

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

**МЕХАНІЗМ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ ТА
КІНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНИХ
РЕАКЦІЙ. РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ**

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

Запоріжжя, 2015

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

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

**МЕХАНІЗМ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ ТА
КІНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНИХ
РЕАКЦІЙ. РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ**

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

Запоріжжя, 2015

УДК 577.112.8(075)

ББК 28.072 я 73

М 55

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

Автори:

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

Рецензенти:

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

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

Механізм дії ферментів та кінетика ферментативних реакцій. Регуляція активності : методичний посібник з дисципліни «Біологічна хімія» для викладачів / Александрова К. В., Шкода О. С., Васильєв Д. А., Юрченко Д. М., Левіч С. В., Запоріжжя, 2015.- 50 с.

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

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

УДК 577.112.8(075)

ББК 28.072 я 73

Запорізький державний медичний університет
Александрова К. В., Шкода О. С., Васильєв Д. А., Юрченко Д. М.,
Левіч С. В., 2015.

ЗМІСТ

1	АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ.....	5
2	НАВЧАЛЬНІ ЦІЛІ ЗАНЯТТЯ.....	6
3	ВИХОВНІ ЦІЛІ.....	7
4	БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ.....	8
5	ЗМІСТ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ.....	9
6	ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ.....	10
7	АЛГОРИТМ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ.....	12
8	КОНТРОЛЬ ЗАКЛЮЧНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ З ТЕМИ.....	15
9	ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ.....	17
10	ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК-1»	20
11	ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ.....	25
	МЕХАНІЗМ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ.....	70
	Кінетика ферментативних реакцій.....	75
	Вплив концентрації фермента та субстрату на швидкість ферментативної реакції.....	75
	Залежність швидкості ферментативної реакції від температури.....	78
	Залежність швидкості ферментативної реакції від рН.....	79
	Специфічність дії ферментів.....	79
	Регуляція активності ферментів.....	81
12	ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПІДГОТОВКИ СТУДЕНТІВ	46
13	РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	47

1. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ

Ферменти як біокаталізатори, які містяться в усіх тканинах, клітинах і біологічних рідинах, забезпечують перебіг хімічних реакцій у живих організмах. Їм також належить провідна роль і в метаболізмі ліків. Сучасні методи виділення та очищення ферментів дозволили вивчити структуру, активні та регуляторні центри їх молекул, умови прояву їх активності.

2. НАВЧАЛЬНІ ЦІЛІ ЗАНЯТТЯ №5

Вивчити особливості структури простих і складних ферментів; вміти визначати клас ферменту за типом хімічної реакції; вивчити на прикладі амілази слини особливості специфічності дії ферментів, зміни активності ферменту під дією рН і температури навколишнього середовища.

Необхідно знати:

1. Сучасні положення про механізм дії ферментів: поняття про енергію активації ферментативної реакції; утворення фермент-субстратного комплексу і механізми отримання продуктів ферментативної реакції (ковалентний і кислотно-лужний каталіз). Значення робіт Е. Фішера і Д. Кошленда.
2. Кінетику ферментативних реакцій: вплив концентрації субстрата і ферменту на швидкість ферментативної реакції (графічні залежності). Рівняння Міхаеліса-Ментен. Константа Міхаеліса, її визначення і значення.
3. Чинники регуляції активності ферментів: концентрація субстрата, концентрація ферменту, концентрація продуктів реакції; температура і рН середовища.
4. Поняття про хімічну природу і функцію активаторів. Механізми активації ферментів.
5. Загальне поняття про інгібітори. Типи інгібування ферментів: зворотне (конкурентне, неконкурентне, бесконкурентне) і незворотне (приклади). Особливості зміни кінетичних параметрів ферментів при конкурентному і неконкурентному інгібуванні (використання методу Лайнуївера-Берка).
6. Поняття про алостеричний центр і його функцію у ферментативному каталізі. Алостеричний тип регуляції активності ферментів. Ретроінгібування ферментів.

Необхідно вміти:

1. Визначати вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини.
2. Визначати залежність швидкості ферментативної реакції від кількості ферменту на прикладі α -амілази слини.

3. ВИХОВНІ ЦІЛІ

Ознайомитися зі шляхами регуляції швидкості ферментативних реакцій при дії різних факторів регуляції (активаторів, інгібіторів, концентрації субстрату, концентрації ферменту).

4. БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ

Дисципліни	Отримані навички
<p>Попередні: Органічна хімія</p>	<p>Поняття про ферменти та ферментативний каталіз. Моносахариди, полісахариди, властивості.</p>
<p>Неорганічна хімія</p>	<p>Поняття концентрація, способи вираження концентрації.</p>
<p>Нормальна фізіологія</p>	<p>Функції ферментів в організмі. Використання ферментів для нормалізації фізіологічних функцій.</p>
<p>Фізична та колоїдна хімія</p>	<p>Методи хімічної кінетики. Основні поняття. Реакції прості та складні, гомогенні та гетерогенні. Швидкість гомогенних хімічних реакцій та методи її визначення. Залежність швидкості реакції від різноманітних факторів. Залежність швидкості реакції від температури. Температурний коефіцієнт швидкості реакції. енергія активації. Зв'язок між швидкістю реакції та енергією активації. Визначення енергії активації. Каталітичні процеси. Позитивний та негативний каталіз.. енергія активації каталітичних реакцій. Гальмування хімічних реакцій. Механізм дії інгібіторів.</p>
<p>Наступні Лабораторна діагностика, Фармакотерапія, Клінічна фармакологія</p>	<p>Поняття норма та патологія. Поняття про патологічні стани печінки, підшлункової залози тощо. Поняття симптом і синдром.</p>

5. ЗМІСТ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ

1. Визначення поняття «кінетика ферментативних реакцій». Графічні залежності впливу на кінетику ферментативних реакцій концентрації субстрату й ферменту.

2. Рівняння Міхаеліса-Ментен. Константа Міхаеліса, її визначення та значення.

3. Графічні залежності впливу факторів регуляції активності ферментів: концентрації субстрату, ферменту, продуктів реакції, температури та рН середовища.

4. Поняття про хімічну природу й функції активаторів. Механізм активації ферментів.

5. Загальні поняття про інгібітори.

6. Типи інгібування ферментів: оборотне (конкурентне, неконкурентне), необоротне (приклад). Особливості зміни кінетичних параметрів ферментів при конкурентному і неконкурентному інгібуванню (використання методу Лайнуівера-Берка).

7. Поняття про алостеричний центр та його функції у ферментативному каталізі. Алостеричний тип регуляції активності ферментів. Ретроінгібування ферментів.

6. ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ

Етапи	Час у хв	Навчальні матеріали		Місце проведення
		Засоби навчання	Обладнання	
1. Організаційний момент	5	Перевірити присутніх, провести співбесіду щодо організації навчальної роботи на кафедрі (структуру занять, правила поведінки, порядок відробок заборгованостей, порядок проведення підсумкових занять тощо), провести екскурсію по кафедрі.		Навчальна кімната
2. Співбесіда з питань про структуру, властивості, класифікацію ферментів	15	Провести пояснення важливих термінів: кінетика, константа Міхаеліса, максимальна швидкість ферментативної реакції, конкурентне, неконкурентне, аlostеричне інгібування активності ферментів, катал, міжнародна одиниця активності ферментів, ензимопатології	Методичні рекомендації до практичного заняття «Ферменти: структура, механізм дії, регуляція активності»	Навчальна кімната
Фізіологічна перерва	10			
<p>Організація проведення пратикуму з теми заняття. Поділити навчальну групу на 4 бригади: №№ 1, 2, 3 і 4. Зміст практичної роботи для кожної бригади: № 1: Вивчення впливу активаторів і інгібіторів на активність амілази слини (одна робота). № 2: вивчення залежності швидкості ферментативної реакції від кількості ферменту на прикладі α-амілази слини (одна робота).</p>				
3. Початок роботи студентів згідно тем лабораторних робіт	15	Протоколи для лабораторних робіт	Обладнання та реагенти до лабораторних робіт, протоколи	Навчальна кімната

			для лабораторних робіт	
4. Проведення письмової контрольної роботи	20	Закінчення 1 практики є початком письмової роботи	Картки з завданнями, зошити для контрольних робіт	Навчальна кімната
5. Продовження виконання практичної частини заняття	10	Студенти мають час закінчити проведення експериментів.	Протоколи для лабораторних робіт	Навчальна кімната
6. Оформлення результатів лабораторних робіт	10 хв		Підручник, Практикуми	Кімната для навчання
7. Заключна співбесіда згідно результатів усіх типів робіт студентів на протязі заняття	15 хв	Перевірка та підпис протоколів лабораторних робіт, аналіз успішності студентів на занятті, інформування студентів про тему наступного заняття, видання завдань для самостійної роботи	Список літератури у допомогу для ліквідації недоліків у вивчанні теми	Кімната для навчання

1. Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини**Принцип методу:**

Активатором амілази слини є натрій хлорид, а одним з інгібіторів – купрум (II) сульфат. Про вплив цих речовин на активність амілази судять по ступеню гідролізу крохмалю під дією ферменту в їх присутності (ступінь гідролізу оцінюється по йодній пробі).

Хід роботи:

Слину розбавляють в 200 разів (до 1 мл слини додають 199 мл води). Беруть 3 пробірки. У першу наливають 2 краплі 1% розчину NaCl, у другу – 2 краплі 1% розчину CuSO₄, а в третю – 2 краплі води. В усі три пробірки додають по 1 мл розведеної слини й по 5 крапель 1% розчину крохмалю. Вміст перемішують і залишають при кімнатній температурі на 2 хвилини. Після цього в усі пробірки додають по 1 краплі розчину йоду, перемішують і спостерігають характер забарвлення.

Результати роботи заносять у таблицю:

Вміст пробірок	Пробірки		
	1	2	3
1% розчин NaCl	+	-	-
1% розчин CuSO ₄	-	+	-
Дистильована вода	-	-	+
Слина розведена	+	+	+
1% розчин крохмалю	+	+	+
Забарвлення йодної проби			

2. Залежність швидкості ферментативної реакції від кількості ферменту на прикладі α -амілази слини

Принцип методу:

Метод заснований на визначенні швидкості гідролізу крохмалю залежно від кількості α -амілази в пробі (визначається розведенням слини). Швидкість гідролізу полісахариду оцінюється за часом утворення із крохмалю еритродекстринів, які дають червоне забарвлення при проведенні йодної проби.

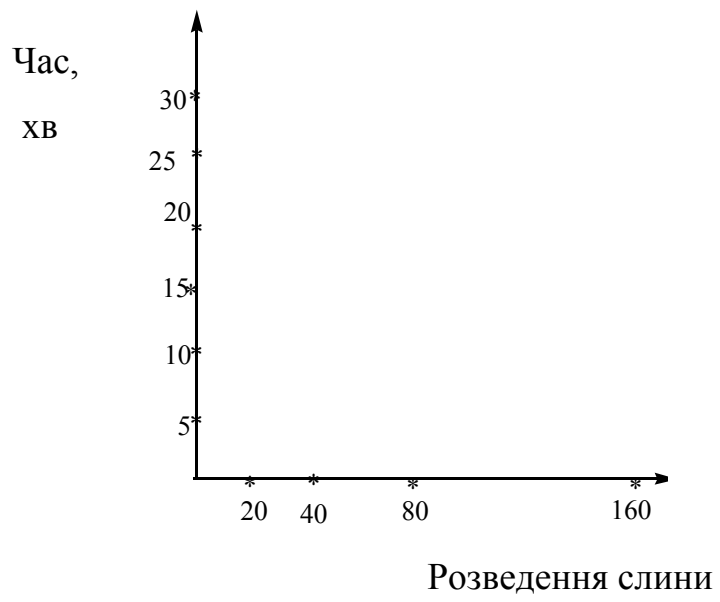
Хід роботи:

Приготувати розчини слини (в 20, 40, 80 і 160 разів розведення). Пронумерувати чотири пробірки та внести в кожну по 1 мл розчину слини відповідного розведення.

В кожну пробірку додати по 5 мл 1% розчину крохмалю, швидко перемішати і помістити їх на водяну баню (термостат) при 38⁰С. Кожні 1-2 хвилини на предметне скло відбирають по 1-2 краплі розчину з кожної пробірки, додають по 1 краплі 0,1% розчину йоду в 0,2% розчині КІ. Спочатку спостерігають синє забарвлення, потім фіоле-тове, червоно-фіолетове, а наприкінці – червоне забарвлення (йодною пробою доводиться наявність еритродекстринів). Відзначають час від початку дослідження і до появи червоного забарвлення (в кожній пробірці). Результати відображують графічно, відкладаючи на осі абсцис відносну концентрацію α -амілази (розведення), а на осі ординат – час (термін) утворення еритродекстринів у хвилинах.

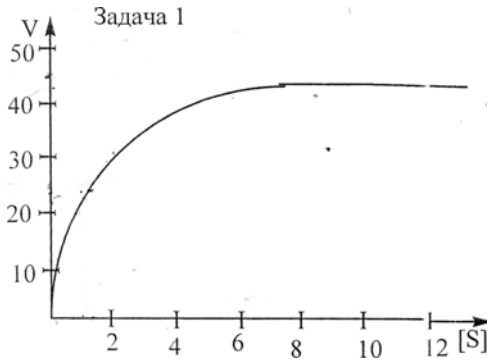
Результати:

Розведення слини	Час утворення еритродекстринів
20	
40	
80	
160	



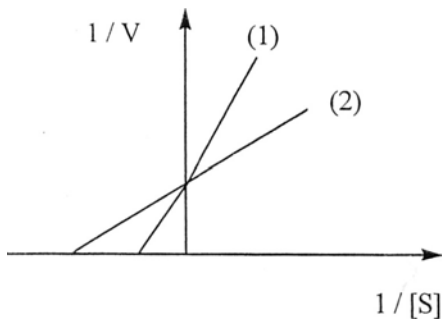
8. КОНТРОЛЬ ЗАКЛЮЧНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ З ТЕМИ

Вариант 1



Розрахунок швидкості ферментативної реакції виконується відповідно формули $V = -\Delta S / \Delta t$, тому одиниці швидкості мають бути - ммоль/с. Визначте значення величин V_{\max} и K_m , застосовуючи дані графічної залежності. (1 ммоль = 10^{-6} моль).

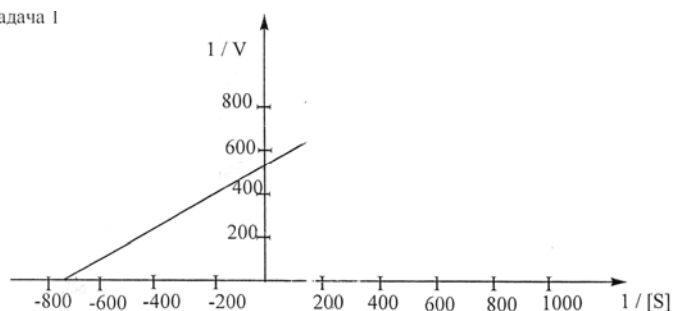
Вариант 2



Визначте тип інгібування ферментативної реакції (1), застосовуючи дані метода Лайнуівера-Берка для умов: інгібітор відсутній (2), інгібітор присутній (1). Дайте пояснення.

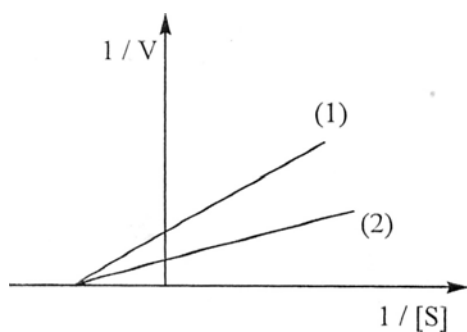
Вариант 3

Задача 1



Перед Вами графическая зависимость обратной величины $1/V$ при изменении обратной величины $1/[S]$, полученная по методу Лайнуивера-Берка. Определите значения V_{\max} и K_m , имея ввиду, что концентрация субстрата измерялась в ммоль/л, а скорость измерялась в ммоль/л.с.

Вариант 4



Определите тип ингибирования ферментативной реакции (1), используя данные метода Лайнуивера-Берка для случаев: ингибитор отсутствует (2), ингибитор присутствует (1). Дайте обоснование Вашего ответа.

9. ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

1. Укажіть інгібітор дії амілази слини:

- A. Хлорид натрію
- B. Сульфат амонію
- C. Сульфат міді
- D. Хлорид магнію
- E. Глюконат кальцію

2. Укажіть активатор дії амілази слини:

- A. Хлорид натрію
- B. Сульфат амонію
- C. Сульфат міді
- D. Хлорид магнію
- E. Глюконат кальцію

3. Константа Міхаеліса для ферменту визначає:

- A. Ступінь спорідненості ферменту до продукту реакції
- B. Ступінь спорідненості ферменту до субстрату
- C. Ступінь спорідненості ферменту до інгібітору
- D. Середню швидкість ферментативної реакції
- E. Максимальну швидкість ферментативної реакції

4. Виберіть фактор, який не впливає на значення константи дисоціації фермент-субстратного комплексу:

- A. Концентрація субстрату
- B. Хімічна природа ферменту
- C. Концентрація ферменту
- D. Концентрація фермент-субстратного комплексу
- E. Ступінь спорідненості ферменту до субстрату

5. Укажіть прізвище вченого, який запропонував гіпотезу «індукованої відповідності»:

- A. Г. Кребс
- B. Д. Кошленд

C. M. Ментен

D. Ф. Крік

E. К. Функ

6. Укажіть фактор, який зменшує дію конкурентного інгібітора на фермент:

A. Підвищення концентрації ферменту

B. Введення в реакційне середовище катіона металу

C. Підвищення концентрації субстрату

D. Введення в реакційне середовище аlostеричного активатора

E. Видалення з реакційного середовища продукту реакції

7. 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

8. Укажіть показник, який вико-ристовують при визначенні пито-мої активності ферменту, якщо відома загальна активність ферменту:

A. Концентрація даного ферменту в досліджуваній пробі

B. Концентрація білка в досліджуваній пробі

C. Концентрація субстрату в досліджуваній пробі

D. Константа Міхаеліса для даного ферменту

E. Максимальна швидкість досліджуваної ферментативної реакції

9. Укажіть активатори фермента гліколізу енолази:

A. Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+}

B. Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{+}

C. Mn^{2+} , Ni^{2+} , K^{+}

D. цАМФ

Е. цГМФ

10. Укажіть тип інгібування, при якому інгібітором ферменту є продукт реакції:

А. Конкурентне

В. Неконкурентне

С. Бесконкурентне

Д. Стереохімічне

Е.

Ретроінгібування

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

1. Амілолітичні ферменти каталізують гідроліз полісахаридів і олігосахаридів. На який хімічний зв'язок вони діють:

- A. * Глікозидний
- B. Водневий
- C. Пептидний
- D. Амідний
- E. Фосфодієфірний

2. Ліполітичні ферменти ШКТ каталізують гідроліз ліпідів. Вкажіть хімічний зв'язок, який вони розщеплюють:

- A. * Складноефірний
- B. Пептидний
- C. Глікозидний
- D. Водневий
- E. Амідний

3. Фермент здійснює перенос структурного фрагменту від одного субстрату до іншого. Назвіть клас цього фермента.

- A. *Трансферази
- B. Ізомерази
- C. Оксидоредуктази
- D. Лігази
- E. Гідролази

4. Гідролітичне руйнування сполук здійснює клас ферментів – гідролази. Які сполуки гідролізуються протеазами?

- A. Білки
- B. Вищі жирні кислоти

- C. Глюкоза
- D. Піровиноградна кислота
- E. Вуглекислий газ

5. Фермент уреаза здатний руйнувати тільки структуру сечовини.

Укажіть його тип специфічності.

- A. Абсолютний
- B. Стереохімічний
- C. Абсолютний груповий
- D. Відносний груповий
- E. Відносний

E. М'язах

6. Речовини в травній системі зазнають певних змін. Ферменти якого класу головним чином здійснюють ентеральні перетворення?

- A. *Гідролази
- B. Оксидоредуктази
- C. Трансферази
- D. Ліази
- E. Лігази

7. Дегідрогенази – це ферменти, які відщеплюють атоми водню від субстрату. До якого класу ферментів відноситься лактатдегідрогеназа:

- A. *Оксидоредуктаз
- B. Трансфераз
- C. Гідролаз
- D. Ізомераз
- E. Ліаз

8. Ферменти широко застосовуються в фармації в якості фармацевтичних препаратів. Яка основна відмінність ферментів від небіологічних каталізаторів?

- A. Мала універсальність
- B. Висока гомогенність
- C. *Висока специфічність дії та селективність
- D. Висока універсальність
- E. Висока дисперсність

9. Надходження поживних речовин у бактеріальну клітину здійснюється за допомогою різних механізмів. Одним з них є полегшена дифузія, яка здійснюється особливими мембранними білками-переносниками. Як вони називаються?

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

10. Ферменти (біологічні каталізатори) використовуються як фармакологічні препарати. Який механізм дії ферментів в біохімічних реакціях?

- A. *Знижують енергію активації
- B. Змінюють константу швидкості реакції
- C. Змінюють порядок реакції
- D. Інгібують реакцію
- E. Підвищують енергію активації

11. Патогенним мікроорганізмам властива наявність ферментів агресії, які визначають їх вірулентність. Виберіть серед перерахованих ферменти агресії:

- A. Лиаза
- B. Карбогидраза
- C. Гиалуронидаза*
- D. Оксидаза
- E. Трансфераза

12. Інфікування лікарських рослин мікроорганізмами виключає їх подальше використання фармацевтичною промисловістю. Інвазивні властивості фітопатогенних мікроорганізмів обумовлені такими ферментами:

- A. Гідролази*
- B. Ліази
- C. Трансферази
- D. Ізомерази
- E. Оксидоредуктази

13. Відомо, що анаеробні мікроорганізми гинуть у присутності кисню через згубну дію перекису водню. Це пов'язано з відсутністю продукції анаеробами ферменту:

- A. Протеази
- B. Каталази
- C. Редуктази
- D. Лактази
- E. Полімерази

14. Для отримання з підшлункової залози тварин ферменту амілази в чистому вигляді застосовують метод афінної хроматографії з закріпленням на носії лігандом. Яку речовину використовують як ліганд?

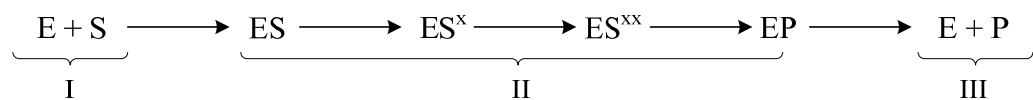
- A. Крохмаль
- B. Глюкозу
- C. Сахарозу
- D. Целюлозу
- E. Лактоз

11. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ ЗАНЯТТЯ

Механізм дії ферментів

Після того, як була встановлена хімічна природа ферментів, підтвердилися припущення англійського хіміка А. Бруна, висловлене ще на початку ХХ ст., а згодом і вчених В. Анрі, Л. Міхаеліса та М. Ментен про те, що в основі ферментативного каталізу лежить утворення нестійкого проміжного фермент-субстратного комплексу, який згодом розпадається з утворенням продуктів реакції та вивільненням фермента в незміненому вигляді. Ці твердження лягли в основу теорії «жорсткої матриці» Е. Фішера про те, що активний центр фермента комплементарний субстрату, тобто підходить до нього як «ключ до замка». Згодом ця теорія була вдосконалена та доповнена в «гіпотезі індукованої відповідності» Д. Кошлендом, згідно з якою субстрат, взаємодіючи з активним центром фермента, викликає зміну його конформації, що призводить до формування фермент-субстратного комплексу (ES), сприятливого для хімічної модифікації субстрату; при цьому молекула субстрату теж змінює свою конформацію, що забезпечує високу ефективність ферментативної реакції.

Отже, базуючись на твердженнях Л. Міхаеліса та М. Ментен, процес ферментативного каталізу умовно можна розділити на три етапи: приєднання молекули субстрату (S) до фермента (E); утворення проміжного фермент-субстратного комплексу та послідовне його перетворення на один або кілька перехідних (ES, ES^x, ES^{xx}) з подальшим утворенням нестабільного комплексу фермент-продукт (EP); вивільнення продуктів реакції (P) та фермента (E). Ці етапи можна описати наступним рівнянням і відобразити схематично (рис. 2):



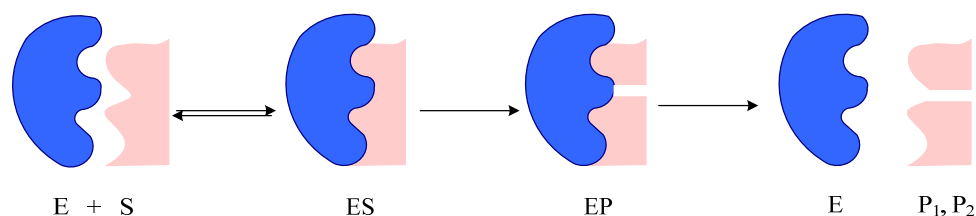


Рис. 2. Стадії ферментативного каталізу: E – фермент, S – субстрат, ES – фермент-субстратний комплекс, P – продукти реакції

Перша стадія – зближення та орієнтація субстрату відносно активного центра фермента з метою утворення фермент-субстратного комплексу – відбувається внаслідок зв'язування субстрату з активним центром ферменту водневими, електростатичними та гідрофобними взаємодіями, а в низці випадків – ковалентними та координаційними зв'язками. На цьому етапі має велике значення просторова конфігурація білкової молекули фермента, в якій жорсткі ділянки чергуються з еластичними лінійними відрізками, що надає молекулі фермента можливість динамічно змінюватися: приєднання субстрату до фермента змінює структуру активного центра останнього, його функціональні групи розміщуються так, що реакція може відбуватися. Утворення фермент-субстратного комплексу відбувається дуже швидко, тривалість цієї стадії залежить від концентрації субстрату, швидкості його дифузії до активного центра фермента. Енергія активації при цьому змінюється несуттєво.

Друга стадія – перетворення первинного фермент-субстратного комплексу на один або кілька проміжних – характеризується послабленням зв'язків у субстраті, їх розривом або утворенням нових у результаті дії каталітичних груп фермента; формується молекула продукта. За рахунок утворення перехідних комплексів знижується енергія активації субстрату, що зумовлює зростання швидкості його перетворення. Ця стадія відбувається найповільніше та лімітує швидкість усього каталізу.

Третя стадія – відокремлення від комплексу продуктів реакції, які утворилися в процесі ферментативної реакції та перехід фермента у початковий стан. Тривалість цієї стадії наближається до першої та визначається швидкістю дифузії продукту в середовище.

Як уже зазначалося, ферменти прискорюють біохімічні реакції за рахунок зниження енергії активації. *Енергія активації* – це енергія, необхідна для переходу молекул 1 моль речовини в активний (перехідний) стан при певній температурі. Іншими словами, це енергія, необхідна для запуску хімічної реакції. Фермент знижує енергію активації шляхом збільшення

числа активованих молекул, які стають більш реакційно здатними на нижчому енергетичному рівні. Наприклад, при розщепленні пероксиду водню на воду та кисень енергія активації для досягнення перехідного (активного) стану дорівнює 18 ккал/моль. За участі платини енергія активації знижується до 12 ккал/моль, а під впливом фермента каталази – до 5 ккал/моль.

З рисунка 3 видно, що для досягнення збудженого стану вихідних речовин необхідно затратити найбільше енергії активації (рис. 3, 1); менше енергії вимагає реакція за участі небіологічного катализатора (рис. 3, 2); і найменше енергії активації затрачається на реакцію за участі біологічного катализатора (рис. 3, 3). Слід відмітити, що як каталізована ферментом, так і не каталізована ним реакція не залежно від її шляху має однакову величину стандартної зміни вільної енергії (ΔG).

Активний центр на всіх етапах ферментативного каталізу відіграє роль комплексного молекулярного механізму, який використовує різні хімічні

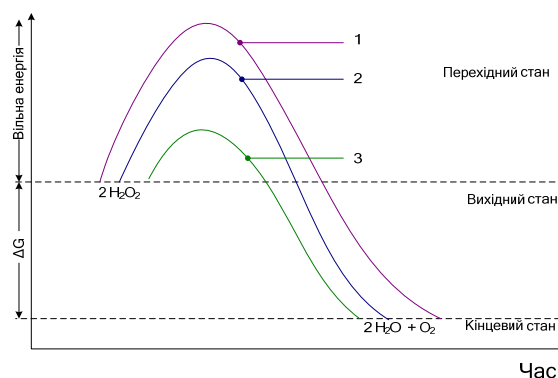


Рис. 3. Енергія активації гідролізу пероксиду водню: 1 – спонтанна реакція, 2 - реакція з небіологічним катализатором (платиною), 3 – реакція з

перетворення, які сприяють перетворенню субстрату на продукт. На молекулярному рівні властивість контактних ділянок активного центра фермента специфічно зв'язувати субстрат і забезпечувати в такий спосіб їх взаємну орієнтацію та зближення так, щоб це було вигідно для дії каталітичних груп, називають *ефектом зближення та орієнтації реагентів*. Таке впорядковане розташування знижує енергію активації, що, своєю чергою, визначає каталітичну ефективність ферментів. Активний центр фермента також сприяє дестабілізації міжатомних зв'язків у молекулі субстрату, що полегшує перебіг хімічної реакції та утворення продуктів. Цю властивість активного центра називають *ефектом деформації субстрату*. Після зв'язування з активним центром молекула субстрату ніби розтягується. Місце деформації легше атакується, наприклад, молекулами води. Чим більша довжина міжатомного зв'язку в молекулі субстрату, тим менша енергія його розриву (знижується енергія активації).

У залежності від ролі функціональних груп активного центра фермента розрізняють кислотно-основний і ковалентний каталіз.

Кислотно-основний каталіз характеризується участю в ферментативній реакції кислотних і/або основних груп. Так, радикали таких амінокислот як цис, тир, сер, ліз, глу, асп і особливо гіс можуть виступати як у ролі донорів протонів, так і їх акцепторів, надаючи ферментам властивостей універсальних каталізаторів, на відміну від небілкових каталізаторів, які проявляють або лише кислі, або лужні властивості. Прикладом такого каталізу може бути фермент алкогольдегідрогеназа печінки, яка містить іон Zn^{2+} та $НАД^+$ у якості кофермента і каталізує реакцію окиснення етилового спирту: позитивно заряджений атом цинку сприяє від'єднанню протона від спиртової групи етанолу з утворенням негативно зарядженого атома кисню; негативний заряд перерозподіляється між атомом кисню та сусіднім атомом Гідрогену, який потім у вигляді гідрит-іона переноситься на четвертий

вуглецевий атом нікотинаміду з утворенням відновленої форми НАДН і оцтового альдегіду.

Ковалентний каталіз базується на утворенні ковалентних зв'язків між нуклеофільними (негативно зарядженими) або електрофільними (позитивно зарядженими) групами активного центра фермента та субстратом. Прикладом цього може служити дія серинових протеїназ (трипсину, хімотрипсину, тромбіну), до складу активного центра яких входить гідроксильна група серину та імідазольна група гістидину. Остання відтягує на себе протон від ОН-групи серину, внаслідок чого з'являється надлишкова електронна щільність на атомі Оксигену серину та полегшується нуклеофільна атака гідроксилом серину СО-групи субстрату. При цьому ацильний радикал від субстрату переноситься на сериновий залишок ферменту. Тоді атом гістидину здійснює нуклеофільну атаку на кисень ацильного похідного серину, внаслідок чого ацильна група відщеплюється і переноситься на молекулу води.

Максимальна активність ферменту спостерігається при оптимальних умовах перебігу реакції і зумовлена оптимальною конформацією молекули ферменту в цілому та активного центра зокрема. Тому навіть невеликі зміни умов, що впливають на зв'язування субстрату або конформацію третинної структури білка, будуть змінювати швидкість ферментативної реакції.

Кінетика ферментативних реакцій

Ферментативна кінетика досліджує вплив на швидкість перебігу реакції різних хімічних речовин і фізико-хімічних чинників, які є достатньо численними та різноманітними. До них відносять концентрацію фермента та субстрату, рН і температуру, наявність активаторів або інгібіторів. Вивчення кінетики ферментативної реакції важливо для вибору одиниць активності ферментів, здійснення їх очищення, планування проведення досліджень та інтерпретації результатів тощо.

Вплив концентрації фермента та субстрату на швидкість ферментативної реакції. Швидкість будь-якої ферментативної реакції залежить від концентрації фермента. У переважній більшості випадків у початковий період реакції, за умови надлишку фермента та невеликої кількості продукту швидкість реакції (V) прямо пропорційна його концентрації – $[E]$ і має лінійний характер: $V=K \times [E]$, де K – коефіцієнт (рис. 4, А). Але з часом кількість продукту зростає і з'являється можливість для перебігу зворотної реакції, внаслідок чого лінійна залежність втрачається.

Якщо ж концентрацію фермента залишити постійною, змінюючи лише концентрацію субстрату $[S]$, то графік швидкості ферментативної реакції буде описуватися гіперболою (рис. 4, Б).

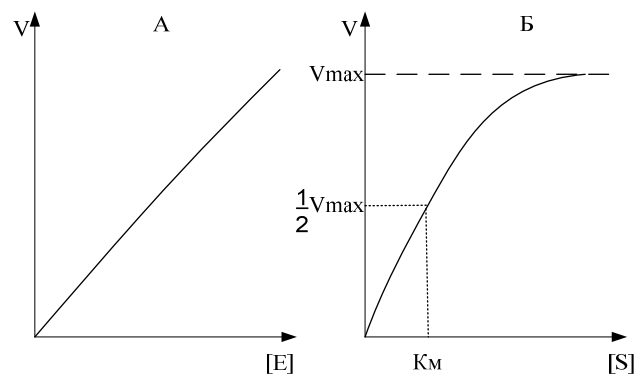
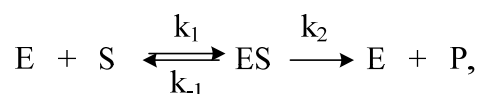


Рис. 4. Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації

При збільшенні кількості субстрату початкова швидкість зростає і коли фермент повністю насичується субстратом, тобто відбувається максимально можливе утворення фермент-субстратних комплексів, спостерігають найвищу швидкість утворення продукту. Але подальше збільшення концентрації субстрату не призведе до збільшення утворення продукту, оскільки швидкість реакції збільшуватися не буде. Описаний стан відповідає **максимальній швидкості реакції (V_{max})**.

На основі аналізу залежності V від $[S]$ Л. Міхаеліс і М. Ментен сформулювали в 1913 р. загальну теорію кінетики дії ферментів. Вони постулювали, зокрема, що ферментативна реакція є двостадійною. На першій стадії фермент вступає в швидку зворотну взаємодію з субстратом з утворенням фермент-субстратного комплексу (ES), а під час другої стадії, яка

відбувається повільніше і лімітує швидкість процесу, комплекс ES розпадається з утворенням продукту реакції (P) та відновленого стану ферменту:



де k_1 – константа швидкості утворення ES, k_{-1} – константа швидкості зворотної реакції (розпаду ES), k_2 – константа швидкості утворення продукту реакції. Співвідношення констант швидкостей $(k_{-1} + k_2) / k_1$ називають константою Міхаеліса (K_M).

На основі цього було виведено рівняння, яке пов'язує V і $[S]$, відоме під назвою рівняння Міхаеліса:

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]},$$

де: V – початкова швидкість реакції, тобто швидкість, що реєструється впродовж періоду часу, за який рівень субстрату не перевищує 10 %. У цей період швидкість реакції можна вважати приблизно постійною, оскільки, по-перше, зменшення кількості субстрату невелике, а по-друге, концентрація продукту незначна. V_{\max} дає характеристику каталітичній активності фермента і має розмірність швидкості ферментативної реакції моль/л, тобто, вона визначає максимальну можливість утворення продукту при певній концентрації фермента в умовах надлишку субстрату.

У випадку, коли швидкість реакції рівна половині максимальної ($V = V_{\max}/2$), то $K_M = [S]$. Таким чином, константа Міхаеліса чисельно дорівнює концентрації субстрату, при якій швидкість ферментативної реакції становить половину від максимальної. Ця величина характеризує спорідненість того чи іншого фермента до конкретного субстрата і є величиною постійною, незалежною від концентрації фермента. Якщо K_M значно більша від $[S]$,

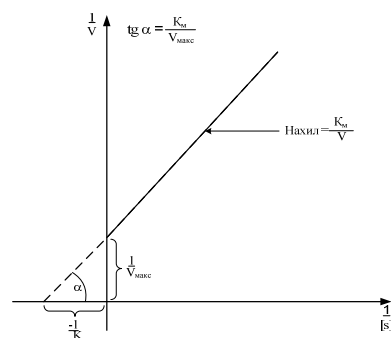


Рис. 5. Графік Лайнуівера-Берка

тобто $K_M \gg S$, то сума $(K_M + S)$ приблизно дорівнює K_M , відповідно рівняння набуває вигляду: $V = V_{\text{макс}} \times [S] / K_M$. У цьому випадку швидкість ферментативної реакції прямо пропорційна концентрації субстрату, тобто при малих концентраціях субстрату швидкість буде зростати із збільшенням концентрації. Якщо $[S] \gg K_M$, то зростання концентрації субстрату на величину $K_M + [S]$ практично не впливає і нею можна знехтувати. Тому швидкість реакції буде дорівнювати максимальній швидкості: $V = V_{\text{макс}}$.

Обробка рівняння Міхаеліса-Ментен за методом подвійних зворотних величин дає змогу відобразити залежність V від $[S]$ прямою лінією (рівняння Лайнуївера-Берка) (рис. 5).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\text{макс}}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{макс}}}$$

Між $1/V$ та $1/[S]$ є прямопропорційна залежність, яка дозволяє легко отримати значення кінетичних констант K_M та $V_{\text{макс}}$, що неможливо при аналізі звичайної гіперболи.

Із рівняння та графіка випливає, що кутовий коефіцієнт прямої (tg кута нахилу) дорівнює $K_M/V_{\text{макс}}$. Значення цих констант легко знайти за графіком.

Залежність швидкості ферментативної реакції від температури. Зростання температури до певних визначених меж чинить вплив на швидкість ферментативної реакції, подібно до впливу температури на будь-яку хімічну реакцію, що супроводжується прискоренням руху молекул і, відповідно, прискоренням ймовірності взаємодії реагуючих речовин. Крім того, температура може підвищувати енергію реагуючих речовин, що теж прискорює реакцію. Однак, швидкість ферментативної реакції має свій

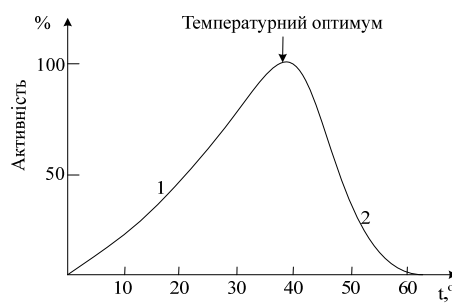


Рис. 6.

Вплив температури на швидкість ферментативної реакції: 1 – зростання швидкості реакції при підвищенні температури; 2 - зниження швидкості реакції при денатурації фермента

температурний оптимум, перевищення якого супроводжується зниженням ферментативної активності внаслідок термічної денатурації білкових молекул (рис. 6).

Для більшості ферментів людини оптимальна температура 37-40 °С, проте в природі існують і термостабільні ферменти: Таq-полімераза, виділена з мікроорганізмів, яка не інактивується навіть при 95 °С. Цей фермент використовують у науково-практичній медицині для молекулярної діагностики захворювань із використанням методу ланцюгової полімеразної реакції.

Зниження температури нижче оптимальної тимчасово сповільнює активність ферменту внаслідок зменшення процесів дифузії молекул; повернення того чи іншого фермента в оптимальне температурне середовище відновлює його активність. Цю здатність ферментів широко використовують у медицині для пригнічення метаболічних процесів у тканинах (під час трансплантації органів, операцій на серці), у фармації для збереження препаратів і лікарських форм (наприклад, білкових препаратів, відварів, настоїв, емульсій тощо), у народному господарстві, наприклад, для збереження харчових продуктів.

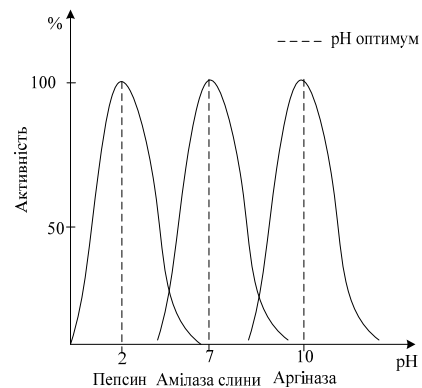


Рис. 7. Залежність швидкості ферментативної реакції від рН середовища

Залежність швидкості ферментативної реакції від рН середовища.

Для кожного фермента існує певне значення рН середовища, в якому він виявляє максимальну активність. Для пепсину воно становить 1,5 – 2,0, піруваткарбоксилази 4,8, аргінази – 9,5 – 10,0. Проте, більшість ферментів організму людини мають оптимум рН, наближений до нейтрального:

фумараза 6,5; каталаза 6,8 – 7; уреаза 6,8 – 7,2; амілаза слини 6,8 – 7,4, карбоксипептидаза 7,5; трипсин 7,5 – 8,5, (рис. 7).

Вплив рН на активність фермента пов'язаний із іонізацією функціональних груп амінокислотних залишків білкової молекули, що забезпечує оптимальну конформацію активного центра. Відхилення рН від оптимальних величин порушує іонізацію функціональних груп в активному центрі фермента. Так, наприклад, залуження середовища спричинює від'єднання іонів H^+ від карбоксильних груп (COO^-), тоді як закиснення, навпаки, приєднання протонів до вільних аміногруп (NH_3^+). Це викликає зниження активності ферменту, порушує спорідненість субстрату до фермента і гальмує каталітичний процес в цілому. При значному відхиленні від оптимального значення рН може відбуватися денатурація білкової молекули з повною втратою ферментативної активності. Зміна рН середовища може також впливати і на просторову організацію субстрату.

Специфічність дії ферментів

Специфічність – одна з найважливіших властивостей ферментів, яка визначає біологічну значимість цих білкових молекул і істотно відрізняє їх від небілкових каталізаторів. В основі специфічності лежить відповідність стеричної структури субстрату й активного центра фермента, внаслідок чого даний фермент з безлічі речовин, які є в клітині, приєднує лише певний субстрат.

Розрізняють субстратну та каталітичну специфічності фермента. **Субстратна специфічність** – це здатність фермента взаємодіяти з одним або кількома субстратами. Вона може бути абсолютною, груповою та стереоспецифічністю. Фермент з **абсолютною субстратною специфічністю** каталізує перетворення лише одного субстрату з певною структурою. Будь-які модифікації (зміни) у структурі субстрату роблять його недоступними для дії ферменту. Прикладом можуть слугувати аргіназа, яка

каталізує реакцію розщеплення аргініну на сечовину та орнітин, та уреаза, яка каталізує гідроліз сечовини з утворенням вуглецю оксиду (II) та аміаку. Сахараза гідролізує тільки сахарозу, а на інші дисахариди не діє.

Переважає більшість ферментів каталізує однотипні реакції з невеликою кількістю (групою) структурно подібних субстратів із характерним типом зв'язку, тобто вони володіють **груповою субстратною специфічністю**. Так, панкреатична ліпаза гідролізує жири в дванадцятипалій кишці, каталізуючи перетворення будь-якої молекули жиру до моноацилгліцеролу та двох молекул вищих жирних кислот, розриваючи ефірний зв'язок біля α -атомів вуглецю гліцеролу, незалежно від того, які жирні кислоти входять до складу молекули жиру. Протеолітичні ферменти (пепсин, трипсин, хімотрипсин) теж володіють груповою субстратною специфічністю, гідролізуючи пептидні зв'язки, утворені різними амінокислотними залишками.

Ферменти зі **стереохімічною специфічністю** діють лише на певні стереоізомери. Наприклад, більшість моносахаридів і продуктів їх обміну в організмі людини належать до D-стереоізомерів; ферменти, які здійснюють їх метаболізм, не володіють специфічністю до L-форм. Білки людини складаються з амінокислот L-ряду, тому більшість ферментів, які забезпечують перетворення амінокислот, володіють стереоспецифічністю до L-амінокислот. Якщо сполука існує в формі цис- і транс-ізомерів, то тільки одна з них може служити субстратом для дії ферменту, наприклад, фумараза каталізує перетворення фумарої кислоти (транс-ізомер), але не діє на малеїнову кислоту (цис-ізомер). Виключення становлять лише епімерази (рацемази), які каталізують перетворення оптичних ізомерів. Стереоспецифічність до α - та β -глікозидних зв'язків можна розглянути на прикладі амілази, яка діє лише на α -глікозидні зв'язки, що дозволяє гідролізувати крохмаль і глікоген. Клітковина, хоч і теж складається з залишків глюкози, не гідролізується в організмі людини, оскільки містить у

своєму складі β -глікозидні зв'язки, для гідролізу яких в організмі людини немає відповідних ферментів.

Каталітична специфічність – це такий вид специфічності, коли фермент каталізує перетворення приєднаного субстрату за одним із кількох можливих шляхів. Так, наприклад, молекула глюкозо-6-фосфату в гепатоцитах виступає субстратом для 4 різних ферментів: фосфоглюкомутази, глюкозо-6-фосфатфосфатази, фосфоглюкоізомерази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Завдяки особливостям будови каталітичних ділянок цих ферментів відбувається перетворення цього субстрату на 4 різних продукти.

Регуляція активності ферментів

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.

Будь-які зміни зовнішнього чи внутрішнього середовища вимагають включення адаптаційних процесів, що реалізуються, першою чергою, через зміну швидкості тієї чи іншої ферментативної реакції.

Регуляція швидкості ферментативної реакції здійснюється трьома шляхами: зміною кількості ферменту; доступністю субстрату та кофермента; зміною каталітичної активності молекули фермента.

Перший шлях регуляції є механізмом довготривалої адаптації ферментів. Для його включення і повної реалізації необхідно декілька годин або діб. Він полягає у зміні впливу на систему ядерного геному або рибосомального білкового синтезу (вплив на процеси транскрипції та

трансляції) метаболітів, гормонів та інших біологічно активних речовин. Цей тип регуляції характерний здебільшого для мікроорганізмів, ферменти яких поділяють на два класи: *конститутивні*, які синтезуються мікроорганізмами постійно, не залежно від умов існування та *адаптивні*, інтенсивність біосинтезу яких змінюється залежно від змін умов існування. Адаптивні ферменти мікроорганізмів поділяють на *індуцибельні* та *репресибельні*, тобто такі, активність синтезу яких підвищується або гальмується залежно від дії певних сполук-ефекторів.

Другий шлях регуляції здійснюється на рівні двох параметрів: субстрату та кофермента. Чим більша концентрація субстрату (особливо першого, вихідного), тим вища швидкість метаболічного шляху. Стосовно кофермента слід зазначити, що важливе значення для регуляції має наявність регенованих коферментів. Наприклад, у реакціях дегідрування коферментами дегідрогеназ є окиснені форми НАД⁺, ФАД, ФМН, які відновлюються в ході реакції. Для того, щоб коферменти могли знову брати участь у реакції, необхідна їх регенерація, тобто перехід в окиснену форму.

Третій шлях регуляції активності ферментів може відбуватися за чотирма основними механізмами (L. Stryer, 1995): ковалентною модифікацією; обмеженим протеолізом; білок-білковими взаємодіями; алостерично.

До регулюючих механізмів можна віднести і явище компартменталізації – строга локалізація ферментів у різних органелах, що дозволяє одночасно перебігати різноспрямованим процесам (наприклад, синтез і розпад) у межах однієї клітини. Так, процес синтезу жирних кислот відбувається в цитоплазмі, а їх розпад зосереджений у мітохондріях.

Ковалентна модифікація ферментів – один із механізмів контролю метаболічних процесів, що може відбуватися шляхом зворотного фосфорилювання-дефосфорилювання, метилування, аденілування, АДФ-рибозилування білків-ферментів. Фосфорилюють білки спеціальні ферменти

протеїнкінази, які за допомогою залишку фосфату АТФ здійснюють фосфорилювання серинового, тирозинового чи треонінового радикалу відповідного білка. Зворотну реакцію – дефосфорилювання білків – каталізують *протеїнофосфатазами*. Субстратами протеїнкіназ є численні ферментативні білки (*глікогенфосфорилаза, кіназа фосфорилази b, глікогенсинтаза, тригліцеридліпаза, піруватдегідрогеназа, ацетил-КоА-карбоксилаза* тощо), деякі білки мембранних каналів, гістони хроматину тощо. Приєднання залишка фосфорної кислоти призводить до зміни конформації активного центра, при цьому результат може бути двояким: фосфорилювання багатьох білків-ферментів трансформує їх у каталітично активну форму (фосфорилювання глікогенфосфорилази, кінази фосфорилази b, тригліцеридліпази тощо), тоді як фосфорилювання інших ферментативних білків (глікогенсинтази, β -ГОМК-редуктази) є, навпаки, механізмом їх інактивації (рис. 8).

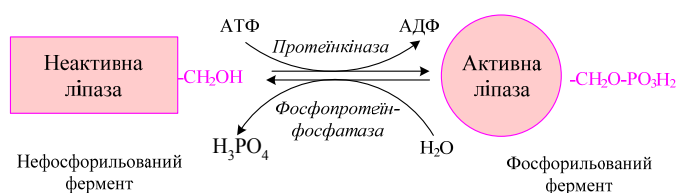


Рис. 8. Регуляція активності ліпази

Зміна активності фермента внаслідок фосфорилювання зазвичай зворотна і регулюється гормонами, що дозволяє швидко змінювати активність ключових ферментів метаболічних шляхів.

Активація ферментів шляхом обмеженого протеолізу. Активація низки ферментів (здебільшого травного тракту або плазми крові) може відбуватися протеолітичним шляхом. Такі ферменти синтезуються в неактивній формі у вигляді проферментів або зимогенів (попередників ферментів), активний центр яких замаскований додатковою ділянкою пептидного ланцюга, внаслідок чого субстрат не може взаємодіяти з активним центром. Наприклад, проферментом пепсину є пепсиноген, який синтезується головними клітинами шлункових залоз. Відщеплення від його

молекули невеликого пептидного ланцюга за участі хлоридної кислоти шлункового соку призводить до утворення пепсину та формування його активного центра. Профермент трипсиноген, який утворюється в підшлунковій залозі, у дванадцятипалій кишці під впливом ферменту ентерокинази шляхом відщеплення гексапептиду перетворюється на трипсин. Після цього створюються умови, які сприяють утворенню активного центру ферменту, і трипсиноген перетворюється на трипсин. Ці процеси можуть також відбуватися аутокаталітично, тобто під впливом вже утвореного пепсину чи трипсину відповідно.

Активация шляхом білок-білкових взаємодій включає в себе два механізми: активацію в результаті приєднання регуляторних білків і зміну каталітичної активності внаслідок асоціації чи дисоціації протомерів фермента.

До регуляторних білків, які можуть чинити вплив на активність ферментів належать:

- *кальмодулін-кальційвмісний білок*, який, зв'язуючись з чотирма іонами кальцію, сприяє збільшенню цитозольної концентрації останнього при певних біохімічних та фізіологічних процесах у клітині. Утворений комплекс кальмодулін-кальцій здатний до активації багатьох ферментів, зокрема фосфодіестерази циклічних нуклеотидів, кінрази легких ланцюгів міозину тощо;
- *протеїназні інгібітори* блокують активність тканинних протеїназ – ферментів, здатних розщеплювати власні білки організму. Найактивнішими протеїназами є α_2 – *макроглобулін* та α_1 – *антитрипсин* (α_1 - *протеїназний інгібітор*), які блокують активність серинових та інших протеїназ;
- *антигемофільний глобулін А* (фактор VIII згортальної системи крові). Цей білок бере участь в активації фактора X, який запускає весь коагуляційний каскад, що призводить до утворення тромба.

Прикладом регуляції каталітичної активності шляхом асоціації/дисоціації протомерів може служити регуляція активності протеїнкінази А, функцією якої є фосфорилування інших білків-субстратів, що призводить до значного посилення регуляторного сигналу (каскадна

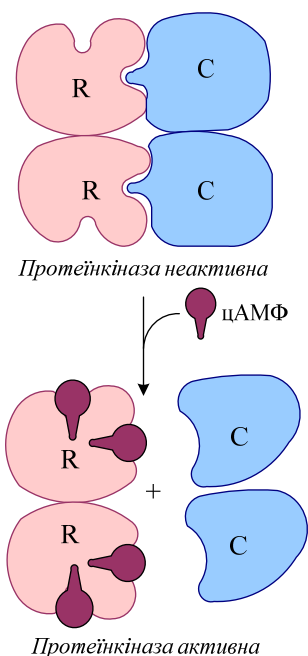
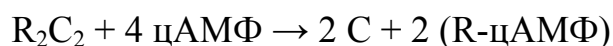


Рис. 9. Активація протеїнкінази за участі цАМФ

система регуляції). Цей фермент в неактивній формі є тетрамером R_2C_2 який складається з двох регуляторних (R) і двох каталітичних (C) субодиниць (рис. 9).

Регуляторні субодиниці мають центри зв'язування для цАМФ (по 2 на кожен субодиницю). Активна протеїнкіназа представлена субодиницями C, для вивільнення яких необхідна дисоціація комплексу. Активація ферменту відбувається за участі цАМФ, який приєднуються до субодиниць R і змінює конформацію білка, що призводить до порушення комплементарності субодиниць R і C і дисоціації комплексу.



Такий механізм регуляції зворотний. Від'єднання молекул цАМФ від регуляторних субодиниць призведе до асоціації регуляторних і каталітичних субодиниць протеїнкінази А з утворенням неактивного комплексу.

Алостерична регуляція ферментів. Активування ферментів може здійснюватися шляхом приєднання до алостеричного центра фермента специфічної модифікуючої групи (*активатора*), що сприяє зміні конформації фермента, його активного центра та, як наслідок, прискоренню ферментативної реакції (*алостерична активація*). Вона характерна для олігомерних ферментів, які складаються з кількох протомерів або мають доменну структуру. У центральних метаболічних шляхах вихідні речовини можуть виступати активаторами ключових ферментів, при цьому

організмів, лікувальні ефекти деяких лікарських речовин зумовлені їх інгібуючою дією на ферменти. Серед інгібіторів є як синтетичні речовини, так і природні метаболіти.

Процес інгібування ферментів може бути *зворотнім* і *незворотнім*. Якщо молекула інгібітора викликає стійкі зміни, модифікацію функціональних груп ферменту або їх руйнування, то такий тип інгібування називається незворотнім. *Незворотне гальмування* виникає, коли утворений комплекс фермент-інгібітор практично не дисоціює. Такі інгібітори хімічно модифікують важливі функціональні групи фермента, тому після усунення інгібітора шляхом діалізу активність модифікованого фермента не відновлюється. Незворотні інгібітори мають властивості клітинних отрут.

Прикладами незворотних інгібіторів є диізопропілфторфосфат (ДІФФ), який інактивує низку гідролаз (трипсин, хімотрипсин, ацетилхолінестеразу тощо), модифікуючи важливий для активності цих ферментів залишок серину; фторид натрію, який інгібує фосфатази, фенапролін – металовмісні ферменти.

До незворотних неконкурентних інгібіторів належать також фосфорорганічні препарати, наприклад хлорофос. Фосфорорганічні сполуки (ФОС) блокують каталітичну ділянку ферменту ацетилхолінестерази; у результаті цього фермент стає неактивним, що призводить до накопичення ацетилхоліну та, як наслідок, отруєння організму, тому ФОС застосовують для боротьби зі шкідниками сільського господарства, побутовими комахами, гризунами тощо. У медичній практиці відомі випадки отруєння синільною кислотою, коли смерть настає внаслідок повного гальмування та виключення дії ферментів тканинного дихання (система цитохромів), особливо клітин мозку.

Зворотні інгібітори взаємодіють з ферментом без утворення ковалентних зв'язків. Після інкубації з утворенням комплексу фермент-інгібітор активність фермента відновлюється при видаленні інгібітора

шляхом діалізу. Прикладами таких інгібіторів є клітинні метаболіти та їх структурні аналоги, які знижують активність ферментів.

За механізмом дії зворотні інгібітори ферментів поділяють на конкурентні, неконкурентні, безконкурентні, субстратні (або метаболічні) та алостеричні.

Конкурентне інгібування. Конкурентні інгібітори за будовою подібні до субстрату, вони конкурують із ним за зв'язування з активним центром фермента (рис. 11).

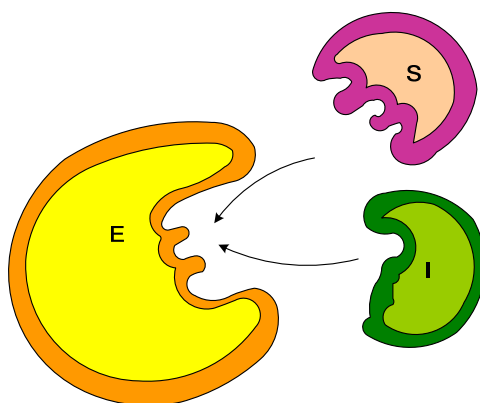
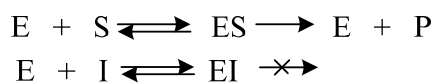


Рис. 11. Конкурентне інгібування:

S – субстрат, I – інгібітор, E – фермент

Характерною особливістю конкурентного гальмування є те, що ефективність інгібітора залежить від співвідношення концентрацій субстрату й інгібітора. При наявності субстрату [S] та інгібітора [I] одночасно відбувається дві реакції:



Гальмування відбудеться тоді, коли концентрація інгібітора перевищить концентрацію субстрату. У цьому випадку інгібітор утворює з ферментом комплекс фермент-інгібітор і виключає фермент із

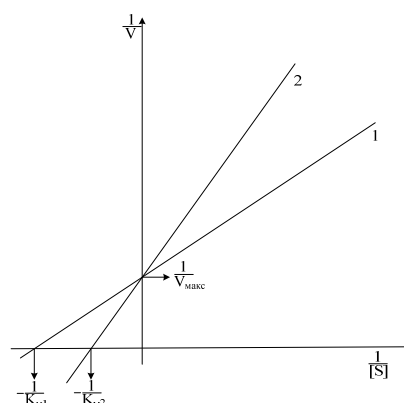
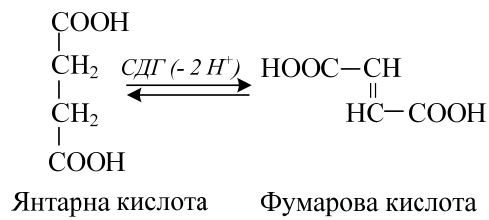


Рис. 12. Конкурентне інгібування фермента: 1 – без інгібітора; 2 – у присутності інгібітора

реакції. Але якщо концентрація субстрату буде вищою за концентрацію інгібітора, утворюється фермент-субстратний комплекс і дія інгібітора припиняється. Кінетичний аналіз за Лайнуївером-Берком демонструє, що конкурентні інгібітори збільшують константу Міхаеліса K_m ферменту і не впливають на максимальну швидкість реакції (рис. 12).

Прикладом конкурентного гальмування є дія малонової та деяких інших дикарбонових кислот на фермент сукцинатдегідрогеназу (СДГ), який каталізує в організмі перетворення янтарної кислоти (сукцинату) на фумарову (фумарат).



Малонова кислота є інгібітором даної реакції; у структурному відношенні вона подібна до янтарної кислоти і може конкурувати з останньою за місце в активному центрі СДГ (рис. 13).

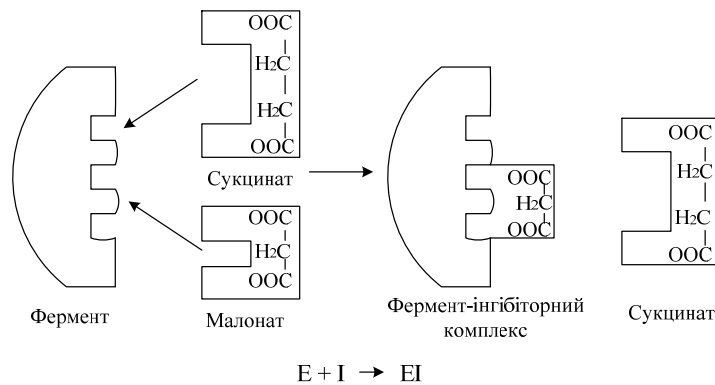


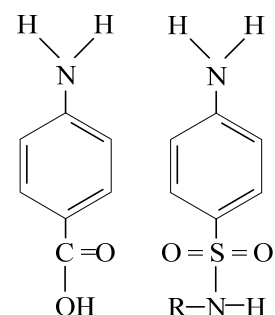
Рис. 13. Схема конкурентного гальмування СДГ малонатом

У цьому випадку СДГ ніби «ошукана»: вона замість субстрату (янтарної кислоти) захоплює його «двійника» (малонову кислоту) і субстрат уже не може розташуватися на контактній ділянці ферменту. Якщо ж навколо ферменту з'явиться багато молекул субстрату (янтарної кислоти), то субстрат витисне інгібітор з активного центру. Оскільки в комплексі фермент-

інгібітор через специфічність дії ферменту хімічної реакції не відбувається, активність СДГ виявляється тільки відносно свого субстрату. Навпаки, якщо кількість молекул інгібітора є значною, то субстрату важче проникнути на контактну ділянку ферменту, активність його буде дуже низькою – ферментативна реакція блокується.

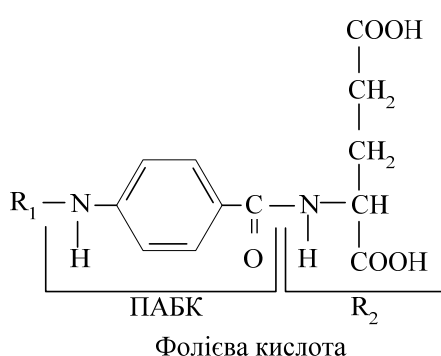
У якості інгібіторів ферментів за конкурентним механізмом у медичній практиці використовують речовини, які називають *антиметаболітами*. Будучи структурними аналогами природних субстратів, ці сполуки, з одного боку, викликають конкурентне інгібування ферментів, а з іншого – можуть використовуватися цими ж ферментами в якості псевдосубстратів, що призводить до синтезу аномальних продуктів, які не володіють функціональною активністю.

В якості лікарських препаратів-антиметаболітів використовують аналоги нуклеотидів для лікування онкологічних захворювань, сульфаніламідні препарати (аналогі параамінобензойної кислоти (ПАБК)) для лікування інфекційних захворювань. ПАБК структурно подібна до сульфанілової кислоти, похідні якої є сульфаніламідними препаратами.



ПАБК Сульфаніламід

У мікроорганізмах в присутності ПАБК синтезується фолієва кислота,



Фолієва кислота

яка є важливим коферментом низки ферментів, що беруть участь у синтезі нуклеїнових кислот, а отже, і білків, тобто фолієва кислота є фактором росту бактерій, зокрема, стафілококів, пневмококів тощо. Цим забезпечується ріст і розмноження мікроорганізмів. У фолієвій кислоті ПАБК має два замісники: гетероциклічне похідне (R_1) і глутамінову кислоту (R_2). Сульфаніламідні препарати конкурують з ПАБК (структурна подібність) на стадії утворення фолієвої

кислоти. Наявність сульфамідної групи в сульфаніламідних препаратах перешкоджає взаємодії ПАБК з глютаміновою кислотою, цим самим припиняється (блокується) біосинтез фолієвої кислоти. Гальмування синтезу фолієвої кислоти в мікроорганізмах призводить до порушення біосинтезу нуклеїнових кислот і білків, внаслідок цього пригнічується ріст і розмноження бактерій.

Таким чином, сульфанілова кислота та її N-заміщені аміди, виступають

антиметаболітами ПАБК,

зумовлюють

бактеріостатичний ефект.

Неконкурентним

інгібуванням називають таке

гальмування, при якому

інгібітор не є структурним

аналогом субстрату, він

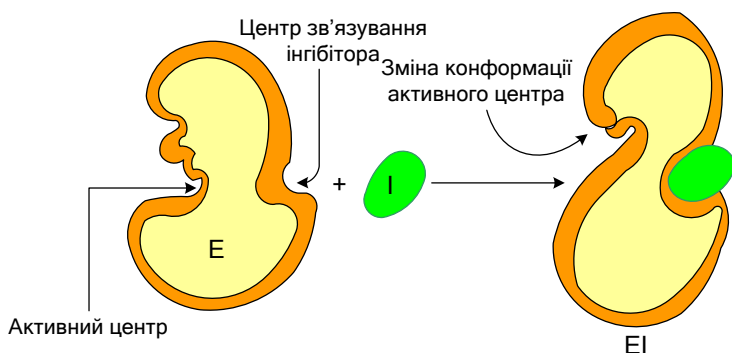


Рис. 14. Неконкурентне інгібування фермента

аналогом субстрату, він взаємодіє з ферментом або в ділянці, відмінній від активного центра, або з уже сформованим фермент-субстратним комплексом. Приєднання неконкурентного інгібітора викликає зміну конформацію молекули фермента в такий спосіб, що порушується взаємодія субстрату з активним центром фермента, що призводить до зниження швидкості реакції (рис. 14).

У випадку утворення потрійного комплексу (фермент-субстрат-інгібітор) останній не спроможний перетворитися на продукт, у результаті чого реакція зупиняється.



??Неконкурентні інгібітори можуть бути проміжними продуктами метаболізму, які утворюються в живих організмах. Вони здатні зменшувати швидкість реакції ($V_{\text{макс}}$), але не впливати на спорідненість ферменту до субстрату (K_M) (рис. 15).

Неконкурентними інгібіторами є ціаніди, які міцно сполучаються з

тривалентним залізом, яке входить в каталітичну ділянку гемінового фермента цитохромоксидази. Блокування останнього призводить до припинення тканинного дихання та загибелі клітини.

Велика токсичність іонів ртуті, свинцю, миш'яку обумовлена їх властивістю блокувати SH-групи каталітичних ділянок низки ферментів. Проте, важкі метали лише в невеликих концентраціях виконують роль неконкурентних інгібіторів, у великих кількостях вони є інактиваторами і діють як денатуруючі агенти. Для подолання інтоксикації, викликаної цими препаратами, застосовують різні реактиватори (або протиотрути), які витісняють інгібітор з комплексу. До них відносять, наприклад, SH-вмісні комплекси (цистеїн, унітіол тощо), лимонну кислоту, етилендіамінтетраацетатну кислоту тощо.

Безконкурентне інгібування. Цей тип інгібування спостерігають у тому випадку, коли інгібітор зворотно взаємодіє з ферментом тільки після утворення фермент-субстратного комплексу, тобто безконкурентний інгібітор не сполучається з ферментом у відсутності субстрату. Інгібітор полегшує приєднання субстрату, а потім, зв'язуючись, інгібує фермент. Це рідкісний вид інгібування.

Субстратне інгібування. Наявність надмірно високої концентрації субстрату викликає гальмування ферментативної реакції. Пояснюється цей факт тим, що молекули субстрату в надлишку займають неправильне положення в активному центрі фермента (рис. 16).

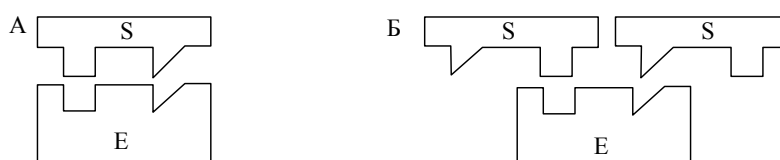
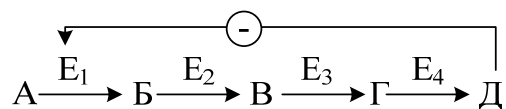


Рис. 16. Схема субстратного інгібування: А – молекула субстрату (S) оптимально розташована в активному центрі фермента (E); Б – дві молекули субстрату зв'язалися неправильно з активним центром фермента

У багатьох біосинтетичних реакціях основним типом регуляції швидкості багатоступінчастого ферментативного процесу є **алостеричне інгібування за типом зворотного зв'язку**, коли кінцевий продукт, який за структурою подібний до субстрату, гальмує дію фермента. Такий тип інгібування доведений для всіх живих організмів і розглядається як один з основних типів регуляції активності ферментів і клітинного метаболізму взагалі, оскільки нагромадження надлишку продукту гальмує в подальшому його утворення.

Інколи алостерична регуляція виявляється у вигляді інгібування першого фермента біохімічних перетворень кінцевим продуктом:



??Фермент, який каталізує перетворення субстрату А на продукт Б має алостеричний центр для негативного ефектора (інгібітора), який виступає кінцевий продукт метаболічного шляху (Д). Якщо концентрація останнього збільшується, то інгібується активність одного з початкових ферментів (E1). Така регуляція за принципом зворотного зв'язку (ретроінгібування) дозволяє контролювати вихід кінцевого продукту. Наприклад, при надлишку в клітині АТФ, яка утворюється під час гліколізу, відбувається ретроінгібування алостеричних ферментів фосфофруктокінази та піруваткінази (рис. 17).

Гормони також можуть виконувати роль алостеричних інгібіторів. Так, алостеричним інгібітором інсуліну є гормони надниркових залоз – глюкокортикоїди, а жіночі статеві гормони (естрогени) є алостеричними інгібіторами фермента глутаматдегідрогенази, яка каталізує дезамінування глутамінової
кислоти.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПІДГОТОВКИ СТУДЕНТІВ

1. Доведіть білкову природу ферментів, дайте їм характеристику як каталізаторам.
2. Охарактеризуйте функціонально активні ділянки ферментів (активний та алостеричний центри).
3. Дайте визначення коферментам, вкажіть їх класифікацію, наведіть приклади.
4. Назвіть класи ферментів і притаманні їм типи реакцій.
5. Що таке ізоферменти, наведіть приклади.
6. Які ви знаєте типи інгібування ферментів? Дайте характеристику кожному з них.
7. Наведіть приклади застосування ферментів у медицині.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Базова

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

Допоміжна

1. Балаболкин М.И. Эндокринология. - М.: Универсум паблишинг, 1998. – 582 с.
2. Боєчко Л.Ф., Боєчко Л.О. Основні біохімічні поняття, визначення та терміни: Навч. посібник. - К.: Вища шк., 1993. - 528 с.
3. Болдырев А.А. Введение в биохимию мембран: Учебн.пособие. М.: Высш. шк., 1986. - 112 с.

4. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т.- М.: Мир, 1985. - 1056 с.
5. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т. - М.: Мир, 1993. - т.1 - 381 с.; т.2 - 414 с.
6. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов. - М.: Медицина, 1985. - 432с.
7. Николс Д.Дж. Биоэнергетика. Введение в хемио-осмотическую теорию. – М.: Мир, 1985. - 190 с.
8. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. - М.: Мир, 1977. - 407 с.
9. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. - М.: Просвещение, 1987. - 815 с.
10. Парк Д. Биохимия чужеродных соединений. - М.: Медицина, 1973. - 288 с.
11. Розен В.Б. Основы эндокринологии. - М.: Высш. шк., 1984. - 336 с.
12. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. – М.: Наука, 1989. – 564с.
13. Тюкавкина Н. А., Бауков Ю. И. Биоорганическая химия. – М.: Медицина, 1985. – 480с.
14. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. - М.: Мир, 1986. - 374 с.
15. Хухо Ф. Нейрохимия: основы и принципы.- М.: Мир, 1990. - 384 с.
16. Черних В. П., Зіменковський Б. С., Грищенко І. С. Органічна хімія: у 3 кн. – Харків: Основа, 1997. – Кн. 1. – 145 с.; Кн. 2. – 480 с.; Кн. 3. – 256 с.
17. Руководство к лабораторным занятиям по биоорганической химии. / Под ред. Н.А.Тюкавкиной. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.
18. Halkerston I.D.K. Biochemistry: 2nd edition. The National medical series for independent study. - 1988. - 522 p.

19. Murray R.K, Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. . Harper`s Illustrated Biochemistry., LANGE medical books, 26-edition, India, 2006.- 868 p.
20. Stryer L. Biochemistry. - W.H.Freeman and Company. New York. - 1995. - 1064 p.

Рассмотрено и утверждено на заседании цикловой методической комиссии химических дисциплин Запорожского государственного медицинского университета (протокол № _____ от _____ 2015 года)

Копирование и тиражирование только по письменному согласию ЗГМУ