

**Александрова К. В., Шкода О. С., Крісанова Н. В., Юрченко Д. М.,  
Левіч С. В.**

# **ФЕРМЕНТИ**

**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., Крісанова Н. В., Юрченко Д. М.,  
Левіч С. В.**

# **ФЕРМЕНТИ**

**МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК  
З ДИСЦИПЛІНИ «БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ» ДЛЯ ВИКЛАДАЧІВ**

Запоріжжя, 2015

**УДК 577.15 (075.8)  
Ф43**

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

**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

**Автори:**

Александрова К. В., Шкода О. С., Крісанова Н. В., Юрченко Д. М., Левіч С. В.

**Ферменти** : методичний посібник для викладачів / К. В. Александрова, О. С. Шкода, Н. В. Крісанова [та ін.]. – Запоріжжя : [ЗДМУ], 2015. – 115 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 577.15 (075.8)

©Александрова К. В., Шкода О. С., Крісанова Н. В., Юрченко Д. М., Левіч С. В., 2015.  
©Запорізький державний медичний університет

## ЗМІСТ

1	АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ.....	6
2	НАВЧАЛЬНІ ЦІЛІ ЗАНЯТТЯ.....	7
3	ВИХОВНІ ЦІЛІ.....	8
4	БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ.....	9
5	ЗМІСТ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ.....	10
6	ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ.....	11
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	НАВЧАЛЬНІ ЦІЛІ ЗАНЯТТЯ.....	26
12	ВИХОВНІ ЦІЛІ.....	27
13	БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ.....	28
14	ЗМІСТ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ.....	29
15	ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ.....	30
16	АЛГОРИТМ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ.....	32
17	КОНТРОЛЬ ЗАКЛЮЧНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ З ТЕМИ.....	37
18	ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ.....	40
19	ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК-1».....	44
20	ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ.....	50
	ФЕРМЕНТИ: БУДОВА, ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, КЛАСИФІКАЦІЯ, МЕХАНІЗМ ДІЇ.....	50
	Визначення поняття «ферменти».....	50
	Хімічна природа ферментів.....	51
	Подібність і відмінність між ферментами та небілковими каталізаторами.....	54
	Специфічні властивості ферментів.....	54
	Номенклатура та класифікація.....	56
	СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ ФЕРМЕНТІВ.....	61
	Класифікація коферментів.....	62
	Функціонально активні ділянки ферментів.....	68
	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
<b>ОДИНИЦІ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ, МЕТОДИ ЇХ ВИЗНАЧЕННЯ.....</b>	<b>94</b>
Множинні молекулярні форми ферментів. Ізоферменти.....	99
Поліферментні системи.....	102
Імобілізовані ферменти та їх застосування .....	103
Значення ферментів для медицини.....	105
Автокаталіз тканин і його значення для заготівлі лікарської сировини.....	110
<b>ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПІДГОТОВКИ СТУДЕНТІВ</b>	<b>110</b>
<b>РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА</b>	<b>113</b>

## 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. Сучасна біохімія характеризується широким застосуванням методів визначення активності ферментів в біологічних рідинах і тканинах. Це дозволяє використовувати визначення активності ферментів у діагностиці багатьох захворювань і запропонувати методи їх лікування із використанням сучасних лікарських засобів. Досягнення ензимології (науки про ферменти) широко впроваджуються в медицину. Це, перш за все, ензимодіагностика і ензимотерапія, вивчення яких дозволить майбутнім провізорам запропонувати шляхи лікування різноманітних ензимопатій.

Необхідність використання ферментів в біотехнологіях для створення лікарських препаратів, а також використання деяких з них в якості лікарських засобів вимагає ретельного вивчення даної теми фахівцями у галузі фармації.

## 2. НАВЧАЛЬНІ ЦІЛІ ЗАНЯТТЯ №1

Вивчити особливості структури простих і складних ферментів, що пояснюють участь ферментів в механізмі каталізу; 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. Функція білків-ферментів в організмі. Відмінність дії ферментів від дії небілкових каталізаторів.
2. Структура простих і складних ферментів. Поняття про апофермент, кофактор, кофермент і простетичну групу. Вітамінні кофактори. Особливості структури активного центру простих і складних ферментів.
3. Ізоферменти: особливості структури, локалізації синтезу в організмі людини (на прикладі ізоферментів лактатдегідрогенази).
4. Сучасні положення про механізм дії ферментів: поняття про енергію активації ферментативної реакції; утворення фермент-субстратного комплексу та механізми отримання продуктів ферментативної реакції (ковалентний та кислотно-лужний каталіз). Значення робіт Е. Фішера і Д. Кошленда.
5. Загальні властивості ферментів: специфічність дії; вплив рН і температури середовища на активність ферментів.
6. Класифікація і номенклатура ферментів. Характеристика типів хімічних реакцій, які лежать в основі класифікації ферментів.

Необхідно вміти:

1. Проводити реакції навивчення специфічності дії амілази слини.
2. Проводити реакції на вивчення термолабільності амілази слини.
3. Досліджувати активність амілази слини при різних значеннях рН середовища.

### **3. ВИХОВНІ ЦІЛІ**

Ознайомитися з функціями білків-ферментів в організмі, структурою простих і складних ферментів, участю ферментів в механізмах каталізу, ізоферментами, сучасними положеннями про механізм дії ферментів, загальними властивостями ферментів, класифікацією та номенклатурою ферментів.



#### 4. БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ

Дисципліни	Отримані навички
<p><b>Попередні:</b> Органічна хімія</p>	<p>Класифікація органічних сполук. Поняття функціональні групи, ізомерія, основні принципи каталізу, ковалентний та кислотно-лужний каталіз.</p>
<p>Неорганічна хімія</p>	<p>Типи хімічної реакції. Поняття каталізатори, каталіз.</p>
<p>Нормальна фізіологія</p>	<p>Поняття про травну, метаболічну, захисну та інші функції ферментів.</p>
<p>Фізична та колоїдна хімія</p>	<p>Поняття про енергію активації, механізми отримання продуктів реакції. Вплив рН та температури на активність ферментів, поняття специфічності.</p>
<p><b>Наступні</b> Лабораторна діагностика, Фармакотерапія, Клінічна фармакологія</p>	<p>Ферментативний каталіз, ферментативні реакції в організмі та умови їх перебігу. Функції ферментів в організмі. Специфічність дії ферментів, термолабільність. Клиническая энзимология: ферменты, имеющие диагностическое значение, измерение активности</p>

## 5. ЗМІСТ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ

1. Визначення поняття «ферменти». Функція білків-ферментів в організмі. Відмінність дії ферментів від дії небілкових каталізаторів.

2. Структура простих і складних ферментів. Поняття про апофермент, кофактор, кофермент і простетичну групу. Вітамінні кофактори. Особливості структури активного центру простих і складних ферментів.

3. Ізоферменти: особливості структури, локалізації синтезу в організмі людини (на прикладі ізоферментів лактатдегідрогенази).

4. Сучасні положення про механізм дії ферментів: поняття про енергію активації ферментативної реакції; утворення фермент-субстратного комплексу та механізми отримання продуктів ферментативної реакції (ковалентний та кислотно-лужний каталіз). Значення робіт Е. Фішера і Д. Кошленда.

5. Загальні властивості ферментів: специфічність дії; вплив рН і температури середовища на активність ферментів.

6. Класифікації ферментів. Номенклатура ферментів. Класифікація ферментів в залежності від типу каталізуємої реакції.

## 6. ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ

Етапи	Час у хв	Навчальні матеріали		Місце проведення
		Засоби навчання	Обладнання	
1. Організаційний момент	5			Навчальна кімната
2. Контроль вихідного рівня знань	20		Тестові завдання	Навчальна кімната
3. Самостійна робота з літературою	45	Підручник, методичні вказівки «Ферменти: структура, механізм дії, регуляція активності», лекції	Картки з завданнями, зошити для контрольних робіт	Навчальна кімната
Фізіологічна перерва	10			
<p>Поділити навчальну групу на 3 бригади: №№1, 2, 3. Зміст практичної роботи для кожної бригади:</p> <p>№1: Вивчення специфічності дії амілази слини (одна робота).</p> <p>№2: Вивчення термолабільності амілази слини (одна робота).</p> <p>№3: Вивчення активності амілази слини при різних значеннях рН середовища активності (одна робота).</p>				
4. Початок роботи студентів згідно тем лабораторних робіт	45	Протоколи для лабораторних робіт	Обладнання та реагенти до лабораторних робіт, протоколи для лабораторних робіт	Навчальна кімната
5. Проведення письмової контрольної роботи	20		Картки з завданнями, зошити для контрольних робіт	Навчальна кімната
Фізіологічна перерва	20			
6. Обговорення результатів практичної роботи в комплексі з теоретичними питаннями	45	Методичні вказівки «Ферменти: структура, механізм дії, регуляція активності», лекції		Навчальна кімната
7. Обговорення результатів заняття, надання мотиваційних установок до наступного практичного заняття.	5		Список літератури у допомогу для ліквідації недоліків у вивченні теми	Навчальна кімната

## 7. АЛГОРИТМ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

### Робота № 1. Специфічність дії амілази слини

*Принцип методу.* Ферменти специфічні як стосовно типу реакцій, які каталізують, так і стосовно субстратів, на які вони діють. Амілаза слини, маючи відносну групову специфічність, розщеплює  $\alpha$ -1,4-глікозидні зв'язки в полісахаридах і не діє на дисахариди.

На підставі результатів реакції Троммера, яка підтверджує наявність альдегідної групи, можна зробити висновок про гідроліз крохмалю, що відбувся і призвів до утворення глюкози, та відсутність реакції із сахарозою.

*Обладнання та реактиви:* термостат, пробірки, піпетки, штатив, розчин слини, 1 % розчин крохмалю, 1 % розчин сахарози.

*Хід роботи.* В 2 пробірки наливають по 5 крапель слини, розведеної в 5 разів. В першу пробірку додають 10 крапель 1% розчину крохмалю, в другу – 10 крапель 1% розчину сахарози. Обидві пробірки ставлять у термостат при 38 °С на 10 хвилин. Після цього з вмістом пробірок проводять реакцію Троммера.

#### Реакція Троммера:

*Обладнання та реактиви:* пробірки, піпетки, тримач для пробірок, штатив, газовий пальник, 10% розчину NaOH, 5% розчину CuSO<sub>4</sub>.

*Хід роботи.* У кожен пробірку вносять по 5 крапель 10% розчину NaOH та по 3 краплі 5% розчину CuSO<sub>4</sub>. Збовтують вміст пробірок (утворюється яскраво-синій прозорий розчин). Обережно нагрівають пробірки і кип'ятять 1 хвилину.

*Очікуваний результат:* поява червоного забарвлення вказує на наявність глюкози (продукту гідролізу крохмалю) в пробі.

### Робота № 2. Термолабільність амілази слини.

*Принцип методу.* Про вплив температури на активність амілази слини судять зарозщепленням цим ферментом крохмалю до глюкози в різних

температурних умовах (100 °С та 38°С). Ступінь розщеплення крохмалю амілазою визначають йодною пробою, а утворення продукту реакції – пробую Троммера.

*Обладнання та реактиви:* термостат, штатив, мірна центрифужна пробірка, хімічні пробірки, газовий пальник, 1 % розчин крохмалю.

*Хід роботи.* У чисту мірну центрифужну пробірку збирають 1-2 мл слини і готують розведення слини в п'ять разів (додаючи до слини дистильовану воду). Відбирають 3 мл розведеної слини в звичайну хімічну пробірку і кип'ятять 5 хвилин на відкритому полум'ї пальника, після чого її охолоджують.

Потім беруть 3 пробірки, у кожену з яких наливають по 10 крапель 1% розчину крохмалю. Далі в першу пробірку додають 10 крапель розведеної в 5 разів не кип'яченої слини, в другу 10 крапель кип'яченої слини, в третю – 10 крапель води як контроль. Всі пробірки ставлять у термостат на 10 хвилин при 38°С. Потім вміст кожної пробірки ділять на 2 частини (знадобиться ще 3) й проводять якісну реакцію на крохмаль (йодна проба) і на глюкозу (проба Троммера).

**а) Реакція на крохмаль (йодна проба):**

*Обладнання та реактиви:* хімічні пробірки, 1% розчин йоду в калію йодиді.

*Хід роботи.* В усі три пробірки наливають по 1 краплі 1% розчину йоду в калію йодиді.

*Очікуваний результат:* в присутності крохмалю з'являється синє забарвлення.

**б) Реакція Троммера (див. роботу № 1)**

**Робота № 3. Дослідження активності амілази слини при різних значеннях рН середовища**

*Принцип методу.* Про вплив рН середовища на активність амілази слини судять за розщепленням цим ферментом крохмалю при різних значеннях рН. Ступінь розщеплення крохмалю визначається йодноюпробою.

*Обладнання та реактиви:* термостат, мірний циліндр, хімічні пробірки, штатив, фосфатний буфер з різним значенням рН (6,0; 6,4; 6,8; 7,2; 7,6; 8,0), 0,5 % розчин крохмалю, розчин йоду.

*Хід роботи.* Слину розводять в 100 разів. Беруть 6 пробірок і в кожну з них наливають по 2 мл фосфатного буферу з різним значенням рН: 6,0; 6,4; 6,8; 7,2; 7,6; 8,0. Потім доливають по 1 мл 0,5% розчину крохмалю і по 1 мл розведеної слини. Перемішують вміст пробірок і ставлять їх у термостат при 38°C на 10 хвилин. Потім в усі пробірки доливають по 1 краплі розчину йоду, перемішують, спостерігають забарвлення та відзначають оптимум рН.

*Очікуваний результат:* оптимум рН відповідає забарвленню негативної йодної проби.

## 8. КОНТРОЛЬ ЗАКЛЮЧНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ З ТЕМИ

### *Варіант 1*

1. В чому схожість дії ферментів та небілкових каталізаторів?
2. Напишіть рівняння хімічної реакції, яку каталізує амілаза слини (субстрат – крахмал). Якими якісними реакціями можна відкрити продукти реакції?

### *Варіант 2*

1. Викладіть відмітні особливості дії ферментів від дії небілкових каталізаторів.
2. Відобразьте графічну залежність активності фермента амілаза слини від температури та поясніть її.

### *Варіант 3*

1. Чим відрізняється поняття «простетична група» від поняття «кофермент»? які органічні молекули можуть бути застосовані для утворення небілкової частини складного фермента?
2. Відобразьте графічну залежність активності фермента від рН середовища. Поясніть її.

### *Варіант 4*

1. Опишіть структуру активного центру простого фермента.
2. Укажіть тип специфічності дії для амілази слини. Відповідь поясніть.

### *Варіант 5*

1. Викладіть теорії ферментативного каталізу.
2. Поняття «алостеричний центр» фермента.

### *Варіант 6*

1. Дайте визначення абсолютної специфічності, використовуючи приклади.
2. Укажіть амінокислотні залишки, що входять до складу активного центру більшості ферментів.

### *Варіант 7*

1. Дайте визначення стереохімічної специфічності ферментів, використовуючи конкретні приклади.

2. Укажіть якісну реакцію, за допомогою якої можна довести повне інгібування дії амілази слини. Поясніть ваш вибір.

*Варіант 8*

1. Укажіть небілкові сполуки, які найчастіше входять до складу складних ферментів та роль цих сполук в ферментативному каталізі.

2. Більшість ферментів синтезуються в організмі в неактивній формі. Укажіть способи їх активації.

*Варіант 9*

1. Дайте визначення відносної групової специфічності дії ферментів, використовуючи конкретні приклади.

2. Яку з якісних реакцій Ви оберете для доказу повного розщеплення крахмалу під дією амілази слини? Поясніть принцип дії реагентів у вибраній реакції.

*Варіант 10*

1. Опишіть структуру активного центру фермента та його участь у ферментативному каталізі.

2. Дайте визначення активаторів та інгібіторів, використовуючи знання роботи по вивченню впливу активаторів та інгібіторів на активність амілази слини.



## 9. ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

**1. Оберіть речовину, яка не здатна виконати функцію субстрату для ферментів організму людини:**

- A. Глюкоза
- B. Вища жирна кислота
- C. Нітратна кислота
- D. Оцтова кислота в активній формі
- E. Глікоген

**2. Укажіть субстрат, руйнування якого здійснює клас ферментів – гідролази:**

- A. Вищі жирні кислоти
- B. Білки
- C. Глюкоза
- D. Піровиноградна кислота
- E. Вуглекислий газ

**3. Укажіть субстрат для амілази слини:**

- A. Білок
- B. Крохмаль
- C. Сахароза
- D. Глюкоза
- E. Амінокислота

**4. Виберіть небілкову частину ферментів, яка використовується для утворення активних форм ацилів різних кислот:**

- A. КоQ
- B. HSKoA
- C. ТПФ

- D. НАДФ
- E. ФМН

**5. Ферменти класу ліаз здатні каталізувати тип реакції:**

- A. Гідроліз
- B. Окислення
- C. Відновлення
- D. Трансамінування
- E. Декарбоксілювання

**6. Укажіть клас ферментів, який здійснює процес фосфорилювання субстратів:**

- A. Трансферази
- B. Оксидоредуктази
- C. Ізомерази
- D. Ліази
- E. Лігази

**7. Фермент уреаза здатний руйнувати тільки структуру сечовини.**

**Укажіть його тип специфічності:**

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

**8. D-оксидаза аланіну здатна дезамінувати тільки D-аланін, але не руйнує структуру L-аланіну. Укажіть тип специфічності цього ферменту:**

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

**9. Укажіть ознаку, яка покладена в основу класифікації ферментів:**

- A. Зворотність реакції
- B. Хімічна структура ферменту
- C. Тип специфічності ферменту
- D. Тип реакції, яка каталізується
- E. Хімічна структура субстрату

**10. Дайте повну назву складному ферменту, у якому поліпептидні ланцюги приєднуються до небілкової частини:**

- A. Протетична група
- B. Кофактор
- C. Кофермент
- D. Апофермент
- E. Холофермент

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

- A. Г. Кребс
- B. Д. Кошленд
- C. М. Ментен
- D. Ф. Крік
- E. К. Функ

**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

**6. Відомо, що визначення ізоферментів ЛДГ використовують в диференціальній діагностиці патологічних станів. За якою властивістю розділяють ізоформи лактатдегідрогенази?**

- A. \* За електрофоретичною рухомістю
- B. За гідрофільністю
- C. За гідрофобністю
- D. За розчинністю
- E. За небілковими компонентами

**7. В сироватці крові хворого визначено підвищену активність ізоферменту ЛДГ<sub>1</sub>. В якому органі локалізовано патологічний процес?**

- A. \*Серці
- B. Печінці
- C. Нирках
- D. Шлунку
- E. М'язах

**8. 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

**9. Хворий скаржиться на болі за грудиною з лівої сторони, потовиділення та посилене серцебиття. Які з перелічених ферментів слід визначити в крові для підтвердження діагнозу інфаркту міокарда?**

- A. \*АсАТ, КФК, ЛДГ-1
- B. АлАТ, альдолаза, ЛДГ-4
- C. Амілаза, лужна фосфатаза, АлАТ
- D. Кисла фосфатаза, ЛДГ-5, ЛДГ-4
- E. Альфа-фетопротейн, альдолаза, КФК

**10. У крові хворого виявлено підвищення активності ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub>, АсАТ, креатинфосфокінази - МВ. Визначте, в якому органі відзначається порушення біохімічних процесів?**

- A. \*Серце
- B. Скелетні м'язи
- C. Нирки
- D. Печінка
- E. Підшлункова залоза

**11. При обстеженні хворого виявлено підвищення в крові активності ЛДГ. Це характерно для захворювань серця, печінки, нирок. Яке додаткове біохімічне обстеження треба зробити для диференціальної діагностики?**

- A. \*Визначення ізоферментів ЛДГ
- B. Визначення цукру в крові
- C. Рівень кетонових тіл
- D. Визначення рівня холестерину
- E. Визначення амілази крові

**12. 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

**13. В крові хворого при обстеженні виявлена підвищена кількість ферментів:КФК (МВ-ізоформа), АсАТ, ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub>. Яку патологію насамперед слід припустити?**

- A. Панкреатит
- B. М'язова дистрофія
- C. Ураження центральної нервової системи
- D. Цироз печінки
- E. \*Інфаркт міокарду

**14. 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

**15. 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

**16. 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

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

- A. Ліаза
- B. Карбогидраза
- C. Гиалуронидаза\*
- D. Оксидаза



Е. Трансфераза

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

- А. Гідролази\*
- В. Ліази
- С. Трансферази
- Д. Ізомерази
- Е. Оксидоредуктази

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

- А. Протеази
- В. Каталази
- С. Редуктази
- Д. Лактази
- Е. Полімерази

**20. 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?**

- А. Крохмаль
- В. Глюкозу
- С. Сахарозу
- Д. Целюлозу

Е. Лактоз

## 11. НАВЧАЛЬНІ ЦІЛІ ЗАНЯТТЯ №2

Вивчити і вміти аналізувати шляхи регуляції швидкості ферментативних реакцій при дії різних факторів регуляції (активаторів, інгібіторів, концентрації субстрату, концентрації ферменту); вивчити принципи визначення активності ферментів у біологічних середовищах на прикладі визначення активності амілази сечі і холінестерази в сироватці крові; вміти розраховувати загальну активність ферменту в одиницях СІ; вміти викладати загальні уявлення про основні напрями ензимології (ензимодіагностики і ензимотерапії) із залученням конкретних прикладів з лікувальної практики.

Необхідно знати:

1. Кінетика ферментативних реакцій: вплив концентрації субстрата та фермента на швидкість ферментативної реакції (графічні залежності). Рівняння Міхаеліса-Ментен. Константа Міхаеліса, її визначення та значення.
2. Фактори регуляції активності ферментів: концентрація субстрата, концентрація фермента, концентрація продуктів реакції; температура та рН середовища (графічні залежності).
3. Поняття про хімічну природу й функції активаторів. Механізми активації ферментів.
4. Загальне поняття про інгібітори. Типи інгібування ферментів: оборотне (конкурентне, неконкурентне) і необоротне (приклади). Особливості зміни кінетичних параметрів ферментів при конкурентному і неконкурентному інгібуванні (використання методу Лайнуівера-Берка).
5. Поняття про алостеричний центр та його функції у ферментативному каталізі. Алостеричний тип регуляції активності ферментів. Ретроінгібування ферментів.
6. Принципи визначення активності ферментів в біологічних середовищах. Одиниці виміру загальної активності ферментів.
7. Основні напрями досліджень медичної ензимології:

- розробка методів діагностики захворювань з використанням ферментів як реагентів (глюкозооксидазний метод визначення глюкози в плазмі крові);
- розробка методів діагностики захворювань за зміною активності ферментів (приклади);
- використання ферментів та їх інгібіторів як фармацевтичних препаратів (приклади).

Необхідно вміти:

1. Визначати вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини.
2. Визначати залежність швидкості ферментативної реакції від кількості ферменту на прикладі  $\alpha$ -амілази слини.
3. Визначати активність амілази (діастази) сечі за методом Вольгельмута.
4. Визначати активність холінестерази в сироватці крові.

## 12. ВИХОВНІ ЦІЛІ

Ознайомитися зі шляхами регуляції швидкості ферментативних реакцій при дії різних факторів регуляції (активаторів, інгібіторів, концентрації субстрату, концентрації ферменту); з розрахунком загальної активності ферменту в одиницях СІ; з загальними уявленнями про напрями ензимології.

### 13. БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ

Дисципліни	Отримані навички
<b>Попередні:</b> Органічна хімія	Поняття про ферментита ферментативний каталіз. Моносахариди, полісахариди, властивості.
Неорганічна хімія	Поняття концентрація, способи вираження концентрації.
Нормальна фізіологія	Функції ферментів в організмі. Використання ферментів для нормалізації фізіологічних функцій.
Фізична та колоїдна хімія	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.
Патологічна фізіологія	Поняття норма та патологія. Поняття про патологічні стани печінки, підшлункової залози тощо. Поняття симптом і синдром.
<b>Наступні</b> Лабораторна діагностика, Фармакотерапія, Клінічна фармакологія	Клінічна ензимологія: ферменти, що мають діагностичне значення, визначення активності ферментів. Використання ферментів в якості лікарських засобів. Визначення одиниць активності ферментів.

## 14. 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 (приклади). Особливості зміни кінетичних параметрів ферментів при конкурентному і неконкурентному інгубуванню (використання методу Лайнуівера-Берка).
7. Поняття про алостеричний центр та його функції у ферментативному каталізі. Алостеричний тип регуляції активності ферментів. Ретроінгібування ферментів.
8. Принципи визначення активності ферментів в біологічних середовищах. Одиниці виміру загальної активності ферментів.
9. Основні напрями досліджень медичної ензимології:
  - ензмопатологія;
  - ензимодіагностика;
  - ензимотерапія.

## 15. ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ

Етапи	Час у хв	Навчальні матеріали		Місце проведення
		Зміст пункту плану	Обладнання	
1. Організаційний момент	5	Перевірка присутніх		Навчальна кімната
2. Співбесіда з питань заняття	30	Провести пояснення важливих термінів: кінетика, константа Міхаеліса, максимальна швидкість ферментативної реакції, конкурентне, неконкурентне, алостеричне інгібування активності ферментів, катал, міжнародна одиниця активності ферментів, ензимопатології	Методичні рекомендації до практичного заняття «Ферменти: структура, механізм дії, регуляція активності»	Навчальна кімната
Перерва	10			
<p>Організація проведення практикуму 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 <math>\alpha</math>-амілази слини (одна робота).                      №3: Визначення активності амілази сечі за методом Вольгемута (одна робота).                      № 4: Визначення активності холінестерази сироватки крові (одна робота).</p>				
3. Виконання практикуму	50	Усі бригади виконують усі операції лабораторних робіт	Обладнання та реагенти до лабораторних робіт	Навчальна кімната
4. Контроль знань по темі заняття (комп'ютерне тестування чи письмова самостійна робота на паперових носіях)	20		Картки з завданнями, зошити для контрольних робіт	Навчальна кімната
<p>Перевірка результатів тестування на паперових носіях викладачем 20 хв                      У цей час студенти починають самостійну роботу з підручником про дослідження типів інгібування із застосуванням графічних залежностей методів Міхаеліса-Ментен і Лайнуївера-Берка (5 варіантів)</p>				
Перерва 10 хв				
5. Обговорення самостійної роботи	30		Протоколи для лабораторних	Навчальна кімната

студентів з підручником та результатів тестування. Співбесіда за такими питаннями: одиниці активності ферментів принципи, визначення активності ферментів у біологічних середовищах, їх клініко-діагностичне значення			робіт	
6. Рішення задач щодо загальної активності ферментів	10		Картки (чотири варіанта завдань)	Навчальна кімната
Перерва	10			
7. Обговорення результатів лабораторних робіт. Обговорення результатів заняття, надання мотиваційних установок до наступного практичного заняття	15		Список літератури у допомогу для ліквідації недоліків у вивчанні теми	Навчальна кімната



## 16. АЛГОРИТМ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

### Робота № 1. Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини

*Принцип* *методу.*

Активатором амілази слини є натрій хлорид, а одним з інгібіторів – купрум(II) сульфат. Провплив цих речовин на активність амілази судять за ступенем гідролізу крохмалю під дією ферменту в їх присутності (ступінь гідролізу оцінюється йодною пробою).

*Обладнання та реактиви:* штатив, пробірки, 1 % розчин NaCl, 1 % розчин CuSO<sub>4</sub>, 1 % розчин крохмалю, розчин йоду.

*Хід роботи.* Слинурозбавляють 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 CuSO<sub>4</sub>, 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.

*Очікуваний результат:* під впливом активатору слини – натрій хлориду, амілаза повністю розщепить крохмаль, йодна проба буде негативною. Під впливом інгібітору ступінь гідролізу крохмалю буде мінімальною, йодна проба – позитивна.

### Робота № 2

#### 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 крохм

альюеритродекстринів, які дають червоне забарвлення при проведенні однієї проби.

*Обладнання та реактиви:* термостат, штатив, пробірки, 1 % розчин крохмалю, 0,1 % розчин йоду, 0,2% розчин KI.

*Хід роботи.* Приготувати розчини слини (в 5, 10, 20 і 40 разів розведення). Пронумерувати чотири пробірки та в нести 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 38°C. Кожні 1-2 хвилини предметне скло відбирають по 1-2 краплі розчину з кожної пробірки, додають по 1 краплі 0,1% розчину йоду, 0,2% розчину KI. Спочатку спостерігають синє забарвлення, потім фіолетове, червоно-фіолетове, а наприкінці – червоне забарвлення (йодною пробою доводиться явна наявність еритродекстринів). Відзначають час від початку до злізнення до появи червоного забарвлення (в кожній пробірці). Результативі відображують графічно, відкладаючи на осі абсцис відносну концентрацію  $\alpha$ -амілази (розведення), а на осі ординат – час (термін) утворення еритродекстринів у хвилинах.

*Очікуваний результат:* за графіком визначають залежність швидкості ферментативної реакції від кількості ферменту. При цьому швидкість гідролізу полісахариду оцінюється за часом утворення із крохмалю еритродекстринів, які дають червоне забарвлення при проведенні однієї проби.

### **Робота № 3. Визначення активності амілази (діастази) сечі за методом Вольгемута**

*Принцип* *методу.*

Метод Вольгемута заснований на виявленні мінімальної кількості ферменту, здатного повністю розщепити 2 мл 0,1% крохмалю за 30 хв. Цю кількість ферменту приймають за одиницю амілазної активності.

*Обладнання та реактиви:* термостат, штатив, пробірки, піпетки, сеча, 0,85 % розчин натрійхлориду, 0,1 % розчин крохмалю, 0,1 % розчин йоду, 0,2% розчинікаліййодиду.

*Хід роботи.* Увісім пробірок вносять по 1 мл 0,85% розчину натрійхлориду. Впершу пробірку додають 1 мл досліджуваної сечі і ретельно перемішують. Далі 1 мл суміші переносять в другу пробірку, знеї таким же чином – в третю і т.д. З восьми пробірок 1 мл рідини виливають. Таким чином готують сярозведення сечі. У всі пробірки додають по 2 мл 0,1% розчину крохмалю, перемішують і ставлять в термостат при 38°С на 30 хв. Після закінчення часу інкубації пробірки виймають, охолоджують і додають в кожну по 2 краплі 0,1% розчину йоду, 0,2% розчинікаліййодиду. Вміст пробірок перемішують і вибирають для розрахунку розведення останню пробірку з розчином жовтого кольору після проведення однієї проби (де відбулося повне розщеплення крохмалю).

Розрахунок проводиться за формулою:

**$X \text{ (од)} = 1 \cdot 2 \cdot \text{розведення}$** , де:

X – активність амілази слини в умовних одиницях (од);

1 – кількість сечі в мл;

2 – кількість 0,1 % розчину крохмалю, в мл.

*Очікуваний результат:* В залежності від встановленої активності діастази сечі можна зробити ряд висновків, щодо стану пацієнта.

Нормальні значення активності амілази сечі (по Вольгемуту) знаходяться в межах 16-64 одиниць. При гострому панкреатиті активність амілази сечі і сироватки крові зростає в 10-30 разів. Визначення активності амілази сечі проводять з метою постановки діагнозу, а також коли хворого виписують з лікарні. Визначення активності амілази сечі проводять також після важко перенесеного паротиту для діагностики

функціонального стану підшлункової залози, оскільки вірус, що викликає запалення привушних залоз може пошкодити підшлункову залозу.

#### **Робота № 4. Визначення активності холінестерази в сироватці крові**

*Принцип* *методу.*

Піддією холінестерази сироватки крові відбувається гідроліз ацетилхоліну з утворенням оцтової кислоти і холіну. Оцтова кислота знижує рН розчину, що встановлюється за допомогою індикатора (зміна малинового забарвлення на жовтий колір). Інтенсивність зміни фарбування пропорційна активності ферменту в досліджуваній пробі.

*Обладнання та реактиви:* термостат, штатив, пробірки, піпетки, буферно-індикаторний фізіологічний розчин, сироватка крові, ацетилхолін, стоп-реагент, кювети з товщиною шару 5 мм, фотоелектроколориметр, калібрувальний графік.

*Хід роботи.* Перед роботою буферно-індикаторний фізіологічний розчин витримують у термостаті при 37°C протягом 10 хвилин.

Паралельно готують дві пробі згідно схеми:

Додати, мл	Досліджувана проба	Контрольна проба
Буферно-індикаторний розчин	2,5	-
Сироватка крові	0,05	0,05
Фізіологічний розчин	-	2,7
Ацетилхолін	0,1	-

Суміш інкубують протягом 30 хвилин при температурі 37°C

---

Стоп-реагент	0,1	-
--------------	-----	---

Вимірюють оптичну щільність кожної проби відносно дистильованої води при 540 нм (зелений світлофільтр); кювети (5 мм).

Розрахунки проводять за формулою:

$$E = E_{xp} + E_{kp} - E_{dp},$$

де  $E_{xp}$ ,  $E_{kp}$  і  $E_{dp}$  – поглинання холостої, контрольної і досліджуваної проби.

Значення  $E_{xp}$  видає старший лаборант, решту значень ( $E_{kp}$ ,  $E_{dp}$ ) студент визначає самостійно. Одержане значення  $E$  використовують для пошуку за калібрувальним графіком активності холінестерази в сироватці крові.

*Очікуваний результат:* В залежності від встановленої концентрації холінестерази (ХЕ) в сироватці крові можна зробити ряд висновків, щодо стану пацієнта.

**Нормальна активність** холінестерази в сироватці крові знаходиться в діапазоні 45-95 мкмоль/сек•л.

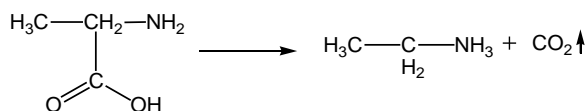
Суттєве зниження активності ХЕ в сироватці крові спостерігається при захворюваннях печінки, гіпотиреозі, бронхіальній астмі, суглобовому ревматизмі, інфаркті міокарду, опіках, травматичному шоці, в післяопераційному стані. При важкій формі хвороби Боткіна активність ХЕ різко і стійко знижується впродовж всього жовтнячного періоду. При загостренні захворювання пацієнта активність ХЕ випереджає білірубіновий пік, граючись роль передвісника загострення. Динаміка зміни активності сироваткової ХЕ в процесі хвороби може мати прогностичне значення.

## 17. КОНТРОЛЬ ЗАКЛЮЧНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ З ТЕМИ

### Варіант 1

1. Відбулась зміна концентрації субстрату з 5 ммоль/л до 1 ммоль/л за 5 хв ферментативної реакції. Визначте загальну активність фермента в міжнародних одиницях активності.

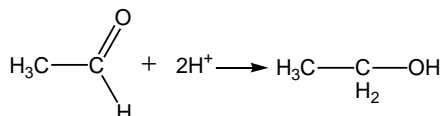
2. Укажіть клас фермента, що каталізує дану реакцію:



### Варіант 2

1. Відбулось збільшення концентрації продукта з 0 ммоль/л до 6 ммоль/л протягом 1 хв ферментативної реакції. Визначте загальну активність фермента в кат/л.

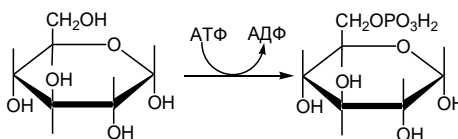
2. Укажіть клас фермента, що каталізує дану реакцію:



### Варіант 3

1. Відбулось зниження концентрації субстрату з 12 ммоль/л до 6 ммоль/л протягом 1 хв ферментативної реакції. Визначте загальну активність фермента в кат/л.

2. Укажіть клас фермента, що каталізує дану реакцію:



### Варіант 4

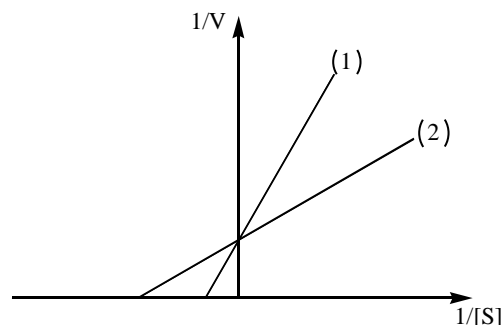
1. Відбулось зниження концентрації субстрата з 6 ммоль/л до 0 ммоль/л протягом 5 хв ферментативної реакції. Визначте загальну активність фермента в кат/л.

2. Укажіть клас фермента, що каталізує дану реакцію:



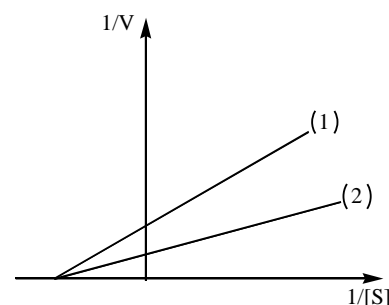
### Варіант 1

Одна з кривих відповідає залежності без впливу інгібітора, інша залежність – в присутності інгібітора. Укажіть тип інгібування та номер кривої в присутності інгібітора.



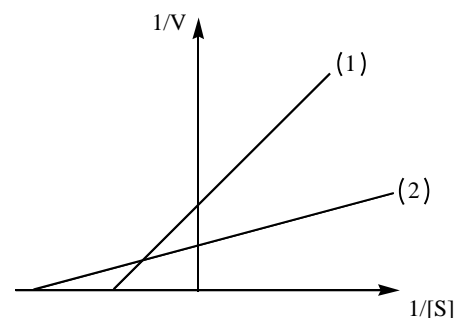
### Варіант 2

Одна з кривих відповідає залежності без впливу інгібітора, інша залежність – в присутності інгібітора. Укажіть тип інгібування та номер кривої в присутності інгібітора.



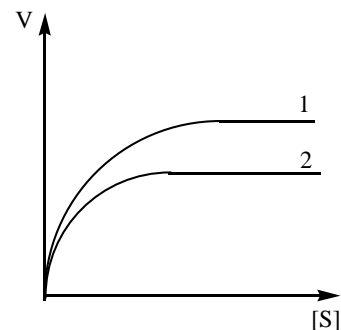
### Варіант 3

Одна з кривих відповідає залежності без впливу інгібітора, інша залежність – в присутності інгібітора. Укажіть тип інгібування та номер кривої в присутності інгібітора.



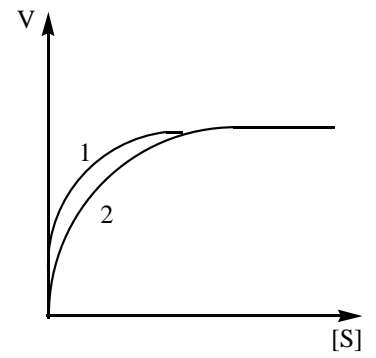
### Варіант 4

Одна з кривих відповідає залежності без впливу інгібітора, інша залежність – в присутності інгібітора. Укажіть тип інгібування та номер кривої в присутності інгібітора.



*Варіант 5*

Одна з кривих відповідає залежності без впливу інгібітора, інша залежність – в присутності інгібітора. Укажіть тип інгібування та номер кривої в присутності інгібітора.





## 18. 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 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 алостеричного активатора
- E. Видалення з реакційного середовища продукту реакції

**6. Продовжіть 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

**7. Укажіть показник, який використовують при визначенні питомої 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

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

- A. Конкурентне
- B. Неконкурентне
- C. Бесконкурентне

- D. Стереохімічне
- E. Ретроінгібірування

**9. Укажіть одиницю активності ферменту, яка визначається кількістю ферменту, що перетворює 1 моль субстрату за 1 секунду в оптимальних умовах:**

- A. Катал
- B. Стандартна міжнародна одиниця
- C. Умовна одиниця
- D. Число оборотів
- E. Молярна активність

**10. Укажіть фермент, активність якого слід визначати в сечі пацієнта при гострому панкреатиті:**

- A. Амілаза
- B. Протеїнкаіаза
- C. Холінестераза
- D. Лейцинамінопептидаза
- E. Лужна фосфатаза

**11. Для оцінки ступеню поразки паренхіми печінки у пацієнтів використовують тест визначення:**

- A. Концентрації ізоформ ЛДГ<sub>1</sub> і ЛДГ<sub>2</sub> плазми крові
- B. Активності холінестерази плазми крові
- C. Активності амілази сечі
- D. Концентрації ізоформи ЛДГ<sub>3</sub> плазми крові
- E. Активності кислої фосфатази

**12. Укажіть ізоформи лактат-дегідрогенази (ЛДГ), концентрація яких збільшується у плазмі крові пацієнтів з інфарктом міокарду:**

- A. ЛДГ<sub>1</sub> і ЛДГ<sub>2</sub>
- B. ЛДГ<sub>3</sub>, ЛДГ<sub>4</sub>
- C. Тільки ЛДГ<sub>3</sub>
- D. ЛДГ<sub>4</sub> і ЛДГ<sub>5</sub>
- E. Тільки ЛДГ<sub>5</sub>

**13. Укажіть фермент, активність якого визначають у плазмі крові пацієнтів з патологіями кісткової тканини:**

- A. Пепсин
- B. Трипсин
- C. Амілаза
- D. Кисла фосфатаза
- E. Лужна фосфатаза

**14. Вкажіть фермент, активність якого визначають у хворих карциномою передміхурової залози:**

- A. Пепсин
- B. Трипсин
- C. Амілаза
- D. Кисла фосфатаза
- E. Лужна фосфатаза

**15. Укажіть фермент плазми крові, який використовують у терапевтичній практиці для зниження кров'яного тиску:**

- A. Ізоформа ЛДГ<sub>1</sub>
- B. Трипсин
- C. Хімотрипсин
- D. Холінестераза
- E. Калікреїн

## 19. ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК 1»

**1. У хворих при лікуванні гнійних ран використовують пов'язки з іммобілізованим на них ферментом. Вкажіть цей фермент:**

- A. \*Трипсин
- B. Аргіназа
- C. Каталаза
- D. Лужна фосфатаза
- E. Кисла фосфатаза

**2. Фібринолітичні лікарські засоби здатні розчиняти уже утворені тромби в організмі людини. Який фармацевтичний препарат має фібринолітичну активність?**

- A. \*Стрептокіназа
- B. Фенобарбітал
- C. Вікасол
- D. Рибофлавін
- E. Ізоніазид

**3. Стрептокіназа та її препарат стрептодеказа є ферментами з фібринолітичною дією. Стрептодеказа має більшу тривалість дії, ніж вільна стрептокіназа, оскільки при її виробництві застосували:**

- A. \*Іммобілізацію
- B. Ліофілізацію
- C. Діаліз
- D. Денатурацію
- E. Висолювання

**4. У хворого після опіків залишилися колоїдні рубці. Який ферментний фармацевтичний препарат використовується для їх розсмоктування?**

- A. Аспарагіназа
- B. Нігедаза
- C. Галактозідаза
- D. Стрептолідаза
- E. \*Лідаза

**5. Для розсмоктування рубців після опіків, а також гематом, в клініці використовують препарат лідаза. Що розщеплює даний фермент?**

- A. \*Гіалуронову кислоту
- B. Дерматансульфат
- C. Гепарин
- D. Кератансульфат
- E. Хондоїтин-4-сульфат

**6. Фібринолітичні лікарські засоби здатні розчиняти в організмі людини вже утворені тромби. Який фармацевтичний препарат володіє фібринолітичною активністю?**

- A. Рибофлавін
- B. Стрептокіназа\*
- C. Ізоніазид
- D. Фенобарбітал
- E. Вікасол

**7. Для росту ряду ракових клітин потрібен певний ростовий фактор. При лікуванні лейкозів використовують фермент, що руйнує цей незамінний фактор, а саме:**

- A. Аспарагіназа\*

- B. Сукцинатдегідрогеназа
- C. Аспартатамінотрансфераза
- D. Цитратсинтаза
- E. Глутаміназа

**8. Відомо, що визначення ізоферментів ЛДГ використовують в диференціальній діагностиці патологічних станів. За якою властивістю розділяють ізоформи лактатдегідрогенази?**

- A. \* За електрофоретичною рухомістю
- B. За гідрофільністю
- C. За гідрофобністю
- D. За розчинністю
- E. За небілковими компонентами

**9. Препарат прозерин є інгібітором ацетилхолінестерази зворотної дії. Який механізм інгібуючої дії прозерину?**

- A. \*Конкуренція з ацетилхоліном за активний центр фермента
- B. Денатурація фермента
- C. Ковалентне зв'язування з субстратом ферменту
- D. Ковалентне зв'язування поза активним центром фермента
- E. Окиснення іона заліза в активном у центрі фермента

**10. Стрептокіназа та її препарат стрептодеказа є ферментами з фібринолітичною дією. Стрептодеказа має більшу тривалість дії, ніж вільна стрептокіназа, оскільки при її виробництві застосували:**

- A. \*Імобілізацію
- B. Ліофілізацію
- C. Діаліз
- D. Денатурацію

Е. Висолювання

**11. Протипухлинний препарат метотрексат інгібує дигідрофолатредуктазу, зв'язуючись з її активним центром. Активність ферменту може бути відновлена збільшенням концентрації субстрату. Який тип інгібування спостерігається?**

- А. \*Конкурентне
- В. Незворотне
- С. Безконкурентне
- Д. Алостеричне
- Е. Неконкурентне

**12. В сироватці крові хворого визначено підвищену активність ізоферменту ЛДГ<sub>1</sub>. В якому органі локалізовано патологічний процес?**

- А. \*Серці
- В. Печінці
- С. Нирках
- Д. Шлунку
- Е. М'язах

**13. Ізоніазид використовують в якості протитуберкульозного препарату завдяки здатності гальмувати процеси біологічного окиснення. Активність яких ферментів тканинного дихання він може пригнічувати?**

- А. \*Дегідрогеназ
- В. Синтетаз
- С. Ізомераз
- Д. Трансфераз
- Е. Карбоксилаз



**14. У хворого виявлено гострий панкреатит. Для уникнення аутолізу підшлункової залози необхідно застосувати :**

- A. \*Інгібітори протеолітичних ферментів
- B. Інсулін
- C. Трипсиноген
- D. Антибіотики
- E. Сульфаніламідні препарати

**15. У хворого діагностовано гострий панкреатит. Визначення активності якого ферменту в крові необхідно провести з діагностичною метою?**

- A. \*Амілази
- B. Альдолази
- C. ЛДГ
- D. Креатинкінази
- E. Пепсину

**16. Пацієнту призначено конкурентний інгібітор ацетилхолінестерази. Назвіть його:**

- A. \*Прозерин
- B. Аспірин
- C. Диклофенак натрію
- D. Індометацин
- E. Алопуринол

**17. Прозерин застосовувався для лікування міастеній та інших захворювань м'язової системи.Цей препарат є конкурентним інгібітором ферменту:**

- A. \* Ацетилхолінестерази
- B. Сукцинатдегідрогенази

- C. Лактатдегідрогенази
- D. Цитратсинтази
- E. Аргінази

**18. При обробці ран, що кровоточать розчином перекису водню відбувається її розпад одним з ферментів крові. Оберіть цей фермент:**

- A. \* Каталаза
- B. Моноамінооксидаза
- C. Цитохромоксидаза
- D. Аспаратаміотрасфераза
- E. Лактатдегідрогеназа

**19. У пацієнта відсутні пігменти у шкірі, волосі, радужці ока, знижена гострота зору і спостерігається світлобоязнь. Спадкова недостатність якого ферменту є причиною даної патології?**

- A. \*Тирозинази
- B. Глюкокінази
- C. Уридилтрансферази
- D. Ксантинооксидази
- E. Каталази

## 20. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ ЗАНЯТТЯ «Ферменти: будова, фізико-хімічні властивості, класифікація та механізм дії»

**Визначення поняття «ферменти».** Основу життєдіяльності живих організмів становлять хімічні процеси. Вони відбуваються з величезною швидкістю під дією ферментів – біологічних каталізаторів білкової природи, які синтезуються в процесі життєдіяльності всіх живих організмів і забезпечують синтез, розпад і взаємоперетворення різноманітних органічних сполук. Термін "ферменти" ("fermentum" (лат.) – закваска, дріжджі, та "fermentatio" – бродіння) або "ензими" (enzyme (грец.) – у дріжджах, у заквасці) був запропонований на початку XVIII ст. голандським вченим Ван Гельмонтом під час вивчення процесу спиртового бродіння. У кінці XVII ст. дослідженнями Р. Реомюра та Л. Спаланцані щодо впливу шлункового соку хижих птахів на м'ясо було показано, що розчинення м'яса – це хімічний, а не механічний процес, а в 1836 році Т. Шванн виявив у вмісті шлункового соку фермент пепсин, який перетравлював білки м'яса. Російський вчений К.С. Кірхгоф вперше показав участь хімічних речовин (ферментів) солоду у перетворенні крохмалю на цукор. Російський фізіолог І.П. Павлов вважав ферменти «збудниками всіх хімічних перетворень». На початку XX ст. він вперше довів, що ферменти можуть існувати в організмі в неактивній формі – і дослідив перетворення проферменту трипсиногену на фермент трипсин за участі ентерокинази. Новий етап у розвитку вчення про ферменти наступив у 1926 р., коли американський біохімік Дж. Самнер отримав з насіння конвалії кристалічний препарат фермента уреазы. У 1930 р. Д. Нортроп виділив кристалічний пепсин, а згодом трипсин і хімотрипсин. З цього періоду стало загальноприйнятим твердження, що ензими мають білкову природу. У кінці XIX ст. Е. Фішер, вивчаючи властивості ферментів, висунув положення, що субстрат підходить до фермента як «ключ до замка», дослідження специфічності ферментів і сьогодні є важливим науковим завданням.

На початку ХХ століття з'явилися роботи, присвячені кінетиці ферментативних реакцій, згодом були сформульовані теорії механізму їх дії, регуляції ферментативної активності; все це дало поштовх для становлення «ензимології» як науки, її активний розвиток у тісному зв'язку з органічною, неорганічною та фізичною хіміями, фізіологією, токсикологією, мікробіологією, генетикою, фармакологією, ботанікою тощо відбувається й зараз. Завданнями ензимології є вивчення ролі ферментів у прискоренні хімічних реакцій, що відбуваються в організмі; дослідження їх структури, механізму дії, кінетичних характеристик і регуляції активності; виділення та очищення ферментів. На даний час за допомогою спеціальних хімічних методів для багатьох білків-ферментів з'ясована їх амінокислотна послідовність, охарактеризовано декілька тисяч ферментів, понад тисячу з них отримані в хімічно чистому вигляді.

Вивчення ферментів має величезне значення для будь-якої фундаментальної та прикладної галузі біології, хімічної, харчової та фармацевтичної індустрії, зайнятих приготуванням каталізаторів, антибіотиків, вітамінів, амінокислот, пептонів та інших біологічно активних речовин, які використовують у народному господарстві та медицині.

**Хімічна природа ферментів.** На сьогоднішній день встановлено, що ферменти – це речовини білкової природи. Підтвердженням цього є факт втрати ферментами бродіння своєї активності під час кип'ятіння, що було досліджено ще Л.Пастером. Кип'ятіння спричинює незворотну денатурацію білка-фермента, внаслідок чого останній втрачає здатність каталізувати хімічну реакцію. Як відомо, білки теж при кип'ятінні денатують і втрачають свої біологічні властивості. Дія на ферменти різних фізичних і хімічних чинників, таких як вплив УФ- і рентгенівського опромінення, ультразвуку, мінеральних кислот, лугів, алкалоїдних реактивів, солей тяжких металів тощо теж спричинює денатурацію ферментів(так само як і білків)й втрату їх каталітичної активності. В основі денатурації лежить руйнування

зв'язків, що стабілізують вищі структури фермента-білка (четвертинну, третинну, вторинну) і, як наслідок, випадання його в осад. Це свідчить про те, що просторова структура білка впливає на виявлення його ферментативної активності. Аналогічно до білків, ферменти під час гідролізу розпадаються на амінокислоти. Доказом білкової природи ферментів слугує виділення їх у чистому вигляді в формі кристалів білка. На сьогоднішній день отримано понад 1 000 кристалічних ферментів. Структура багатьох із них досліджена детально методами рентгеноструктурного аналізу, ядерного магнітного резонансу, електронного парамагнітного резонансу тощо.

У процесі каталізу беруть участь наступні функціональні групи ферментів: COOH-групи дикарбонових амінокислот, NH<sub>2</sub>-групи лізину, SH-групи цистеїну та дисульфідні цистину, OH-групи серину та треоніну, гуанідинові групи аргініну, імідазольні групи гістидину, тіоефірні групи метіоніну, фенольні групи тирозину, гідрофобні ланцюги аліфатичних амінокислот і ароматичне кільце фенілаланіну. Фізико-хімічні властивості вказаних амінокислотних залишків поліпептидного ланцюга фермента визначають контакт із відповідним субстратом та його перетворення. Гідрофобні радикали амінокислот мають спорідненість до неполярних ділянок субстрату. Полярні групи проявляють кислотні, або основні, або спряжені кислотно-основні(наприклад, гістидин) властивості. Зсув рН середовища викликає зміни їх кислотно-основних властивостей і сприяє контакту з різними групами субстрату.

Водні розчини ферментів є стійкими та гомогенними і можуть тривалий час зберігатися, не випадаючи в осад (не коагулювати), тобто мають властивості справжніх розчинів. Одночасно з тим, за рахунок високої молекулярної маси ферментів, їх розчинам притаманні властивості й колоїдних систем.

**Властивості ферментів.** Ферменти, як і білки, володіють низкою властивостей, характерних для високомолекулярних сполук: амфотерністю

(можуть існувати в розчині в вигляді аніонів, катіонів, амніонів); електрофоретичною рухливістю (завдяки наявності позитивних і негативних зарядів) та втратою рухливості в електричному полі в ізоелектричній точці; вони не здатні до діалізу через напівпроникні мембрани, проте шляхом діалізу їх розчини можна звільнити від низькомолекулярних домішок. Як і білки, ферменти легко осаджуються з водних розчинів методами висолювання чи обережним додаванням ацетону, етанолу та інших речовин, не втрачаючи при цьому своїх каталітичних властивостей.

Заряд молекули ферменту залежить від вмісту в ньому кислих і основних амінокислот. У нативній молекулі ферменту заряди розміщені асиметрично на поверхні білка. Якщо в молекулі ферменту кислі амінокислоти переважають над основними, то його молекула буде мати негативний заряд (поліаніон). І, навпаки, якщо переважають основні амінокислоти, то вона заряджена позитивно, тобто веде себе як полікатіон. В ізоелектричному стані ферменти найменш стабільні і можуть випадати в осад.

Ферменти мають велику молекулярну масу, яка може сягати кількох мільйонів. Так, молекулярна маса пепсину становить 32 100 Да, лужної фосфатази – 80 000 Да, лактатдегідрогенази – 140 000 Да, каталази – 248 000 Да, уреази – 480 000 Да, піруватдегідрогеназного комплексу – 4 500 000 Да.

Враховуючи білкову природу ферментів, слід зважати на їх стабільність, котра визначається низкою чинників. Так, оптимальною температурою для роботи з ферментами є температура тіла, а для препаративних цілей – використання температури, наближеної до 0°C. Слід пам'ятати, що низка ферментів чутлива до зниження температури (мітохондріальний фермент АТФаза, який каталізує розпад АТФ, інактивується при 0°C, тоді як при кімнатній температурі залишається стабільним). Для більшості ферментів оптимальним рН середовища є 6,0 – 8,0 (хоча існують винятки). Із препаративною метою часто обезводнюють

ферменти (видаляють воду) у вакуумі із замороженого розчину (ліофілізація). Осадження з розчину ферментів спиртом чи ацетоном теж здійснюють при низькій температурі, оскільки при кімнатній температурі ці процедури спричинюють втрату ферментативної активності. Для стабілізації ферментів часто користуються хелатоутворювальними агентами, наприклад, ЕДТА (етилендіамінтетраацетат), який може зв'язувати небажані домішки, які гальмують активність фермента. Однією з обов'язкових умов збереження стабільності фермента є його зберігання в висушеному або замороженому стані, велика кількість ферментів може зберігати свою стабільність у вигляді суспензії в концентрованих розчинах амонію сульфату.

**Подібність і відмінність між ферментами та небіологічними каталізаторами.** Ферменти та каталізатори небілкової природи підлягають загальним законам каталізу та мають низку спільних властивостей:

- прискорюють лише енергетично можливі реакції, тобто вони не змінюють константу рівноваги та величину вільної енергії;
- збільшують швидкість хімічної реакції шляхом зниження її енергії активації та, у такий спосіб, наближають реакцію до точки термодинамічної рівноваги;
- не впливають на напрям зворотної реакції, яка визначається співвідношенням концентрацій субстратів і кінцевих продуктів;
- не впливають на положення рівноваги зворотної реакції, а лише пришвидшують її досягнення;
- не входять до складу кінцевих продуктів реакції і виходять з реакції в незміненому вигляді, проте, у низці випадків можуть модифікуватися і навіть розпадатися під впливом кінцевих продуктів реакції (наприклад, цитохром P-450);
- не витрачаються в процесі каталізу, вивільняючись, вони можуть знову реагувати з новими молекулами субстрату.

Однак, для ферментів характерні і **специфічні властивості**, які відрізняють їх від інших каталізаторів. Ці відмінності пов'язані з особливостями будови ферментів, які є складними білковими молекулами:

1. Ефективність ферментів вища, ніж небілкових каталізаторів: швидкість перебігу реакції за участю ферментів зростає в  $10^8 - 10^{20}$  разів (фермент уреаза прискорює гідроліз сечовини в  $10^{14}$  разів), вони діють у мізерних концентраціях (молекула реніну, який синтезується в шлунку теляти, звурджує за 10 хв при температурі  $37^\circ\text{C}$   $10^6$  молекул казеїногену).

2. Ферменти мають високу специфічність дії, яка обумовлена унікальною структурою активного центра, а також конформаційною та електростатичною комплементарністю між молекулами субстрату та фермента. Кожний фермент каталітично прискорює, зазвичай, одну хімічну реакцію або ж групу реакцій одного типу. Висока специфічність дозволяє ферментам брати участь у регуляції обміну речовин і направляти його в певному напрямі.

3. Активність ферментів може суттєво змінюватися під впливом сполук, які прискорюють (активатори) та сповільнюють (інгібітори) швидкість каталізованої реакції, що дає можливість координувати метаболічні процеси, спрямовані на відтворення живої матерії, підтримання постійності гомеостазу та пристосування до умов середовища.

4. Термолабільність ферментів: ферменти каталізують хімічні реакції при невисокій температурі ( $37-40^\circ\text{C}$ ); її зростання призводить до денатурації білкової молекули фермента та, відповідно, зниження швидкості реакції або повної її зупинки. При температурі  $100^\circ\text{C}$  майже всі ферменти втрачають свою активність. Зниження температури нижче оптимальної тимчасово сповільнює активність фермента внаслідок зменшення швидкості дифузії молекул.

5. Залежність активності ферментів від рН середовища: ферменти зазвичай найактивніші в межах вузької концентрації іонів  $\text{H}^+$  (фізіологічне



значення рН = 6,0 – 8,0). Виключення становлять пепсин (оптимум рН = 2,0) та аргіназа (оптимум рН = 10,0). Зміна рН середовища впливає на стан і ступінь іонізації кислотних і основних груп, які входять до складу фермента в цілому та його активного центра зокрема, що впливає на третинну структуру білка та формування активного фермент-субстратного комплексу.

6. У випадку, коли ферментативний процес являє собою низку послідовних реакцій (метаболичні шляхи) дія ферментів строго впорядкована: продукт однієї ферментативної реакції слугує субстратом для іншої. Її активність змінюється в залежності від потреб організму в кінцевому продукті.

### **Номенклатура та класифікація ферментів**

Сучасна номенклатура та класифікація ферментів були розроблені Комісією з ферментів Міжнародної біохімічної спілки і затверджені на V Міжнародному біохімічному конгресі в 1961 році.

**Номенклатура ферментів.** У даний час використовують дві назви ферментів: систематичну та тривіальну (або робочу).

Систематична назва дається лише добре вивченим ферментам і складається з назви субстрату хімічної реакції, на яку діє фермент, назви типу хімічного перетворення та закінчення – аза. Наприклад, систематична назва ферменту лактатдегідрогенази записується таким чином: L-Лактат:НАД<sup>+</sup>-оксидоредуктаза, де L-Лактат – це субстрат, тип каталізованої реакції – окиснювально-відновна в присутності кофермента НАД<sup>+</sup>.

Іншим прикладом може служити фермент, який у гепатоцитах каталізує реакцію гідролітичного розщеплення глюкозо-6-фосфату на вільну глюкозу та фосфатну кислоту. Цей фермент має назву: глюкозо-6-фосфатфосфогідролаза. У цій назві відображено назву субстрату – глюкозо-6-фосфат; назву продукту реакції – фосфатна кислота; тип реакції – гідроліз і додано закінчення - аза.

Тривіальна назва складається з назви субстрату, назви каталізованої реакції та закінчення – аза. Наприклад: лактат + дегідрогенізація + аза → лактатдегідрогеназа.

Збереглися й інші робочі назви ферментів. Вони не дають докладної характеристики їх дії, але введені давно і міцно вкоренилися, наприклад, пепсин, трипсин, хімотрипсин, уреаза тощо.

**Класифікація ферментів.** Основою для створення класифікації ферментів і їх позначення служать три принципи, а саме: хімічна природа фермента; хімічна природа субстрату та тип каталізованої реакції, який є специфічним для дії будь-якого ферменту. Отже, всі ферменти поділяють на 6 класів (табл. 1).

Таблиця 1. Характеристика класів ферментів

Номер класу	Назва класу	Тип каталізованої реакції	Приклади	Коферменти
1	Оксидо-редуктази	Окиснювально-відновні реакції різних типів	Лактатдегідрогеназа, цитохромоксидаза, алкогольдегідрогеназа	НАД <sup>+</sup> , НАДФ <sup>+</sup> , ФАД, ФМН, убіхінон, металопорфірини, глутатіон, ліпоева кислота
2	Трансферази	Перенесення різних хімічних груп (карбоксільних, метильних, аміно-, сульфогруп від одного субстрату до іншого)	Аспаратамінотрансфераза, аланінамінотрансфераза	ПАЛФ, ПАМФ, КоА, УДФ, ЦДФ, ТГФК, метоксикобаламін
3	Гідролази	Гідроліз – розрив зв'язків у субстратах з приєднанням води	Кисла та лужна фосфатази, пепсин, трипсин, ліпаза	-
4	Ліази	Розщеплення зв'язків у субстратах негідролітичним шляхом, утворення подвійних зв'язків, приєднання хімічних груп при подвійних зв'язках	Дезаміази, дегідратази, альдолаза	ПАЛФ, КоА, ТДФ, Дезоксіденозилкобаламін
5	Ізомерази	Ізомерні перетворення в межах однієї молекули	Рацемаза, глюкозо-6-фосфатізомераза, фосфогліцератмутуаза	ПАЛФ, дезоксіденозилкобаламін, глутатіон
6	Лігази	Приєднання молекул одна до одної з виходом ристанням енергії АТФ або інших високоенергетичних сполук	Аспарагінсинтетаза, глутамінсинтетаза, ацетил-КоА-карбоксилаза	УДФ, ЦДФ, ТГФК, карбоксибіотин

**Оксидоредуктази.** До класу оксидоредуктаз відносять ферменти, що каталізують окисно-відновні реакції. Систематична назва цього класу ферментів будується за формулою «донор:акцептор-оксидоредуктаза». За тривіальною номенклатурою оксидоредуктази, що відщеплюють атоми водню або електрони від субстрату окиснення і передають їх на будь-який акцептор, крім кисню або пероксиду водню, називаються дегідрогеназами. Субстратами оксидоредуктаз можуть бути спирти, кислоти, альдегіди, кетони,  $\text{NH}_2$ -,  $\text{NH}$ -,  $\text{SH}$ -групи, гем та його похідні тощо.

Розрізняють наступні основні оксидоредуктази: оксидази, які каталізують перенесення протонів (електронів) безпосередньо на молекулярний кисень; дегідрогенази – ті, що забезпечують відщеплення протонів; цитохроми, які каталізують перенесення тільки електронів. До цього класу відносять також пероксидази, які переносять атоми водню на пероксид водню; оксидоредуктази, яким властива відновна дія, називають редуктазами.

**Трансферази.** До класу трансфераз належать ферменти, що каталізують реакції міжмолекулярного перенесення різних атомів, груп атомів і радикалів: ті, що переносять  $\text{CH}_3$ - групи, називають метилтрансферазами, переносники  $\text{NH}_2$ -груп отримали назву амінотрансфераз, розрізняють трансферази, що каталізують перенесення одновуглецевих, ацильних, глікозильних, альдегідних або кетонних, нуклеотидних залишків, азотистих груп, залишків фосфатної та сульфатної кислот тощо. До трансфераз належать також кінази, зокрема протеїнкінази – ферменти, що каталізують фосфорилювання субстратів та інших білків за рахунок фосфатного залишку АТФ. Систематичну назву формують за формулою «донор:акцептор–транспортована група-трансфераза».

Трансферази беруть участь у реакціях взаємоперетворень різних речовин, знешкодженні природних та чужорідних сполук. Деякі трансферази використовують у діагностиці захворювань, наприклад,

аспартатамінотрансферазу – для діагностики інфаркту міокарда, ааланінамінотрансферазу – гострих гепатитів тощо.

**Гідролази.** До цього класу належить велика група ферментів, які каталізують розщеплення внутрішніх молекулярних зв'язків органічних речовин за участі молекули води. Це естерази – ферменти, що каталізують реакції гідролізу та синтезу складних ефірів; глікозидази, які пришвидшують розрив глікозидних зв'язків; фосфатази й пептидогідролази, які каталізують гідроліз фосфоангідридних і пептидних зв'язків; амідази, які пришвидшують розрив амідних зв'язків тощо. Систематичну назву складають за формулою «субстрат–гідролаза».

До гідролаз належать також ферменти травного тракту (ліпази, протеази, глікозидази тощо). Гідролази містяться у лізосомах та інших органоїдах клітин, сприяють розпаду біомакромолекул на прості речовини.

**Ліази.** До класу ліаз відносять ферменти, які каталізують розрив зв'язків C-O, C-C, C-N тощо, а також зворотні реакції відщеплення різних груп від субстратів негідролітичним шляхом. Ці реакції супроводжуються утворенням подвійного зв'язку або приєднанням додаткової групи до місця розриву подвійного зв'язку.

До цього класу відносять декарбоксилази (декарбоксилювання амінокислот та альфа-кетокислот); гідроліази, а за тривіальною номенклатурою – дегідратази (наприклад, карбангідраза розщеплює карбонатну кислоту на  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$ ), альдолази – ферменти, що каталізують розрив гексозофосфатів на дві тріози (наприклад, фруктозо-1,6-дифосфат на гліцеральдегід-3-фосфат і діоксіацетонфосфат). Систематичну назву складають за формулою «субстрат–від'єднана чи приєднана група».

**Ізомерази.** До класу ізомераз відносять ферменти, які каталізують взаємне перетворення оптичних і геометричних ізомерів. Систематичну назву складають з урахуванням типу реакції: «субстрат-цис-транс-ізомераза».

Якщо ізомеризація включає внутрішньомолекулярне перенесення групи, то фермент отримує назву «мутаза».

До цього ж класу відносять рацемази й епімерази, які діють на аміно- та оксикислоти, вуглеводи та їх похідні; внутрішньомолекулярні оксидоредуктази, які каталізують взаємоперетворення альдоз і кетоз; внутрішньомолекулярні трансферази, які переносять ацильні, фосфорильні та інші групи тощо.

Ізомерази відіграють важливу роль у відновленні біологічної активності молекул, у переключенні використання метаболітів на різних шляхах обміну.

**Лігази (синтетази).** До класу лігаз відносять ферменти, які каталізують синтез органічних речовин із двох вихідних молекул із використанням енергії розпаду АТФ (або ГТФ, УТФ). Дія цих ферментів спричинює утворення нових зв'язків. Систематичну назву складають за формулою «Х:У лігаза», де Х і У позначають вихідні речовини. Як приклад можна назвати L-глутамат: аміаклігазу (рекомендована скорочена назва «глутамінсинтетаза»), за участю якої із глутамінової кислоти й аміаку в присутності АТФ синтезується глутамін. Іншу назву – синтетази – ці ферменти отримали завдяки тому, що вони є каталізаторами біосинтетичних процесів. Прикладом можуть бути: аміноацил-тРНК-синтетаза (каталізує приєднання амінокислоти до молекул тРНК у процесі біосинтезу білків) та ацетил-КоА-синтетаза (каталізує конденсацію ацетатної кислоти і КоА), карбоксилази (каталізують зв'язування  $\text{CO}_2$  з кетокислотами).

**Шифр ферментів.** У 1972 році комісією з номенклатури біохімічних сполук Міжнародної спілки теоретичної та прикладної хімії були запропоновані «Правила номенклатури ферментів», згідно з якими кожен фермент отримує спеціальну кодову назву (шифр). Шифр фермента складається з чотирьох розділених крапками чисел: перше число означає клас ферменту, друге і третє числа – підклас та підпідклас відповідно, а четверте

число – порядковий номер фермента в його підпідкласі. Спочатку шифру будь-якого ферменту ставиться дві букви – КФ, що означає «класифікація ферментів». Для прикладу розглянемо гексокіназу, систематична назва якої АТФ:D-гексозо-6-фосфотрансфераза, шифр 2.7.1.1. Шифр означає, що зазначений фермент належить до другого класу ферментів – трансфераз, сьомого підкласу ферментів, які переносять залишки фосфату, до першого підпідкласу – акцептором фосфату є спирт, порядковий номер цього фермента в підпідкласі – 1.

### **Структурно-функціональна організація ферментів**

Оскільки ферменти – це речовини білкової природи, вони, так само як і білки, можуть бути як простими, так і складними (їх переважна більшість). Для ферментної активності білків важливе значення має збереження їх первинної, вторинної та третинної структур; регуляторним ферментам властива четвертинна структура. Більшість внутрішньоклітинних ферментів є олігомерами, які складаються з декількох протомерів, відносно міцно пов'язаних між собою. Так, глутаматдегідрогеназа (відщеплює два атоми водню від глутамінової кислоти з утворенням  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти), виділена з печінки бика, складається з 8 великих субодиниць, на які вона може дисоціювати.

*Ферменти-прості білки* являють собою поліпептидні ланцюги, які при гідролізі розпадаються до амінокислот, їх ще називають однокомпонентними. До них належать пепсин, трипсин, уреаза, рибонуклеаза тощо. *Ферменти-складні білки*, крім поліпептидних ланцюгів, містять небілкову частину, їх називають двокомпонентними. Білкову частину двокомпонентних ферментів називають *апоферментом* (забезпечує специфічність дії та відповідає за вибір типу хімічного перетворення субстрату), а небілкову – *кофактором* (служить акцептором і донором хімічних груп, атомів і електронів у каталітичній ділянці активного центра фермента). Молекула складного

фермента в цілому називається *холоферментом*. Зв'язок білкової частини ферменту з небілковою здійснюється за рахунок ковалентних і нековалентних зв'язків і може бути різної міцності. Якщо небілкова частина ферменту міцно пов'язана з білком і в циклі біохімічних реакцій не відділяється від нього, її прийнято називати *простетичною групою* (наприклад, ФАД, ФМН, біотин тощо). Небілкові компоненти, які слабо пов'язані з білком і легко дисоціюють з комплексу з ферментним білком, називають *коферментами* (наприклад, НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>). Коферменти можуть знаходитися у вільному стані й сполучатися з білковою частиною тільки в момент каталітичної реакції, їх можна розглядати в якості другого субстрату. Один і той самий кофермент може сполучатися з різними апоферментами і брати участь у різних хімічних перетвореннях субстрату (наприклад, піридоксальфосфат може брати участь у реакціях трансамінування чи декарбоксилування). Ферменти, які міцно пов'язані з іонами металів і не втрачають цього зв'язку за умов виділення та фракціонування ферменту, називаються *металоферментами*. У деяких випадках іони металів не входять до складу ферментів як інтегральні структурні компоненти, а виконують лише функцію їх активаторів (іони Ca<sup>2+</sup> служать активаторами протеїнкінази С, іони Cl<sup>-</sup> – α-амілази тощо).

**Класифікація коферментів.** Хімічна природа коферментів, їх функції в ферментативних реакціях дуже різноманітні. Вони беруть участь в акті каталізу, здійснюють контакт між ферментним білком і субстратом, стабілізують апофермент, який, в свою чергу, посилює каталітичний акт небілкової частини і, крім цього, визначає специфічність ферментів, оскільки одна і та ж за хімізмом небілкова частина може функціонувати в складі різних ферментів.

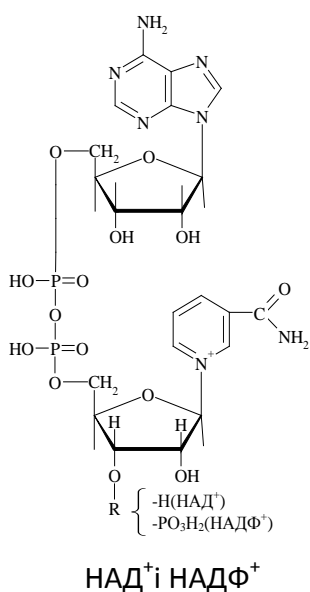
Традиційно до коферментів відносять похідні вітамінів (табл. 2).

Таблиця 2. Коферменти та відповідні їм вітаміни

Кофермент	Вітамін-попередник	Функція	Фермент
Піридоксаль-фосфат	B <sub>6</sub> (піридоксин)	Переамінування, декарбоксілування, рацемізація	Трансамінази, декарбоксілази, рацемази
Тіамін-дифосфат	B <sub>1</sub> (тіамін)	Окисне декарбоксілування α-кетокислот, перенесення альдегідних груп	Трансальдолаза, транскетолаза
Кофермент А	B <sub>3</sub> (пантотенова кислота)	Перенесення ацильних груп, аеробна деградація та синтез жирних кислот	Ацетилтрансферази, ацилтрансферази
Тетрагідро-фолієва кислота	Фолієва кислота	Перенесення C <sub>1</sub> -груп, біосинтез пуринових нуклеотидів	Формілтрансфераза, тимідилатсинтетаза
Біотин	H (біотин)	Реакції карбоксилювання за участі CO <sub>2</sub>	Карбоксилаза
НАД <sup>+</sup> , НАДФ <sup>+</sup>	PP (нікотинова к-та)	Зворотне перенесення H <sup>+</sup> та e <sup>-</sup>	Дегідрогенази (піридинзалежні)
ФМН, ФАД	B <sub>2</sub> (рибофлавін)	Перенесення H <sup>+</sup> та e <sup>-</sup>	Дегідрогенази (флавінзалежні)
Метилкобаламін, 5-дезоксадезилкобаламін	B <sub>12</sub> (ціанкобаламін)	Перенесення метильних груп, реакції трансметилування, ізомеризації	Метилмалоніл-КоА-мутаза
Ліпоєва кислота	N (ліпоєва к-та)	Перенесення ацетильних груп	Піруватдегідрогеназа, кетоглутаратдегідрогеназа

За типом каталізованої реакції коферменти поділяють на:

1. **Коферменти – переносники атомів водню та електронів** (НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, ФМН, ФАД, аскорбінова кислота, кофермент Q, глутатіон, гемінові коферменти (металопорфірини – цитохроми)).

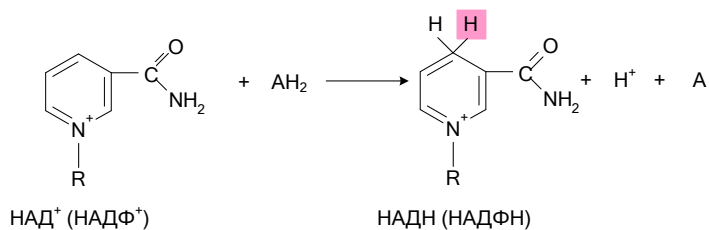


### Похідні вітаміну

**PP**нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД<sup>+</sup>) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ<sup>+</sup>)– це окиснені форми коферментів, у яких позитивний заряд несе атом Нітрогену піридинового кільця нікотинаміду. Субстрат (А) втрачає два атоми Гідрогену (2 протони та 2 електрони), але на кофермент переноситься лише 2 електрони і 1 протон, другий протон переходить у середовище. У результаті відновлена форма коферменту втрачає



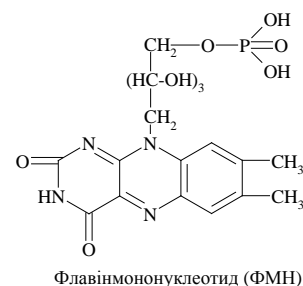
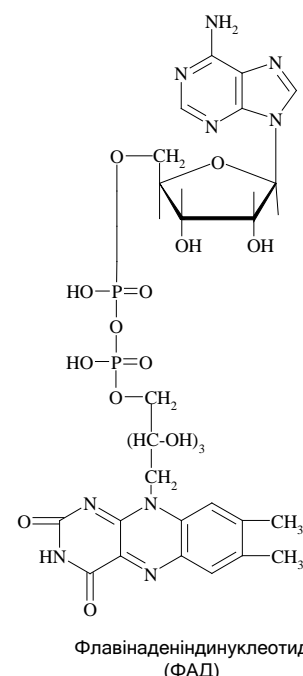
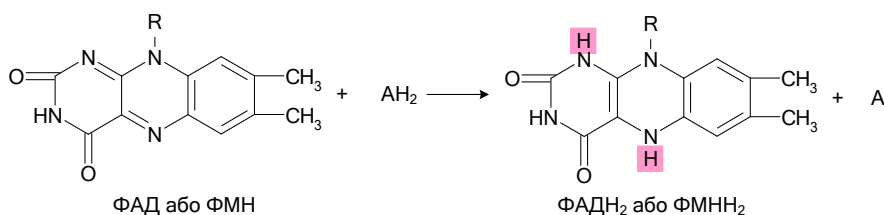
позитивний заряд:



Нікотинаміддинуклеотиди входять до складу багатьох дегідрогеназ, необхідних для синтезу енергії в клітині: вони виступають акцепторами та проміжними переносниками атомів Гідрогену на початкових стадіях окиснення вуглеводів, жирних кислот, амінокислот, гліцерину, на стадії циклу Кребса і в термінальних стадіях дегідрування в дихальному та монооксигеназному ланцюгах; вони виступають алостеричними ефекторами ферментів енергетичного обміну. НАДФН<sub>2</sub> як донор атомів Гідрогену використовується в біосинтетичних відновних реакціях (синтез жирних кислот, холестерину, гормонів тощо).

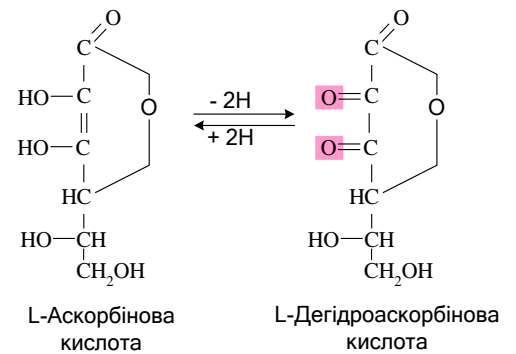
**Похідні вітаміну В<sub>2</sub>**– флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД) – коферменти, які входять до складу флавінових ферментів, що беруть участь у багатьох окиснювальних реакціях: перенесенні електронів і протонів у дихальному ланцюзі, окисненні пірувату, α-кетоглутарату, жирних кислот, біогенних амінів тощо.

Активною частиною флавінових коферментів є ізоалоксазинова циклічна система, вона може приєднувати два атоми водню (2 електрони та 2 протони).

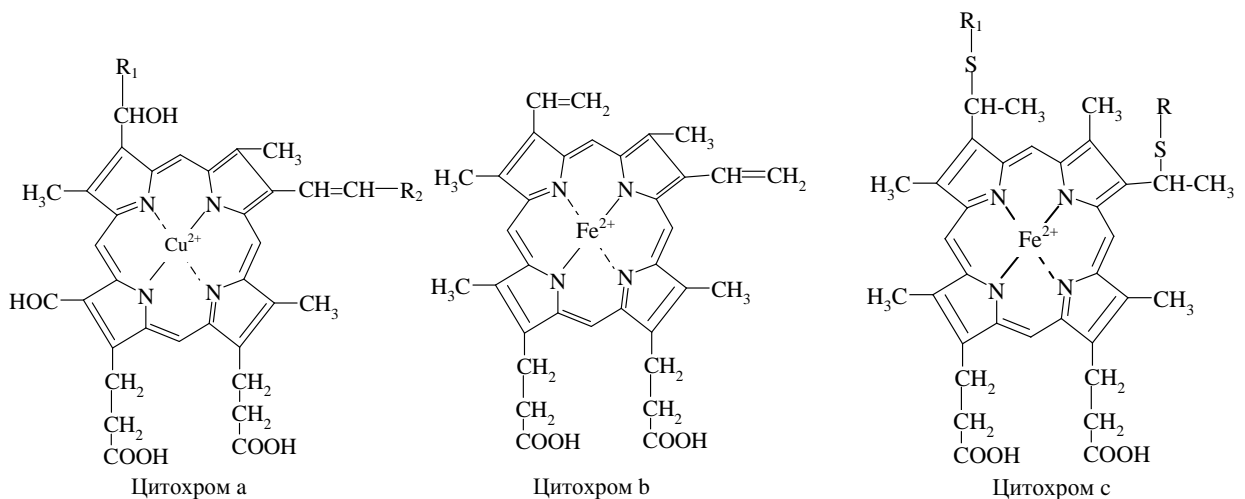


**Вітамін С** теж бере участь у окисно-відновних процесах. Він може існувати в двох формах – відновленій (аскорбінова кислота) та окисненій (дегідроаскорбінова кислота). Обидві форми легко переходять одна в одну і в якості коферментів гідроксилаз беруть участь в окисно-відновних реакціях.

Ця властивість обумовлює участь аскорбінової кислоти в обміні білків, вуглеводів, мінеральних речовин.



**Металопорфірини** за своєю структурою подібні або тотожні гему в гемоглобіні. Порфіринові коферменти входять до складу таких ферментів як цитохроми (а, b, с), пероксидаза, каталаза тощо.

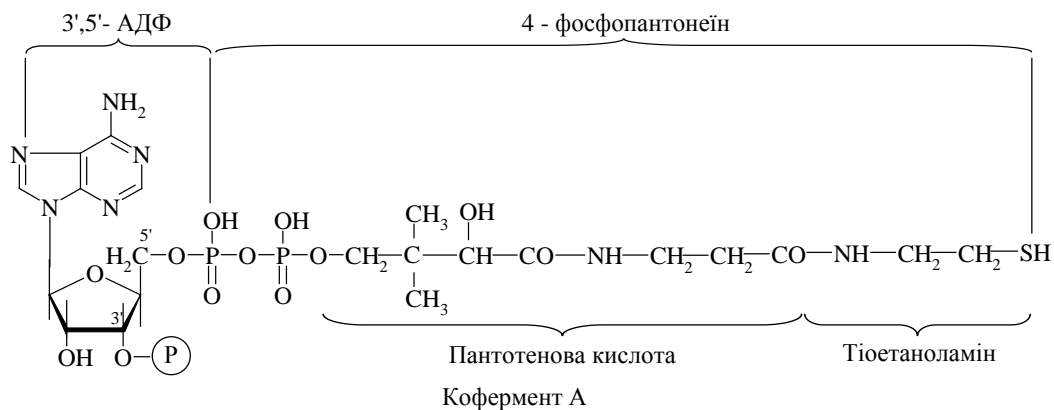


Вони містять іони металів (зокрема заліза, міді тощо), які здатні змінювати свою валентність (наприклад,  $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) і, у такий спосіб, беруть участь у перенесенні електронів під час окисно-відновних процесів.

**2. Коферменти – переносники різних хімічних груп** (нуклеотидні – АТФ, АДФ, УТФ, УДФ, ЦТФ, ЦДФ, похідні вітамінів – піридоксальфосфат, піридоксамінфосфат, ліпоєва кислота, КоА, тетрагідрофолієва кислота). Реакції за участі нуклеотидних коферментів зводяться до перетворення субстрату в молекулі коферменту (наприклад, перетворення УДФ-глюкози на УДФ-галактозу), вони можуть виступати донорами субстратів у реакціях

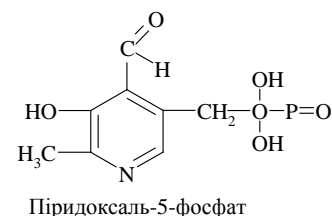
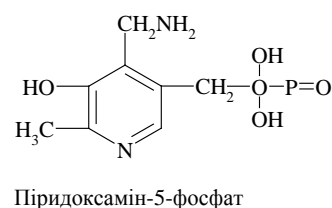
перенесення тих чи інших груп (наприклад, УДФ-глюкоза є донором глюкози в процесі біосинтезу глікогену, ЦДФ-холін – донором холіну в біосинтезі холін фосфатидів тощо).

**Кофермент А (КоА)** утворюється з пантотенової кислоти (В<sub>3</sub>).



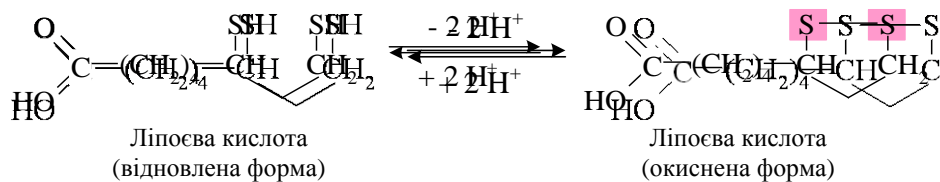
Його сульфгідрильна група може зазнавати ацилювання з перетворенням на ацил-КоА, або знаходитися в деацильованому стані (HS-КоА). Ці коферментні форми беруть участь у перенесенні ацильних радикалів у реакціях загального шляху катаболізму, активуванні жирних кислот, біосинтезі жирних кислот, холестерину, стероїдних гормонів, кетонових тіл, ацетилхоліну, знешкодженні чужорідних речовин у печінці.

**Похідні вітаміну В<sub>6</sub>** – піридоксаль-5-фосфат (ПАЛФ) і піридоксамін-5-фосфат (ПAMФ) відіграють ключову роль в обміні амінокислот: каталізують реакції трансамінування (перенесення аміногрупи з α-амінокислоти на α-кетокислоту) та декарбоксилювання (відщеплення карбоксильної групи у вигляді CO<sub>2</sub>) амінокислот, беруть участь у специфічних реакціях метаболізму окремих амінокислот (серину, треоніну, триптофану, сірковмісних амінокислот, а також у синтезі гему.



**Ліпоєва кислота**, завдяки своїй здатності легко переходити з окисненої у відновлену форми, проявляє властивості кофермента в складі

оксидоредуктаз, її амід слугує простетичною групою складного піруват- і  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів, які беруть участь в окисненні піровиноградної та  $\alpha$ -кетоглутарової кислот.

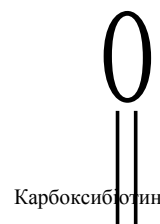


**Тетрагідрофолієва кислота** – відновлена форма фолієвої кислоти – переносить одновуглецеві залишки (метильні (-CH<sub>3</sub>), оксиметильні (-CH<sub>2</sub>OH), формільні (-HCO тощо) на різні сполуки і бере в такий спосіб участь у синтезі азотистих основ нуклеїнових кислот, креатину, метіоніну, гліцину, серину.



**3. Коферменти синтезу, ізомеризації та розщеплення вуглець-вуглецевих зв'язків** (метилкобаламін, дезоксіденозилкобаламін, карбоксибіотин, тіаміндифосфат).

**Біотин** виконує коферментну функцію в якості N<sup>5</sup>-карбоксибіотину і входить до складу карбоксилаз: він бере участь в утворенні активної форми CO<sub>2</sub>, використовується в утворенні малоніл-КоА з ацетил-КоА, у синтезі пуринового кільця, у реакції карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату тощо.



Роль **вітаміну B<sub>1</sub>** визначається тим, що у формі кофактора тіаміндифосфату (ТДФ) він входить до складу як мінімум трьох ферментів і ферментативних

комплексів: у складі піруват- і  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів він бере участь в окиснювальному декарбоксилуванні пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату; у складі транскетолази він залучається у пентозофосфатний шлях перетворення вуглеводів. Цей кофермент необхідний для синтезу жирних кислот, холестерину, стероїдних гормонів, знешкодження токсичних речовин і ліків. Тіамінтрифосфат (ТТФ) у тканині мозку причетний до синаптичної передачі нервових імпульсів.

**Метилкобаламін** і дезоксіаденозилкобаламін – це коферментативні форми вітаміну B<sub>12</sub>. Метилкобаламін тісно пов'язаний із фолієвою кислотою, оскільки входить до складу фермента, який переносить метильну групу 5-метилтетрагідрофолієвої кислоти на гомоцистеїн із утворенням метіоніну.

Разом із фолієвою кислотою він бере участь у синтезі креатину, азотистих основ, амінокислот, білків, нуклеїнових кислот тощо. Дезоксіаденозилкобаламін бере участь у завершальній стадії окиснення жирних кислот із непарною кількістю вуглецевих атомів, бічного ланцюга холестерину, тиміну, розгалужених амінокислот тощо.

### Функціонально активні ділянки ферментів.

Біологічна функція як простих, так і складних ферментів обумовлена наявністю в них функціональних ділянок (рис. 1). Під час ферментативної реакції відбувається взаємодія фермента та субстрату (ліганда, який взаємодіє з

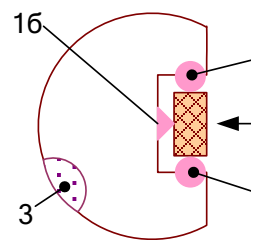
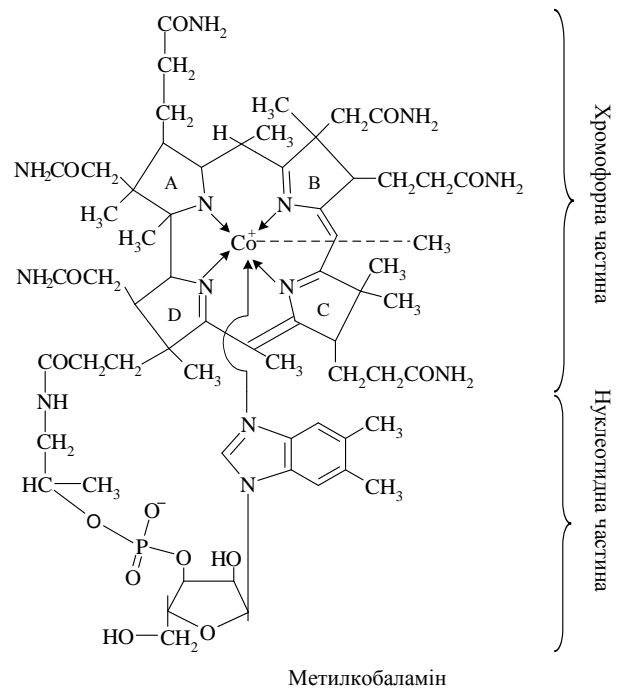


Рис. 1. Функціонально активні ділянки фермента: 1а – контактні ділянки, 1б – каталітична ділянка, 2 – субстрат, 3 – алостеричний центр

ферментом) з утворенням проміжних фермент-субстратних комплексів (ФСК). Ділянка молекули фермента, до якої приєднується субстрат, називається активним центром.

*Активний центр* простого фермента – це тривимірне утворення, здебільшого щілиноподібної форми, яке представлено сукупністю бічних радикалів амінокислотних залишків, що дуже часто знаходяться на певній відстані в лінійній послідовності поліпептидного ланцюга. Так, у молекулі лізоциму – ферменту, що забезпечує бактерицидні властивості слини, основні групи активного центра представлені амінокислотними залишками, які займають у поліпептидному ланцюзі 35, 52, 62, 63 і 101 положення. У складних ферментах активний центр може містити кофактор, а бічні радикали створюють умови для правильної конформації активного центра, орієнтації та перетворення субстрату. Проте, саме білок у складному ферменті організовує ефективне функціонування кофактора. Так, гем у комплексі з глобіном виявляє свою схильність до участі в окисновально-віновних перетвореннях; у складі каталази він забезпечує відновлення  $H_2O_2$ , тоді як у складі цитохрому гем виконує роль переносника електронів, змінюючи при цьому валентність заліза. У ферментах із четвертинною структурою кількість активних центрів, зазвичай, співпадає з числом субодиниць.

Оскільки субстрат сполучається з активним центром у кількох точках і це, своєю чергою, забезпечує високу вибірковість зв'язування (виявляється відповідність субстрату й активного центра) і орієнтацію субстрату, необхідного для каталізу, тому в активному центрі умовно виділяють *якірні (або контактні) ділянки*, які забезпечують вибір субстрату та його приєднання нековалентними зв'язками, а також *каталітичну ділянку*, яка забезпечує вибір шляху хімічного перетворення певного субстрату, тобто, бере безпосередню участь у синтезі або розриві зв'язків субстрату з утворенням продукту (рис. 1). Найчастіше до складу активних центрів

входять такі амінокислоти як сер, гіс, глу, асп, цис-SH, тир, три, ліз, гідрофобні ланцюги аліфатичних амінокислот і ароматичне кільце фенілаланіну.

Крім активного центра, у ферментах може знаходитися *алостеричний центр* (або центри) (грец. *allos* – інший і *steros* – просторовий, структурний) (рис. 1). Він просторово розділений з активним центром і являє собою ділянку молекули фермента, з якою зв'язуються так звані модулятори або алостеричні ефектори, які за своєю природою різняться з субстратами. Вони змінюють третинну, а іноді й четвертинну структуру молекули фермента, конформацію активного центра, спричинюючи в такий спосіб пришвидшення (активатори) або сповільнення (інгібітори) ферментативної реакції. Такими ефекторами можуть бути гормони та їх похідні, метаболіти, медіатори тощо.

### **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):

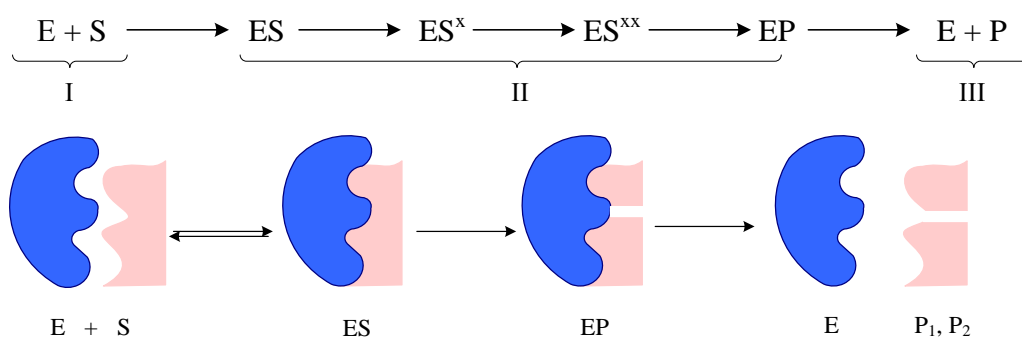


Рис. 2. Стадії ферментативного каталізу: E – фермент, S – субстрат, ES – фермент-субстратний комплекс, P – продукти реакції

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 продукту. 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

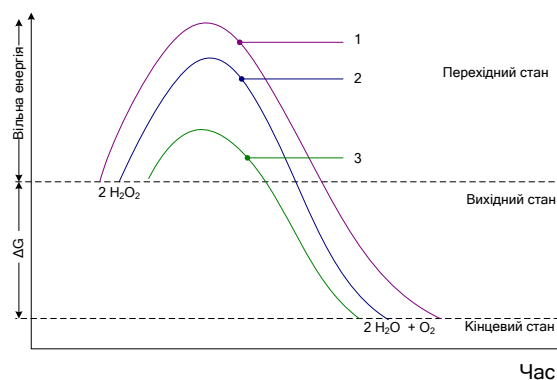


Рис. 3. Енергія активації гідролізу пероксиду водню: 1 – спонтанна реакція, 2 - реакція з небіологічним каталізатором (платиною), 3 – реакція з 73

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 каталізатора (рис. 3, 2); і найменше енергії активації затрачається на реакцію за участі біологічного каталізатора (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 ( $\Delta G$ ).

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

*Кисотно-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<sup>+</sup> 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).

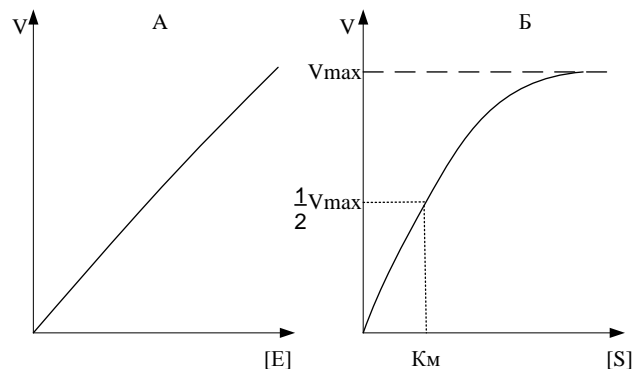
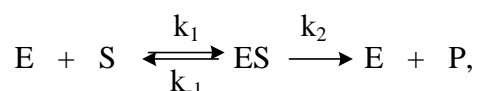


Рис. 4. Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації

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  $[S]$ , тобто  $K_M \gg S$ , то сума  $(K_M + S)$  приблизно дорівнює  $K_M$ , відповідно рівняння набуває вигляду:  $V = V_{\max} \times [S] / K_M$ . 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:  $V = V_{\max}$ .

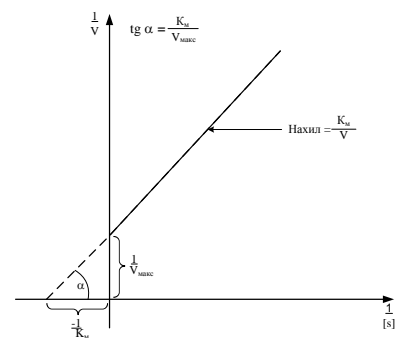


Рис. 5. Графік Лайнуївера-Берка

Обробка рівняння Міхаеліса-Ментен за методом подвійних зворотних величин

дає змогу відобразити залежність  $V$  від  $[S]$  прямою лінією (рівняння Лайнуївера-Берка) (рис. 5).

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

Між  $1/V$  та  $1/[S]$  є

прямопропорційна залежність, яка дозволяє легко отримати значення

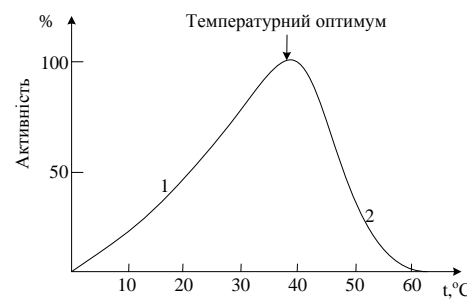


Рис. 6.

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

кінетичних констант  $K_M$  та  $V_{\max}$ , що неможливо при аналізі звичайної гіперболи.

Із рівняння та графіка випливає, що кутовий коефіцієнт прямої ( $\text{tg}$  кута нахилу) дорівнює  $K_M/V_{\max}$ . 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 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

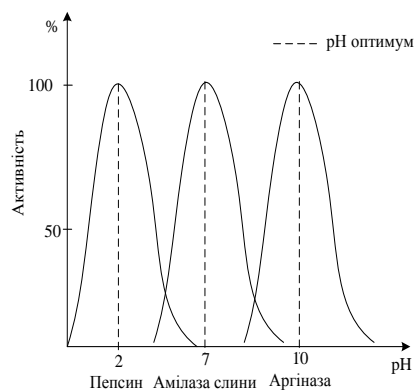


Рис. 7. Залежність швидкості ферментативної реакції від pH середовища

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.

### **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  $\alpha$ -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  $\alpha$ - та  $\beta$ -глікозидних зв'язків можна розглянути на прикладі амілази, яка діє лише на  $\alpha$ -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  $\beta$ -глікозидні зв'язки, для гідролізу яких в організмі людини немає відповідних ферментів.

**Каталітична специфічність** – це такий вид специфічності, коли фермент каталізує перетворення приєданого 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<sup>+</sup>, 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 *протеїнофосфатази*. 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,  $\beta$ -ГОМК-редуктази) є, навпаки, механізмом їх інактивації (рис. 8).

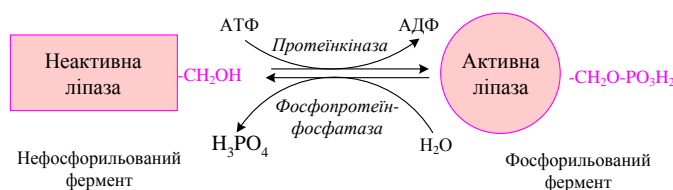


Рис. 8. Регуляція активності ліпази

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.

**Активація 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.

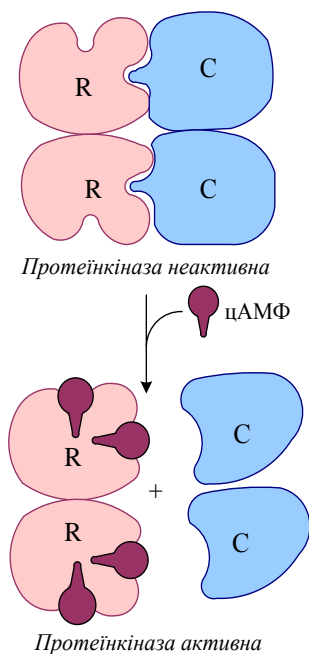
До регуляторних білків, які можуть чинити вплив на активність ферментів належать:

- *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, кінази легких ланцюгів міозину тощо;

- *протеїназні інгібітори* блокують активність тканинних протеїназ – ферментів, здатних розщеплювати власні білки організму. Найактивнішими протеїназами є  $\alpha_2$  – *макроглобулін* та  $\alpha_1$  – *антитрипсин* ( $\alpha_1$ - *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



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.

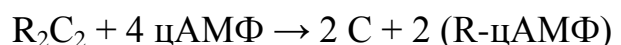
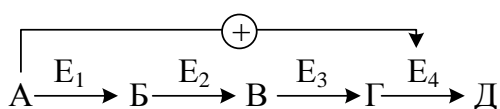


Рис. 9. Активація протеїнкінази за участі цАМФ

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 алостеричній активації підлягають ті ферменти, які каталізують ключові реакції заключних етапів метаболічного шляху:



У якості прикладу розглянемо гліколіз – специфічний шлях розпаду глюкози: при утворенні надмірної кількості фруктозо-1,6-дифосфату спостерігається алостерична активація фермента піруваткінази (рис. 10).

Роль активаторів можуть виконувати також органічні речовини (жовчні кислоти посилюють дію ліпази підшлункової залози) та неорганічні (іони хлору є активаторами амілази слини; іони водню посилюють активність пепсину). Проте існують випадки, коли одна й та сама речовина виступає активатором для одного фермента, а інгібітором – для іншого.

Іони металів часто слугують специфічними активаторами для низки

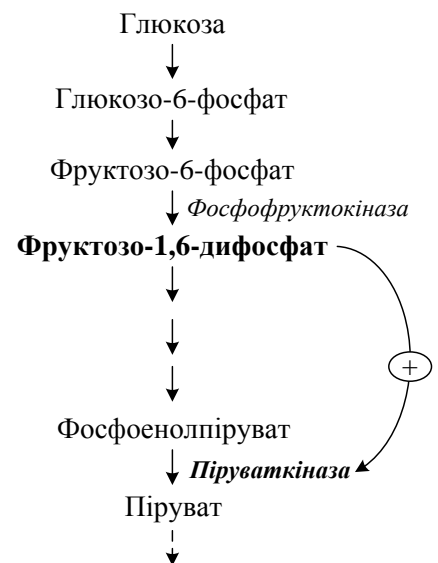


Рис. 10. Алостерична активація на прикладі гліколізу

ферментів, оскільки вони можуть бути компонентами активного центра, сприяють взаємодії субстрату з ферментом, беруть участь у формуванні третинної структури фермента (залізо в складі фермента каталази, мідь у складі аскорбатоксидази). Це стосується, в основному, катіонів. Аніони можуть позитивно впливати на ферментативну реакцію, прискорюючи її другий етап.

**Інгібування ферментів.** Дія багатьох ферментів може бути загальмована, а в низці випадків і повністю припинена під впливом певних хімічних речовин – *інгібіторів*. Останні за тією або іншою причиною частково або повністю перешкоджають утворенню активного фермент-субстратного комплексу. Зокрема, токсичність багатьох отрут для живих 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).

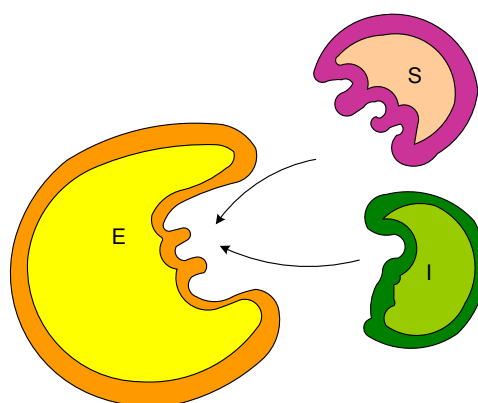
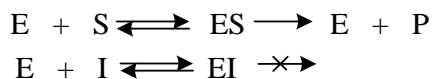


Рис. 11. Конкурентне інгібування:

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 відбуваються 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 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).

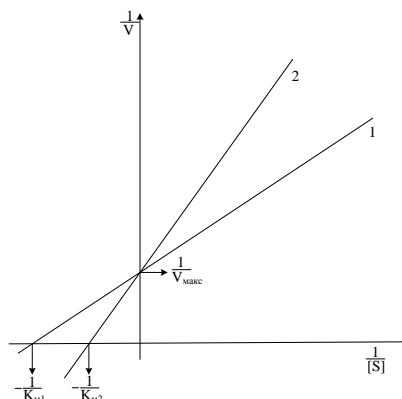
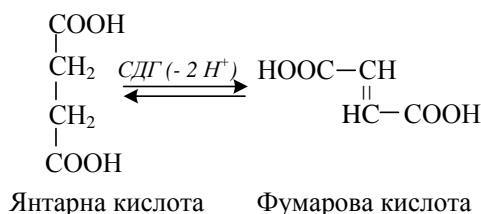


Рис. 12. Конкурентне інгібування фермента: 1 – без інгібітора; 2 – у присутності інгібітора

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).

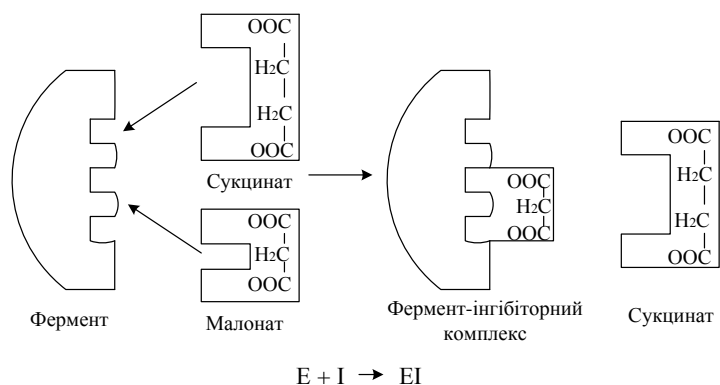
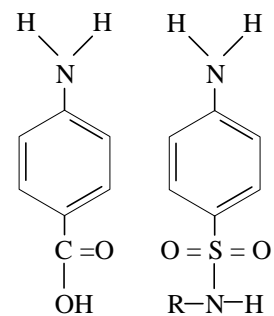


Рис. 13. Схема конкурентного гальмування СДГ малонатом

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.

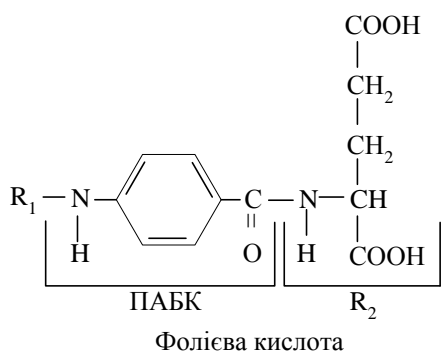
В якості лікарських препаратів-антиметаболітів використовують аналоги нуклеотидів для лікування



ПАБК Сульфаніламід

онкологічних захворювань, сульфаніламідні препарати (аналоги параамінобензойної кислоти (ПАБК)) для лікування інфекційних захворювань. ПАБК структурно подібна до сульфанілової кислоти, похідні якої є сульфаніламідними препаратами.

У мікроорганізмах в присутності ПАБК синтезується 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 глутаміновою 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 амідні, виступають

антиметаболітами ПАБК,

зумовлюють

бактеріостатичний ефект.

**Неконкурентним**

**інгібуванням** називають таке

гальмування, при якому

інгібітор не є структурним

аналогом субстрату, він

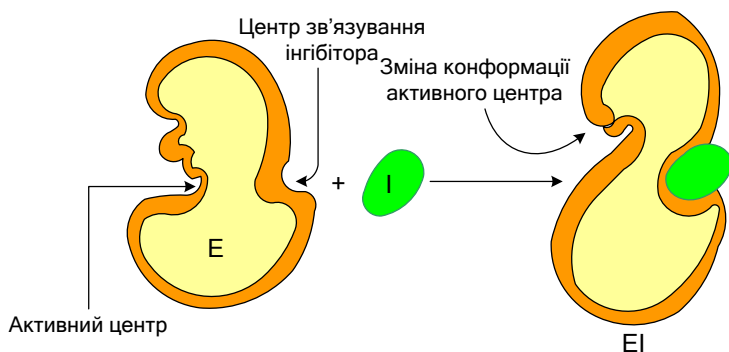


Рис. 14. Неконкурентне інгібування фермента

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, викликані цими препаратами, застосовують різні реактиватори (або протиотрути), які витісняють інгібітор з комплексу. До них відносять, наприклад, SH-вмісні

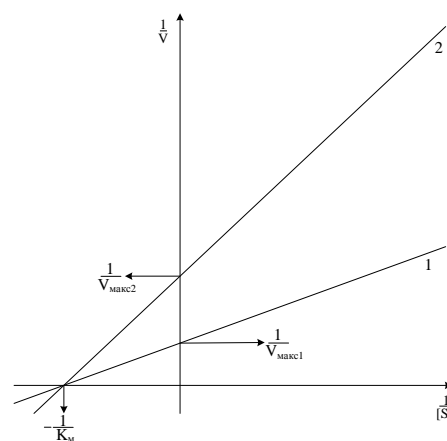


Рис. 15. Неконкурентне інгібування фермента: 1 – без інгібітора, 2 – у присутності інгібітора

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).

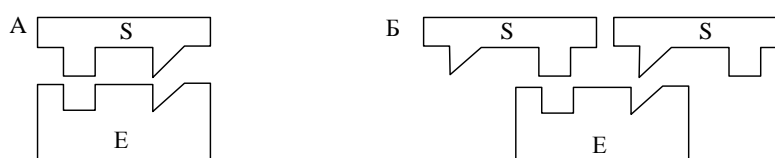
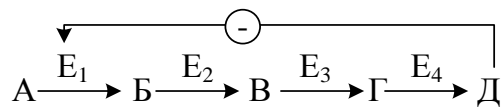


Рис. 16. Схема субстратного інгібування: А – молекула субстрату (S) оптимально розташована в активному центрі фермента (E); Б – дві молекули субстрату зв'язалися неправильно з активним центром фермента

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 В має алостеричний центр для негативного ефектора (інгібітора), який виступає

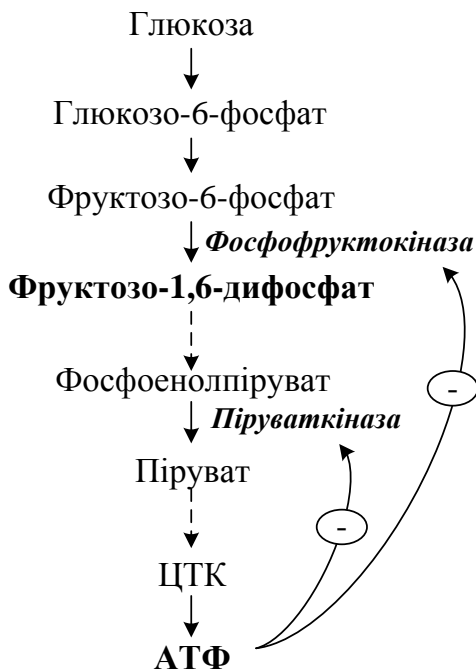


Рис. 17. Ретроінгібування на прикладі гліколізу

кінцевий продукт метаболічного шляху (Д). Якщо концентрація останнього збільшується, то інгібуються 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.

### Одиниці активності ферментів, методи їх визначення.

#### *Виділення та очищення ферментів*

Активність ферментів виражають в міжнародних одиницях активності. Кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мікромоль субстрату на продукт реакції за 1хв у стандартних (оптимальних) умовах з розрахунку на 1 г тканини називається *міжнародною одиницею (МО)*. Для оцінки кількості

молекул фермента серед інших білків досліджуваної тканини визначають *питому активність* – це кількість одиниць фермента в зразку тканини, розділену на масу білка (мг) у цій тканині. За цією величиною аналізують ступінь очистки фермента: чим менше сторонніх білків, тим вища питома активність.

У 1973 році Міжнародна біохімічна спілка запропонувала використати як одиницю активності *катал* (кат). Активність в 1 кат – це така кількість каталізатора, яка перетворює 1 моль субстрату на продукт за 1 секунду. Отже, 1 кат =  $60 \times 10^6$  міжнародних одиниць. Рекомендовано використати також одиницю значно меншого масштабу - нанокатал (нкат), яка дорівнює  $10^9$  кат.

Кількість молекул субстрату, які перетворюються однією молекулою ферменту на продукт у процесі реакції за одиницю часу при повному насиченні ферменту субстратом, прийнято називати *числом обертів ферменту*, або *молярною активністю*. Ця активність виражається в каталах на 1 моль ферменту.

### ***Методи визначення активності ферментів у біоб'єктах***

Здебільшого кількість фермента не можна виміряти в одиницях маси, тобто в міліграмах або в моль, про неї опосередковано свідчить його активність, тобто дія фермента. Іншими словами, присутність і кількість фермента виявляють за специфічністю та швидкістю реакції, яку він каталізує. Активність фермента можна визначити опосередковано: за визначенням кількості продукту, який утворився під дією ферменту або за кількістю витраченого субстрату за одиницю часу при оптимальних умовах ферментативної реакції. Наприклад, активність  $\alpha$ -амілази, яка каталізує гідролітичне розщеплення крохмалю з утворенням у кінцевому результаті мальтози, розраховують на основі кількості негідролізованого крохмалю або за кількістю утвореної мальтози.



Найчастіше активність ферментів визначають у сироватці, плазмабюклітинах крові та в сечі колориметричними, спектрофотометричними, флюориметричними, манометричними, кондуктометричними, віскозиметричними методами. У клініко-діагностичних лабораторіях для визначення активності ферментів переважно застосовують колориметричні та спектрофотометричні методи.

В основі **кологориметричних** методів лежить вимірювання за допомогою фотоелектрокологориметра інтенсивності забарвлення речовини, яка утворюється під час взаємодії субстрату або продукту ферментативної реакції зі специфічними реактивами, які додаються у пробу після припинення реакції. Наприклад, продуктом дії ЛДГ в умовах прямої реакції є піруват, який з 2,4-динітрофенілгідразином утворює у лужному середовищі забарвлений гідрозон. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості пірувату, а, значить, і активності фермента.

**Спектрофотометричні** методи реєструють поглинання світла в певних ділянках спектра коферментами, субстратами або продуктами реакції. Ці методи широко застосовують для визначення активності оксидоредуктаз, зокрема НАД<sup>+</sup>- та НАДФ<sup>+</sup>-залежних дегідрогеназ. Перехід НАД<sup>+</sup> або НАДФ<sup>+</sup> з окисненої форми у відновлену супроводжується зміною поглинання в ультрафіолетовій ділянці спектра. В окисненій формі кофермент дає одну вузьку смугу поглинання при  $\lambda=260$  нм, яка обумовлена наявністю аденіну в його молекулі.

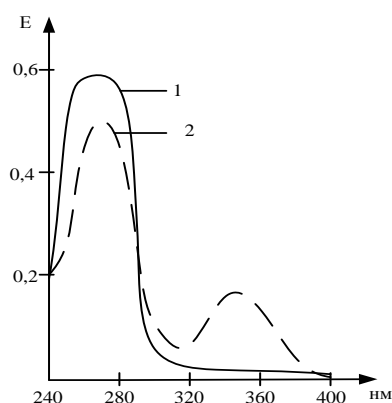


Рис. 18. Абсорбційні спектральні криві для окиснених НАД<sup>+</sup> (або НАДФ<sup>+</sup>) (1) та відновлених НАДН (або НАДФН) (2) нікотинамідних коферментів

У разі відновлення кофермента поглинання світла в цій зоні дещо знижується, але з'являється інша широка смуга поглинання при  $\lambda=340$  нм.

Поява цієї смуги зумовлена зникненням одного подвійного зв'язку у піридиновому кільці аденіну під час його відновлення. Визначення активності ферментів за різницею спектрів поглинання окисненої та відновленої форм НАД<sup>+</sup> (або НАДФ<sup>+</sup>) та НАДН (або НАДФН) називають тестом Варбурга (рис. 18).

### ***Методи виділення та очистки ферментів***

Уся інформація про метаболічні процеси, проміжні сполуки, які утворюються на різних етапах метаболічних шляхів та про механізми регуляції каталізаторів отримується, здебільшого, з використанням очищених препаратів ферментів. Вони необхідні також для аналізу кінетики, характеристики активних центрів, кофакторів, структури та механізмів дії ферментів. Процес очищення ферментів полягає у виділенні їх з клітинного екстракту, який містить велику кількість інших компонентів. Невеликі молекули видаляють методом діалізу або гель-фільтрації; нуклеїнові кислоти – осадженням шляхом додавання антибіотика тощо. Але основна проблема – відділити потрібний фермент від сотень хімічно та фізично подібних білкових молекул. Для цього широко застосовують осадження різними концентраціями солей (найчастіше сульфату амонію чи сульфату натрію) та органічними розчинниками (ацетоном, етанолом); диференційну денатурацію шляхом нагрівання чи зміни рН; диференційне центрифугування; гель-фільтрацію та електрофорез. Для швидкого очищення білків успішно використовують вибіркочу адсорбцію та елюцію білків з целюлозного аніонообмінника діетиламіноетилцелюлози та катіонообмінника карбоксиметилцелюлози, а також розділення білків за розміром на молекулярних ситах, наприклад, сефадексі. Проте ефективнішим є метод афінної хроматографії, який дозволяє вибірково виділяти зі складної суміші білків один конкретний білок або невелику їх кількість. Цей метод базується на використанні іммобілізованого ліганда, який специфічно взаємодіє з тим білком, який необхідно отримати в чистому вигляді. Зі всіх білків, які

присутні в суміші, з іммобілізованим лігандом зв'язуються лише ті білки, які можуть вступати з ним у потужну взаємодію. Потім потрібний фермент «знімають» з іммобілізованого ліганда або концентрованими сольовими розчинами, або розчином, який містить розчинну форму ліганда. Оскільки ферменти проявляють високу специфічність до своїх субстратів і коферментів, тому в якості лігандів найчастіше використовують похідні субстратів і коферментів, ковалентно зв'язаних з носієм, наприклад, сефадексом. Прикладом успішного використання афінної хроматографії може служити очищення великої кількості дегідрогеназ.

З афінною хроматографією схожа хроматографія з використанням у якості лігандів барвників (блакитна, зелена або червона сефароза), а також хроматографія на гідрофобних лігандах із використанням у якості носія феніл- або октилсефарози.

Локалізацію фермента в тканині чи клітині часто вдається ідентифікувати *in situ* гістохімічними методами (гістоензимологія). Розподіл ферментів у субклітинних органелах вивчають після попереднього фракціонування клітинних гомогенатів шляхом високошвидкісного центрифугування, визначаючи вміст ферментів у кожній фракції (табл. 3).

Таблиця 3. Локалізація деяких ферментів у клітині

<i>Цитозоль</i>	<i>Мітохондрії</i>	<i>Лізосоми</i>
Ферменти гліколізу	Піруватдегідрогеназний комплекс	Кисла фосфатаза
Ферменти пентозофосфатного циклу	Цитратсинтетаза	$\beta$ -Глюкуронідаза
Ферменти активації амінокислот	Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна)	$\alpha$ -Глюкозидаза
Мультиферментний комплекс синтезу жирних кислот	Малатдегідрогеназа та інші ферменти циклу Кребса	$\beta$ -Глюкозидаза
Ферменти катаболізму пуринових і піримідинових основ	Ацил-КоА-дегідрогеназа та інші ферменти окиснення жирних кислот	Катепсини
Пептидази	Ферменти дихального ланцюга та окиснювального фосфорилювання	Кисла рибонуклеаза
Амінотрансферази		$\alpha$ -Галактозидаза
Малатдегідрогеназа		Лізоцим
Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна)		Гіалуронідаза
Глікогенфосфорилаза		Арилсульфатаза
Глікогенсинтетаза		Колагеназа
<i>Мікросомна фракція</i>	<i>Плазматична мембрана</i>	<i>Ядро</i>
НАДН- і НАДФН- цитохром С	Аденілатциклаза	Ферменти, які

редуктази, цитохром P <sub>450</sub> - і цитохром b <sub>5</sub> -оксидази, глюкозо-6-фосфатази, естерази, нуклеозиддифосфатази, глюкуронілтрансферази, фосфогліцерид- і триацилгліцеридсинтетази, β-глюкуронідази Глюкозо-6-фосфатаза Рибосомні ферменти синтезу білка Ферменти, які беруть участь у реакціях гідроксилування Ферменти синтезу фосфоліпідів, тригліцеридів, а також деякі ферменти синтезу холестерину	Лужна фосфатаза Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -залежна АТФаза	беруть участь у процесі реплікації ДНК РНК-полімераза НАД-синтетаза
<i>Ендоплазматичний ретикулум</i>	<i>Комплекс Гольджі</i>	
Глюкозо-6-фосфатаза	Галактозилтрансфераза	

Для цього спочатку руйнують клітинну структуру за допомогою відповідного дезінтегратора, утворена гомогенізована маса підлягає диференційному центрифугуванню при температурі 0-4 °С. Центрифугування різними швидкостями гомогенатів різних тканин забезпечує седиментацію (осідання) субклітинних структур, що дозволяє згодом дослідити їх склад.

Якщо говорити про вузькоспеціалізовані клітини, то ферментів, які забезпечують їх функціонування в цих клітинах знаходиться більше порівняно з іншими. Наприклад, у клітинах міокарда підвищена кількість креатинкінази та аспартатамінотрансферази, у гепатоцитах – аланінамінотрансферази, в остеобластах – лужної фосфатази тощо.

### **Множинні молекулярні форми ферментів. Ізоферменти**

Ферменти, що каталізують одну і ту ж хімічну реакцію, але різняться за первинною структурою білка та фізико-хімічними властивостями, називають ізоферментами. Природа появи ізоферментів найчастіше обумовлена відмінністю в структурі генів, які кодують ці ізоферменти. У залежності від кількості наявних поліпептидних субодиниць, а також від будови фермента (димер, тетрамер, полімер) можлива різна кількість комбінацій

поліпептидних ланцюгів або різна кількість ізоферментів. Властивості ізоферментів обумовлені властивостями субодиниць, які входять до їх складу.

Зазвичай органи характеризуються різним кількісним складом того чи іншого ізофермента. Відмінності в будові поліпептидних ланцюгів та особливості поєднання цих ланцюгів у молекулі ізофермента обумовлюють відмінності в його загальному електричному заряді що, у свою чергу, забезпечує різну електрофоретичну рухливість. Це дозволяє фракціонувати ізоферменти за допомогою електрофорезу.

У даний час ізоферменти виявлені у понад 100 ферментів. Прикладом ізоферментів може служити лактатдегідрогеназа (ЛДГ) – фермент, що каталізує утворення й окиснення молочної кислоти. За допомогою електрофореграми виявлено 5 його ізоформ (рис. 19).

Кожна ізоформа містить 4 субодиниці двох типів – «Н» (heart – серце, англ) та «М» (muscle – м'яз, англ) і складається з таких протомерів: ЛДГ<sub>1</sub> = Н<sub>4</sub>; ЛДГ<sub>2</sub> = М<sub>1</sub>Н<sub>3</sub>; ЛДГ<sub>3</sub> = М<sub>2</sub>Н<sub>2</sub>; ЛДГ<sub>4</sub> = М<sub>3</sub>Н<sub>1</sub>; ЛДГ<sub>5</sub> = М<sub>4</sub>.

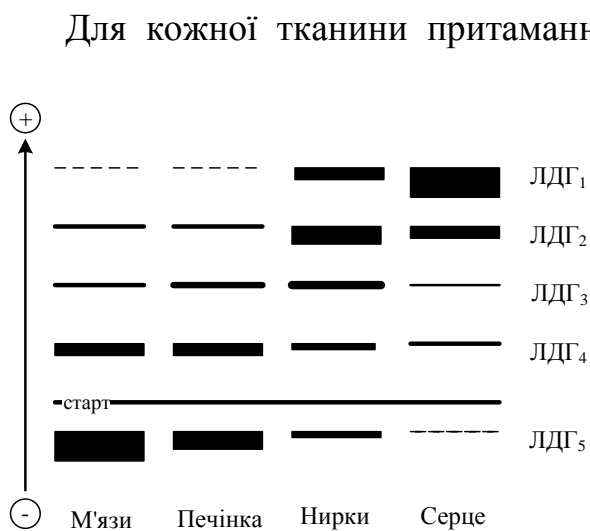
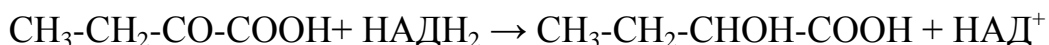


Рис. 19. Електрофореграма множинних форм ЛДГ

Для кожної тканини притаманне своє співвідношення ізоформ. Так, ЛДГ<sub>1</sub> та ЛДГ<sub>2</sub> переважають у органах, які характеризуються аеробним метаболізмом - серці, мозку, нирках, підшлунковій залозі та еритроцитах; ЛДГ<sub>3</sub> – у легенях, селезінці, лімфатичних вузлах; ЛДГ<sub>4</sub> та ЛДГ<sub>5</sub> – в органах з активним анаеробним обміном – печінці та скелетних м'язах.

Субодиниці ЛДГ відрізняються за спорідненістю до субстратів. Субодиниця „М” краще каталізує перетворення піровиноградної кислоти до молочної. Субодиниця

„Н” є менш специфічною за своєю дією та каталізує взаємоперетворення  $\alpha$ -кето- та  $\alpha$ -гідроксимасляної кислоти в реакції:



Це дозволяє відрізнити ізоферменти, які складаються, основним чином, з субодиниць „Н” (ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub>) від ізофермента, побудованого з „М”-субодиниць (ЛДГ<sub>5</sub>) на підставі дослідження їх активності в реакції, яка визначається як реакція дегідрогенази  $\alpha$ -гідроксимасляної кислоти та відбувається за участі ЛДГ<sub>1</sub>.

Вивчення ізоферментного спектра широко використовується в клініці для діагностики органічних і функціональних уражень органів і тканин, встановлення чіткої локалізації патологічного процесу. Так, розподіл ізоферментів ЛДГ у сироватці крові за умов норми має наступний вигляд: ЛДГ<sub>2</sub> > ЛДГ<sub>1</sub> > ЛДГ<sub>3</sub> > ЛДГ<sub>4</sub> > ЛДГ<sub>5</sub>. При інфаркті міокарда ЛДГ<sub>1</sub> > ЛДГ<sub>2</sub> > ЛДГ<sub>3</sub> > ЛДГ<sub>4</sub> > ЛДГ<sub>5</sub> - помітна характерна зміна „розташування” ЛДГ<sub>1</sub> та ЛДГ<sub>2</sub>: активність ЛДГ<sub>1</sub> переважає над активністю ЛДГ<sub>2</sub>. При гемолітичній анемії ЛДГ<sub>2</sub> + ЛДГ<sub>1</sub> > ЛДГ<sub>3</sub> + ЛДГ<sub>4</sub> + ЛДГ<sub>5</sub>, загальна активність ЛДГ при цьому в 2 – 5 разів перевищує норму. При мегалобластних анеміях активність перевищує норму в 10 – 50 разів. Для захворювань м’язів, печінки, утворення пухлин розподіл ізоформ має наступний вигляд: ЛДГ<sub>4</sub> = ЛДГ<sub>5</sub> > ЛДГ<sub>2</sub> > ЛДГ<sub>1</sub> > ЛДГ<sub>3</sub>.

Крім ізоферментів лактатдегідрогенази велике клінічне значення мають ізоферменти креатинфосфокінази (КК), яка каталізує реакцію утворення креатинфосфату. Цей фермент є димером і побудований з двох основних субодиниць – В та М, з них утворюються три комбінації цих субодиниць і, як наслідок, триізоферменти КК. У мозку переважає ізоформа ВВ, у скелетних м’язах – ММ, а у серцевому м’язі – ВМ.

## Поліферментні системи

Більшість ферментів має чотири рівні структурної організації і є олігомерами, які складаються з двох (алкогольдегідрогеназа), чотирьох (піруваткіназа) і більше протомерів (субодиниць). Ці протомери можуть бути однаковими або різними за хімічною природою та функціями. Кожна з субодиниць або окремі їх частини відіграють певну роль у процесі функціонування ферменту (аспартаткарбамоїлтрансфераза має шість каталітичних і шість регуляторних протомерів).

Кожна клітина організму має свій специфічний набір ферментів, дія яких не індивідуальна, а тісно пов'язана з іншими ферментами. Так із окремих ферментів формуються **поліферментні (мультиферментні) комплекси**, що каталізують послідовності спряжених біохімічних реакцій.

Можна умовно виділити наступні види організації мультиферментних систем: функціональну, структурно-функціональну та змішану.

Функціональна організація характеризується тим, що окремі ферменти, об'єднанні в поліферментну систему, виконують певну функцію завдяки метаболітам, які дифундують від одного фермента до іншого. У таких функціонально організованих поліферментних системах продукт реакції першого фермента в ланцюгу служить субстратом для наступного тощо.

У випадку, якщо метаболіт є спільним для ферментів різних поліферментних ланцюгів, він може виконувати об'єднуючу роль між різними поліферментними системами та об'єднувати в єдину метаболічну карту клітини навіть ті ферментативні системи, які локалізовані в різних її органоїдах.

Прикладом функціональної організації мультиферментної системи служить гліколіз, тобто розпад глюкози. Всі ферменти гліколізу знаходяться в розчиненому стані. Кожну реакцію каталізує окремий фермент, але зв'язуючою ланкою є метаболіти. Розташування та послідовність дії кожного

фермента в ланцюгу перетворень встановлюється за його спорідненістю до субстрату.

Структурно-функціональна організація полягає в тому, що ферменти утворюють структурні системи з певною функцією з допомогою фермент-ферментативних (білок-білкових) взаємодій. Таким чином формуються мультиферментні надмолекулярні комплекси. До них належать, наприклад, мультиферментний комплекс піруватдегідрогеназа, який складається із кількох ферментів, що беруть участь в окисненні пірувату, або синтетаза жирних кислот, яка складається із семи структурно зв'язаних ферментів. Такі мультиферментні комплекси досить міцні і важко розпадаються на окремі ферменти.

Низку таких мультиферментних комплексів іноді називають **ферментними ансамблями**. Вони структурно пов'язані з певними органелами (рибосоми, мітохондрії тощо) або з біомембраною і становлять високоорганізовані надмолекулярні системи (наприклад, тканинне дихання, пов'язане з перенесенням електронів від субстрату на кисень через систему дихальних ферментів).

Змішаний тип організації поліферментних систем – це комбінація обох типів організації, тобто одна частина поліферментної системи має структурну організацію, а інша – функціональну (такі ферменти називають поліфункціональними). Прикладом такої організації служить мультиферментна система циклу Кребса, де одна частина ферментів об'єднана в структурний комплекс (альфа-кетоглутаратдегідрогеназний комплекс), а інша з'єднана функціонально за допомогою метаболітів.

### **Імобілізовані ферменти та їх застосування**

Під імобілізацією розуміють такий процес, внаслідок якого молекула фермента ковалентно прикріплюється до будь-якого органічного чи неорганічного полімерного об'єкта (матриці), нерозчинного у воді (кератин,



фіброїн, міозин, сироватковий альбумін, холестерин, фосфатидилхолін тощо). Застосування ферментів, достатньо міцно зв'язаних з нерозчинними полімерними матеріалами, зробило використання очищених ферментів у промисловості більш технологічним, з'явилася можливість використовувати безперервні процеси, які базуються на проходженні розчину субстрата через колонку з іммобілізованим ферментом; зникла проблема розділення прореагованих компонентів від фермента, підвищилася ефективність використання ферментів. Виявилось також, що зв'язування з носієм часто посилює термічну стійкість фермента – у випадку протеаз іммобілізація суттєво послаблює взаємодію між окремими молекулами ферментів, що запобігає автолізу. Іммобілізація ферментів дозволяє забезпечити їх високу специфічність дії, посилити стабільність, повторно використовувати. Іммобілізація здійснюється шляхом фізичної адсорбції ферментів на нерозчинному матеріалі; включенням ферментів в структуру гелю, а також ковалентним зв'язуванням ферменту з нерозчинним матеріалом або молекул фермента між собою з утворенням поліферментних комплексів. У якості адсорбентів використовують скло, силікагель, гідроксиапатити, целюлозу та її похідні, хітин, декстрини.

Прикладом технологічного процесу з використанням іммобілізованих ферментів може бути отримання глюкозо-фруктозного сиропу, який широко застосовують для виготовлення кондитерських виробів. Цей процес відбувається з використанням трьох іммобілізованих ферментів:  $\alpha$ -амілази, яка каталізує гідроліз кукурудзяного крохмалю до олігосахаридів невеликої довжини, амілоглікозидази, за допомогою якої ці олігосахариди гідролізуються до глюкози, глюкозоізомерази, яка перетворює глюкозу на суміш глюкози та фруктози.

Інший приклад – отримання 6-амінопеніцилінової кислоти з природного пеніциліну за допомогою іммобілізованої пеніцилінамідинази. Утворену 6-амінопеніцилінову кислоту використовують у якості сировини

для отримання широкого спектра напівсинтетичних пеніцилінів, у тому числі таких, які діють на стійкі до природних пеніцилінів мікроорганізми.

Застосування іммобілізованих ферментів замість розчинних у якості медичних препаратів виявилось в низці випадків пріоритетним. Внаслідок підвищеної стійкості такі препарати триваліший час можуть знаходитися в організмі; крім того, можна створювати вигідніші для використання форми ферментів, наприклад, іммобілізація протеаз на целюлозі дозволяє виготовляти тампони та пов'язки, які володіють протеолітичною активністю, та застосовувати їх для загоєння ран, виразок тощо.

Фармпрепарат стрептодеказа, створений на основі іммобілізації препарату стрептокінази (володіє тромболітичною активністю) на водорозчинній матриці полісахаридної природи, здатний тривалий час забезпечувати пролонговану фібринолітичну дію в крові (48 – 72 год), на відміну від стрептокінази та фібринолізину, які швидко руйнуються після введення в організм.

### **Значення ферментів для медицини**

Клінічна ензимологія – один із найважливіших розділів клінічної біохімії, який має свої завдання, специфічні методи дослідження та напрями, основними з яких є: вивчення ферментативних порушень у патогенезі різних захворювань (*ензимопатологія*); використання ферментів з діагностичною метою (*ензимодіагностика*); використання ферментів з лікувальною метою (*ензимотерапія*); використання ферментів у лабораторній практиці як високоспецифічних аналітичних реактивів.

**Ензимопатологія** – важлива галузь медичної ензимології, метою якої є дослідження активності ферментів за умов норми та патології, оскільки чисельні вади метаболізму є результатом дефекту того чи іншого фермента. У цьому контексті всі ферментопатії поділяють на первинні та вторинні. До першої групи належать спадкові захворювання обміну речовин, у патогенезі

яких основну роль відіграє відсутність, нестача або аномальна структура ферменту. Первинні або спадкові, ферментопатії виникають унаслідок змін у генетичному коді синтезу ферментів. Причинами ферментативних дефектів можуть бути: аномальна структура ДНК, порушення перенесення генетичного коду від ДНК до РНК, змінена структура РНК і порушення в передачі інформації від РНК до рибосом. Крім цього, причиною метаболічних розладів можуть бути генетично зумовлені порушення співвідношення природних активаторів та інгібіторів ферментів.

Ферментативні дефекти при спадкових ферментопатіях спричинюють порушення обміну речовин (метаболічний блок), що є причиною нагромадження невикористаного субстрату та його попередників, які, у випадку їх токсичності, призводять до патологічних змін і можуть викликати вторинний метаболічний блок.

Так, при *галактоземії* (дефіцит галактозо-1-фосфатуридилтрансферази або галактокінази) відбувається накопичення в крові й тканинах галактозо-1-фосфату, вільної галактози та спирту дульциту – продукту відновлення галактози. Високий їх вміст діє токсично, у немовлят після споживання молока спостерігають блювання та пронос, збільшується печінка, розвивається катаракта, затримується розумовий розвиток.

Відсутність у печінці фенілаланін-4-монооксигенази призводить до розвитку *фенілкетонурії*. Приблизно одна людина з 80 серед європейців є носієм рецесивного гену фенілаланінмонооксигенази. Внаслідок блоку перетворення фенілаланіну на тирозин в організмі нагромаджується фенілаланін, фенілпіруват. Надлишок цих кислот порушує нормальний розвиток мозку дитини та є причиною розумової відсталості, судом тощо.

Друга група – це захворювання, при яких ферментативні порушення виникають вторинно. Вони розвиваються внаслідок ушкодження тканин різними агентами (вірусами, бактеріями, найпростішими, отрутами тощо). При цьому етіологічний чинник порушує (пригнічує або стимулює) діяльність

однієї або декількох ферментативних систем, що спричинює порушення відповідних обмінних процесів, у результаті чого виникає захворювання з характерними для нього симптомами. Так, інфекційні хвороби (вірусні, бактеріальні, паразитарні) супроводжуються тяжкими розладами функцій ферментативних систем, насамперед, у результаті дії на них екзо- й ендотоксинів мікроорганізмів, які блокують синтез низки важливих ферментів або гальмують їх активність.

Прикладом вторинних ферментопатій є ендокринні захворювання. Гіпо- або гіперфункція певної ендокринної залози пов'язана зі зниженням або підвищенням синтезу відповідних гормонів, отже, з порушенням роботи ферментативних систем, які ними регулюються. Так, при цукровому діабеті дефіцит інсуліну викликає пригнічення або стимулювання активності низки ферментів: блокується активність ферментів, які забезпечують окиснення глюкози й активуються ферменти глюконеогенезу, ліполізу, метаболізму білків тощо.

Гіпо- й авітамінози, нестача незамінних амінокислот, есенціальних жирних кислот, макро- та мікроелементів у харчовому раціоні викликають порушення синтезу великої кількості ферментів, сприяючи тим самим розвитку езімопатій.

Таким чином, ензімопатії лежать в основі всіх патологій людини. Тому важко уявити захворювання, яке б не супроводжувалося ферментними порушеннями.

### ***Ензимодіагностика патологічних процесів***

Для ранньої діагностики низки захворювань дослідження активності тих чи інших ферментів є значно інформативнішим порівняно з іншими біохімічними тестами. Так, для диференційного діагнозу різних за генезом жовтяниць визначають кілька органоспецифічних ферментів (або ізоферментів) печінки, наприклад, фруктозомонофосфатальдолазу, сорбітолдегідрогеназу, для оцінки переходу гострого гепатиту в хронічний

використовують АЛАТ, АсАТ, аденозіндезаміназу, 5-нуклеотидазу тощо. Прикладом може бути використання креатинфосфокінази, аспартатамінотрансферази та лактатдегідрогенази для диференціації інфаркту міокарда й стенокардії. При захворюваннях нирок і сечовидільної системи важливе діагностичне значення має визначення активності сироваткової гліцинамідинотрансферази, ферментів сечі – лейцинамінопептидази,  $\beta$ -глюкуронідази, арилсульфатази.

Ферменти досить чітко відображають перебіг захворювання і зарекомендували себе надійними критеріями, які характеризують період хвороби (гострий, хронічний) та її можливе загострення. Нерідко активність ферментів змінюється ще до появи характерних клінічних ознак загострення. Наприклад, підвищення активності аланінамінотрансферази передують збільшенню вмісту білірубіну, погіршенню самопочуття хворого. Це допомагає своєчасно розпізнати ускладнення і змінити терапевтичну тактику.

Ферменти успішно використовують у клінічній практиці для оцінки прогнозування перебігу захворювання та ефективності лікування. Відсутність зміни активності ферментів на тлі використання лікарських та інших методів лікування свідчить про малу їх ефективність. Так, визначення активності амінотрансфераз в сироватці крові значно достовірніше відображає ступінь репаративних процесів у печінці при гепатиті порівняно з вмістом білірубіну.

Перспективним для ензимодіагностики є дослідження ізоферментів. Відомо, що при пошкодженні тканин ізоферменти надходять у кров та інші біологічні рідини й їх ізоферментний спектр стає близьким до тканинного, що лежить в основі використання ізоферментів у діагностиці. Ізоферментативні спектри широко використовують для діагностики різних видів патології, наприклад, ізоформи креатинфосфокінази (ВМ) та лактатдегідрогенази (ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub>) є важливими діагностичними критеріями для встановлення діагнозу інфаркту міокарда.

**Ензимотерапія**– використання ферментів як лікарських засобів – проводиться переважно в разі нестачі в організмі якогось фермента чи кофермента (замісна ензимотерапія) або як допоміжний засіб при деяких захворюваннях.

Засоби замісної терапії (панкреатин, фестал, панзинорм, дігестал, креон тощо) застосовують для покращення функціонального стану травного тракту та нормалізації процесів травлення. Вони також показані особам із нормальною функцією травного тракту у випадку порушення правильного харчування (споживання жирної їжі, великої кількості їжі, нерегулярного харчування), при порушенні жувальної функції, малорухомому способі життя, тривалій іммобілізації, підготовці до рентгенологічного чи ультразвукового дослідження органів черевної порожнини.

Фермент підшлункової залози трипсин застосовують у хірургічній практиці зовнішньо для очищення гнійних ран і внутрішньом'язово як протизапальний засіб при остеомієлітах і гаймориті. Фібринолізин рекомендується для розсмоктування тромбів судин, цитохром С застосовують при отруєнні чадним газом і деякими іншими отруйними речовинами, які сповільнюють процестканинного дихання.

Препарати типу тромбіну використовують для запобігання кровотечі або для її зупинки. Калікреїни (ферменти кінінової системи) використовують для зниження кров'яного тиску.

При лікуванні вірусного кон'юнктивіту успішно застосовуються очні краплі, що містять ДНКазу (фермент руйнує ДНК віруса).

Для лікування деяких форм лейкозу використовують аспарагіназу, лікувальний ефект якої базується на тому, що зазначений фермент розщеплює аспарагін на аміак і аспарагінову кислоту, внаслідок чого синтез білків у лейкозних клітинах припиняється і клітини пухлини гинуть.

### ***Ферменти як аналітичні реагенти***

Ферменти, які застосовують для діагностики, отримують із різних джерел: рослин, тварин, мікроорганізмів (здебільшого бактерій). Їх широко використовують у клінічних лабораторіях як аналітичні реагенти для визначення кількості субстрату, ідентифікації медпрепаратів, визначення активності інших ферментів. Ці можливості пов'язані з каталітичними властивостями ферментів і високою специфічністю до субстратів каталізованих ними реакцій. Методи, що базуються на використанні ензимів, застосовують для визначення глюкози, сечовини, сечової кислоти, холестеролу тощо. Превагою цих методів є те, що відповідний субстрат для його визначення не потребує попереднього виділення та очищення і може бути ідентифікований у сироватці крові або іншій біологічній рідині.

### **Автоліз тканин і його значення для заготівлі лікарської сировини**

Автоліз (auto – сам і lysis – розкладати, розпад, грец) – самознищення живих клітин і тканин під впливом власних гідролітичних ферментів, які руйнують структурні молекули клітини, гідролізуючи білки, вуглеводи, ліпіди та нуклеїнові кислоти. Ці ферменти знаходяться в лізосомах і належать до класу гідролаз (катепсини, кисла рибонуклеаза, фосфоліпаза тощо). За умов норми процеси автолізу супроводжують низку явищ, які лежать в основі розвитку організму та диференціювання клітин. Автоліз також супроводжує такі фізіологічні процеси як інволюція матки після пологів чи молочних залоз після припинення секреції молока; цей процес відбувається також при запальних і імунологічних реакціях, у вогнищах омертвіння, у клітинах новоутворень. Під час поділу клітин автолізу підлягають окремі ділянки цитоплазматичних мембран.

Автоліз лежить в основі технологічних процесів під час заготівлі лікарської сировини. Так, для отримання препарату алое листя цієї рослини поміщають у темне місце при температурі 7-8 °С, що сприяє накопиченню в

них продуктів автолізу (амінів, органічних кислот, азотистих основ), які, будучи біогенними стимуляторами, посилюють низку ланок обміну речовин і пришвидшують регенеративні процеси.

Сировину тваринного походження піддають кислотному, лужному, ферментативному та гідротермічному гідролізу, після чого гідролізати набувають вигляду в'язких, гомогенних розчинів, при висушуванні яких утворюються плівки, які легко перетворюють на порошок. Так, білоквмісні відходи м'ясопереробної промисловості, основними структурними та хімічними компонентами яких є унікальні за своїми властивостями фібрилярні білки (колаген і еластин), що беруть участь у процесах ембріогенезу, морфогенезу, цитодиференціювання, регенерації, імунних реакціях теж можна розглядати як цінну сировину для виготовлення різноманітних засобів фармацевтичного, косметичного та біотехнологічного призначення. Використовуючи фібрилярні білки в якості біологічно активних матриць у поєднанні їх з лікарськими засобами спрямованої дії, створені ефективні та стабільні форми препаратів і біоматеріалів – антистресові препарати та комплекси вітамінів пролонгованої дії; колагенові плівки, які містять мотиваційні сироватки, гіалурнову кислоту, антибіотики; гемостатичні мазі, розчини для ін'єкцій, які містять цитостатики різної хімічної природи, іммобілізовані на колагені; колагеновий біоматеріал, сорбент для афінної хроматографії; косметичні засоби по догляду за шкірою обличчя та волоссям.

### **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.: Выцашк. 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 \_\_\_\_\_ 2015года)

Копирование и тиражирование только  
по письменному согласию ЗГМУ