

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

**ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ
ФЕРМЕНТІВ В БІОЛОГІЧНИХ
СЕРЕДОВИЩАХ. ОДИНИЦІ
АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ.
ЕНЗИМОПАТІЇ. МЕДИЧНА
ЕНЗИМОЛОГІЯ**

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

Запоріжжя, 2015

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

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

**ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ
ФЕРМЕНТІВ В БІОЛОГІЧНИХ
СЕРЕДОВИЩАХ. ОДИНИЦІ
АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ.
ЕНЗИМОПАТІЇ. МЕДИЧНА
ЕНЗИМОЛОГІЯ.**

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

Запоріжжя, 2015

УДК 577.112.8(075)

ББК 28.072 я 73

В 42

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

Автори:

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

Рецензенти:

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

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

Визначення активності ферментів в біологічних середовищах.

Одиниці активності ферментів. Ензимопатії. Медична ензимологія : методичний посібник з дисципліни «Біологічна хімія» для викладачів / К. В. Александрова, О. С. Шкода, Д. А. Васильєв [та ін.]. – Запоріжжя : [ЗДМУ], 2015. – 45 с.

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

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

УДК 577.112.8(075)

ББК 28.072 я 73

Запорізький державний медичний університет

Александрова К. В., Шкода О. С., Васильєв Д. А., Юрченко Д. М., Левіч С. В., 2015.

ЗМІСТ

1	АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ.....	5
2	НАВЧАЛЬНІ ЦІЛІ ЗАНЯТТЯ.....	6
3	ВИХОВНІ ЦІЛІ.....	7
4	БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ.....	8
5	ЗМІСТ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ.....	9
6	ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ.....	10
7	АЛГОРИТМ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ.....	12
8	КОНТРОЛЬ ЗАКЛЮЧНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ З ТЕМИ.....	15
9	ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ.....	17
10	ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК-1»	20
11	ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ.....	25
	ФЕРМЕНТИ: БУДОВА, ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, КЛАСИФІКАЦІЯ, МЕХАНІЗМ ДІЇ.....	25
	Визначення поняття «ферменти».....	25
	Хімічна природа ферментів.....	26
	Подібність і відмінність між ферментами та небілковими каталізаторами.....	29
	Специфічні властивості ферментів.....	30
	Номенклатура та класифікація.....	31
	ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПІДГОТОВКИ СТУДЕНТІВ	46
	РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	47

1. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ

Ферменти як біокаталізатори, які містяться в усіх тканинах, клітинах і біологічних рідинах, забезпечують перебіг хімічних реакцій у живих організмах. Їм також належить провідна роль і в метаболізмі ліків. Сучасна біохімія характеризується широким застосуванням методів визначення активності ферментів в біологічних рідинах і тканинах. 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 №6

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

Необхідно знати:

1. Принципи визначення активності ферментів в біологічних середовищах. Одиниці активності ферментів.
2. Основні напрямки досліджень медичної ензимології:
3. розробка методів діагностики захворювань з використанням ферментів як реагентів (глюкозооксидазний метод визначення глюкози в плазмі крові);
4. розробка методів діагностики захворювань по зміні активності ферментів (приклад);
5. використання ферментів і їх інгібіторів як фармацевтичних препаратів (приклад).
6. Загальне поняття про ензимопатії та причини їх виникнення (приклад).

Необхідно вміти:

1. Визначати активність амілази (діастази) сечі за методом Вольгельмута.
2. Визначати активність холінестерази в сироватці крові.

3. 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.

4. БАЗОВИЙ РІВЕНЬ ПІДГОТОВКИ. МІЖПРЕДМЕТНА ІНТЕГРАЦІЯ

Дисципліни	Отримані навички
Попередні: Органічна хімія	Класифікація органічних сполук. Поняття функціональні групи, ізомерія, основні принципи каталізу, ковалентний та кислотно-лужний каталіз.
Неорганічна хімія	Типи хімічної реакції. Поняття каталізатори, каталіз.
Нормальна фізіологія	Поняття про травну, метаболічну, захисну та інші функції ферментів.
Фізична та колоїдна хімія	Поняття про структуру фермента та термодинамічні характеристики
Наступні 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.

5. ЗМІСТ НАВЧАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ

1. Принципи
визначення активності ферментів в біологічних середовищах.
Одиниці виміру загальної активності ферментів.
2. Основні напрями досліджень медичної ензимології:
 - ензімопатологія;
 - ензимодіагностика;
 - ензімотерапія.

6. ПЛАН І ОРГАНІЗАЦІЙНА СТРУКТУРА ЗАНЯТТЯ

Етапи	Час у хв	Навчальні матеріали		Місце проведення
		Засоби навчання	Обладнання	
1. Організаційний момент	5	Перевірити присутніх, провести співбесіду щодо організації навчальної роботи на кафедрі (структуру занять, правила поведінки, порядок відробок заборгованостей, порядок проведення підсумкових занять тощо), провести екскурсію по кафедрі.		Навчальна кімната
2. Співбесіда з питань про структуру, властивості, класифікацію ферментів	15	Провести пояснення важливих термінів: катал, міжнародна одиниця активності ферментів, ензимопатології		Навчальна кімната
Фізіологічна перерва	10			
<p>Поділити навчальну групу на 3 бригади: №№ 1, 2. Зміст практичної роботи для кожної бригади:</p> <p>№ 1: Визначення активності амілази сечі за методом Вольгемута (одна робота).</p> <p>№ 2: Визначення активності холінестерази сироватки крові (одна робота).</p>				
3. Початок роботи студентів згідно тем лабораторних робіт	15	Протоколи для лабораторних робіт	Обладнання та реагенти до лабораторних робіт, протоколи для лабораторних робіт	Навчальна кімната
4. Проведення письмової контрольної роботи	20	Початок часу інкубації є початком письмової роботи.	Картки з завданнями, зошити для контрольних робіт	Навчальна кімната
5. Продовження виконання практичної частини заняття	10	Студенти мають час закінчити проведення експериментів.	Протоколи для лабораторних робіт	Навчальна кімната
6. Оформлення результатів лабораторних робіт	10 хв		Підручник, Практикуми	Кімната для навчання
7. Заключна	15	Перевірка та підпис	Список	Кімната для

співбесіда згідно результатів усіх типів робіт студентів на протязі заняття	хв	протоколів лабораторних робіт, аналіз успішності студентів на занятті, інформування студентів про тему наступного заняття, видання завдань для самостійної роботи	літератури у допомогу для ліквідації недоліків у вивчанні теми	навчання
---	----	---	--	----------

7. АЛГОРИТМ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

1. Визначення активності амілази (діастази) сечі за методом Вольгемута

Принцип методу:

Метод Вольгемута заснований на виявленні мінімальної кількості ферменту, здатного повністю розщепити 2 мг крохмалю за 15 хв. Цю кількість ферменту приймають за одиницю амілазної активності.

Хід роботи:

У вісім пробірок вносять по 1 мл 0,85% розчину натрій хлориду. В першу пробірку додають 1 мл досліджуваної сечі і ретельно перемішують. Далі 1 мл суміші переносять в другу пробірку, з неї таким же чином – в третю і т.д. З восьмої пробірки 1 мл рідини виливають. Таким чином готуються розведення сечі, представлені в таблиці. У всі пробірки додають по 2 мл 0,1% розчину крохмалю, перемішують і ставлять в термостат при 38°C на 30 хвилин. Після закінчення часу інкубації пробірки виймають, охолоджують і додають в кожен по 2 краплі 0,1% розчину йоду в 0,2% розчині калій йодиду. Вміст пробірок перемішують і вибирають для розрахунку розведення останньої пробірки з розчином жовтого кольору після проведення йод-ної проби (де відбулося повне розщеплення крохмалю).

Результати

Показник	№ пробірки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Розведення сечі	2	4	8	16	32	64	128	256
1мл 0,85% розчину NaCl								
2 мл 0,1% розчину крохмалю								
Забарвлення йодної проби								

заносять в таблицю.

Розрахунок

проводиться по формулі:

$X \text{ (од)} = 1 * 2^* \text{ розведення}$

де :

X – активність

амілази слини в умовних одиницях (од).

1 – кількість сечі в мл; 2 – кількість 0,1% розчину крохмалю, в мл;

Результат:

ДОДАТОК

Клініко-діагностичне значення визначення активності амілази (діастази) сечі пза методом Вольгемута:

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 і підшлункову залозу.

2. Визначення активності холінестерази в сироватці крові

Принцип методу:

Під дією 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.

Хід роботи:

Перед роботою буферно-індикаторний і фізіологічний розчини витримують у термостаті при 37°C протягом 10 хвилин.

Паралельно готують дві проби 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 (10 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 по калібрувальному графіку активності холінестерази в сироватці крові.

ДОДАТОК

Клініко-діагностичне значення визначення холінестерази (ХЕ) в сироватці крові:

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 жовтяничного періоду. При загостренні захворювання падіння активності ХЕ випереджає білірубіновий пік, граючи роль передвісника загострення. Динаміка зміни активності сироваткової ХЕ в процесі хвороби може мати прогностичне значення.

8. КОНТРОЛЬ ЗАКЛЮЧНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ З ТЕМИ

Вариант 1

1. Произошло изменение концентрации субстрата с 5 ммоль/л до 1 ммоль/л в течение 5 минут ферментативной реакции. Определите общую активность фермента в международных единицах активности.
2. Какова цель определения активности амилазы в моче пациентов? Назовите нормальное значение активности этого фермента в моче.

Вариант 2

1. Произошло увеличение концентрации продукта с 0 ммоль/л до 6 ммоль/л в течение единицах Кат/л.
2. Активность холинэстеразы в плазме крови пациента 50 мкмоль/с·л. Является ли это значение активности нормальным или вы можете предложить вероятный диагноз для пациента? Превратите значение активности фермента единицы Кат/л.

Вариант 3

1. Произошло снижение концентрации субстрата со значения 12 ммоль/л до 6 ммоль/л в течение 1 минуты ферментативной реакции. Определите общую активность фермента в Кат/л.
2. В плазме крови пациента наблюдается снижение активности холинэстеразы до 20 мкмоль/с·л. Предложите вероятный диагноз для пациента, превратите значение активности фермента в единицы Кат/л.

Вариант 4

1. Произошло снижение концентрации субстрата со значения 6 ммоль/л до 0 ммоль/л за 5 минут течения ферментативной реакции. Определите общую активность фермента в Кат/л.
2. Почему активность амилазы мочи определяется в относительных единицах активности, и нет возможности использовать единицы СИ?

9. ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

1. 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

2. Укажіть метод досліджень, який використовується для виділення ферментативних систем окремих субклітинних фракцій з гомогенату тканини:

- A. Діаліз
- B. Ізоелектричне фокусування
- C. Диференційне центрифугування
- D. Якісний аналіз
- E. Рентгеноструктурний аналіз

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

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

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

- A. Концентрації ізоформ ЛДГ₁ і ЛДГ₂ плазми крові
- B. Активності холінестерази плазми крові
- C. Активності амілази сечі
- D. Концентрації ізоформи ЛДГ₃ плазми крові

Е. Активності кислої фосфатази

5. Укажіть клас ферменту, який каталізує тип хімічної реакції:



А. Ліази

В. Лігази

С. Оксидоредуктази

Д. Трансферази

Е. Гідролази

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

А. ЛДГ₁ і ЛДГ₂

В. ЛДГ₃, ЛДГ₄

С. Тільки ЛДГ₃

Д. ЛДГ₄ і ЛДГ₅

Е. Тільки ЛДГ₅

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

А. Пепсин

В. Трипсин

С. Амілаза

Д. Кисла фосфатаза

Е. Лужна фосфатаза

8. Укажіть фермент, активність якого стійко знижується при хворобі Боткіна:

А. Пепсин

В. Холінестераза

С. Амілаза

Д. Кисла фосфатаза

Е. Лужна фосфатаза

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

- A. Ізоформа ЛДГ₁
- B. Трипсин
- C. Хімотрипсин
- D. Холінестераза
- E. Калікреїн

10. Укажіть патологію, при якій значення активності амілази сечі зростає в десять і більш разів:

- A. Вірусний гепатит
- B. Гострий панкреатит
- C. Хронічний холецистит
- D. Інфаркт міокарду
- E. Цукровий діабет

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

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

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

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

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

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

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

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

- A. Білки
- B. Вищі жирні кислоти

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

5. Фермент уреаза здатний руйнувати тільки структуру сечовини.

Укажіть його тип специфічності.

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

E. М'язах

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ ЗАНЯТТЯ

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 1 хв 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, $1 \text{ кат} = 60 \times 10^6$ 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 α -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, плазмі або клітинах 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 *колориметричних* методів лежить вимірювання за допомогою фотоелектроколориметра 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-динітрофенілгідрaziном 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^+ - та НАДФ^+ -залежних дегідрогеназ. Перехід НАД^+ або

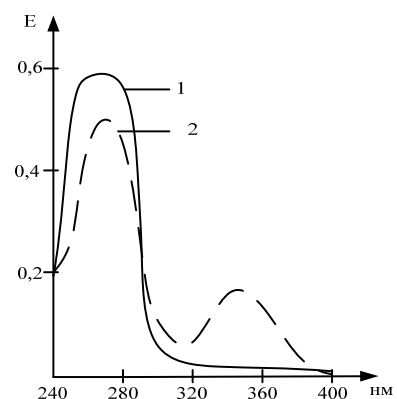


Рис. 18. Абсорбційні спектральні криві для окиснених НАД^+ (або НАДФ^+) (1) та відновлених НАДН (або НАДФН) (2) нікотинамідних коферментів

НАДФ⁺ 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.

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⁺ (або НАДФ⁺) 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 вибіркочну 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

Цитозоль	Мітохондрії	Лізосоми
Ферменти гліколізу	Піруватдегідрогеназний комплекс	Кисла фосфатаза
Ферменти пентозофосфатного циклу	Цитратсинтетаза	β -Глюкуронідаза
Ферменти активації амінокислот	Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна)	α -Глюкозидаза
Мультиферментний комплекс синтезу жирних кислот	Малатдегідрогеназа та інші	β -Глюкозидаза
Ферменти катаболізму пуринових і		Катепсини
		Кисла

піримідинових основ Пептидази Амінотрансферази Малатдегідрогеназа Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна) Глікогенфосфорилаза Глікогенсинтетаза	ферменти циклу Кребса Ацил-КоА-дегідрогеназа та інші ферменти окиснення жирних кислот Ферменти дихального ланцюга та окиснювального фосфорилювання	рибонуклеаза α-Галактозидаза Лізоцим Гіалуронідаза Арилсульфатаза Колагеназа
<i>Мікросомна фракція</i>	<i>Плазматична мембрана</i>	<i>Ядро</i>
НАДН- і НАДФН- цитохром С редуктази, цитохром P ₄₅₀ - і цитохром b ₅ -оксидази, глюкозо-6-фосфатази, естерази, нуклеозиддифосфатази, глюкуронілтрансферази, фосфогліцерид- і тріацилгліцеридсинтетази, β- глюкуронідази Глюкозо-6-фосфатаза Рибосомні ферменти синтезу білка Ферменти, які беруть участь у реакціях гідроксилювання Ферменти синтезу фосфоліпідів, тригліцеридів, а також деякі ферменти синтезу холестерину	Аденілатциклаза Лужна фосфатаза Na ⁺ -K ⁺ -залежна АТФаза	Ферменти, які беруть участь у процесі реплікації ДНК РНК-полімераза НАД-синтетаза
<i>Ендоплазматичний ретикулум</i>	<i>Комплекс Гольджі</i>	
Глюкозо-6-фосфатаза	Галактозилтрансфераза	

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: $ЛДГ_1 = H_4$; $ЛДГ_2 = M_1H_3$; $ЛДГ_3 = M_2H_2$; $ЛДГ_4 = M_3H_1$; $ЛДГ_5 = M_4$.

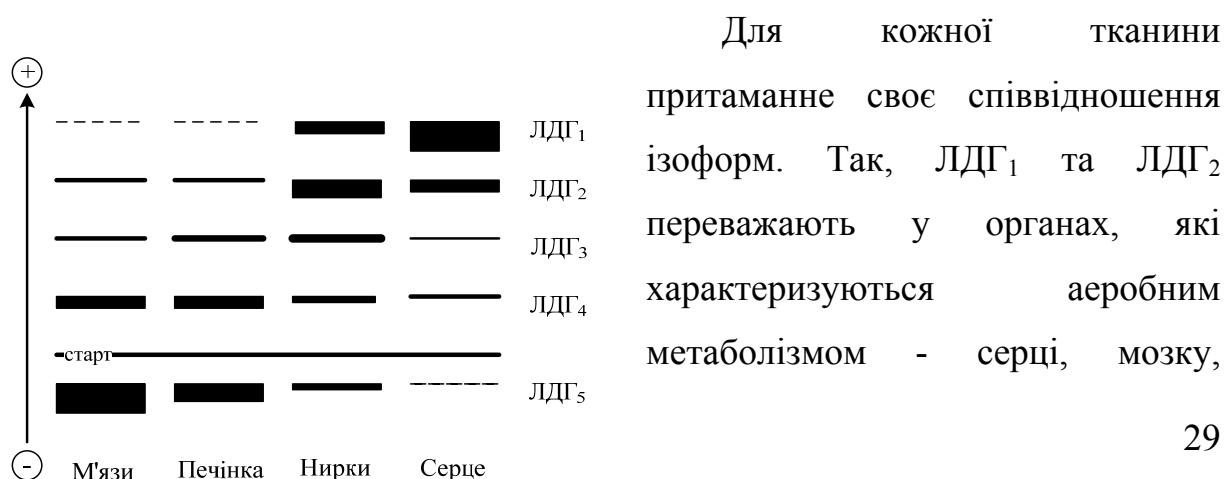
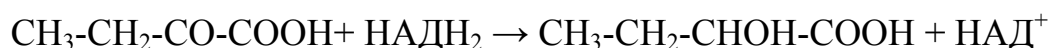


Рис. 19. Електрофореграма множинних форм ЛДГ

нирках, підшлунковій залозі та еритроцитах; ЛДГ₃ – у легенях, селезінці, лімфатичних вузлах; ЛДГ₄ та ЛДГ₅ – 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 α-кето- та α-гідроксимасяної кислоти в реакції:



Це дозволяє відрізнити ізоферменти, які складаються, основним чином, з субодиниць „Н” (ЛДГ₁, ЛДГ₂) від ізофермента, побудованого з „М”-субодиниць (ЛДГ₅) на підставі дослідження їх активності в реакції, яка визначається як реакція дегідрогенази α-гідроксимасяної кислоти та відбувається за участі ЛДГ₁.

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: ЛДГ₂ > ЛДГ₁ > ЛДГ₃ > ЛДГ₄ > ЛДГ₅. При інфаркті міокарда ЛДГ₁ > ЛДГ₂ > ЛДГ₃ > ЛДГ₄ > ЛДГ₅ - помітна характерна зміна „розташування” ЛДГ₁ та ЛДГ₂: активність ЛДГ₁ переважає над активністю ЛДГ₂. При гемолітичній анемії ЛДГ₂ + ЛДГ₁ > ЛДГ₃ + ЛДГ₄ + ЛДГ₅, 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: ЛДГ₄ = ЛДГ₅ > ЛДГ₂ > ЛДГ₁ > ЛДГ₃.

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, три ізоферменти 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 іммобілізацією 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: α -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, аденозиндезаміназу, 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, β -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 аланінаміноотрансферази 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 аміноотрансфераз 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 (ЛДГ₁, ЛДГ₂) 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 процес тканинного 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. Наведіть приклади застосування ферментів у медицині.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Базова

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

Допоміжна

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

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

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

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

Копирование и тиражирование только по письменному согласию ЗГМУ