



Біологічна хімія

*Навчально-методичний посібник для самоїїної
позааудиторної підготовки до занять*

**Змістовий модуль 1: Вступ до біохімії. Прості та складні білки.
Ферменти**

Спеціальності: 7.12020101 «Фармація»
7.12020104 «Технології парфумерно-косметичних
засобів»

Запоріжжя
2016

Затверджено на засіданні
Центральної методичної Ради ЗДМУ
протокол № 4 від « 2 » червня 2016 р.

Біологічна хімія

*Навчально-методичний посібник для самостійної
позааудиторної підготовки до занять*

Змістовий модуль 1: Вступ до біохімії. Прості та складні білки.
Ферменти

зі спеціальності: 7.12020101 «Фармація»
7.12020104 «Технології парфумерно-косметичних
засобів»

Запоріжжя
2016

Біологічна хімія. Навчально-методичний посібник для самостійної аудиторної та позааудиторної підготовки до занять студентів III курсу фармацевтичного факультету спеціальності 7.12020101 "Фармація" та 7.12020104 «ТПКЗ». Змістовий модуль 1. Вступ до біохімії. Прості та складні білки. Ферменти склали:

- © Александрова К.В. – д.х.н., професор
- © Шкода О.С. – к.фарм.н., доцент
- © Макоїд О.Б. – к.б.н., доцент
- © Сінченко Д.М. – к.фарм.н., асистент
- © Левіч С.В. – к.фарм.н., асистент
- © Васильєв Д.А. – к.фарм.н., асистент

Під загальною редакцією завідувача кафедри біологічної хімії д.х.н. **професора Александрової К.В.**

Рецензенти:

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

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

ПЕРЕДМОВА

Навчально-методичний посібник, що пропонується є необхідним додатковим методичним матеріалом для вивчення дисципліни «Біологічна хімія» студентами III курсу фармацевтичного факультету спеціальностей «Фармація» та «ТПКЗ». У зв'язку з введенням нових Стандартів вищої освіти, зміною навчальних планів та частковим перерозподілом початкових годин, які відводяться на аудиторну та самостійну роботи студентів виникає потреба в навчально-методичних посібниках, які б дали змогу студенту позааудиторно опрацювати теоретичний матеріал, згідно питань до заняття, перевірити себе за блоком тестів, який пропонується для самоконтролю домашньої підготовки. У ході позааудиторної самостійної роботи студент повинен ознайомитись з тестовими питаннями для складання Ліцензійного інтегрованого іспиту «Крок 1. Фармація». У навчально-методичному посібнику також міститься необхідна інформація (перелік питань для підготовки до складання змістового модулю 1.)

ЗАНЯТТЯ № 1

- 1. ТЕМА: Введення в біохімію. Біохімічні компоненти клітини. Особливості роботи в біохімічній лабораторії. Інструктаж з техніки безпеки. Контроль вихідного рівня знань.**
- 2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ:** Біохімія – наука, яка займається вивченням молекул, хімічних реакцій та процесів, що протікають в живих клітинах і організмах. Знання біохімії необхідне для успішного засвоєння двох головних напрямків біомедичних наук: 1) рішення проблем збереження здоров'я людини; 2) з'ясування причин різних захворювань та розробку шляхів їх ефективного лікування.
- 3. МЕТА ЗАНЯТТЯ:** Вивчити етапи становлення біохімії як фундаментальної медико-біологічної науки та визначити роль біохімічних досліджень функціонального стану організму людини в нормі і при патології.
- 4. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.**

4.1. ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ВИХІДНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ

1. Загальні поняття органічної хімії:
 - 1.1. Полярність, гідрофобність і гідрофільність органічних молекул.
 - 1.2. Кислотні, основні і амфотерні властивості органічних молекул.
2. Характерні особливості структури спиртів, альдегідів, кетонів, карбонових кислот і амінів.
3. Структура окремих представників класів органічних речовин: етанол, гліцерол; оцтова, янтарна, фумарова, пальмітинова, олеїнова; піровиноградна, щавлевооцтова, 2-оксоглутарова, молочна, яблучна кислоти; оцтовий альдегід, ацетон, етаноламін і холін.
4. Механізм утворення естерів на прикладі триацилгліцеролів і ацетилхоліну, їх біологічна роль.
5. Загальні уявлення про ліпіди і їх класифікацію. Біологічна роль різних класів ліпідів.
6. Особливості структури і біологічної ролі моносахаридів (глюкоза, фруктоза, галактоза, рибоза), полісахаридів (крохмаль, глікоген, целюлоза).
7. Класифікації та властивості α -амінокислот. Структура окремих представників (гліцин, аланін, цистеїн, серин, глютамінова кислота, лізин, фенілаланін, триптофан, метіонін).
8. Білки: механізм утворення пептидного зв'язку, рівні структурної організації, біологічна роль.
9. Нуклеїнові кислоти, нуклеозиди, нуклеотиди: особливості структури і складу. Біологічна роль.

4.2. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Біологічна хімія як наука. Предмет, завдання, основні етапи і сучасні напрямки розвитку біохімії.
2. Мета і методи проведення біохімічних досліджень, їх клініко-діагностичне значення.

- Зв'язок біохімії з іншими біомедичними науками. Клінічна біохімія. Біохімічна лабораторна діагностика.
- Світова історія біохімії та розвиток біохімічних досліджень в Україні.

5. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ ДО ЗАНЯТТЯ

Амінокислоти – це похідні карбонових кислот, в яких один або кілька атомів Гідрогену у вуглеводному радикалі замінені на аміногрупу (NH₂).

Загальна формула амінокислот:

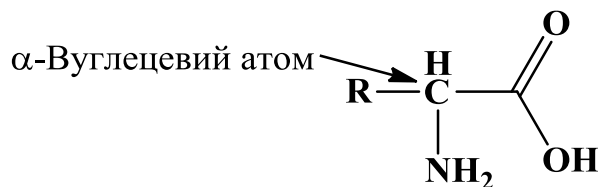


Рис. 1. Структура амінокислот

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

Класифікація, номенклатура та ізомерія амінокислот

Сьогодні існує кілька класифікацій амінокислот:

- За будовою вуглецевого ланцюга.
- За біохімічною роллю (здатність до синтезу в організмі).
- За хімічною природою продуктів, які утворюють із амінокислот.
- За полярністю радикалів.

За будовою вуглецевого ланцюга амінокислоти діляться на дві групи:

- Ациклічні, аліфатичні (або амінокислоти жирного ряду).
- Циклічні амінокислоти.

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

- Моноамінокарбоніві*: C₂-гліцин; C₃-аланін, серин, цистеїн; C₄-треонін; C₅-валін, метіонін; C₆-лейцин, ізолейцин.
- Моноамінодикарбоніві*: C₄-аспаргінова кислота; C₅-глутамінова кислота.
- Діаміномонокарбоніві*: C₅-аргінін; C₆-лізин.
- Діамінодикарбоніві*: цистин.

Група циклічних амінокислот ділиться на дві підгрупи:

- Карбоциклічні (ароматичні) амінокислоти – їхній цикл складається з атомів Карбону: фенілаланін, тирозин;

- Гетероциклічні амінокислоти: триптофан, гістидин, пролін, оксипролін. До складу їхніх циклів, окрім атомів Карбону, входять інші атоми (гетероатоми), найчастіше Нітрогену.

За біохімічною роллю амінокислоти поділяють на замінні та незамінні.

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

Замінні амінокислоти можуть синтезуватися в організмі з інших сполук.

За хімічною природою продуктів, які утворюються з амінокислот в процесі їх обміну, амінокислоти діляться на глікогенні, кетогенні та змішані. *Глікогенні амінокислоти*, вуглецевий скелет яких при розщепленні перетворюється на піруват, α -кетоглутарат, сукциніл-КоА, фумарат або оксалоацетат, - попередники глюкози. *Кетогенні амінокислоти*, вуглецевий скелет який при розщепленні перетворюється на ацетил-КоА та ацетоацетат, потім перетворюються на жирні кислоти й кетонові тіла (табл. 1.)

Таблиця 1

Класифікація амінокислот

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

За полярністю радикалів амінокислоти поділяють за таким чином:

- Позитивно заряджені R-групи: L-Лізин, L-Гістидин, L-Аргінін.
- Ароматичні R-групи: L-Фенілаланін, L-Тирозин, L-Триптофан.
- Полярні незаряджені R-групи: L-Серин, L-Цистеїн, L-Глутамін, L-Треонін, L-Метіонін, L-Аспаргін.
- Негативно заряджені R-групи: L-Аспаргінова кислота, L-Глутамінова кислота.

- Неполарні R-групи: L- α -Аланін, L-Валін, L-Лейцин, L-Гліцин, L-Пролін, L-Ізолейцин.

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

Ізомерія амінокислот.

Для амінокислот характерні структурна і просторова ізомерія. Структурна ізомерія зумовлена будовою вуглецевого ланцюга і положенням аміногрупи в радикалі. Оптична ізомерія пов'язана з тим, що в усіх амінокислотах є хоральний атом Карбону, зв'язаний з чотирма різними замісниками (рис. 2).

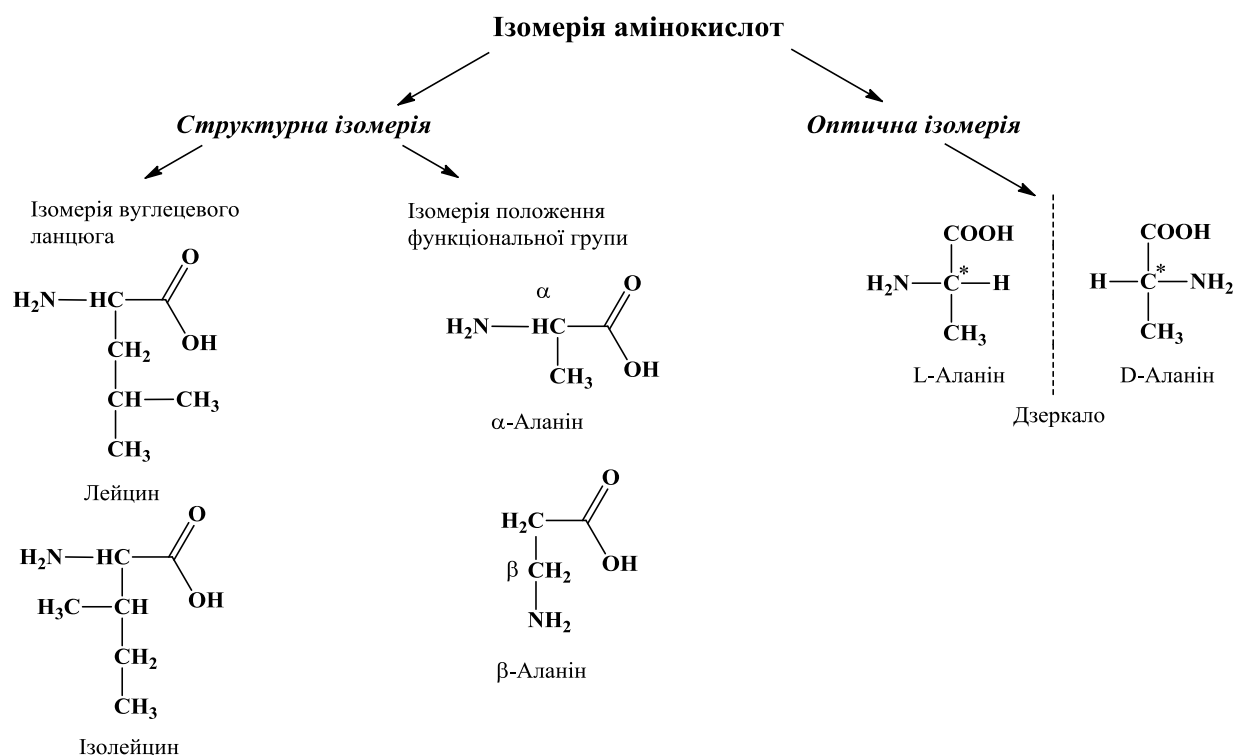


Рис. 2. Ізомерія амінокислот

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

Майже всі природні α -амінокислоти, на відміну від вуглеводів, належать до L-ряду. α -Амінокислоти D-ряду іноді називають «неприродними», тому вони не беруть участі у біосинтезі білків у організмі людини і тварин.

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

Якісні реакції на виявлення α -амінокислот

1. **Ксантопротеїнова реакція** на виявлення ароматичних та гетероциклічних α -амінокислот (фенілаланін, тирозин, гістидин, триптофан). Під дією концентрованої азотної кислоти відбувається нітрування бензольного ядра з утворенням нітросполук жовтого кольору.
2. **Нінгідринова реакція** на виявлення α -амінокислот у складі білкових гідролізатів після їх хроматографічного поділу, що використовується в аналізі

первинної структури білків і пептидів. Нінгідрин при нагріванні з α -амінокислотами спричиняє їх декарбоксилювання з утворенням NH_3 , CO_2 та альдегіду – продукту окиснювального декарбоксилювання амінокислоти. У подальшому аміак, що вивільнився, реагує з відновленим нінгідрином, утворюючи комплекс синьо-фіолетового кольору з максимумом поглинання при $\lambda_{\text{max}}=570$ нм.

3. **Реакція Фоля** – проба на сірковмісні амінокислоти (сульфгідрильна проба). При кип'ятінні розчину білка або відповідних амінокислот із лугом у присутності плумбіту натрію утворюється чорно-бурий осад сульфідів свинцю.
4. **Біуретова реакція**. Білки і пептиди, що містять не менше як два пептидних зв'язки, з сульфатом міді в лужному середовищі утворюють сполуки, забарвлені у фіолетовий колір.
5. **Реакція Мілона** – специфічна реакція на тирозин (амінокислоту, що містить фенольний гідроксил). В умовах нагрівання фенолів та їх похідних із реактивом Мілона (суміш нітратів ртуті (I) та (II)) утворюються ртутні похідні цегляно-червоного кольору.
6. **Реакція Сакагучі** – реакція, що застосовується для ідентифікації гуанідинової групи аргініну. При взаємодії гуанідину з α -нафтолом та гіпохлоритом натрію в лужних умовах утворюються сполуки з червоним забарвленням.
7. **Реакція Ерліха** – застосовується для виявлення індольного кільця триптофану, яке при реакції з *n*-диметиламінобензальдегідом у кислому середовищі дає сполуки з фіолетовим забарвленням.

РІВНІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ БІЛКОВОЇ МОЛЕКУЛИ

Розрізняють чотири рівні структурної організації білкової молекули (рис. 3). У табл. 2 наведені узагальнені дані про зв'язки, які стабілізують різні рівні організації білкової молекули. Усі вони взаємопов'язані, й послідовність залишків амінокислот (первинна структура) повністю визначає конформацію білкової молекули. Але прояви біологічної активності білків залежить від вищих рівнів їх структурної організації. З іншого боку, відомо, що навіть незначна зміна первинної структури (заміна одного амінокислотного залишку на інший) приводить до порушень просторової будови до радикальних змін біологічних властивостей білка. Наприклад, зміною первинної структури гемоглобіну зумовлене таке спадкове захворювання, як серповидноклітинна анемія (еритроцити мають форму серпа і втрачають здатність зв'язувати кисень). У хворих на цю недугу в β ланцюгу гемоглобіну (в нормі гемоглобін складається із 2α і 2β поліпептидних ланцюгів), у положенні 6 від N-кінця замість глутамінової кислоти розміщена гідрофобна амінокислота валін. Це проявляється зниженням розчинності гемоглобіну та зменшенням здатності його зв'язувати кисень.

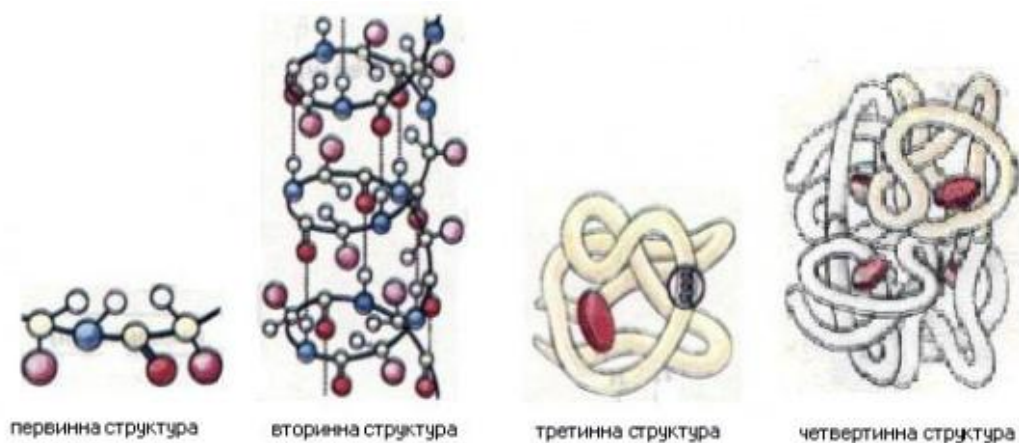


Рис. 3. Структурна організація білкової молекули

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

Таблиця 2

Характеристика зв'язків, які забезпечують структурну організацію білків

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

Первинна структура білка

Первинна структура білка являє собою лінійний ланцюг залишків α -амінокислот, які розташовані у певній послідовності в поліпептидному ланцюзі і з'єднані між собою пептидними зв'язками (рис. 4). Таким чином, під первинною структурою білка розуміють кількість, склад і порядок розташування амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюзі. Кожен білок має специфічну структуру, котра визначається генетичною інформацією. Основу первинної структури складають ковалентні пептидні зв'язки. Кількість різновидів білкових молекул у природі величезна, їхня різноманітність пов'язана з різним набором амінокислот, що входять до складу білка, і порядком їх чергування в поліпептидному ланцюзі.

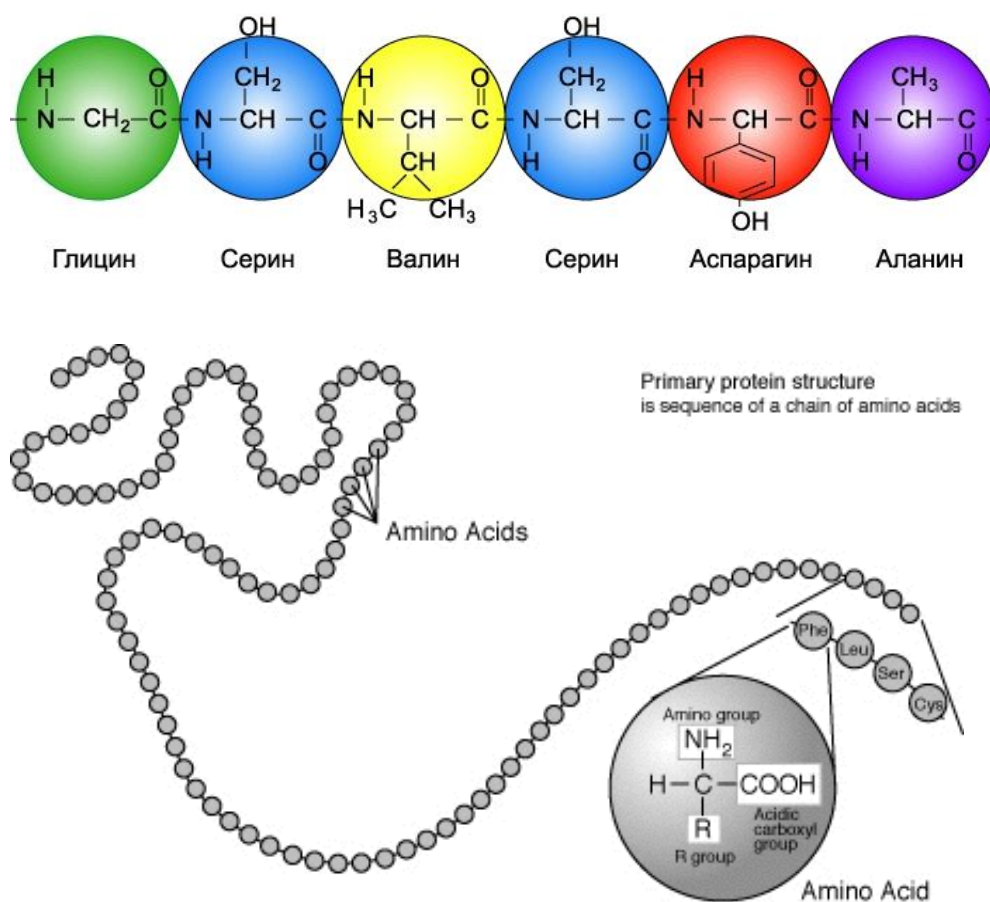


Рис. 4. Первинна структура білку

В організмі людини, за приблизною оцінкою, існує близько 100 тис. різних білків. Кістяк білкової молекули характеризується абсолютною однаковістю будови. При цьому радикали (R) амінокислотних залишків розташовані зовні, по обидва боки поліпептидного ланцюга в трансположенні. Стандартні значення міжатомних відстаней і валентних кутів у ньому представлені на рис. 5.

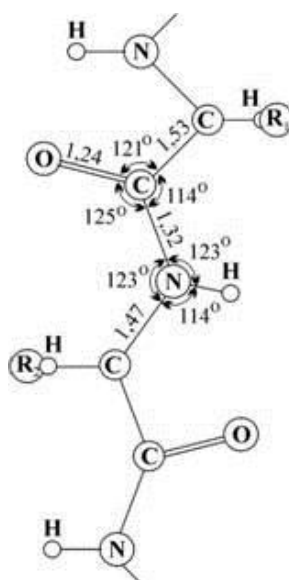


Рис. 5. Валентні кути і міжатомні відстані у витягнутому поліпептидному ланцюзі

На даний час розшифровано амінокислотну послідовність приблизно 2500 білків: гемоглобінів, імуноглобулінів, цитохромів, білківрибосом, великої кількості ферментів (пепсин, хімотрипсин, лізоцим, альдолаза та ін.).

Успішне вивчення первинної структури білків обумовило їх хімічний синтез (наприклад, інсуліну, рибонуклеази та ін.). Таким чином, первинна структура білка (поліпептидний ланцюг) – це загальна структурна формула білків.

Вторинна структура білка

Вторинна структура являє собою впорядковану просторову конформацію поліпептидного ланцюга. Вона утворюється за рахунок водневих зв'язків між пептидними групами в одному поліпептидному ланцюзі або між сусідніми поліпептидними ланцюгами. При цьому конформація може набувати вигляду спіральних і шарувато складчастих структур (рис. 6).

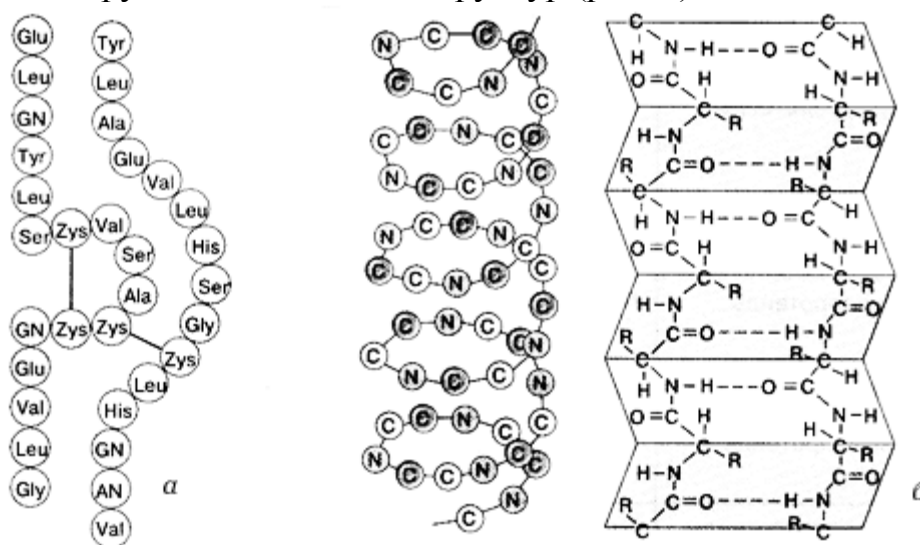


Рис. 6. Первинна (а) та вторинна (б) структура білків.

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

α -Спіраль. Спираючись на дані рентгеноструктурних досліджень пептидів і розрахункові дані, американські вчені Л.Полінг та Р.Корі (1950 р.) встановили, що для пептидів найвигіднішою конформацією є певна спіральозакручена структура, яку вони назвали α -спіраллю. У природних білках виявлено тільки праві α -спіралі. Зовні α -спіраль подібна до злегка розтягнутої спіралі електроплитки (рис. 7).

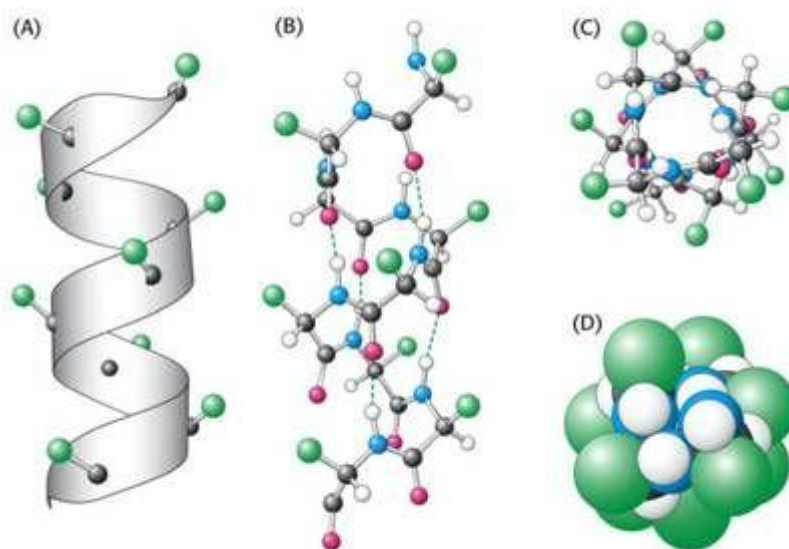


Рис. 7. Приклад α -спіралі: А – схема, В – молекулярна структура, С – вид зверху, D – модель просторової структури.

При формуванні α -спіралі водневі зв'язки утворюються в поліпептидному ланцюзі між кожною карбонільною ($-\text{CO}-$) групою і четвертою за ходом ланцюга – NH -групою. Водневі зв'язки орієнтовані вздовж осі спіралі, з'єднуючи її витки, а бокові радикали залишків амінокислот знаходяться на зовнішньому боці спіральної конформації і розташовані по різні боки від її осі. На кожний виток спіралі припадає 3,6 амінокислотні залишки.

Пептидні ланцюги набувають α -спіральної конформації довільно. Хоча енергія водневих зв'язків, які беруть участь в утворенні α -спіралі, порівняно невелика, значна кількість цих зв'язків забезпечує структурі стабільність, що призводить до виразного енергетичного ефекту, внаслідок чого α -спіральна конформація є досить стійкою і жорсткою. Стабільність структури залежить і від інших факторів, зокрема, від бокових радикалів залишків амінокислот, розташованих у різних ділянках поліпептидного ланцюга. Так, дослідження, проведені з поліпептидами амінокислот, показали, що деякі амінокислоти (аланін, метіонін, лейцин, фенілаланін, тирозин, триптофан, гістидин) сприяють утворенню α -спіралі, інші – гліцин, серин, треонін, лізин, аргінін, аспарагінова і

глутамінова кислоти – її дестабілізують. Залишки імінокислот проліну і гідроксипроліну не вкладаються в просторову спіралізацію α -структур, і вона порушується. Поліпептидний ланцюг на цих ділянках легко вигинається, оскільки не утримується в даному випадку другим водневим зв'язком. Наведені дані можуть бути однією з можливих причин того, що поліпептидний ланцюг у молекулах білка спіралізується неповністю. Ступінь спіралізації поліпептидного ланцюга у різних білків неоднаковий. Повністю спіралізовані поліпептидні ланцюги зустрічаються дуже рідко. Наприклад, α -кератин є повністю α -спіралізованим білком. Білок м'язів параміозин спіралізований на 96–100%, міоглобін і гемоглобін – 75%, альбумін сироватки крові – 50%, альбумін курячого яйця – 45%, лізоцим – 35%, пепсин – 38%, рибонуклеаза – 17%, хімотрипсин – 11%. Крім α -спіралі, у білках виявлено інші типи спіралей, до витків яких входять 3,0 або 4,4 залишки амінокислот. Такі спіралі зустрічаються дуже рідко, в основному на коротких ділянках, утворюючи на кінцях α -спіралі 1-2 витки. Білки зі структурою α -спіралі можуть бути або глобулярними (альбуміни і глобуліни яєчного білка і молока, а також пепсин та ін.), або фібрилярними (міозин, еластин, α -кератин та ін.).

β -Структура. Іншим різновидом вторинної структури білків є β -структура, яка називається також складчастим шаром, або листом. Цей різновид вторинної структури має слабо вигнуту конфігурацію поліпептидного ланцюга. Вона формується за допомогою міжпептидних водневих зв'язків у межах окремих ділянок одного поліпептидного ланцюга, де водневі зв'язки будуть всередині поліпептидного ланцюга (коротка β -структура), або групою близько розташованих суміжних поліпептидних ланцюгів у молекулі, де водневі зв'язки будуть замикатися між ланцюгами (повна β -структура). У більшості випадків складчасті шари містять не більше шести поліпептидних ланцюгів. Залежно від взаємної орієнтації ланцюгів розрізняють паралельні й антипаралельні β -структури (рис. 8). При цьому, якщо ланцюги паралельні, тобто мають однаковий напрямок від N- до C-кінця, то утворюється паралельний складчастий шар (наприклад, у β -кератину). Антипаралельні ланцюги (N-кінці спрямовані у протилежні боки) утворюють структуру антипаралельного складчастого шару (наприклад, у фіброїнішовку). Антипаралельна структура утворюється в тому випадку, якщо складчастий ланцюг вигинається, робить поворот назад і йде вздовж самого себе у зворотньому напрямку, а в місці повороту утворюється так званий β -вигин – особливий вид вторинної структури. β -Вигини утворюються чотирма послідовно розміщеними амінокислотними залишками (рис. 8).

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

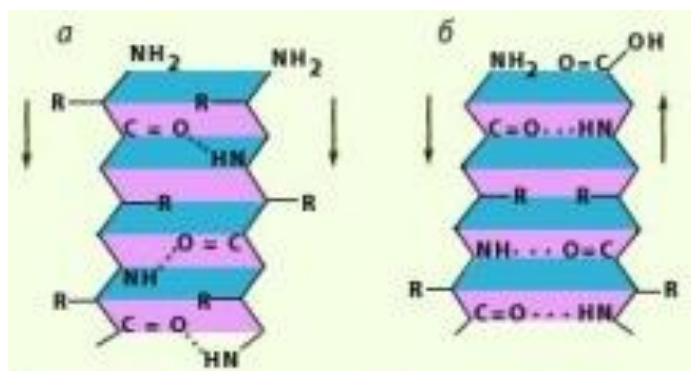


Рис. 8. Схематичне зображення β-структури: а - паралельні ланцюги; б - антипаралельні ланцюги.

У білках можливі переходи α-структур у β-структури і навпаки внаслідок перебудови водневих зв'язків. Такий перехід виявлено в кератині – білку волосся: α-кератин переходить у β-кератин. Під час миття волосся лужними миючими засобами легко порушується спіральна α-структура і він переходить у β-кератин (кучеряве волосся розпрямляється). У структурі багатьох білків одночасно присутні α-спіралі і β-структури (лізоцим, хімотрипсин, рибонуклеаза, лактатдегідрогеназа, інсулін та ін.).

Третинна структура білків

Третинна структура білків являє собою спосіб укладання поліпептидного ланцюга з елементами вторинної структури (α-спіралі і β-структури) у просторі, який досягається за рахунок взаємодії між радикалами залишків амінокислот. Для багатьох білків третинна структура еквівалентна повній просторовій структурі. Упакування третинної структури має свої закономірності, залежно від типу первинної структури поліпептидного ланцюга, від стану навколишнього середовища (водно-сольовий склад, рН, температура, взаємодія білка з іншими речовинами тощо). Третинна структура білка визначає форму білкової молекули, утворюючи або глобулу (глобулярні білки) або достатньо витягнуті волокна (фібрилярні білки). У глобулярних білків поліпептидний ланцюг вигинається в просторі, робить повороти в різних напрямках, складається в компактну, унікальну тривимірну конформацію, притаманну певному білку зі специфічною функцією.

У молекулі білка з третинною структурою зустрічаються спіралізовані ділянки (α-спіралі), шаруваті (β-структури) та ділянки у формі безладного клубка, тобто такі, що не мають будь-якої періодичної структури. Тільки правильне просторове укладання білка робить його активним: порушення його структури призводить до зміни властивостей білка і втрати біологічної активності.

Стабільність тривимірної структури забезпечують усі можливі типи зв'язків (дисульфідні, водневі, гідрофобні, іонні) (рис.9). Рушійною силою виникнення тривимірної структури є взаємодія радикалів амінокислот із молекулами води. Гідрофобні радикали амінокислот ніби вдаються всередину

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

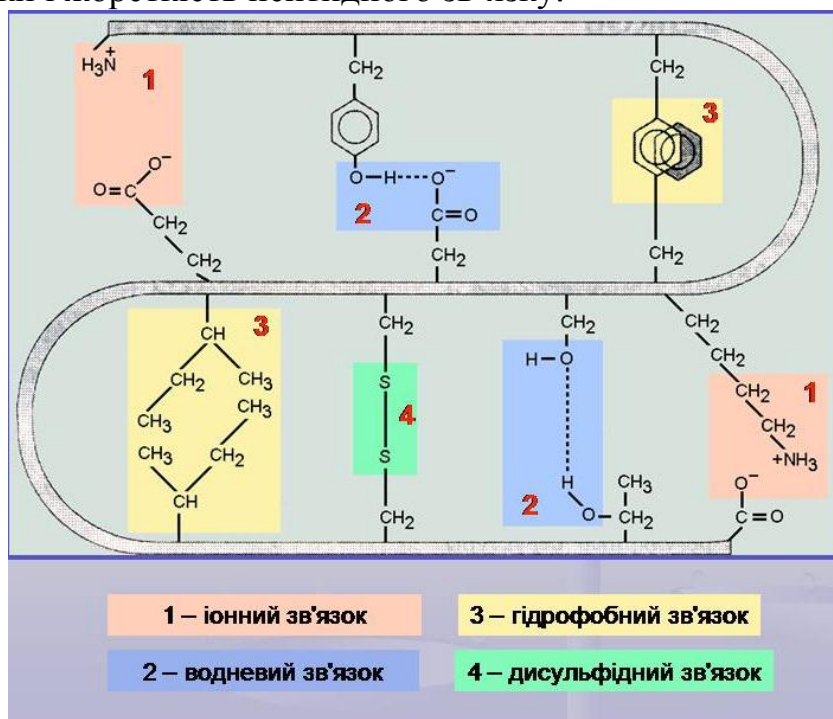


Рис. 9. Типи зв'язків, що стабілізують третинну структуру білкової молекули

Дисульфідні зв'язки (-S-S-) утворюються між боковими радикалами цистеїнів, що знаходяться на різних ділянках поліпептидного ланцюга (4); Водневі зв'язки виникають між двома електронегативними атомами, коли протон водню, ковалентно зв'язаний з одним із цих атомів, розташовується між ними (2). Існує велика кількість можливостей для утворення водневих зв'язків у білках, наприклад, між негативно зарядженим кислотним залишком моноамінодикарбонових кислот (-COO^-) і гідроксигрупами тирозину (2), серину, треоніну або NH_2 - і SH -групами бічних радикалів амінокислоті багато інших. Іонні або електростатичні взаємодії виникають під час контакту заряджених груп бічних радикалів -NH_3^+ (лізин, аргінін, гістидин) і COO^- -групою аспарагінової і глутамінової кислот (1). Гідрофобні зв'язки або ван-дер-ваальсові взаємодії виникають між вуглеводневими радикалами амінокислот аланіну, валіну, лейцину, ізолейцину, фенілаланіну, триптофану (3).

Четвертинна структура білків

Білки, побудовані з одного поліпептидного ланцюга, мають тільки третинну структуру. Але багато білків складаються із декількох ідентичних або неідентичних поліпептидних ланцюгів, кожен з яких має свою третинну конформацію. Об'єднуючись, вони утворюють єдиний функціональний комплекс із вищим рівнем організації – четвертинну структуру білка.

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

Олігомерні білки найчастіше побудовані з парного числа протомерів – від 2 до 4 (димери, тетрамери), рідше від 6 до 8, 10, 12 і більше з молекулярною масою в межах від декількох тисяч до 100000 дальтон. Олігомерні білки являють собою неподільне ціле і виконують біологічні функції, невластиві окремо взятим субодиницям. У разі дії на білки з четвертинною структурною організацією різних фізичних або хімічних факторів (сечовина, концентровані розчини нейтральних солей, органічні розчинники, детергенти, зміна рН середовища тощо) спостерігається дисоціація їх на окремі субодиниці. При цьому розриваються зв'язки, що стабілізують четвертинну структуру. Дисоціація часто буває оборотною: після вилучення відповідного агента субодиниці сполучаються між собою і четвертинна структура відновлюється. У цьому процесі важливим є те, що при відновленні структури олігомерного білка відновлюється і його біологічна активність. У клітині існує певна рівновага дисоціації деяких олігомерних білків, при якій зберігається вміст олігомеру та його субодиниць у порівнюваних кількостях. У білків з четвертинним рівнем організації не змінюється основна конформація початкових третинних структур (глобулярна або фібрилярна).

Наприклад, гемоглобін – це білок, що має четвертинну структуру і складається з чотирьох субодиниць. Кожна із субодиниць – глобулярний білок і в цілому гемоглобін також має глобулярну конформацію. Кератини – білки волосся і шерсті, які за третинною структурою належать до фібрилярних білків, мають фібрилярну конформацію четвертинної структури.

Отже, четвертинна структура білка – це спосіб взаємного розташування в просторі окремих поліпептидних ланцюгів у молекулі, а також характер зв'язку між ними. Четвертинна структура стабілізується і підтримується в нативному стані, в основному за рахунок слабких нековалентних зв'язків (іонних і водневих) і гідрофобних взаємодій, котрі виникають між різними функціональними групами, розташованими на поверхні субодиниць.

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

6. ЛІТЕРАТУРА (див. с.127)

ЗАНЯТТЯ № 2

1. ТЕМА: Будова та фізико-хімічні властивості білків. Функції білків в організмі людини. Класифікація білків. Прості білки.

2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ: Більш як 60% сухої маси клітин ссавців складають білки. Кожен з сотень тисяч різних білків має унікальну хімічну і просторову структуру, які визначають його специфічні функції. Набуті при вивченні розділу знання про структурну та функціональну різноманітність білків, їх фізико-хімічні властивості та методи ідентифікації, необхідні майбутньому провізору для вибору найбільш ефективних лікарських засобів лікування патології білкової та амінокислотної етиології.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити матеріали стосовно амінокислотного складу та структурних рівнів організації простих білків, їх фізико-хімічних властивостей; засвоїти методи якісного визначення білків та окремих амінокислот.

4. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

4.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Амінокислотний склад білків та пептидів.
2. Структурна організація білків.
3. Фізико-хімічні властивості білків. Реакції осадження білків. Денатурація.
4. Класифікація білків організму людини. Класифікація та характеристика простих білків.
5. Глобулярні білки: структура, фізико-хімічні властивості, розповсюдження в тканинах, біологічна роль. Чинники стійкості глобулярних білків в колоїдних розчинах.
6. Фібрилярні білки: структура, фізико-хімічні властивості, розповсюдження в тканинах, біологічна роль.
7. Загальні уявлення про методи розділення, виділення і очищення білкових препаратів: ультрацентрифугування, висолювання, діаліз, електрофорез, хроматографія.

5. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ ДО ЗАНЯТТЯ

Фізико-хімічні властивості білків

Виділення і очистка білків.

Першим етапом виділення й очистки білків є вилучення їх із клітин. Спочатку клітини руйнують, перетворюючи їх на гомогенат за допомогою гомогенізаторів з лопатками, що обертаються, або товкачика, які виготовлені з інертного матеріалу – тефлону. Застосовують також метод розтирання із твердим матеріалом, наприклад, із кварцовим піском. Існують методи руйнування клітин за допомогою попереминого заморожування й розморожування. На всіх етапах виділення й очищення білків слід зважати на їх значну нестійкість, лабільність, схильність до втрати нативних властивостей. Дуже часто процес руйнування клітин супроводжується виділенням тепла, тому всі процедури необхідно проводити при знижених температурах (близько +4°C) з метою запобігання теплової денатурації. Важливим є також підтримування активної реакції середовища у певному інтервалі; з цією метою середовище суспендування готують на буферних розчинах. Щоб усунути вплив різних

іонів, використовують комплексоутворювачі – етилендіамінтетраацетат (ЕДТА або трилон Б) та ін. Щоб запобігти окисленню в білках SH-груп, у середовище додають відновники, наприклад цистеїн та ін.

Для виділення білків клітинних органел останні спочатку одержують за допомогою ультрацентрифугування. Більшість білків у клітині знаходиться в сполученні з іншими речовинами або клітинними структурами, для їх кращої солюбілізації застосовують слабкі розчини детергентів – речовин з поверхневою активністю (дезоксихолатнатрію та ін.) або деякі розчинники (ефір, бутанол тощо). Білки екстрагують із матеріалу після його гомогенізації. У залежності від властивостей вилученого білка і мети дослідження застосовують різні розчинники: воду, сольові розчини, різноманітні буферні суміші, водно-спиртові розчини, слабкі кислоти або луги, органічні реагенти. Дуже часто екстракцію білка здійснюють у процесі гомогенізації матеріалу. Внаслідок екстракції отримують суміш білків та інших речовин, тому застосовують різні методи очистки (висолювання, ізоелектричне осадження, застосування органічних розчинників за низької температури від 5° до 10°C); використовується іонообмінна, адсорбційна або афінна хроматографія з різними адсорбентами, гельфільтрація на колонках, електрофорез. Застосовуючи різноманітні методи виділення й очистки білків, можна отримати індивідуальні білки з високим ступенем чистоти. Основними тестами на гомогенність отриманого білка є стабільний амінокислотний склад, певна молекулярна маса, рух при електрофорезі у вигляді однієї смуги, вияв певної біоактивності.

Ультрацентрифугування

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

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

Одним з простих підходів, що обумовлюють можливість проведення такої оцінки є метод «середньої точки». При таких дослідженнях лунка центрифуги містить розчин, концентрація якого постійна по всій довжині лунки. В процесі центрифугування частки рухаються під дією гравітаційної

сили, меніск освітлюється та формується рухомий фронт. За швидкість руху фронту стандартно приймається зміна радіальної координати в середній точці. Цей метод може бути застосовано виключно для «ідеальних» розчинів, тобто однакових макромолекул, що не взаємодіють. У випадку наявності двох макромолекул з вираженими відмінностями в молекулярній масі можливий розрахунок двох констант седиментації, що характеризуватимуть окремо кожен тип молекул. Однак, у випадку, коли молекулярно-ваговий розподіл наперед невідомий, застосування підходу «середньої точки» може призвести до великих похибок. А тому в практиці аналітичного центрифугування не застосовується. Окрім того, одним з умов проведення є наявність на седиментограмі плато та базової лінії, що обмежує можливості методу в дослідженні білків з молекулярною масою до 30 кДа.

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

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

Електрофорез

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

Протягом електрофорезу на заряджені біомолекули діють декілька сил. Основна – електричний потенціал, або напруга (вольтаж), поля, що визначає величину заряду поміщеної в поле частинки і спонукає до руху негативно заряджені частинки (аніони) до позитивно зарядженого електроду (аноду), а позитивно заряджені катіони – до негативного катоду. Через наявність сили тертя більш великі за розміром та асиметричні молекули будуть переміщатись під дією електричного поля з меншою швидкістю (рис. 10).

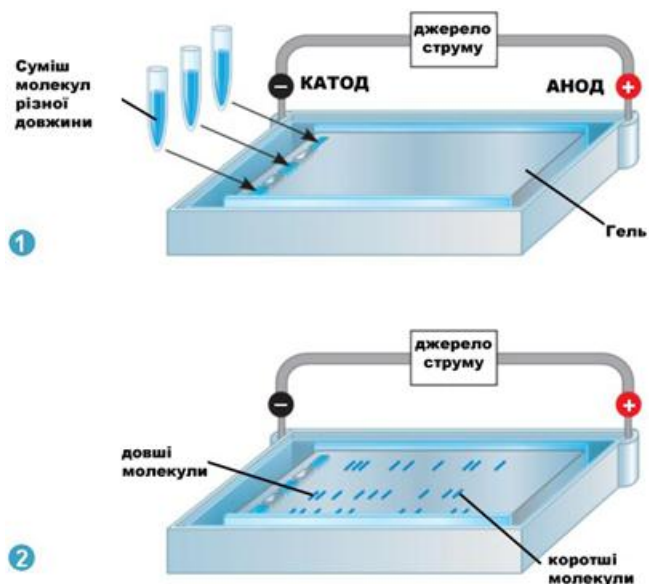


Рис. 10. Схема електрофоретичного розділення молекул білків

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

На рух біомолекул також впливає плинність буферу через пори роздільного середовища. Буфер рухається у протилежному напрямку від негативно заряджених молекул біозразку і, таким чином, може порушувати рух молекул з малою магнітудою заряду, переносючи їх з собою (електро- чи ендосмос).

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

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

В подальшому роздільне середовище проходить етап фарбування з метою ідентифікації специфічних категорій біомолекул. Барвник, що використовується для фарбування, вибирається, виходячи з задач дослідження. Протеїни можуть бути візуалізовані з використанням нінгідрину, що виявляє аміногрупи; Пунцовим S (Ponceau S), який використовується для неспецифічної візуалізації протеїнів на ацетаті целюлози; Coomassie brilliant blue та amino black специфічні до протеїнів; Sudan black та oil red O – до ліпопротеїнів. Для

візуалізації нуклеїнових кислот може бути використано нітрат срібла, етидію бромід, SYBR Green чи інші інтеркалюючі барвники, що вбудовуються між подвійними ланцюгами полінуклеотидів. Після фарбування візуалізація відбувається шляхом зйомки роздільного середовища з використанням гел'документуючих систем при опроміненні світлом з певною довжиною хвилі, специфічною до вибраного барвника. Наступна обробка отриманого зображення дозволяє визначити молекулярну вагу досліджуваних біоломекул, а денситометричний аналіз – концентрацію біомолекул у фракції. Обидва аналізи вимагають одночасного використання стандартів молекулярної ваги та концентрацій при постановці електрофорезу. Перенос продукту з гелю на нітроцелюлозну мембрану дозволяє проводити специфічну ідентифікацію протеїнів з використанням проб, мічених радіоактивною чи флуоресцентною міткою (блотінг).

Окремим різновидом електрофорезу є 2D-електофорез, першим етапом якого є ізоелектрофокусування вихідного зразку (наприклад, за градієнтом рН, приклад якого наведено на рис. 11).

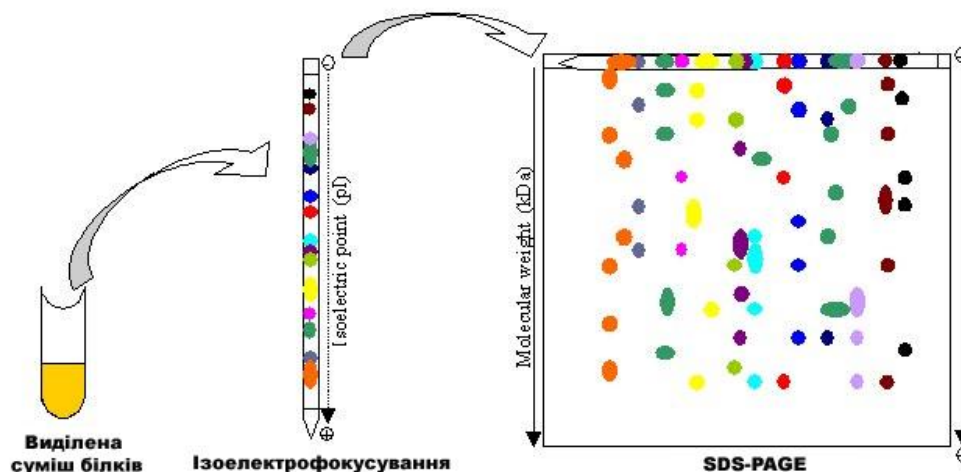


Рис. 11. Схема проведення 2D-електофорезу з використанням поліакриламідного гелю у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE).

Хроматографія

Хроматографія являє собою техніку розділення біомолекул на основі їхнього відносного розподілу між двома різними фазами. Розділення відбувається на стаціонарній (нерухомій) фазі під впливом мобільної (рухомої) фази та базується на розчинності біомолекул та їх взаємодії з цими двома фазами.

Номенклатура хроматографії.

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

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

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

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

Крім цього розрізняють також колонкову та площинну хроматографії.

Площинна хроматографія

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

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

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

Тонкошарова хроматографія

При даному виді хроматографії у якості сорбенту використовується гель на основі діоксиду кремнію (кварцу), оксиду алюмінію, поліакриламідний чи крохмальний гель, нанесений на стаціонарну фазу, як правило, скляну, металеву чи пластикову пластинку. Рухомою фазою є рідкий розчинник. Фракції розчиненої речовини разом з розчинником рухаються вгору по стаціонарній фазі під дією капілярних сил. Спеціально підібрані хімічні

компоненти, додані до нерухокої фази, спричиняють хімічну реакцію з розділеними фракціями біомолекул, обумовлюючи зміну кольору та отримання типових хроматограф (рис. 12).

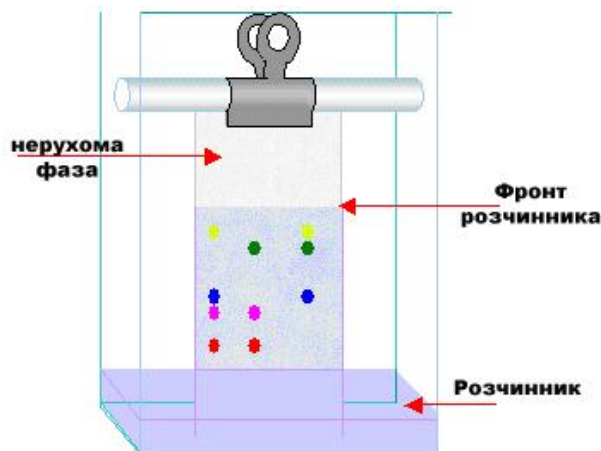


Рис. 12. Схема тонкошарової хроматографії.

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

Колонкова хроматографія

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

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

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

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

При іон-обмінній хроматографії зразок розводиться з буфером з метою отримання розчиненою речовиною електричного заряду. Принцип методу

заснований на різниці в розчинності речовин у двох фазах та величині електричних зарядів. Змінюючи рН рухомої фази, можна досягти елюції специфічно заряджених частинок розчиненої речовини.

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

Гель-фільтрація

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

Автоматизовані системи хроматографії

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

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

площу під піком шуканої речовини до аналогічного показника відомого стандарту чи калібрувального розчину.

За механізмом розділення рідинна хроматографія високого тиску ділиться на адсорбційну, роздільну, іон-обмінну, ексклюзійну тощо. Однак, в практичній роботі, розділення часто проходить за кількома механізмами одночасно.

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

Типова схема будови рідинного хроматографа наведена на рис. 13.

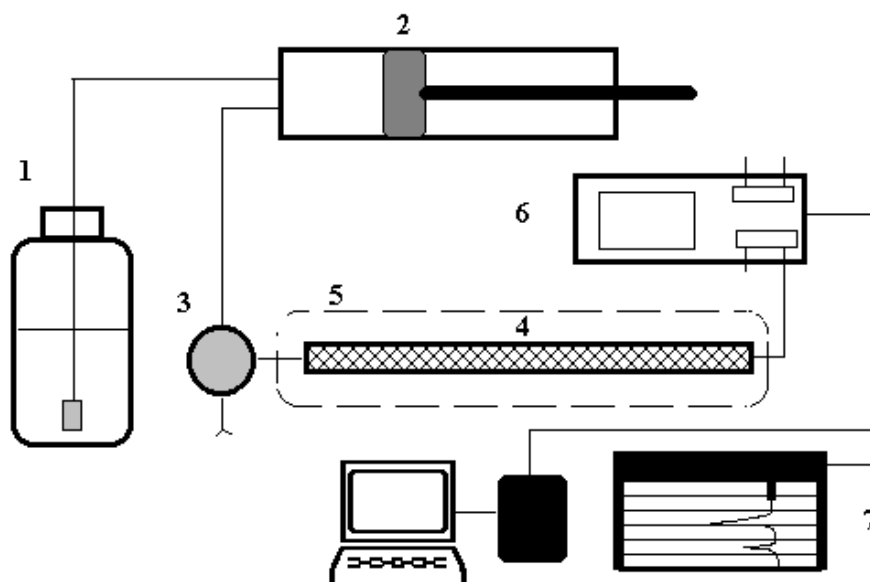


Рис. 13. Принципова схема будови хроматографа для ВЕРХ.

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

Газова хроматографія використовується з метою розділення летючих компонентів. У якості мобільної фази використовується інертний газ, як правило, гелій, що не взаємодіє зі зразком та стаціонарною фазою. В залежності від різновиду газової хроматографії, стаціонарна фаза може являти собою твердий носій (діоксид кремнію, оксид алюмінію) (газово-твердофазна) чи рідину, що оточує інертну основу (газово-рідиннофазна). Шляхом нагрівання досягається випаровування зразку, який потім подається з газом-носієм до розігрітої колонки, де й проходить розділення. В газовій хроматографії до кожного зразку додається внутрішній стандарт з метою урахування флуктуації в колонці, температури порту інжекції та змін у газовому потоці. Розділені

частинки потрапляють до полум'яно-іонізаційного детектору, що створює електронний сигнал. Конструктивно, можуть бути використані інші види детекторів, на кшталт термоіонного, фотоіонізаційного чи детектора електронного захвату. Однак, одним з найбільш точних детекторів є мас-спектрометр, що дозволяє фракціонувати молекули з подальшим електромагнітним розділенням за спектром розподілу мас.

Електронний сигнал детектору виводиться на моніторі у вигляді піку, за площею та висотою якого можна оцінювати концентрацію певної хімічної сполуки, а за часом його появи проводити ідентифікацію сполуки шляхом встановлення часу утримування, що є унікальною її характеристикою. Схема будови газового хроматографа наведена на рис. 14.

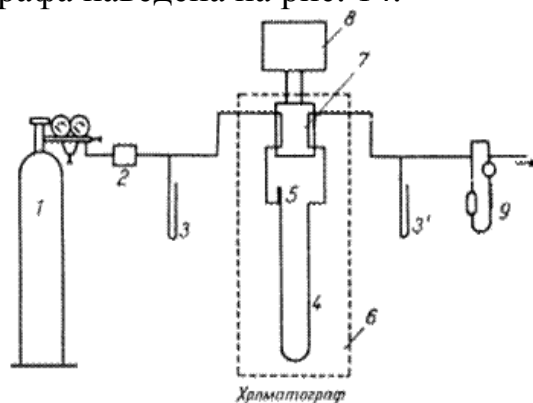


Рис. 14. Принципова схема будови газового хроматографа.

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

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

Діаліз.

Діаліз – це особливий різновид розподілу речовин з використанням мембран, нездатних пропускати через свої пори високомолекулярні молекули. Діаліз використовують у біохімічних дослідженнях для очистки високомолекулярних сполук (білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів і т.ін.) від низькомолекулярних і у фармації для одержання лікарських препаратів, у тому числі і білкових. Метод діалізу використовується в практичній медицині для очистки крові від природних низькомолекулярних «шлаків» і токсичних сполук при захворюванні нирок і деяких отруєннях (апарат «штучна нирка»). Нездатність білків дифундувати через напівпроникні мембрани спричиняє явище осмосу, тобто переміщення молекул води через мембрану в розчин білка. Якщо розчин білка відокремити від води целофановою мембраною, то, прагнучи досягти рівноваги, молекули води проникають у розчин білка. Це підвищує гідростатичний тиск (тиск стовпа води), який перешкоджає подальшій дифузії молекул води. Той тиск, або сила, яку треба прикласти, щоб

зупинити осмотичний потік води, називається осмотичним тиском. Біологічні мембрани також непроникні для білка, тому осмотичний тиск, утворений білком, залежить від концентрації його усередині і поза клітиною. Осмотичний тиск, зумовлений білком, називають також онкотичним тиском.

Молекулярна маса.

Молекулярна маса білків дуже велика – від декількох тисяч до мільйонів дальтон. Вважають, що сполуки з молекулярною масою < 6000 належать до поліпептидів, а $>50000-60000$ – до олігомерів.

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

Амфотерні властивості білків.

Білки є амфотерними електролітами, оскільки у складі їх молекули містяться як кислотні, так і лужні групи. Кислотно-основні властивості визначаються, головним чином, бічними радикалами амінокислот, здатними до іонізації. До іонізованих груп належать COO^- -групи бокових радикалів аспарагінової і глутамінової кислот, NH_3^+ -групи залишків лізину й аргініну. Іонізація решти груп у молекулах білка істотного значення не має, оскільки $\alpha\text{-NH}_2$ -і $\alpha\text{-COOH}$ -групи утворюють пептидні зв'язки, а кількість N- і C-кінцевих груп є незначною у зв'язку з великими розмірами молекул білка. Ступінь іонізації функціональних груп залежить від значення рН. У кислому середовищі іонізуються NH_2 -групи, у лужному середовищі – COOH . Тому білки у водному середовищі, подібно до амінокислот, мають властивості амфолітів: у кислому середовищі вони реагують як основи, у лужному – як кислоти. У залежності від знака заряду молекула білка в електричному полі пересуватиметься відповідно в бік катоду чи аноду. Додавання до розчину білка певної кількості іонів H^+ чи OH^- змінює рН середовища, внаслідок чого дисоціація одних груп пригнічується, а інших – посилюється.

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

Значення рН середовища, при якому білок не несе сумарного заряду й не рухається в електричному полі, називається ізоелектричною точкою (ІЕТ). ІЕТ вища за 7, якщо білок містить велику кількість залишків основних амінокислот, і менша за 7 при переважному вмісті кислих амінокислот. Для більшості глобулярних білків ІЕТ знаходяться у кислій зоні (4,5-6,5). Проте є й винятки. Наприклад, фермент пепсин, який виконує свою функцію в сильно кислому середовищі шлунка, має ІЕТ близько 1,0, а протамін – близько 12. ІЕТ білка характеризується низкою особливостей: в ІЕТ білок має найменшу розчинність і досить легко випадає в осад, втрачаючи здатність рухатися в електричному полі. Слід зазначити, що в ІЕТ білок випадає в осад у більшості випадків після додавання водовідбираючих речовин, котрі руйнують гідратну оболонку (спирту, ацетону, нейтральної солі та ін.). Знаючи ІЕТ індивідуальних білків,

можна підібрати найкращі умови для їх осадження з біологічних рідин, тканинних екстрактів, які містять суміш різних білків, а також для одержання й очистки білкових препаратів. Наявність великої кількості точок дисоціації визначає і здатність білкових молекул до взаємодії з малими іонами, зокрема з іонами металів, іншими зарядженими молекулами, що дуже важливо для функціонування білка.

Внаслідок наявності в складі білкової молекули великої кількості реакційно здатних груп, білки можуть брати участь в реакціях окислення, відновлення, солеутворення, ацетилювання, етерифікації, фосфорилування та ін. Усі ці реакції мають місце в живих організмах і забезпечують процеси їх життєдіяльності. Білки, як амфотерні поліелектроліти, виявляють в організмі буферні властивості, що має відношення до підтримання сталості рН.

Розчинність білка.

Більшість білків – гідрофільні речовини, які добре розчиняються у воді. Переважна частина поверхні білкової молекули утворена групами, здатними до гідратації. Гідратація – це зв'язування диполів води з іонними й неіонними полярними групами білків. У дисоційованому стані іонні групи притягають молекули води за рахунок іон-дипольних взаємодій. Неіонні полярні бокові радикали амінокислот (серин, треонін, аспарагін, глютамін) утворюють із водою водневі зв'язки.

Розчинність білків сильно залежить від концентрації солей (від іонної сили). У дистильованій воді білки, частіше за все, матимуть погану розчинність, однак, зі збільшенням іонної сили розчинність білків зростатиме. При цьому, чим більша кількість гідратованих неорганічних іонів зв'язується з поверхнею білка, тим меншою стає ступінь його агрегації (засолування). За високої іонної сили молекули білків лишаються гідратуючих оболонки, що призводить до їх агрегації та випадінню білка в осад (висолування). Використовуючи різницю в розчинності, можна з використанням звичайних солей розділити (фракціонувати) суміш білків. Типовий графік розчинності білків в залежності від концентрації солі наведений на рис. 15.

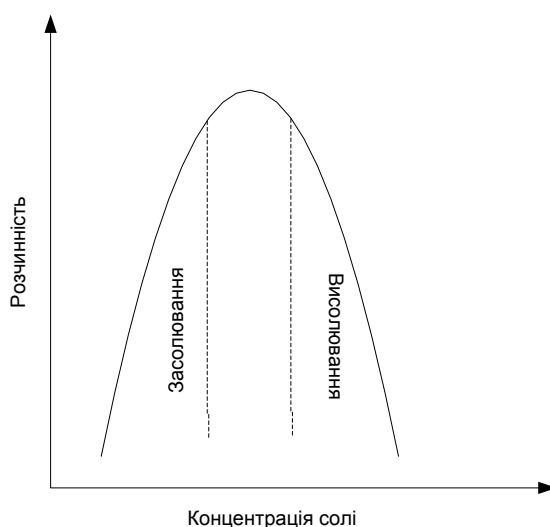


Рис.15. Залежність розчинності білків від концентрації солі

Розчинність різних білків у воді і в різних розчинниках неоднакова і залежить від природи білка й розчинника, значення рН, температури, іонної сили тощо. Наприклад, альбуміни розчиняються у воді, а глобуліни – тільки в присутності електролітів, білки опорних тканин (кератини, колаген, еластин та ін.) не розчиняються у воді й сольових розчинах, у воді вони лише набрякають. Розчинність білків у воді зростає за невеликих концентрацій нейтральних солей (Na_2SO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та ін.). Цей ефект називають сольовим розчиненням. Нейтральні солі в малих концентраціях збільшують ступінь дисоціації іонізованих груп білка, екранують заряджені групи білкових молекул і цим зменшують білок-білкові взаємодії. Високі концентрації нейтральних солей, навпаки, осаджують (висолюють) білки з водних розчинів; найактивніше це відбувається у ІЕТ білка. При цьому солі відтягують до себе від заряджених груп білка поляризовані молекули води і тим самим частково позбавляють білок гідратної оболонки, котра запобігає його осадженню з розчину. Оскільки процес розчинення білків залежить від гідrataції їхніх молекул, а наявність гідратної оболонки разом із зарядом є важливим фактором стабілізації молекули білка, то всі фактори, котрі послаблюють гідrataцію білка або сприяють руйнуванню гідратних оболонок, зменшують таким чином розчинність білка й призводять до його осадження. У разі втрати білками гідратної оболонки виникають дипольні сили, котрі забезпечують агрегацію білкових молекул. Білки з високим дипольним моментом (глобуліни, міозин) випадають в осад за низьких концентрацій солей, а білки з низьким дипольним моментом – за високих концентрацій солей (альбуміни). Так, глобуліни випадають в осад у напівнасичених розчинах нейтральних солей, а альбуміни – при добавленні 100% насичених сольових розчинів. Знизити гідrataцію білкових розчинів можна добавленням спирту, ацетону й інших органічних розчинників.

Осадження білків органічними розчинниками за низьких температур, а також при висолюванні має оборотний характер. Після добавлення води і відновлення гідратних оболонок білок знову розчиняється і набуває початкового нативного стану, виявляючи електрофоретичну рухливість з тією ж біологічною активністю. Оборотно осадження білків органічними розчинниками і методом висолювання використовують у фармацевтичній практиці для виділення білків і для їх розподілу на білкові фракції при одержанні очищених білкових, у тому числі, ферментних і гормональних препаратів, а також для одержання білків у кристалічному стані. Метод висолювання білків використовують у клініко-біохімічних лабораторіях для розподілу альбумінів і глобулінів і визначення їх співвідношення в сироватці крові. Осаджену фракцію білка відділяють центрифугуванням, розчиняють і визначають кількісний вміст за допомогою різноманітних методів. У нормі альбуміно-глобулінове співвідношення (А/Г коефіцієнт) складає 1,5–2,3 і може змінюватися при патології, наприклад, при хронічних дифузних ушкодженнях печінки (гепатит і цироз), інфекційних захворюваннях, лихоманці, пневмонії, туберкульозі, ендокардиті, злоякісних процесах, амілоїдозі, коли збільшується вміст глобулінів.

Денатурація білків.

Під впливом фізичних (температура, ультразвук, іонізуюча радіація і т.ін.), хімічних (мінеральні й органічні кислоти, луги, органічні розчинники, важкі метали, алкалоїди, детергенти, деякі амідні, наприклад, сечовина та ін.) факторів відбуваються глибокі зміни в молекулі білка, пов'язані з порушенням четвертинної, третинної і вторинної структур, що спричиняє у свою чергу зміну фізико-хімічних і біологічних властивостей білка, тобто денатурацію. При денатурації білка має місце розрив цементуючих білкову молекулу вторинних зв'язків (водневих, дисульфідних, електростатичних, ван-дер-ваальсових та ін.). Це призводить до зміни просторової структури; глобула білка розкручується, на її поверхні збільшується кількість гідрофобних груп, тобто зменшуються гідрофільні властивості білка. Він стає більш гідрофобним, втрачає здатність розчинятися у звичайних для нього розчинниках і позбується своїх біологічних функцій (ферментів, гормонів тощо). Після денатурації змінюється більшість фізико-хімічних властивостей білка: зменшується розчинність, збільшується кількість SH- та інших груп, посилюється в'язкість, з'являється більше хіральных атомів вуглецю, змінюються оптичні властивості і константа седиментації. У структурі білка суттєво зменшується кількість α -спіралей і β -структур, зменшується кількість внутрішньомолекулярних водневих зв'язків і збільшується кількість цих зв'язків між білком і водою. Під час денатурації білка вивільняються реактивні групи, які в його нативному стані були не зовсім доступні (сульфгідрильні, фенольні, гідроксильні, імідазольні та ін.), що спричиняє зміну ІЕТ білків. Найчастіше вона зміщується у бік лужних значень рН. Денатурація білків супроводжується зростанням оптичної активності. Перетворення компактної молекули в безладний клубок, яке має місце при денатурації, призводить до того, що більшість пептидних зв'язків стають доступними для дії протеолітичних ферментів (трипсину, хімотрипсину та ін.). У зв'язку з цим протеоліз таких білків відбувається з більшою швидкістю, ніж нативних білків. При денатурації в більшості випадків первинна структура не порушується, тому після розкручування поліпептидного ланцюга (стадія нитки) він може знову стихійно скручуватися, утворюючи «випадковий клубок», тобто переходить до хаотичного стану. При цьому спостерігається агрегація білкових частинок і випадання їх в осад. Повна денатурація білка в більшості випадків необоротна, на відміну від оборотної, за якої зміни в молекулі білка незначні, і білок за певних умов знову набуває своїх нативних властивостей (процес ренатурації). Наприклад, таке відбувається під час осадження білків органічними розчинниками – спиртом або ацетоном, якщо проводити його за низької температури, а потім швидко видалити осаджувач.

Процес денатурації білків широко використовується в клініці, фармації і біохімічних дослідженнях для осадження білка в біологічному матеріалі з метою подальшого визначення в ньому небілкових і низькомолекулярних сполук; для встановлення наявності білка і його кількісного визначення; для знезараження шкіри і слизових покривів; для зв'язування солей важких металів під час лікування отруєнь солями ртуті, свинцю, міді тощо або для профілактики отруєнь на підприємстві.

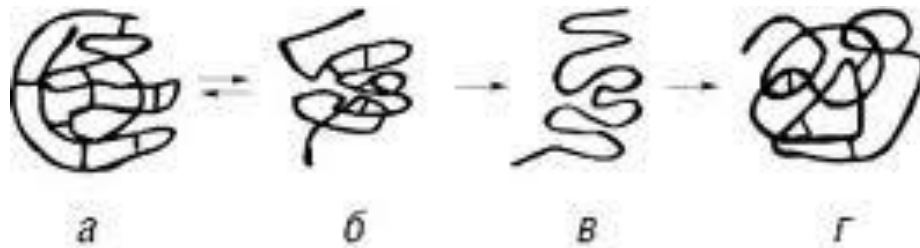


Рис. 16. Схема денатурації білка:

а – нативна молекула; б – розгортання поліпептидного ланцюга;
в – стадія нитки; г – випадковий клубок

Оптичні властивості білків.

Як правило, усі білки, поглинають ультрафіолетове (УФ) світло у трьох зонах. Поглинання при довжині хвиль понад 250 нм з максимумом близько 280 нм зумовлюється наявністю виключно ароматичних амінокислот – фенілаланіну, тирозину, триптофану. Смуга поглинання, максимум якої знаходиться поблизу 190 нм, зумовлюється, головним чином, пептидними зв'язками. На перелічених властивостях ґрунтується спектрофотометричний метод кількісного визначення білка. Він не дуже точний, оскільки кількість тирозину і триптофану в різних білках варіюється в досить широких межах. Незважаючи на недостатню точність, цей метод широко застосовують у сучасній біохімії, завдяки його простоті і швидкості виконання. В інфрачервоній (ІЧ) частині спектра (760-10000 нм) поглинають світло всі білки. ІЧ-спектроскопію широко використовують для визначення відносного вмісту α -спіралей, β -структур та аморфних ділянок у білковій молекулі. Білки є оптично-активними сполуками: вони обертають плоскополяризоване світло, яке проходить через їх розчин, і неоднаково поглинають ліве і праве циркулярно поляризоване світло. Зазначена властивість білків пояснюється наявністю в їх молекулі хіральних атомів вуглецю. Взаємодію з білками поляризованого світла вивчають за допомогою методів дисперсії оптичного обертання (ДОО), кругового дихроїзму (КД). Ці методи застосовують для загального опису вмісту спіральних структур у білках і дослідження конформаційних змін. Білкові розчини здатні також флуоресцювати – випускати квант світла при переході з електронного збудженого стану до основного. На цій властивості білків ґрунтується флуоресцентна спектроскопія. Флуоресценція характерна для таких амінокислотних залишків у молекулі білка, як фенілаланін, тирозин, триптофан. Вимірювання флуоресценції дає відомості про конформаційні перебудови білка в місцях приєднання лігандів, взаємодії з розчинниками, ступінь гнучкості молекули, міжмолекулярні відстані тощо.

Кількісні методи визначення білків використовуються у фармацевтичній практиці, у тому числі в контрольно-аналітичних лабораторіях для контролю білкових лікарських засобів (вакцин, сироваток, гаммаглобуліну, гістаглобуліну, гормонів, ферментів, білкових препаратів крові і т.ін.), а також для визначення питомої активності ферментних препаратів. Для кількісного визначення білків у лікарських засобах і біологічному матеріалі найчастіше використовують

фотоколориметричні і спектрофотометричні методи, у деяких випадках кількість білка визначають за вмістом загального азоту (азотометрією), а також фотонейфелометрією.

У клініко-біохімічних лабораторіях з метою постановки діагнозу багатьох захворювань визначають концентрацію білка в біорідинах організму (кров, сеча, спинномозкова рідина, ексудати). У сироватці крові міститься суміш білків, які відрізняються за фізіологічним значенням, структурою і фізико-хімічними властивостями. На даний час відомо близько 100 різноманітних білків плазми крові. У нормі вміст загального білка в сироватки крові становить у дорослих 65–85 г/л (6,5–8,5 г%), у дітей до 6 років – 56–85 г/л або 5,6–8,5 г%. Підвищення рівня концентрації білка до 120 г/л (гіперпротеїнемія) зустрічається рідко. Це спостерігається при деяких хронічних запальних процесах за рахунок утворення антитіл (поліартрит, ревматизм, мієломна хвороба – плазмоцитомі). Короткочасна відносна гіперпротеїнемія відзначається при сгущенні крові через значні втрати рідини, наприклад, при посиленому потовиділенні, нестримному блюванні, холері, нецукровому діабеті, важких опіках і т.ін. Зниження кількості білка (гіпопротеїнемія) має місце при недостатньому надходженні білка з їжею (голодування), порушенні прохідності кишкового тракту, порушенні процесів біосинтезу білків в органах, ураженні печінки хімічними речовинами, мікроорганізмами, пухлинами, при втраті білка організмом (кровотеча, підвищена проникність судин, захворювання нирок, вагітність тощо).

Методам кількісного визначення білка належить значне місце в науково-дослідницьких експериментах.

Принцип будови фотометрів та спектрофотометрів

Оптичні прилади, що вимірюють поліхроматичний світловий потік (7012 нм) у видимому діапазоні світла, носять назву фотоелектроколориметрів. Прилади, що вимірюють поліхроматичний світловий потік в ультрафіолетовому, видимому та інфрачервоному діапазонах, називають фотометрами (рис. 17). А прилади, що розділять світловий потік та дозволяють проводити його виміри на будь-якій довжині хвиль в межах оптичного діапазону – спектрофотометрами (рис. 18). Дослідження можуть виконуватися за одно- та двопроменевою схемами.

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

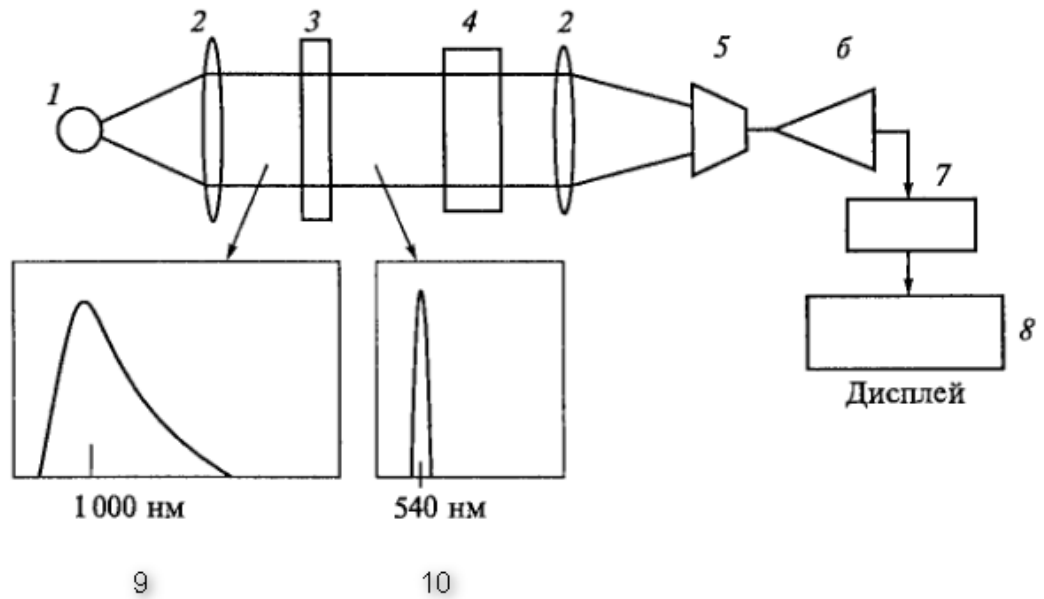


Рис. 17. Типова будова фотометру.

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

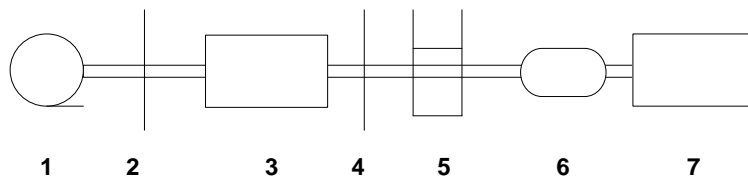


Рис. 18. Схема будови однопроменевого спектрофотометру.

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

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

Виділення області спектру є принциповим етапом дослідження, оскільки для різних речовин характерне поглинання на різних довжинах хвиль. Для виділення відповідних інтервалів та довжин світла можуть бути використані різні оптичні засоби: дзеркала, лінзи, світлофільтри, монохроматори. Необхідні спектральні ділянки виділяють за допомогою світлофільтрів та монохроматорів. Світлофільтри дозволяють пропускати світло лише певного діапазону хвиль, у той час як за допомогою монохроматора можна визначити повний спектр, отриманий від проби.

Спектральна ширина смуги світла, що залежить від якості монохроматора, пристрою дисперсії світла та вихідної щілини, визначає

роздільну здатність спектрофотометру, тобто – його здатність диференціювати два дуже близьких один до одного піки.

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

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

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

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

КЛАСИФІКАЦІЯ БІЛКІВ

Незважаючи на те, що хімічний склад і структура білків уже значною мірою вивчені, і прогрес у цій сфері продовжується, на даний час ще не створено ні чіткої номенклатури, ні дійсно наукової класифікації білків. Білки часто класифікують за випадковими ознаками: джерелами виділення білка, формою молекули, розчинністю у певних розчинниках, локалізацією у певних органах і тканинах, амінокислотним складом тощо. Із загальної кількості білків виділяють ті чи інші вузькі або широкі групи. Так, характеризуючи білкові речовини за ступенем складності, серед них виділяють дві великі групи: *прості*

і **складні білки**. До простих білків, або протеїнів, відносяться білки, котрі дають при гідролізі лише амінокислоти. Складні білки складаються із простого білка і додаткової групнебілкової природи. Складні білки поділяються на групи в залежності від будови небілкової частини – простетичної групи.

За формою молекул білки ділять на **глобулярні** і **фібрилярні**. Існує також класифікація білків за їх розчинністю.

В останні роки зроблено спроби дати науково обґрунтовану класифікацію з урахуванням досягнень хімії та біохімії білків. Згідно зоднією з них білки класифікуються за **функціями**, які вони виконують. За цією ознакою виділяють такі групи білків: каталітичні, білки-регулятори активності геному, захисні, токсичні, транспортні, скорочувальні, рецепторні, білки-інгібітори ферментів, білки вірусних оболонки, білки з іншими функціями. Хоча функціональна класифікація також має деякі недоліки, наприклад, при класифікації біфункціональних білків, проте вона дає можливість глибшого розуміння взаємозв'язку структури і функції молекул білка.

Інша спроба полягає в класифікації білків відповідно до **особливостей їх вторинної і третинної структури**. Згідно з цією класифікацією серед глобулярних білків виділено 4 класи: α -, β -, $\alpha+\beta$ -, α/β -білки. До класу α -білків відносять глобулярні білки, які містять лише α -спіралі в кількості не менше 60% від поліпептидного ланцюга, до складу якого вони входять; до класу β -білків – ті, що містять тільки β -структури, найчастіше не менше двох антипаралельних ланцюгів. До класу $\alpha+\beta$ -білків відносять білки, що містять ті чи інші структури в межах одного й того ж поліпептидного ланцюга (причому один домен складається з α -спіралей, а інший – із β -шарів), до класу α/β -білків – ті, що містять чергування вздовж поліпептидного ланцюга α -спіралей і β -структур, або один чи декілька β -шарів, оточених декількома α -спіралями кожен. Більшість білків згідно з цією точкою зору належать до α/β -класу, якому зачисельністю трохи поступається β -клас; α -клас і $\alpha+\beta$ -клас менш поширені, аніж два перші (за Ю.Б.Филиповичем, 1985 р.). Слід мати на увазі, що є нечисленні глобулярні білки, цілком позбавлені будь-якої вторинної структури, тому їх не можна віднести ні до одного із вищезазначених класів.

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

Альбуміни. Це водорозчинні білки, які осаджуються при насиченні розчинів нейтральними солями, наприклад $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Альбуміни широко розповсюджені в природі. Вони складають біля 50% усіх білків плазми людини. Молекулярна маса альбумінів 35000–70000. Молекули їх мають еліпсоїдну форму, яка є компактнішою і симетричнішою, ніж у глобулінів. Для хімічного складу характерним є вміст лейцину (15%), значної кількості сірковмісних амінокислот, лізіну, аспарагінової і глутамінової кислот, а також незначний вміст гліцину. Деякі альбуміни зовсім не містять цієї амінокислоти (альбумін сироватки крові). Основні функції альбумінів – регуляція осмотичних процесів і транспорт. При зменшенні вмісту альбумінів порушується транспорт ліпідів. Вони регулюють також вміст у плазмі крові іонів Ca^{2+} , стероїдних гормонів,

деяких лікарських препаратів (дикумарину, пеніциліну, аспірину), утворюючи з ними комплекси.

Глобуліни. Глобуліни, як і альбуміни, дуже поширені у складі тваринних і рослинних тканин. На відміну від альбумінів, глобуліни не розчиняються в концентрованих розчинах нейтральних солей. Із тканин їх виділяють за допомогою екстрагування 10% розчином солей. При підвищенні концентрації солей розчинність глобулінів зменшується, а в 50% розчині вони випадають в осад. Молекулярна маса глобулінів – 0,9-1,5 млн. Вони більш грубодисперсні і менш гідрофільні, ніж альбуміни. За хімічним складом глобуліни дещо відрізняються від альбумінів і містять більше гліцину (~5%) і меншу кількість сірковмісних амінокислот. Під час електрофорезу білки сироватки крові в залежності від рухливості розподіляються на декілька фракцій, серед яких альбуміни становлять 54–58%, фракція глобулінів неоднорідна і розділяється на α_1 -глобуліни (6–7%), α_2 -глобуліни (8–9%), β -глобуліни (13–14%), γ -глобуліни (11–12%). За допомогою імунофорезу білки сироватки крові можна розділити на 16–19 фракцій, кожна з яких виконує специфічну роль у процесах метаболізму.

Гістони. Це лужні білки з молекулярною масою 12000–30000, які містять 20–30% лужних амінокислот. Вони розчиняються у слабких кислотах, осаджуються спиртом, не містять триптофану і, у більшості випадків, цистеїну і цистину. Основна маса гістонів входить до складу хромосом ядер клітин і відіграє важливу роль у стабілізації ДНК. Певну роль вони виконують у процесах біосинтезу білків, оскільки є компонентами дезоксирибонуклеопротеїнів ядра. Згідно з даними РСА й електронної мікроскопії гістони не знайдено в хромосомах тих організмів, які не мають сформованого клітинного ядра (прокаріот).

Протаміни. Це сильно лужні білки з низькою молекулярною масою (до 12000), завдяки чому деякі з них проходять через целофан при діалізі. Протаміни розчиняються в слабких кислотах, не осаджуються при кип'ятінні; у їх молекулі вміст діаміномонокарбонових кислот становить близько 80%, особливо багато аргініну. У протамінах не зустрічаються цистеїн, триптофан, аспарагін, найчастіше відсутні тирозин, фенілаланін, тому вони не дають багатьох кольорових реакцій на білок. Завдяки високому вмісту основних амінокислот протаміни являють собою полівалентний органічний катіон, що легко реагує з молекулами, які мають надлишок негативно заряджених груп, наприклад, із нуклеїновими кислотами. Протаміни надають ДНК біологічній інертності, що є необхідною умовою збереження спадкових властивостей організму. Протаміни широко розповсюджені в природі. Вони містяться в статевих клітинах тварин і людині складають основну масу білків хроматину.

Проламіни. Ця група білків дуже поширена в рослинних організмах, добре розчиняється в 60–80% етиловому спирті, до їх складу входить багато проліну, а також глутамінової кислоти. У дуже незначній кількості до складу цих білків входять лізин, аргінін, гліцин.

Глютеліни. Як і проламіни, – це білки рослинного походження, добре розчинні в лужних розчинах (0,2–2% NaOH). До їх складу входить велика кількість глютамінової кислоти і лізину.

Протеїноїди. Це важкорозчинні білки, котрі не розчиняються у воді, розчинах солей та в розчинах кислот і лугів; для їх складу характерною є висока частка сірковмісних амінокислот. До протеїноїдів належать фібрилярні білки: кератини, колагени, фіброїни шовку та ін. Вони відрізняються високою стійкістю й еластичністю. Протеїноїди слабо розщеплюються ферментами кишкового тракту, тому погано засвоюються і сприяють процесам гниття в кишечнику.

Природні пептиди

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

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

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

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

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

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

Глутатіон захищає сульфгідрильні (-SH) групи білків від окислення, входить як небілкова частина до складу деяких ферментів (як кофермент), бере участь у механізмі транспорту амінокислот через клітинні мембрани кишкового епітелію та інших клітин у складі ферменту γ -глутамініл-трансферази, яка знаходиться в мембрані. Бере участь у розкладанні пероксиду водню, що утворюється в еритроцитах внаслідок обмінних процесів або аутоокислення лікарських препаратів, і в детоксикації низки сторонніх для організму сполук (ксенобіотиків), у тому числі лікарських препаратів, шляхом кон'югації (об'єднання) з ними. При цьому утворюються парні, більш розчинні у воді сполуки, які легко виводяться через нирки.

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

Нейропептиди містяться, переважно, у головному мозку. До них належить група так званих опіоїдних пептидів, оскільки вони взаємодіють із тими ж рецепторами, що й опіатні речовини (наприклад, морфін) і близькі до них за своєю дією. Представниками їх є α -, β -, γ -ендорфіни, α - і β -неоендорфіни, динорфін, пентапептиди метіоніненкефалін (тир-глі-глі-фен-мет) та лейцин-енкефалін, який відрізняється від першого останньою амінокислотою: замість метіоніну в лейцин-енкефаліні знаходиться лейцин, що відображено у їхній назві. Опіоїдні пептиди справляють модулюючий вплив на передачу нервових імпульсів у ряді відділів центральної нервової системи (ЦНС). Велику кількість рецепторів зв'язування ендопіоїдів знайдено в гіпоталамусі, таламусі, нейрогіпофізі і ряді інших відділів ЦНС, вони зустрічаються й у периферичній нервовій системі. Ендопіоїди беруть участь у регуляції процесів, пов'язаних зі сприйняттям болю, впливають на серцево-судинну діяльність, стресові реакції та на деякі інші фізіологічні функції. Під час знеболювання голковколуюванням відбувається підвищення їх вмісту в спинно-мозковій рідині, що свідчить про активацію цієї системи. На особливу увагу заслуговує синтез опіоїдних пептидів як лікарських засобів, що виявляють знеболюючу дію і використовуються як замітники наркотичних препаратів. На даний час деякі з опіоїдних пептидів отримані синтетичним шляхом, проте виявилось, що після введення в організм вони швидко руйнуються ферментами. Для підвищення стабільності їх захищають шляхом заміни окремих амінокислот L-ряду на залишки D-амінокислот або створення різних модифікацій амінокислот, які входять до складу опіоїдних пептидів. Подібна заміна лише трохи зменшує їх біоактивність, проте сприяє пролонгованій дії препарату.

Останнім часом з екстрактів тканини передсердя тварин і людини були виділені атріопептиди, які беруть участь у регуляції тонуусу серцево-судинної системи й електролітичного обміну. Фізіологічний ефект їх виявився протилежним стосовно системи ренін-ангіотензин-альдостерон. Атріопептиди

розширюють судини, підсилюють клубочкову фільтрацію, стимулюють виведення натрію і хлоридів за рахунок пригнічення їх реабсорбції в канальцях. Атріопептиди (від лат. atrio – передсердя) побудовані з різної кількості залишків амінокислот – від 23 до 100, але для виявлення біологічного ефекту обов'язковою є присутність у молекулі 17-членного кільця, яке утворюється за рахунок дисульфідного зв'язку між залишками цистеїну.

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

Пептидно-білкову природу мають багато токсичних речовин: токсини отруйних грибів, отрути змій, скорпіонів, бджіл. Найчастіше вони блокують біосинтез білка в клітинах еукаріот. З іншого боку, в деяких грибах у тих же тканинах містяться й антитоксини, які ущільнюють мембрани клітин печінки і знижують їх проникність для токсинів. Вивчення токсинів і антитоксинів становить інтерес у світлі пошуку сполук, які знешкоджують токсини.

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

7. ПІДГОТОВКА ДО ІНТЕГРОВАНОГО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК 1. ФАРМАЦІЯ». (дивись п. 10 списку основної літератури).

8. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

9. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Укажіть якісну реакцію на пептидний зв'язок:

- A. Фоля
- B. Адамкевича
- C. Піотровського
- D. Міллона
- E. Мульдера

2. Укажіть амінокислоту, у якої відсутній асиметричний атом вуглецю:

- A. Ізолейцин
- B. Лейцин
- C. Валін
- D. Метіонін
- E. Гліцин

3. Виберіть із приведеного списку незамінну амінокислоту:

- A. Гліцин
- B. Лізин
- C. Серин
- D. Аланін
- E. Тирозин

4. Виберіть із приведених амінокислот замінну:

- A. Триптофан
- B. Метіонін
- C. Валін
- D. Лізин
- E. Глутамат

5. Назвіть гетероциклічну амінокислоту:

- A. Серин
- B. Лізин
- C. Метіонін
- D. Тирозин
- E. Триптофан

6. Укажіть рівень структурної організації білкової молекули, що зберігається після дії денатуруючих агентів:

- A. Вторинний
- B. Первинний
- C. Третинний
- D. Четвертинний
- E. Вторинний і третинний

7. Укажіть основні типи зв'язків, характерні для первинної структури білкової молекули:

- A. Гідрофобні
- B. Водневі
- C. Дисульфідні
- D. Іонні взаємодії
- E. Пептидні

8. Укажіть основні типи зв'язків, які характерні для вторинної структури білкової молекули:

- A. Гіозв'язки
- B. Ефірні
- C. Пептидні
- D. Водневі
- E. Сили Ван-дер-Ваальса

9. Виберіть визначення поняттю "білковий коефіцієнт" як співвідношення:

- A. Гістонів і протамінів
- B. Альбумінів і глобулінів
- C. Глютелінів і альбумінів
- D. Альбумінів і протамінів

Е. Гістонів і глобулінів

10. Виберіть вірне продовження фрази: "Незамінними амінокислотами" називаються ті, котрі...:

- А. Позитивно заряджені
- В. Негативно заряджені
- С. Синтезуються в організмі
- Д. Не синтезуються в організмі
- Е. Не мають заряду

11. Укажіть білки сироватки крові, що піддаються висолюванню при 50%-ному насиченні амоній сульфатом:

- А. Гістони
- В. Протаміни
- С. Глютеліни
- Д. Альбуміни
- Е. Глобуліни

12. Укажіть білки сироватки крові, які піддаються висолюванню при 100%-ному насиченні амоній сульфатом:

- А. Глобуліни
- В. Глютеліни
- С. Альбуміни
- Д. Гістони
- Е. Протаміни

13. При фракціонуванні білків часто використовується метод адсорбційної хроматографії. Укажіть принцип, що лежить у його основі:

- А. Розходження у сорбуванні
- В. Розходження у розчинності
- С. Розходження у денатурації
- Д. Розходження у ренатурації
- Е. Розходження у рН середовища

14. Укажіть принцип, покладений в основу методу електрофоретичного розділу білків:

- А. Величина молекули білка
- В. Здатність до адсорбції
- С. Специфічність білка
- Д. Здатність до гідролізу
- Е. Величина заряду білка

15. Укажіть метод очищення білка від низькомолекулярних домішок:

- А. Висолювання
- В. Діаліз
- С. Електрофорез
- Д. Гідроліз
- Е. Денатурація

16. Укажіть підготовчу операцію, яка використовується для вивчення амінокислотного складу очищеного від домішок білка:

- А. Гідроліз

- В. Висолювання
- С. Денатурація
- Д. Заморожування
- Е. Розчинення

17. Укажіть білок рослинного походження:

- А. Клупеїн
- В. Інсулін
- С. Оризенін
- Д. Сальмін
- Е. Альбумін

18. Назвіть білки, які входять до складу дезоксирибонуклеопротейнів:

- А. Проламіни
- В. Глютеліни
- С. Глобуліни
- Д. Альбуміни
- Е. Гістони

19. Укажіть найбільш сучасний і найточніший метод визначення тримірної конфігурації білка:

- А. Гідроліз
- В. Ультрацентрифугування
- С. Рентгеноструктурний аналіз
- Д. Хроматографія
- Е. Електрофорез

20. Укажіть принцип, покладений в основу класифікації складних білків:

- А. Хімічна природа білкового компонента
- В. Амінокислотний склад
- С. Розчинність
- Д. Хімічна природа простетичної групи
- Е. Здатність до ренатурації.

9. ЛІТЕРАТУРА (див. с. 127)

ЗАНЯТТЯ № 3

1. ТЕМА: Методи виділення та кількісного визначення білків. Складні білки.

2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ: Біологічні рідини організму – кров, ліквор, жовч, шлунковий і кишковий соки, міжклітинна рідина – містять суміші білків. Особливості фізико-хімічних властивостей білка лежать в основі багатьох прийомів і методів, які використовуються в клініко-біохімічних лабораторіях, фармацевтичній практиці та експериментальній біохімії для їх виділення, очистки, розділення. Для кількісного визначення білків у біологічному матеріалі та лікарських засобах найчастіше застосовують фотоколориметричні і спектрофотометричні методи.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити будову складних білків, їх класифікацію та методи кількісного визначення загального білку в біоматеріалі.

4. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

4.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Загальні уявлення про методи розділення, виділення і очищення білкових препаратів:
 - а) ультрацентрифугування
 - б) діаліз
 - в) електрофорез
 - г) хроматографія.
2. Методи кількісного визначення білків:
 - а) колориметричні методи
 - б) спектрофотометричні методи
3. Класифікація та характеристика складних білків:
 - а) хромопротеїни (гемопротеїни, магній-порфіріни, флавопротеїни)
 - б) нуклеопротеїни (ДНП, РНП)
 - в) ліпопротеїни
 - г) фосфопротеїни
 - д) глікопротеїни
 - є) металопротеїни

5. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ ДО ЗАНЯТТЯ

СКЛАДНІ БІЛКИ

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

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

холопротеїн=апопротеїн +простетична група

Небілковий компонент (простетична група) може по-різному сполучатися з білковим компонентом. В одних випадках він міцноприєднується до

поліпептидного ланцюга за допомогою ковалентних зв'язків (гемоглобін, родопсин, флавопротеїни та ін.), в інших – небілковий компонент з'єднується з білком за допомогою сил слабких взаємодій, як, наприклад, в нуклеопротеїнах та ліпопротеїнах крові. Такі представники складних білків мають властивість легко дисоціювати в розчинах на складові компоненти.

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

Включення до складу молекули білка небілкового компонента надає їй особливі властивості, що не характерні для вільного поліпептидного ланцюга. Так, приєднання ліпиду викликає появу гідрофобної ділянки, за рахунок чого молекула білка набуває здатності вбудовуватися в гідрофобний шар клітинної мембрани; приєднання гема надає молекулі здатності зв'язувати кисень та переносити електрони, а кон'югація з поліпептидним ланцюгом олігосахариду сприяє збільшенню тривалості існування білка в цитоплазмі клітини, оскільки в такому вигляді гальмується його гідроліз протеолітичними ферментами.

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

- змінюється структура активних ділянок білкової молекули (активних центрів ферментів, ділянок зв'язування рецепторних білків та білкових гормонів). І, як наслідок цього, модулюються каталітичні властивості ферментів, спорідненість рецепторів до їх лігандів та лігандів до рецепторів;
- змінюється стійкість білка до гідролізу протеолітичними ферментами та до дії факторів денатурації;
- формуються умови для зворотнього скріплення лігандів, а, значить, для їхнього транспорту в організмі та клітині;
- виникає можливість для вбудови білків у певні внутрішньоклітинні мембрани і забезпечення, тим самим, компартменталізації процесів обміну речовин всередині клітини тощо.

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

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

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

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

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

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

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

Хромопротеїни

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

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

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

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

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

1. Гемоглобін А₁ (HbA₁ – від англ. *adult*– дорослий), вміст якого становить 96 % від загальної кількості Hb.
2. Гемоглобін А₂ (HbA₂) - вміст становить до 2,5 %.
3. Фетальний гемоглобін (HbF від англ. *fetus*- плід) складає 1,5 - 2 %.

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

На рис. 19 схематично представлена будова молекули гемоглобіну.

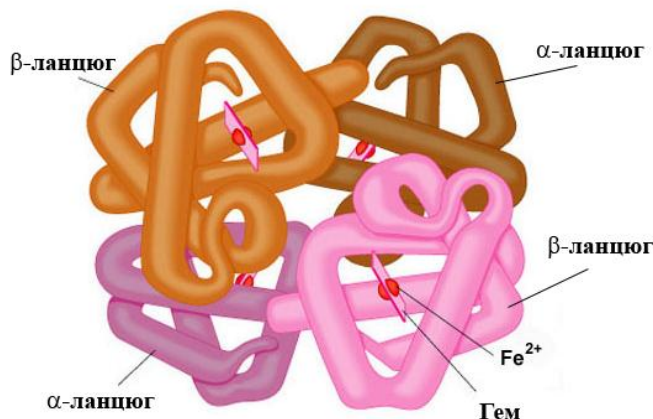


Рис. 19. Модель молекули гемоглобіну (HbA₁)

Молекула гемоглобіну дорослої людини HbA₁, складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів, кожен з яких пов'язаний з одним гемом. Білкова частина молекули гемоглобіну має назву "глобін".

До складу HbA₁ входять 2α- та 2β-ланцюги, які є продуктами експресії двох різних генів і тому мають різну первинну структуру. До складу α-ланцюга входить 141, а до складу β-ланцюга - 146 амінокислотних залишків. За просторовою структурою обидва типи ланцюгів нагадують молекулу міоглобіну (рис. 25). Схематично гемоглобін A₁ записують так: HbA₁ = α₂β₂. В гемоглобіні A₂ замість β субодиниці знаходиться δ: HbA₂ = α₂δ₂, а у фетальному гемоглобіні - γ, тобто HbF = α₂γ₂.

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

Небілковий компонент гемоглобіну – гем. Основою будови гему є порфірин. Порфірин складається з чотирьох пірольних кілець, з'єднаних між собою α-метиновими містками (-CH=). У залежності від хімічної природи груп, які знаходяться в бічному ланцюзі, порфірини мають багато ізомерів. З можливих 15 ізомерів протопорфіринів найпоширенішим виявився протопорфірин IX. Він має в положеннях 4 метильні, 2 вінільні та 2 пропіонільні групи (рис. 20 А). Хелатний комплекс протопорфірину IX з Fe²⁺ називається протогемом IX або гемом.

Атом Феруму, що входить у структуру гема, утворює два ковалентні зв'язки з атомами Нітрогену двох пірольних кілець і два координаційні зв'язки з

двома атомами Нітрогену двох інших пірольних кілець в площині протопорфіринового кільця. Крім цього, він бере участь в утворенні ще двох координаційних зв'язків, які розташовані перпендикулярно до площини протопорфіринового кільця (рис. 20 Б).

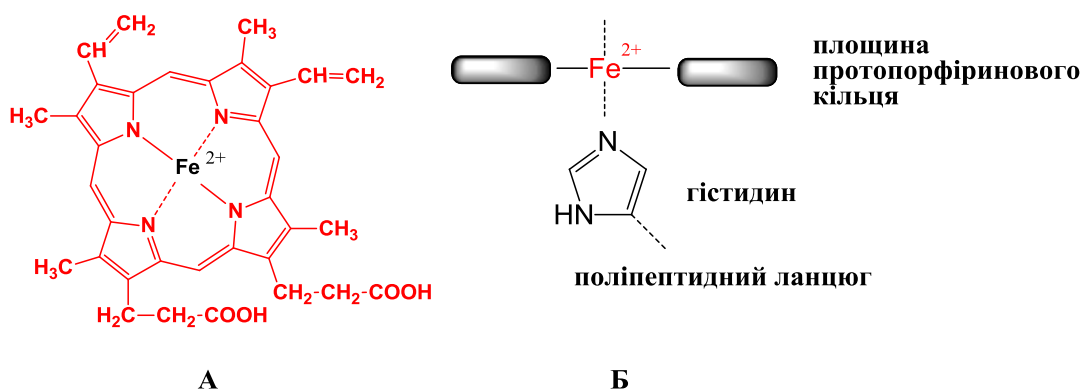


Рис. 20. Зв'язки атома Феруму в гемі гемоглобіну. А - вид зверху; Б - вид збоку (координаційний зв'язок над площиною кільця вільний)

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

Шостий координаційний зв'язок бере участь у приєднанні до гему різних лігандів (молекули кисню, чадного газу або інших сполук). Саме використання шостого координаційного зв'язку атома Феруму гема набуває особливого значення для оборотного приєднання молекули кисню. Процес взаємодії молекули кисню з гемоглобіном можна описати у вигляді наступного рівняння (рис. 21):

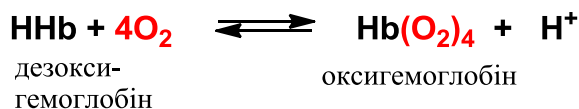


Рис. 21. Приєднання кисню до гемоглобіну

В результаті приєднання кисню до катіону Fe^{2+} гему утворюється *оксигемоглобін* (рис. 22).

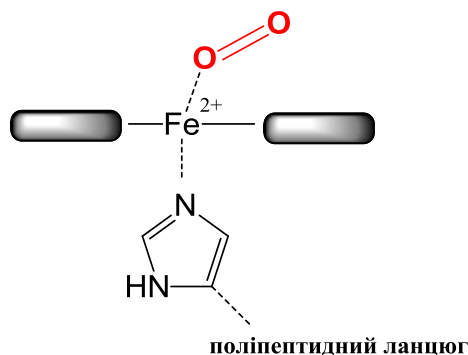


Рис. 22. Схема приєднання кисню до гема при утворенні оксигемоглобіну

Процес утворення оксигемоглобіну супроводжується зміною конформації його поліпептидних ланцюгів. Найбільш виражені зрушення відбуваються в області гема. У початковому стані в структурі дезоксигемоглобіну атом Феруму виступає за площину протопорфіринового кільця в бік залишку гістидину (рис.

23). При приєднанні кисню відбувається втягування атома Феруму в площину кільця. Це сприяє зміні просторової укладки поліпептидного ланцюга, пов'язаного з гемом. У результаті виникнення подібних конформаційних зрушень у молекулі оксигемоглобіну змінюється характер взаємодії поліпептидних ланцюгів один з одним. Молекула оксигемоглобіну стає більш компактною, ніж молекула дезоксигемоглобіну.

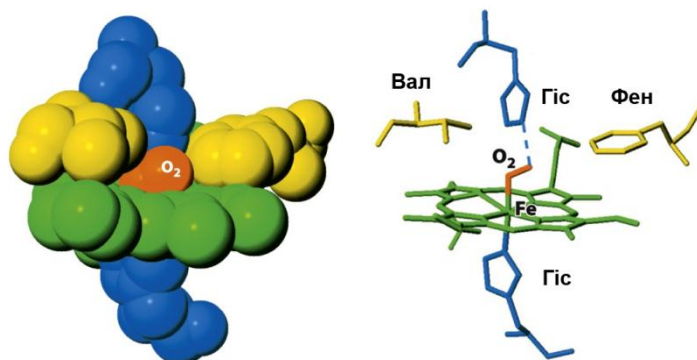


Рис. 23. Зміна конформації поліпептидного ланцюга гемоглобіну в результаті приєднання кисню до гему (Berg J.M. et al., 2006)

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

Конформаційна перебудова поліпептидного ланцюга, що виникає внаслідок приєднання однієї молекули кисню до гему, сприяє різкому підвищенню спорідненості інших трьох гемів молекули гемоглобіну до кисню, полегшуючи його зв'язування.

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

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

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

Регуляторний вплив вуглекислого газу і H^+ на зв'язування та звільнення кисню гемоглобіном пояснюється ефектом Бора. В основі механізму ефекта Бора лежить існування зворотного взаємозв'язку між процесами зв'язування кисню та звільнення H^+ гемоглобіном. Властивість гемоглобіну оборотно зв'язувати кисень та спрямовано транспортувати його від легень до тканин внутрішніх органів залежить від величини парціального тиску кисню ($p\text{O}_2$) в навколишньому середовищі (рис. 24).

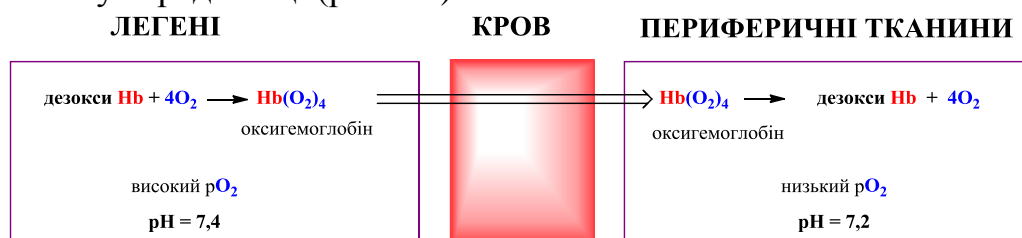
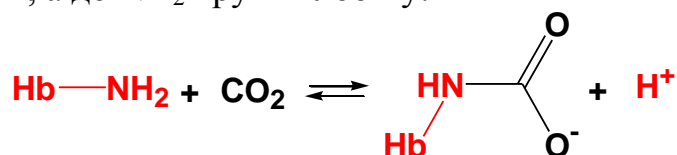


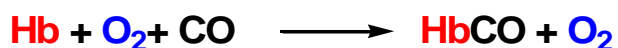
Рис. 24. Спрямований транспорт кисню між легнями й периферичними тканинами

Наступним похідним гемоглобіну є *карбгемоглобін*, який утворюється при взаємодії Hb із вуглекислим газом. В цій сполуці CO_2 приєднується не до катіону Феруму Fe^{2+} , а до NH_2 -групи глобіну:



За таким способом із тканин організму до легень транспортується до 10 - 15 % CO_2 . Реакція зворотна - утворення карбгемоглобіну відбувається в тканинах організму, а його розпад - у легенях.

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



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

Під дією окислювачів у гемоглобіні може відбуватися окиснення катіону Fe^{2+} до катіону Fe^{3+} , що супроводжується утворенням *метгемоглобіну* (єдиний Hb , що містить катіон Fe^{3+}). Метгемоглобін також не здатний зв'язувати і переносити кисень, тобто його фізіологічна дія аналогічна дії CO . Але незначне утворення метгемоглобіну менш небезпечне, ніж HbCO . Тому метгемоглобіноутворювачі використовують як антидоти для лікування отруєнь ціанідами. Метгемоглобін може зв'язувати до 30 % смертельної дози HCN з утворенням малотоксичної сполуки *ціанметгемоглобіну*. Сприяють утворенню

метгемоглобіну метиленова синька, натрій нітрит та інші окисники, які здатні перетворювати катіон Fe^{2+} гему у катіон Fe^{3+} , що супроводжується переходом червоного забарвлення розчину у коричневе (за умов кислої реакції).

У теперішній час для виявлення отруєнь CO або метгемоглобіноутворювачами користуються спектральним аналізом крові у видимій частині елекромагнітного випромінювання. Смуги поглинання HbO_2 і $HbCO$ дуже подібні та розміщені у жовтій та зеленій частинах спектра, але при цьому у $HbCO$ вони зміщені в бік коротких довжин хвиль. Смуга поглинання метгемоглобіну розташована в червоній частині спектра.

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

Гемоглобінопатії зазвичай пов'язані зі зміною первинної структури поліпептидних ланцюгів гемоглобіну (амінокислотні заміни, делеції або вставки). З аномальних типів гемоглобіну, що викликають гемоглобінопатії, найчастіше зустрічається серпоподібноклітинний гемоглобін (HbS), який виявлений у хворих на серпоподібноклітинну анемію. Хімічний дефект при захворюванні на серпоподібноклітинну анемію був розкритий В. Генгредом. Він полягає в заміні однієї єдиної амінокислоти, а саме глутамінової, у 6-му положенні з N-кінця β -ланцюгів молекули гемоглобіну на валін. Це результат мутації в молекулі ДНК, яка кодує синтез β -ланцюга гемоглобіну.

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

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

Молекула міоглобіну складається з одного поліпептидного ланцюга, що містить 153 амінокислотні залишки, і пов'язаного з ним гема. Поліпептидний ланцюг має характерне глобулярне укладання в просторі. Гем розташований в гідрофобній щілині, яка утворюється в процесі формування третинної структури білкової частини молекули (рис. 25). Він приєднується до атома Нітрогену гістидинового залишку поліпептидного ланцюга. Стабілізація зв'язку простетичної групи та поліпептидного ланцюга відбувається за рахунок

взаємодії між тетрапірольним кільцем гема і неполярними амінокислотними радикалами, що формують гідрофобну щілину.

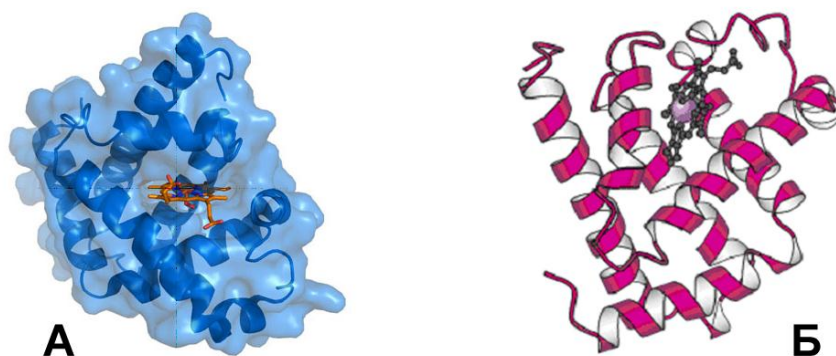


Рис. 25. Тривимірна структура молекули міоглобіну – А (червоним позначено положення гема в молекулі) та її модель – Б (Berg J.M. et al., 2006)

Середній вміст міоглобіну (Mb) становить 0,3% від маси тіла і підвищується у м'язовій тканині при тривалих фізичних навантаженнях. Приблизно так, як це відбувається при утворенні оксигемоглобіну, молекула кисню оборотно приєднується до міоглобіну за рахунок виникнення шостого координаційного зв'язку. При цьому утворюється оксиміоглобін (рис. 26).

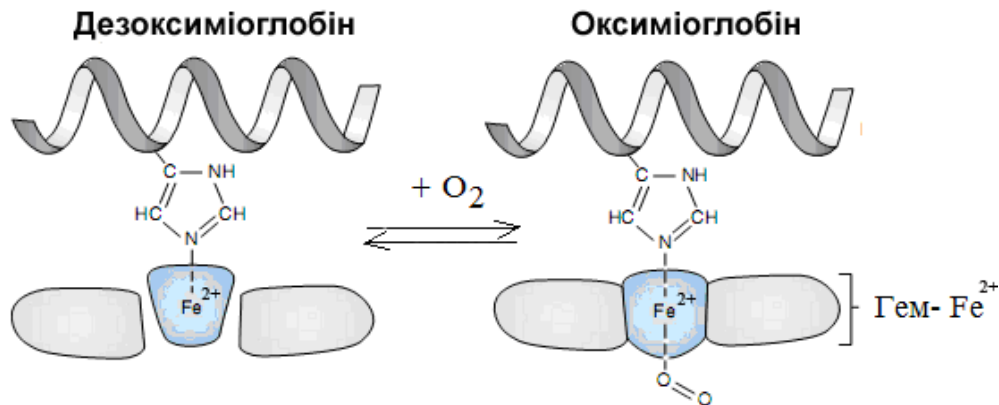


Рис. 26. Механізм приєднання кисню до молекули міоглобіну (Smith C. et al., 2005, зі змін.)

Міоглобін зв'язує O_2 у 5 разів швидше, ніж гемоглобін і створює запас кисню у м'язах. Подібно до Hb міоглобін утворює похідні з чадним газом та ціанідами. За рахунок міоглобіну м'язи набувають червоного кольору, а сам Mb (за даними спектральних досліджень) характеризується широкою смугою поглинання при довжині хвилі 564 нм. Кількість кисню, який зв'язується з міоглобіном («відсоток насичення»), залежить від концентрації кисню в середовищі, яке безпосередньо оточує молекулу білка (цю концентрацію виражають як pO_2 – парціальний тиск кисню). В умовах кисневого голодування (наприклад, у разі великого фізичного навантаження) кисень звільняється з

комплексу з міоглобіном і надходить до мітохондрій м'язових клітин, де здійснюється синтез АТФ (окисне фосфорилування).

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

Відомо близько 30 різних цитохромів, які за спектрами поглинання поділяються на групи *a*, *b*, *c*, *d* (рис. 27). Всі вони є похідними протопорфірину ІХ. Особливості будови гема зумовлюють відмінності у прояві оптичних властивостей цитохромів та значеннях їх редокс-потенціалів. Крім структури бічних радикалів порфіринів, цитохроми відрізняються один від одного будовою білкової частини та способом приєднання гему до білків.

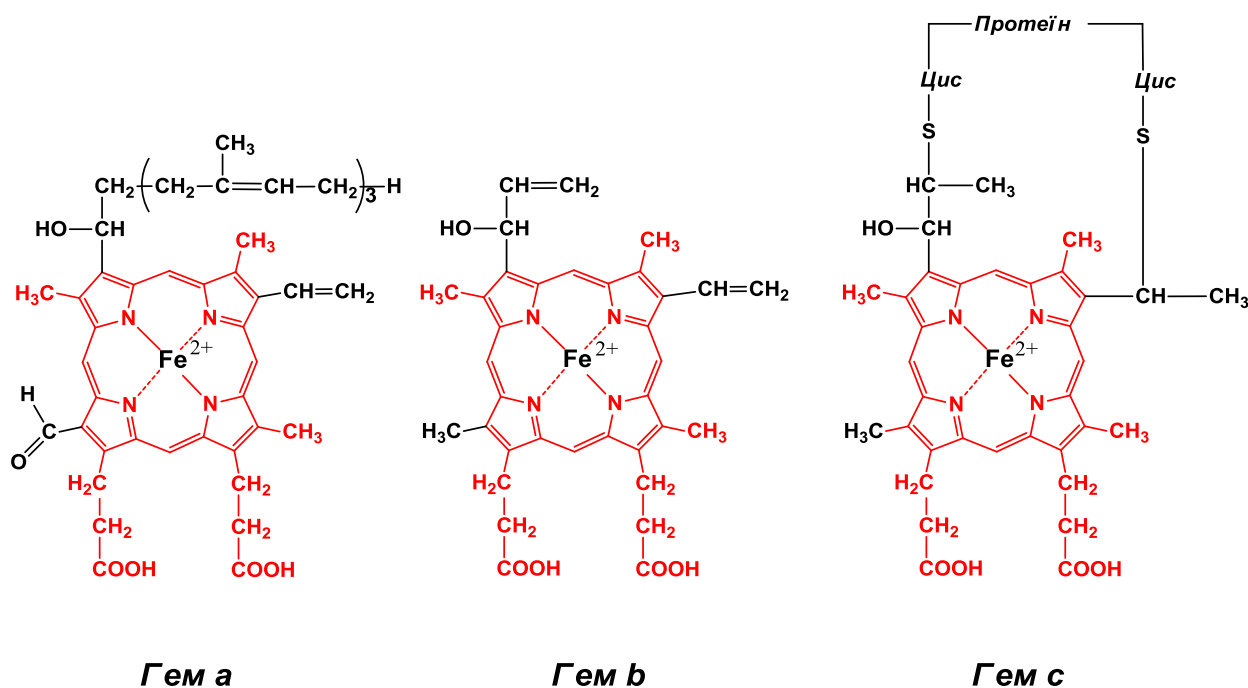


Рис. 27. Різновиди гему, що входить до структури цитохромів

В різних типах цитохромів гем по-різному з'єднується з поліпептидним ланцюгом. Наприклад, цитохроми типу *c*, на відміну від інших, містять міцно зв'язаний з апопротеїном гем. Він ковалентно приєднується за рахунок двох вінілових радикалів до сульфгідрильних груп цистеїнових залишків поліпептидного ланцюга (рис. 27). *Цитохром c* є компонентом дихального ланцюга мітохондрій. Нижче представлено модель цитохрому *c*, що створена на основі детального вивчення його третинної структури (рис. 28).

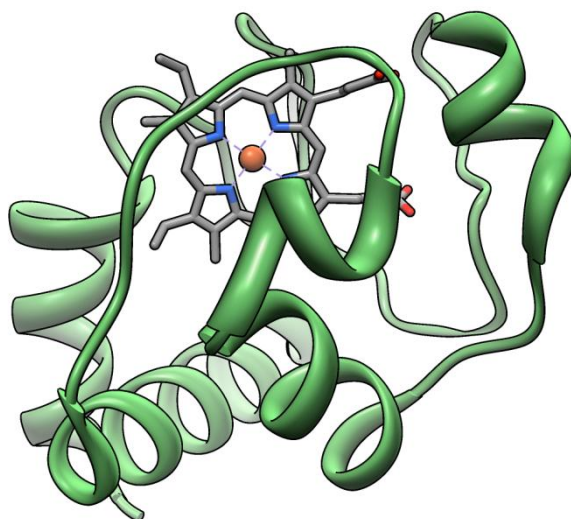


Рис. 28. Модель цитохрому *c* (Bushnell et al., 1990)

В ендоплазматичному ретикулумі печінки міститься ще один широко розповсюджений цитохром – *цитохром P₄₅₀*, названий так тому, що вперше був відкритий у Філадельфії (Philadelphia), США, а комплекс його відновленої форми з CO має максимум поглинання при 450 нм. Цитохром P₄₅₀ містить протогем, подібний до цитохромів групи b, і бере участь у знешкодженні гідрофобних чужорідних для організму молекул (ксенобіотиків). Він є термінальним компонентом мікросомального оксигеназного ланцюга, що забезпечує окиснення ксенобіотиків. Окремі різновиди цього цитохрому задіяні у синтезі холестеролу, стероїдних гормонів та ненасичених вищих жирних кислот.

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

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

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

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

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

Флавопротеїни. Являють собою складні білки, до складу яких в якості простетичної групи входить похідне рибофлавіну – вітаміну B₂. Рибофлавін складається з трициклічної сполуки ізоалоксазину та спирту рибітолу, звідки і походить його назва (рис. 29).

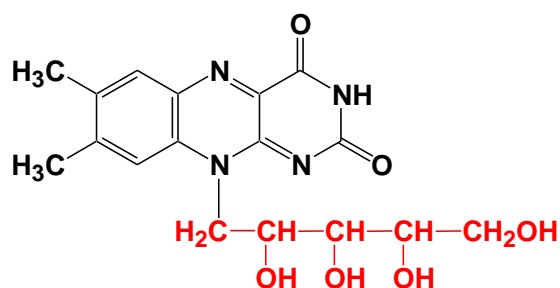


Рис. 29. Будова молекули рибофлавіну

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

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

Слід зазначити, що флавопротеїни являють собою дуже складно побудовані молекули білків. Окрім флавінової групи, вони містять й інші небілкові компоненти. Так, до структури сукцинатдегідрогенази додатково входять ще 3 FeS-центри та гем типу *b*. На рис. 30 представлено структуру молекули сукцинатдегідрогенази. Поряд із мембранозв'язаними зустрічаються також і розчинні флавінові дегідрогенази. Вони локалізуються в цитоплазмі клітин. До них належить широко розповсюджений фермент ксантиноксидаза (див. далі), яка містить атом Молібдену, що входить до складу молібденоптерину.

Молекула складається з 4 субодиниць: двох, що вбудовані у внутрішню мітохондріальну мембрану та двох, що звернені до мітохондріального матріксу. В якості небілкових компонентів до сукцинатдегідрогенази входять: флавінова простетична група – ФАД, 3 FeS- центри та гем типу *b*.

Родопсини - складні білки, у яких апопротеїн (опсин) зв'язаний з простетичною групою, що представлена *цис*-ізомером ретиналю (альдегідної форми вітаміну А) (рис. 31 та 32):

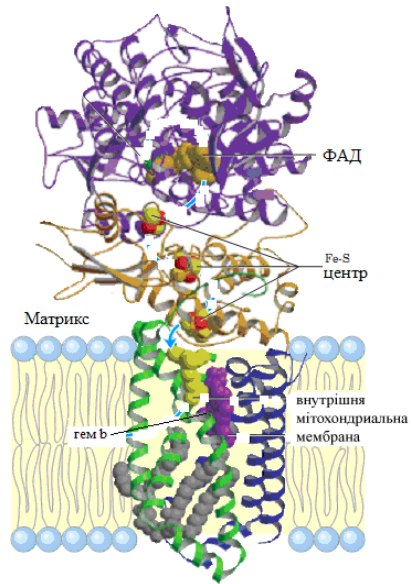
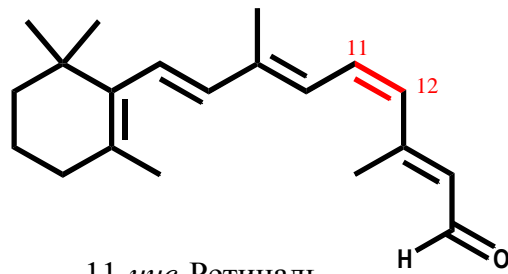


Рис. 30. Сукцинатдегідрогеназа мітохондрій (Nelson D.L., Cox M.M., 2004)



11-цис-Ретиналь

Рис. 31. Структура 11-цис-ретиналю

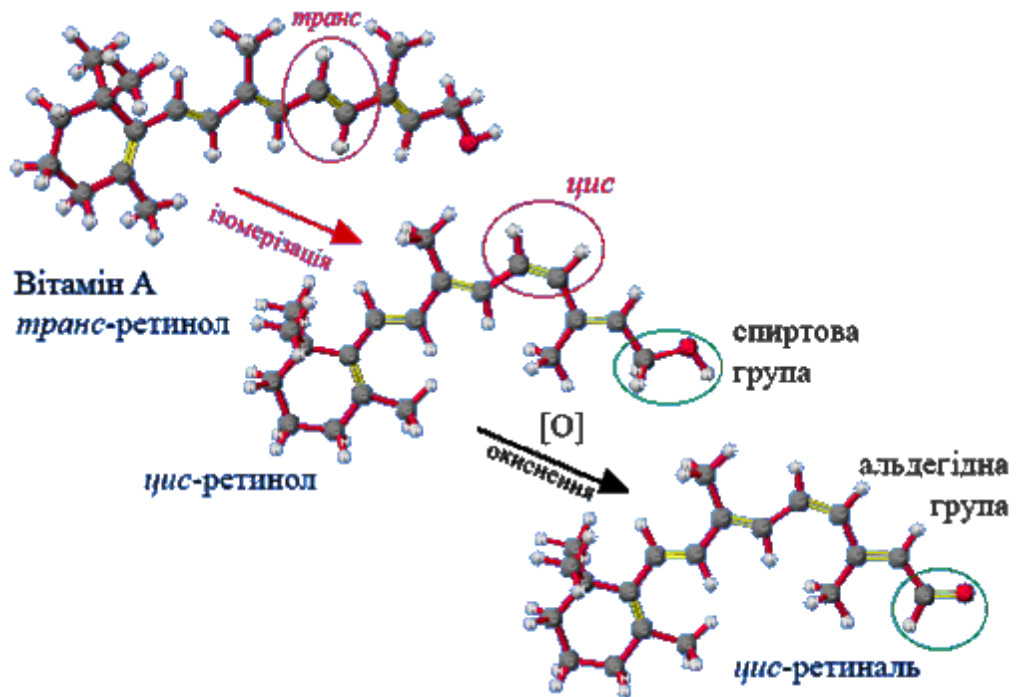


Рис. 32. Утворення 11-цис-ретиналю з вітаміну А

Простетична група приєднується до залишку лізину поліпептидного ланцюга опсину, утворюючи при цьому сполуку типу шиффової основи (рис. 33).

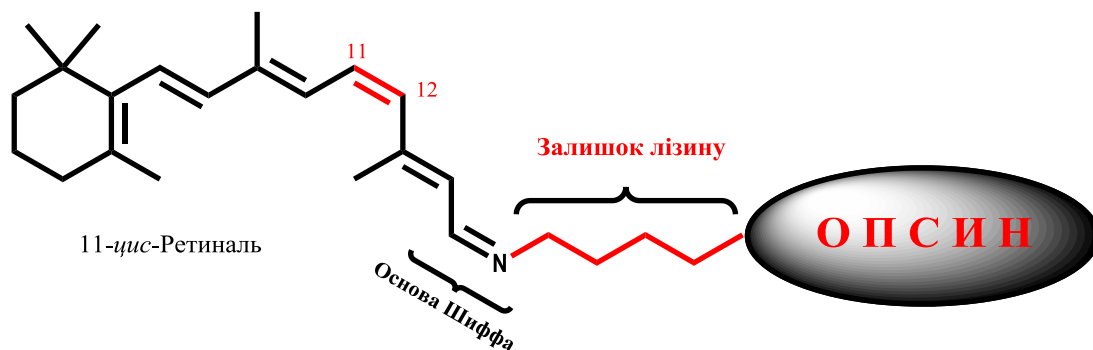


Рис. 33. Сполучення 11-*цис*-ретиналя з лізиновим залишком опсину шляхом утворення шиффової основи

Сітківка ока людини містить рецепторні клітини двох типів – палички та колбочки. *Палички* відрізняються великою світлочутливістю, призначені для зору при малій освітленості (забезпечують сутінковий та нічний зір), і дають чорно-білу картину. *Колбочки* забезпечують кольоровий і денний зір.

В паличках молекула родопсину жорстко вбудована в мембрану диску фоточутливих клітин сітківки ока. Поліпептидний ланцюг опсину укладено таким чином, що він утворює 7 спіральних фрагментів, які наскрізь перетинають мембрану. При цьому залишок ретиналю опиняється в товщі мембрани (рис. 34).

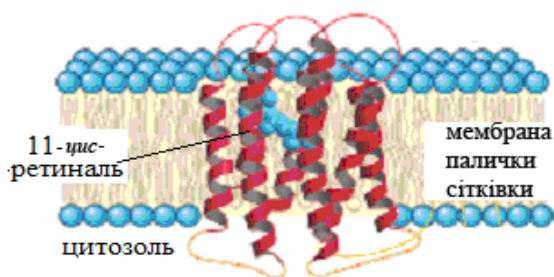


Рис. 34. Розташування родопсину в мембрані палички сітківки ока. З центральною частиною опсину в товщі мембрани зв'язаний залишок 11-*цис*-ретиналю (Nelson D.L., Cox M.M., 2004)

Під впливом кванту світла видимої ділянки спектру відбувається ізомеризація 11-*цис*-ретиналю в *транс*-ретиналь. Шиффова основа лізину з даним ізомером ретиналю існувати не може. Тому родопсин розкладається на вільний опсин та *транс*-ретиналь, що зумовлює його участь в процесі світлосприйняття. Родопсин забарвлений у червоний колір, який йому надає *цис*-ретиналь. При освітленні родопсин знебарвлюється, оскільки утворюється *транс*-ретиналь (безбарвна сполука).

В спеціальних фоточутливих клітинах сітківки ока - колбочках, які забезпечують процес кольорового зору, присутні 3 ізомерні форми родопсину. Вони є продуктами експресії різних генів і тому відрізняються один від одного за первинною структурою поліпептидного ланцюга. Їх характерною

властивістю є відмінності в максимумі спектру поглинання компонентів видимого світла – синього, зеленого та червоного (рис. 35).

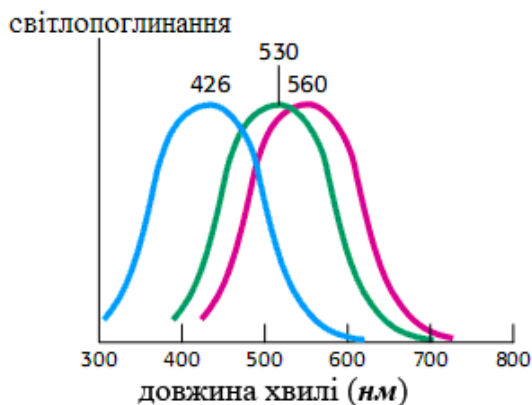


Рис. 35. Спектр поглинання трьох різних ізоформ родопсинів колбочок сітківки ока

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

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

Глікопротеїни

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

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

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

Вуглеводний компонент глікопротеїнів може бути представлений окремими моносахаридними або олігосахаридними залишками, які мають лінійну або розгалужену структуру (рис. 36); при цьому, у молекулі глікопротеїну часто міститься не один, а відразу кілька олігосахаридних залишків.

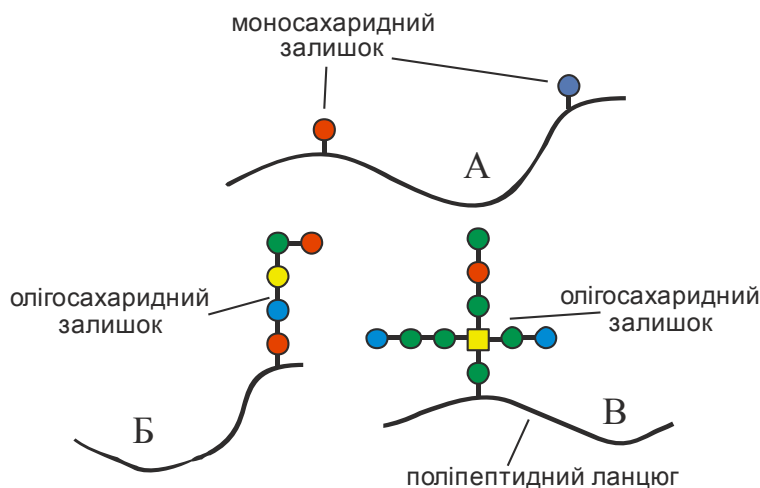


Рис. 36. Різновиди вуглеводних компонентів, що зустрічаються в глікопротеїнах (А – окремі моносахаридні залишки; Б – лінійний олігосахарид; В – розгалужений олігосахарид)

На рис. 37 схематично представлена структура молекули ферменту підшлункової залози - *еластази*, яка містить у своєму складі два олігосахаридних ланцюга.

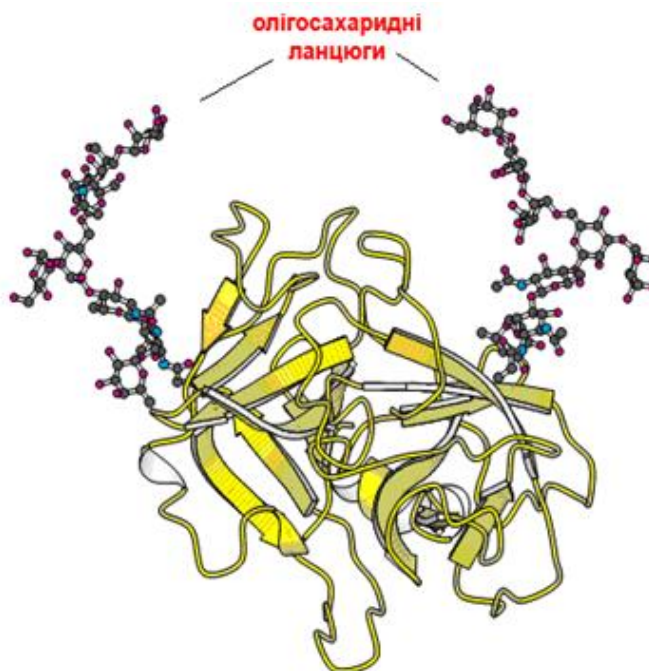


Рис. 37. Модель молекули еластази (Berg J.M. et al., 2006)

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

Існує два основних типи зв'язку між вуглеводним та білковим компонентами у глікопротеїнах. До першого з них належить O-глікозидний, а до другого – N-глікозидний зв'язок відповідно. Переважним типом зв'язку вуглеводного компонента з білковою частиною є N-глікозидний. Він виникає між C¹-ОН радикалом моносахаридного залишку та аміногрупою бокового ланцюга аспарагіну (рис. 38):

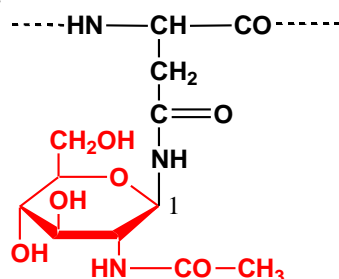


Рис. 38. N-глікозидний зв'язок між N-ацетилглюкозаміном та залишком аспарагіну, що включений до поліпептидного ланцюгу білка

У формуванні O-глікозидного зв'язку між вуглеводом та білком, як правило, беруть участь включені в поліпептидний ланцюг залишки серину (рис. 39). Приєднання вуглеводного компонента за допомогою цього типу зв'язку може відбуватися також із залишком треоніну, а в деяких білках - із залишком нестандартної амінокислоти гідроксипроліну.

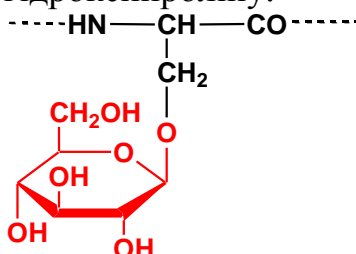


Рис. 39. O-глікозидний зв'язок між глюкозою та залишком серину, що включений до поліпептидного ланцюга білка.

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

Оскільки глікопротеїни мають здатність специфічно приєднувати сигнальні молекули, вони відіграють важливу роль у процесі обміну інформацією між клітиною і зовнішнім середовищем. У зв'язку з цим глікопротеїни входять до складу рецепторів, розташованих на зовнішній

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

Як було зазначено вище, на частку вуглеводного компоненту в протеогліканах може припадати до 95% від загальної маси молекули. На відміну від глікопротеїнів, простетична група яких представлена олігосахаридами, до складу протеогліканів входять глікозаміноглікани (кислі мукополісахариди), що являють собою розгалужені гетерополісахариди.

Молекула глікозаміногліканів утворена дисахаридними залишками, що повторюються. До їх складу, зазвичай, входять похідні аміногексоз (D-глюкозамін або D-галактозамін) та уронові кислоти (глюкуронова кислота, галактуронова кислота тощо). Наявність великої кількості уронових кислот в глікозаміногліканах надає їм кислі властивості та обумовлює появу вираженого негативного заряду на молекулі. До найбільш поширених глікозаміногліканів, що входять до складу протеогліканів, відносяться гіалууронова та хондроїтинсульфатна кислоти, кератансульфати, гепарин та ін. (рис.41).

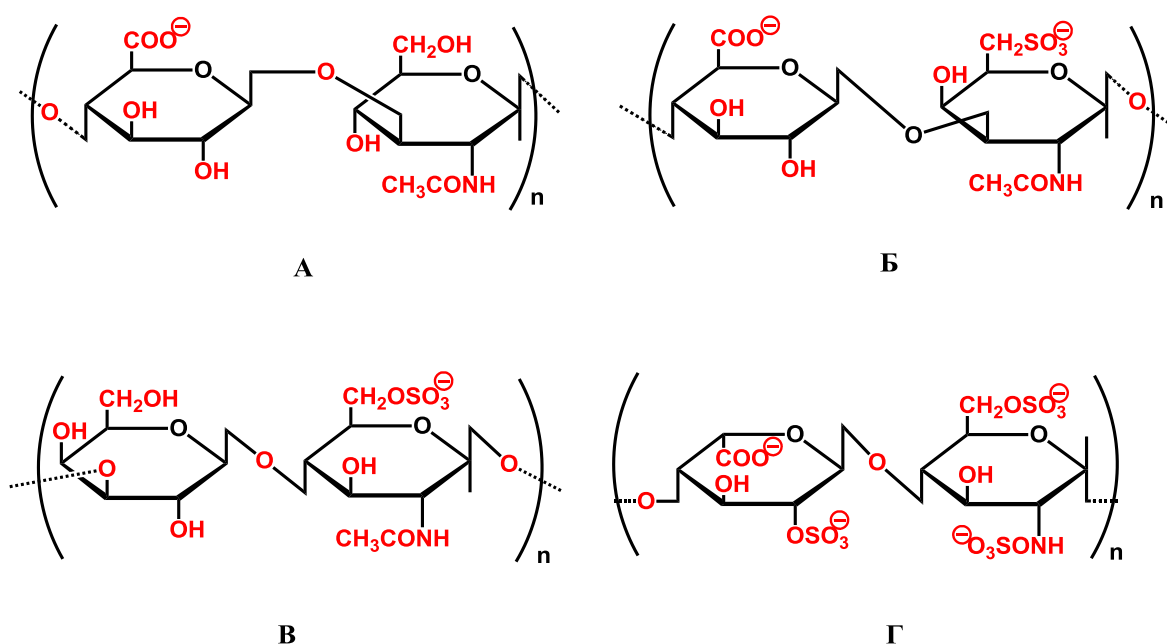


Рис. 41 Структура глікозаміногліканів: гіалууронова кислота (А), хондроїтин-6-сульфатна кислота (Б), кератансульфат II (В) та гепарин (Г)

Приєднання глікозаміногліканів до поліпептидних ланцюгів забезпечується за рахунок міцних ковалентних N- і O-глікозидних зв'язків. При цьому O-глікозидний зв'язок виникає між залишками ксилуози або N-ацетилгалактозаміну та серином поліпептидних ланцюгів. N-глікозидний зв'язок у протеогліканів формується між залишками N-ацетилглюкозаміну та амідною групою аспарагіну. У сполученні глікозаміноглікану з білком, як правило, бере участь специфічний трисахаридний компонент, що містить два залишки галактози і один залишок ксилуози (рис. 42).

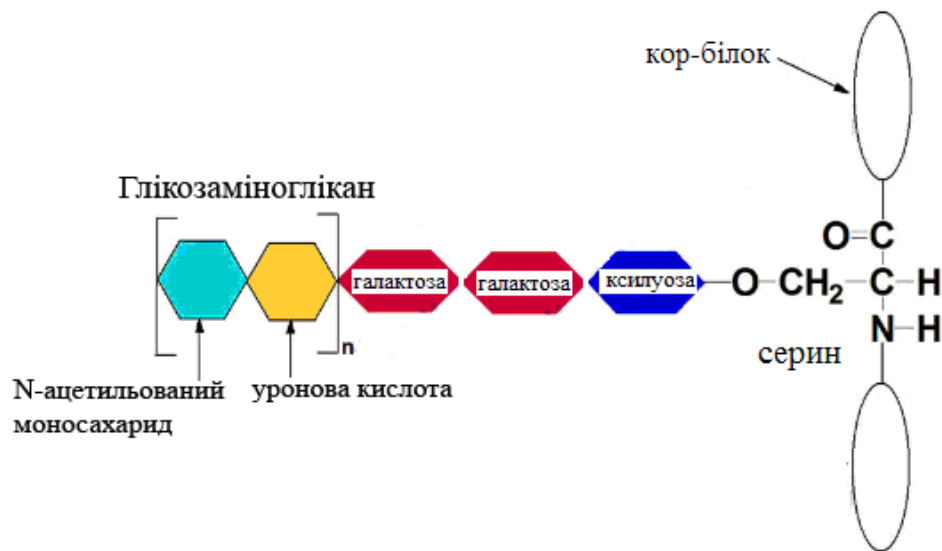


Рис. 42. Приєднання глікозаміноглікану через трисахаридний залишок до серину, включеному до складу поліпептидного ланцюга

Як було зазначено вище, молекула протеоглікану має складну гіллясту структуру. Типова молекула протеоглікану складається з центрального поліпептидного ланцюга – кору (від англ. *core* – серцевина, ядро), до якого приєднані різні глікозаміноглікани, переважно хондроїтинсульфати, кератансульфати (рис. 43 А). Далі, за умов взаємодії в міжклітинному матриці сполучної тканини, утворюються складні протеогліканові комплекси з молекулою гіалуронової кислоти посередені та бічними ланцюгами протеогліканів («ялинка з ялинок»). Встановлено, що з однією молекулою гіалуронової кислоти може сполучатися до 150 молекул сульфатованих протеогліканів (рис. 43 Б).

Глікозаміногліканові компоненти протеогліканів (як полівалентні аніони) зв'язують значну кількість екстрацелюлярного Na^+ та, відповідно, H_2O , що зумовлює механізм участі тканинних протеогліканів у регуляції водно-сольового обміну.

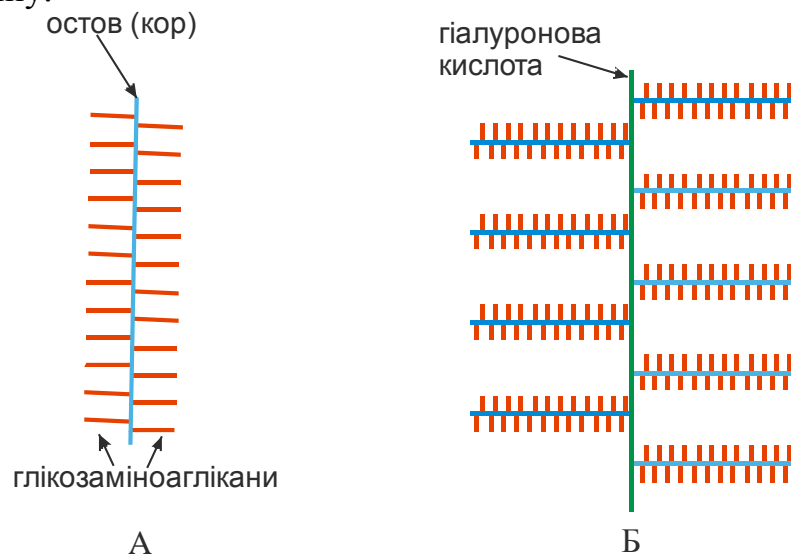


Рис. 43. Будова протеоглікану (А) та фрагмент комплексу гіалуронової кислоти з протеогліканами (Б)

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

Ліпопротеїни

До ліпопротеїнів належать складні білки, у яких в якості небілкового компоненту виступають різноманітні ліпіди (вищі жирні кислоти, фосфоліпіди, похідні ізопрену тощо). Найбільше значення в біохімії мають ліпопротеїни, в складі яких ліпіди знаходяться в плазмі крові людини, та ліпопротеїни, що є інтегральними компонентами біологічних мембран.

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

Залишок міристинової кислоти зазвичай приєднується до вільної аміногрупи N-кінцевої амінокислоти поліпептидного ланцюга білка (рис. 44). На відміну від міристинової, пальмітинова кислота приєднується до поліпептидного ланцюга шляхом утворення тіоестерного зв'язку із залишком цистеїну. Таким чином, залишок пальмітинової кислоти входить до складу білка рецептора трансферину (рис. 44).

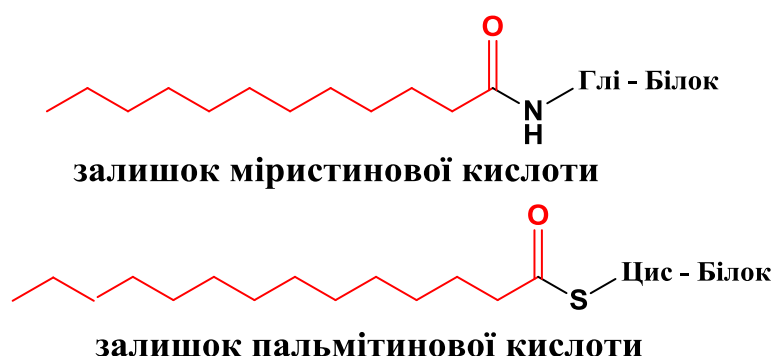


Рис. 44. Приєднання залишку міристинової та пальмітинової кислот до поліпептидного ланцюга ліпопротеїну

Зазвичай у структурі ліпопротеїнів виявляються похідні ізопрену, до яких, зокрема, належить лінійний терпен фарнезил (рис. 45). Ізопреноїди вбудовуються до складу молекули ліпопротеїну за рахунок утворення тіоестерного зв'язку із залишком цистеїну, що розташований з С-кінця поліпептидного ланцюга.

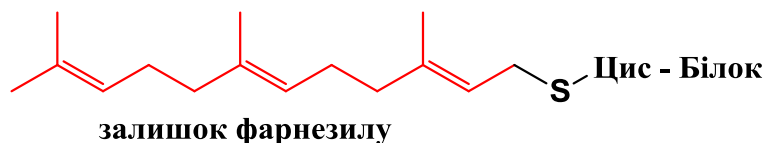


Рис. 45. Приєднання залишку фарнезилу до поліпептидного ланцюга ліпопротеїну

До складу деяких ліпопротеїнів входить залишок фосфоліпиду - фосфатидилінозиту. Він сполучається з поліпептидним ланцюгом в ділянці її С-кінця, за рахунок послідовного зв'язування з N-ацетилглюкозаміном, трьома залишками манози та фосфатоетаноламіном (рис. 46). Подібна гліколіпідна структура утворює своєрідний якір ліпопротеїну, який жорстко фіксує його в ліпідному бішарі клітинної мембрани. В такому стані білок виявляється на її зовнішній (екстраклітинній) поверхні. Представниками подібних ліпопротеїнів є ферменти: лужна фосфатаза та 5'-нуклеотидаза.



Рис. 46. Схема будови молекули ліпопротеїну, що містить в складі залишок фосфатоетаноламіну (GN - N-ацетилглюкозамін, M3 - три послідовно зв'язаних залишки манози, I - залишок інозитулу)

Як вже зазначалося раніше, у більшості своїй ліпопротеїни є мембранозв'язаними білками. Ліпідний компонент дозволяє їм жорстко вбудовуватися в гідрофобний шар мембрани і тому виконувати характерну для них функцію в безпосередній близькості від неї (рис. 47). Зв'язування білка з мембраною збільшує його локальну концентрацію в клітині і підвищує ефективність взаємодії з іншими мембранними білками й субстратами.

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

До ліпопротеїнів належать також ліпопротеїни плазми крові, які є надмолекулярними сферичними частинками, що складаються з білків і ліпідів. Між компонентами ліпопротеїнів крові відсутні міцні ковалентні зв'язки.

Взаємозв'язок між білками й ліпідами в них забезпечується за рахунок сил слабких взаємодій – переважно гідрофобних, водневих та ван-дер-ваальсових зв'язків.

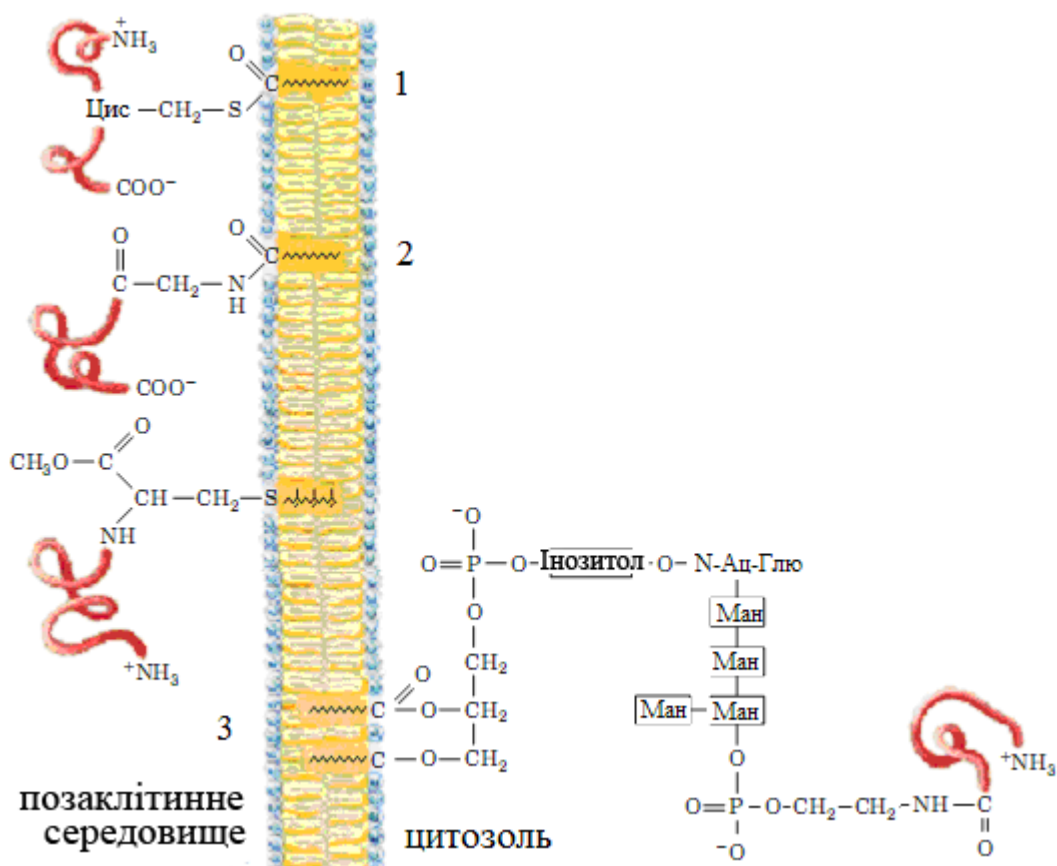


Рис. 47. Топографія різних типів ліпопротеїнів в клітинній мембрані. Ліпопротеїни, що містять в структурі: 1 – міристинову кислоту; 2 – пальмітинову кислоту; 3 – фосфатиділінозитол (за Nelson D.L., Cox M.M., 2004)

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

Ліпопротеїнова частка має міцелярну структуру. Вона складається з гідрофільної оболонки та гідрофобного ядра (рис. 48).

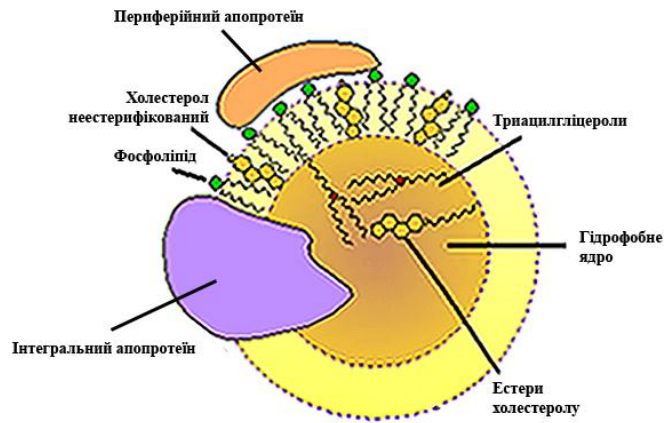


Рис. 48. Схема будови ліпопротеїнів плазми крові (Губський Ю.І., 2007)

До складу гідрофільної оболонки входять білкові молекули (апопротеїни), а також полярні групи окремих ліпідів - фосфоліпідів і холестеролу. Гідрофільна оболонка ліпопротеїнової частинки знаходиться в контакт з водою. Гідрофобне ядро утворене неполярними ліпідними молекулами - тригліцеридами, естерами холестеролу, а також неполярними функціональними групами фосфоліпідів і холестеролу. На відміну від гідрофільної оболонки, гідрофобне ядро повністю ізольовано від контакту з полярними молекулами води. За рахунок цього формується стійка у воді частинка, що має форму міцели. У її складі гідрофобні ліпідні молекули транспортуються по крові.

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

За щільністю ліпопротеїни крові розподіляються на такі основні класи:

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

Нижче в таблиці 4 наведені відомості щодо щільності, а також ліпідного та білкового складу основних класів ліпопротеїнів крові:

Таблиця 4

Компонентний склад ліпопротеїнів

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

Хіломікрони	<0,95	1,5 – 2,5	2 – 3	3 – 5	7 – 9	85 – 90
-------------	-------	-----------	-------	-------	-------	---------

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

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

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

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

Нуклеопротейни

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

- рибонуклеопротейни;
- дезоксирибонуклеопротейни.

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

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

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

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

Білковий компонент нуклеопротейнів у людини та тварин переважно представлений гістонами та протамінами (лужні білки з $pH_1 = 10$). Характерною особливістю їх будови є присутність в поліпептидних ланцюгах великої кількості діаміномонокарбонових кислот, до числа яких належить аргінін та лізин. Частка цих амінокислот може сягати до 25 % від маси білка.

Особливе значення серед простих білків, що входять до складу дезоксирибонуклеопротейнів, належить гістонам. В клітинах зустрічається 5 класів цих білків. Їх представники відрізняються один від одного за вмістом

амінокислотних залишків аргініну й лізину та локалізацією в нуклеосомі (табл. 5).

Таблиця 5

Гістони ядерного хроматину

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

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

В інтерфазних клітинах, що не діляться, дезоксирибонуклеопротейни утворюють особливу ядерну субстанцію – *хроматин*, який містить близько 60 % білка, 35 % ДНК та 5 % РНК. Хроматин представлений хроматиновими волокнами, що утворюють особливі структури – нуклеосоми. Нуклеосоми мають форму намиста. При їх формуванні нуклеїнова кислота обмотує комплекси з 8 різноманітних гістонів - по 2 молекули гістонів H_{2A}, H_{2B}, H₃ і H₄, які формують ядро нуклеосоми – нуклеосомний кор. На цей кор майже двічі (1,75 витка) щільно намотана подвійна спіраль ДНК, довжиною близько 150 нуклеотидних пар. Між нуклеосомами розташовується лінкерна ділянка ДНК, довжиною до 50 нуклеотидних пар, яка пов'язана з гістоном H₁, що захищає ці ланки від дії нуклеаз. Утворення нуклеосом дозволяє щільно упакувати надзвичайно довгу молекулу ДНК всередині ядра клітини (рис. 49).

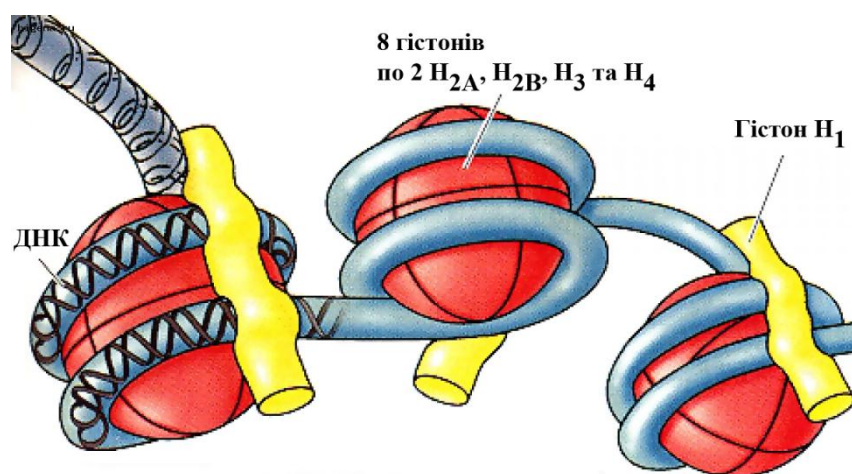


Рис. 49. Будова нуклеосоми (The Columbia Electronic Encyclopedia, 6th ed., 2008)

В клітинних ядрах, що діляться, дезоксирибонуклеопротейни утворюють особливі структури - *хромосоми* (рис. 50).

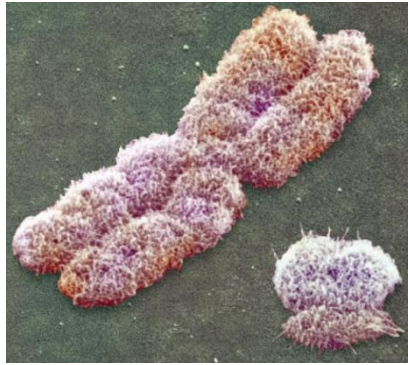


Рис. 50. Вид X та Y-хромосоми в світловий мікроскоп (Huntington F. Willard, 2003)

До складу хромосоми входять гістони та негістонові основні білки, а також одна дволанцюгова молекула ДНК. До ядра клітини кожного виду живих організмів входить певна, характерна для нього, кількість хромосом. Так, наприклад, в ядрах соматичних клітин організму людини міститься 46, щура – 38, жаби – 26 хромосом.

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

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

Фосфопротейіни

До фосфопротейінів належать складні білки, що в якості небілкового компонента мають залишки ортофосфатної кислоти. Вони приєднуються за допомогою складнофірного зв'язку до гідроксильних груп β-оксіамінокислот: серину й треоніну, що входять до складу поліпептидного ланцюга (рис. 51А). Рівень фосфопротейінів у клітині залежить в значній мірі від регулюючої дії ферментів, що каталізують фосфорилування (протеїнкінази) та дефосфорилування (протеїнфосфатази). Ці білки знаходяться в молоці, ікрі риби, жовтку курячого яйця. Велика кількість фосфопротейінів міститься в ЦНС.

Найбільш поширеним серед фосфопротейінів є білок молока *казеїн*, на частку якого припадає до 80 % всіх білків молока. До складу молока казеїн входить у формі кальцієвої солі (рис. 51Б).

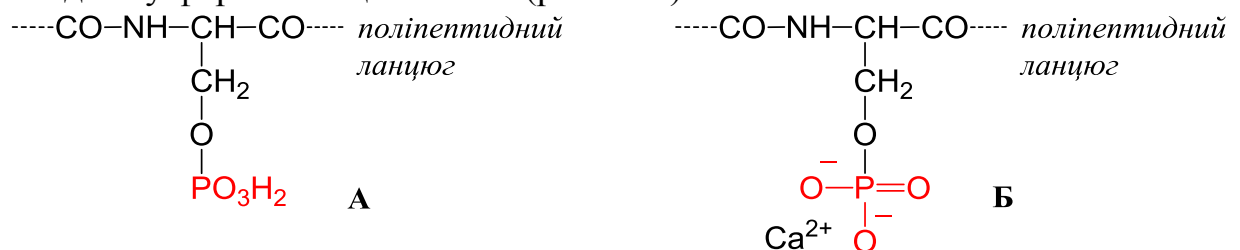


Рис. 51. Приєднання залишку ортофосфатної кислоти до серину поліпептидного ланцюга фосфопротейіну (А) та утворення кальцієвої солі (Б)

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

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

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

Розглядаючи фосфопротеїни, необхідно звернути особливу увагу на те, що багато внутрішньоклітинних білків можуть оборотно включати до свого складу залишок ортофосфатної кислоти. В якості його донора виступає молекула АТФ. Включення до складу білка кислоти (фосфорилування білка) змінює конформацію його поліпептидного ланцюга і, як наслідок, його властивості. З цієї причини оборотне фосфорилування внутрішньоклітинних білків виступає в якості одного із закріплених в процесі еволюції шляхів регуляції каталітичної активності ферментів, а також спорідненості рецепторних білків до їх лігандів. У зв'язку з цим фосфопротеїни надзвичайно поширені в живих організмах. Вони містять зв'язаний лабільний фосфат, який є необхідним для виконання клітиною ряду біологічних функцій. Фосфопротеїни також є цінним джерелом енергетичного та пластичного матеріалу в процесах ембріогенезу та розвитку організму.

Металопротеїни

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

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

Представниками металопротеїнів є такі широко поширені білки:

- *феритин* й *трансферин*, а також *залізо-сірчані білки* дихального ланцюга мітохондрій (містять Fe^{2+});

- *алкогольдегідрогеназа, РНК-полімераза й ДНК-полімераза, матриксні металопротеїнази* (містять Zn^{2+});
- *цитохромоксидаза, супероксиддисмутаза й церулоплазмін* (містять Cu^{2+});
- *ксантиноксидаза і нітрогеназа* (містять Mo);
- *метилмалоніл-КоА-мутаза* (містить Co^{2+});
- *Mn-супероксиддисмутаза* (містить Mn^{2+}) та багато інших.

Металопротеїни часто проявляють каталітичні властивості. Вони, як правило:

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

Розглянемо особливості будови деяких представників металопротеїнів. *Залізо-сірчані білки дихального ланцюга мітохондрій*. Включають до свого складу один або кілька атомів Феруму, пов'язаних з атомами неорганічної сірки або атомами Сульфуру, що входять до складу залишків цистеїну поліпептидного ланцюга апопротеїну (рис. 52).

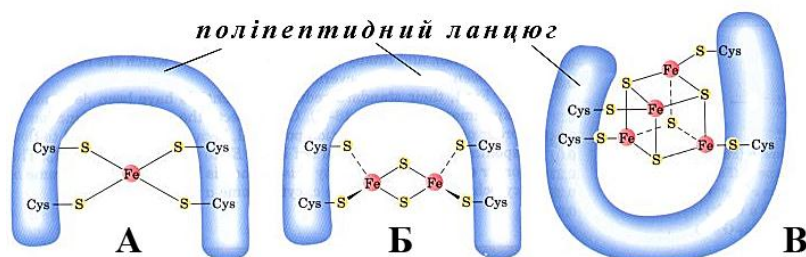


Рис. 52. Залізо-сірчані кластери (центри): А – залізо-сірчаний центр типу (FeS), що містить 1 атом Fe; Б – залізо-сірчаний центр типу (Fe₂S₂), що містить 2 атоми Fe; В – залізо-сірчаний центр типу (Fe₄S₄), що містить 4 атоми Fe (Nelson D.L., Cox M. M., 2004)

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

Феритин. Це дуже великий за масою білок, що складається з 24 поліпептидних ланцюгів, які утворюють його окремі субодиниці (рис. 53). Об'єднані в спільну молекулу, субодиниці формують оболонку, що оточує центральне ядро, яке містить складний гідроксиферум(II) ортофосфат. Одна молекула феритину може зв'язувати від 4000 до 5000 атомів Феруму, тому його молекулярна маса сягає 747 000 кДа.

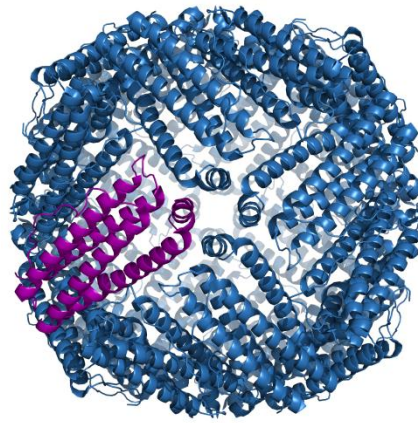


Рис. 53. Модель молекули феритину (Granier T. et al., 2003)

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

Cu-Zn-супероксиддисмутаза. Являє собою фермент, який знаходиться в цитозолі клітин еукаріот. Забезпечує дисмутацію (розпад) супероксидного аніон-радикалу $O_2^{\cdot-}$, з цієї причини, захист клітини від пошкодження вільними радикалами. Cu-Zn-супероксиддисмутаза є гомодимером. Вона складається з двох ідентичних поліпептидних ланцюгів (рис. 54), кожен з яких приєднує до себе по одному атому Цинка та Купруму. Атоми металів зв'язуються із залишками гістидину й аспарагінової кислоти та створюють локальний позитивний заряд в активному центрі ферменту. За рахунок цього негативно заряджена молекула субстрату (супероксид-аніону) набуває можливості сполучатися з активним центром.

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

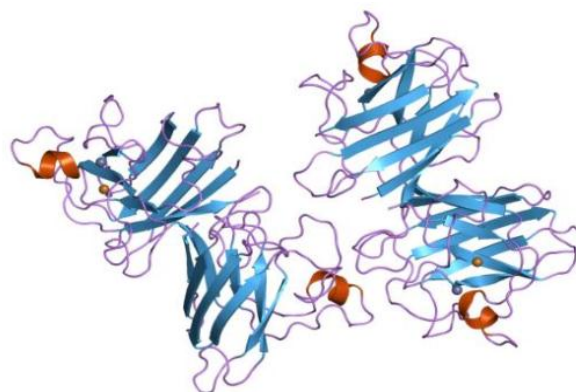


Рис. 54. Модель димеру Cu-Zn-супероксиддисмутази

Ксантиноксидаза. Являє собою великий білок з двома атомами Молібдену (рис. 55), 8 атомами Феруму, які формують в апопротеїні залізо-сірчані центри, та двома флавіновими простетичними групами (ФАД).

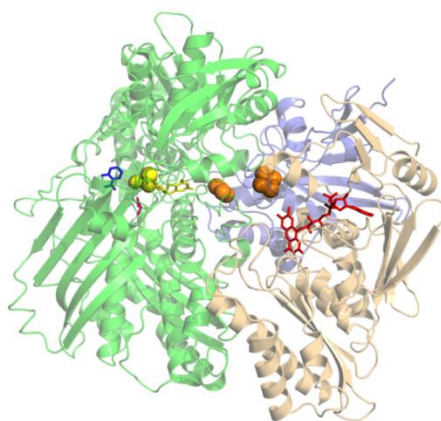


Рис. 55. Модель молекули ксантиноксидази (атом Молібдену помічено жовтим кольором) ()

Атоми Молібдену формують структуру молібденоптерина, який долучається до складу каталітичної частини активного центру фермента (рис. 56).

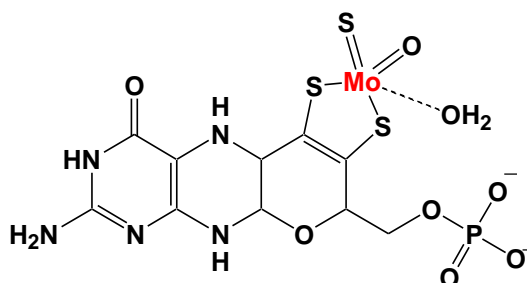


Рис. 56. Положення атома Молібдену в складі молібденоптерина

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

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

Молекула церулоплазміну складається з одного поліпептидного ланцюга, з яким зв'язано 4 олігосахаридних залишки та 6-7 атомів Купруму (іони Cu^{2+}), які сполучені з залишками гістидину у складі апопротеїну (рис. 57).

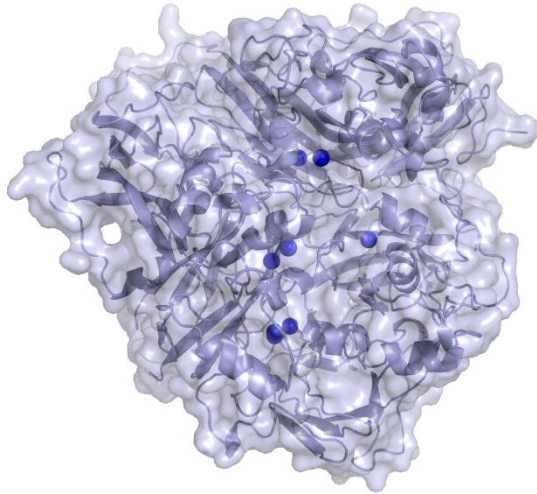


Рис. 57. Модель молекули церулоплазміну крові людини. Синім кольором позначені атоми Купруму (Zaitseva I. et al, 1996)

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

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

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

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

6. ПІДГОТОВКА ДО ІНТЕГРОВАНОГО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК 1. ФАРМАЦІЯ». (див. п. 10 списку основної літератури).

7. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

8. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Укажіть білки сироватки крові, що піддаються висолюванню при 50%-ному насиченні амоній сульфатом:

- A. Гістони
- B. Протаміни
- C. Глютеліни
- D. Альбуміни
- E. Глобуліни

2. Укажіть білки сироватки крові, які піддаються висолюванню при 100%-ному насиченні амоній сульфатом:

- A. Глобуліни
- B. Глютеліни
- C. Альбуміни
- D. Гістони
- E. Протаміни

3. При фракціонуванні білків часто використовується метод адсорбційної хроматографії. Укажіть принцип, що лежить у його основі:

- A. Розходження у сорбуванні
- B. Розходження у розчинності
- C. Розходження у денатурації
- D. Розходження у ренатурації
- E. Розходження у рН середовища

4. Укажіть принцип, покладений в основу методу електрофоретичного розділу білків:

- A. Величина молекули білка
- B. Здатність до адсорбції
- C. Специфічність білка
- D. Здатність до гідролізу
- E. Величина заряду білка

5. Укажіть метод очищення білка від низькомолекулярних домішок:

- A. Висолювання
- B. Діаліз
- C. Електрофорез
- D. Гідроліз
- E. Денатурація

6. Укажіть підготовчу операцію, яка використовується для вивчення амінокислотного складу очищеного від домішок білка:

- A. Гідроліз
- B. Висолювання
- C. Денатурація
- D. Заморожування
- E. Розчинення

7. Укажіть білок рослинного походження:

- A. Клупеїн
- B. Інсулін
- C. Оризенін

- D. Сальмін
- E. Альбумін

8. Назвіть білки, які входять до складу дезоксирибонуклеопротейнів:

- A. Проламіни
- B. Глютеліни
- C. Глобуліни
- D. Альбуміни
- E. Гістони

9. Укажіть найбільш сучасний і найточніший метод визначення тримірної конфігурації білка:

- A. Гідроліз
- B. Ультрацентрифугування
- C. Рентгеноструктурний аналіз
- D. Хроматографія
- E. Електрофорез

10. Укажіть принцип, покладений в основу класифікації складних білків:

- A. Хімічна природа білкового компонента
- B. Амінокислотний склад
- C. Розчинність
- D. Хімічна природа простетичної групи
- E. Здатність до ренатурації.

9. ЛІТЕРАТУРА (див. с. 127)

ЗАНЯТТЯ № 4

1. **ТЕМА:** Будова й фізико-хімічні властивості білків-ферментів.

Класифікація й номенклатура ферментів.

2. **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.

3. **МЕТА ЗАНЯТТЯ:** Вивчити біохімічні закономірності будови та функціонування різних класів ферментів. Вміти показати на прикладах відмінність ферментів від небіологічних каталізаторів (специфічність дії, високу ефективність каталізу, здатність діяти в м'яких умовах та ін.).

4. **ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.**

4.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

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. Загальні властивості ферментів: специфічність дії; вплив рН і температури середовища на активність ферментів.
4. Ізоферменти: особливості структури, локалізації синтезу в організмі людини (на прикладі ізоферментів лактатдегідрогенази).
5. Класифікація і номенклатура ферментів. Характеристика типів хімічних реакцій, які лежать в основі класифікації ферментів.

5. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

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 уреазу. У 1930 р. Д. Нортроп виділив кристалічний пепсин, а згодом трипсин і хілотрипсин. 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 XX 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 денатурують 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: СООН-групи дикарбонових амінокислот, NH₂-групи лізину, SH-групи цистеїну та дисульфідні цистину, ОН-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, уреазы – 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°С. 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 Р-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°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°C); її зростання призводить до денатурації білкової молекули фермента та, відповідно, зниження швидкості реакції або повної її зупинки. При температурі 100°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 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 (метаболічні шляхи) дія ферментів строго впорядкована: продукт однієї ферментативної реакції слугує субстратом для іншої. Їх 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⁺-оксидоредуктаза, де L-Лактат – це субстрат, тип каталізованої реакції – окиснювально-відновна в присутності кофермента НАД⁺.

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 ⁺ , НАДФ ⁺ , ФАД, ФМН, убіхінон, металопорфірини, глутатіон, ліпоєва кислота
2	Трансферази	Перенесення різних хімічних груп (карбоксильних, метильних, аміно-, сульфогруп від одного субстрату до іншого	Аспартатамінотрансфераза, 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	Дезамінази, дегідратази, альдолаза	ПАЛФ, КоА, ТДФ, Дезоксіденозилкобаламін
5	Ізомерази	Ізомерні перетворення в межах однієї молекули	Рацемаза, глюкозо-6-фосфатізомераза, фосфогліцератмутаза	ПАЛФ, дезоксіденозилкобаламін, глутатіон
6	Лігази	Приєднання молекул одна до одної з використанням 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, NH_2 -, NH -, 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 редуцтазами.

Трансферази. До класу трансфераз належать ферменти, що каталізують реакції міжмолекулярного перенесення різних атомів, груп атомів і радикалів: ті, що переносять CH_3 - групи, називають метилтрансферазами, переносники 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 фосфорилування 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); гідролази, а за тривіальною номенклатурою – дегідратази (наприклад, карбангідраза розщеплює карбонатну кислоту на CO_2

і H_2O), 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:аміакліазу (рекомендована скорочена назва «глутамінсинтетаза»), за участю якої із глютамінової кислоти й аміаку в присутності АТФ синтезується глютамін. Іншу назву – синтетази – ці ферменти отримали завдяки тому, що вони є каталізаторами біосинтетичних процесів. Прикладом можуть бути: аміноацил-тРНК-синтетаза (каталізує приєднання амінокислоти до молекули тРНК у процесі біосинтезу білків) та ацетил-КоА-синтетаза (каталізує конденсацію ацетатної кислоти і КоА), карбоксилази (каталізують зв’язування 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 α -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, NAD^+ , NADP^+). 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^{2+} служать активаторами протеїнази С, іони Cl^- – 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.

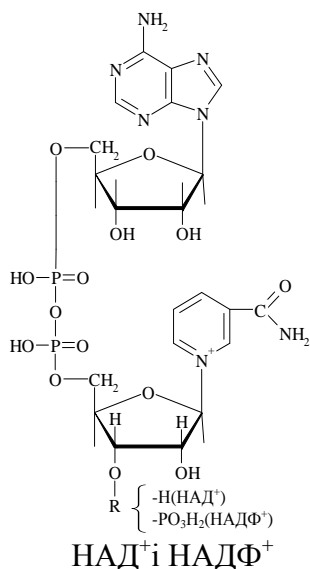
Традиційно до коферментів відносять похідні вітамінів (табл. 2).

Таблиця 2. Коферменти та відповідні їм вітаміни

Кофермент	Вітамін-попередник	Функція	Фермент
Піридоксаль-фосфат	В ₆ (піридоксин)	Переамінування, декарбоксилування, рацемізація	Трансамінази, декарбокси-лази, рацемази
Тіамін-дифосфат	В ₁ (тіамін)	Окисне декарбоксилування α -кетокислот, перенесення альдегідних груп	Трансальдолаза, транскетолаза
Кофермент А	В ₃ (пантотенова кислота)	Перенесення ацильних груп, аеробна деградація та синтез жирних кислот	Ацетилтрансферази, ацилтрансферази
Тетрагідро-фолієва кислота	Фолієва кислота	Перенесення С ₁ -груп, біосинтез пуринових нуклеотидів	Формілтрансфераза, тимідилатсинтетаза
Біотин	Н (біотин)	Реакції карбоксилування за участі СО ₂	Карбоксилаза
НАД ⁺ , НАДФ ⁺	РР (нікотина к-та)	Зворотне перенесення Н ⁺ та е ⁻	Дегідрогенази (піридинзалежні)
ФМН, ФАД	В ₂ (рибофлавін)	Перенесення Н ⁺ та е ⁻	Дегідрогенази (флавінзалежні)
Метилкобаламі н, 5- дезоксиаде нозилкобаламін	В ₁₂ (ціанокобаламі н)	Перенесення метильних груп, реакції трансметилування, ізомеризації	Метилмалоніл-КоА-мутаза
Ліпоєва кислота	Н (ліпоєва к-та)	Перенесення ацетильних груп	Піруватдегідрогеназа, кетоглутаратдегідрогеназа

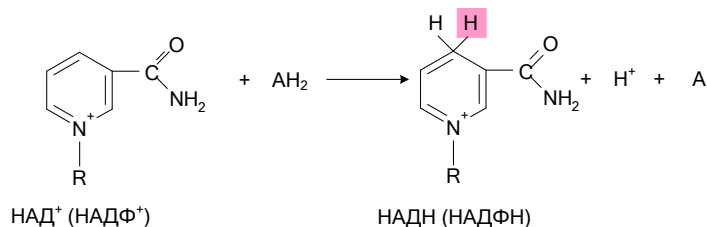
За типом каталізованої реакції коферменти поділяють на:

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



Похідні вітаміну

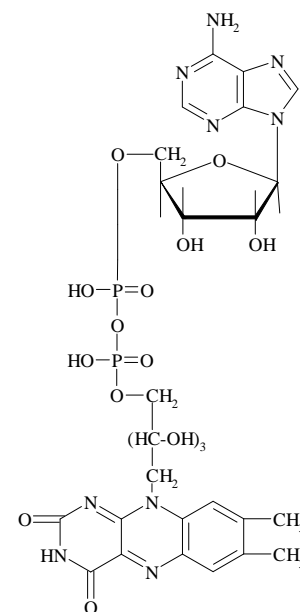
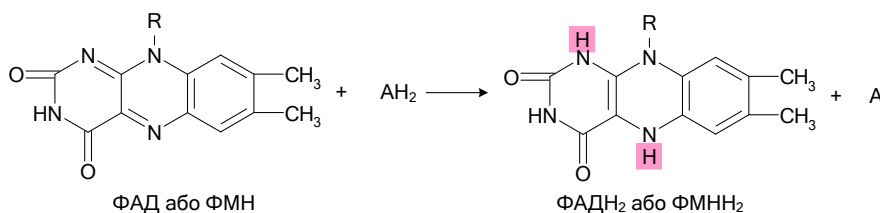
РРнікотинамідаденіндинуклеотид (НАД⁺) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ⁺) – це окиснені форми коферментів, у яких позитивний заряд несе атом Нітрогену піридинового кільця нікотинаміду. Субстрат (А) втрачає два атоми Гідрогену (2 протони та 2 електрони), але на кофермент переноситься лише 2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



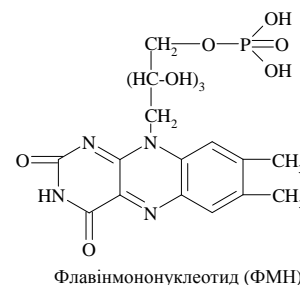
Нікотинаміддинуклеотиди входять до складу багатьох дегідрогеназ, необхідних для синтезу енергії в клітині: вони виступають акцепторами та проміжними переносниками атомів Гідрогену на початкових стадіях окиснення вуглеводів, жирних кислот, амінокислот, гліцерину, на стадії циклу Кребса і в термінальних стадіях дегідрування в дихальному та монооксигеназному ланцюгах; вони виступають алостеричними ефекторами ферментів енергетичного обміну. НАДФН₂ як донор атомів Гідрогену використовується в біосинтетичних відновних реакціях (синтез жирних кислот, холестерину, гормонів тощо).

Похідні вітаміну В₂ – 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).



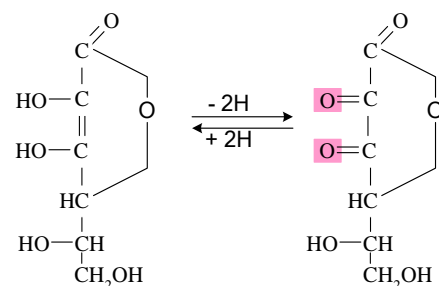
Флавінаденіндинуклеотид (ФАД)



Флавінмононуклеотид (ФМН)

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.

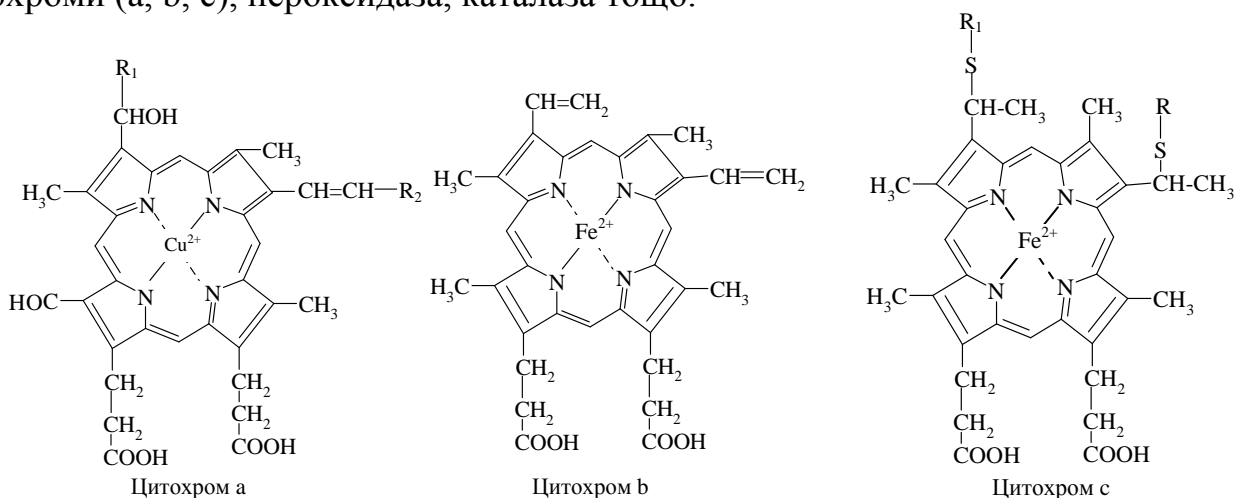
Ця властивість обумовлює участь аскорбінової кислоти в обміні білків, вуглеводів, мінеральних речовин.



L-Аскорбінова кислота

L-Дегідроаскорбінова кислота

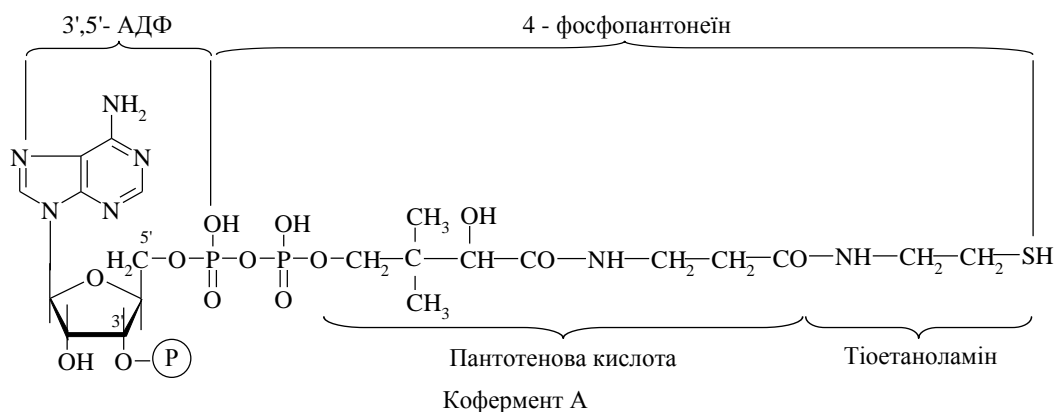
Металопорфірини за своєю структурою подібні або тотожні гему в гемоглобіні. Порфіринові коферменти входять до складу таких ферментів як цитохроми (a, b, c), пероксидаза, каталаза тощо.



Вони містять іони металів (зокрема заліза, міді тощо), які здатні змінювати свою валентність (наприклад, $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$) 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 (В₃).

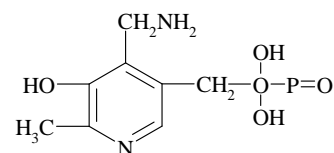


Його сульфгідрильна група може зазнавати ацилювання з перетворенням на ацил-КоА, або знаходитися в деацильованому стані (HS-КоА). Ці коферментні форми беруть участь у перенесенні ацильних радикалів у реакціях загального шляху катаболізму, активуванні жирних кислот, біосинтезі жирних кислот, холестерину,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

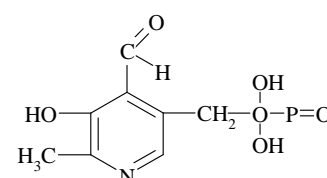
Похідні вітаміну В₆ – піридоксаль-5-фосфат (ПАЛФ) і піридоксамін-5-фосфат (ПAMФ) відіграють ключову роль в обміні амінокислот: каталізують реакції

трансамінування (перенесення аміногрупи з α-амінокислоти на α-кетокислоту) та декарбоксілювання (відщеплення карбоксильної групи у вигляді CO₂) амінокислот, беруть участь у специфічних реакціях метаболізму окремих амінокислот (серину, треоніну, триптофану, сірковмісних амінокислот, а також у синтезі гему.

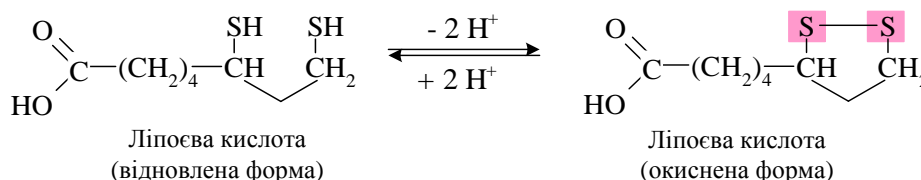
Ліпоєва кислота, завдяки своїй здатності легко переходити з окисненої у відновлену форми, проявляє властивості кофермента в складі оксидоредуктаз, її амід слугує простетичною групою складного піруват- і α-кетоглутаратдегідрогеназного комплексів, які беруть участь в окисненні пірвіноградної та α-кетоглутарової кислот.



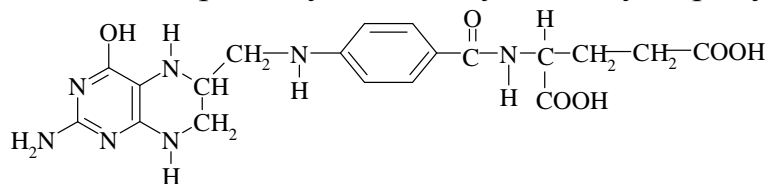
Піридоксамін-5-фосфат



Піридоксаль-5-фосфат



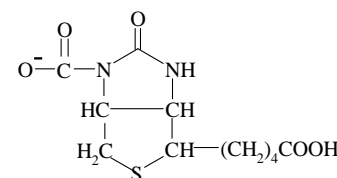
Тетрагідрофолієва кислота – відновлена форма фолієвої кислоти – переносить одновуглецеві залишки (метильні (-CH₃), оксиметильні (-CH₂OH), формільні (-HCO тощо) на різні сполуки і бере в такий спосіб участь у синтезі азотистих основ нуклеїнових кислот, креатину, метіоніну, гліцину, серину.



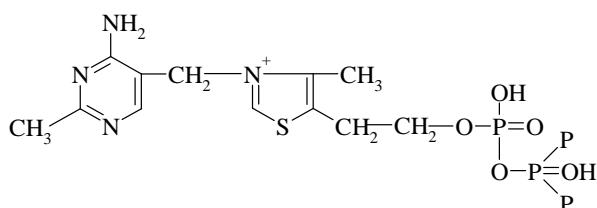
Тетрагідрофолієва кислота (ТГФК)

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

Біотин виконує коферментну функцію в якості N⁵-карбоксибіотину і входить до складу карбоксилаз: він бере участь в утворенні активної форми CO₂, використовується в утворенні малоніл-КоА з ацетил-КоА, у синтезі пуринового кільця, у реакції карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату тощо.



Карбоксибіотин



Тіаміндифосфат

Роль вітаміну В₁ визначається

тим, що у формі кофактора тіаміндифосфату (ТДФ) він входить до складу як мінімум трьох ферментів і

ферментативних комплексів: у складі піруват- і α -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів він бере участь в окиснювальному декарбоксілюванні пірувату та α -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 В₁₂. 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 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 окиснювально-віновних перетвореннях; у складі каталази

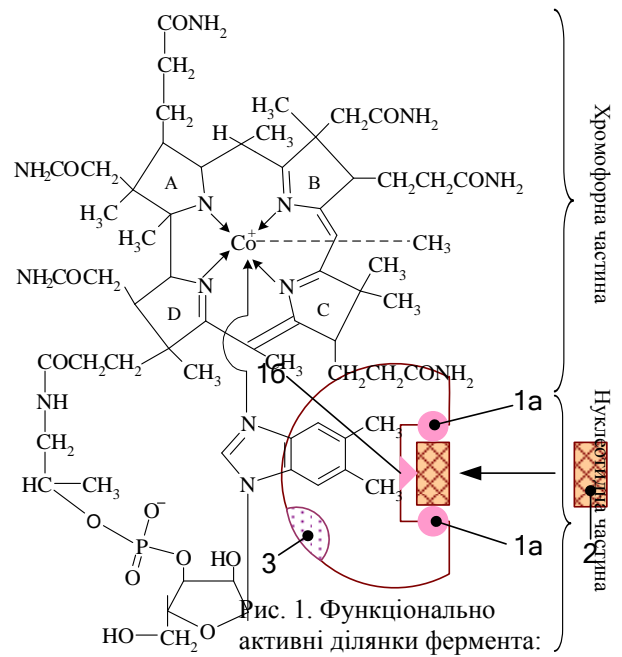


Рис. 1. Функціонально активні ділянки фермента: 1а – контактні ділянки, 1б – каталітична ділянка, 2 – метилкобаламін, 3 – алостеричний центр

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.

6. ПІДГОТОВКА ДО ІНТЕГРОВАНОГО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК 1. ФАРМАЦІЯ». (див. п. 10 списку основної літератури).

7. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

8. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Виберіть 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 фосфорилування 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. Простетична група
 - B. Кофактор
 - C. Кофермент
 - D. Апофермент
 - E. Холофермент

9. ЛІТЕРАТУРА (див. с. 127).

ЗАНЯТТЯ № 5

1. **ТЕМА: Механізм дії ферментів та кінетика ферментативних реакцій. Регуляція активності ферментів.**
2. **АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ:** Сучасна біохімія характеризується широким застосуванням методів визначення активності ферментів в біологічних рідинах і тканинах. Це дозволяє встановити патогенез багатьох захворювань і запропонувати методи їх лікування з використанням сучасних лікарських засобів.
3. **МЕТА ЗАНЯТТЯ:** Вивчити та вміти аналізувати механізми дії ферментів і шляхи регуляції ферментативних процесів як основи обміну речовин в організмі в нормі та при патології.
4. **ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.**

4.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Сучасні положення про механізм дії ферментів: поняття про енергію активації ферментативної реакції; утворення фермент-субстратного комплексу і механізми отримання продуктів ферментативної реакції (ковалентний і кислотно-лужний каталіз). Значення робіт Е. Фішера і Д. Кошленда.
2. Кінетика ферментативних реакцій: вплив концентрації субстрата і ферменту на швидкість ферментативної реакції (графічні залежності). Рівняння Міхаеліса-Ментен. Константа Міхаеліса, її визначення і значення.
3. Чинники регуляції активності ферментів: концентрація субстрата, концентрація ферменту, концентрація продуктів реакції; температура і рН середовища.
4. Поняття про хімічну природу і функцію активаторів. Механізми активації ферментів.
5. Загальне поняття про інгібітори. Типи інгібірування ферментів: зворотне (конкурентне, неконкурентне, бесконкурентне) і незворотне (приклад).

Особливості зміни кінетичних параметрів ферментів при конкурентному і неконкурентному інгібуванні (використання методу Лайнуївера-Берка).

6. Поняття про алостеричний центр і його функцію у ферментативному каталізі. Алостеричний тип регуляції активності ферментів. Ретроінгібування ферментів.

5. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ ДО ЗАНЯТТЯ

Енергія активації – це енергія, необхідна для переходу молекул 1 моль речовини в активний (перехідний) стан при певній температурі. Іншими словами, це енергія, необхідна для запуску хімічної реакції. Фермент знижує енергію активації шляхом збільшення числа активованих молекул, які стають більш реакційно здатними на нижчому енергетичному рівні. Наприклад, при розщепленні пероксиду водню на воду та кисень енергія активації для досягнення перехідного (активного) стану дорівнює 18 ккал/моль. За участі платини енергія активації знижується до 12 ккал/моль, а під впливом фермента каталази – до 5 ккал/моль.

З рисунка 3 видно, що для досягнення збудженого стану вихідних речовин необхідно затратити найбільше енергії активації (рис. 3, 1); менше енергії вимагає реакція за участі небіологічного 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 (ΔG).

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.

Кислотно-основний каталіз характеризується участю в ферментативній реакції кислотних і/або основних груп. Так, радикали таких амінокислот як цис, тир, сер, ліз, глу, асп і особливо гіс можуть виступати як у ролі донорів протонів, так і їх акцепторів, надаючи ферментам властивостей універсальних

каталізаторів, на відміну від небілкових каталізаторів, які проявляють або лише кислі, або лужні властивості. Прикладом такого каталізу може бути фермент алкогольдегідрогеназа печінки, яка містить іон Zn^{2+} та $НАД^+$ у якості кофермента і каталізує реакцію окиснення етилового спирту: позитивно заряджений атом цинку сприяє від'єднанню протона від спиртової групи етанолу з утворенням негативно зарядженого атома кисню; негативний заряд перерозподіляється між атомом кисню та сусіднім атомом Гідрогену, який потім у вигляді гідрит-іона переноситься на четвертий вуглецевий атом нікотинамід у 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

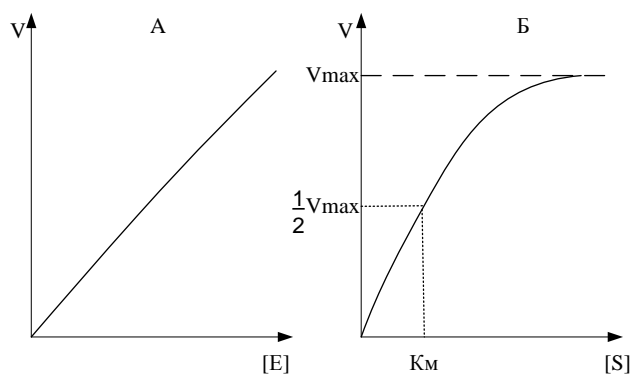


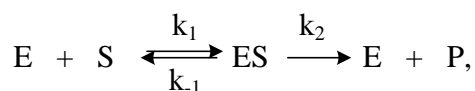
Рис. 4. Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації фермента (А) та субстрату (Б)

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).

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: $V = V_{\max}$.

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

Із рівняння та графіка випливає, що кутовий коефіцієнт прямої (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.

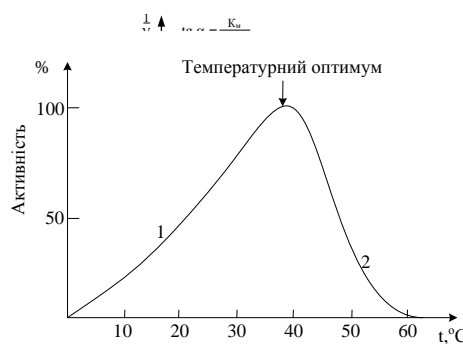


Рис. 6.

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

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

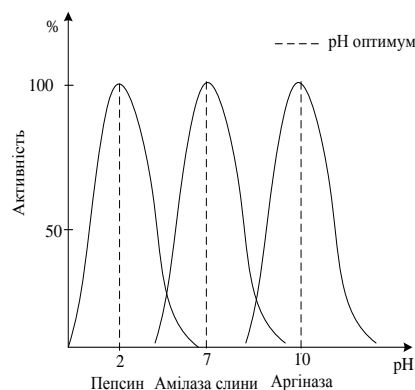


Рис. 7. Залежність швидкості ферментативної реакції від pH середовища

Залежність швидкості ферментативної реакції від pH середовища. Для кожного фермента існує певне значення pH середовища, в якому він виявляє максимальну активність. Для пепсину воно становить 1,5 – 2,0, піруваткарбоксілази 4,8, аргінази – 9,5 – 10,0. Проте, більшість ферментів організму людини мають оптимум pH, 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 pH на активність фермента пов'язаний із іонізацією функціональних груп амінокислотних залишків білкової молекули, що забезпечує оптимальну конформацію активного центра. Відхилення pH 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 pH може відбуватися денатурація білкової молекули з повною втратою ферментативної активності. Зміна pH середовища може також впливати і на просторову організацію субстрату.

Специфічність дії ферментів

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

Розрізняють субстратну та каталітичну специфічності фермента. **Субстратна специфічність** – це здатність фермента взаємодіяти з одним або кількома

субстратами. Вона може бути абсолютною, груповою та стереоспецифічністю. Фермент з **абсолютною субстратною специфічністю** каталізує перетворення лише одного субстрату з певною структурою. Будь-які модифікації (зміни) у структурі субстрату роблять його недоступними для дії ферменту. Прикладом можуть слугувати аргіназа, яка каталізує реакцію розщеплення аргініну на сечовину та орнітин, та уреаза, яка каталізує гідроліз сечовини з утворенням вуглецю оксиду (II) та аміаку. Сахараза гідролізує тільки сахарозу, а на інші дисахариди не діє.

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

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

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

Регуляція активності ферментів

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

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

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

Перший шлях регуляції є механізмом довготривалої адаптації ферментів. Для його включення і повної реалізації необхідно декілька годин або діб. Він полягає у зміні впливу на систему ядерного геному або рибосомального білкового синтезу (вплив на процеси транскрипції та трансляції) метаболітів, гормонів та інших біологічно активних речовин. Цей тип регуляції характерний здебільшого для мікроорганізмів, ферменти яких поділяють на два класи: *конститутивні*, які синтезуються мікроорганізмами постійно, не залежно від умов існування та *адаптивні*, інтенсивність біосинтезу яких змінюється залежно від змін умов існування. Адаптивні ферменти мікроорганізмів поділяють на *індуцибельні* та *репресибельні*, тобто такі, активність синтезу яких підвищується або гальмується залежно від дії певних сполук-ефекторів.

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

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

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

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

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

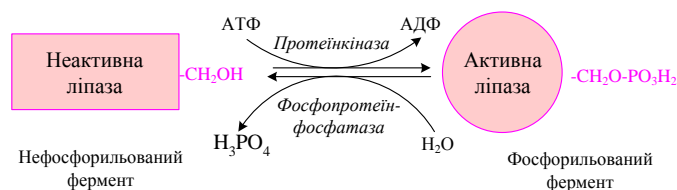


Рис. 8. Регуляція активності ліпази

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

Активація ферментів шляхом обмеженого протеолізу. Активація низки ферментів (здебільшого травного тракту або плазми крові) може відбуватися протеолітичним шляхом. Такі ферменти синтезуються в неактивній формі у вигляді проферментів або зимогенів (попередників ферментів), активний центр яких замаскований додатковою ділянкою пептидного ланцюга, внаслідок чого субстрат не може взаємодіяти з активним центром. Наприклад, проферментом пепсину є пепсиноген, який синтезується головними клітинами шлункових залоз. Відщеплення від його молекули невеликого пептидного ланцюга за участі хлоридної кислоти шлункового соку призводить до утворення пепсину та формування його активного центра. Профермент трипсиноген, який утворюється в підшлунковій залозі, у дванадцятипалій кишці під впливом ферменту ентерокинази шляхом відщеплення гексапептиду перетворюється на трипсин. Після цього створюються умови, які сприяють утворенню активного центру ферменту, і трипсиноген перетворюється на трипсин. Ці процеси можуть також відбуватися аутокаталітично, тобто під впливом вже утвореного пепсину чи трипсину відповідно.

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 α_2 – макроглобулін та α_1 – антитрипсин (α_1 - протеїназний інгібітор), які блокують активність серинових та інших протеїназ;
- антигемофільний глобулін А (фактор VIII згортальної системи крові). Цей білок бере участь в активації фактора X, який запускає весь коагуляційний каскад, що призводить до утворення тромба.

Прикладом регуляції каталітичної активності шляхом асоціації/дисоціації протомерів може служити регуляція активності протеїнкінази А, функцією якої є фосфорилювання 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).

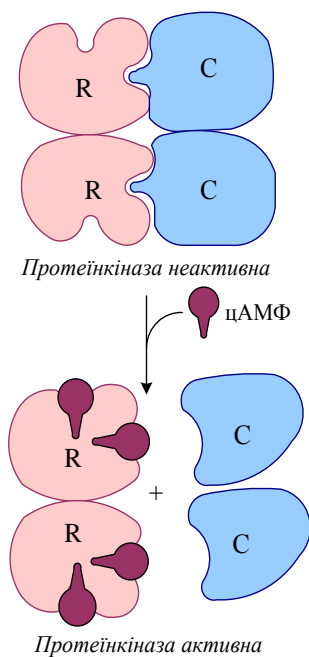
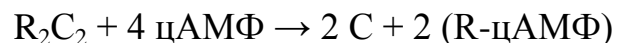


Рис. 9. Активація протеїнкінази за участі цАМФ

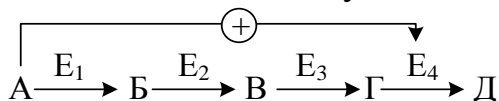
Регуляторні субодиниці мають центри зв'язування для цАМФ (по 2 на кожен субодиницю). Активна протеїнкіназа представлена субодиницями С, для вивільнення яких необхідна дисоціація комплексу. Активація ферменту відбувається за участі цАМФ, який приєднуються до субодиниць R і змінює конформацію білка, що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



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

Алостерична регуляція ферментів. Активування ферментів може здійснюватися шляхом приєднання до алостеричного центра фермента специфічної модифікуючої групи (*активатора*), що сприяє зміні

конформації фермента, його активного центра та, як наслідок, прискоренню ферментативної реакції (*алостерична активація*). Вона характерна для олігомерних ферментів, які складаються з кількох протомерів або мають доменну структуру. У центральних метаболічних шляхах вихідні речовини можуть виступати активаторами ключових ферментів, при цьому 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 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

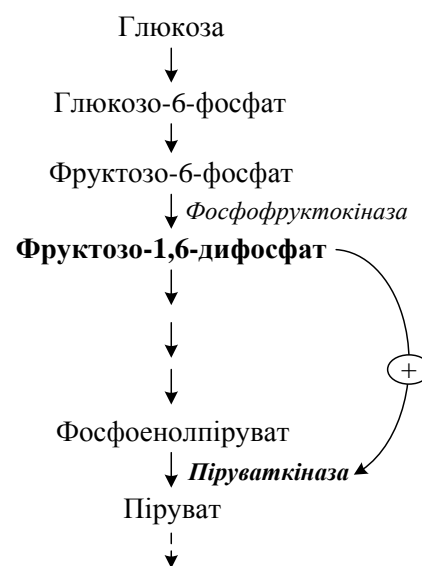


Рис. 10. Алостерична активація на прикладі гліколізу

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 сільськогосподарства, 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).

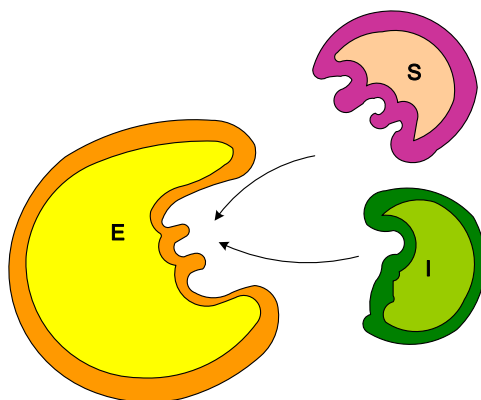
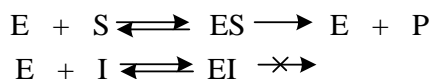


Рис. 11. Конкурентне інгібування:
S – субстрат, I – інгібітор, E – фермент

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 Лайнувером-Берком демонструє, що конкурентні інгібітори збільшують константу Міхаеліса K_M ферменту і не впливають на максимальну швидкість реакції (рис. 12).

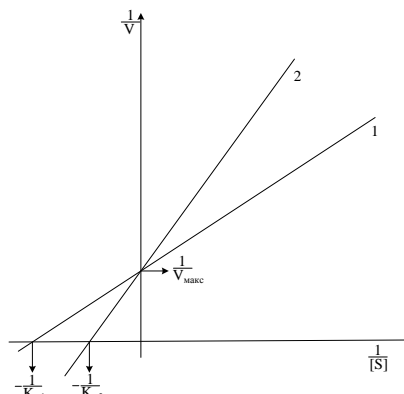
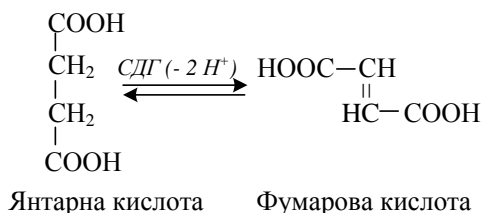


Рис. 12. Конкурентне інгібування фермента: 1 – без інгібітора; 2 – у присутності інгібітора

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



Маленова 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).

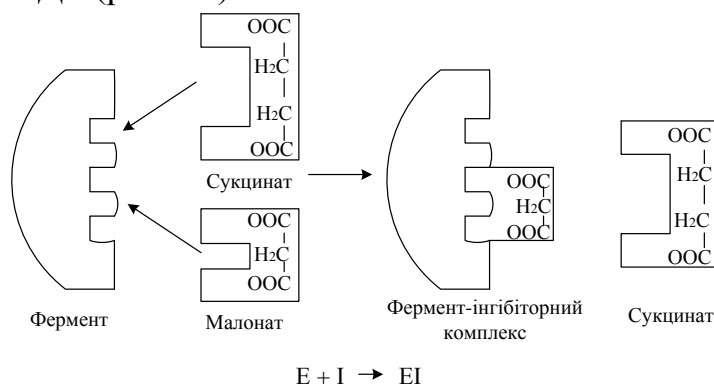


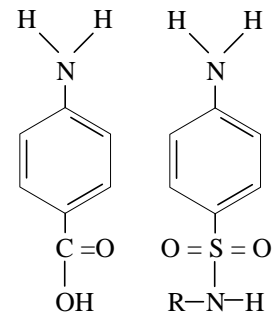
Рис. 13. Схема конкурентного гальмування СДГ малонатом

У цьому випадку СДГ ніби «ошукана»: вона замість субстрату (янтарної кислоти) захоплює його «двійника» (маленову кислоту) і субстрат уже не може

розташуватися на контактній ділянці ферменту. Якщо ж навколо ферменту з'явиться багато молекул субстрату (янтарної кислоти), то субстрат витисне інгібітор з активного центру. Оскільки в комплексі фермент-інгібітор через специфічність дії ферменту хімічної реакції не відбувається, активність СДГ виявляється тільки відносно свого субстрату. Навпаки, якщо кількість молекул інгібітора є значною, то субстрату важче проникнути на контактну ділянку ферменту, активність його буде дуже низькою – ферментативна реакція блокується.

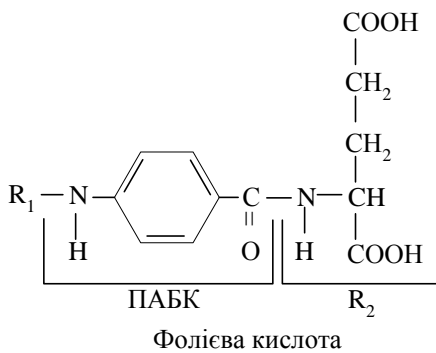
У якості інгібіторів ферментів за конкурентним механізмом у медичній практиці використовують речовини, які називають *антиметаболітами*. Будучи структурними аналогами природних субстратів, ці сполуки, з одного боку, викликають конкурентне інгібування ферментів, а з іншого – можуть використовуватися цими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

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



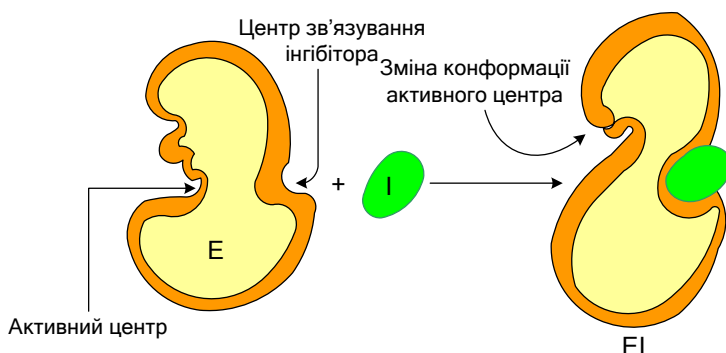
ПАБК Сульфаніламід

У мікроорганізмах в присутності ПАБК синтезується фолієва кислота, 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, сульфанілово кислота та її N-заміщені амідні, виступають антиметаболітами ПАБК, зумовлюють

Рис. 14. Неконкурентне інгібування фермента

бактеріостатичний ефект. **Неконкурентним інгібуванням** називають таке гальмування, при якому інгібітор не є структурним аналогом субстрату, він взаємодіє з ферментом або в ділянці, відмінній від активного центра, або з уже сформованим фермент-субстратним комплексом. Приєднання неконкурентного інгібітора викликає зміну конформацію молекули фермента в такий спосіб, що порушується взаємодія субстрату з активним центром фермента, що призводить до зниження швидкості реакції (рис. 14).

У випадку утворення потрібного 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 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).

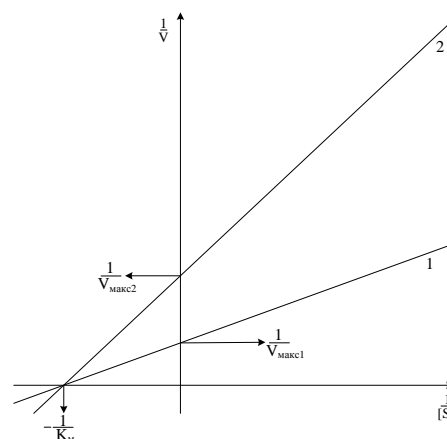


Рис. 15. Неконкурентне інгібування фермента: 1 – без інгібітора, 2 – у присутності інгібітора

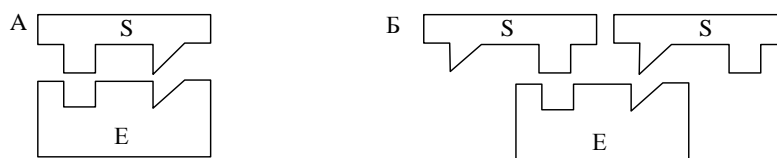
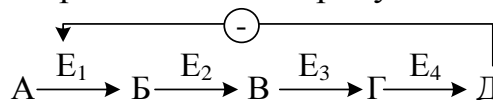


Рис. 16. Схема субстратного інгібування: А – молекула субстрату (S) оптимально розташована в активному центрі фермента (E); Б – дві молекули субстрату зв'язалися неправильно з активним центром фермента

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

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



Фермент, який каталізує перетворення субстрату А на продукт Б має алостеричний центр для негативного ефектора (інгібітора), який виступає кінцевий продукт метаболічного шляху (Д). Якщо концентрація останнього збільшується, то інгібується активність

одного з початкових ферментів (E1). Така регуляція за принципом зворотного зв'язку (ретроінгібування) дозволяє контролювати вихід кінцевого продукту. Наприклад, при надлишку в клітині АТФ, яка утворюється під час гліколізу, відбувається ретроінгібування алостеричних ферментів фосфофруктокінази та піруваткінази (рис. 17).

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

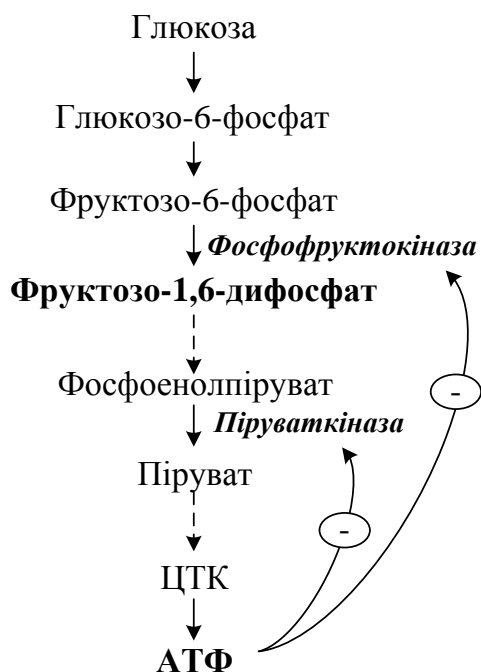


Рис. 17. Ретроінгібування на прикладі гліколізу

6. ПІДГОТОВКА ДО ІНТЕГРОВАНОГО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК 1. ФАРМАЦІЯ». (диав. п. 10 списку основної літератури).

7. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

8. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Укажіть інгібітор дії амілази слини:

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

2. Укажіть активатор дії амілази слини:

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

3. Константа Міхаеліса для ферменту визначає:

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

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

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

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

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

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

- A. Підвищення концентрації ферменту
- B. Введення в реакційне середовище катіона металу
- C. Підвищення концентрації субстрату

D. Введення в реакційне середовище алостеричного активатора

E. Видалення з реакційного середовища продукту реакції

7. Продовжте фразу: «Незначна зміна рН середовища впливає на молекулу ферменту, змінюючи...»:

A. Структурний рівень організації молекули ферменту

B. Ступінь поляризації амінокислотних радикалів в активному центрі

C. Товщину гідратної оболонки ферменту

D. Оптичні властивості ферменту

E. Біологічну функцію ферменту

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

A. Концентрація даного ферменту в досліджуваній пробі

B. Концентрація білка в досліджуваній пробі

C. Концентрація субстрату в досліджуваній пробі

D. Константа Міхаеліса для даного ферменту

E. Максимальна швидкість досліджуваної ферментативної реакції

9. Укажіть активатори фермента гліколізу енолази:

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

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

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

D. цАМФ

E. цГМФ

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

A. Конкурентне

B. Неконкурентне

C. Бесконкурентне

D. Стереохімічне

E. Ретроінгібування

9.ЛІТЕРАТУРА (див. с. 127)

ЗАНЯТТЯ № 6

1. ТЕМА: Визначення активності ферментів в біологічних середовищах. Медична ензимологія. Контроль засвоєння змістового модулю 1 (комп'ютерне тестування)

2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ: Досягнення ензимології (науки про ферменти) широко впроваджуються в медицину. Це, насамперед, ензимодіагностика і ензимотерапія, вивчення яких дозволить майбутнім провізорам запропонувати шляхи лікування різноманітних ензимопатій.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити та вміти пояснювати зміни перебігу ферментативних процесів і накопичення проміжних продуктів метаболізму при спадкових та набутих вадах метаболізму – ензимопатіях.

4. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

4.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

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

5. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ ДО 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 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 = 60×10^6 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, 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 **колериметричних** методів лежить вимірювання за допомогою фотоелектроколериметра 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 гідразон. 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 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

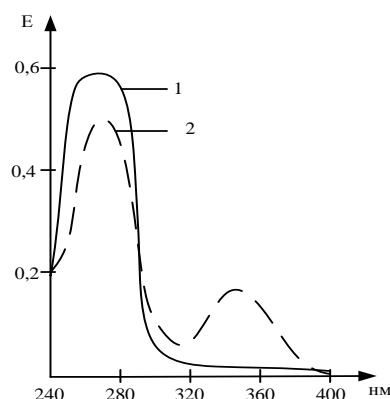


Рис. 18. Абсорбційні спектральні криві для окиснених НАД⁺ (або НАДФ⁺) (1) та відновлених НАДН (або НАДФН) (2) нікотинамідних коферментів

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 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 Ферменти пентозофосфатного циклу Ферменти активації амінокислот Мультиферментний комплекс синтезу жирних кислот Ферменти катаболізму пуринових і піримідинових основ Пептидази Амінотрансферази Малатдегідрогеназа Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна) Глікогенфосфорилаза Глікогенсинтетаза	Піруватдегідрогеназний комплекс Цитратсинтетаза Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна) Малатдегідрогеназа та інші ферменти циклу Кребса Ацил-КоА-дегідрогеназа та інші ферменти окиснення жирних кислот Ферменти дихального ланцюга та окиснювального фосфорилування	Кисла фосфатаза β-Глюкуронідаза α-Глюкозидаза β-Глюкозидаза Катепсини Кисла 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 триацилгліцеридсинтетази, 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: ЛДГ₁ = Н₄; ЛДГ₂ = М₁Н₃; ЛДГ₃ = М₂Н₂; ЛДГ₄ = М₃Н₁; ЛДГ₅ = М₄.

Для кожної тканини притаманне своє співвідношення ізоформ. Так, ЛДГ₁ та ЛДГ₂ переважають у органах, які характеризуються аеробним метаболізмом - серці, мозку, 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.

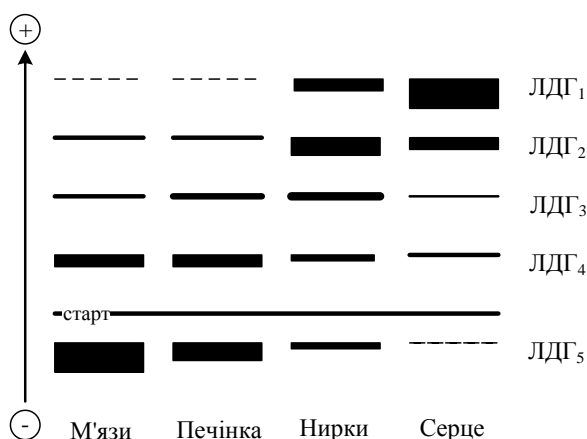
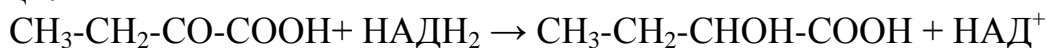


Рис. 19. Електрофореграма множинних форм ЛДГ

Субодиниці ЛДГ відрізняються за спорідненістю до субстратів. Субодиниця „М” краще каталізує перетворення пірвиноградної кислоти до молочної. Субодиниця „Н” є менш специфічною за своєю дією та каталізує взаємоперетворення α -кето- та α -гідроксималярної 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 -гідроксималярної 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: $ЛДГ_2 > ЛДГ_1 > ЛДГ_3 > ЛДГ_4 > ЛДГ_5$. При інфаркті міокарда $ЛДГ_1 > ЛДГ_2 > ЛДГ_3 > ЛДГ_4 > ЛДГ_5$ - помітна характерна зміна „розташування” ЛДГ₁ та ЛДГ₂: активність ЛДГ₁ переважає над активністю ЛДГ₂. При гемолітичній анемії $ЛДГ_2 + ЛДГ_1 > ЛДГ_3 + ЛДГ_4 + ЛДГ_5$, 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: $ЛДГ_4 = ЛДГ_5 > ЛДГ_2 > ЛДГ_1 > ЛДГ_3$.

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 її 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 органах.

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 тяжко 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 імобілізованим ферментом; зникла проблема розділення прореагованих компонентів від фермента, підвищилася ефективність використання ферментів. Виявилася також, що зв'язування з носієм часто посилює термічну стійкість фермента – у випадку протеаз імобілізація суттєво послаблює взаємодію між окремими молекулами ферментів, що запобігає автолізу. Імобілізація ферментів дозволяє забезпечити їх високу специфічність дії, посилити стабільність, повторно використовувати. Імобілізація 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 пеніцилінамідази. 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 глікогеногенезу, 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, езімопатії 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 аланінамінотрансферази передуює збільшенню вмісту білірубину, 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 білірубину.

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.

Ензімотерапія – використання ферментів як лікарських засобів – проводиться переважно в разі нестачі в організмі якогось фермента чи кофермента (замісна ензімотерапія) 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.

6. ПІДГОТОВКА ДО ІНТЕГРОВАНОГО ЛІЦЕНЗІЙНОГО ІСПИТУ «КРОК 1. ФАРМАЦІЯ». (див. п. 10 списку основної літератури).

7. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

8. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

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. Протеїнкаіназа
- 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

E. Активності кислої фосфатази

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



A. Ліази

B. Лігази

C. Оксидоредуктази

D. Трансферази

E. Гідролази

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

A. ЛДГ₁ і ЛДГ₂

B. ЛДГ₃, ЛДГ₄

C. Тільки ЛДГ₃

D. ЛДГ₄ і ЛДГ₅

E. Тільки ЛДГ₅

7. 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

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

A. Пепсин

B. Холінестераза

C. Амілаза

D. Кисла фосфатаза

E. 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

9. ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ СКЛАДАННЯ ЗМІСТОВОГО МОДУЛЮ 1

1. Біологічна хімія як наука. Місце біохімії серед інших медико-біологічних дисциплін.
2. Об'єкти вивчення і завдання біохімії. Провідна роль біохімії у визначенні молекулярних механізмів патогенезу захворювань людини.
3. Зв'язок біохімії з іншими біомедичними науками. Медична біохімія. Клінічна біохімія. Біохімічна лабораторна діагностика.
4. Історія біохімії; розвиток біохімічних досліджень в Україні.
5. Біохімічні компоненти клітин, їх функції. Класи біомолекул. Ієрархія біомолекул, їх походження.
6. Класифікація простих та складних білків.
7. Структура, фізико-хімічні властивості та функції фібрилярних білків.
8. Методи виділення та розділення білків із суміші. Методи кількісного та якісного дослідження білків і амінокислот.
9. Ферменти: визначення; властивості ферментів як біологічних каталізаторів.
10. Класифікація і номенклатура ферментів, характеристика окремих класів ферментів.
11. Будова і механізм дії ферментів. Активний і алостеричний (регуляторний) центри.
12. Кофактори і коферменти. Будова і властивості коферментів, вітаміни як попередники в біосинтезі коферментів.
13. Ізоферменти, особливості будови і функціонування, значення в діагностиці захворювань.
14. Механізми дії ферментів і кінетика ферментативних реакцій: залежність швидкості реакції від концентрації субстрату, рН і температури.
15. Регуляція ферментативних процесів. Активатори і інгібітори ферментів: приклади і механізми дії.
16. Типи інгібування ферментів: зворотне (конкурентне, неконкурентне) і незворотне інгібування.
17. Механізми регуляції алостеричних ферментів; ковалентна модифікація ферментів.
18. Загальне уявлення про ензимопатії і причини їх виникнення.
19. Ензимодіагностика патологічних процесів і захворювань.
20. Ензимотерапія – використання ферментів, їх активаторів і інгібіторів в медицині.
13. Принципи і методи визначення ферментів в біоб'єктах. Одиниці вимірювання активності ферментів.

10. ЛІТЕРАТУРА (див. с. 127)

Література:

Основна

1. Біохімія : підруч. для студентів фармацевт. спец. / [А. Л. Загайко та ін.] ; за ред. проф. А. Л. Загайка, проф. К. В. Александрової. - Харків : Форт, 2014. - 725 с. : рис.
2. Біологічна хімія / Вороніна Л.М. [та ін].— Харків: Основа, 2000.- 608 с.
3. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - М.: Медицина, 1998. – 704 с.
4. Биологическая химия : Учебное пособие для самостоятельной работы по подготовке к лицензионному интегрированному экзамену «Крок 1. Фармация» по модулю 1 «Общие закономерности метаболизма. Метаболизм углеводов, липидов и его регуляция» для студентов фармацевтического факультета специальностей 7.12020101 «Фармация» и 7.12020104 «Технологии парфюмерно-косметологических средств» / под общей редакцией проф. Е.В. Александровой – Запорожье.: .Изд-во ЗГМУ, 2014. – 142 с.
5. Гонський Я. І. Біохімія людини: Підручник / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. - 736 с.
6. Губський Ю. І. Біологічна хімія / Ю. І. Губський. - Київ-Тернопіль : Укрмедкнига, 2000. - 508 с.
7. Збірник тестових завдань з біологічної хімії для студентів вищих медичних навчальних закладів IV рівня акредитації / Романенко М.І. [та ін] .- Запоріжжя : Вид.ЗДМУ.- 2005. - 98 с.
8. Лабораторні та семінарські заняття з біологічної хімії./ Л.М. Вороніна [та ін].- Х.: Вид-во НФаУ; 2004.-384 с.
9. Николаев А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. - М. : Мед. инфор. агентство, 1998. - 496 с.
10. Практикум з біологічної хімії : Посібник / [Бойків Д.П. та ін] ; за ред. О.Я. Скларова. – К. : Здоров`я, 2002. - 298 с.

Додаткова

1. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами / под редакцией Е.С. Северина, А.Я. Николаева.– М.: ГЭОТАР–МЕД, 2001.– 448 с.: ил.
2. Боєчко Л. Ф. Основні біохімічні поняття, визначення та терміни: Навч. посібник / Л. Ф. Боєчко, Л. О. Боєчко. - К. : Вища шк., 1993. - 528 с.
3. Бышевский А. Ш. Биохимия для врача / А. Ш. Бышевский, О. А. Терсенов. – Екатеринбург : Урал. рабочий, 1994. - 384 с.
4. Комаров Ф.И. Биохимические исследования в клинике / Ф. И. Комаров, Б. Ф. Коровкин., В. В. Меншиков. – Элиста: АЛЛ "Джангар", 1998. – 250 с., ил.
5. Кушманова О. Д. Руководство к практическим занятиям по биологической химии / О. Д. Кушманова, Г. М. Ивченко. – М.: Медицина, 1983. – 424 с.
6. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3 т. / А. Ленинджер - М. : Мир, 1985. – Т. 1- 367 с. : ил. – Т. 2 – 368 с. : ил. – Т. 3 – 320 с. : ил.
7. Мак-Мюррей В. Обмен веществ у человека / В. Мак-Мюррей. – М.: Мир, 1980. – 368 с.
8. Марри Р. Биохимия человека: в 2 т. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл М. – М. Мир, 1993. - Т.1 - 381 с. - Т. 2 - 414 с.
9. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке : в 3 т. / Д. Мецлер. - М. : Мир, 1980. – Т. 1 :- 407 с. – Т. 2 – 606 с. – Т. 3 – 488 с.
10. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов / Я. Мусил. - М. : Медицина, 1985. - 432с.
11. Николс Д.Дж. Биоэнергетика. Введение в хемио-осмотическую теорию / Д.Дж. Николс. – М. : Мир, 1985. - 190 с.
12. Ньюсхолм Э. Регуляция метаболизма / Э. Ньюсхолм, К. Старт. - М. : Мир, 1977. - 407 с.
13. Парк Д. Биохимия чужеродных соединений / Д. Парк. - М. : Медицина, 1973. - 288 с.
14. Розен В.Б. Основы эндокринологии / В. Б. Розен. - М. : Высш. шк., 1984. - 336 с.

15. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран / В. П. Скулачев. – М. : Наука, 1989. – 564с.
16. Стент Г. Молекулярная генетика / Г. Стент, Р.Кэлиндар. - М.: Мир, 1981. – 646 с.
17. Страер Л. Биохимия : в 3 т. / Л.Страер. - М. : Мир, 1985. – Т. 1- 232 с. : ил. – Т. 2 – 312 с. : ил. – Т. 3 – 400 с. : ил.