципових відмінностей ферментів від каталізаторів небіологічного походження є кооперативний характер їх дії. На рівні поодинокі молекули ферменту кооперативний принцип реалізується в тонкій взаємодії субстратного, активного і алостеричного центрів. Проте набагато більше значення має кооперативне здійснення реакцій на рівні ансамблів ферментів. Саме завдяки наявності систем ферментів – у вигляді *мультиферментних комплексів* ще складніших утворень – *метаболонів*, що забезпечують каталітичні перетворення усіх учасників єдиного метаболічного циклу – в клітинах з великою швидкістю здійснюються багатостадійні процеси як розпаду, так і синтезу органічних молекул. Ферментативний каталіз в багатостадійних реакціях йде без виділення проміжних продуктів: тільки виникнувши, вони тут же піддаються подальшим перетворенням.

Це можливо лише тому, що у клітині ферменти розподілені не хаотично, а строго впорядковано. З сучасної точки зору клітина являє собою високоорганізовану систему, в окремих частинах якої здійснюються строго визначені біохімічні процеси. Відповідно до належності їх до певних субклітинних часток або відсіків (компаратментів) клітини, в них локалізовані індивідуальні ферменти, мультиферментні комплекси, поліфункціональні ферменти або складні метаболи.

Різноманітні гідролази і ліази зосереджені переважно в лізосомах. Усередині цих порівняно невеликих (декілька нанометрів у діаметрі) бульбашок, обмежених мембраною від гіалоплазми клітини, відбуваються процеси деструкції різних органічних сполук до тих простих структурних одиниць, з яких вони побудовані.

Складні ансамблі окисно-відновних ферментів, такі, наприклад, як цитохромна система, знаходяться в мітохондріях. У цих же субклітинних частках локалізований набір ферментів циклу трикарбонових кислот.

Ферменти активування амінокислот знаходяться у гіалоплазмі, але вони є і в ядрі. У гіалоплазмі наявні численні метаболи гліколізу, структурно об'єднані з шляхами пентозофосфатного циклу, що забезпечує взаємопереключення дихотомічного і апотомічного шляхів розпаду вуглеводів. У той же час ферменти, які прискорюють перенесення амінокислотних залишків на зростаючий кінець поліпептидного ланцюга і каталізуючі деякі інші реакції у процесі біосинтезу білку, зосереджені у рибосомальному апараті клітини.

Нуклеотидилтрансферази, прискорювальні реакції перенесення нуклеотидних залишків при синтезі нуклеїнових кислот, локалізовані в основному в ядерному апараті клітини. Таким чином, системи ферментів, зосереджені в тих або інших структурах, беруть участь у здійсненні окремих циклів реакцій. Будучи тонко координовані один з одним, ці окремі цикли реакцій забезпечують життєдіяльність клітин, органів, тканин і організму в цілому.

У мультиферментних системах субстрат і проміжні сполуки від початку до кінця метаболічного циклу не залишають комплекс.

Класифікація мультиферментних систем

Розрізняють три типи мультиферментних систем :

- 1) мультиферментні комплекси (нековалентні асоціати білків);
- 2) мультиферментні кон'югати;
- 3) мембранно-зв'язані мультиферментні системи.

Прикладом *мультиферментних комплексів* є динамічні комплекси ферментів, які здатні зв'язувати одні і ті ж метаболіти. У таких системах здійснюється пряма передача інтермедіата від активного центру одного ферменту до активного центру іншого за допомогою утворення потрійного комплексу, що містить обидва ферменти і метаболіт. Показано, що такий механізм прямої передачі інтермедіата реалізується для НАД-залежних дегідрогеназ, а також ферментів, що беруть участь у гліколізі. Так, при високих концентраціях фруктозо-1,6-бісфосфату фруктозобісфосфатальдолаза утворює комплекс з димерною формою гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (ГАФД), що призводить до активації ферменту, оскільки димер ГАФД характеризується вищою каталітичною активністю порівняно з тетрамером. У такому комплексі відбувається пряме перенесення гліцеральдегід-3-фосфата, що утворюється з фруктозо-1,6-бісфосфату, на активний центр ГАФД, завдяки чому виключається вихід гліцеральдегід-3-фосфату в об'єм і його гідратація.

Прикладом *мультиферментних комплексів і одночасно мультиферментних кон'югатів* може слугувати комплекс СЖК – синтетаза жирних кислот, що складається із 7 ферментів і каталізує 8 реакцій циклу біосинтезу жирних кислот. У разі бактеріальних клітин *E. Coli* СЖК складається із 7 окремих ферментів, кожен з яких містить 1 активний центр. СЖК дріжджів складається з двох поліпептидних ланцюгів, що містять 7 активних центрів. У разі хребетних тварин спостерігається повна інтеграція ферментів комплексу: СЖК являє собою мультиферментний комплекс, що складається з одного величезного поліпептидного ланцюга ($M = 240$ кДа) і містить 7 активних центрів.

До найбільш організованих систем належать метаболони.

Метаболон – це мобільна структура, в якій об'єднані мультиферментний комплекс і елементи біомембрани (чи іншої клітинної структури, наприклад, цитоскелета). Головна особливість метаболону полягає в тому, що це структура, яка об'єднує всі ферменти певної метаболічної системи та виконує певну метаболітичну функцію.

Термін «*метаболон*» запропонований П. Шрером у 1985 році. Метаболон був визначений як тимчасовий структурно-функціональний комплекс, сформований ферментами одного метаболічного шляху, які утримуються разом нековалентними взаємодіями, а також структурних елементів клітини, таких як інтегральні мембранні білки та білки цитоскелета. Так, наприклад, існує думка про те, що асоціація гліколітичних ферментів в еритроцитах відбувається на інтегральному мембрано-зв'язаному глікопротеїні. Іншим прикладом метаболону може бути інтеграція ферментів циклу Кребса і внутрішньої мембрани мітохондрій. Якірною ділянкою цієї системи буде один із ферментів – сукцинатдегідрогеназа – інтегральний білок-фермент мітохондріальної мембрани. Накопичені дані, що свідчать на користь існування комплексів ферментів таких метаболічних шляхів, як синтез ДНК, РНК, білка, глікогену, пуринів і піримідинів, ліпідів, стероїдів, антибіотиків, метаболізм амінокислот, цикл сечовини, перенос електронів, окислення жирних кислот, деградація цАМФ.

Метаболони характерні для широкого спектра організмів – від прокаріотів до клітин вищих тварин, що свідчить про їх появу на ранніх етапах розвитку життя. Очевидно, метаболони виникли у ході передбіологічної еволюції.

Подібні комплекси не «плавають» вільно всередині клітини, а формуються на її структурних елементах (так званих «якірних білках»), утворюючи тим самим із цими елементами єдину систему. Асоціація метаболонів з клітинними структурами створює передумови для структурної єдності метаболізму. Важливим є також те, що якірні білки, на яких формуються метаболони, стають центрами управління даної метаболічної системи.

Загальні принципи організації метаболонів. Метаболон формується на біологічній підложці, роль якої можуть виконувати мембрани, структурні білки м'язів, елементи цитоскелета

і, зокрема, нитки мікротрабекулярної сітки. Однією з важливих характеристик метаболону є його симетрія, яка повинна відповідати симетрії тієї структури (підложки), на якій метаболон формується.

Фермент, який утворює «ядро» метаболону і відіграє ключову роль у формуванні комплексу, повинен відповідати таким вимогам:

а) молекула ферменту повинна мати найбільші розміри серед ферментів метаболічної системи;

б) фермент повинен бути здатним адсорбуватися на мембрані, зберігаючи при цьому каталітичну активність;

в) фермент повинен мати вісь симетрії третього порядку чи збиратися в тримери в адсорбованому стані;

г) фермент повинен проявляти здатність до самоасоціації; ця здатність означає наявність у ферменту «липких» кінців, які в умовах *in vivo* можуть насичуватися шляхом взаємодії з якірним білком підложки і з іншими ферментами метаболічної системи;

д) фермент повинен бути чутливим до дії вторинних посередників, оскільки він утворює разом з якірним білком підложки центр керування метаболону.

Для визначення взаємного розташування ферментів у метаболоні запропоновані такі принципи: ферменти, які каталізують реакції, що відбуваються одна за іншою в метаболічному шляху, повинні займати сусідні позиції в комплексі.

Ферменти, що використовують і регенерують НАД⁺, АТФ, КоА та інші коферменти, повинні знаходитися в контакті один з одним. У ряді випадків є доцільним, щоб усі ферменти, які використовують один кофермент, були розташовані поруч. Ферменти, активність яких регулюється інтермедіатами даної метаболічної системи, повинні розташовуватися в метаболоні таким чином, щоб забезпечити можливість реалізації цього регуляторного механізму.

Численні мультиферментні системи здатні автоматично підтримувати необхідну швидкість сумарної реакції. У таких системах кінцевий продукт послідовних реакцій є інгібітором першого ферменту. У результаті цього швидкість всього процесу визначається стаціонарною концентрацією кінцевого продукту.

При вивченні будови мультиферментів, тобто ферментів, що мають здатність прискорювати одночасно декілька хімічних реакцій і здійснювати складні перетворення субстрату, особливо виявляється значення просторової організації ферментів. Прикладом може служити мультифермент, що прискорює реакцію окислювального декарбоксілювання піровиноградної кислоти (ПВК). Цей мультиферментний комплекс з $M = 4\,500\,000$ Да складається з трьох видів ферментів. Перший з них (E_1) прискорює реакцію декарбоксілювання ПВК. До складу комплексу входить 12 димерних молекул цього ферменту ($M = 19\,200$ Да). Другий і третій ферменти, що каталізують окислювально-відновні процеси при окисленні ПВК, зосереджені усередині мультиферментного комплексу. Один з них (E_3) представлений шістьма димерними молекулами ($M = 112\,000$ Да), інший (E_2) – 24 протомерами ($M = 70\,000$ Да).

У результаті злагодженої в часі і просторі дії усіх трьох видів ферментів, що входять до його складу, мультифермент з великою швидкістю здійснює перетворення ПВК. *Саме в кооперативному характері каталітичного процесу і криється головна відмінність біокаталізаторів від каталізаторів неорганічної природи, саме тому інтенсивність біокаталізу в десятки, сотні і тисячі разів перевершує потужність дії неорганічних каталізаторів.*

Регуляція активності ферментів

Активність ферментів у клітині непостійна в часі. Вона чутливо реагує на ситуацію, в якій опиняється клітина, на чинники, що впливають на клітину як ззовні, так і зсередини. Головна мета цієї реакції – відреагувати на зміну довкілля, пристосувати клітину до нових умов, дати належну відповідь на гормональні та інші стимули, а в деяких ситуаціях – отримати шанс вижити.

1. Компарменталізація – це зосередження ферментів та їх субстратів в одному компартменті (одній органелі) (*табл. 7*).

Локалізація деяких ферментів усередині клітини

<i>Цитозоль</i>	<i>Мітохондрії</i>	<i>Лізосоми</i>
Ферменти гліколізу Ферменти пентозофосфатного циклу Ферменти активації амінокислот Мультиферментний комплекс синтезу жирних кислот Ферменти катаболізму пуринових і піримідинових основ Пептидази Амінотрансферази Малатдегідрогеназа Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна) Глікогенфосфорилаза Глікогенсинтетаза	Піруватдегідрогеназний комплекс Цитратсинтетаза Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна) Малатдегідрогеназа та інші ферменти циклу Кребса Ацил-КоА-дегідрогеназа та інші ферменти окиснення жирних кислот Ферменти дихального ланцюга та окиснювального фосфорилування	Кисла фосфатаза β-Глюкуронидаза α-Глюкозидаза β-Глюкозидаза Катепсини Кисла рибонуклеаза α-Галактозидаза Лізоцим Гіалуронидаза Арилсульфатаза Колагеназа
<i>Мікросомна фракція</i>	<i>Плазматична мембрана</i>	<i>Ядро</i>
НАДН- та НАДФН-цитохром С-редуктази, цитохром P ₄₅₀ - і цитохром b ₅ -оксидази, глюкозо-6-фосфатази, естерази, нуклеозиддифосфатази, глюкокуронілтрансферази, фосфогліцерид- і триацилгліцеридсинтетази, β-глюкуронидази Глюкозо-6-фосфатаза Рибосомні ферменти синтезу білка Ферменти, які беруть участь у реакціях гідроксилування Ферменти синтезу фосфоліпідів, тригліцеридів, а також деякі ферменти синтезу холестерину	Аденілатциклаза Лужна фосфатаза Na ⁺ -K ⁺ -залежна АТФаза	Ферменти, які беруть участь у процесі реплікації ДНК РНК-полімераза НАД-синтетаза
<i>Ендоплазматичний ретикулум</i>	<i>Комплекс Гольджі</i>	
Глюкозо-6-фосфатаза	Галактозилтрансфераза	

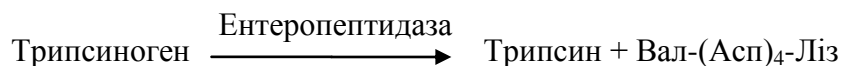
2. Доступність субстрату або коферменту. Тут працює закон дії мас – фундаментальний закон хімічної кінетики: при постійній температурі швидкість хімічної реакції пропорційна множенню концентрацій реагуючих речовин. Чи спрощено – швидкість, з якою речовини реагують одна з одною, залежить від їх концентрації.

Таким чином, зміна кількості хоча б одного з субстратів припиняє або розпочинає реакцію. Для циклу трикарбонних кислот таким субстратом є оксалоацетат.

3. Зміна кількості ферменту. Може відбуватися в результаті збільшення або зниження його синтезу. Зміна швидкості синтезу ферменту зазвичай залежить від кількості певних гормонів або субстратів реакції. Наприклад, гормон кортизол стимулює синтез ферментів глюконеогенезу, що забезпечує стабільність концентрації глюкози в крові та стійкість ЦНС до стресу. Під час вагітності та після пологів під впливом лактотропного гормону в молочній залозі активно йде синтез ферменту лактозосинтази. Зникнення травних ферментів при тривалому голодуванні та їх поява у відновний період у результаті зміни секреції кишкових гормонів. Етанол стимулює в печінці синтез «свого» (що знешкоджує етиловий спирт) ізоферменту цитохрому P-450.

4. Обмежений (частковий) протеоліз проферментів. Деякі ферменти, що функціонують поза клітинами (у шлунково-кишковому тракті або плазмі крові), синтезуються у вигляді неактивних попередників і активуються тільки в результаті гідролізу одного або декількох певних пептидних зв'язків, що призводить до відщеплення частини білкової молекули попередника.

У результаті залишку білкової молекули відбувається конформаційна перебудова і формується активний центр (трипсиноген–трипсин, пепсиноген–пепсин, прокарибосипептидаза–карбосипептидаза, інсулін, чинники згортання крові).



5. Алостерична регуляція. Алостеричні ферменти побудовані з двох і більше субодиниць: одні субодиниці містять каталітичний центр, інші є регуляторними. Приєднання ефектора до алостеричної (регуляторної) субодиниці змінює конформацію білка і активність каталітичної субодиниці.

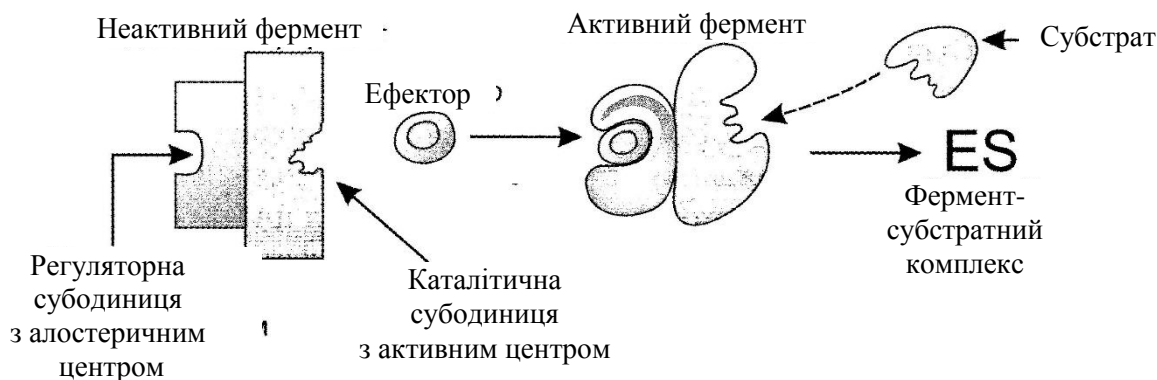


Рис. 18. Алостерична активація ферменту

Алостеричні ферменти зазвичай стоять на початку метаболічних шляхів і від їх активності залежить перебіг багатьох наступних реакцій, тому вони часто називаються ключовими ферментами.

Негативним регулятором може виступати кінцевий метаболіт біохімічного процесу, продукт цієї реакції, тобто працює механізм *зворотного негативного зв'язку*. Якщо регулятором є початковий метаболіт або субстрат реакції, то говорять про *прямую позитивну регуляцію*. Також регуляторами можуть бути метаболіти взаємозв'язаного шляху. Наприклад, фермент енергетичного розпаду глюкози фосфофруктокіназа регулюється проміжними і кінцевими продуктами цього розпаду. Водночас АТФ, лимонна кислота, фруктозо-1,6-дифосфат є інгібіторами, а фруктозо-6-фосфат та АМФ – активаторами ферменту. Регуляція алостеричних ферментів оборотна: від'єднання ефектора від регуляторної субодиниці відновлює вихідну каталітичну активність ферменту.

6. Білок-білкова взаємодія. Цей термін означає ситуацію, коли у разі регулятора виступають не метаболіти біохімічних процесів, а специфічні білки. Вплив окремих чинників на ці білки змінює їх активність, і вони зі свого боку впливають на потрібний фермент.

Наприклад, мембранний фермент аденілатциклаза є чутливою до дії мембранного G-білка, який сам активується при дії на клітину деяких гормонів (наприклад, адреналіну і глюкагону).

Іншим прикладом білок-білкової взаємодії може бути регуляція активності протеїнкінази А. Протеїнкіназа А є тетрамерним ферментом, що складається з 2 каталітичних (С) і 2 регуляторних (R) субодиниць. Активатором для протеїнкінази А є цАМФ. Приєднання цАМФ до регуляторних субодиниць ферменту призводить до зміни їх конформації та відокремлення їх від каталітичних субодиниць. Каталітичні субодиниці при цьому активуються.

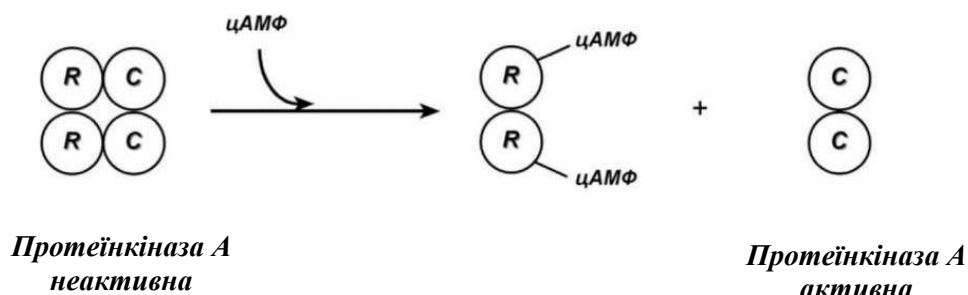


Рис. 19. Активація протеїнкінази А за допомогою цАМФ

7. Ковалентна (хімічна) модифікація полягає в оборотному приєднанні або відщепленні певної групи, завдяки чому змінюється активність ферменту. Найчастіше такою групою є фосфорна кислота, рідше метильні та ацетильні групи. Фосфорилування ферменту відбувається по залишках серину, треоніну, тирозину. Приєднання фосфорної кислоти до білка здійснюють ферменти протеїнкінази, відщеплення – протеїнфосфатази.

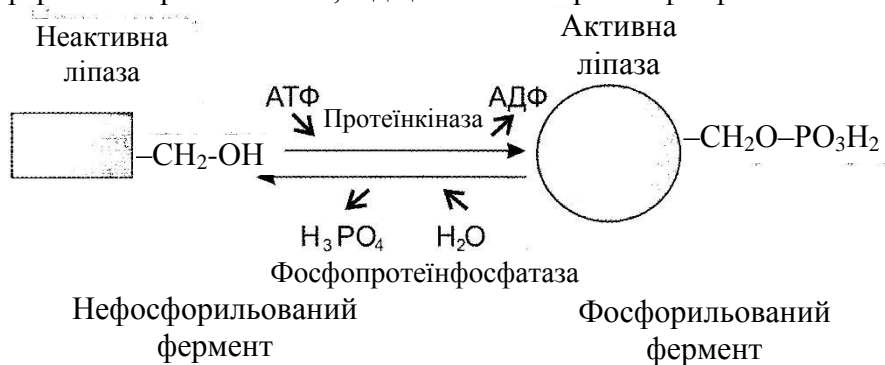


Рис. 20. Регуляція активності ліпази

Ферменти можуть бути активні як у фосфорильованому, так і дефосфорильованому стані. Наприклад, ферменти глікогенфосфорилаза і глікогенсинтаза при потребі організму у глюкозі фосфорилуються, при цьому фосфорилаза глікогену стає активною і починає розщеплення глікогену, а глікогенсинтаза неактивна. У разі необхідності синтезу глікогену обидва ферменти дефосфорилуються, синтаза при цьому стає активною, а фосфорилаза – неактивною.

Активатори та інгібітори

Ферменти, як вже зазначалося, належать до каталізаторів із регульованою активністю, тому через ферменти можна контролювати швидкість хімічних реакцій, що відбуваються в організмі. Регуляцію активності ферментів можна здійснювати шляхом взаємодії з ними різних біологічних компонентів або сполук (наприклад, ліків і отрут), які називають *модифікаторами*, або *регуляторами ферментів*. Внаслідок дії модифікаторів на фермент реакція може прискорюватися (у цьому разі їх називають **активаторами**) або сповільнюватися (тоді їх називають **інгібіторами**).

Групу активаторів становлять речовини, що впливають на ділянку активного центру ферменту. До них належать кофактори ферментів і субстрати. Кофактори (іони металів і коферменти) є не лише обов'язковими структурними елементами складних ферментів, а й по суті їх активаторами. Специфічністю участі коферментів у зв'язуванні й каталізі субстрату пояснюється активація ними ферментативних реакцій. Особливо помітним є активаційний вплив кофакторів при дії на фермент, який ненасичений кофакторами.

Субстрат також у певних межах концентрацій є активатором. Після досягнення насичувальних концентрацій субстрату активність ферменту не збільшується. Субстрат підвищує стабільність ферменту і полегшує формування потрібної конформації активного центру ферменту. Йони металів, коферменти та їх попередники й активні аналоги, субстрати можна використовувати на практиці як препарати, що активують ферменти.

Інгібітори ферментів. Інгібітори становлять значний інтерес для розуміння механізму ферментативного каталізу. Вивчення інгібування ферментативних реакцій має прикладне значення для дослідження і розшифрування механізму дії лікарських засобів, ксенобіотиків тощо.

Термін «інгібітор» потрібно використовувати тільки для тієї речовини, яка зумовлює специфічне зниження активності ферменту. Просто факт гальмування реакції ще не свідчить про те, що ми маємо справу з інгібітором. Будь-які *денатураційні агенти* також спричиняють пригнічення ферментативної реакції, тому в разі дії *денатураційних речовин* правильно говорити не про «інгібування», а про «інактивацію». Нерідко речовина у невеликих концентраціях є інгібітором, а у великих – інактиватором, отже, цей поділ дещо умовний.

Інгібітори характеризуються передусім міцністю зв'язування з ферментом. За цією ознакою інгібітори поділяють на дві групи: *оборотні* й *необоротні*.

Віднести інгібітор до однієї з двох груп можна за критерієм відновлення активності ферменту після діалізу або сильного розведення розчину ферменту з інгібітором. Необоротні інгібітори міцно зв'язуються з ферментом, і після цих процедур активність ферменту не відновлюється. Навпаки, комплекс «фермент–оборотний інгібітор» практично не утворюється та швидко дисоціює. Активність ферменту при цьому відновлюється.

За механізмом дії інгібітори ферментів поділяють на такі основні типи:

- 1) конкурентні;
- 2) неконкурентні;
- 3) безконкурентні;
- 4) субстратні;
- 5) алостеричні.

Конкурентне інгібування відбувається у разі, коли молекула інгібітору за структурою схожа на молекулу субстрату і конкурує з ним за активний центр ферменту. У випадку, коли в середовищі знаходяться молекули інгібітору, вони зв'язуються з активним центром та перешкоджають зв'язуванню молекул субстрату. Для конкурентного інгібування характерні такі основні кінетичні характеристики ферменту: K_M – збільшується, v_{max} – залишається без змін.

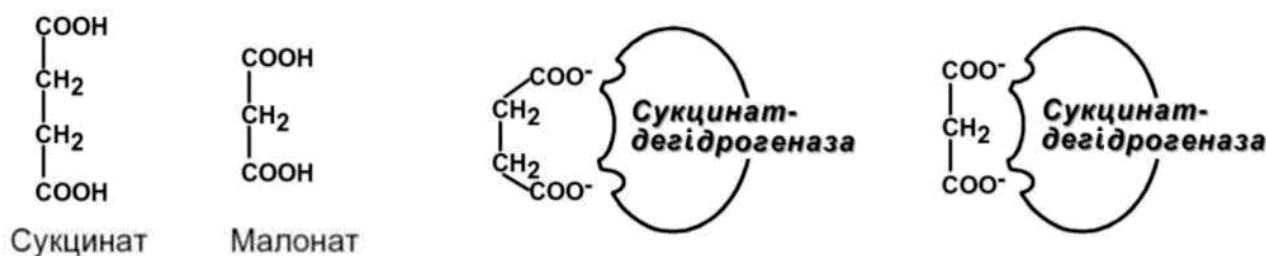
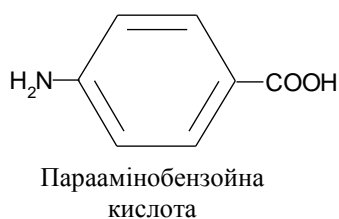
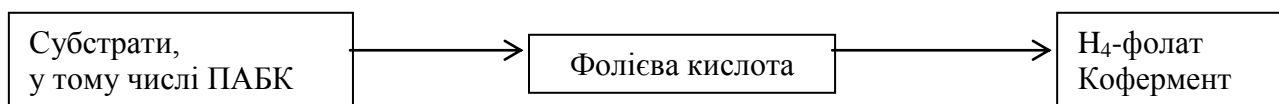


Рис. 21. Приклад конкурентного інгібування

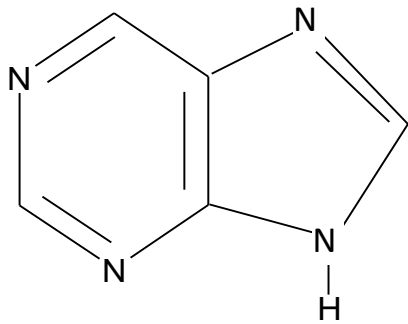
Зняти цей вид інгібування можна надлишком субстрату, тобто внесення в середовище значної кількості субстрату призводить до того, що молекули субстрату витісняють молекули інгібітору з активного центру ферменту.

Конкурентними інгібіторами можуть бути молекули екзогенного та ендogenous походження. Оскільки вони схожі за будовою на молекули субстрату, їх ще називають антиметаболітами.

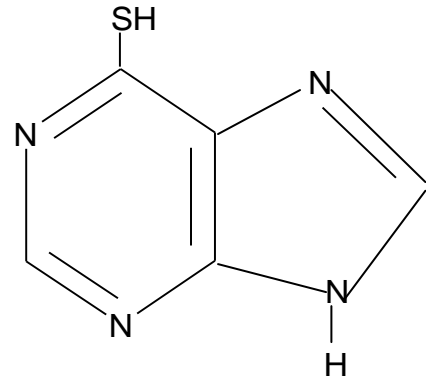
Так, наприклад, структурні аналоги параамінобензойної кислоти (ПАБК) – сульфаніламід – мають антибактеріальну дію, тому що конкурентно інгібують у бактеріальних клітинах утворення дегідрофолієвої кислоти (ДФК). Ця кислота є попередником синтезу тетрагідрофолієвої кислоти (ТГФК), яка у свою чергу необхідна для синтезу нуклеїнових кислот. Таким чином, сульфаніламідні препарати мають бактеріостатичну дію.



Іншим прикладом антиметаболіту є меркаптопурин, який є структурним аналогом пуринових азотистих основ і використовується для лікування деяких онкологічних захворювань. Дія препарату базується на тому, що при його включенні в обмін нуклеотидів порушується синтез пуринів, що, у свою чергу, інгібує синтез нуклеїнових кислот у клітинах, що проліферують в S-фазі клітинного циклу.



Пури́н



Меркаптопури́н

Конкурентне інгібування може спостерігатися при отруєнні деякими сполуками. У цьому разі знання механізмів реактивації при конкурентному інгібуванні має велике значення для пошуку підходів до лікування.

Наприклад, при отруєнні метанолом використовують значні дози етанолу, який є субстратом для алкогольдегідрогенази (АДГ). Метанол – це отрута, яка діє на нервову і судинну систему. Доза 30 мл вважається летальною. У разі отруєння метанол блокує активний центр АДГ, тому що за будовою схожий на етанол. Надлишок етанолу (діє як антидот) знімає інгібування і при вчасній допомозі сприяє одужанню пацієнта.

Аналогічний підхід використовують при лікуванні отруєння етиленгліколем – складовою частиною антифризу. Етиленгліколь під дією АДГ перетворюється на щавлеву кислоту, яка є дуже токсичною для організму людини, тому, за статистикою, щороку у світі від отруєння етиленгліколем гинуть понад 50 осіб. Використання значних доз етанолу (токсичних для здорової людини) обумовлено ефектом заміщення молекул етиленгліколю в активному центрі АДГ на етанол і блокування утворення отруйної щавлевої кислоти. У результаті етиленгліколь виводиться з організму.

На принципі конкурентного інгібування заснована дія багатьох фармакологічних препаратів, пестицидів, які використовують для знищення сільськогосподарських шкідників, та бойових отруйних речовин. Наприклад, група антихолінергічних препаратів, до яких належать похідні четвертинних амонієвих основ і фосфорорганічні сполуки, є конкурентними інгібіторами ферменту холінергази щодо його субстрату ацетилхоліну. Ацетилхолінергаза каталізує гідроліз ацетилхоліну – медіатора холінергічної системи (нервово-м'язових синапсів, парасимпатичної системи тощо) – *рис. 22*.

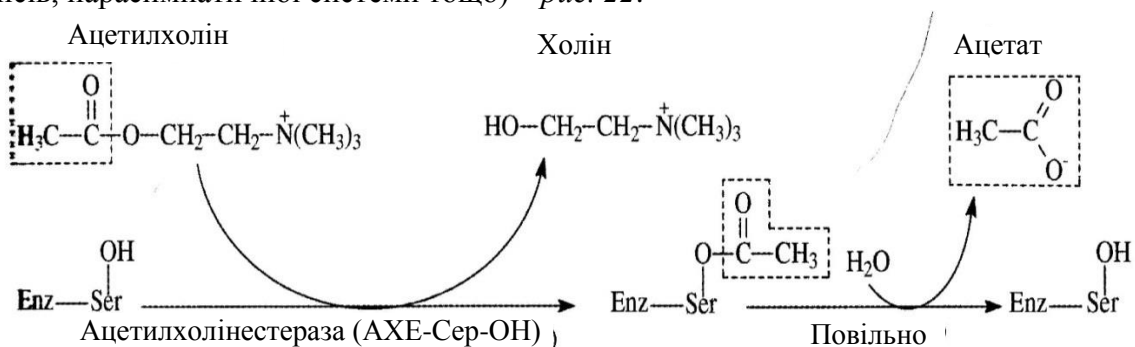


Рис. 22. Реакція, яку каталізує ацетилхолінергаза

Антихолінергічні речовини конкурують з ацетилхоліном за активний центр ферменту, зв'язуються з ним і «вимикають» каталітичну активність ферменту. Такі препарати, як «Прозерин», «Фізостигмін», пригнічують фермент оборотно, а фосфорорганічні сполуки на зразок хлорофосу, дізопропілфторфосфату, зарину, зоману діють необоротно, фосфорилуючи каталітичну групу ферменту. У результаті ацетилхоліну накопичується в синапсах, де він є медіатором нервового збудження, тобто відбувається отруєння організму ацетилхоліном.

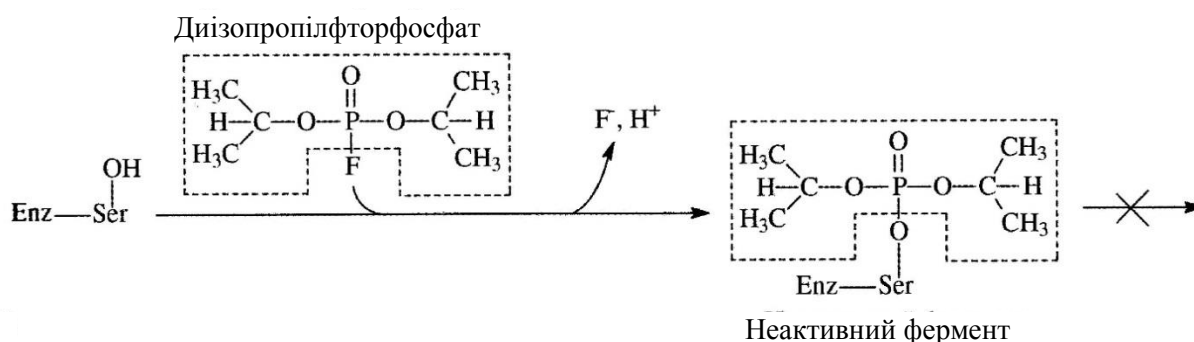


Рис. 23. Реакція необоротного інгібування АХЕ діізопропілфторфосфатом

Дія оборотних інгібіторів поступово минає, оскільки чим більше накопичується ацетилхоліну, тим швидше він витісняє інгібітор з активного центру холінестерази. Токсичність необоротних інгібіторів незрівнянно вища, тому їх застосовують для боротьби зі шкідниками сільського господарства, побутовими комахами і гризунами (наприклад, хлорофос) та як бойові отруйні речовини (наприклад, зарин, зоман та ін.).

Іншим прикладом необоротного інгібування може бути аспірин. Терапевтична дія аспірину як жарознижувального та протизапального засобу пояснюється тим, що він інгібує один з ферментів, який каталізує синтез простагландинів. Простагландини – речовини, які беруть участь у розвитку запалення. Інгібування зумовлено ковалентною модифікацією NH₂-групи, яка входить до активного центру ферменту – простагландинсинтетази.

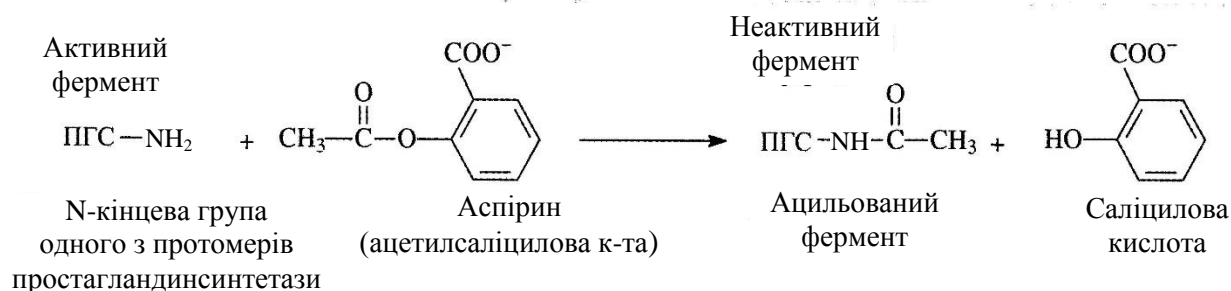


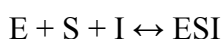
Рис. 24. Взаємодія аспірину з ферментом простагландинсинтетазою

Вибірково «вимикаючи» той чи інший фермент, можна проводити своєрідний аналіз участі конкретного ферменту в обміні речовин. Явище конкурентного інгібування відкриває можливість для пошуку антиметаболітів, які, маючи конфігурацію, подібну до істинного субстрату, можуть потрапляти в категорію конкурентних інгібіторів. Антиметаболіти перспективні як специфічні фармакопрепарати.

Проте не можна забувати, що конкурентні відносини можливі не лише між субстратом та інгібітором, а й між інгібітором і коферментом.

Антикоферменти – аналоги коферментів, не здатні виконувати їх функцію, також діють як конкурентні інгібітори, виводячи з ладу ті молекули ферменту, з якими вони взаємодіють. Антикоферменти (чи їх попередники антивітаміни) широко використовують і в біохімічних дослідженнях, і в медичній практиці як ефективні ліки.

Неконкурентним інгібуванням ферментів називають гальмування, пов'язане з впливом інгібітору на каталітичне перетворення, але не на зв'язування субстрату з ферментом. Неконкурентний інгібітор або зв'язується безпосередньо з каталітичними групами активного центру ферменту, або, взаємодіючи з ферментом поза активним центром, змінює конформацію активного центру так, що зачіпає структуру каталітичної ділянки, перешкоджаючи взаємодії з ним субстрату. Оскільки неконкурентний інгібітор не впливає на зв'язування субстрату, на відміну від конкурентного інгібування може утворитися потрійний комплекс ферменту (E), субстрату (S) та інгібітору (I):



Механізм інгібування полягає в тому, що після такого зв'язування відбуваються конформаційні зміни в активному центрі, який у подальшому не може нормально функціонувати та перетворювати S у P.

При неконкурентному інгібуванні K_M – не змінюється, v_{max} – зменшується.

За будовою неконкурентний інгібітор не схожий на молекулу субстрату, тому зняти цей вид інгібування надлишком субстрату неможливо. Для цього існують спеціальні сполуки – реактиватори, які міцно зв'язують інгібітор і, таким чином, звільняють фермент від нього.

Прикладами неконкурентного інгібування можуть бути:

1. Дія іонів важких металів (ртуті, свинцю, кадмію та ін.), які блокують SH-групи активного центру. Зняти таке інгібування допомагають реактиватори – SH-комплексони (цистеїн, димеркаптопропанол). Ці сполуки містять SH-групи, які зв'язують іони важких металів (рис. 25):

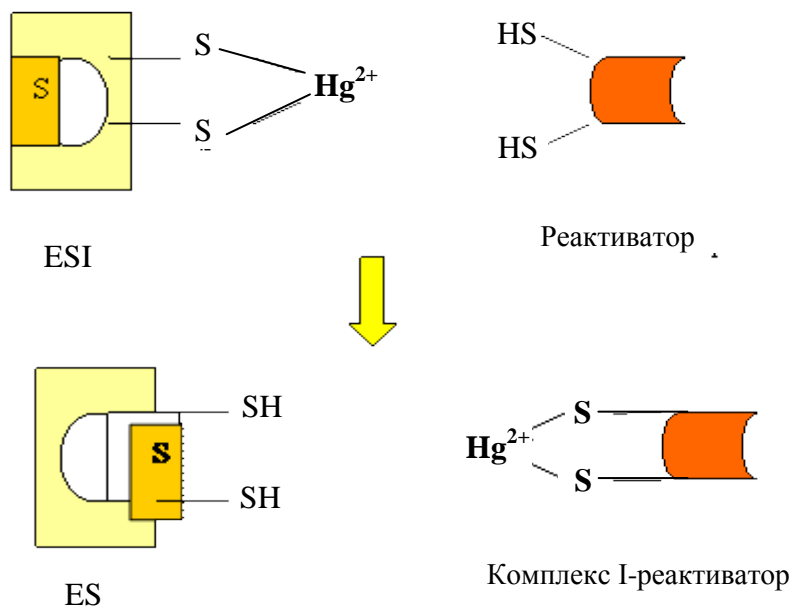


Рис. 25. Механізм дії реактиватора

2. Дія ціанідів CN^- , які реагують з Fe^{3+} , що входить до складу цитохромоксидази – ферменту дихального ланцюга мітохондрій і повністю блокують синтез АТФ у клітині.

Важкі метали лише у невеликих концентраціях відіграють роль неконкурентних інгібіторів. У великих концентраціях вони виступають як інактиватори (діють як денатуруючі агенти).

Неконкурентні інгібітори застосовують як фармакологічні засоби, отруйні речовини для боротьби зі шкідниками сільського господарства та у воєнних цілях. У медицині застосовують препарати, що містять меркурій, арсен, бісмут, які неконкурентно інгібують ферменти у клітинах організму або хвороботворних бактерій, чим і визначається той чи інший їх ефект.

Безконкурентним інгібуванням називають гальмування ферментативної реакції, яке зумовлено приєднанням інгібітору лише до комплексу фермент-субстрат. Безконкурентний інгібітор не взаємодіє з ферментом за відсутності субстрату. До того ж інгібітор полегшує приєднання субстрату, а далі, зв'язуючись сам, інгібує фермент. Таке інгібування трапляється рідше, ніж розглянуті вище.

Субстратне інгібування – це гальмування ферментативної реакції, спричинене надлишком субстрату, що відбувається унаслідок утворення фермент-субстратного комплексу, не здатного до каталітичних перетворень. Субстратне гальмування спричинене надлишком субстрату, тому нівелюється у разі зниження його концентрації.

Алостеричні інгібітори зв'язуються з окремими ділянками ферменту поза активним центром. Алостерична регуляція характерна тільки для особливої групи ферментів з четвертинною структурою, що мають регуляторні центри для зв'язування алостеричних ефекторів.

Алостеричними ефекторами ферментів частіше виступають різні метаболіти, а також гормони, іони металів, коферменти. В окремих випадках роль алостеричного ефектора фер-

ментів виконують молекули субстрату. У таких ферментах, очевидно, активний центр за конфігурацією подібний до алостеричного, але останній не має каталітичної ділянки, передбачається, що в них однакові лише контактні ділянки, чим вони й відрізняються від активного центру ферменту.

Деякі ферменти мають по кілька алостеричних центрів: одні з них специфічні до алостеричних інгібіторів, інші – до активаторів. Причому специфічність зв'язування активаторів та інгібіторів зі своїми алостеричними центрами може бути різною, як і в активних центрів: або абсолютною, тобто тільки до одного ефектора, або груповою, тобто до групи близьких за будовою ефекторів. Це ще раз доводить, що алостеричний центр – це своєрідний активний центр, позбавлений каталітичної ділянки. Чим більше алостеричних центрів і ефекторів, тим чутливіше реагує фермент на зміни в обміні речовин.

Механізм дії алостеричних інгібіторів на фермент полягає у зміні конформації активного центру. Зниження швидкості ферментативної реакції є наслідком збільшення K_M та зменшення максимальної швидкості (v_{max}) насичувальних концентрацій субстрату, тобто фермент частково втрачає свою активність.

Алостеричні активатори, навпаки, полегшують перетворення субстрату в активному центрі ферменту, що супроводжується або зменшенням K_M , або підвищенням максимальної швидкості (v_{max}).

Алостеричні ферменти відрізняються від інших ферментів особливою кривою залежності швидкості реакції від концентрації субстрату, що нагадує криву насичення гемоглобіну киснем і свідчить про те, що активні центри субодиноць функціонують не автономно, а кооперативно, тобто спорідненість кожного наступного активного центру до субстрату визначається мірою насичення попередніх. Узгоджену роботу центрів зумовлюють алостеричні ефектори.

Алостеричні ферменти мають велике значення в обміні речовин клітини. Вони відіграють ключову роль у метаболізмі, оскільки чутливо реагують на зміну в обміні речовин і регулюють швидкість проходження речовин по цілій системі ферментів.

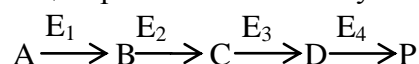
Медична ензимологія

У медичній ензимології виділяють три напрями:

- ензимопатологія;
- ензимодіагностика;
- ензимотерапія.

Ензимопатологія вивчає молекулярні хвороби, причина виникнення яких пов'язана з дефіцитом або повною відсутністю ферментів (ензимопатії). На сьогодні відомо більш ніж 1000 ензимопатій різних видів обміну (фенілкетонурія, альбінізм, гомоцистинурія, глікогенози тощо).

Набуті ензимопатії, як і взагалі протеїнопатії, мабуть, спостерігаються при всіх хворобах. При первинних ензимопатіях дефектні ферменти успадковуються в основному за аутосомно-рецесивним типом. Гетерозиготи найчастіше не мають фенотипічних відхилень. Первинні ензимопатії зазвичай відносять до метаболічних захворювань, оскільки відбувається порушення окремих метаболічних шляхів. При цьому розвиток захворювання може відбуватися по одному з перерахованих нижче «сценаріїв». Розглянемо умовну схему метаболічного шляху:



Речовина А в результаті послідовних ферментативних реакцій перетворюється на продукт Р. При спадковій недостатності будь-якого ферменту, наприклад E_3 , можливі різні порушення метаболічних шляхів, таких як утворення кінцевих продуктів та накопичення субстратів-попередників.

Накопичення субстратів-попередників. При недостатності ферменту будуть накопичуватися певні речовини, а також у багатьох випадках сполуки-попередники. Збільшення концентрації субстратів-попередників дефектного ферменту – провідна ланка розвитку багатьох захворювань.

Наприклад, захворювання алкаптонурия, при якому порушено окислення гомогентизинової кислоти у тканинах (гомогентизинова кислота – проміжний метаболіт катаболізму тирозину). У таких хворих спостерігають недостатність ферменту окислення гомогентизинової кислоти – діоксигенази гомогентизинової кислоти, що призводить до розвитку захворювання. У результаті збільшується концентрація гомогентизинової кислоти та виведення її із сечею.

Порушення утворення кінцевих продуктів та накопичення субстратів-попередників. Відзначають захворювання, коли одночасно недостатність продукту та накопичення вихідного субстрату призводять до клінічних проявів. Наприклад, у людей з хворобою Гірке (глікогеноз I типу) спостерігають зниження концентрації глюкози у крові (гіпоглікемія) в перервах між прийомами їжі. це пов'язано з порушенням розпаду глікогену в печінці внаслідок дефекту ферменту глюкозо-6-фосфатази. Одночасно у таких людей збільшуються розміри печінки (гепатомегалія) внаслідок накопичення в ній не використаного глікогену.

Детальне вивчення молекулярних причин і наслідків цих захворювань наближає до розроблення ефективних методів діагностики та терапії.

Ензимодіагностика дає змогу використовувати визначення активності ферментів у біологічних рідинах людини для встановлення діагнозу. Найчастіше використовується визначення активності ферментів крові.

Кількість молекул ферменту в клітині визначається співвідношенням двох процесів – швидкостями синтезу та розпаду білкової молекули ферменту. У клітинах існують два типи ферментів:

1. *Конститутивні* – обов'язковий компонент клітини, синтезуються з постійною швидкістю у постійних кількостях.

2. *Адаптивні*, утворення яких залежить від певних умов. Серед них виділяють ферменти, що індукуються та репресуються

Індуцибельні, – це, як правило, ферменти з катаболічною функцією. Їх утворення може бути спичинене або прискорено субстратом даного ферменту. *Репресованими* зазвичай бувають ферменти анаболічної спрямованості. Інгібітором (репресором) синтезу цих ферментів може бути кінцевий продукт даної ферментативної реакції.

Ферменти крові умовно поділяють на три групи:

Індикаторні (клітинні, маркерні) – локалізовані у клітинах тканин, потрапляють у кров у результаті фізіологічного старіння та руйнування клітин або внаслідок підвищення проникності клітинних мембран. У крові знаходиться декілька десятків індикаторних ферментів. У нормі клітинні ферменти у крові мають невелику активність та не виконують специфічних функцій. При надходженні у кров вони інактивуються протеазами сироватки та тканин. Активність цих ферментів збільшується при ураженні органів, коли спостерігається потужна руйнація клітинних мембран. Ферменти цієї групи поділяються на неспецифічні та органоспецифічні.

Неспецифічні індикаторні ферменти каталізують універсальні реакції метаболізму та локалізовані у більшості органів та тканин. Органоспецифічні ферменти знаходяться лише в тих органах і тканинах, де відбуваються специфічні реакції, властиві лише для клітин цього органа. Саме тому підвищення активності цих ферментів у крові свідчить про органну локалізацію патологічного процесу.

Секреторні (плазмоспецифічні) – синтезуються у печінці, виділяються у кров, де виконують певні фізіологічні функції (ферменти системи згортання крові, фібринолізу, холінестераза, церулоплазмін, протеази ренін-ангіотензинової та калікреїнової систем тощо).

Екскреторні – синтезуються у печінці, підшлунковій залозі, слизовій оболонці кишечника. Поява цих ферментів у крові пов'язана з природною руйнацією клітинних структур, у яких вони утворюються (лужна фосфатаза, лейцинамінопептидаза, ентерокіназа, ГГТП, трипсин, ліпаза та ін.).

Виділяють декілька типів змін активності ферментів у крові: гіперферментемія, гіпоферментемія та дисферментемія.

Гіперферментемія – підвищення активності ферментів у сироватці крові. Більшість захворювань супроводжуються гіперферментемією, причинами якої може бути наступне:

- підвищення проникності клітинних мембран;
- некроз тканин;

- підвищення швидкості синтезу ферменту в тканині;
- збільшення кількості клітин, які продукують фермент.

Гіпоферментемія – зниження активності ферментів крові, що є результатом пригнічення синтезу ферментів у тканинах. Цей вид зміни активності ферментів характерний лише для окремих ферментів, наприклад, холінестерази.

Дисферментемія характеризує появу деяких ферментів у крові, активність яких у нормі відсутня. Такі зміни можуть бути притаманні для деяких органоспецифічних ферментів, наприклад, сорбітолдегідрогенази, фруктозомонофосфатальдолази та ін.

Для діагностики захворювань внутрішніх органів найчастіше визначають активність таких ферментів сироватки крові, як амінотрансферази (АсАТ та АлАТ), лактатдегідрогенази, креатинфосфокінази (КФК, креатинкіназа), альдолази, лужної фосфатази, амілази та деяких інших, а також ізоферментів (ЛДГ, КФК, лужної фосфатази, амілази та ін.).

Існують різноманітні методи визначення активності ферментів, у яких використовуються спектрофотометричні, флюорометричні, фотометричні методи. Для визначення активності ізоферментів, наприклад, ЛДГ та КФК, використовують імунологічні, хроматографічні та електрофоретичні методи.

Нижче наведені можливі причини зміни активності деяких ферментів крові (табл. 8).

Таблиця 8

Зміна активності ферментів сироватки крові

№	Фермент	Хвороби та стани, які супроводжуються зміною активності	
		Підвищення	Зниження
1	Амінотрансферази (АлАТ, АсАТ)	1. Ураження клітин печінки при гострому вірусному гепатиті, хронічному гепатиті, цирозі, пухлинах печінки, інтоксикаціях (АлАТ). 2. Гострий інфаркт міокарда (АсАТ); 3. Ураження скелетних м'язів. 4. Гемоліз еритроцитів	
2	γ-Глутамілтранспептидаза (ГГТП)	1. Захворювання печінки (гепатити, цирози, метастази) з явищами холестазу. 2. Обтурація жовчних шляхів. 3. Панкреатит. 4. Інтоксикації різного генезу	
3	Креатинфосфокіназа (КФК)	Гострий інфаркт міокарда (МВ-ізоформа); ураження скелетних м'язів (м'язові дистрофії, поліміозити тощо) – ММ-ізоформа	Гіподинамія
4	Лактатдегідрогеназа (ЛДГ)	Ураження серця, скелетних м'язів, печінки, захворювання крові	
5	Альдолаза	Вірусний гепатит, цироз печінки; гострий панкреатит; гострий інфаркт міокарда; м'язові дистрофії, ураження м'язів; злоякісні новоутворення; лейкоз, гемолітична анемія тощо	
6	Лужна фосфатаза	Обтураційна жовтяниця, гепатит, цироз печінки з явищами внутрішньопечінкового холестазу; захворювання кісток (хвороба Педжета, рахіт, остеомалія, злоякісні захворювання); ураження кишечника	
7	Кисла фосфатаза	Рак передміхурової залози; деякі запальні процеси в передміхуровій залозі	
8	Альфа-амілаза	Паротит; панкреатит; цукровий діабет; рак підшлункової залози; ниркова недостатність; перитоніт; опіки; холецистит; обтурація кишечника	
9	Холінестераза	Гіпертонічна хвороба; нефроз; ожиріння; алкоголізм; вагітність; цукровий діабет; рак молочної залози	1. Патологія печінки (цироз, гепатит, метастатичний рак печінки).

№	Фермент	Хвороби та стани, які супроводжуються зміною активності	
		Підвищення	Зниження
			2. Гостра або хронічна інтоксикація фосфорорганічними сполуками. 3. Інфаркт міокарда. 4. Ракова кахексія. 5. Гіпоальбумінемія. 6. Спадкові захворювання синтезу ферменту

Інтерпретація результатів досліджень активності ферментів має певні труднощі, тому лікар повинен мати чітке уявлення про участь ферменту в метаболічних перетвореннях, можливих причинах змін активності, бути інформованим про методи, які були використані для аналізу активності ферменту та вміти використовувати отримані результати в комплексі з аналізами інших показників крові та сечі і клінічної картини захворювання.

Ензимодіагностика при інфаркті міокарда. При інфаркті міокарда спостерігають достовірні зміни у крові активності ферментів КК, ЛДГ та АсАТ, які мають залежність від часу, що минув від початку розвитку інфаркту та від зони тканинного ураження (рис. 26). Після закупорки (оклюзії) коронарної артерії у крові спочатку відмічають підвищення активності КК ізоформи МВ, однак фермент швидко видаляється із кровотоку. Виявлення підвищеної активності КК у плазмі крові – основний ензимодіагностичний критерій інфаркту міокарда. Якщо у пацієнта із за грудинними болями не виявлено змін в активності КК, діагноз інфаркту міокарда мало ймовірний.

Додатковим підтвердженням діагнозу інфаркту міокарда є виявлення активності ферментів АсАТ та ЛДГ у крові хворих. Активність АсАТ у нормі складає 5–40 МО/л. При інфаркті міокарда активність АсАТ підвищується через 4–6 год, максимум активності спостерігають протягом 2–3 діб. Рівень ЛДГ ізоформи ЛДГ₁ та ЛДГ₂ також збільшується у плазмі крові через декілька годин після закупорки артерії, максимум активності спостерігають на 3–4-у добу, потім настає поступова нормалізація активності. Рівень підвищення активності ЛДГ корелює з розміром пошкодження серцевого м'яза.

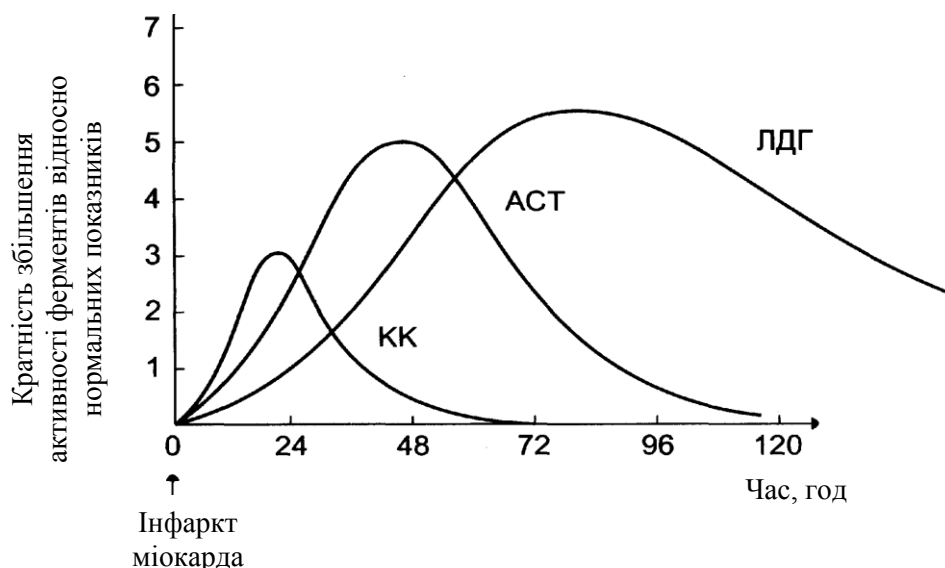


Рис. 26. Зміна активності ферментів у плазмі крові при інфаркті міокарда

Ензимотерапія вивчає можливості використання ферментів для лікування захворювань.

Цей розділ медичної ензимології розвивається у двох напрямках:

- *замісна (специфічна компенсаторна)*, яка пов'язана із введенням ферменту при його дефіциті в організмі;
- *у комплексній терапії* захворювань разом з іншими лікарськими засобами або заходами.

Замість терапію найчастіше застосовують для лікування розладів ШКТ. Для поліпшення процесів травлення використовують лікарські препарати, які містять ферменти травлення (пепсин, панкреатин, фестал, креон та ін.).

Як додаткові лікарські засоби в комплексній терапії захворювань використовують протеолітичні ферменти:

- при гнійно-некротичних процесах;
- як відхаркувальні засоби.

Для розчинення тромбів використовують фібринолітичні ферменти (наприклад, стрептокіназу). З метою розсмоктування гематом та рубців після травм, опіків, операцій застосовують препарат, який містить гіалуронідазу – фермент, що розщеплює гіалуронову кислоту у сполучній тканині (препарат – лідаза).

Використання ферментів як лікарських засобів має певні труднощі, які біологи та лікарі намагаються подолати шляхом розроблення нових підходів у лікуванні. Відомо, наприклад, що протеїнази мають недостатню стабільність, можуть підлягати аутолізу та інгібуванню у крові та тканинах, швидко виводиться з організму, мають високу антигенність. У зв'язку з цим їх використання у гнійній хірургії обмежено.

Метод іммобілізації ферментів значною мірою вирішує ці проблеми.

Іммобілізовані ферменти – це нерозчинні ферменти, які штучно створені шляхом приєднання молекул ензиму до нерозчинного у воді носія (марлеві серветки, тампони, біополімери, ліпосоми тощо).

Іммобілізація має свої переваги:

- стабілізує структуру ферменту і перешкоджає його руйнації;
- пролонгує строк дії ферменту (хоча активність ферменту деякою мірою може бути знижена);
- знижує вартість ферментів завдяки можливості повторного використання.

Існують різні способи іммобілізації. Це може бути механічне включення ферменту або приєднання до певної структури – матриці. Наприклад, для включення молекул ферменту використовують альгінат (полісахарид з морських водоростей) або ліпосоми. Альгінат формує кульки, що включають молекули ферменту, які не зв'язані ковалентно, тому властивостей не втрачають. Ліпосоми – везикули, що утворені біліпідними шарами фосфоліпідів, також можуть включати молекули ферменту. Крім того, використовують спеціальні матрикси, що утворені полімерами (наприклад, колаген, целюлоза), з якими молекули ферменту зв'язуються ковалентно.

Основними постулатами застосування ферментів в онкології є відмінності в метаболізмі клітин пухлин порівняно з обміном у нормальній, здоровій клітині. Як з'ясувалося, пухлинні клітини для свого росту і розмноження потребують амінокислоти з організму, оскільки самі позбавлені здатності синтезувати амідні амінокислот, тоді як нормальні клітини наділені цією здатністю. Було зроблено висновок про те, що амідний нітроген глютаміну й аспарагіну виконує у клітинах низку унікальних функцій, які найкраще встановлено для глютаміну. Зокрема, амідний нітроген глютаміну виявився абсолютно необхідним і незамінним іншими амінокислотами джерелом атому нітрогену мінімум у 10 реакціях синтезу, наприклад пуринових і піримідинових нуклеотидів, відповідно ДНК та РНК, АТФ, гексозамінів, гістидину тощо. Отже, висловлено гіпотезу, що будь-який фермент або агент, який каталізує необоротне розщеплення незамінного для пухлинної клітини харчового фактору (у тому числі амінокислоти), можна застосовувати в ензимотерапії пухлин, якщо буде усунуто обмеження, пов'язане з білковою природою ферменту. Лікувальний ефект, наприклад, L-аспарагінази і L-глютамін(аспарагін)ази при гострих і хронічних формах лейкозів і лімфогранулематозу пояснюється необоротним розпадом у крові як глютаміну, так і аспарагіну та пригніченням синтезу білків у лейкозних клітинах, що призводить до їхньої загибелі.

З метою знешкодження збудників запальних процесів під час лікування ран як зовнішній засіб використовують глюкозооксидази.

Крім ферментів, у лікувальній практиці застосовують також коферменти. Наприклад, тіамінпірофосфат (кокарбоксилазу) вводять хворим на серцеві захворювання, нервові розлади тощо. Особам із серцевими захворюваннями, м'язовими дистрофіями, променевою хворобою

призначають АТФ, НАДН та ін. Препарати цитохрому *c* застосовують для лікування хворих, отруєних карбон (II) оксидом та деякими іншими сполуками, які порушують процеси тканинного дихання.

Широко застосовують у лікувальній практиці інгібітори ферментів. Для пригнічення активності протеолітичних ферментів у підшлунковій залозі у разі гострого панкреатиту використовують інгібітор протеаз – трасилол. Природні інгібітори протеаз застосовують у лікуванні алергічних захворювань, гострих артритів, при яких спостерігається активація протеолізу і фібринолізу, що супроводжується утворенням вазоактивних кінінів. Використовують й інгібітори амінооксидаз, які, інгібуючи моноамінооксидази, сприяють збереженню потрібної кількості моноамінів.

Встановлено, що лікувальна дія пеніциліну пов'язана з інгібуванням активності ферментів бактерій унаслідок блокування функціональних груп їхніх активних центрів шляхом ацилювання.

Таким чином, сфери застосування ферментів у медицині справді безмежні. Розглянуті приклади яскраво свідчать, які перспективи вже сьогодні відкрито у медичній ензимології.

ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ

1. Загальні уявлення про каталіз. Основні принципи каталізу.
2. Теорія біологічного каталізу.
3. Хімічна природа ферментів. Чим зумовлена різноманітність ферментів?
4. Відмінність дії ферментів від неорганічних каталізаторів.
5. Структура простих і складних ферментів. Поняття про апофермент, кофактор, кофермент і простетичну групу. Вітамінні кофактори. Особливості структури активного центру простих і складних ферментів. Алостеричний центр.
6. Загальні властивості ферментів: термолабільність, залежність від рН, специфічність дії.
7. Олігомерні білки-ферменти, мультиензимні комплекси та мембрано-асоційовані ферменти.
8. Ізоферменти: особливості структури, локалізація синтезу в організмі людини (на прикладі ізоферментів лактатдегідрогенази, креатинфосфокінази); роль у діагностиці захворювань.
9. Класифікація і номенклатура ферментів. Характеристика типів хімічних реакцій, що лежать в основі класифікації ферментів.
10. Сучасні положення про механізм дії ферментів: поняття про енергію активації реакції; утворення фермент-субстратного комплексу і механізми отримання продуктів ферментативної реакції (ковалентний та кислотно-лужний каталіз). Значення робіт Е. Фішера і Д. Кошленда.
11. Активність ферментів. Одиниці виміру активності та кількості ферментів: міжнародні одиниці, катал, питома активність ферменту.
12. Фактори, що впливають на активність ферментів: концентрація субстрату, ферменту та продуктів реакції, температура, рН середовища.
13. Методи виділення ферментів з біооб'єктів, їх фракціонування (ультрацентрифугування, гель- та іонообмінна хроматографія, афінна хроматографія, електрофорез) і аналіз активності ферментів.
14. Методи визначення активності ферментів: за кількістю продукту, який утворюється за умов дії ферменту за одиницю часу, за кількістю витраченого субстрату за одиницю часу. Спектрофотометричні методи визначення активності ферментів та візуалізація результатів ферментативної реакції.
15. Кінетика ферментативних реакцій: вплив концентрації субстрату і ферменту на швидкість ферментативної реакції (графічні залежності). Рівняння Міхаеліса–Ментен. Константа Міхаеліса, її визначення і значення.
16. Регуляція ферментативних процесів. Шляхи та механізми регуляції: алостеричні взаємодії у ферментах; ковалентна модифікація ферментів; дія регуляторних білків-ефекторів (кальмодуліну, протеїназ, протеїназних інгібіторів). Циклічні нуклеотиди як регулятори ферментативних реакцій та біологічних функцій клітини.
17. Інгібітори та активатори ферментів. Типи інгібування ферментів: оборотне (конкурентне, неконкурентне, безконкурентне) і необоротне. Приклади.
18. Основні аспекти сучасної ензимодіагностики. Індикаторні, секреторні та екскреторні ферменти. Ізоферменти в ензимодіагностиці, тканинна специфічність розподілу ізоферментів.

Зміни активності ферментів плазми та сироватки крові як діагностичні показники розвитку патологічних процесів в органах і тканинах.

19. Застосування ензимодіагностики в кардіології, урології, онкології тощо.

20. Порушення перебігу ферментативних процесів: спадкові та набуті ензимопатії, природжені вади метаболізму, їх клініко-лабораторна діагностика.

21. Ензимотерапія – використання ферментів як лікарських засобів. Фармакологічне застосування ферментів шлунково-кишкового тракту, згортальної та фібринолітичної систем крові, калікреїн-кінінової та ренін-ангіотензинової систем. Інгібітори ферментів як лікарські засоби.

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Чоловік звернувся до лікаря після появи болю у грудній клітці. У сироватці крові виявлено значне наростання активності ферментів: креатин-фосфокінази та її МВ-ізоформи, аспаратамінотрансферази. Про розвиток патологічного процесу в якій тканині свідчать ці зміни?

А. Легені. В. Серцевий м'яз. С. Скелетні м'язи. D. Печінка. Е. Гладкі м'язи.

2. Біологічне окиснення є основним молекулярним механізмом, завдяки якому забезпечуються енергетичні потреби живих організмів. Який клас ферментів каталізує цей процес?

А. Гідролази. В. Ліази. С. Оксидоредуктази. D. Лігази. Е. Трансферази.

3. Біогенні аміни утворюються за допомогою декарбоксілаз. До якого класу належать ці ферменти?

А. Ліази. В. Ізомерази. С. Оксидоредуктази. D. Гідролази. Е. Трансферази.

4. Із сироватки крові людини виділили п'ять ізоферментних форм лактатдегідрогенази та вивчили їх властивості. Яка властивість доводить, що виділено ізоферментні форми одного й того ж ферменту?

*А. Однакова молекулярна маса D. Каталізують одну й ту ж реакцію
В. Тканинна локалізація E. Однакова електрофоретична рухливість
С. Однакові фізико-хімічні властивості*

5. Структурною особливістю регуляторних ферментів є наявність алостеричного центру. Укажіть його роль.

*А. Зв'язує субстрат D. Сприяє дисоціації коферменту
В. Змінює структуру субстрату E. Зв'язує кофермент
С. Зв'язує регуляторний ефектор*

6. До якого класу ферментів належить глюкокіназа, що каталізує реакцію переносу фосфатної групи з АТФ на глюкозу?

А. Трансферази. В. Оксидоредуктази. С. Ізомерази. D. Гідролази. Е. Ліази.

7. Фермент оксидаза D-амінокислот каталізує дезамінування тільки D-амінокислот. Яка властивість ферментів проявляється при цьому?

*А. Стереохімічна специфічність. D. Залежність від рН.
В. Термолабільність. E. Абсолютна специфічність.
С. Відносна специфічність.*

8. Перетворення проліну на гідроксипролін і лізину на гідроксилізін у молекулі колагену каталізують ферменти:

А. Гідроксилази. В. Гідролази. С. Дегідрогенази. D. Оксидази. Е. Дегідратази.

9. У крові хворого спостерігається підвищення активності ЛДГ₄, ЛДГ₅, аланінамінотрансферази, карбамоїлорнітинтрансферази. У якому органі можна передбачати розвиток патологічного процесу?

*А. Серцевий м'яз (можливий інфаркт міокарда). D. Нирки.
В. Скелетні м'язи. E. Сполучна тканина.
С. Печінка (можливий гепатит).*

10. Для біохімічної діагностики інфаркту міокарда визначають активність у крові ряду ферментів та їх ізоферментних форм. Який ферментативний тест вважається найкращим для підтвердження або виключення діагнозу інфаркту в ранній період після появи болю у грудній клітці?

*А. Ізофермент ММ креатинкінази.
В. Ізофермент ЛДГ₁ лактатдегідрогенази.
С. Ізофермент МВ креатинкінази.
D. Ізофермент ЛДГ₅ лактатдегідрогенази.
Е. Цитоплазматичний ізофермент аспаратамінотрансферази.*

11. Виберіть речовину, яка не здатна виконати функцію субстрату для ферментів організму людини.
A. Глюкоза. C. Нітратна кислота. E. Глікоген.
B. Вища жирна кислота. D. Оцтова кислота в активній формі.
12. Укажіть субстрат, руйнування якого здійснює клас ферментів – гідролази.
A. Вищі жирні кислоти. C. Глюкоза. E. Вуглекислий газ.
B. Білки. D. Піровиноградна кислота.
13. Укажіть ознаку, яку покладено в основу класифікації ферментів.
A. Оборотної реакції. D. Тип реакції, що каталізується.
B. Хімічна структура ферменту. E. Хімічна структура субстрату.
C. Тип специфічності ферменту.
14. Фермент уреаза здатний руйнувати тільки структуру сечовини. Укажіть його тип специфічності.
A. Стереохімічний. C. Абсолютний груповий. E. Відносний субстратний.
B. Абсолютний. D. Відносний груповий.
15. Як називають ферменти, які каталізують одну й ту ж реакцію, але відрізняються первинною структурою і фізико-хімічними властивостями?
A. Ізоферменти. C. Проферменти. E. Апоферменти.
B. Холоферменти. D. Кофактори.
16. Яка з перелічених властивостей характерна тільки для біологічних каталізаторів?
A. Підвищують швидкість реакції, але не витрачаються та не зазнають необоротних змін.
B. Підвищують швидкість реакції, знижуючи енергію активації.
C. Не змінюють стан рівноваги хімічної реакції.
D. Володіють здатністю до регуляції.
E. Каталізують тільки енергетично можливі реакції.
17. Укажіть субстрат для амілази слини.
A. Білок. B. Крохмаль. C. Сахароза. D. Глюкоза. E. Амінокислота.
18. Дайте повну назву складному ферменту, в якому поліпептидні ланцюги приєднуються до небілкової частини.
A. Протетична група. C. Кофермент. E. Холофермент.
B. Кофактор. D. Апофермент.
19. Виберіть небілкову частину ферментів, яка використовується для утворення активних форм ацилів різних кислот.
A. КоQ. B. HSKoA. C. ТПФ. D. НАДФ. E. ФМН.
20. Ферменти підвищують швидкість реакції, оскільки:
A. Змінюють вільну енергію реакції. D. Змінюють стан рівноваги реакції.
B. Зменшують швидкість зворотної реакції. E. Збільшують швидкість прямої реакції.
C. Зменшують енергію активації.
21. Який оптимум рН має фермент пепсин?
A. 1,5–2,5. B. 4–5. C. 6–7. D. 8–9. E. 10–11.
22. Який оптимум рН має фермент амілаза?
A. 1,5–2. B. 7–7,5. C. 8–9. D. 3,5–4. E. 4,5–5.
23. Яка температура є оптимальною для дії більшості ферментів?
A. 50–60 °C. B. 15–20 °C. C. 80–100 °C. D. 35–40 °C. E. 60–80 °C.
24. Константа Міхаеліса для ферменту визначає:
A. Ступінь спорідненості ферменту до продукту реакції.
B. Ступінь спорідненості ферменту до субстрату.
C. Ступінь спорідненості ферменту до інгібітора.
D. Середню швидкість ферментативної реакції.
E. Максимальну швидкість ферментативної реакції.
25. Продовжте фразу «Незначна зміна рН середовища впливає на молекулу ферменту, змінюючи...»:
A. Структурний рівень організації молекули ферменту.
B. Ступінь поляризації амінокислотних радикалів в активному центрі.
C. Товщину гідратної оболонки ферменту.
D. Оптичні властивості ферменту.
E. Біологічну функцію ферменту.

- 26.** Укажіть показник, який використовують при визначенні питомої активності ферменту, знаючи його загальну активність.
- Концентрація даного ферменту в досліджуваній пробі.
 - Концентрація білка в досліджуваній пробі.
 - Концентрація субстрату в досліджуваній пробі.
 - Константа Міхаеліса для даного ферменту.
 - Максимальна швидкість досліджуваної ферментативної реакції.
- 27.** Укажіть прізвище вченого, який запропонував гіпотезу «індукованої відповідності».
- Г. Кребс.
 - Д. Кошленд.
 - М. Ментен.
 - Ф. Крік.
 - К. Функ.
- 28.** Виберіть фактор, який не впливає на значення константи дисоціації фермент-субстратного комплексу.
- Концентрація субстрату.
 - Хімічна природа ферменту.
 - Концентрація ферменту.
 - Концентрація фермент-субстратного комплексу.
 - Ступінь спорідненості ферменту до субстрату.
- 29.** У ході ферментативного каталізу при утворенні фермент-субстратного комплексу:
- Змінюється конформація субстрату.
 - Змінюється конформація ферменту.
 - Встановлюється індукована комплементарна відповідність між ферментом і субстратом.
 - Зближуються функціональні групи, що беруть участь у каталізі.
 - Утворюються ковалентні зв'язки між ферментом та субстратом.
- 30.** Яка з перелічених властивостей ферментів лежить в основі їх якісного та кількісного визначення у біологічних об'єктах?
- Здатність проявляти максимальну активність при визначеному рівні рН середовища.
 - Залежність від наявності в середовищі різноманітних активаторів та інгібіторів.
 - Специфічність.
 - Термолабільність.
 - Гальмування реакції її продуктами.
- 31.** У пробірку з невідомим субстратом додали екстракт з дріжджів. Після 15 хв інкубації суміш у пробірці дала позитивну реакцію Фелінга. Який субстрат був у пробірці?
- Крохмаль.
 - Сахароза.
 - Лактоза.
 - Глікоген.
 - Целюлоза.
- 32.** Після 10 хв інкубації крохмалю зі слиною реакційна суміш дає жовтий колір з йодом і позитивну реакцію Фелінга. У середовищі присутні:
- Амілодекстрини.
 - Фруктоза та глюкоза.
 - Сахароза.
 - Еритродекстрини.
 - Декстрини.
- 33.** Яке явище лежить в основі механізму дії ферментів?
- Зближення груп, які входять до активного центру ферменту.
 - Утворення фермент-субстратного комплексу.
 - Зміна електричного заряду ферменту.
 - Зміна просторової конфігурації.
 - Гідроліз ферменту.
- 34.** Укажіть метод досліджень, який використовується для виділення ферментативних систем окремих субклітинних фракцій з гомогенату тканини.
- Діаліз
 - Ізоелектричне фокусування.
 - Якісний аналіз.
 - Диференційне центрифугування.
 - Рентгеноструктурний аналіз.
- 35.** Укажіть одиницю активності ферменту, яка визначається кількістю ферменту, що перетворює 1 моль субстрату за 1 с в оптимальних умовах.
- Катал.
 - Стандартна міжнародна одиниця.
 - Умовна одиниця.
 - Число оборотів.
 - Молярна активність.
- 36.** Для лікування хворого було використано протизапальний засіб, що блокує дію циклооксигенази. Таким протизапальним засобом є:
- Пепсин.
 - Алопуринол.
 - Тіамін.
 - Аспірин.
 - Анальгін.

37. Протеолітичні ферменти шлунка і підшлункової залози синтезуються в неактивній формі – у вигляді зимогенів, а потім активуються в ШКТ. Назвіть протеолітичний фермент шлунка, що виділяється в неактивному стані.

A. Трипсин. B. Хімотрипсин. C. Пепсин. D. Еластаза. E. Колагеназа.

38. Для попередження нападів гострого панкреатиту лікар призначив трасилол (контрикал, гордокс), який є інгібітором:

A. Трипсину. B. Хімотрипсину. C. Гастринсину. D. Карбоксипептидази. E. Еластази.

39. У хворого на гострий панкреатит у крові та сечі різко підвищена активність ферменту:

A. Пепсину. B. α -Амілази. C. Дипептидази. D. Сахарази. E. Лактази.

40. Назвіть фермент, визначення вмісту якого у крові є найбільш інформативним у перші години після інфаркту міокарда.

A. Аспаратамінотрансфераза. D. Глутаматдегідрогеназа.

B. Аланінамінотрансфераза. E. Креатинфосфокіназа.

C. Лактатдегідрогеназа.

41. Виділяють декілька груп молекулярних механізмів, які відіграють важливу роль у патогенезі пошкодження клітин, що сприяє розвитку патології. Які процеси забезпечують протеїнові механізми пошкодження?

A. Пригнічення ферментів. D. Осмотичне розтягнення мембран.

B. Перекисне окиснення ліпідів. E. Ацидоз.

C. Активація фосфоліпази.

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

A. Оборотно. C. Неконкурентне. E. Ретроінгібування.

B. Конкурентне. D. Необоротне.

43. Назвіть тип інгібування, при якому інгібітор приєднується не до активного центру ферменту, а до іншої специфічної ділянки молекули.

A. Алостеричне. C. Безконкурентне. E. Конкурентне.

B. Неконкурентне. D. Субстратне.

44. Ензимотерапія – напрям медичної ензимології, пов'язаний із застосуванням ферментів для лікування різних захворювань. Назвіть фермент, який застосовується у комплексній терапії з метою усунення набряків, гематом, келоїдних рубців.

A. Карбоксипептидаза. B. Колагеназа. C. Пепсин. D. Амілаза. E. Ліпаза.

45. До відділення інтенсивної терапії доставлена жінка з діагнозом – інфаркт міокарда. Активність якого ферменту буде підвищеною протягом перших двох діб?

A. Аланінамінотрансферази. C. Аспаратамінотрансферази. E. ЛДГ₅.

B. γ -Глутамілтранспептидази. D. ЛДГ₄.

46. У хворого гострий панкреатит. Які препарати повинен призначити лікар, щоб уникнути аутолізу підшлункової залози?

A. Активатори протеаз. C. Хімотрипсин. E. Інгібітори протеаз.

B. Трипсин. D. Амілазу.

47. Одним із шляхів регуляції активності ацетил-КоА-карбоксилази (лімітуючого ферменту в синтезі жирних кислот) є ретроінгібування кінцевим продуктом – пальмітоїл-КоА. Ретроінгібування є варіантом:

A. Ковалентної модифікації ферменту. D. Алостеричного інгібування.

B. Конкурентного інгібування. E. Неконкурентного інгібування.

C. Необоротного інгібування.

48. У пацієнта прогресуюча м'язова дистрофія. Який з перелічених нижче біохімічних показників має діагностичне значення у цьому випадку?

A. Креатинфосфокіназа. C. Лактатдегідрогеназа. E. Аденілатциклаза.

B. Піруватдегідрогеназа. D. Глутаматдегідрогеназа.

49. Активність яких ферментів слід визначати з діагностичною і прогностичною метою, якщо до клініки поступив хворий з патологією серцевого м'яза?
- A. Лізоциму, цитратсинтази, альдолази.
 B. Нейрамінідази, гексокінази, піруваткінази.
 C. Малатдегідрогенази, піруватдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази.
 D. Креатинкінази, аланін- і аспаратамінотрансферази.
 E. Аргінази, пептидази, фосфатази.
50. Назвіть тип інгібування, при якому хімічну будову інгібітору нагадує будову субстрату.
- A. Неконкурентне. B. Конкурентне. C. Безконкурентне. D. Субстратне. E. Необоротне.
51. Табун, зарин, диізопропілфторфосфат (фосфорорганічні сполуки) є отрутами нервово-паралітичної дії. Який з перелічених ферментів інгібується фосфорорганічними сполуками?
- A. Фосфоліпаза A_2 . D. Ангіотензин-перетворюючий фермент.
 B. Ацетилхолінестераза. E. Тирозинамінотрансфераза.
 C. Цитохром P-450.
52. Ферменти широко використовуються як лікарські препарати. Який з наведених ферментів використовується для лікування лейкозів?
- A. Аспарагіназа. B. Дегідрооротаза. C. Енолаза. D. Фумараза. E. Каталаза.
53. Ензимотерапія – напрям медичної ензимології, пов'язаний із застосуванням ферментів для лікування різних захворювань. Назвіть фермент, який застосовується при лікуванні інфаркту міокарда.
- A. Фосфофруктокіназа. C. Стрептокіназа. E. Фосфогліцерокіназа.
 B. Піруваткіназа. D. Гексокіназа.
54. При аналізі шлункового соку хворого з діагнозом «гіпоацидний гастрит» виявлено значне зниження активності пепсину. Укажіть можливий біохімічний механізм цього явища.
- A. Денатурація молекули ферменту.
 B. Конкурентне інгібування ферменту.
 C. Зниження енергії активації ферментативної реакції.
 D. Відсутність внутрішнього фактора Касла в шлунковому соку.
 E. Порушення утворення ферменту з проферменту.
55. Укажіть активатор амілази слини.
- A. Хлорид натрію. C. Сульфат міді. E. Глюконат кальцію.
 B. Сульфат амонію. D. Хлорид магнію.
56. Укажіть тип інгібування, при якому інгібітором ферменту є продукт реакції:
- A. Конкурентне. C. Безконкурентне. E. Ретроінгібування.
 B. Неконкурентне. D. Стереохімічне.
57. Укажіть фермент, активність якого визначається у плазмі крові пацієнтів з патологією кісткової тканини:
- A. Пепсин. B. Трипсин. C. Амілаза. D. Кисла фосфатаза. E. Лужна фосфатаза.
58. Який механізм інгібування синтезу фолієвої кислоти сульфаніламідними препаратами?
- A. Конкурентний. D. Неконкурентний.
 B. Необоротний. E. Зв'язування з аlostеричними центрами ферментів.
 C. Денатурація ферменту.

Приклад завдання з бази тестів United States Medical Licensing Examination (USMLE)

Ротенон – природна хімічна сполука, що використовується як риб'яча отрута. Є оборотним конкурентним інгібітором НАДН-дегідрогенази – ферменту I комплексу дихального ланцюгу. Додавання ротенону буде блокувати дихальний ланцюг на цьому етапі. Яка із зазначених комбінацій описує ефект ротенону на кінетику ферментативної реакції НАДН-дегідрогенази:

- A. K_M зменшується, v_{max} залишається без змін.
 B. K_M збільшується, v_{max} зменшується.
 C. K_M збільшується, v_{max} залишається без змін.
 D. K_M залишається без змін, v_{max} залишається без змін.
 E. K_M залишається без змін, v_{max} зменшується.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Базова

1. Біологічна і біоорганічна хімія : підручник : у 2 кн. Кн. 2. Біологічна хімія / Ю. І. Губський, І. В. Ніженковська, М. М. Корда ; за ред. Ю. І. Губського, І. В. Ніженковської. – Київ : ВСВ «Медицина», 2016. – 544 с.
2. Губський Ю. І. Біологічна хімія : підручник / Ю. І. Губський. – Київ–Вінниця : Нова книга, 2007. – 656 с.
3. Губський Ю. І. Біологічна хімія / Ю. І. Губський. – Київ–Тернопіль : Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
4. Гонський Я. І. Біохімія людини : підручник / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук ; за ред. Я. І. Гонського. – 3-є вид., випр. і доп. – Тернопіль : ТДМУ, 2019. – 732 с.
5. Біохімія людини : підручник / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук, М. І. Калинський. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2002. – 744 с.
6. Скляр О. Я. Біологічна хімія : підручник / О. Я. Скляр, Н. В. Фартушок, Т. І. Бондарчук. – Тернопіль : ТДМУ, 2015. – 706 с.
7. Березов Т. Т. Биологическая химия : учебник для студ. мед. вузов / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – Москва : Медицина, 1998. – 704 с.
8. Березов Т. Т. Биологическая химия : учебник для студ. мед. вузов / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – 3-е изд., стереотип. – Москва : Медицина, 2008. – 704 с.
9. Биологическая химия : практикум / Ю. В. Хмелевский, Ю. И. Губский, С. Д. Зайцева и др. – Киев : Вища школа, 1985. – 212 с.
10. Биохимия : учебник / под ред. Е. С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – Москва : ГЕОТАР-Медиа, 2014. – 768 с.
11. Биологическая химия : учебник / С. Е. Северин, Т. Л. Алейникова, Е. В. Осипов, С. А. Силаева. – 3-е изд., испр. – Москва : ООО Изд-во «Медицинское информационное агенство», 2017. – 496 с.
12. Біологічна хімія / Л. М. Вороніна та ін. – Харків : Основа, 2000. – С. 109–117.
13. Практикум з біологічної хімії / Д. П. Бойків, О. Л. Іванків, Л. І. Кобилянська та ін. ; за ред. О. Я. Склярова. – Київ : Здоров'я, 2002. – С. 51–59.
14. Лабораторні та семінарські заняття з біологічної хімії : навч. посібник для студентів вищих навч. закл. / Л. М. Вороніна, В. Ф. Десенко, А. Л. Загайко та ін. – Харків : Вид-во НФаУ; Оригінал, 2004. – С. 82–84.
15. Popova L. Biochemistry / L. Popova, A. Polikarpova. – Kharkiv. : KNMU, 2012. – 540 p.
16. Molecular Cell Biology / H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser et al. – New York : W. H. Freeman and Company, 2016. – 1170 p.
17. Harper's Biochemistry / R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes et al. – Prentice-Hall Int. Inc., 1998. – 1014 p.
18. Harper's illustrated Biochemistry / V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, P. A. Weil. – New York : McGraw-Hill, 2015. – 817 p.

Допоміжна

1. Клиническая биохимия / А. Я. Цыганенко, В. И. Жуков, В. В. Леонов и др. – Харьков : Изд-во «Факт», 2005. – 456 с.
2. Бышевский А. Ш. Биохимия для врача / А. Ш. Бышевский, О. А. Терсенов. – Екатеринбург : Изд-во «Урал. Рабочий», 1994. – 384 с.
3. Биохимия / Н. Е. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, А. Н. Васильев и др. – Киев : Вища школа, 1988. – 432 с.
4. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. – Москва : Мед. информ. агентство, 1998. – 496 с.
5. Балаболкин М. И. Эндокринология / М. И. Балаболкин. – Москва : Универсум паблишинг, 1998. – 582 с.
6. Основні біохімічні поняття, визначення та терміни : навч. посібник / Л. Ф. Боечко, Л. О. Боечко. – Київ : Вища школа, 1993. – 528 с.
7. Клінічна біохімія / Д. П. Бойків, Т. І. Бондарчук, О. Л. Іванків та ін. ; за ред. О. Я. Склярова. – Київ : Медицина, 2006. – 432 с.
8. Солвей Дж. Г. Наглядная медицинская биохимия : учеб. пособие / Дж. Г. Солвей ; пер. с англ. А. П. Вабищевич, О. Г. Терещенко ; под ред. Е. С. Северина. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 168 с.
9. Halkerston I. D. K. Biochemistry : 2nd edition / I. D. K. Halkerston. – The National medical series for independent study, 1988. – 522 p.
10. Stryer L. Biochemistry / L. Stryer. – New York : W. H. Freeman and Company, 1995. – 1064 p.
11. Lehninger A. Principles of Biochemistry / A. Lehninger. – New York : W. H. Freeman and Company, 1995. – 1064 p.

Навчальне видання

Наконечна Оксана Анатоліївна
Бачинський Руслан Орестович

БІОХІМІЯ ФЕРМЕНТІВ. АСПЕКТИ МЕДИЧНОЇ ЕНЗИМОЛОГІЇ

*Навчально-методичний посібник
для підготовки до практичних занять з біологічної хімії
(для студентів медичних та стоматологічного факультетів)*

Відповідальний за випуск Наконечна О.А.



Редактор М. В. Тарасенко
Комп'ютерна верстка О. Ю. Лавриненко

Формат А4. Ум. друк. арк. 2,2. Зам. № 20-34022.

**Редакційно-видавничий відділ
ХНМУ, пр. Науки, 4, м. Харків, 61022
izdatknmurio@gmail.com**

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавництв, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції серії ДК № 3242 від 18.07.2008 р.