

ЛЕКЦИЯ 1. ЭНЗИМОЛОГИЯ

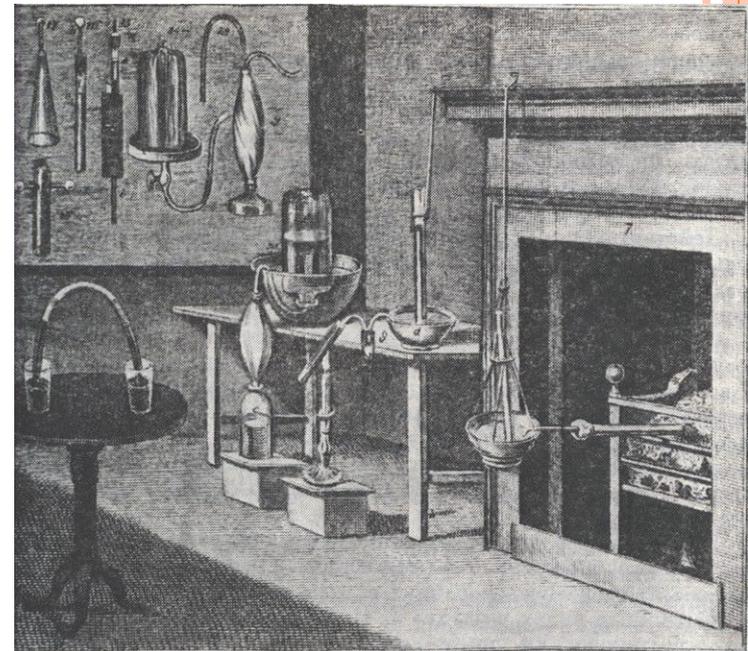
Николаев Вячеслав Михайлович
доцент, к.б.н.
Кафедра биохимии и биотехнологии

Якутск

- **Ферменты или энзимы** (от лат. fermentum, англ. ensimo — закваска и ζύμη, zyme — дрожжи) — белковые молекулы или их комплексы, ускоряющие химические реакции в живых системах. Наука о ферментах называется энзимологией, а не ферментологией (чтобы не смешивать слова с корнями из латинского и греческого языков).



- Термин «брожение» (fermentatio) для обозначения всех процессов, идущих с выделением газа, впервые употребил голландский алхимик **Ж. Б. ван Гельмонт** (1577-1644).





Пайен, Ансельм



Жан-Франсуа Персо

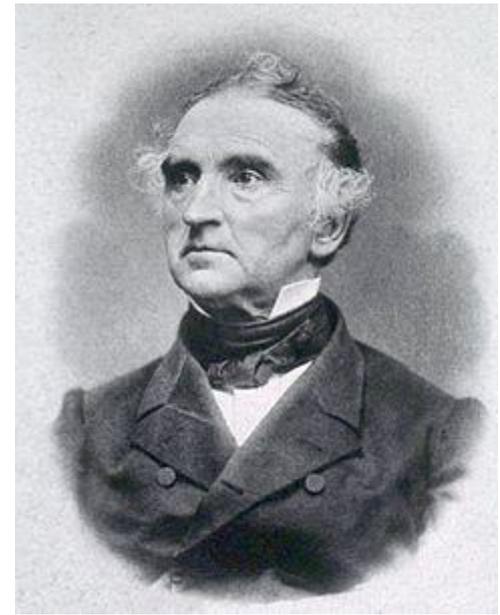
В 1833 году Пайен и Персо обнаружили в осадке, образующимся при добавлении спирта к солодовому экстракту, термолabile вещество, обладающее способностью превращать крахмал в сахар. Это вещество которое мы в данный момент называем — амилазой, было названо ими — **диастазой**.





Луи Пастер

- Процесс брожения катализируется некой жизненной силой (ферментом), находящейся в дрожжевых клетках, причём он считал, что эти «силы» неотделимы от структуры живой клетки дрожжей.



Юстус фон Либих

- Все процессы брожения представляются чисто химическими явлениями каталитического характера.





Вилли Кюне

- Ввел в употребление термин – **ЭНЗИМ.**





Эдуард Бухнер

- Получил систему ферментов, осуществляющих брожение, из дрожжевого экстракта, не содержащего дрожжевых клеток.





Герман Эмиль Фишер

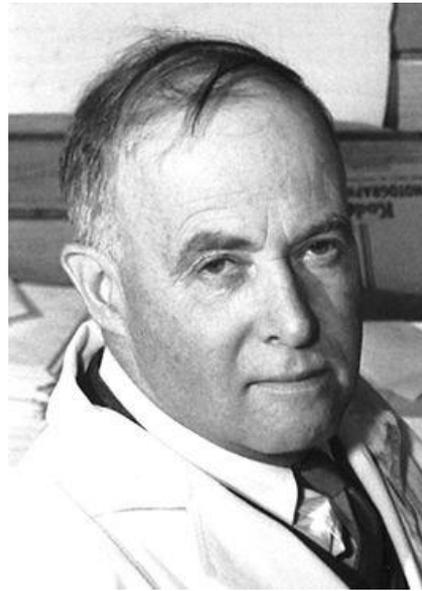
- На основании своих наблюдений над субстратами известной структуры, выдвинул свое знаменитое положение о том, что субстрат подходит к ферменту как ключ к замку.



ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНОГО СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ ИХ —
СПЕЦИФИЧНОСТЬ, НЕВОЗМОЖНО БЕЗ ВЫДЕЛЕНИЯ
ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЧИСТОМ ВИДЕ.



**Рихард Мартин
Вильштеттер**



**Джеймс Бетчеллер
Самнер**



**Джон Говард
Нортроп**



КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ



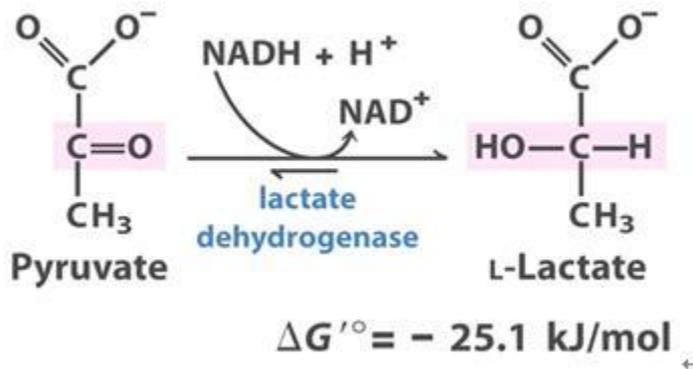
Каждому ферменту присвоен четырехзначный классификационный номер, включающий класс, подкласс, подподкласс и порядковый номер в подподклассе.

В 1961 г в Москве V Международный биохимический союз принял современную классификацию ферментов. В соответствии с этой классификацией все ферменты делятся:

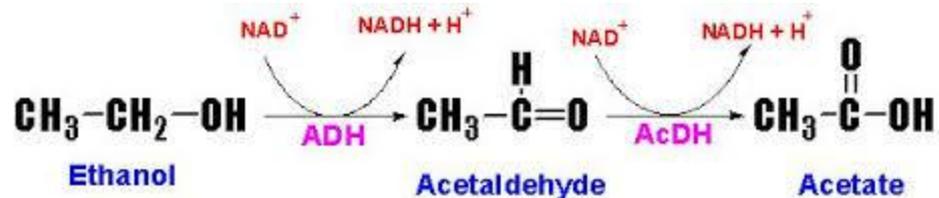
Выделяют 6 классов ферментов:

- I класс – Оксидоредуктазы
- II класс – Трансферазы
- III класс – Гидролазы
- IV класс – Лиазы
- V класс – Изомеразы
- VI класс – Лигазы

- На **классы** – по типу катализируемой реакции,
- каждый класс подразделяется на **подклассы** – по природе атакуемой химической группы,
- подклассы делятся на **подподклассы** – по характеру атакуемой связи или по природе акцептора.



Лактатдегидрогеназа
КФ 1.1.1.27



Алкогольдегидрогеназа
КФ 1.1.1.1.

Таблица 4.5. Международная классификация ферментов

| № | Класс | Тип катализируемой реакции |
|---|--------------------|--|
| 1 | Оксидоредуктазы | Перенос электронов и протонов |
| 2 | Трансферазы | Перенос групп атомов, отличных от атомов водорода |
| 3 | Гидролазы | Гидролиз различных связей (с участием молекулы воды) |
| 4 | Лиазы | Образование двойных связей за счет удаления групп или добавление групп за счет разрыва двойных связей |
| 5 | Изомеразы | Внутримолекулярный перенос групп с образованием изомерных форм |
| 6 | Лигаза (синтетаза) | Соединение двух молекул и образование связей C—C, C—O, C—S и C—N, сопряженных с разрывом пиродифосфатной связи АТФ |



ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Если рассматривать все **подклассы**, то в них выделяются группы ферментов, действующие

на:

- 1.1. СН-ОН группу доноров;

- 1.2. альдегидную или кетонную группу доноров;

- 1.3. СН-СН группу доноров;

- 1.4. СН-NH₂ группу доноров;

- 1.5. СН-NH группу доноров;

- 1.6. НАДН или НАДФН в качестве доноров;

- 1.8. содержащие серу группы доноров;

- 1.9. гем-содержащие доноры;

- 1.10. дифенолы в качестве доноров;

- 1.11. пероксид водорода в качестве акцептора;

- 1.11. водород в качестве донора;

- 1.13. один донор с включением молекулярного кислорода;

- 1.14. два донора с включением молекулярного кислорода;

- 1.15. супероксидные радикалы в качестве акцептора;

- 1.17. СН₂ группу доноров;

- 1.18. ферредоксин в качестве донора;

- 1.19. флаводоксин в качестве донора;

- 1.20. фосфор или мышьяк в качестве донора;

- 1.21. на вещества Х-Н и Y-Н с образованием Х-Y-связи;

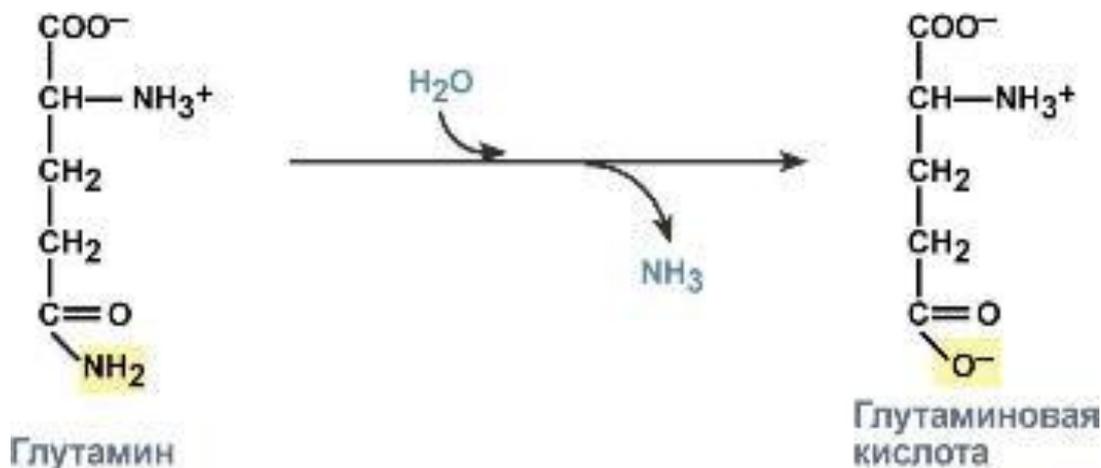
- 1.22. галоген в качестве донора;

- 1.97. другие оксидоредуктазы.



СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ НАЗВАНИЕ

Часто такое название длинно и сложно для использования, поэтому как производное систематического названия у многих ферментов имеется одно или несколько **рабочих** названий.



Характеристика фермента

| | |
|--------------------------|---|
| Систематическое название | L-глутамин:амидгидролаза |
| Рабочее название | Глутаминаза |
| Класс | 3. Гидролазы |
| Подкласс | 3.5. Действующие на связи углерод-азот (не пептидные) |
| Подподкласс | 3.5.1. Действующие в линейных амидах |
| Классификационный номер | КФ 3.5.1.2. |



ТРИВИАЛЬНОЕ НАЗВАНИЕ

Тривиальное название – название, сложившееся исторически. Для некоторых ферментов (чаще для гидролаз) к названию субстрата добавляется окончание "-аза" – уреаза, амилаза, липаза. Тем не менее и у таких ферментов имеется систематическое название.



Теодор Шванн

- ▣ Изучая физиологию пищеварения, обнаружил в желудочном соке особое вещество, переваривающее пищу, которое назвал «пепсин». Это открытие он сделал, когда ему было 26 лет.
- ▣ **ПЕПСИН** (от греческого слова *pepto* - "варю")

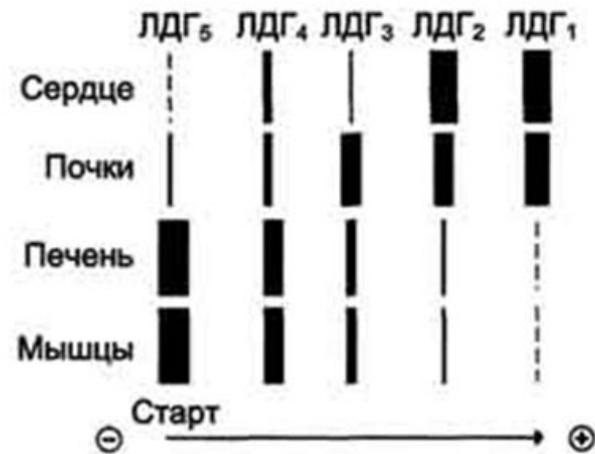
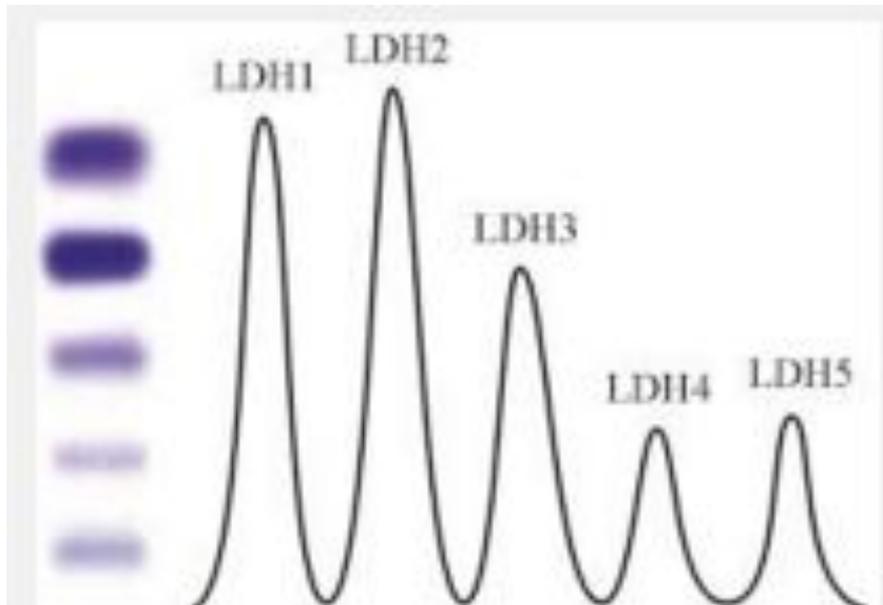
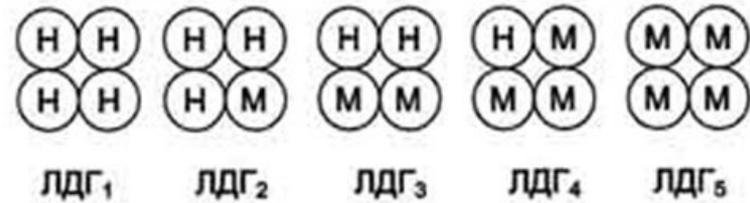
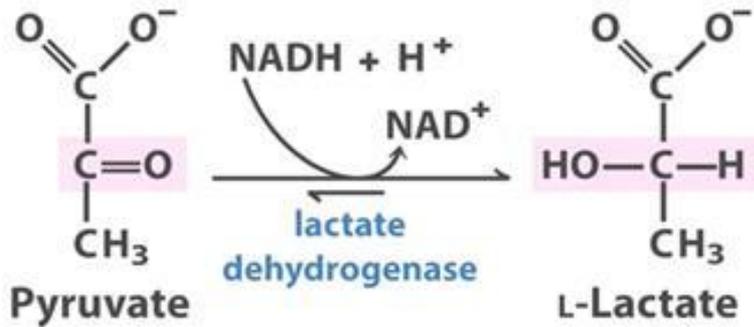


ИЗОФЕРМЕНТЫ

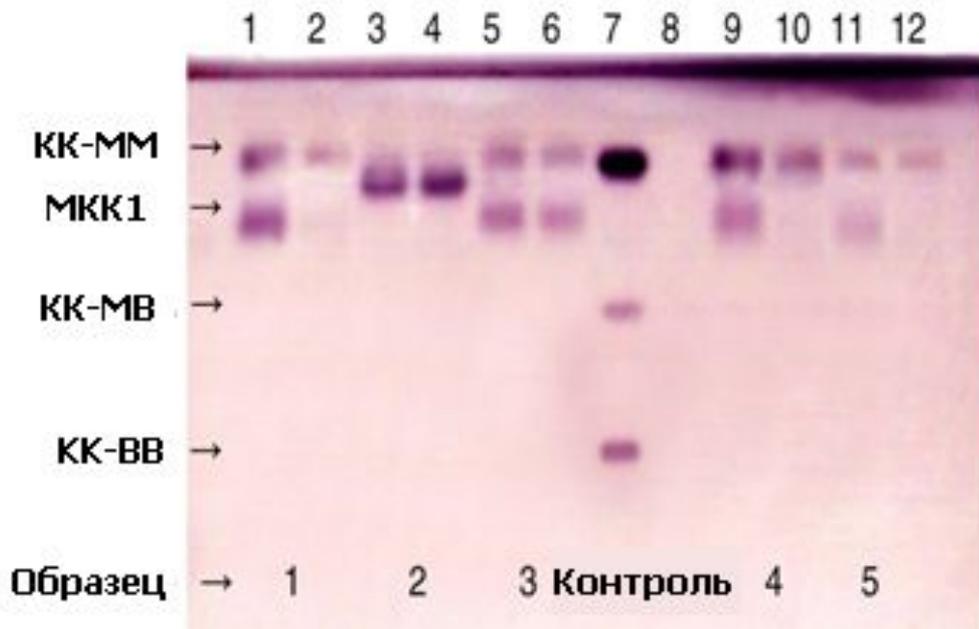
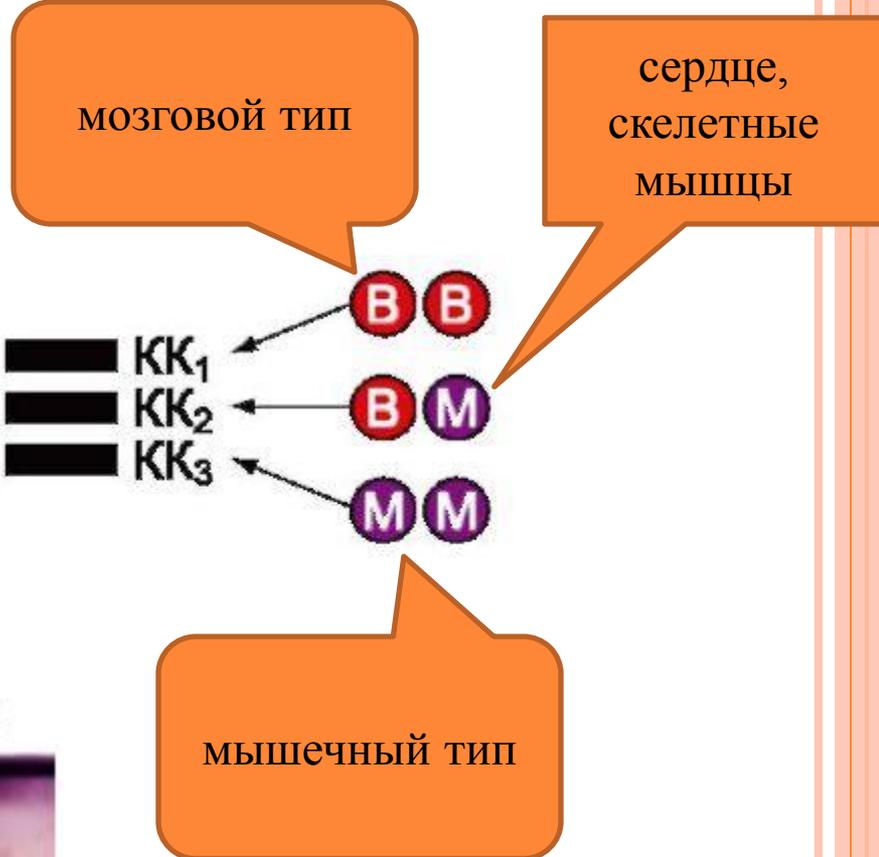
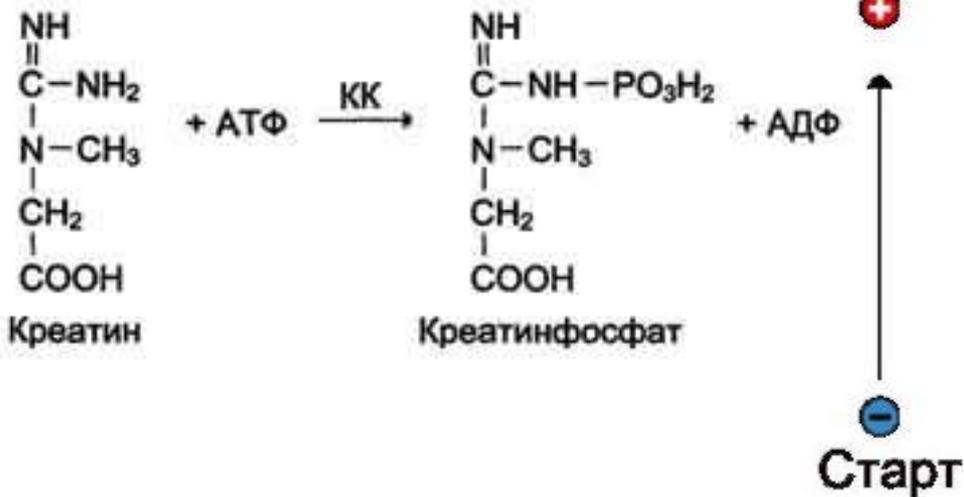
- **Изоферменты, изоэнзимы, изозимы** — множественные формы одного фермента, которые катализируют одну и ту же реакцию, но различаются по аминокислотной последовательности, физико-химическим свойствам и регуляции.



ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА



КРЕАТИНКИНАЗА



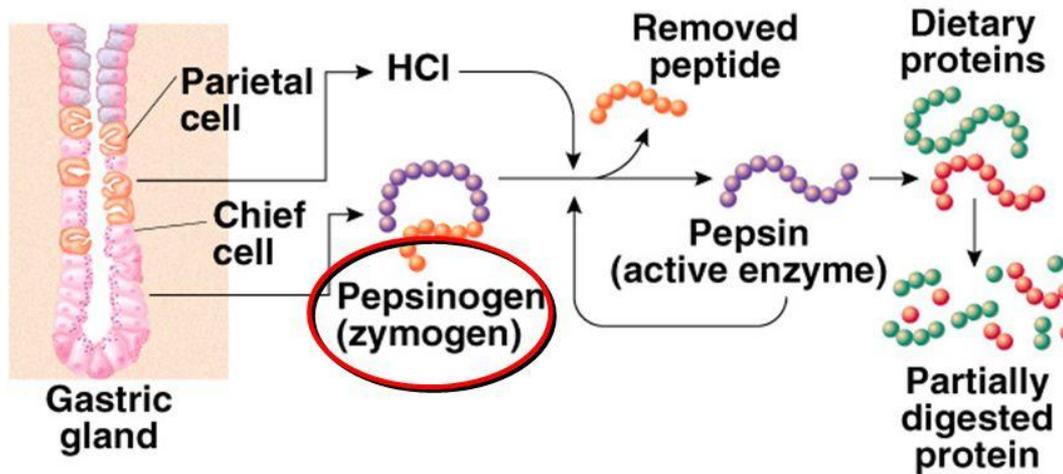
Изоформа ММ может повышаться при травмах и повреждениях скелетных мышц. Изоформа ВВ не может проникнуть через гематоэнцефалический барьер, поэтому в крови практически не определяется даже при инсультах и диагностического значения не имеет.



ЗИМОГЕНЫ

- ▣ **Зимоген** — функционально неактивный профермент, который активируется при посттрансляционном удалении из молекулы фрагмента, способствующего поддержанию латентного состояния (напр., зимоген пепсиногена превращается в пищеварительный фермент пепсин при расщеплении на соответствующие пептиды).

Production & Action of Pepsin

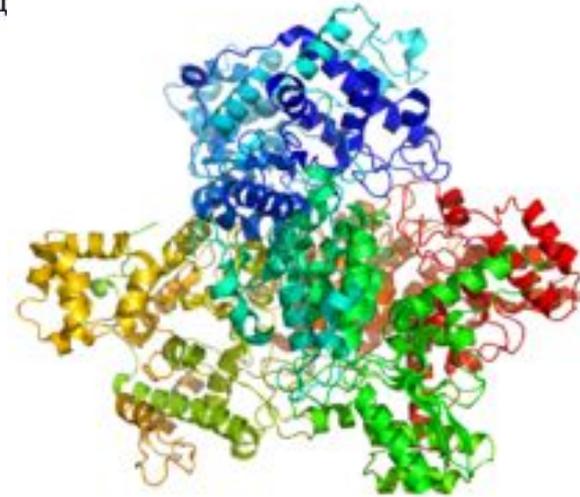
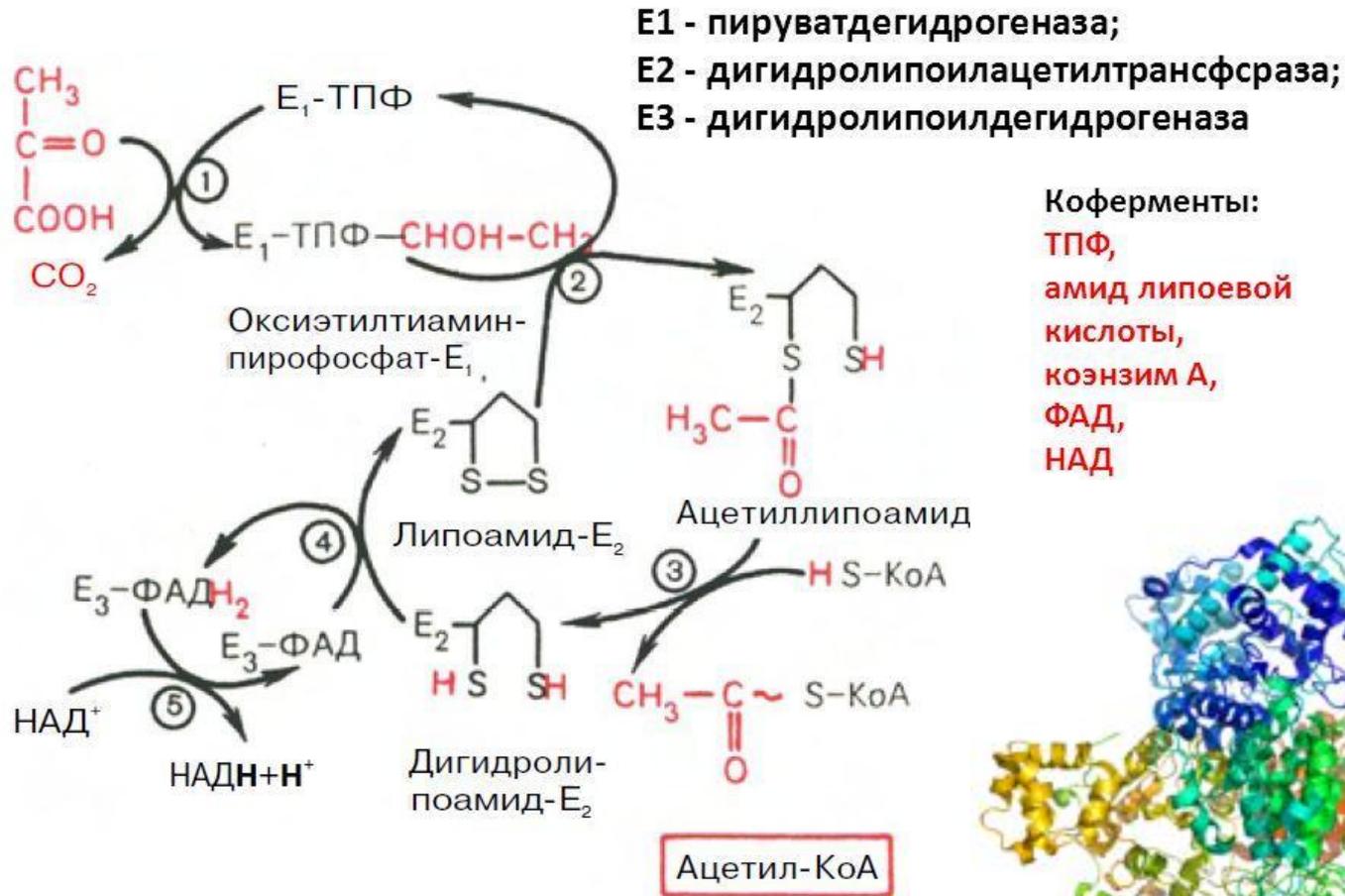


МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ

- Мультимолекулярные ферментные системы - ферментные комплексы, в состав которых входят не сублидиницы (в каталитическом отношении одготипные протомеры), а разные ферменты, катализирующие последовательные ступени превращения какого-либо субстрата.

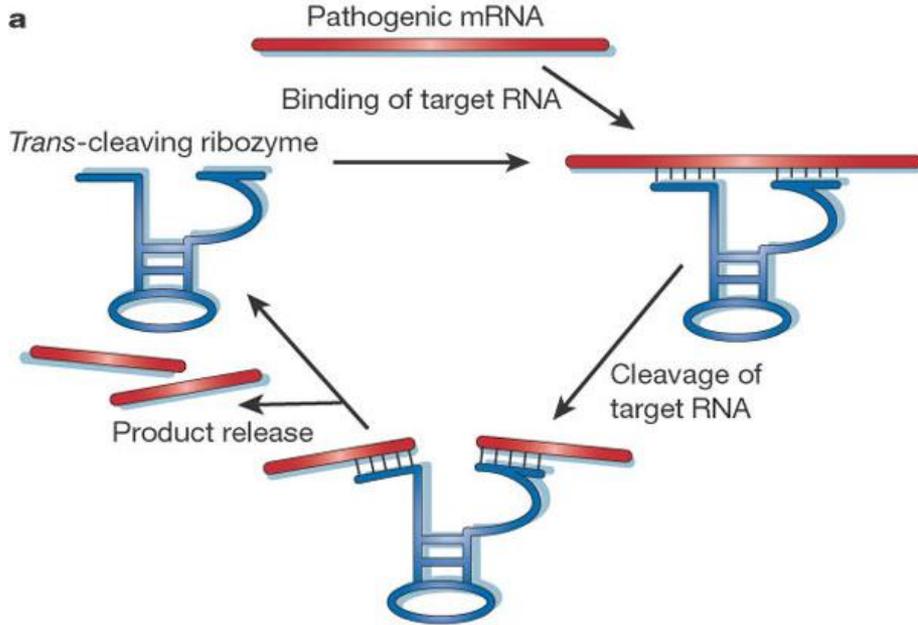


Пируватдегидрогеназа

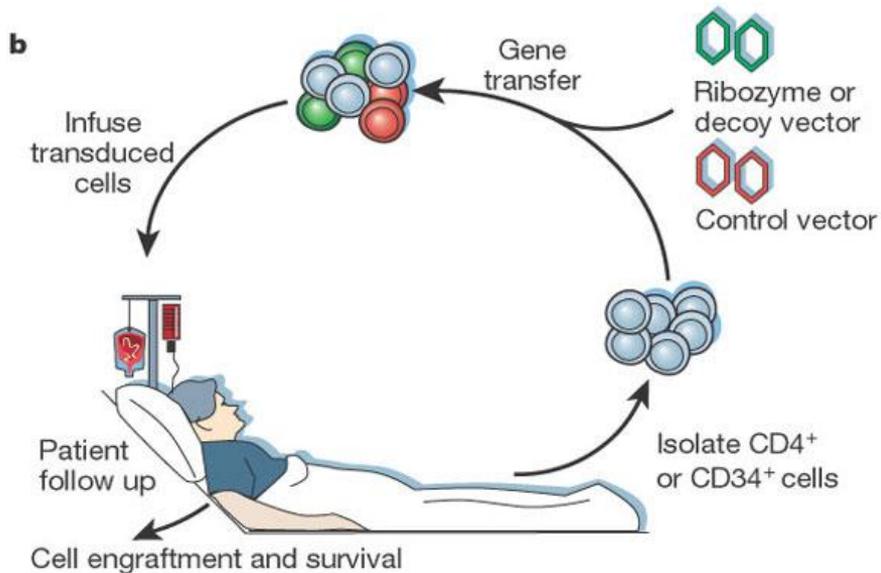


Пируватдегидрогеназа
E. coli.

РИБОЗИМЫ



▣ Рибозимы - каталитически активные молекулы РНК.



АБЗИМЫ

- Антитела, помимо связывания и удаления антигена, способны проявлять ферментативную активность. Такие антитела получили название **абзимов** (гибрид английских слов *antibody* и *enzyme*, буквально: антитело-фермент).



СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы (от греч. enzyme — в дрожжах или от лат. fermentatio — брожение).

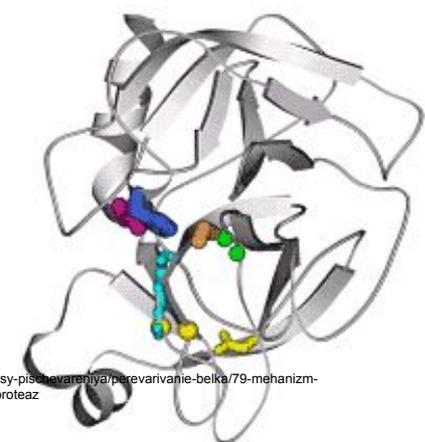
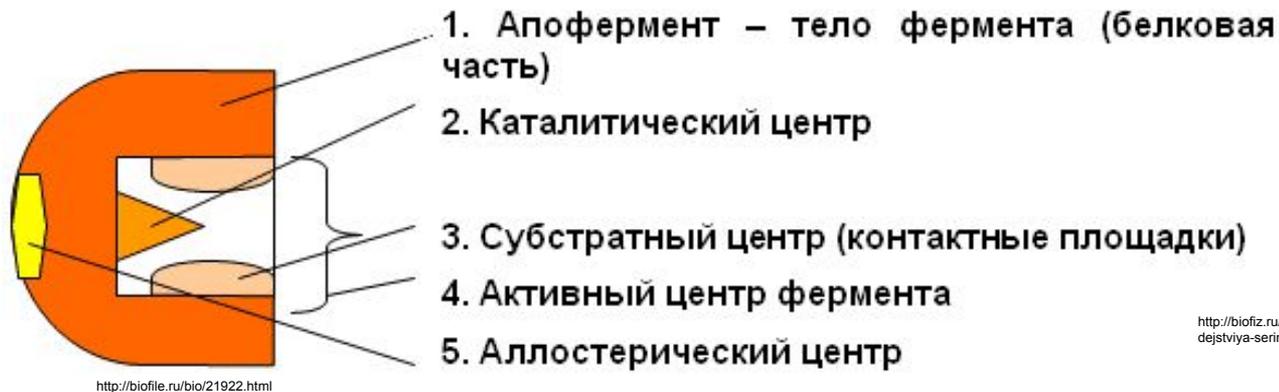
Вещества, вступающие в ферментативную реакцию, называются **субстратами**. В результате ферментативных превращений получают **продукты реакции**.

В трехмерной структуре фермента выделяют несколько участков, несущих определенную функцию. В молекуле фермента выделяют **активный центр**, т. е. участок, с которым связывается субстрат и где протекает каталитическая реакция

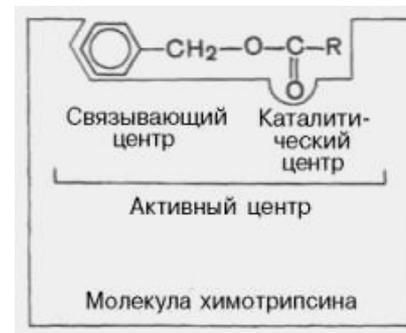
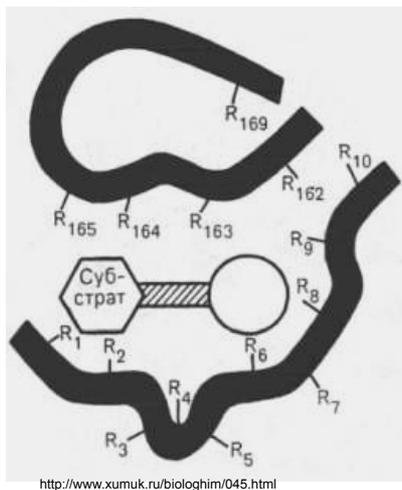
Кроме активного центра у ряда ферментов имеется **регуляторный, или аллостерический** (от греч. allos — иной, чужой) центр, который в молекуле фермента, как правило, пространственно отделен от активного центра. К аллостерическому центру присоединяются вещества — **эффекторы**, которые делятся на **активаторы и ингибиторы**. Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной и/или четвертичной структуры молекулы фермента и соответственно конфигурации активного центра, вызывая снижение или повышение ферментативной активности. Ферменты, имеющие аллостерический центр, называются **аллостерическими**.

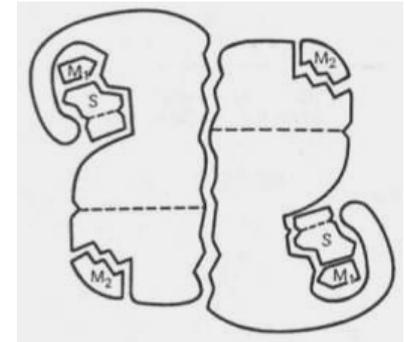


АКТИВНЫЙ ЦЕНТР – часть молекулы фермента где происходит связывание и превращение субстрата.



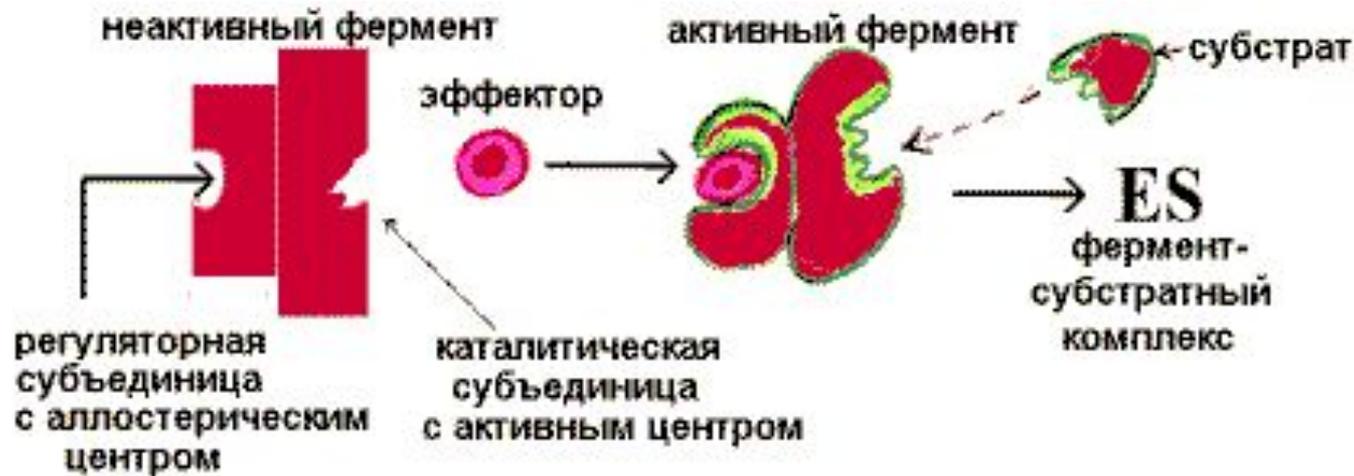
Чаще всего в каталитических центрах однокомпонентных ферментов встречаются остатки Сер, Гис, Три, Арг, Цис, Асп, Глу и Тир





http://bono-esse.ru/blizzard/A/Chimia/Bio_chinija/Stroenie_fermentov.html

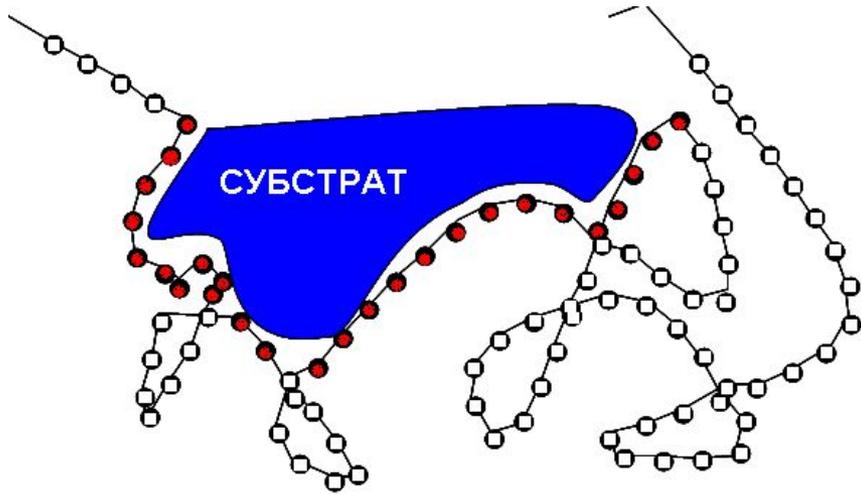
Аллостерический центр - участок молекулы фермента вне его активного центра - Регуляторный центр



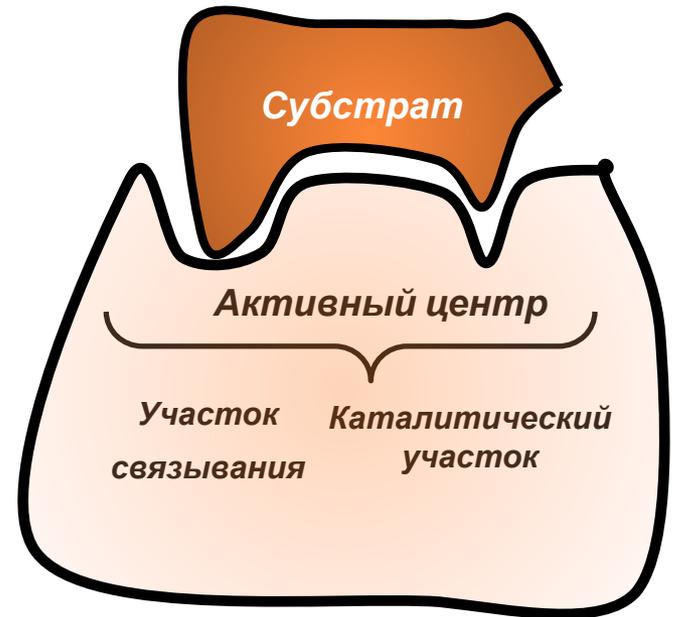
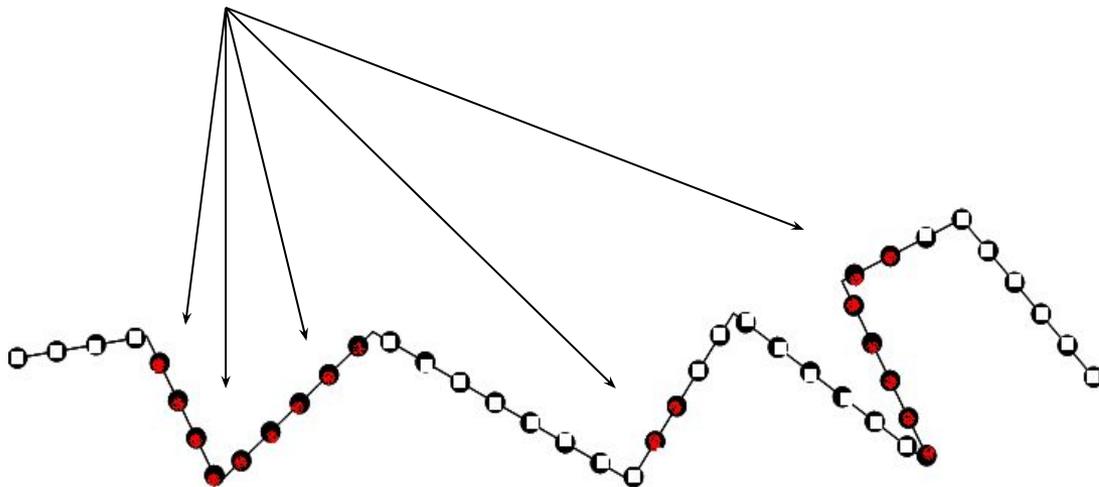
<http://old.ssmu.ru/office/f4/biochemistry/uthebnik/11.htm>



Строение активного центра фермента



Аминокислоты, образующие активный центр



**Аллостерический центр –
регуляторный центр фермента, с которым
взаимодействуют эффекторы**

(+) - активаторы

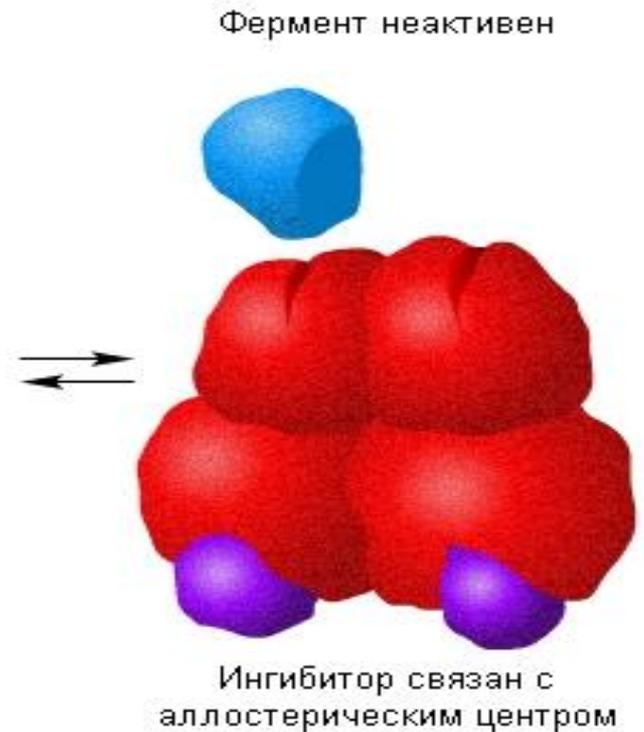
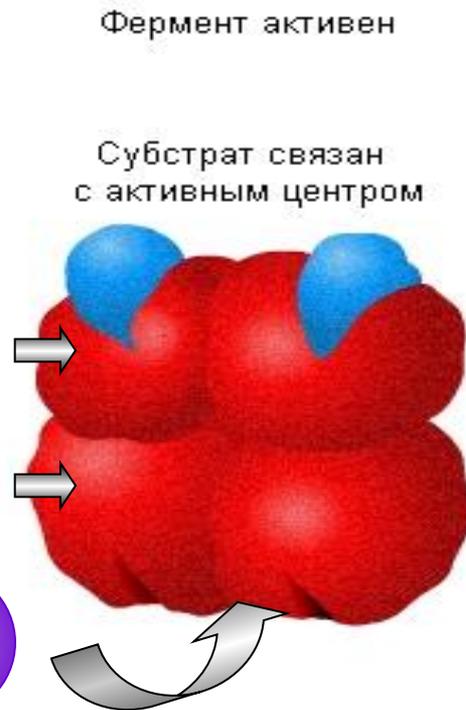
(-) - ингибиторы

Регуляторный фермент:

Каталитическая
субъединица

Регуляторная
субъединица

(-) эффектор



Специфичность ферментов

Специфичность действия - это способность фермента катализировать только определенный тип химической реакции.

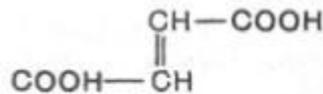
✓ абсолютная субстратная специфичность - превращение только одного, строго определенного субстрата;

Аргиназа – расщепление аргинина

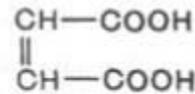
✓ относительная субстратная специфичность - превращения нескольких, сходных по строению, субстратов;

Пептидазы – расщепление пептидных связей

✓ стереоспецифичность - превращения определенных стереоизомеров.



Фумаровая кислота



Малеиновая кислота

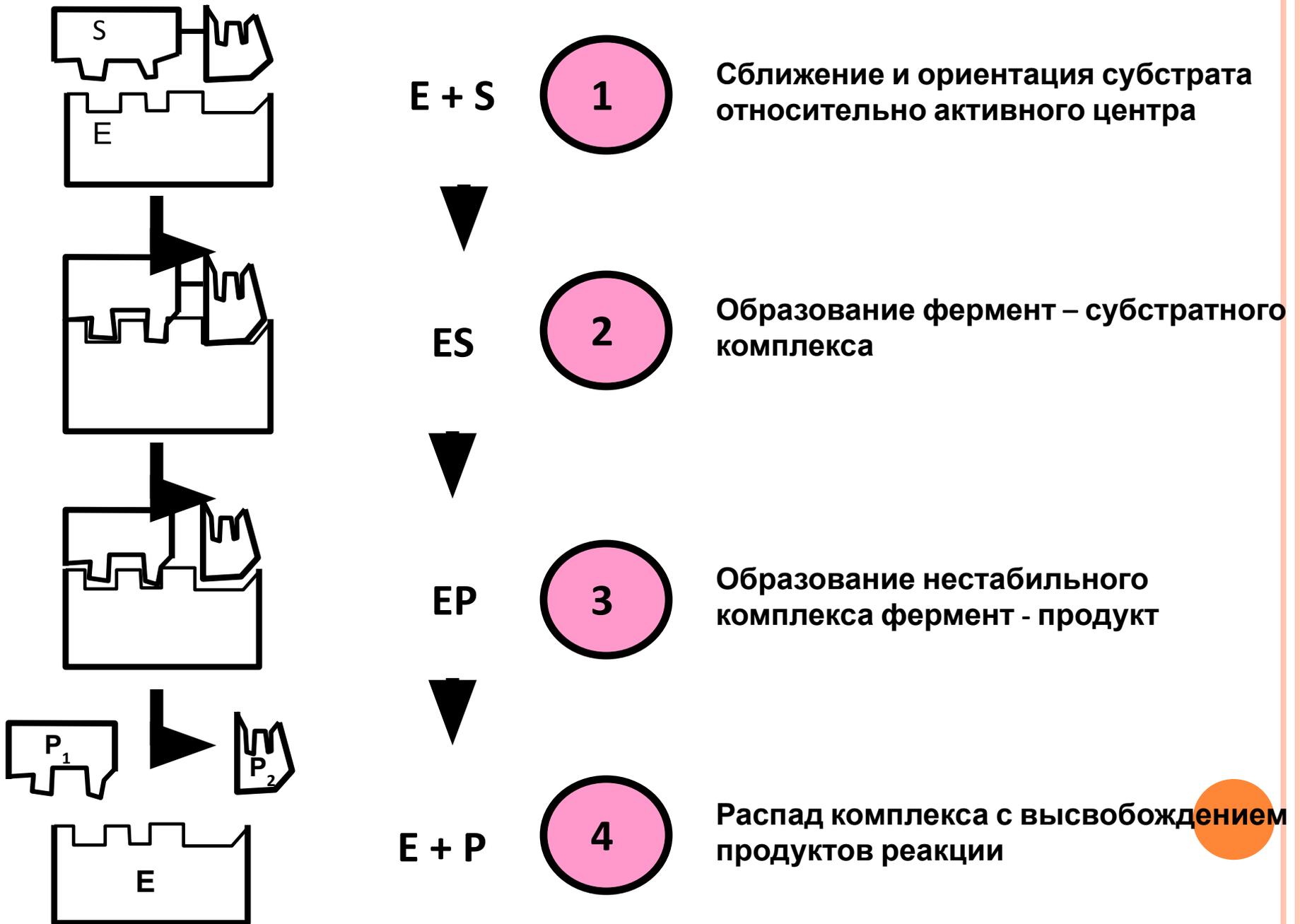


ЛАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

- Конформация белка (лат. *conformatio* - форма, постоеие и расположение)
—
- пространственное расположение атомов в молекуле белка.
- Конформационная лабильность — это способность белков и ферментов к небольшим изменениям пространственной
- структуры за счет разрыва одних и образования других слабых связей.
- Факторы, вызывающие конформационные изменения белков:
 - Небольшие колебания рН среды (в пределах десятых доли единицы)
 - Изменение температуры (в пределах 1-2 градусов)
 - Изменение заряда глобулы при присоединении к ней дополнительных ионогенных групп
 - Незначительные колебания ионной силы среды
 - Взаимодействие белка с другими молекулами
- После окончания действия факторов, вызывающих изменения конформации белка, она самопроизвольной возвращается
- к исходной.

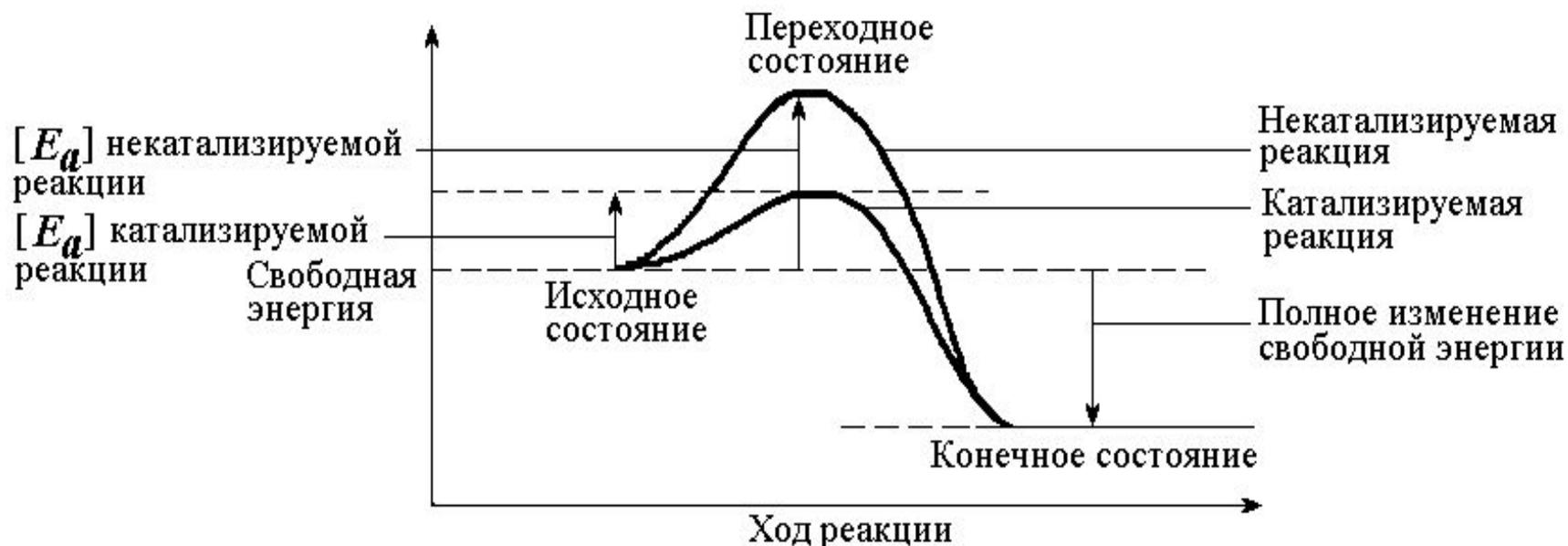


МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ:



МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

- Энергия активации (E_a) – энергия, необходимая для того, чтобы заставить вещества вступить в реакцию.
- Катализаторы ускоряют химические реакции, находя обходные пути, позволяющие молекулам преодолевать активационный барьер на более низком энергетическом уровне.



СПЕЦИФИЧНОСТЬ

- Избирательная способность фермента катализировать строго определенную реакцию.
- Структура активного центра фермента комплементарна структуре его субстрата. Поэтому фермент из всех имеющихся в клетке веществ выбирает и присоединяет только свой субстрат.



- **Абсолютная специфичность** – избирательная способность фермента катализировать только одно из возможных превращений единственного субстрата.
- **Относительная специфичность** – избирательная способность фермента катализировать однотипные превращения сходных по строению субстратов.
- **Стереохимическая (оптическая) специфичность** - избирательная способность фермента катализировать превращение только одного из возможных пространственных изомеров.

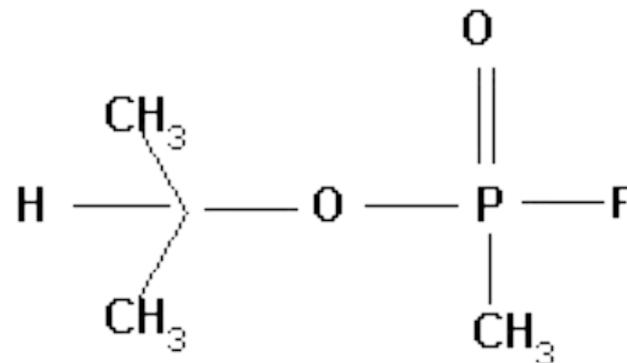


Ингибирование ферментов

- **ОБРАТИМЫЕ**
 - **КОНКУРЕНТНЫЕ**
 - **НЕКОНКУРЕНТНЫЕ**
 - **БЕСКОНКУРЕНТНЫЕ**
- **НЕОБРАТИМЫЕ**

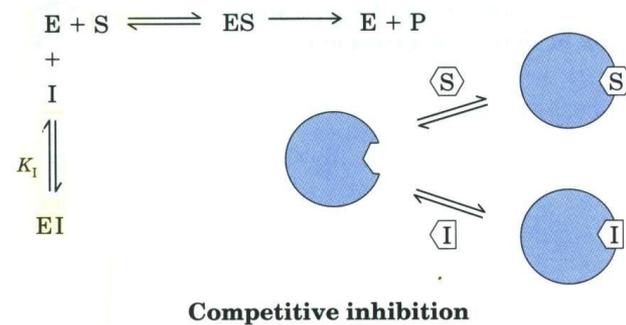


- ▣ **Зарин** ингибирует фермент **ацетилхолинэстеразу** путём формирования ковалентного соединения.
- ▣ Содержание ацетилхолина в синаптической щели растёт, и возбуждающие сигналы непрерывно передаются, поддерживая иннервируемые вегетативными и двигательными нервами органы в гиперактивном состоянии вплоть до их полного истощения.
- ▣ Первые признаки воздействия зарина (и других БОВ нервно-паралитического действия) на человека — выделения из носа, заложенность в груди и сужение зрачков. Вскоре после этого у жертвы затрудняется дыхание, появляется тошнота и усиленное слюноотделение. Затем жертва полностью теряет контроль над функциями организма, её рвёт, происходит непроизвольное мочеиспускание и дефекация. Эта фаза сопровождается конвульсиями. В конечном счёте жертва впадает в коматозное состояние и задыхается в приступе судорожных спазмов с последующей остановкой сердца.

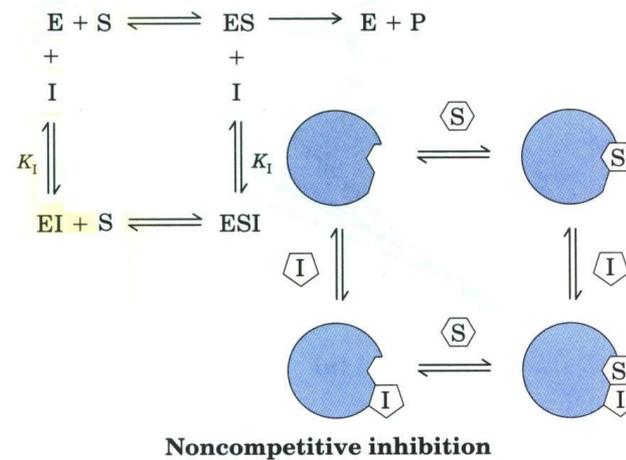


ОБРАТИМОЕ
ИНГИБИРОВАНИЕ

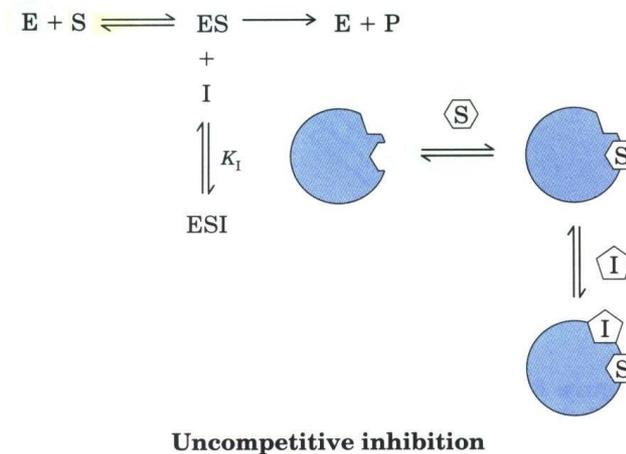
● конкурентное



● неконкурентное



● бесконкурентное



ЕДИНИЦЫ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

- ▣ *Общая активность фермента* – количество микромоль субстрата, которое подвергается превращению в единицу времени в расчёте на количество биологического материала, взятого для исследования.
- ▣ Формула для расчёта:

$$a = \frac{\Delta C}{V \times t} \times n,$$

где a – активность фермента (общая), ΔC – разность концентраций субстрата до и после инкубации; V – количество материала, взятого на анализ, t – время инкубации; n – разведение.

- Для выражения концентрации фермента и количественной оценки его активности в условных единицах **Комиссией по ферментам Международного биохимического союза** была рекомендована **стандартная международная единица (Е или U)**: *за единицу активности любого фермента принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата или образование 1 микромоля продукта в минуту (мкмоль / мин).*
- В связи с введением **Международной системы единиц (СИ)** предложено новое выражение активности фермента в каталах (**кат, kat**): *1 кат есть каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 молю в 1 с (1 моль / с).*
- Рекомендовано, кроме того, измерять активность фермента при температуре 25°C, оптимуме рН и концентрации субстрата, превышающей концентрацию насыщения.



МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

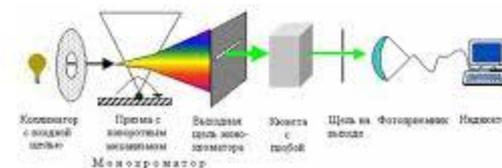
□ Спектрофотометрические методы

Молярные коэффициенты поглощения ряда окислителей и восстановителей

| Вещество | Длина волны, нм | Молярные коэффициенты поглощения | |
|--|-----------------|----------------------------------|------------------|
| | | восстановленная форма | окисленная форма |
| FMN | 450 | — | 12 200 |
| FAD | 450 | — | 11 300 |
| NAD, NADP | 340 | 6 220 | 0 |
| Дихлорфенолиндофенол | 600 | 0 | 21 000 |
| Метиленовый синий (в изобестической точке) | 610 | 0 | 41 000 |
| Феназинметасульфат | 388 | 1 500 | 22 000 |
| Бензо(гидро)хинон | 295 | 2 640 | 322 |
| Аскорбат | 265 | 15 100 | — |
| Дитионит | 314 | 8 000 | 0 |
| Ферри(ферро)цианид | 420 | 0 | 1 020 |
| Ферри(ферро)цианид | 314 | 340 | 1 140 |
| Цитохром c | 550 | 29 500 | 8 300 |



ОБЩАЯ СХЕМА СПЕКТРОФОТОМЕТРА



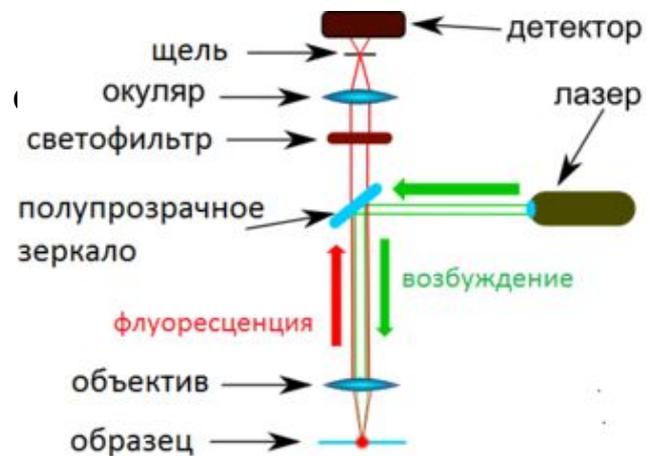
MyShared



Молярный коэффициент поглощения — это поглощение 1 М раствора вещества в односитиметровой кювете; молярную концентрацию раствора находят путем деления наблюдаемой величины поглощения на величину молярного коэффициента поглощения. Ссылки на источники приведены в [1112] Указан-

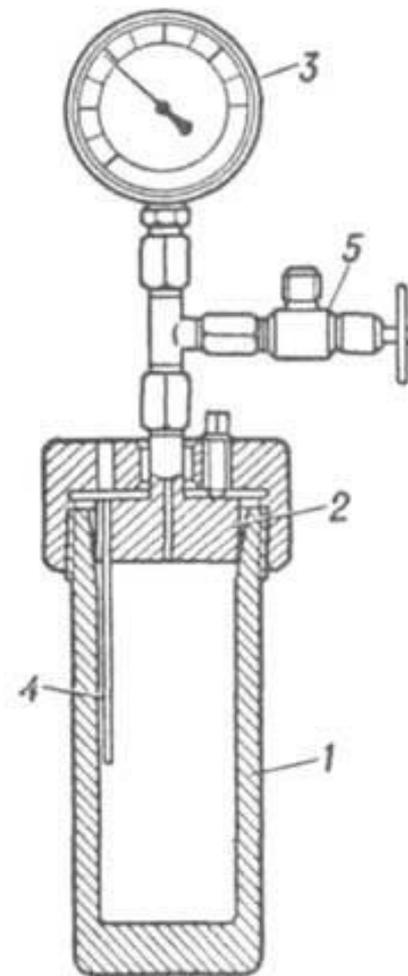
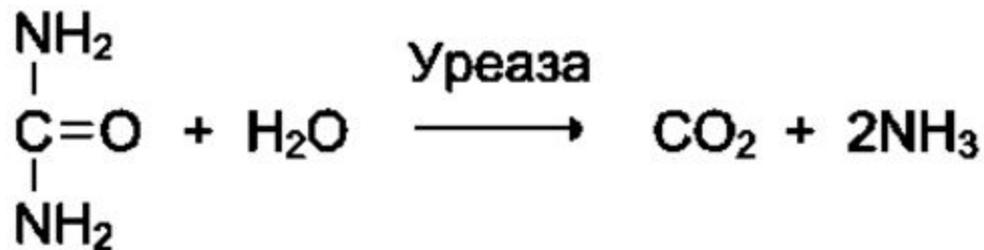
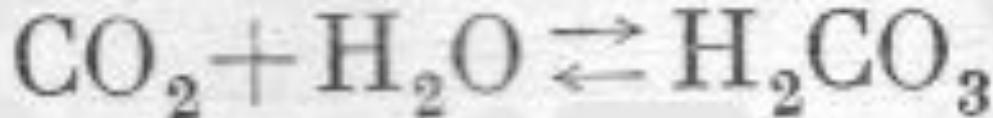
□ Флуоресцентные методы

- При взаимодействии флуорисцентной молекулы с другими участвующими в реакции веществами или с ферментным белком нередко изменяется интенсивность флуорисценции, благодаря чему можно определить активность фермента и рассчитать константы сродства.

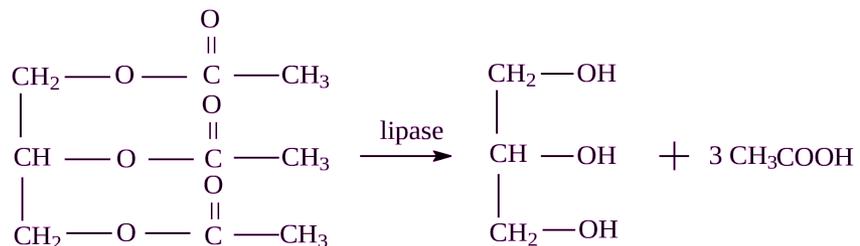


МАНОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- Монометрические методы представляют собой удобные и точные методы для наблюдения за ходом реакции, в которых один из компонентов находится в газообразном состоянии.
- Карбоангидраза



□ Электродные методы

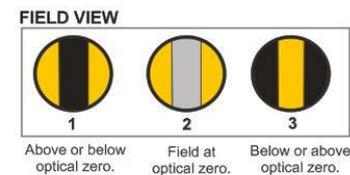
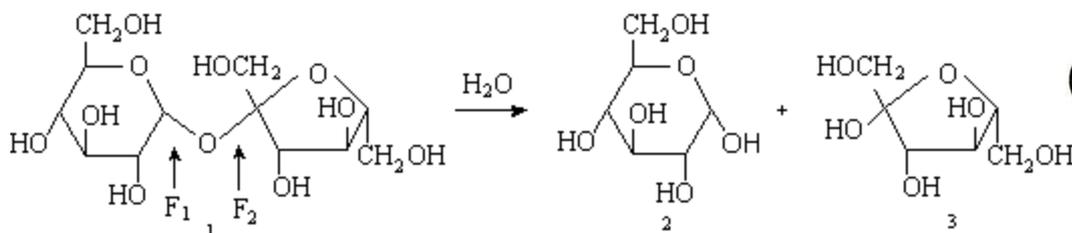
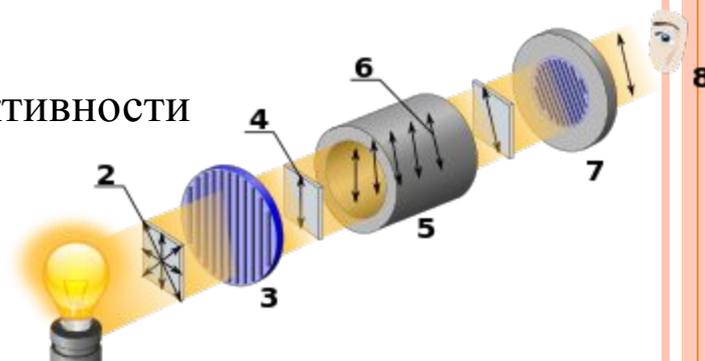


□ Поляриметрические методы

□ β-Фруктофуранозидаза

□ Катализирует распад сахарозы с образованием фруктозы и глюкозы называются инвертным сахаром.

□ Определяют активность фермента по оптической активности одного из продуктов.



Методы выделения и очистки ферментов

ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ВИДЫ БИОМАТЕРИАЛА

- Культуральная жидкость
 - Клетки одноклеточных прокариот
 - Клетки одноклеточных эукариот (чаще всего дрожжи)
 - Плазма или сыворотка крови животных
 - Клетки крови животных (например, эритроциты или лейкоциты)
 - Различные ткани животных (печень, мышцы скелетные или сердце и т.д.)
 - Различные ткани растений
- 

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТОВ

- Гомогенизация
- Фракционирование
- Хроматография
 - гельпроникающая
 - ионообменная
 - гидрофобная
 - афинная
- Электрофорез и изоэлектрическая фокусировка



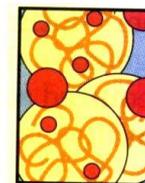
ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ОСАЖДЕНИЕМ.

- Сульфатом аммония
- Органическими растворителями
- Изменение рН среды
- *Солями тяжёлых металлов*
- *Нагревание до 50-70 °С*

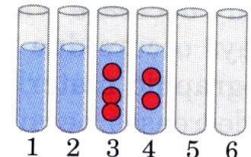
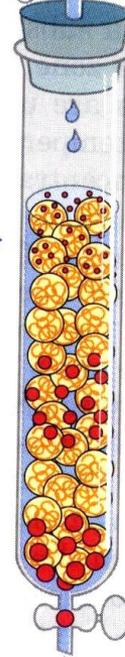
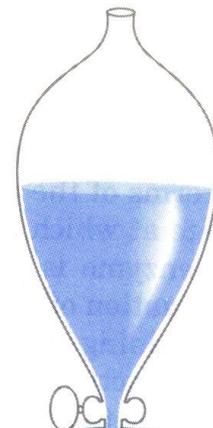
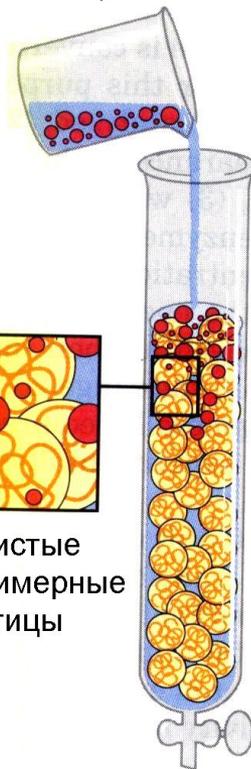


ХРОМАТОГРАФИЯ

раствор
белков
(ферментов)



пористые
полимерные
частицы



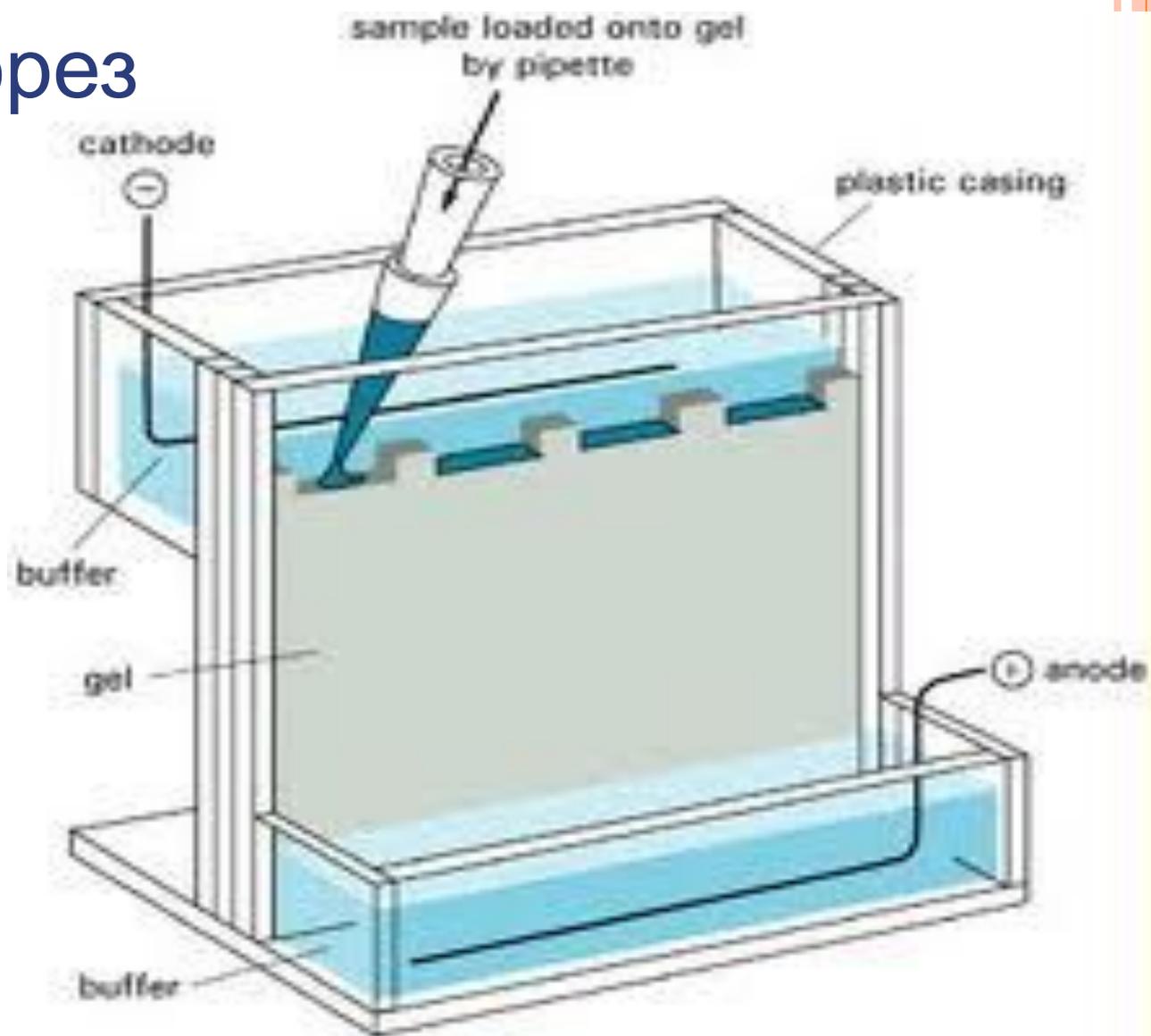
(a)

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

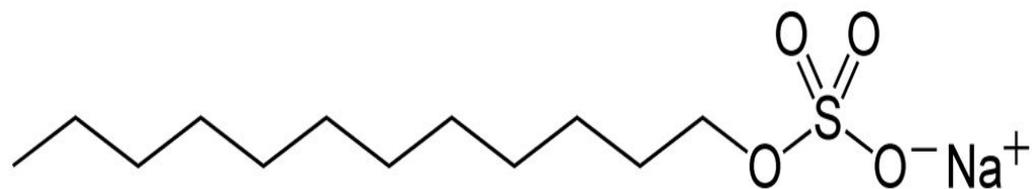
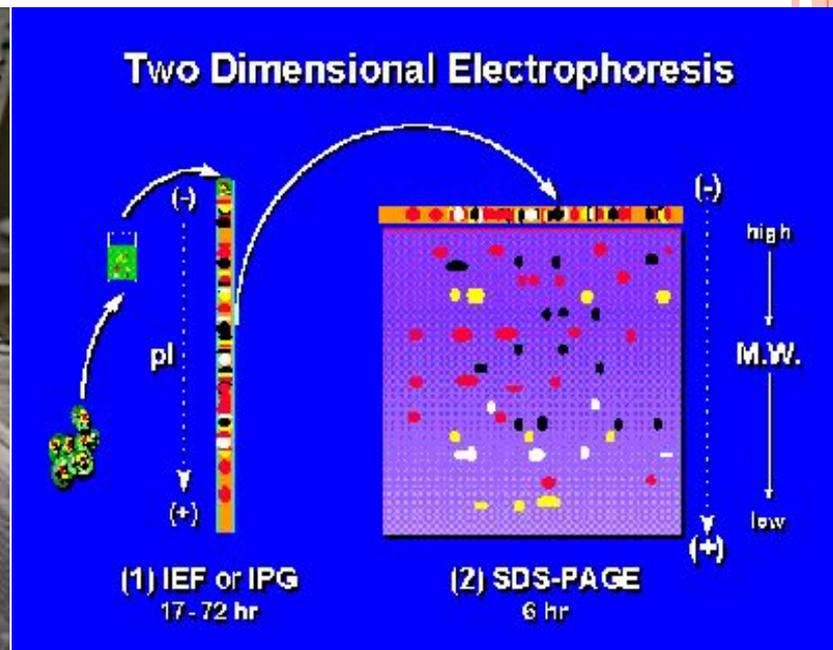
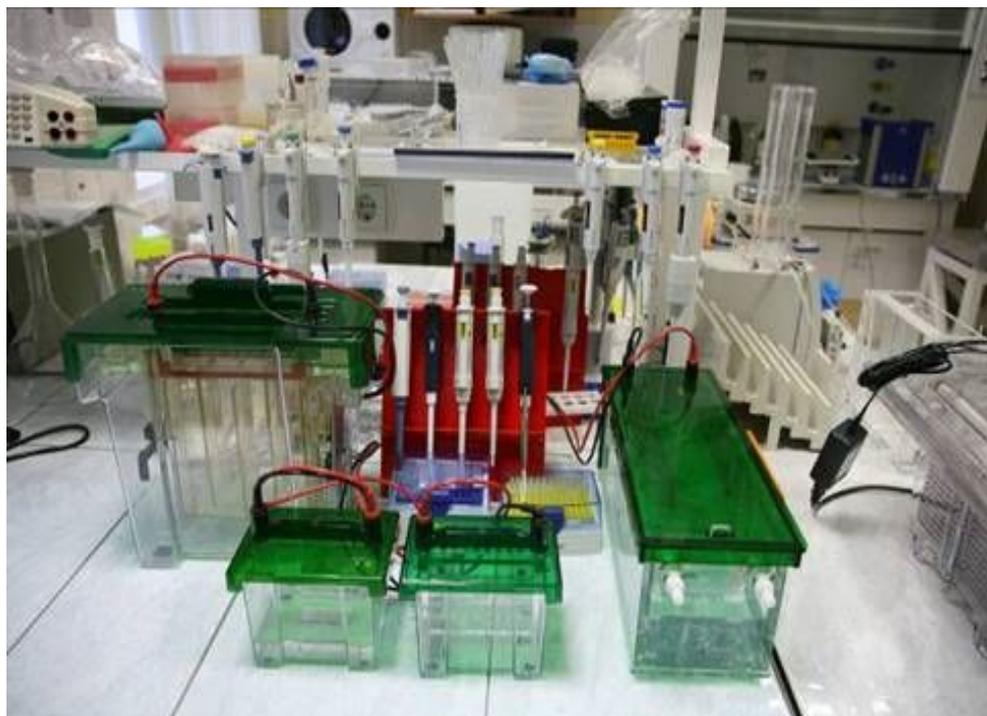
- Электрофорез в денатурирующих условиях
- Нативный электрофорез
- Изоэлектрофокусирование



Электрофорез

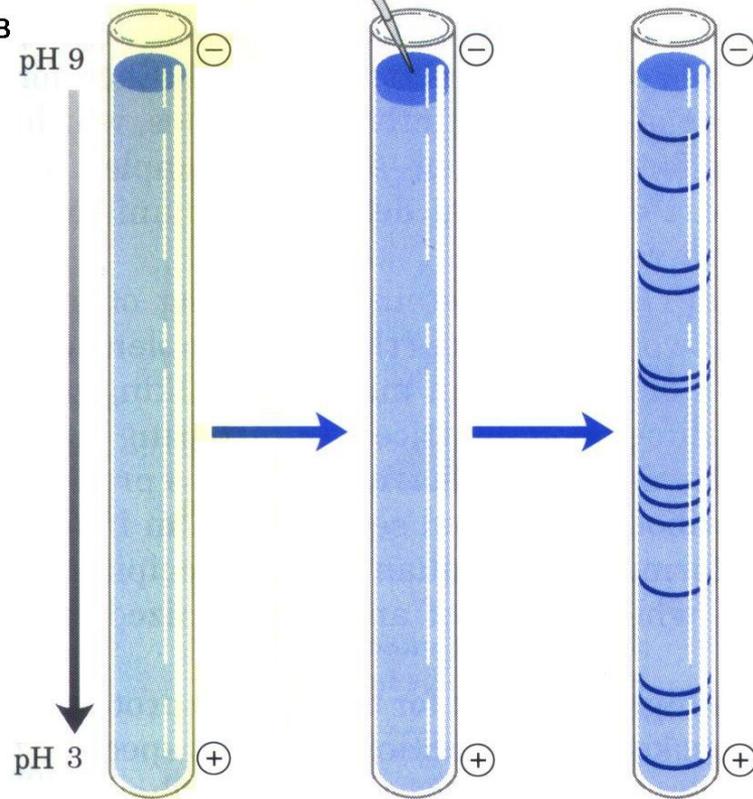


Электрофорез

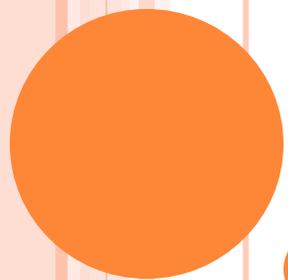


ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ФОКУСИРОВКА

раствор
амфолитов
включен
в гель



введен
раствор
белков



КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ



ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЕРМЕНТА НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

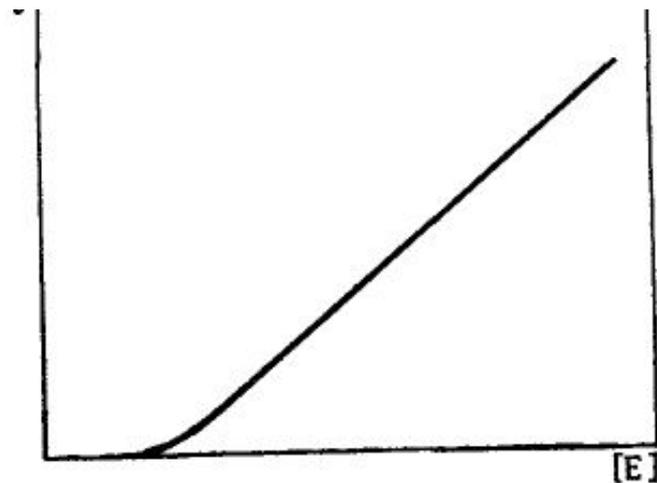


$$v = k [E].$$



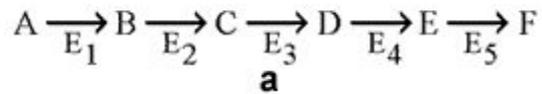
Вогнутые кривые

- Присутствие высокотоксической примеси в среде.
- Наличие диссоциирующего активатора или кофермента в препарате фермента.
- Когда фермент является комплексом субъединиц, каждая из которых по отдельности не обладает активностью.

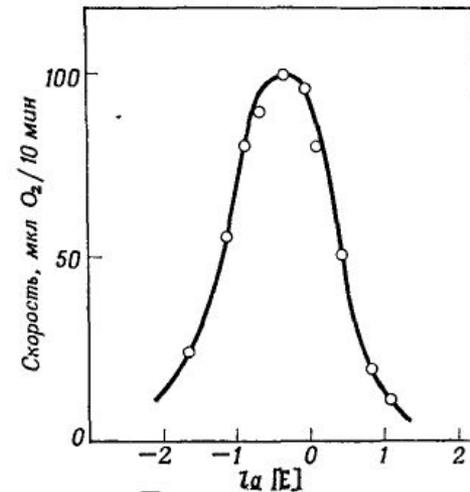
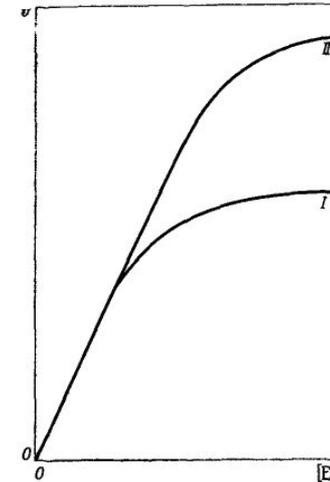
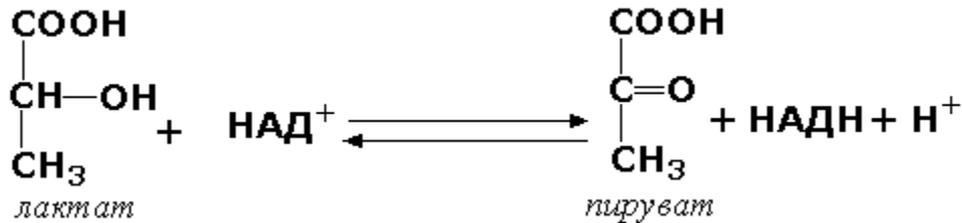


ВЫПУКЛЫЕ КРИВЫЕ

- Не совершенство метода определения.

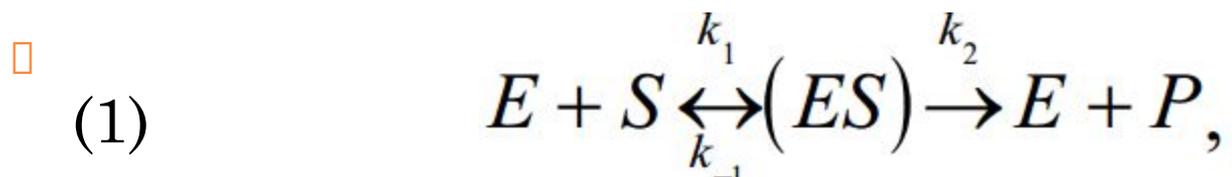


- Добавление чистого фермента (ЛДГ), в изучаемую систему в относительно большом количестве.



ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

- Простейшая схема ферментативного катализа включает обратимое образование промежуточного комплекса фермента (E) с реагирующим веществом (*субстратом*, S) и разрушение этого комплекса с образованием продуктов реакции (P):



- Где k_1 , k_{-1} – константы скорости прямой и обратной реакции образования (ES), k_2 – константа скорости (V_p) образования продукта P.



- Система (1) описывается следующими дифференциальными уравнениями:

$$\frac{dS}{dt} = -k_1(S)(E) + k_{-1}(ES),$$

- $\frac{dE}{dt} = -k_1(S)(E) + k_{-1}(ES) + k_2(ES),$)

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1(S)(E) - k_{-1}(ES) - k_2(ES),$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2(ES) = v_P.$$



Поскольку в системе сохраняется постоянной общая концентрация фермента E_0 , то в любой момент времени сумма концентраций свободного и связанного фермента равна

$$(E) + (ES) = E_0 \quad (3)$$

Характерное время τ_E жизни переменных $[E]$ и $[ES]$ определяется наиболее быстрой стадией его распада с образованием продукта P , т. е. константой скорости v_P образования продукта: $\tau_E = 1/k_2$. Константа k_2 соответствует числу актов катализа, т.е. числу актов распада ES и образования P в единицу времени. Время τ_E - это *время оборота фермента*, а константа k_2 называется *числом оборотов фермента*.

Характерное время τ_S убыли S в системе и соответствующего появления P зависит от скорости образования продукта: $\tau_S = S/v_P$. Максимальная скорость образования продукта будет достигнута, когда весь фермент E_0 находится в связанном состоянии: $v_P^{\max} = k_2 \cdot E_0$. Значит, $\tau_S^{\max} = S/(k_2 \cdot E_0)$. В обычных условиях концентрация субстрата S во много раз превышает концентрацию продукта, т. е. $E/S \sim 10^{-4} \ll 1$.

- Поэтому:

$$\tau_E \gg \tau_S \quad 4$$

- а это означает, что $[E]$ и $[ES]$ являются быстрыми переменными. Их изменения настолько быстры, что они пребывают все время около своих стационарных значений. Следовательно, их можно описывать алгебраическими уравнениями, которые получаются путем приравнивания к нулю правых частей второго и третьего уравнения в модели (2):

$$\frac{d(E)}{dt} = \frac{d(ES)}{dt} = 0. \quad 5$$

- При выполнении условий (2) и (3) получается известное в биохимии уравнение Михаэлиса-Ментен зависимости стационарной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата:

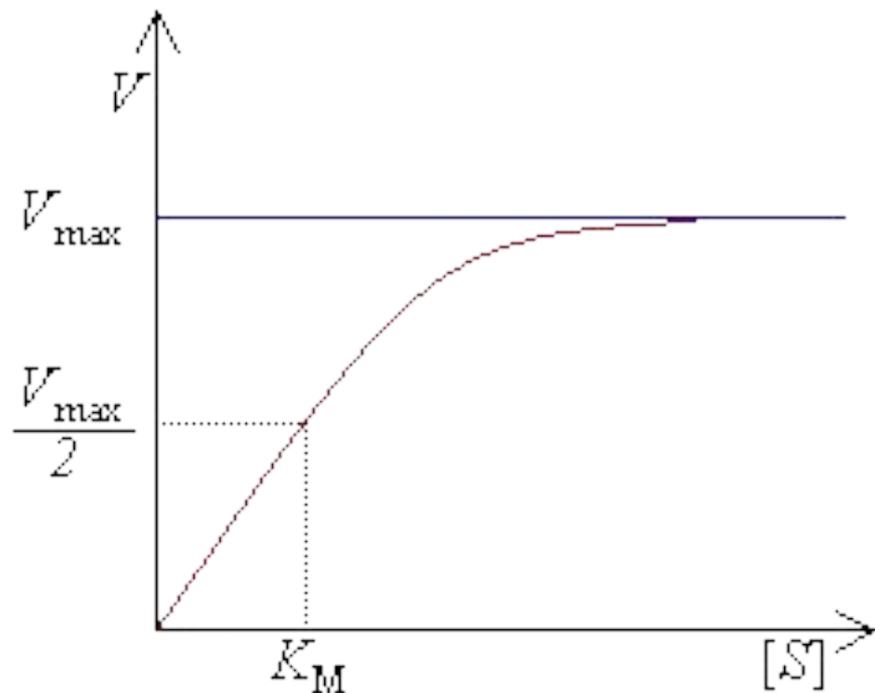
$$\bar{v}_P = \frac{k_2 E_0 S}{K_M + S}, \quad 6$$

- Где K_M – константа Михаэлиса.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_1} \quad 7$$



Уравнение Михаэлиса — Ментен



$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

где v_0 начальная скорость при концентрации субстрата $[S]$, V_{\max} — максимальная скорость и K_M — константа Михаэлиса-Ментен для данного фермента, соответствующая определенному субстрату

K_M (константа Михаэлиса-Ментен) — концентрация специфического субстрата, при которой данный фермент обеспечивает скорость реакции, равную половине ее максимальной скорости



- а - реакция первого порядка (при $[S] < K_m$ скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата);
- б - реакция смешанного порядка;
- в - реакция нулевого порядка, когда $V_0 = V_{\max}$ и скорость реакции не зависит от концентрации субстрата.



V_{\max} и K_m - кинетические характеристики эффективности фермента

- V_{\max} дает характеристику каталитической активности фермента и имеет размерность скорости ферментативной реакции моль/л, т.е. определяет максимальную возможность образования продукта при данной концентрации фермента и в условиях избытка субстрата. K_m характеризует сродство данного фермента к данному субстрату и является величиной постоянной, не зависящей от концентрации фермента. Чем меньше
- K_m , тем больше сродство фермента к данному субстрату, тем выше начальная скорость реакции и наоборот, чем больше K_m , тем меньше начальная скорость реакции, тем меньше сродство фермента к субстрату.



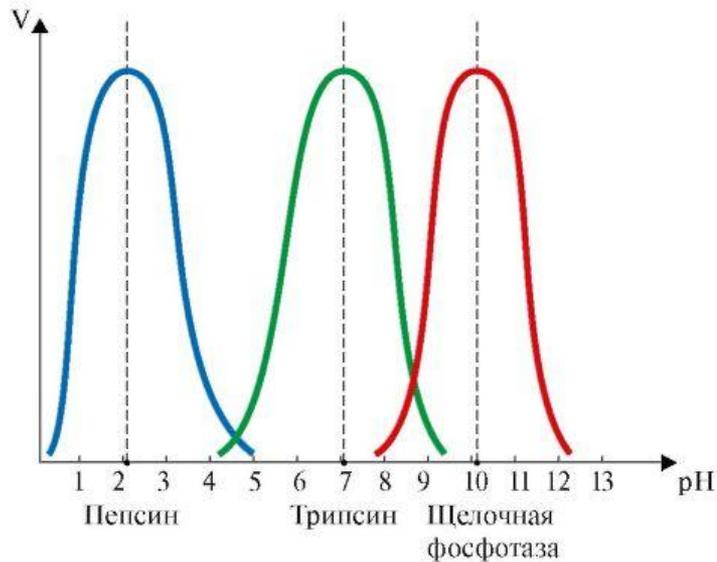
ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ



- Для большинства ферментов человека оптимальна температура 37-38 °С. Однако в природе существуют и термостабильные ферменты. Например, **Taq-полимераза**, выделенная из микроорганизмов, живущих в горячих источниках, не инактивируется при повышении температуры до 95 °С. Этот фермент используют в научно-практической медицине для молекулярной диагностики заболеваний с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).



ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ОТ pH СРЕДЫ

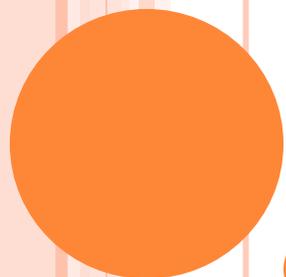


- При изменении pH от оптимальных значений происходит изменение ионизации функциональных групп молекулы белка. Например, при закислении среды происходит протонирование свободных аминогрупп (NH_3^+), а при защелачивании происходит отщепление протона от карбоксильных групп (COO^-). Это приводит к изменению конформации молекулы фермента и конформации активного центра; следовательно, нарушается присоединение субстрата, кофакторов и коферментов к активному центру.

Таблица 4.3. Оптимальные значения pH для некоторых ферментов

| Фермент | pH | Фермент | pH |
|-------------------|---------|------------------------|----------|
| Пепсин | 1,5–2,5 | Каталаза | 6,8–7,0 |
| Катепсин В | 4,5–5,0 | Уреаза | 7,0–7,2 |
| Амилаза из солода | 4,9–5,2 | Липаза панкреатическая | 7,0–8,5 |
| Сахараза кишечная | 5,8–6,2 | Трипсин | 7,5–8,5 |
| Амилаза слюны | 6,8–7,0 | Аргиназа | 9,5–10,0 |





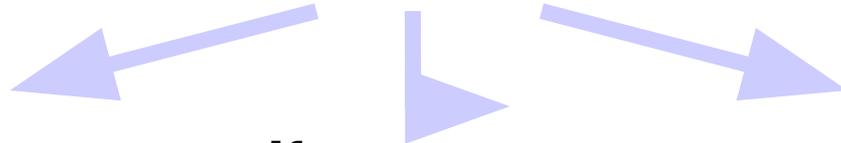
ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА

ПРИНЦИПЫ ЭНЗИМОДИАГНОСТИКИ

1. Состав ферментов и их тканевое деление постоянны и могут изменяться при разных патологических состояниях
2. Для каждой ткани (органа) характерен свой качественный и количественный состав белков, что обуславливает функциональные особенности каждой ткани;
3. Метаболические пути в разных тканях очень похожи, потому существует немного тканеспецифичных ферментов (например, кислая фосфатаза предстательной железы, орнитинкарбамоил-трансфераза и гистидаза печени);
4. Более специфическим для тканей является соотношение разных ферментов и изоферментов.



ФЕРМЕНТЫ СЫВОРОТКИ



Секреторные

синтезируются клетками, поступают в кровь и выполняют специфические функции в кровяном русле, поэтому их называют собственно ферментами крови. Это ферменты свертывающей системы и фибринолиза,, каллекриин-кининовой системы холинэстераза и др.

Клеточные

поступают в кровь из органов и тканей. Уровень их сывороточной активности зависит от содержания энзимов в тканях, молекулярной массы, внутриклеточной локализации, прочности связи фермента со своей органеллой, а также от скорости гидролитического расщепления и элиминации

Экскреторные

образуются пищеварительными железами и из их секретов поступают в кровь (амилаза, липаза и др.).

Органоспецифические

которые находятся в одном-двух органах – это наиболее информативные энзимы, т.к. увеличение их активности свидетельствует о поражении этих органов.

Неспецифические

Активность обнаруживается во всех органах и тканях, поэтому по увеличению их сывороточной активности трудно судить о локализации первичных патологических изменений



ПРИЧИНЫ ПОВЫШЕНИЯ АКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КРОВИ

нарушение проницаемости мембраны клеток (при воспалительных процессах)

нарушение целостности клеток (при некрозе)

повышенная пролиферация клеток с ускорением клеточного цикла (например, при онкопролиферативных процессах)

повышенный синтез ферментов

обструкция путей секреции ферментов в полости

снижение клиренса (например, активность амилазы в сыворотке повышается при острой почечной недостаточности)

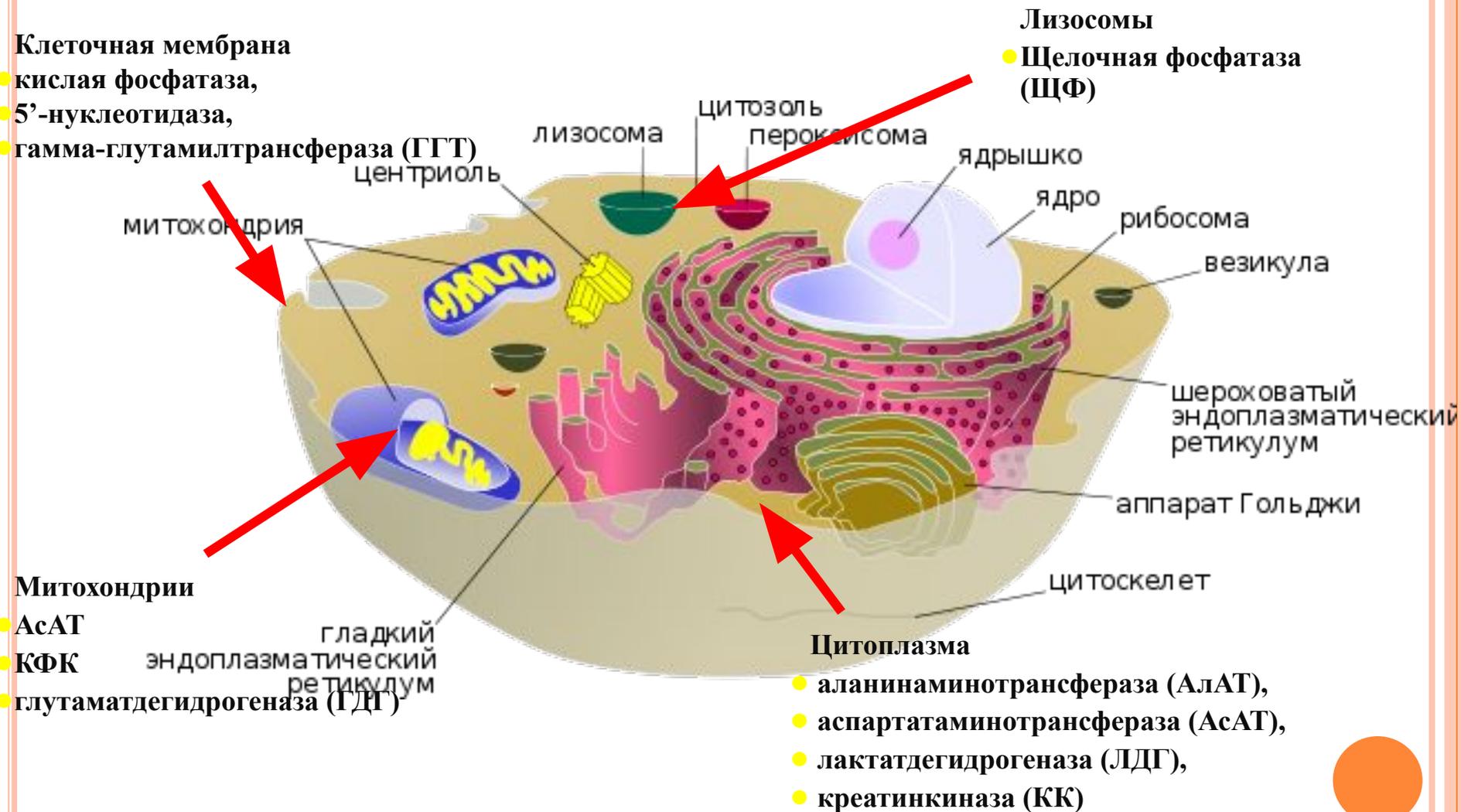


ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ КОНЦЕНТРАЦИЮ ФЕРМЕНТА В КРОВИ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ КЛЕТОК

природа повреждающего воздействия,
время действия и степень повреждения
биомембран клеток и субклеточных структур
органов,
период полужизни (полураспада) в плазме крови
каждого из диагностических ферментов,
особенности распределения (топографии)
ферментов в индивидуальных органах и тканях, а
также их внутриклеточная локализация.



ПРИМЕРЫ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКЕ



Локализация ферментов во фракциях внутриклеточных структур¹

| Субклеточная структура | Фермент | Кодовый номер |
|---|---|---------------|
| Ядро | NMN-аденилилтрансфераза | 2.7.7.1 |
| Митохондрии | | |
| наружная мембрана | Аминоксидаза (содержащая фла- вин) | 1.4.3.4 |
| межмембранное простран- ство | Сульфитоксидаза | 1.8.3.1 |
| внутренняя мембрана | Цитохром с-оксидаза | 1.9.3.1 |
| матрикс | Сукцинатоксидаза | |
| | Глутаматдегидрогеназа [NAD(P) ⁺] | 1.4.1.3 |
| Лизосомы | Кислая фосфатаза | 3.1.3.2 |
| Пероксисомы | Каталаза | 1.11.1.6 |
| | Уратоксидаза | 1.7.3.3 |
| | Оксидаза D-аминокислот | 1.4.3.3 |
| *Клеточная (плазматиче- ская) мембрана | Аденозинтрифосфатаза (ингиби- руется убаином, K ⁺ -зависимая) | 3.6.1.3 |
| | Аденилатциклаза | 4.6.1.1 |
| *Аппарат Гольджи | Галактозилтрансфераза | |
| *Эндоплазматический рети- кулум | Глюкозо-6-фосфатаза | 3.1.3.9 |
| Цитоплазма | NADPH-цитохром — редуктаза | 1.6.2.4 |
| | Лактатдегидрогеназа | 1.1.1.27 |
| | Фруктозобисфосфат-альдолаза | 4.1.2.13 |



ПРИЧИНЫ Понижения активности клеточных ферментов в крови (гипоферментемия)

- *Гипоферментемия* встречается относительно редко и касается в основном секреторных ферментов.
- В подавляющем большинстве случаев она связана с генетически детерминированными нарушениями синтеза определенных энзимов,
- реже – с ингибированием, усиленной деградацией или экскрецией



МЕХАНИЗМЫ УДАЛЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ ИЗ КРОВИ

Большинство ферментов катаболизируется плазменными протеазами и удаляется ретикулоэндотелиальной системой.

Часть ферментов выделяется со слюной, желчью и другими секреторными жидкостями.

Через почечный фильтр небольшие молекулы с молекулярной массой не более 60–70 кДа, (поэтому в норме количество экскретируемых ферментов невелико)



ОСНОВНЫЕ ФЕРМЕНТЫ, КОТОРЫЕ ИССЛЕДУЮТСЯ В ЛАБОРАТОРИЯХ

- ▣ аспаратаминотрансфераза (АсАТ)
- ▣ аланинаминотрансфераза (АЛАТ)
- ▣ глутаматдегидрогеназа (ГЛД)
- ▣ лактатдегидрогеназа (ЛДГ)
- ▣ креатинкиназа (КК)
- ▣ щелочная фосфатаза (ЛФ)
- ▣ кислая фосфатаза (КФ)
- ▣ альдолаза (АЛД)
- ▣ холинестераза (ХЕ)
- ▣ α -амилаза (АМ)
- ▣ липаза (ЛП)
- ▣ аланинаминопептидаза (ААП)
- ▣ глюкозо-6-фосфатаза
- ▣ γ -глутамилтрансфераза (ГЛТ)
- ▣ аргиназа (Ар)
- ▣ сорбитолдегидрогеназа (СД)
- ▣ алкогольдегидрогеназа (АДГ)



НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

| Фермент | Нормальные величины (варьируют в зависимости от метода) |
|---------------------------------|--|
| Аланинаминотрансфераза (АлАТ) | 0,1–0,68 мкмоль/(ч·мл); 3–26 МЕ при 30°C |
| Альдолаза | 0,09–0,57 ммоль/(ч·л); 1,47–9,50 МЕ/л |
| α-амилаза | 3,3–8,9 мг/(с·л); 12–32 мг/(ч·мл); 0,8–3,2 МЕ при 37°C |
| Аспартатаминотрансфераза (АсАТ) | 0,1–0,68 мкмоль/(ч·мл); 6–25 МЕ при 30°C |
| γ-Глутамилтранспептидаза (ГГТП) | Мужчины: 15–106 МЕ при 37°C; Женщины: 10–66 МЕ при 37°C |
| Креатинфосфокиназа (КФК) | до 100 нмоль/(с·л); до 6 МЕ при 30°C |
| Изоферменты КФК: | |
| ВВ-фракция | Отсутствует |
| МВ-фракция | Меньше 2–4% от общей КФК |
| ММ-фракция | Больше 94–96% от общей КФК |
| Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) | до 3200 нмоль/(с·л) или до 195 МЕ при 25°C; до 5330 нмоль/(с·л) или до 320 МЕ при 30°C |
| Изоферменты ЛДГ: | |
| ЛДГ ₁ | 19–29% от общей |
| ЛДГ ₂ | 23–37% от общей |
| ЛДГ ₃ | 17–25% от общей |
| ЛДГ ₄ | 8–17% от общей |
| ЛДГ ₅ | 8–18% от общей |
| Липаза | 0–28 мкмоль/(мин·л) или 0–28 МЕ |
| Фосфатаза кислая (КФ) | 67–167 нмоль/(с·л) или 4–10 МЕ при 37°C |
| Фосфатаза щелочная | 278–830 нмоль/(с·л) или 1–3 мкмоль/(ч·мл); 500–1417 нмоль/(с·л) или 30–85 МЕ (гидролиз п-нитрофенилфосфата) |

АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

- играют важную роль в азотистом обмене,
- принимают участие в расщеплении аминокислот, которые не используются в процессах биосинтеза,
- катализируют реакцию переаминирования, в которой происходит как бы обмен аминогруппы (NH_2) между аминокислотой и кетокислотой.



АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗА (АСАТ)

[КФ 2.6.1.1].

N 0,1-0,45 ммоль/(час/л)

Основные источники: сердечная мышца, печень, скелетная мускулатура, головной мозг, почки.

Изоферменты: митохондриальная АСАТ (м-АсАТ) и цитозольная АСАТ (ц-АсАТ).

Активность АСАТ в сердечной мышце почти в 10 000 раз выше, чем в сыворотке крови. В эритроцитах АСАТ в 10 раз больше, чем в сыворотке. Поэтому при определении активности аминотрансфераз в сыворотке последняя не должна иметь даже следов гемолиза.



АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗА (АЛАТ)

[КФ 2.6.1.2.]

N 0,1-0,68 ммоль/(час*л)

Основные источники: печень, поджелудочная железа, сердце, скелетная мускулатура, почки.

Изоферменты: митохондриальная АЛАТ (м-АЛАТ) и цитозольная АЛАТ (ц-АЛАТ).

В печени активность АЛАТ в несколько тысяч раз выше, чем в сыворотке крови



1. При остром ИМ активность АСАТ более высока, чем АЛАТ (коэффициент де-Ритиса больше 1,3).
2. При остром вирусном и хроническом гепатитах, особенно на ранних стадиях, активность АЛАТ более высока, чем АСАТ (коэффициент де-Ритиса менее 1,0). Тяжелое поражение печени может изменить это соотношение.
3. При алкогольном гепатите нередко активность АСАТ оказывается выше чем АЛАТ (коэффициент де-Ритиса больше 1,3).



ФОСФАТАЗЫ

- ферменты, которые катализируют отщепление фосфорной кислоты от органических соединений. Фосфатазы разделяют на фосфодиэстеразы I (щелочная фосфатаза (ЩФ), оптимум рН = 8,6-10,1) и фосфомоноэстеразы II (кислая фосфатаза (КФ), оптимум рН = 4,6-6,2).



ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА (ЩФ)

[КФ 3.1.3.1.]

N 0,5-1,3 ммоль/(час* л).

Действие: фермент, который гидролизует эфиры ортофосфорной кислоты в щелочной среде. Щелочная фосфатаза содержится практически во всех органах, но максимальная ее активность оказывается в печени, костной ткани кишечника и плаценте.

Изоферменты ЩФ, которые отличаются по своим физико-химическими свойствами и относительной органоспецифичности: печеночный желчный, костный, кишечный, плацентный изоферменты.



Кислая фосфатаза (КФ)

[КФ 3.1.3.2.]

N 0,025-0,12 ммоль/(час л)*

Основные источники: предстательная железа (КФ II), фосфатазная активность которой приблизительно в 1000 раз превышает активность этого фермента в костной ткани, печени, селезенке, почках и эритроцитах. В плазме крови практически здоровых людей она постоянно оказывается после достижения половой зрелости.



Г-ГЛУТАМИЛТРАНСПЕПТИДАЗА (ГГТП)

КФ [2.3.2.2]

Мужчины: 250-1767 нмоль/(с*л) или 15-106 МО,

Женщины: 167-1100 нмоль/(с*л) или 10-66 МО

Основные источники: печень

Значительное повышение активности наблюдается при:

1. обтурации внутрипеченочных и внепеченочных желчных путей (особенно значительное повышение ГГТП, которое идет параллельно с увеличением активности щелочной фосфатазы);
2. заболеваниях печени (гепатитах, циррозе печени, опухолях и метастазах в печень), которые протекают при явлениях холестаза;
3. панкреатите и опухолях поджелудочной железы;
4. интоксикациях этанолом (даже при умеренном употреблении алкоголя), наркотиками и седативными средствами (врачебная интоксикация).



КРЕАТИНКИНАЗА (КК)

КФ [2.7.3.2]

N 0,152-0,305 ммоль/(час*л)

Основные источники: миокард, скелетные мышцы, язык, селезенка, диафрагма, почки, легкие, печень.

Изоферменты:

мозговой тип (КК-ВВ) - I тип.

сердечный тип (КК-МВ) - II тип,

мышечный тип (КК-ММ) - III тип.



КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КК

Физиологическое повышение активности креатинкиназы (КК) обнаружено в сыворотке крови: у новорожденных (небольшое), у рожениц в первые дни после родов, при физической нагрузке.

Значительное повышение - при инфаркте миокарда, дистрофии мышц, травматических повреждениях мышц (раздроблениях), шоке и недостаточности кровообращения.

Умеренное повышение - при инфаркте миокарда (мелкоочаговый), ограниченном повреждении скелетных мышц, судорогах, гипотиреозе, алкоголизме, расстройстве мозгового кровообращения, травмах мозга, остром психическом состоянии.



ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА (ЛДГ)

КФ [1.1.1.27]

N 220-1100 нмоль/(с*л) или 0,8-4,0мкмоль/(час*мл)

Действие: обратное превращение лактата в пируват.

Основные источники (в порядке снижения) почки, скелетные мышцы, поджелудочная железа, селезенка, печень, плацента. Она присутствует также в эритроцитах, лейкоцитах и тромбоцитах крови.

Изоферменты:

ЛДГ1,

ЛДГ2,

ЛДГ3,

ЛДГ4,

ЛДГ5.

Изоферменты ЛДГ1 и ЛДГ2 преобладают в эритроцитах, лейкоцитах, миокарде, почках; ЛДГ4 и ЛДГ5 - в печени, скелетных мышцах, неопластических тканях; ЛДГ3 - лимфоидная ткань, тромбоциты, опухоли.



| Название соотношения или коэффициента | Показатель |
|--|------------|
| Де Ритиса | |
| Воспалительный тип: АСТ/АЛТ | ≤ 1 |
| Некротический тип: АСТ/АЛТ | ≥ 1 |
| АСТ+АЛТ/ГлДГ | |
| Метастазы и печень | ≤ 10 |
| Обструктивная желтуха Билиарный цирроз | 5-20 |
| В случае острого начала цирроза печени и хронического гепатита | 30-40 |
| Холестатический гепатоз | 40-50 |
| Острый вирусный гепатит Острый алкогольный гепатит | 5*50 |
| ЛДГ/АСТ | |
| Гемолитическая желтуха | ≥ 12 |
| Гепатоцеллюлярная желтуха | ≤ 12 |

АЛТ/ГлДГ

Обструктивная желтуха

 ≤ 10

Гепатоцеллюлярная желтуха

 ≥ 10 γ -ГТ/АСТ

Активный вирусный гепатит

 ≤ 1

Токсический гепатит

Хронический персистирующий гепатит

Хронический гепатит Острый
алкогольный гепатит Цирроз печени

1-3

Алкогольный цирроз

3-6

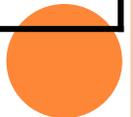
Недавняя обструктивная желтуха

Билиарный цирроз

 ≥ 6

Длительная обструктивная желтуха

Рак печени/метастазы в печень



ЭНЗИМОТЕРАПИЯ

Как 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 тромбоемболиях. 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)

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В КАЧЕСТВЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕАКТИВОВ

- специфические эндонуклеазы, катализирующие разрывы межнуклеотидных связей ДНК, для диагностики фенилкетонурии, α - и β -талассемии и других наследственных болезней)
глюкозооксидазу применяют для количественного определения глюкозы в моче и крови.
Фермент уреазу используют для определения содержания количества мочевины в крови и моче.
С помощью различных дегидрогеназ обнаруживают соответствующие субстраты, например пируват, лактат, этиловый спирт и др.



ЗНАЧЕНИЕ ЭНЗИМОЛОГИИ ДЛЯ БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЫ, ПРОМЫШЛЕННОСТИ И СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА.

