

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Лекция №5-7

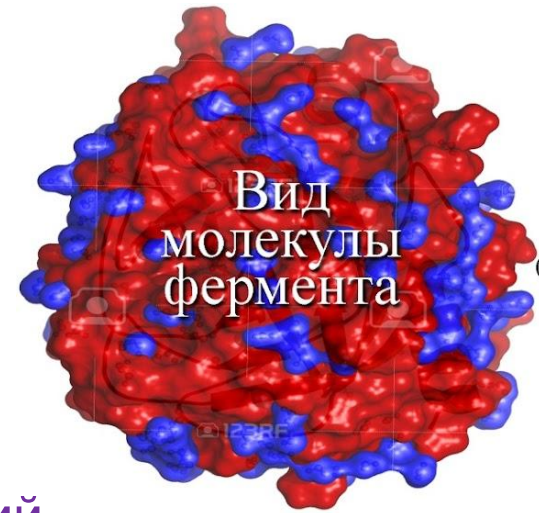
**«Регуляция активности ферментов.
Основные направления медицинской энзимологии»**

Ферменты

энзимы(от греческого en zyme – дрожжи)
(от латинского fermentum – закваска),

эти белки – катализаторы химических реакций
(могут ускорять реакцию в 10^8 - 10^{12} раз).

Главная задача фермента – ускорение
соответствующей реакции.



ФУНКЦИИ:

Пищеварительные (расщепляют пищевые компоненты до химических соединений и способствуют их всасыванию)

Метаболические (катализируют процессы дыхания выделения, роста, работы нервной системы, сокращения мышечной ткани)

Защитные (обладают способностью ликвидировать воспалительные процессы)

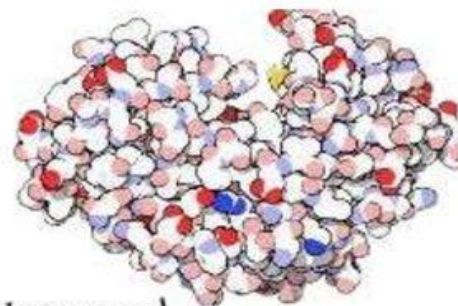


Сходство и отличие ферментов и неорганических катализаторов

Сходства:	Отличия:
<ul style="list-style-type: none">-повышают скорость химической реакции, являются инициаторами и не участвуют в образовании конечных продуктов-не сдвигают равновесие обратимых реакции (они одинаково ускоряют прямую и обратную реакцию, они ускоряют момент наступления равновесия).-снижают энергию активации	<ul style="list-style-type: none">- ферменты чрезвычайно активны (катализ расщепления H_2O 1 млн раз активнее, чем ион Fe)-неорганические катализаторы действуют при высокой температуре, высоком давлении, кислой, щелочной среде- высокая специфичность, неорганические катализаторы специфичностью не обладают

Строение фермента

Подавляющая часть ферментов – белки.



Коферменты (КоЕ):

- производные витаминов: НАД⁺, ФАД, ФМН, ТПФ;
- нуклеотиды;
- порфирины (гем)
- металлы (кофакторы); K⁺, Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺

Ферменты, как и белки, состоят из аминокислот и имеют I, II, III, IV структуру

В молекуле энзима выделяют:

- 1) **активный центр** - участок, ответственный за присоединение субстрата (якорный участок) и его превращения (каталитический участок);
- 2) **аллостерические** (регуляторные) **центры**, регулирующие его активность.



**Биологическая функция ферментов , как и у белков,
обусловлена наличием активного центра.**

**Лиганд, взаимодействующий активным центром фермента, называют
субстратом**

**В активном центре фермента имеются АК остатки, функциональные группы
которых обеспечивают химические превращения субстрата
Присоединение субстрата к ферменту в активном центре**



Номенклатура ферментов

В 1961 году на международном союзе биохимиков была выдвинута единая **классификация** ферментов

В 1972 году на международном союзе биохимиков была выдвинута единая **номенклатура** ферментов

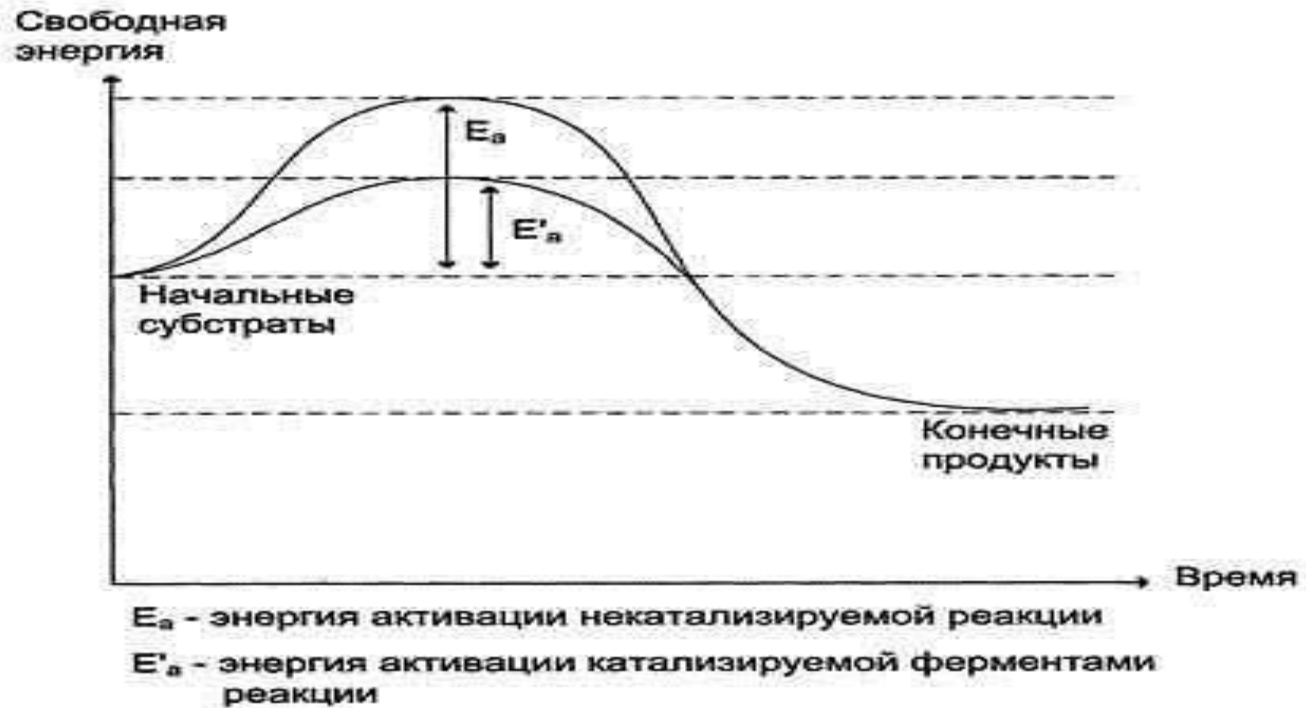
Шифр каждого фермента состоит из 4 цифр

- 1. **Класс** фермента (тип катализируемой реакции)
- 2. **Подкласс** – природа связи в субстрате
- 3. **Под-подкласс** – природа субстрата или к-либо другой признак
- 4. **№ фермента**

1.Оксиредуктаза	Катализируют различные окислительно-восстановительные реакции с участием 2-х субстратов (атом водорода переносит с одного субстрата на другой)	Дегидрогеназа, оксидаза... $AH + B = A + BH$ (окисленный) $A + O = AO$ (восстановленный)
2.Трансферазы	Катализируют перенос функциональных групп от одного соединения к другой	Трансаминаза, киназа... $AB + C = A + BC$
3.Гидролаза	Реакция разрыва расщепления ковалентной связи с присоединением молекулы H ₂ O, по месту разрыва	Липаза, амилаза, пептидаза... $AB + H_2O = AOH + BH$
4. Лиаза	Не гидролитическое присоединение к субстрату, отщепление от субстрата без участия H ₂ O определенную группы (отщепление CO ₂ , H ₂ O, NH ₂ , SH ₂).	Альдолаза, фумараза, декарбоксилаза... 
5.Изомеразы	Реакция изомеризации, катализируют различные внутримолекулярные превращения	Изомераза, мутаза... $AB = BA$
6. Лигаза(синтетаза)	Реакция синтеза с затратой энергии АТФ	Синтетаза $X + Y + АТФ = XY + АДФ + Фн$

Механизм действия ферментов.

Ферменты снижают энергию активации (E_a):



Этапы ферментативных реакций:

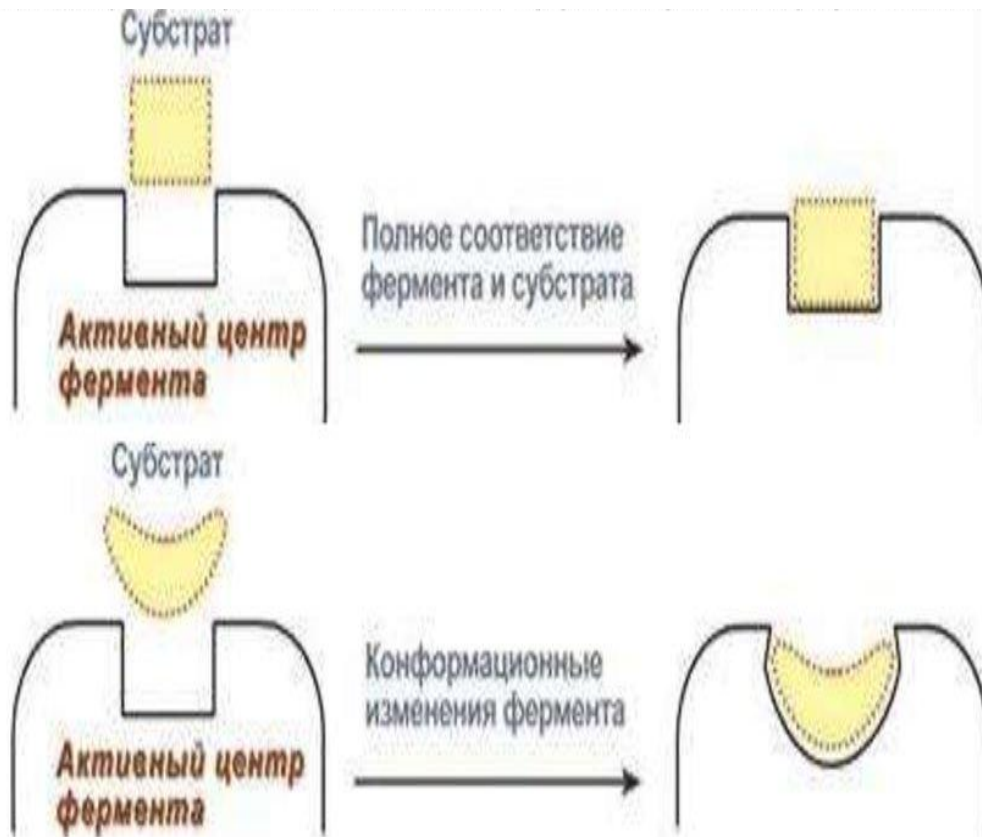
I этап. Связывание фермента (E) и субстрата (S) в активном центре фермента.

II этап. Образование энзим-субстратного (ES) комплекса .

III этап. Образование продукта реакции (P).



Механизм специфичности ферментов



1. Теория жесткого соответствия : фермент и субстрат должны соответствовать как ключ к замку (теория Фишера)

2. Теория индивидуального соответствия, где фермент и субстрат приспособляются друг другу как перчатки (теория Кошланда)

группами фермента, только субстратной специфичности объясняет две гипотезы

- 1. Теория Фишера (модель "жесткой матрицы", "ключ-замок") – активный центр фермента строго соответствует конфигурации субстрата и не изменяется при его присоединении. Эта модель хорошо объясняет абсолютную специфичность, но не групповую.

- 2. Теория Кошланда (модель "индуцированного соответствия", "рука-перчатка") – подразумевает гибкость активного центра. Присоединение субстрата к якорному участку фермента вызывает изменение конфигурации каталитического центра таким образом, чтобы его форма соответствовала форме субстрата.

Специфичность

Субстратная

- способность фермента взаимодействовать лишь с одним или несколькими определенными субстратами

- Абсолютная (уреаза)
- Относительная (групповая)
- Стереоспецифичность

Каталитическая

- способность фермента катализировать превращение субстрата лишь по одному из возможных путей его превращения.

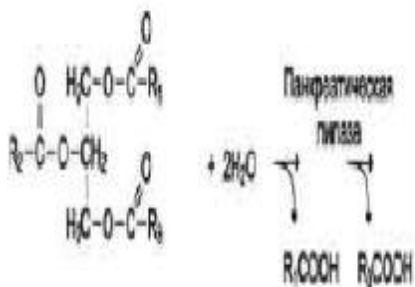
Пример:

Глюкозо-6-фосфат в гепатоцитах является субстратом 4 различных ферментов: фосфоглюкомутазы, фосфоглюкоизомеразы, глюкозо-6-фосфатфосфатазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Относительная (групповая)-

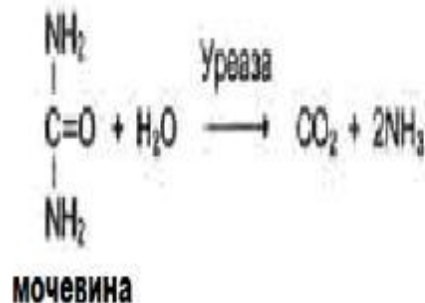
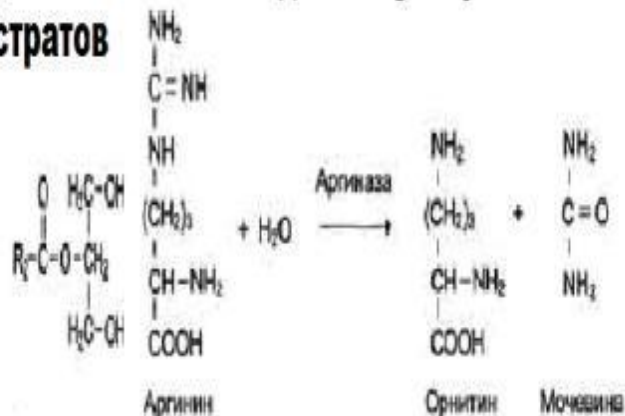
фермент катализирует
однотипные реакции с
небольшим количеством
структурно похожих субстратов



Триацилглицерол

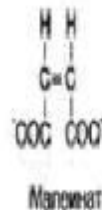
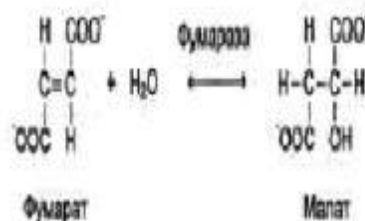
Абсолютная- фермент

катализирует преобразование
только одного субстрата

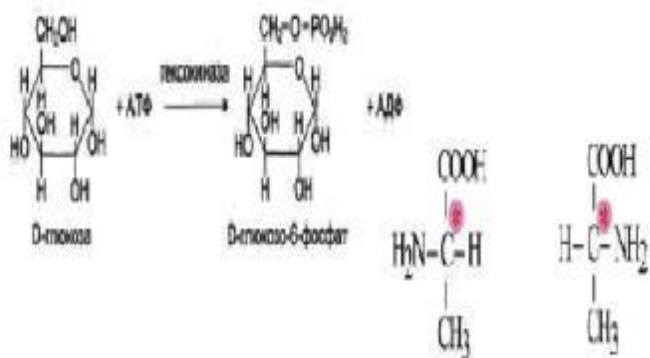


Стереоспецифичность- фермент катализирует

превращение только одного
из стереоизомеров субстрата
к цис-транс-изомерам

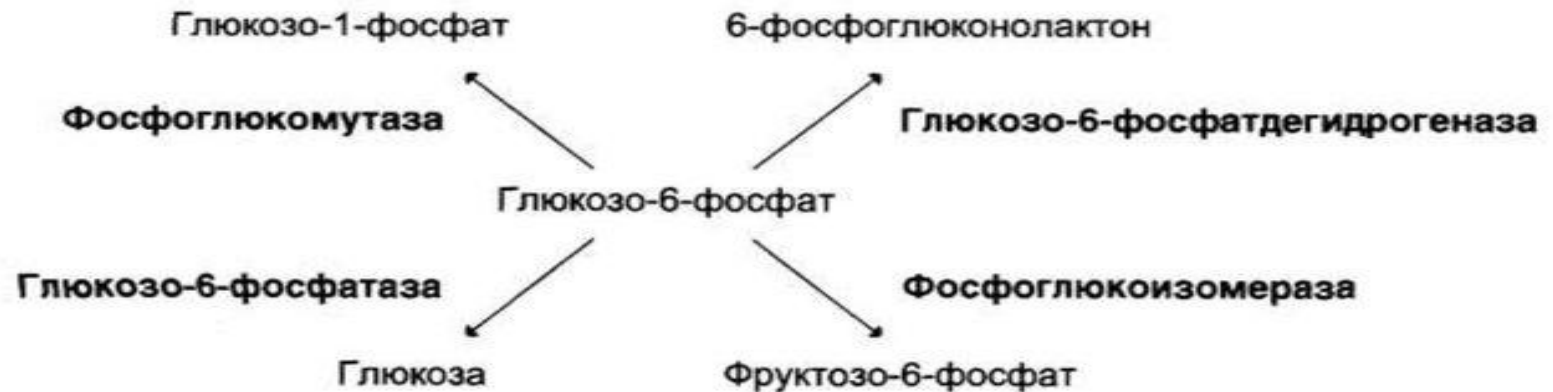


к D-сахарам L-аминокислотам



Каталитическая специфичность

Фермент катализирует превращение субстрата по одному из возможных метаболических путей. Это свойство обеспечивается строением каталитического участка активного центра фермента.



Активность ферментов и единицы активности ферментов

• **Международная единица (МЕ) активности фермента** – это количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин (при оптимальных температурае, рН среды, концентрации субстрата):

$$\text{МЕ} = \text{мкмоль (S)} / \text{мин}$$

• **Катал** – количество фермента, способное превращать 1 моль субстрата за 1 сек: **катал = моль (S) / сек**

• **Удельная активность фермента** - это число единиц активности фермента (E), приходящихся на 1 мг чистого фермента:

$$\text{Удельная активность фермента} = \text{E} / \text{мг(Ф)}$$

• **Молекулярная (молярная) активность фермента** – это число молекул субстрата, которое подвергается превращению 1 молекулой фермента за 1 мин.

$$\text{Молекулярная (молярная) активность фермента} = \text{E} / \text{мкмоль (Ф)}$$

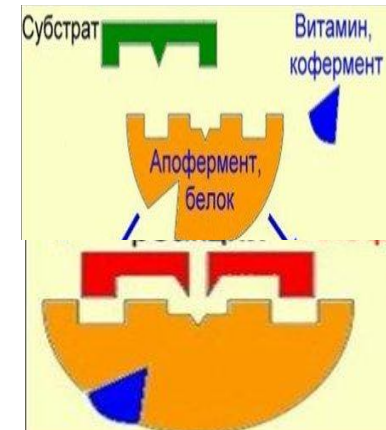
КОФЕРМЕНТЫ –

низкомолекулярные органические вещества не белковой природы. Они чаще всего содержат в своём составе различные витамины, следовательно, их делят на две группы:

1. Витаминные.

2. Невитаминные (нуклеотиды, производные порфирина, глутатион).

- Соединяясь с ферментом, коферменты образуют каталитически активные комплексы.
- Выполняют функцию промежуточных переносчиков атомов или функциональных групп.



-ионы металлов (кофакторы)

- 1) 25% ФЕРМЕНТОВ нуждаются для проявления полной каталитической активности в ионах металлов
- 2) ионы металлов выполняют функцию стабилизатора (молекула субстракта , активного центра и конформации белковой молекулы фермента(3,4 струк. Белка)

Пример: в качестве одного из субстрактов выступает не молекула АТФ, а комплекс Mg^{2+} АТФ, молекула Mg^{2+} не взаимодействует с ферментом , а стабилизирует молекулу АТФ

-в некоторых случаях ионы Металлов служат

мостиком между E и S

E- Me- S



Кинетика ферментативных реакций.

Скорость реакции по закону действующих масс зависит от концентрации исходных веществ: $V_1 = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$ $V_2 = k_2 \cdot [ES]$ $V_3 = k_3 \cdot [ES]$,

где V_1 – скорость образования комплекса ES,

V_2 и V_3 – скорости распада ES на исходные вещества или конечные продукты;

k_1, k_2, k_3 – константы скорости соответствующих реакций.

Наступает равновесие между скоростью образования ES и его распада, т.е. $V_1 = V_2 + V_3$.

Тогда $k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_2 \cdot [ES] + k_3 \cdot [ES]$, или $k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_2 + k_3) \cdot [ES]$.

Преобразовав выражение, получаем $\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m$

Константа Михаэлиса – K_m характеризует сродство фермента к субстрату!

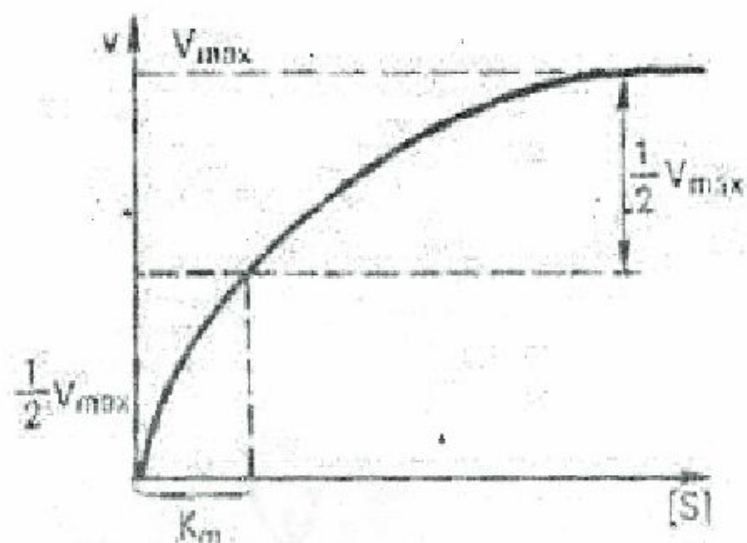
✓ Высокое сродство достигается, когда $k_1 \gg k_2$, при этом K_m – минимальна, а скорость реакции наибольшая.

Уравнение и график Михаэлиса-Ментен

Главное уравнение ферментативной реакции, описывающее зависимость ее скорости от концентрации субстрата, называется *уравнением Михаэлиса-Ментен*:

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

где V_{max} — максимальная скорость реакции при насыщении фермента субстратом.

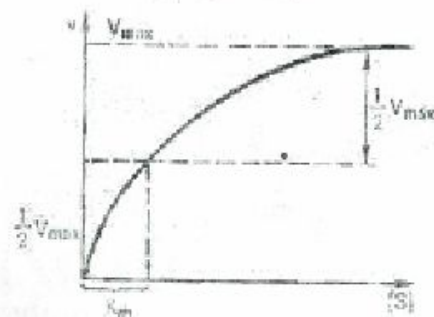


Факторы, влияющие на активность ферментов.

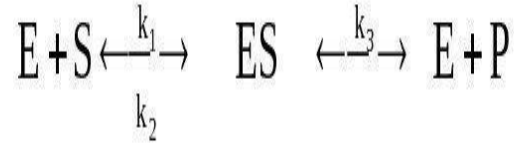
1. *Концентрация субстрата.* Чем выше концентрация субстрата, тем выше скорость реакции.

При различных соотношениях $[S]$ и K_m в ферментативной реакции возможны три случая:

- Если $[S] \ll K_m$, то $V \sim [S]$. В таких условиях, при малой концентрации субстрата, от нее линейно зависит скорость реакции.
- Если $[S] = K_m$, то $V = \frac{1}{2} V_{\max}$ - определяет физический смысл K_m : ее значение численно равно такой концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной.
- Если $[S] \gg K_m$, то $V \rightarrow V_{\max}$ и мало зависит от $[S]$. Это означает, что при высокой концентрации субстрата все связывающие участки фермента заняты, и при дальнейшем увеличении $[S]$ скорость реакции практически не изменяется (*субстратное насыщение*).



Физический смысл константы Михаэлиса



$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

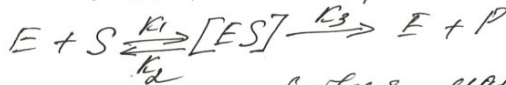
Константа Михаэлиса - K_m характеризует сродство фермента к субстрату!

✓ Высокое сродство достигается, когда $k_1 \gg k_2$, при этом K_m - минимальна, а скорость реакции наибольшая.

✓ Сравнивая значения K_m , можно определить, какой тип молекул наиболее прочно связывается с ферментом.

✓ Как правило, к таким молекулам относятся природные субстраты.

Закономерности течения химической реакции



по закону действующих масс

$$v_1 = k_1 [E][S]$$

$$v_1 = v_2 + v_3$$

$$v_2 = k_2 [ES]$$

$$k_1 [E][S] = k_2 [ES] + k_3 [ES]$$

$$v_3 = k_3 [ES]$$

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

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m$$

K_m - константа Михаэлиса (отношение кон-т обратной реакции к кон-те прямой реакции)

K_m - характеризует сродство фермента к субстрату, чем $\downarrow K_m$, тем \uparrow сродство E и S и наоборот для большинства $K_m \approx 10^{-5} - 10^{-6}$ моль.

зависимость v от концентрации $[S]$ описывается урав. ММ Михаэлиса

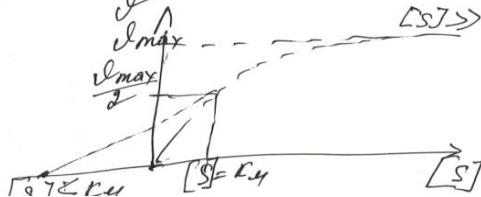
$$v = v_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

сущ. ест 3 варианта решения уравнения

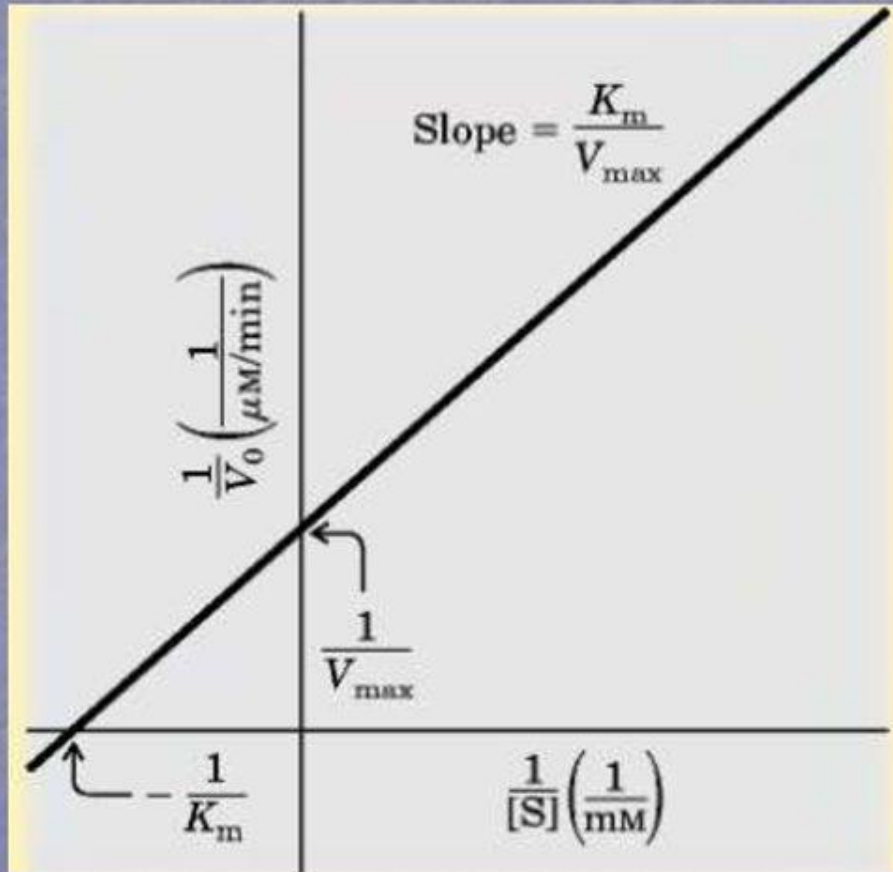
1. $[S] \gg K_m \quad K_m \approx 0. \quad v = v_{\max} \frac{[S]}{[S]} = v_{\max}$

2. $[S] \ll K_m \quad [S] \approx 0. \quad v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m} = K' [S]$

3. $[S] = K_m \quad v = v_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} = v_{\max} \frac{[S]}{2[S]} = \frac{v_{\max}}{2}$



Уравнение Лайнуивера-Берка



$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{max}} [S]}$$

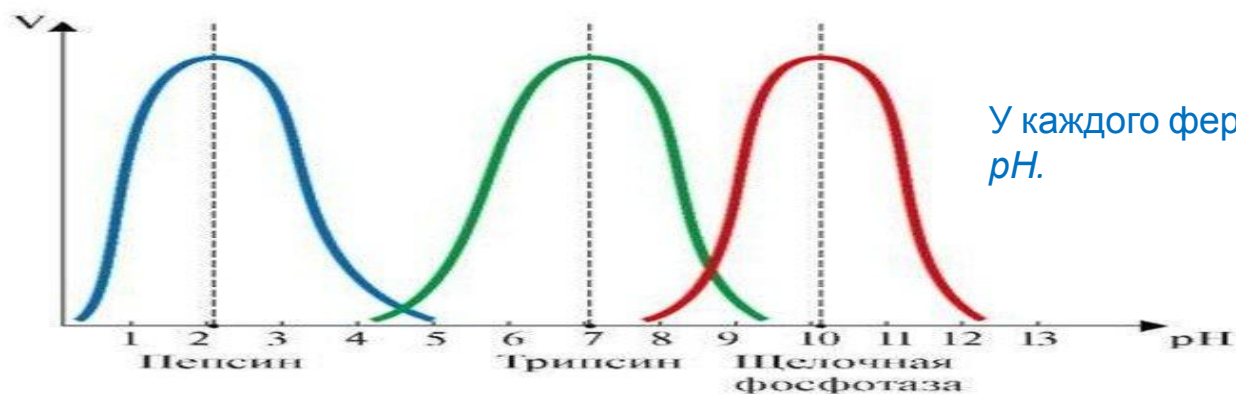
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{max}} [S]} + \frac{[S]}{V_{\text{max}} [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{max}} [S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

Зависимость активности фермента от температуры



Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от pH среды

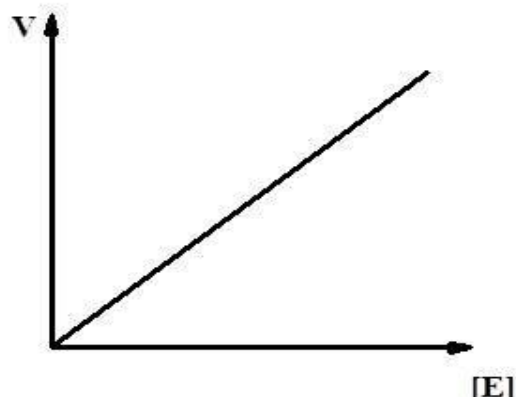


Причиной изменения активности ферментов при разных pH служит протонирование и депротонирование аминокислотных радикалов, в том числе, радикалов активного центра, что меняет конформацию фермента и его сродство к субстрату.

Зависимость скорости ферментативной реакции

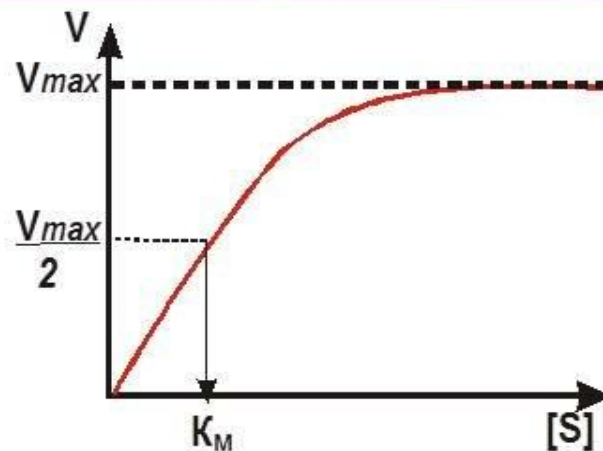


от концентрации фермента



Зависимость скорости реакции от концентрации фермента носит линейный характер: чем больше молекул фермента, тем выше скорость.

от концентрации субстрата



Субстратное насыщение, при дальнейшем увеличении S , скорость практически не изменяется.

Ингибиторы ферментов

- **Ингибиторы – вещества, снижающие каталитическую активность фермента**



Конкурентное ингибирование

Субстрат

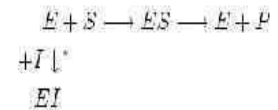


Ингибитор

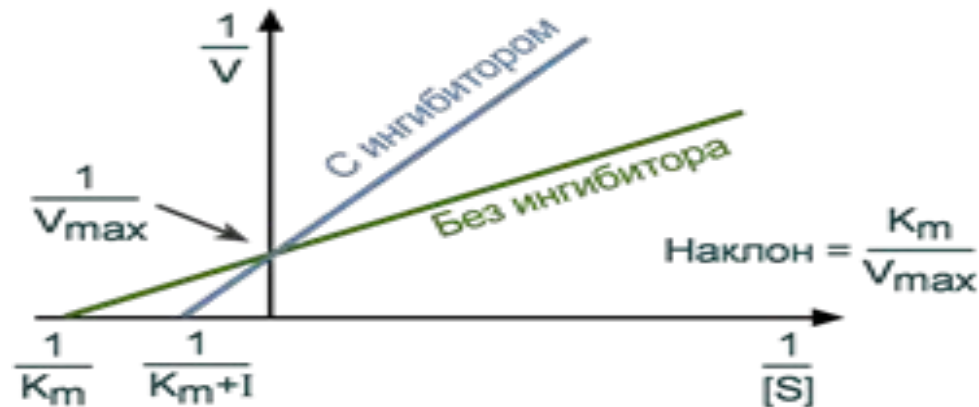


Конкурируют за активный центр

- Конкурентный ингибитор конкурирует с субстратом за связывание с активным центром. Это происходит потому, что ингибитор и субстрат имеют сходные структуры. Конкурентное ингибирование: S-субстрат, I- ингибитор (своей трехмерной структурой похож на субстрат). Ингибитор связывается с ферментом, но реакция не протекает.



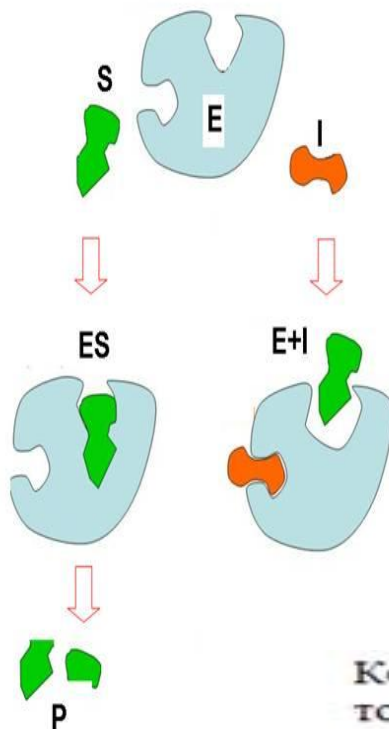
С ингибитором конкурентного типа



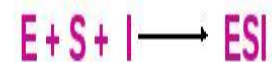
Неконкурентные ингибиторы:

- 🍷 Не похожи на S
- 🍷 Химически связываются с любым участком E
- 🍷 Действуют в низких концентрациях
- 🍷 Ингибирование чаще необратимое!!!

Клеточные яды !!!

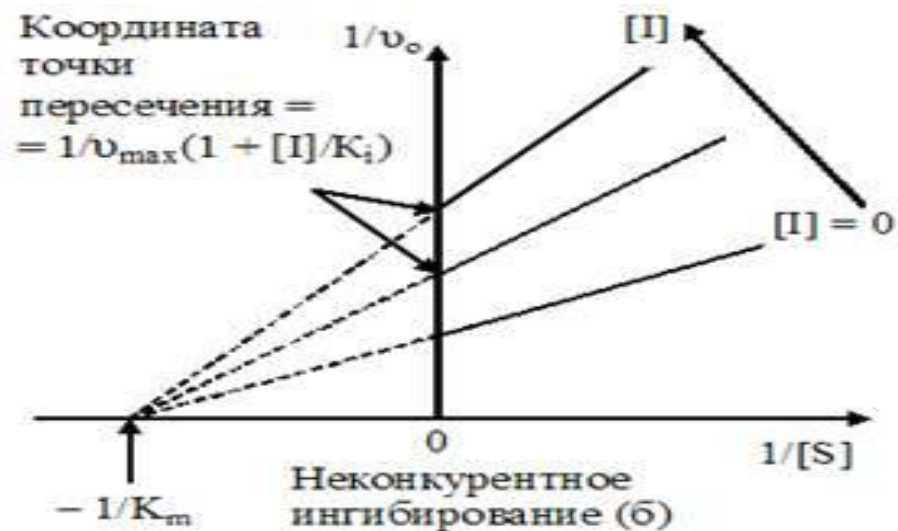


Образуется тройной неактивный комплекс:



Сродство фермента к субстрата не изменяется, т.е.

K_m - не меняется



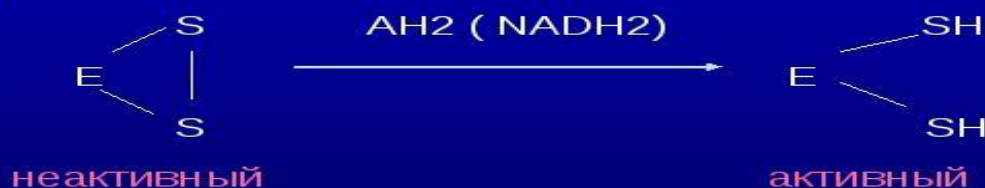
Активаторы ферментов

- Это вещества, увеличивающие скорость ферментативной реакции.
- Чаще всего в качестве активаторов выступают ионы металлов, такие как Fe, Cu, Co, Mg и др.
- Металлы-активаторы участвуют в образовании стабильной переходной конформации фермента, что способствует более быстрому образованию фермент-субстратного комплекса.

45

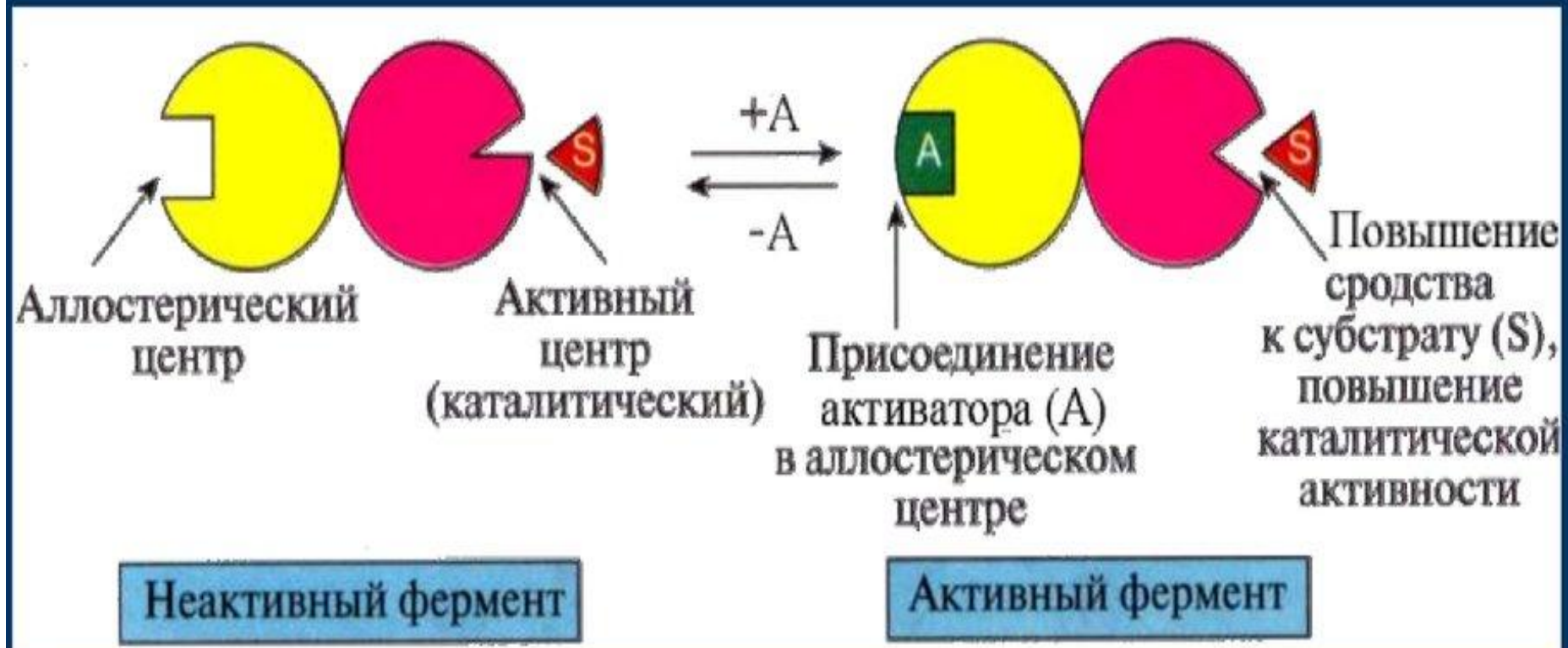
Активация ферментов

- 1) Ионами металлов
- 2) Восстановленными соединениями



- 3) Частичный протеолиз
пепсиноген $\xrightarrow[HCl]{\text{пепсин}}$ пепсин
- 4) Аллостерическими активаторами (АДФ, АМФ)
- 5) Гормонами через посредников: цАМФ, цГМФ

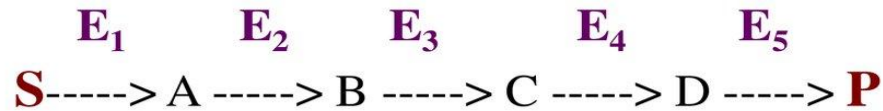
Аллостерическая регуляция: активация



Аллостерические активаторы изменяют конформацию фермента и повышают сродство активного центра к субстрату (повышают активность).

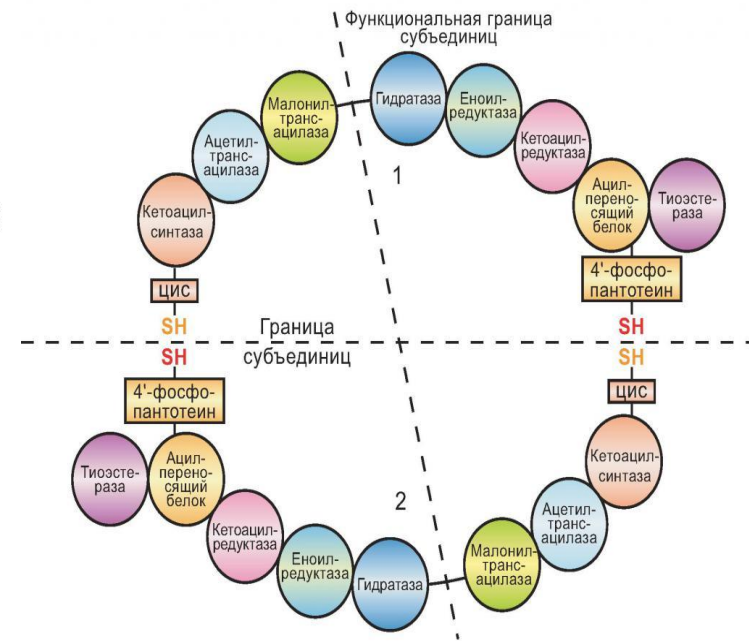
МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

- это комплексы ферментов, работающие подобно конвейеру, и обеспечивающие превращение S до конечного продукта через промежуточные стадии.



- E_1, E_2, E_3, E_4, E_5 - объединяются в мультиферментный комплекс и находятся в клетке в одной органелле.

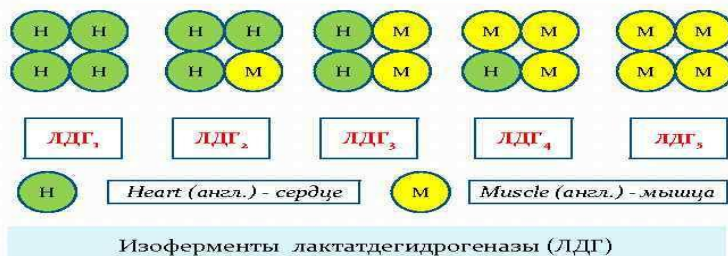
Строение мультиферментного комплекса — синтазы жирных кислот



Благодаря таким комплексам значительно ускоряется скорость превращения молекул.

ИЗОФЕРМЕНТЫ

- Изоферменты – это ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся по структуре, физико-химическим и иммунологическим свойствам. катализирующие идентичные или одинаковый тип реакции, но отличающиеся друг от друга по первичной структуре белка.



Например, фермент **креатинкиназа** представлен **тремя** **изомерными формами**, составленными из двух типов субъединиц **М** и **В**.

Креатинкиназа-1 состоит из субъединиц типа **В** и локализуется в головном мозге;
креатинкиназа-2 по одной **М** и **В** субъединице, активна в миокарде;
креатинкиназа-3 содержит две **М**-субъединицы, специфична для скелетной мышце.



Медицинская энзимология –

это энзимология, которая изучает применение ферментов в медицине.
В медицинской энзимологии выделяют три основных направления:

- энзимопатология;
- энзимодиагностика;
- энзимотерапия.

Энзимопатии

Патологические процессы, основанные на нарушении ферментативного катализа

➤ **первичные** (наследственные)

- **нарушается образование конечного продукта**

ПРИМЕР: дефект **тирозины** → нарушение синтеза меланина → альбинизм

- **накапливаются токсические метаболиты**

ПРИМЕРЫ:

- ✓ **Фенилкетонурия** (недостаток **фенилаланингидроксилазы** → снижение образование тир из фен):

накопление фенилпирувата, фенилацетата → токсическое действие на мозг
нарушение транспорта *тир* в мозг → снижение синтеза дофамина, норадреналина

- ✓ **Алкаптонурия - «черная моча»** (недостаток **оксигеназы гомогентизиновой кислоты**, реакция катаболизма *тир*):

гомогентизиновая кислота и алкаптоны откладывается в суставах → воспаление

— ➤ **вторичные** (приобретенные)

Энзимодиагностика

Постановка диагноза на основе определения активности ферментов в биологических жидкостях человека

Ферменты энзимодиагностики заболеваний

- **Амилаза** Слюнные железы, поджелудочная железа, яичники *Заболевания поджелудочной железы*
- **Кислая фосфатаза** Простата, эритроциты *Рак простаты*
- **Щелочная фосфатаза** Печень, кость, слизистая оболочка кишечника, плацента, почки *Болезни костной ткани, болезни печени*
- **АЛТ** Печень, скелетная мышца, сердце *Гепатиты*
- **АСТ** Печень, скелетная мышца, сердце, почки, эритроциты *Инфаркт миокарда, Гепатиты, болезни мышц*
- **Холинэстераза** Печень *Отравление фосфорорганическими инсектицидами, болезни печени*

Энзимотерапия

к элемент комплексной терапии - применение ферментов в сочетании с другой терапией.

В качестве дополнительных терапевтических средств ферменты используют при ряде заболеваний.

- Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин) применяют при местном воздействии для обработки гнойных ран с целью расщепления белков погибших клеток, для удаления сгустков крови или вязких секретов при воспалительных заболеваниях дыхательных путей.
- Ферментные препараты рибонуклеазу и дезоксирибонуклеазу используют в качестве противовирусных препаратов при лечении аденовирусных конъюнктивитов, герпетических кератитов.
- Ферментные препараты стали широко применять при тромбозах и тромбозмболиях. С этой целью используют препараты фибринолизина, стрептолиазы, стрептодеказы, урокиназы.
- Фермент гиалуронидазу (лидазу), катализирующий расщепление гиалуроновой кислоты, используют подкожно и внутримышечно для рассасывания контрактур рубцов после ожогов и операций (гиалуроновая кислота образует сшивки в соединительной ткани)

Энзимотерапия – применение ферментов и регуляторов активности ферментов (ингибиторов и активаторов) с лечебной целью.

Протеолитические ферменты:

- 1) **абомин и ацидинпепсин** - при гастритах;
- 2) **панкреатин, мезим-форте, панцитрат, креон** – при панкреотитах;
- 3) **коллагеназа** – для предупреждения развития грубых (типа келоидных) рубцов;
- 4) **стрептокиназа и урокиназа** - для предотвращения и лечения тромбозов, эмболии, инфаркта миокарда, закупорки сосудов сетчатки глаза.

Полиферментные препараты:

- 1) **вобэнзим, вобэмугос, флогэнзим**: оказывают противовоспалительное, противоотечное, фибринолитическое, иммуномодулирующее и анальгетическое действие.