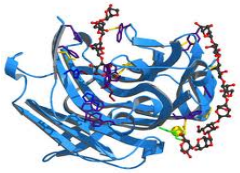


Лекція. Ферменти

1.Номенклатура, класифікація, властивості ферментів

2. Механізм дії ферментів, центри ферментів,

3. Структура ферментів.

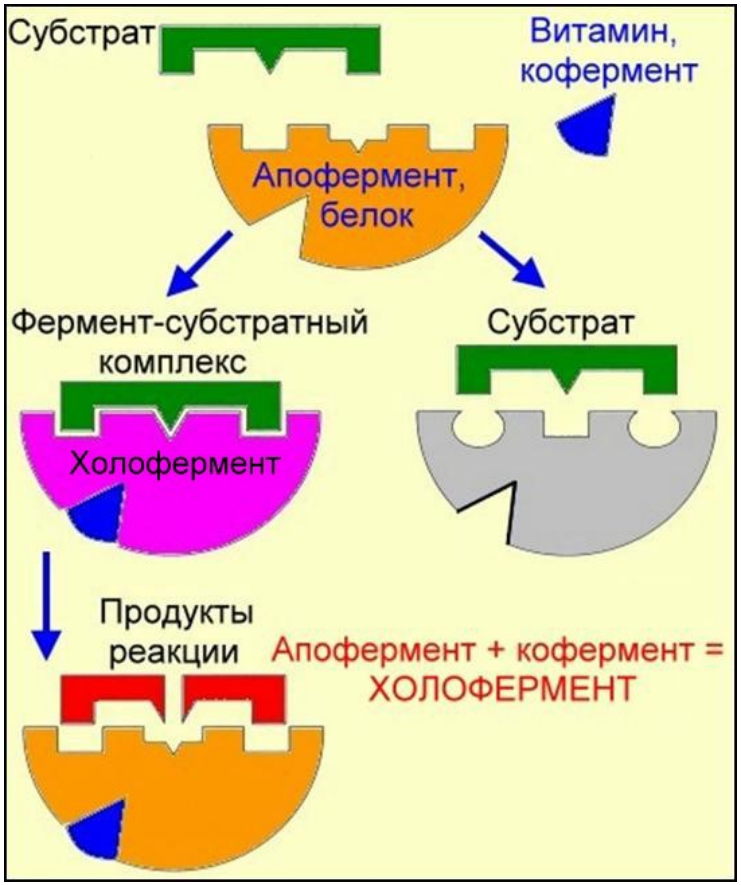
4. Кінетика, енергетика ферм. реакції

5. Активатори, інгібітори ферментів

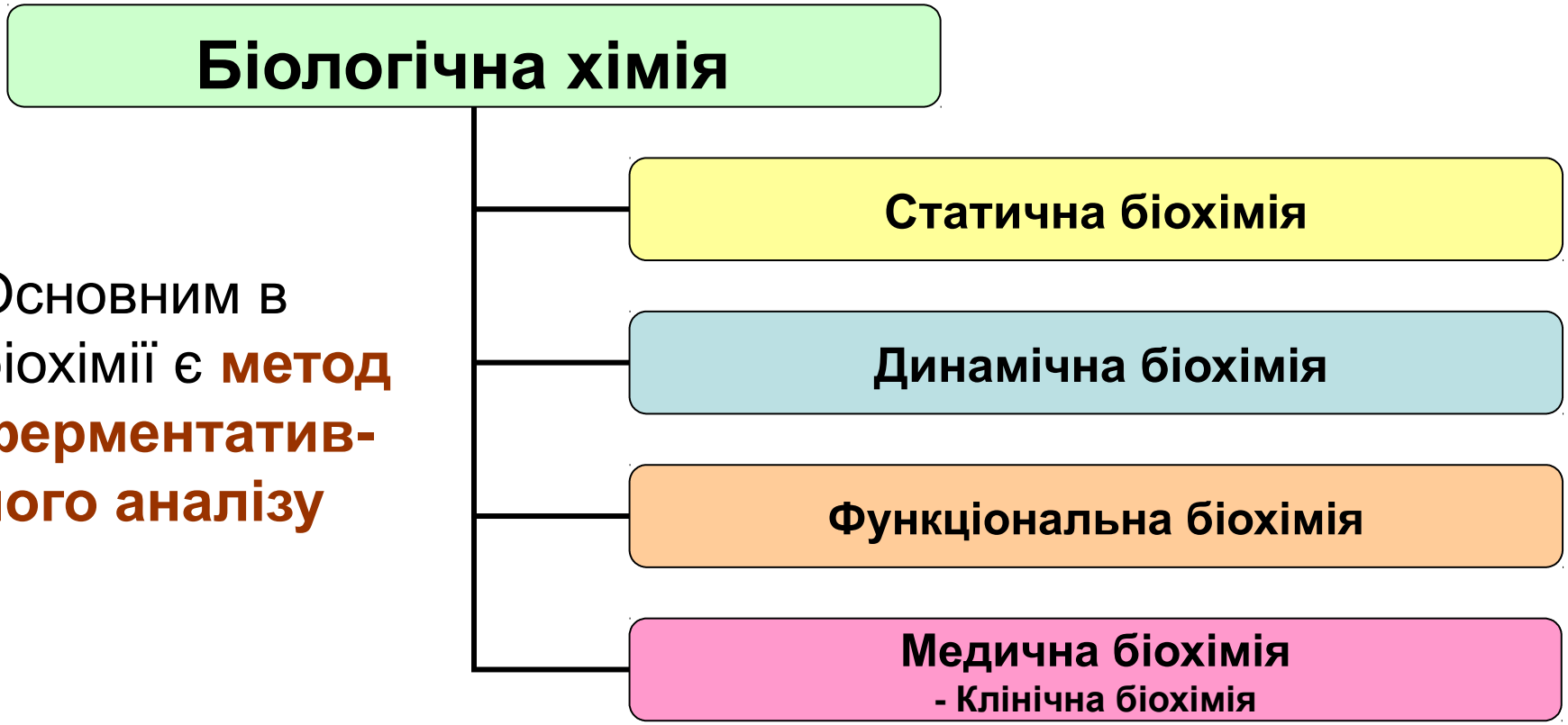
6. Ізоферменти, поліферментні системи

7. Регуляція ферментативної активності

8. Основи медичної ензимології



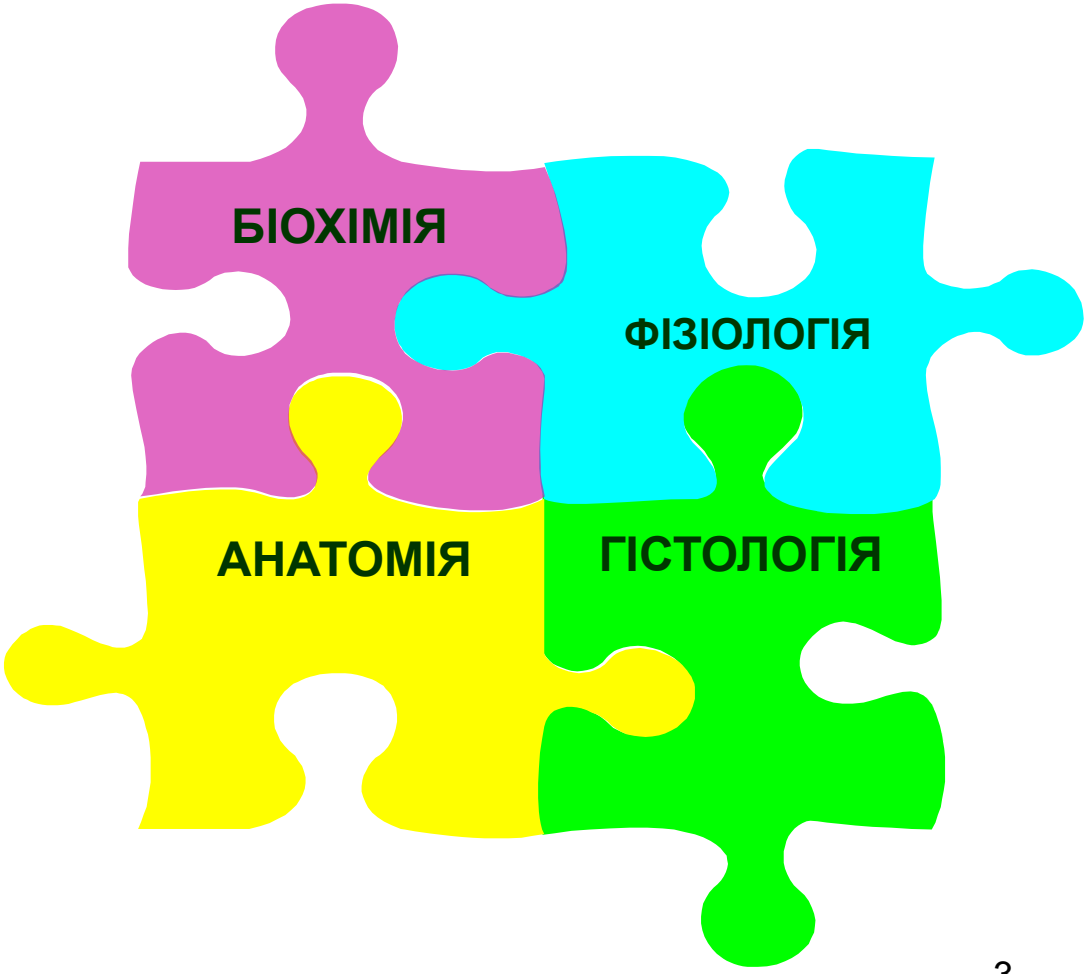
Біохімія – фундаментальна біомедична наука, яка вивчає хімічний склад, обмін речовин та енергії, молекулярні основи функціонування живих організмів



Основним в біохімії є **метод ферментатив-ного аналізу**

Медична біохімія - одна з провідних дисциплін медичного вузу, що формує світогляд майбутнього медика та його професійні знання

- обмін речовин та його регуляція у здорової людини
- зміни метаболізму в умовах патології
- біохімічні методи діагностики захворювань та контролю за їх перебігом захворювань
- створення нових лікарських засобів та методів лікування



Ферменти (ензими) – це біокаталізатори переважно білкової природи та каталітичні молекули РНК (*рибозими*), які беруть участь в хімічних реакціях в організмі.

- ***лат. «fermentatio» - бродіння ; грец. «en zyme» - у дріжджах, у заквасці.***

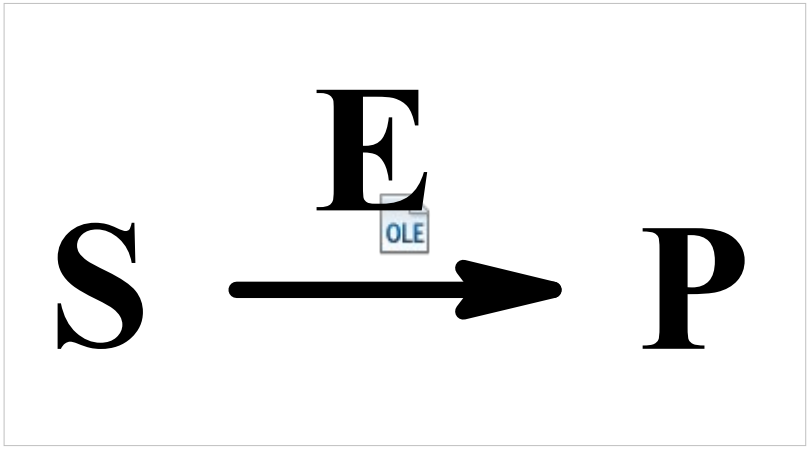
Ензимологія (ферментологія) – наука про ферменти

Умовні позначення в ензимології

E – фермент, ензим (“enzyme”)

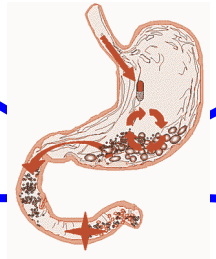
S – субстрат - речовина, на яку діє фермент

P – продукт реакції - речовина, яка утворюється в результаті ферм. реакції

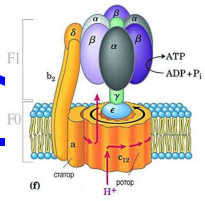


Синтез і розпад речовин

Травлення та всмоктування



Вивільнення та зберігання енергії



Координація хімічних реакцій

Ферменти

Використання в медицині

Порушення синтезу та активності ферментів

Діагностика захворювань

Лікарські препарати на основі ферментів Їх активаторів та інгібіторів

Хвороби (ензимопатії)

Історія ензимології

17 ст., Ван Гельмонт - термін «фермент»

1814 р., Кірхгоф - солод ячменю викликає бродіння крохмалю.

1894 р., Фішер - гіпотеза «ключа та замка» (специфічність дії ферментів)

1913 р. Ментен та Міхаеліс - теорія механізму дії ферментів та кінетика ферментативних реакцій

1926 р. Самнер - отримав фермент уреазу в кристалічній формі (рік народження ферментології як науки)

1969 р. Меррифільд - синтезував рибонуклеазу

80-ті роки 20 ст. Томас Чек - відкрив каталітичні властивості у молекул РНК (рибозими).

Номенклатура ферментів

1. **Робоча** ***(зручна для використання)***

- **назва ферменту = хім.назва субстрату + «-аза»**

мальтоза + «-аза» = мальтаза

- **назва ферменту = хім.назва субстрату + *тип хім. реакції* + «-аза»**

лактат + *дегідрогенізація* + «-аза» = лактатдегідрогеназа

- **історично усталена (тривіальна) назва**

пепсин, тромбін, трипсин, ренін

2. Систематична (*1961 р. Міжнародний союз біохімії та молекулярної біології*) **побудована за типом хімічної реакції згідно класифікації ферментів (КФ)!!!**

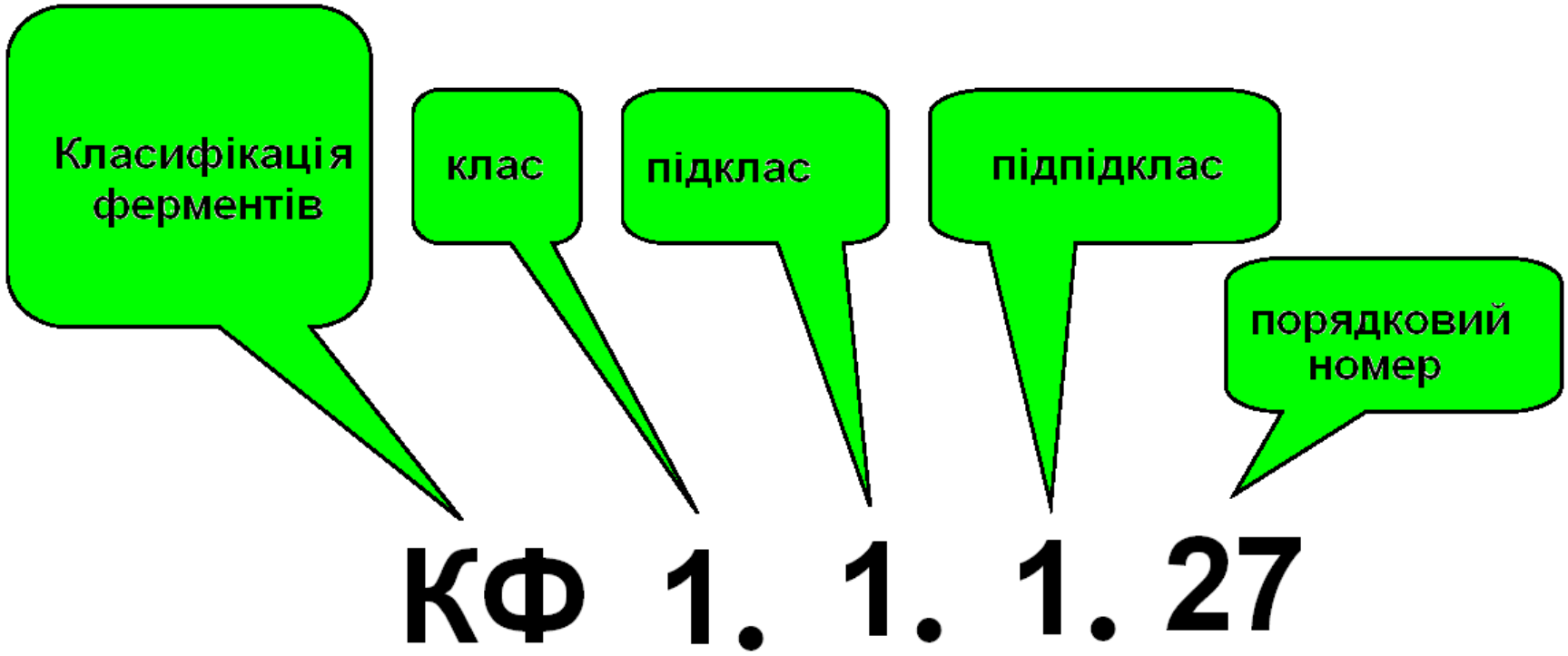
Систематична назва =

Субстрат 1: Субстрат 2 - *тип хім.реакції за КФ* + «-аза»

L-Лактат: НАД$^+$ - оксидоредуктаза

(лактатдегідрогеназа)

Шифр ферменту за КФ – 4 кодових числа



Шифр лактатдегідрогенази (ЛДГ)

Класифікація ферментів – 6 класів (КФ)

КФ 1. Оксидоредуктази

КФ 2. Трансферази

КФ 3. Гідролази

КФ 4. Ліази

КФ 5. Ізомерази

КФ 6. Лігази (синтетази)

КФ 1. Оксидоредуктази: ***переніс H^+, e^-, H***

☎**Дегідрогенази, оксидази, оксигенази (гідроксилази), цитохроми**

КФ 2. Трансферази: ***переніс хімічних груп***

☎**метил-, сульфо-, аміно-, фосфо-, ацил-, глікозил- трансферази**

☎**кінази** (*переніс фосфатного залишку з АТФ на субстрат*)

КФ 3. Гідролази: ***розщеплення субстрату за участі H_2O (р-ції гідролізу)***

☎**пептидази, естерази, глікозидази, фосфатази**

КФ 4. Ліази: ***розщеплення зв'язків між атомами C, O, N, S*** **без участі** H_2O

☎**декарбоксилази, альдолази, дегідратази**

КФ 5. Ізомерази: ***реакції ізомерізації***

мутази, цис-транс-ізомерази, рацемази, епімерази

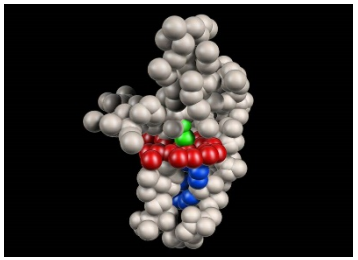
КФ 6. Лігази (синтетази): ***з'єднання двох молекул з використанням енергії***

☎**Синтетази:** *джерело енергії – АТФ*

☎**Синтази:** *джерело енергії інший макроерг*

Докази хімічної природи ферментів

Ферменти - це білки!!!!



Виділення в кристалічній формі

Денатурація з втратою активності

Велика Mr (>6 kD) нездатність до діалізу

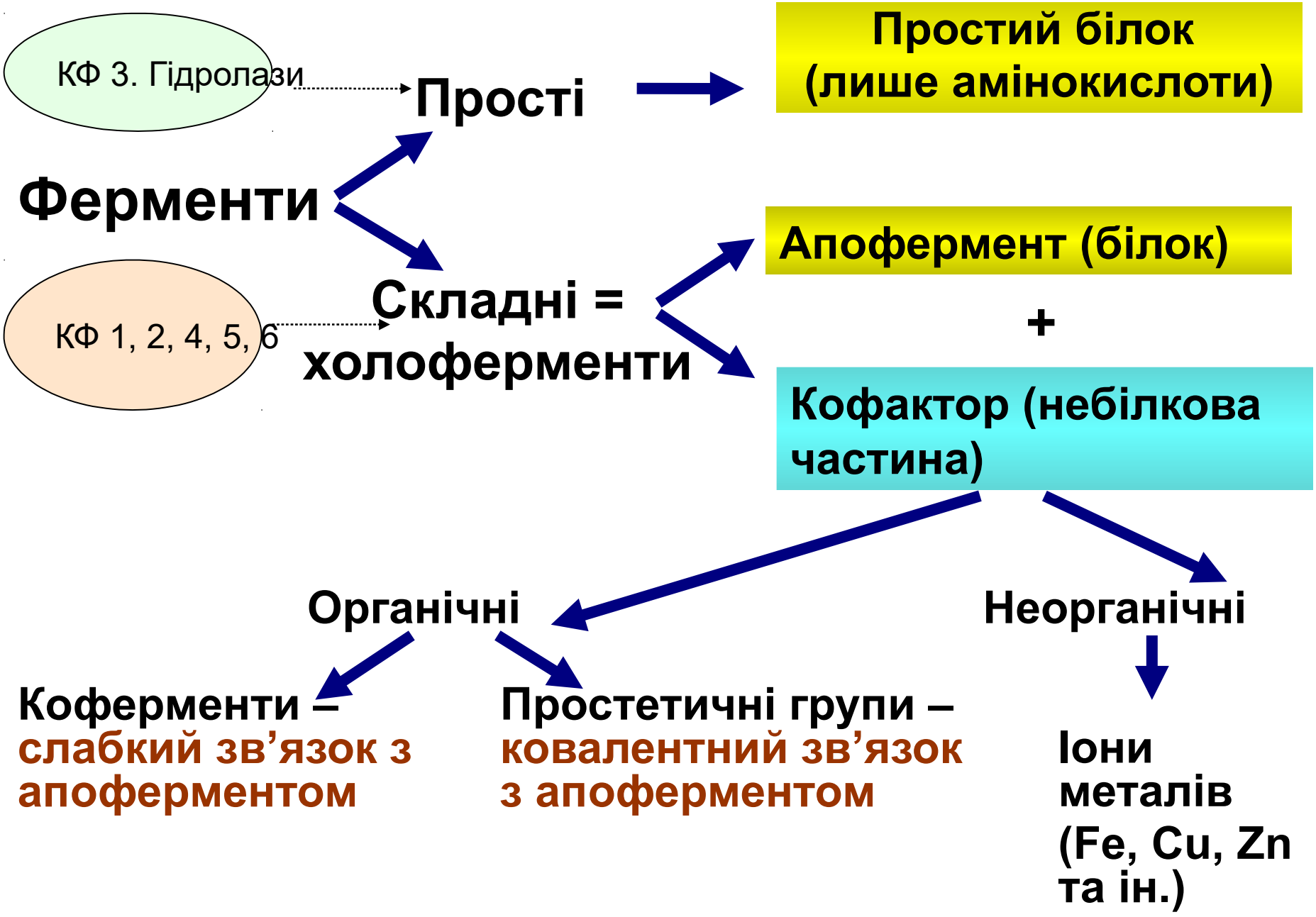
Гідроліз до амінокислот

Висолювання

Амфотерність, електрофоретична рухливість

Штучний синтез з амінокислот

Кольорові реакції на білки


КФ 3. Гідролази
Прості
Простий білок (лише амінокислоти)
Ферменти
КФ 1, 2, 4, 5, 6
Складні = холоферменти
Апофермент (білок)
+
Кофактор (небілкова частина)
Органічні
Неорганічні
Коферменти – слабкий зв'язок з апоферментом
Простетичні групи – ковалентний зв'язок з апоферментом
Іони металів (Fe, Cu, Zn та ін.)

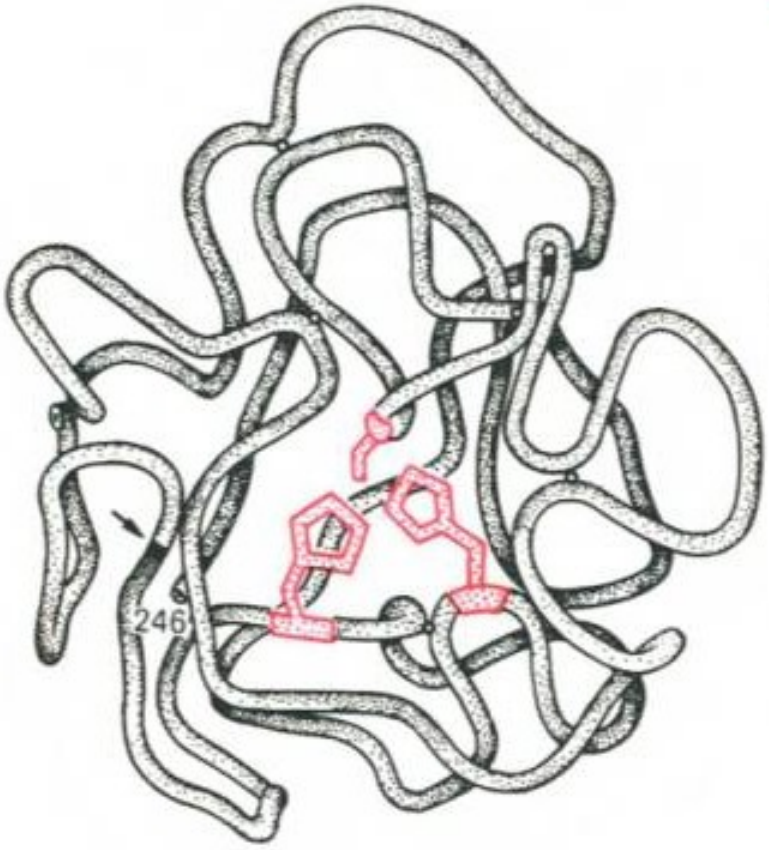
Активний центр – ділянка молекули ферменту, у якій відбувається зв'язування і перетворення субстрату

☹є **комплементарним** **просторовій будові субстрату**

☹**містить 7-15 амінокислот**

☹ *знаходиться в «просторовій ніші»*

☹*активних центрів може бути 2, 4, 6, 8*

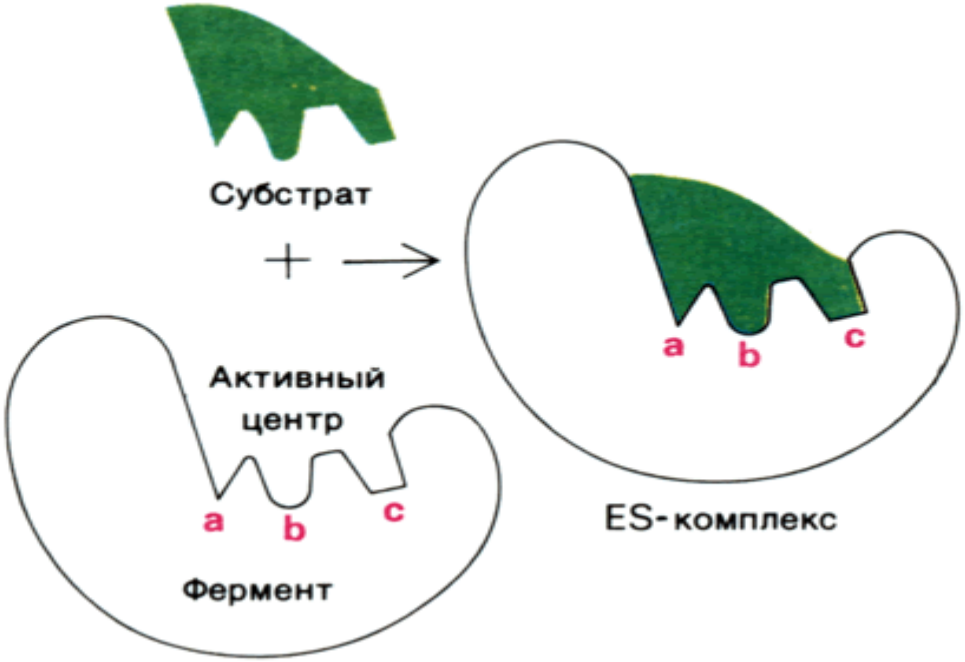


Активний центр хімотрипсину

Теорія Фішера, 1894 р.

Герман Еміль Фішер
(1852-1919), німецький біохімік,
1902 – Нобелевська премія по хімії

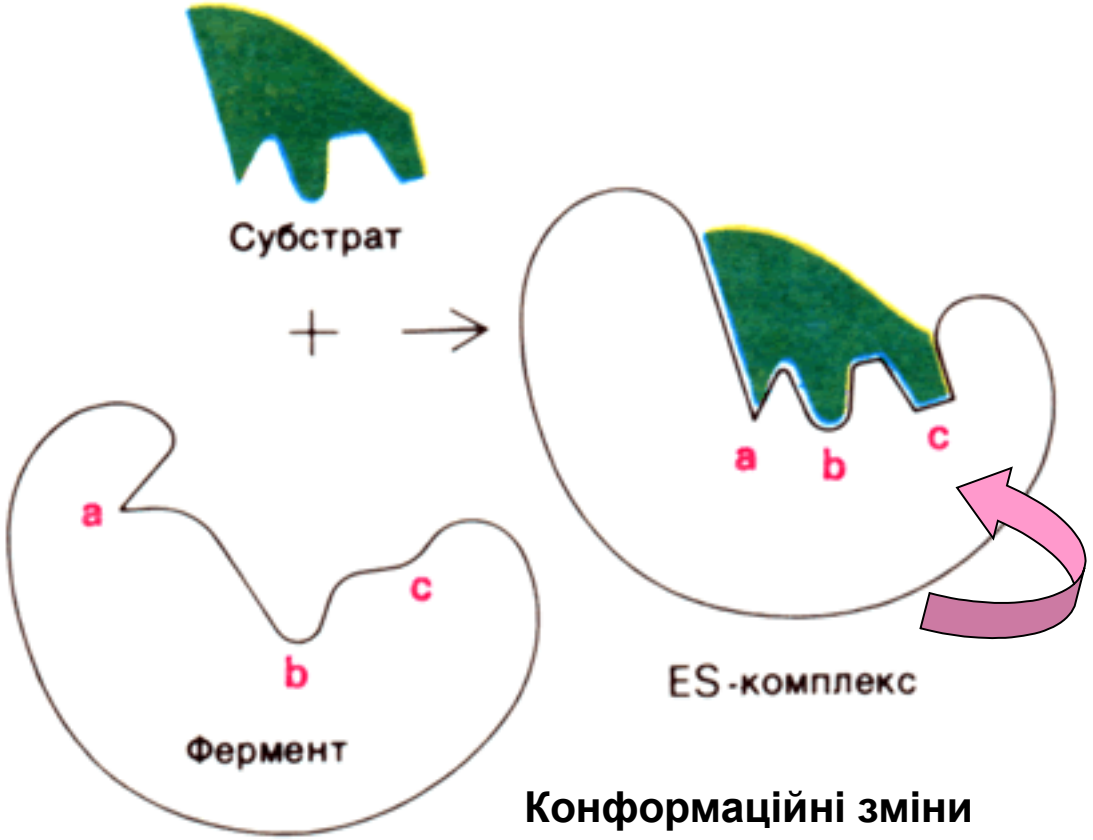
“Ключ-замок” *(модель жосткої матриці*) **- *E та S повністю комплементарні***



Теорія Кошланда, 1958 р.

Денієл Е.Кошланд (1920-2007),
американський біохімік,
редактор «Science».

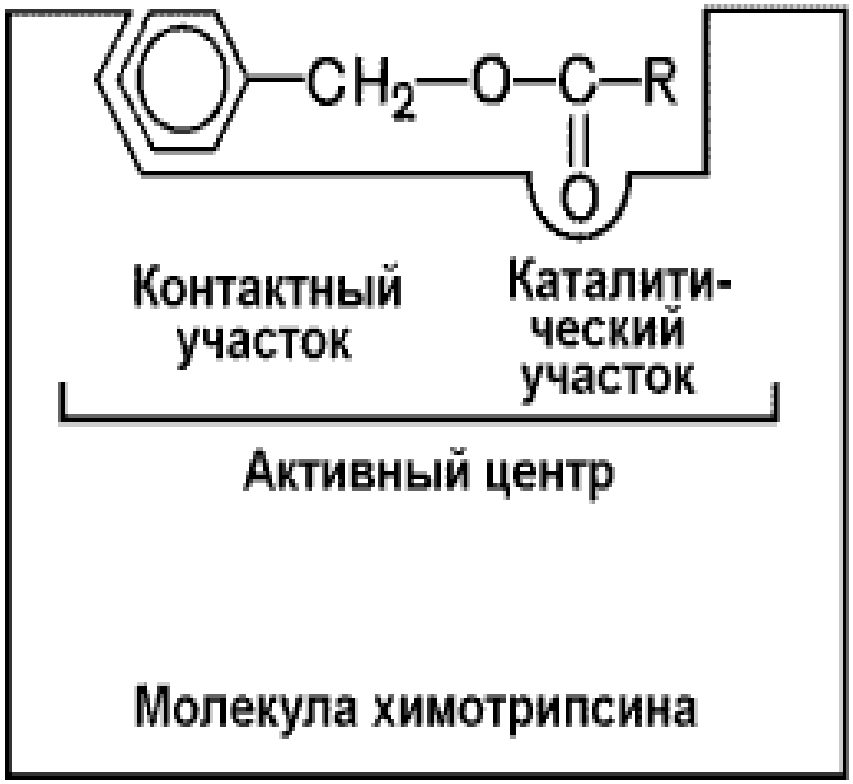
Модель *«індукованої відповідності Е та S»,*
«рука - рукавичка»



Конформаційні зміни

Структура активного центру:

- **контактна (якірна) ділянка - зв’язує S**
- **каталітична ділянка - перетворює S**



В акт.центр входять групи:

- **OH (сер, тре, тир)**
- **SH (цис)**
- **NH (гіс)**
- **COOH (глу, асп)**
- **NH_2 (арг, ліз)**

У складних ферментів в каталітичній ділянці – кофактори !!!

Алостеричний центр – додатковий регуляторний центр фермента, з яким взаємодіють ефектори

(+) - активатори

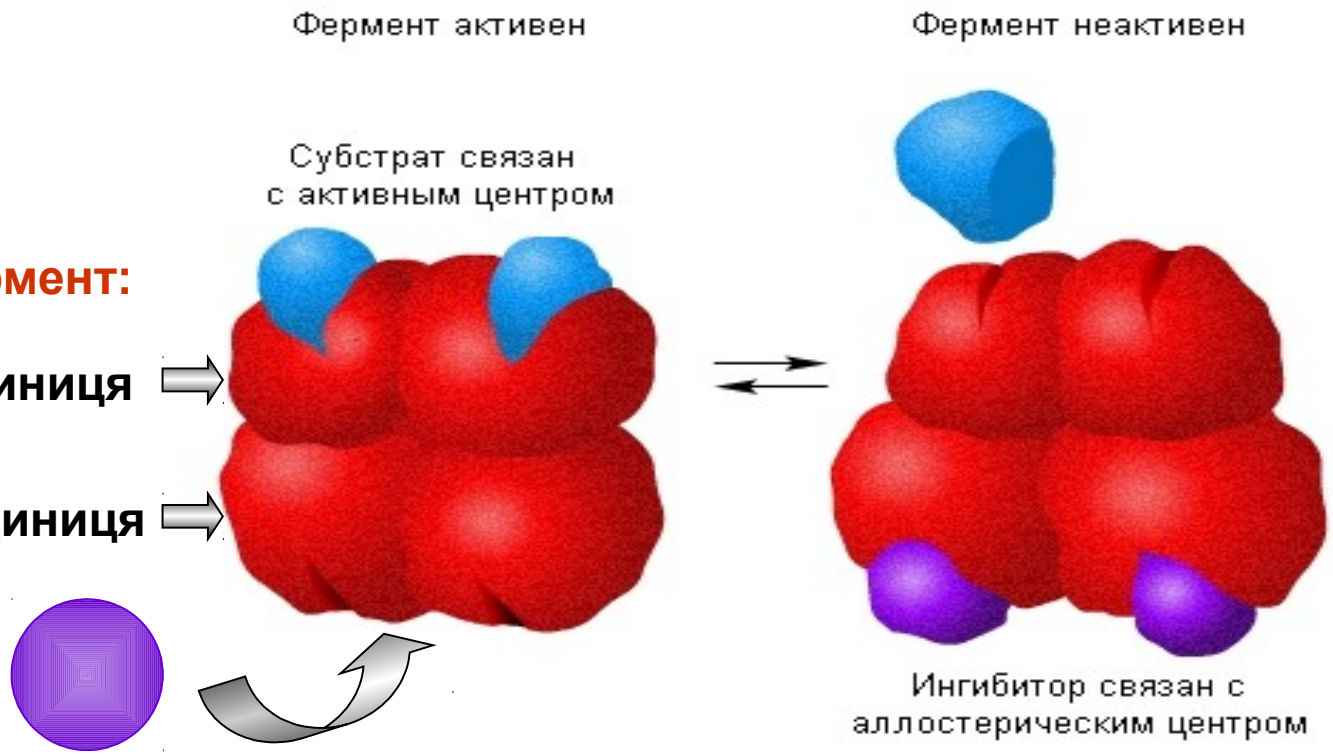
(-) - інгібітори

Регуляторний фермент:

Каталітична субодиниця

Регуляторна субодиниця

(-) ефектор



Механізм дії ферментів

Етапи

1. Утворення фермент-субстратного комплексу (ES)
2. Перетворення субстрата в продукт: розрив старих зв’язків та утворення нових зв’язків
3. Вивільнення продуктів реакції !!!

Властивості ферментів як біокаталізаторів !!!

1. **Специфічність - висока вибірковість дії**

а) абсолютна: один фермент – один субстрат (*уреаза, аргіназа*)

б) стереоструктурна: дія на певний стереоізомер (*ЛДГ -на L-лактат; оксидази D- та L-амінокислот*)

в) відносна: один фермент – один тип хімічного зв'язку

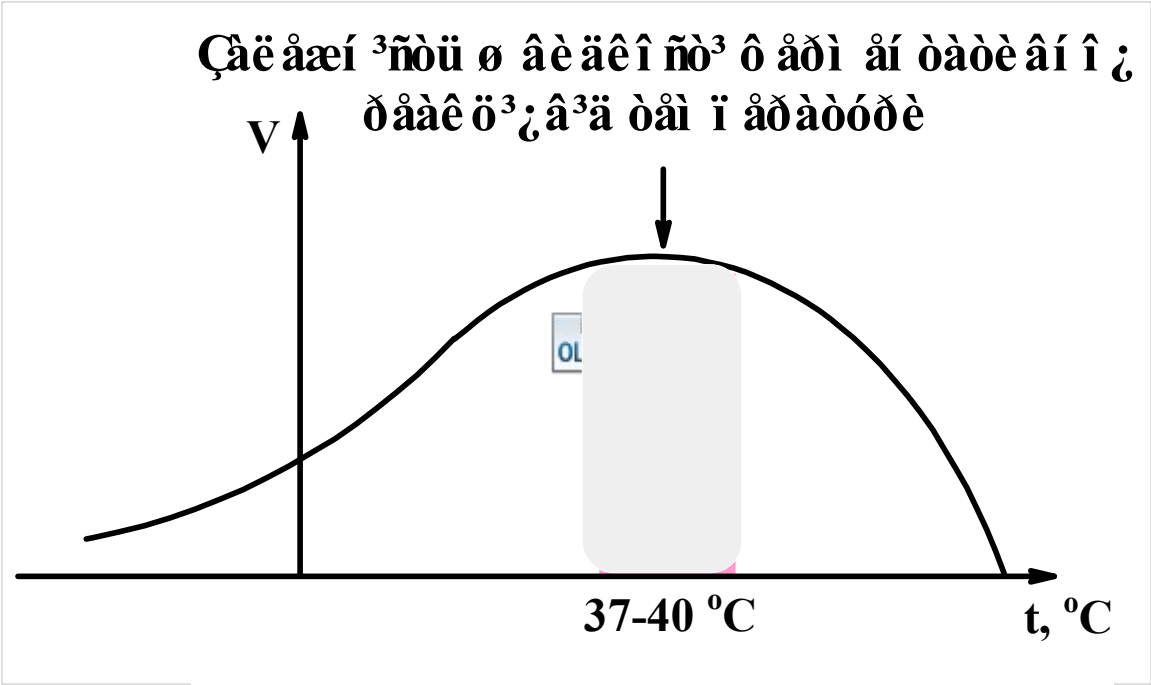
(*пептидази – пептидний зв'язок*)

2. Термолабільність

t оптимум - 37- 40°С

55-60°С та вище – зниження активності ферментів (денатурація)

Ферменти добре зберігаються при низькій t !!!

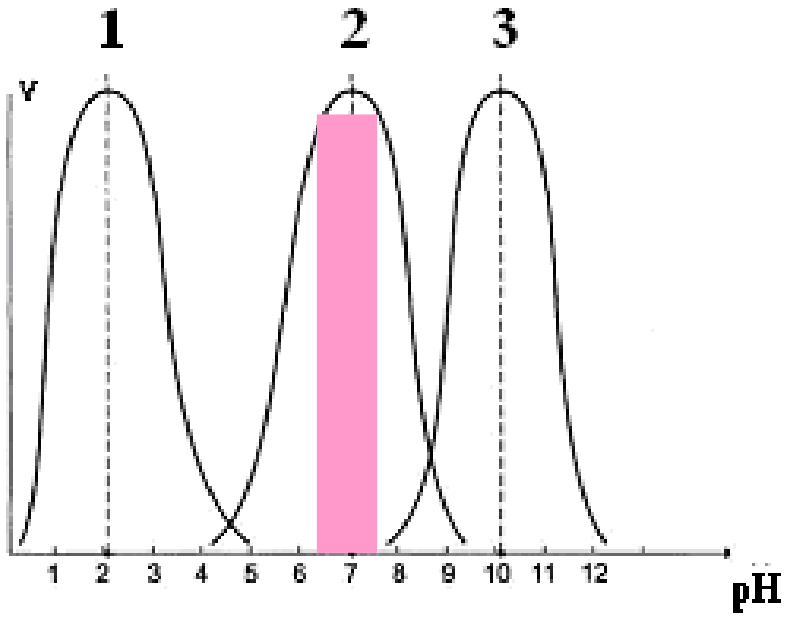


3. Залежність від pH (pH-оптимум)

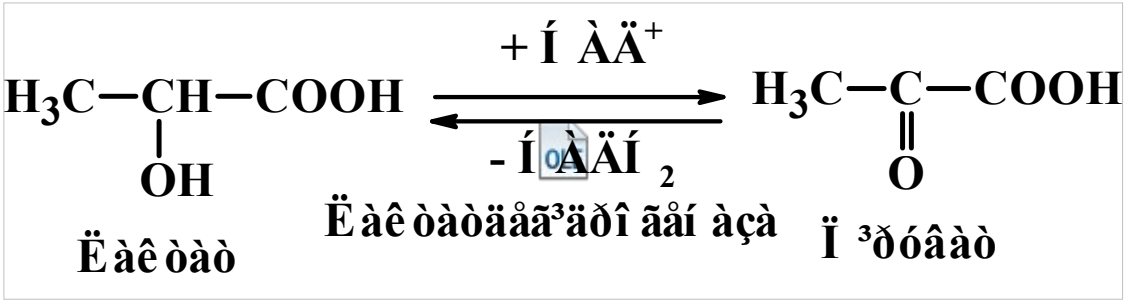
1 - пепсин: $pH_{опт}$=1,5-2

2 - більшість Е: $pH_{опт}$= 7-8

3 - аргіназа: $pH_{опт}$=10-11



4) Прискорюють як пряму, так і зворотну реакцію



5) Регульованість дії

6) Висока ефективність, дія в дуже малих концентраціях

1 молекула карбангідрази розщеплює 36 млн молекул H_2CO_3

Як всі каталізатори ферменти:

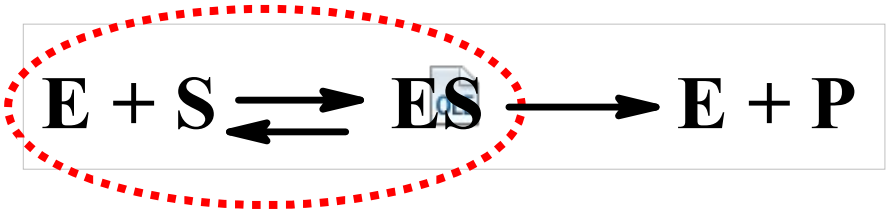
- каталізують лише термодинамічно можливі реакції

- не змінюють напрямку реакцій

- не входять до складу продуктів реакції

Кінетика ферментативних реакцій

(1913 р. – Міхаеліс та Ментен)



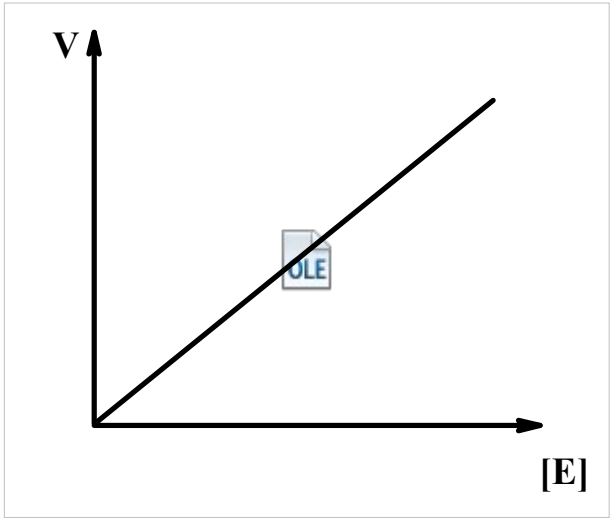
Швидкість ферм. р-ції (V) визначається зміною концентрації молекул реагуючих речовин за од. часу

Залежить від:

- ☹**концентрації ферменту**
- ☹**концентрації субстрату**
- ☹**t, pH та інших чинників**

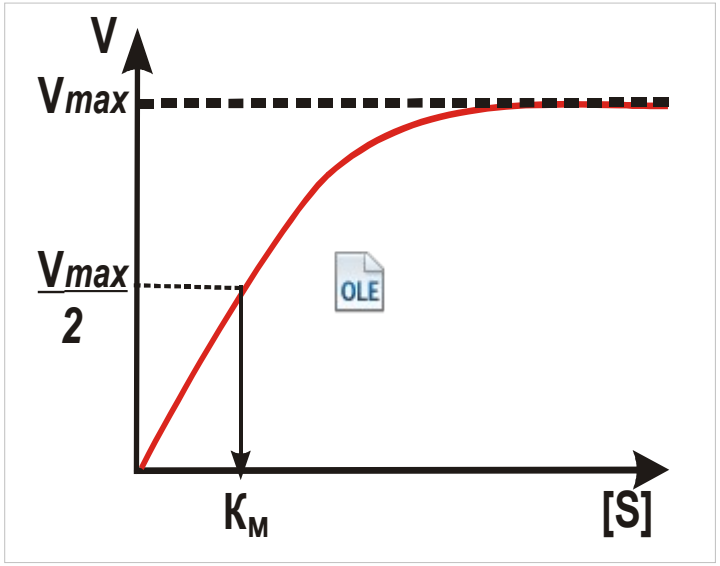
Залежність швидкості ферментативної реакції

від концентрації ферменту



$$V = k \cdot [E]$$

від концентрації субстрату

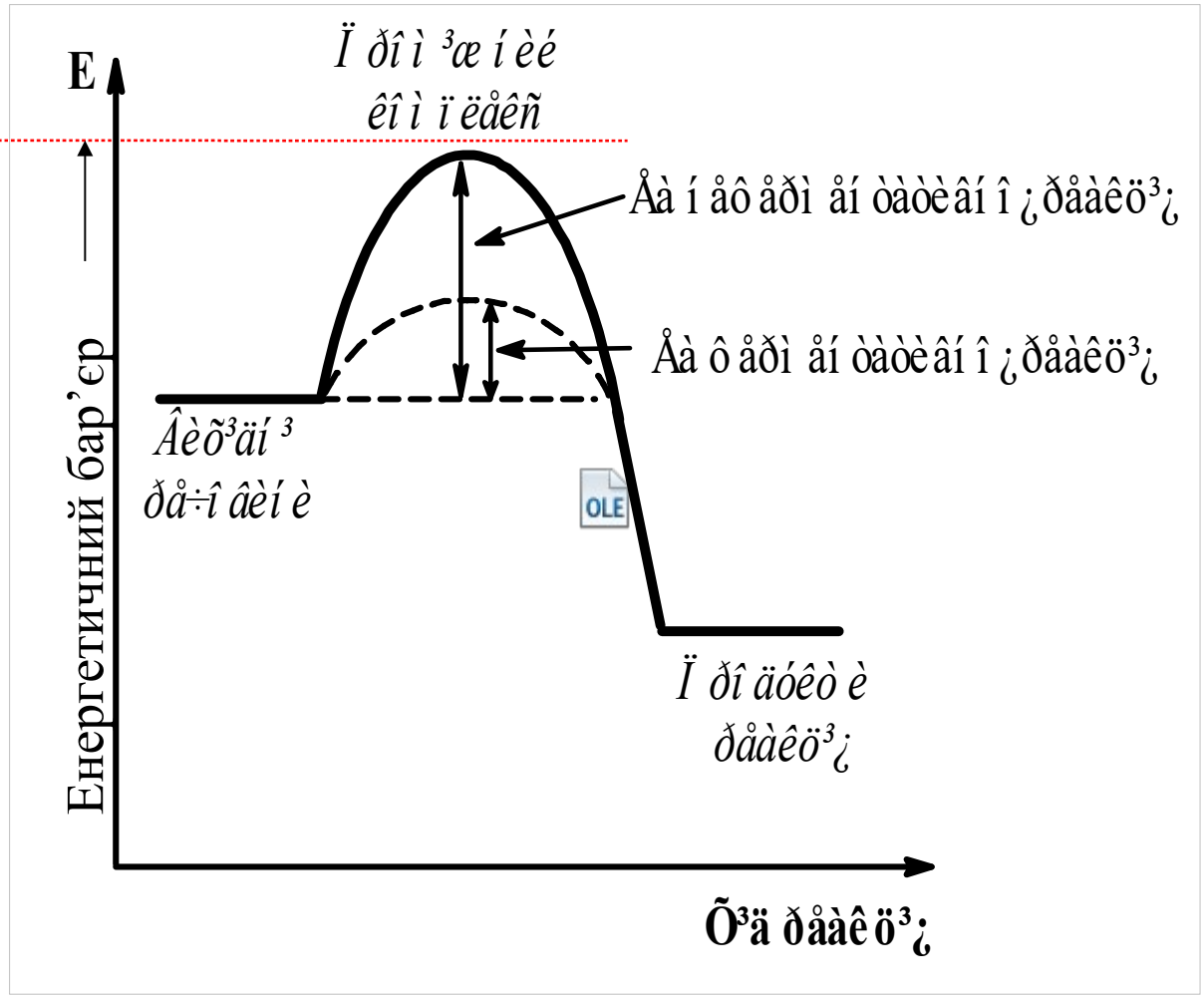


$$V = \frac{Vmax}{1 + K_m / [S]}$$

Константа Міхаєліса (Km) – та концентрація S, при якій швидкість ферм.р-ції = ½ від максимальної.

Енергетика ферментативних реакцій

Енергія активації (*Ea, кДж/моль*) - **додаткова кількість кінетичної енергії, необхідна для переведення молекул 1 моля речовини в активний стан.**



!!! Ферменти знижують Ea за рахунок утворення *ES*

Активність ферменту – *відповідає швидкості реакції, яку каталізує фермент*

Принципи визначення:

☎**за швидкістю зникнення S**

☎**за швидкістю накопичення P**

Одиниці активності ферментів:

Міжнародна: Unit (Од.). 1 U = 1 мкмоль/хв

SI: Катал. 1 кат = 1 моль/с *(1 кат = 6 ·10^7 U)*

Питома активність: U / мг білка

В медичній ензимології: U/л (мкмоль/хв·л)

(Unit на 1 л плазми крові, сечі)

Активатори – **збільшують активність Е**

органічні :

жовчні кислоти – активують ліпазу,

ентерокіназа – активує трипсин

неорганічні :

HCl – активує пепсин

іони металів (Na, K, Mg, Mn, Zn).

Інгібітори – зменшують активність Е

Види інгібування:

☎оборотне : $E+I \leftrightarrow EI$

☎необоротне : $E+I \rightarrow EI$

Необоротне інгібування викликають солі Hg, Pb, Cu, ФОС.

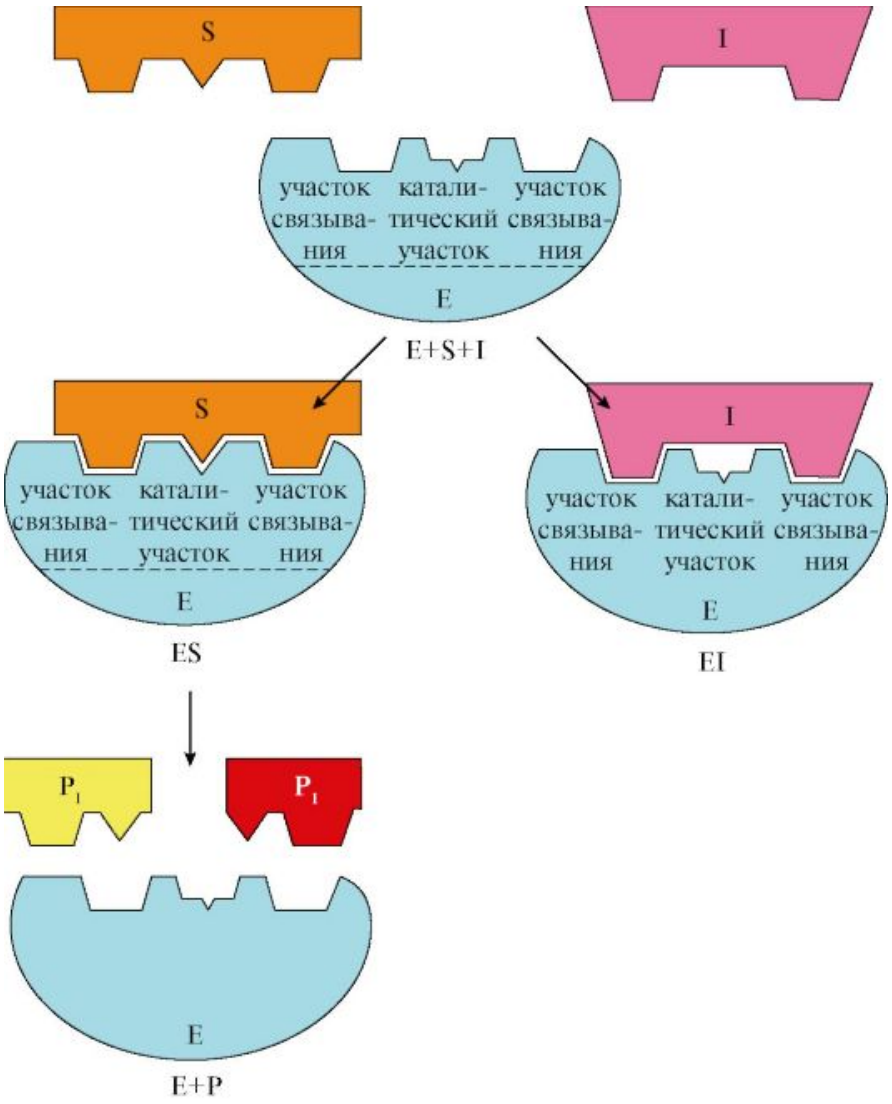
За механізмом :

☎Конкурентне

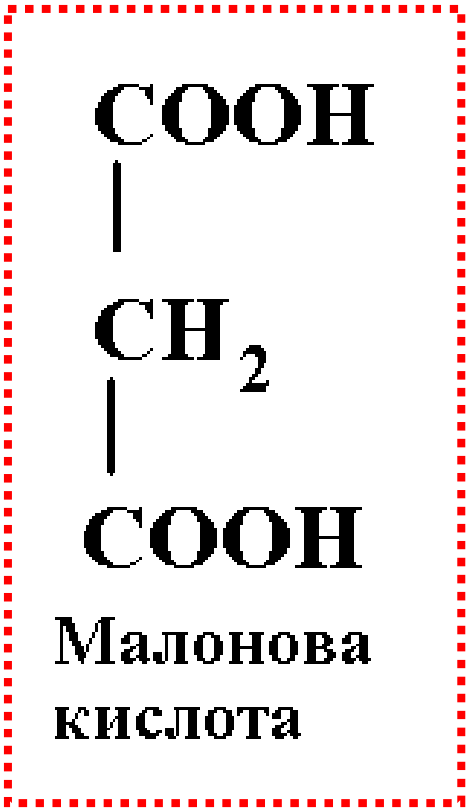
☎Неконкурентне

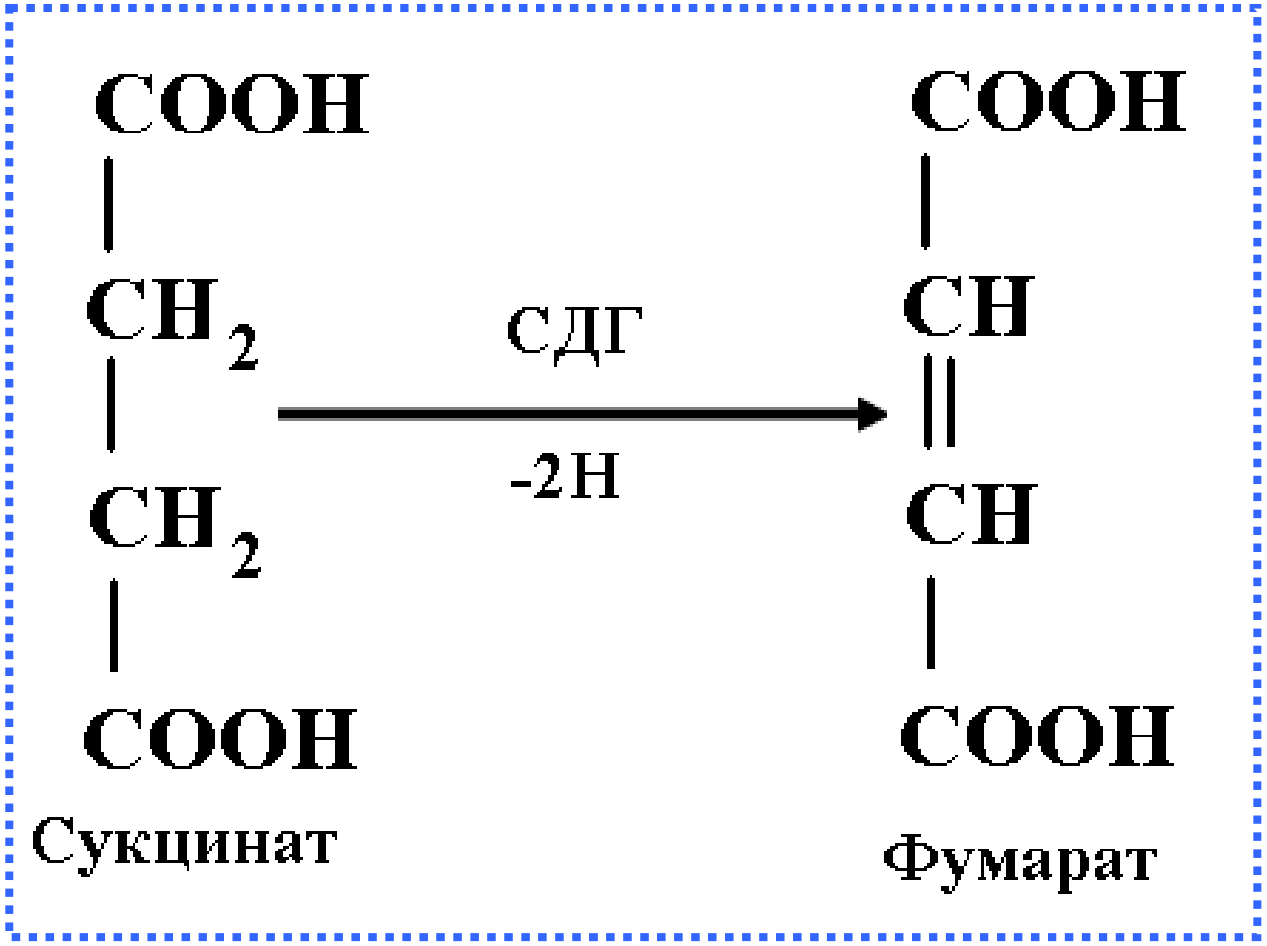
Конкурентні інгібітори:

- структурно схожі на S
- взаємодіють з контактною ділянкою активного центру
- діють за високих концентрацій (I > S)
- ↑Km
- інгібування завжди оборотне!!!



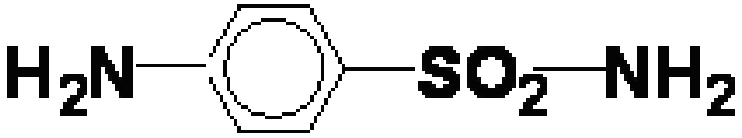
Малонат – конкурентний інгібітор сукцинатдегідрогенази



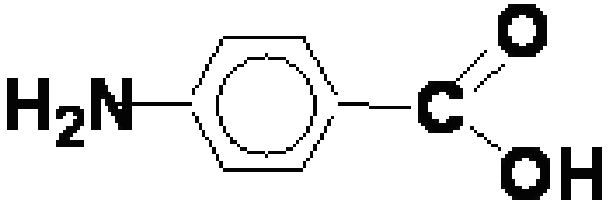


Конкурентні інгібітори в медицині:

- сульфаніламіди - аналоги ПАБК (антимікробні)
- метотрексат – аналог віт.B_9, блокує синтез ДНК
- дикумарини – аналоги віт.К, блокують синтез протромбіну (антизгортальні)
- прозерин - інгібітор ацетилхолінестерази



Стрептоцид

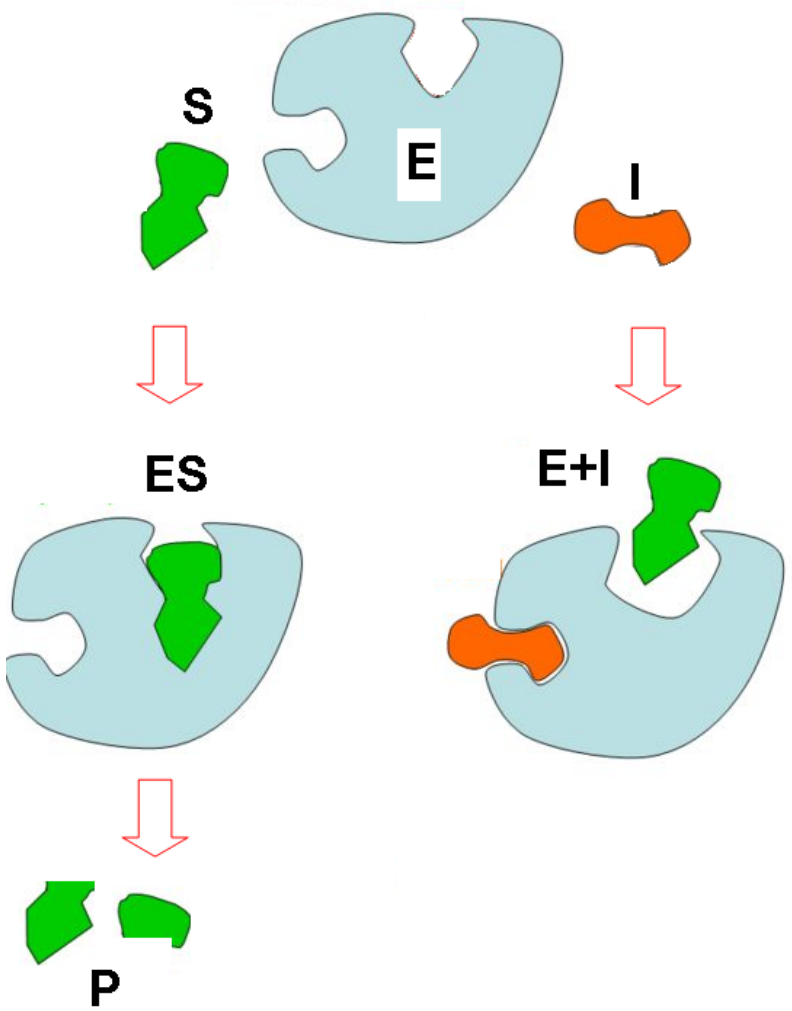


ПАБК

Неконкурентні інгібітори:

- не схожі на S
- хімічно модифікують фермент
- діють в малих концентраціях
- не змінюють Km
- інгібування частіше необоротне!!!

Часто є клітинними отрутами !!!

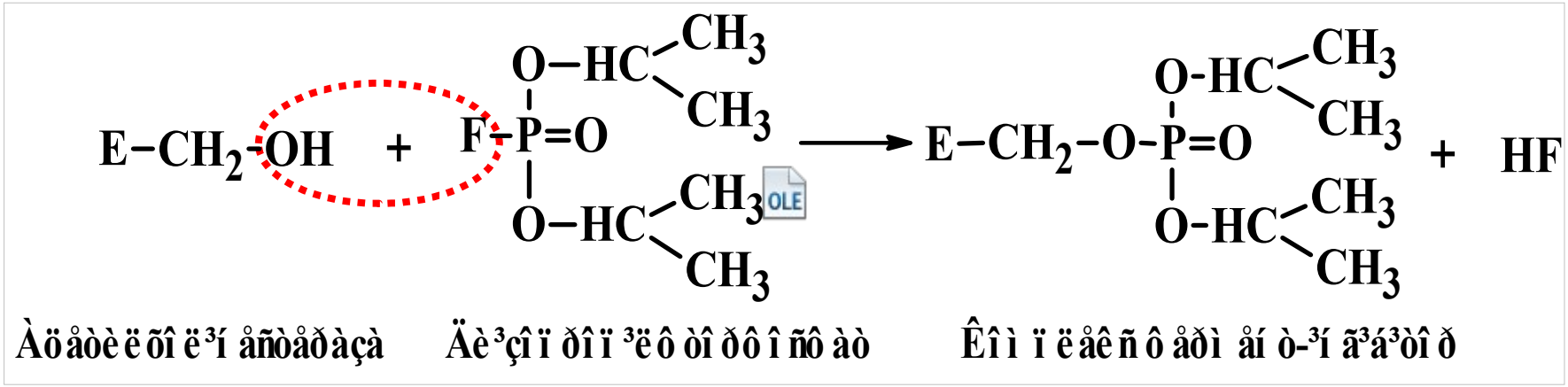


Неконкурентні інгібітори:

☎ФОС (отрути) – інгібітори ацетилхолінестерази

☎тетурам – інгібітор ацетальдегід-дегідрогенази

☎аспірин – інгібітор ЦОГ



Àöåòèëõîë³í åñòåðàçà Äè³çîïðîï³ëôòîðôîñôàò Êîìïëåêñôåðìåíò-³í ã³á³òîð

Клітинна організація ферментативної активності

- **ядро:** синтез ДНК та РНК
- **внутрішня мембрана мітохондрій:** дихальний ланцюг
- **матрикс мітохондрій:** ЦТК, окисне декарбоксилування α-кетокислот, β-окиснення жирних кислот
- **лізосоми:** гідролази
- **цитоплазма:** гліколіз, синтез жирних кислот
- **плазматична мембрана:** транслокази (транспорт Na^+, K^+, глюкози та ін.)

Мембранозв'язані ферменти – структурно-функціонально пов'язані з мембранами

Ізоферменти – множинні форми ферменту, які каталізують одну й ту саму реакцію і відрізняються за

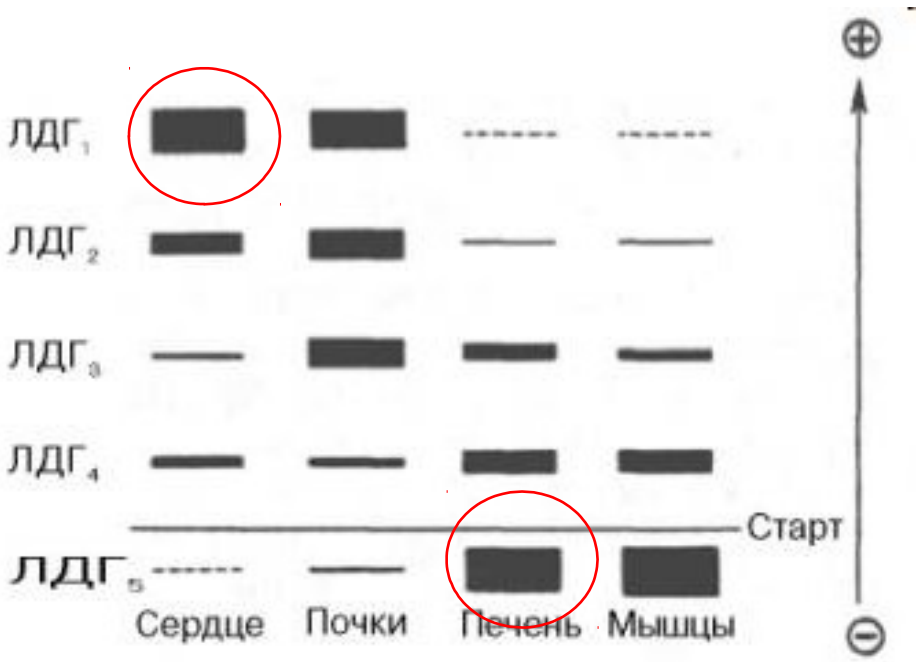
- будовою
- фіз.-хім. властивостями
- локалізацією в тканинах

$ЛДГ_1$: $ЛДГ_2$: $ЛДГ_3$: $ЛДГ_4$: $ЛДГ_5$
(Н4) (Н3М) (Н2М2) (НМ3) (М4)

$Піруват + НАДН_2 \leftrightarrow Лактат + НАД$

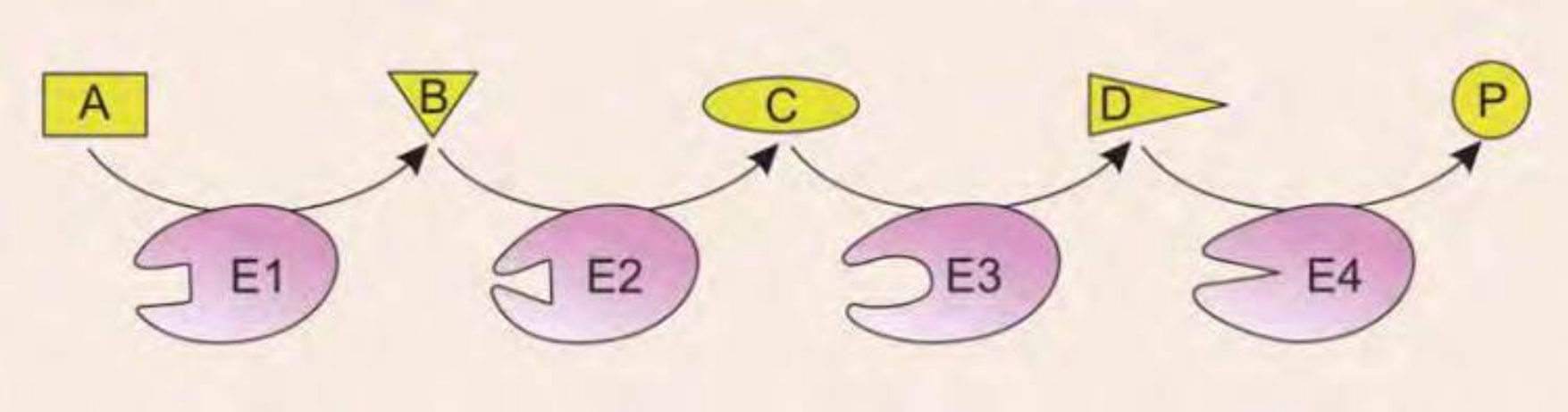
↑$ЛДГ_{1,2}$ – інфаркт міокарду

↑ $ЛДГ_{4,5}$ – ураження печінки



Поліферментні системи -

(гліколіз, β-окиснення жирних кислот)



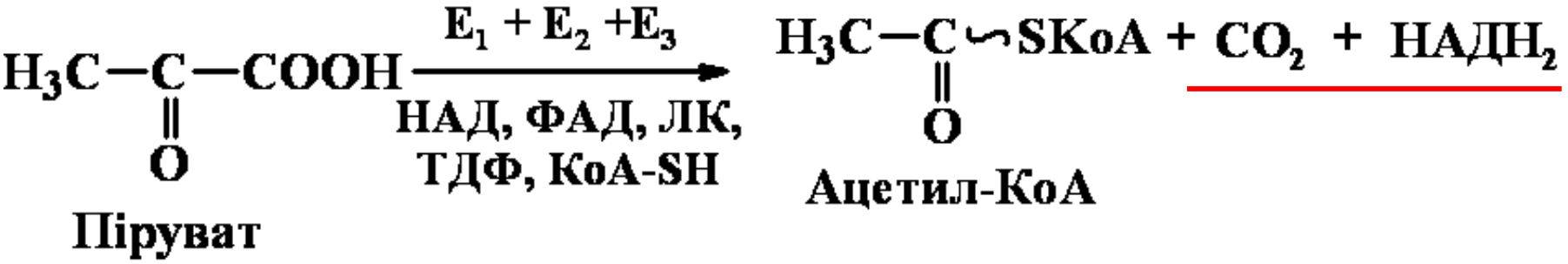
Ферменти пов’язані за допомогою метаболітів

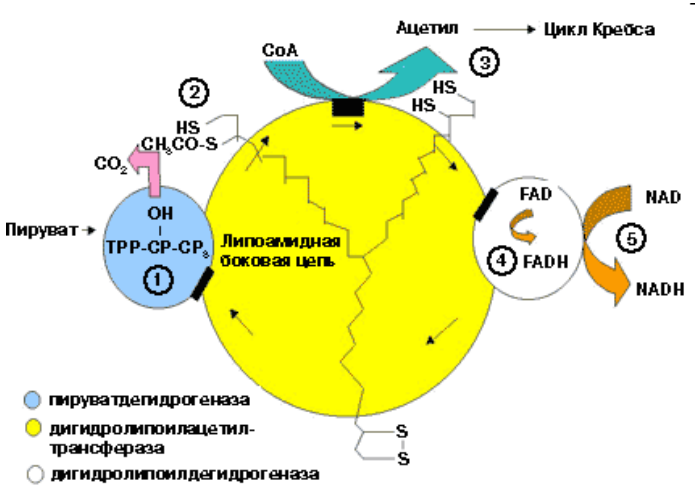
Піруватдегідрогеназний комплекс (ПДГ):

3 ферменти +

5 коферментів (НАД, ФАД, ліпоєва к-та, ТДФ, КоА)

Р-ція окисного декарбоксилування пірувату:





Регуляція швидкості ферм. р-цій

Зміна активності існуючих молекул ферменту - швидка (сек, хв)

Зміна кількості молекул ферменту – повільна (години, дні)

Ковалентна модифікація

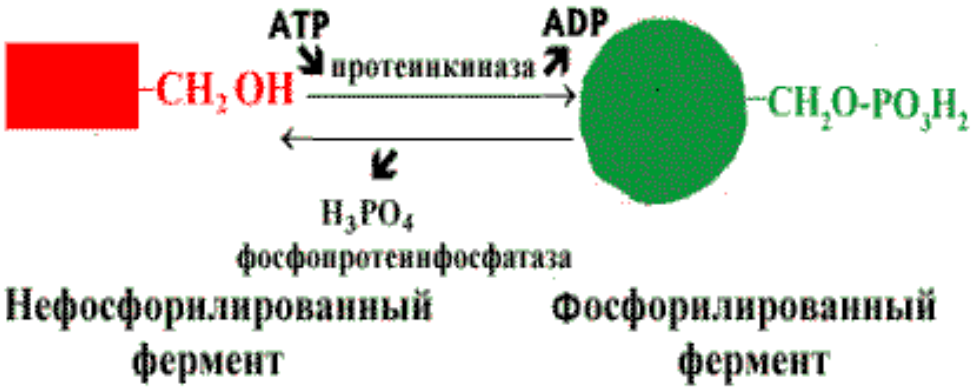
- **Фосфорилування / дефосфорилування**

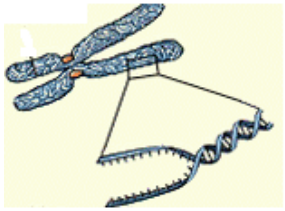
(глікогенфосфорилаза,глікогенсинтетаза)

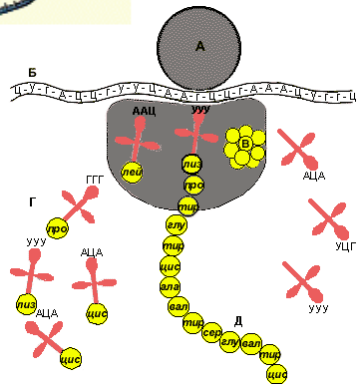
- **Обмежений протеоліз**

(пепсиноген →пепсин)

синтез ферменту – регуляція через геном (дія гормонів)

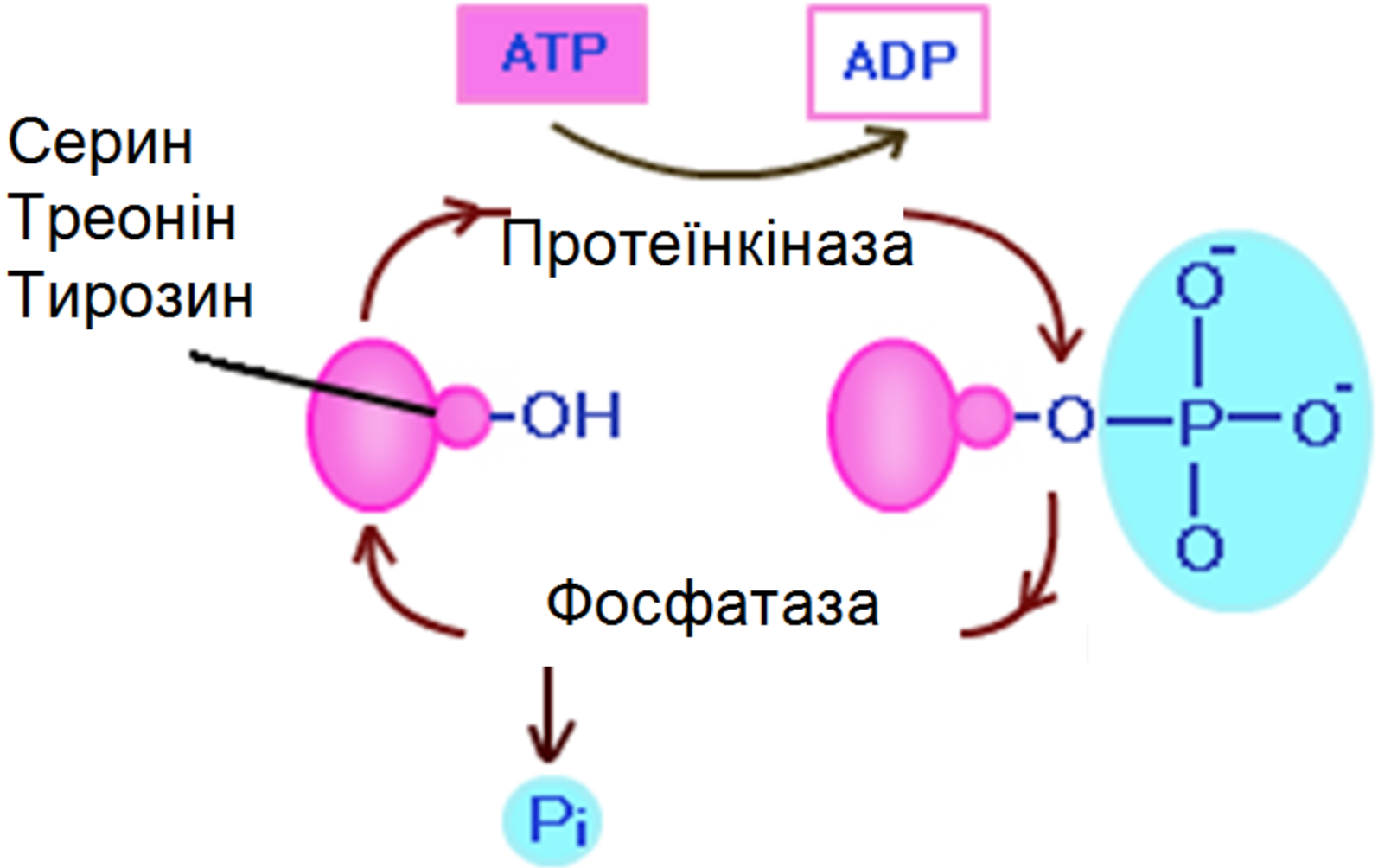




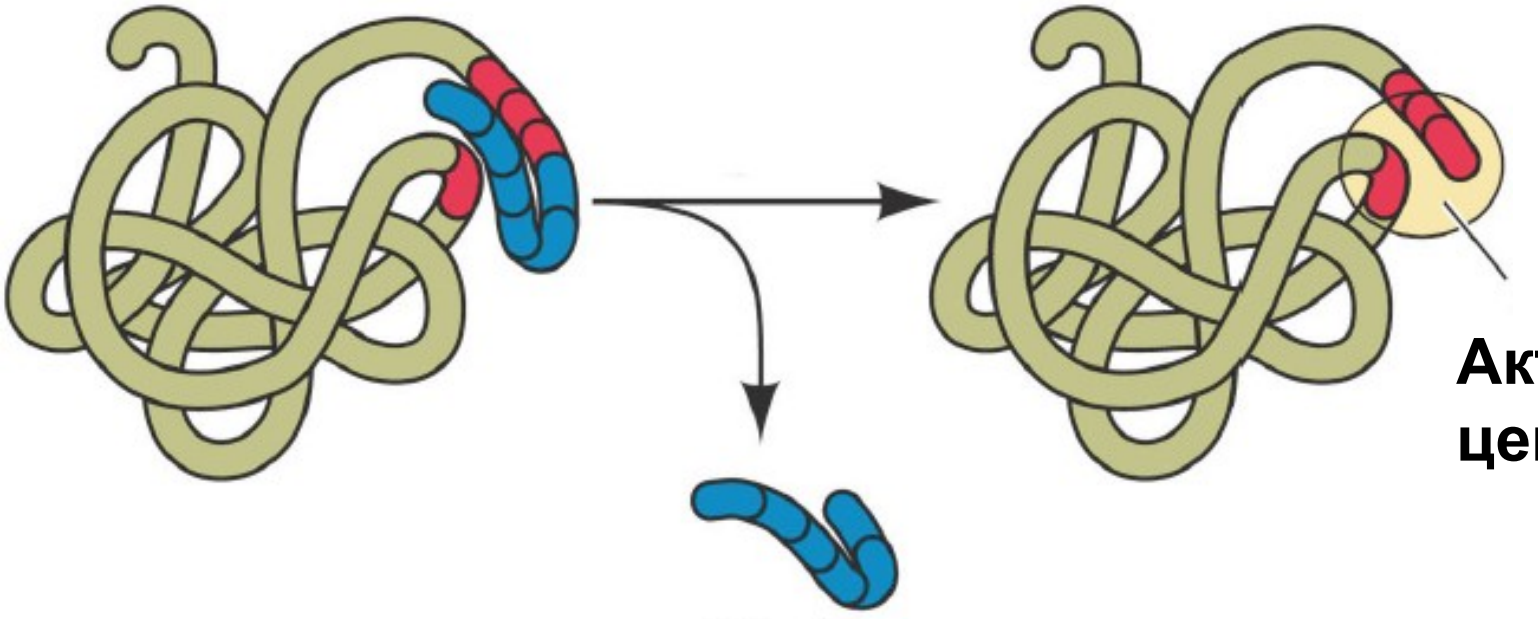


Фосфорилування /дефосфорилування

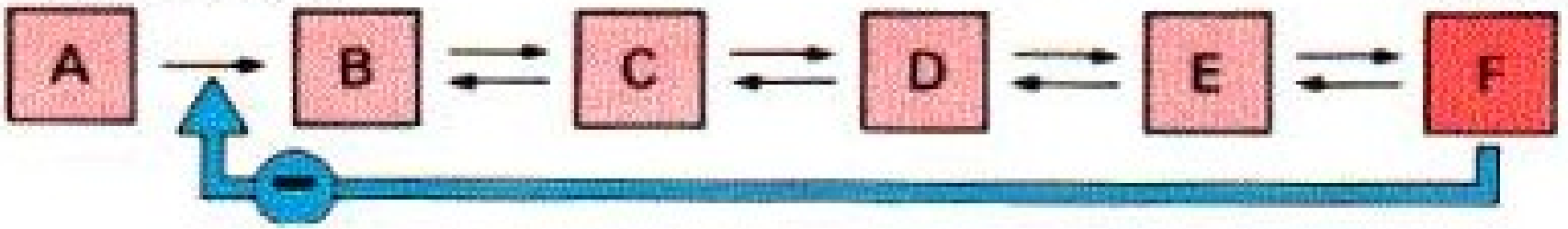
(глікогенфосфорилаза / глікогенсинтетаза)



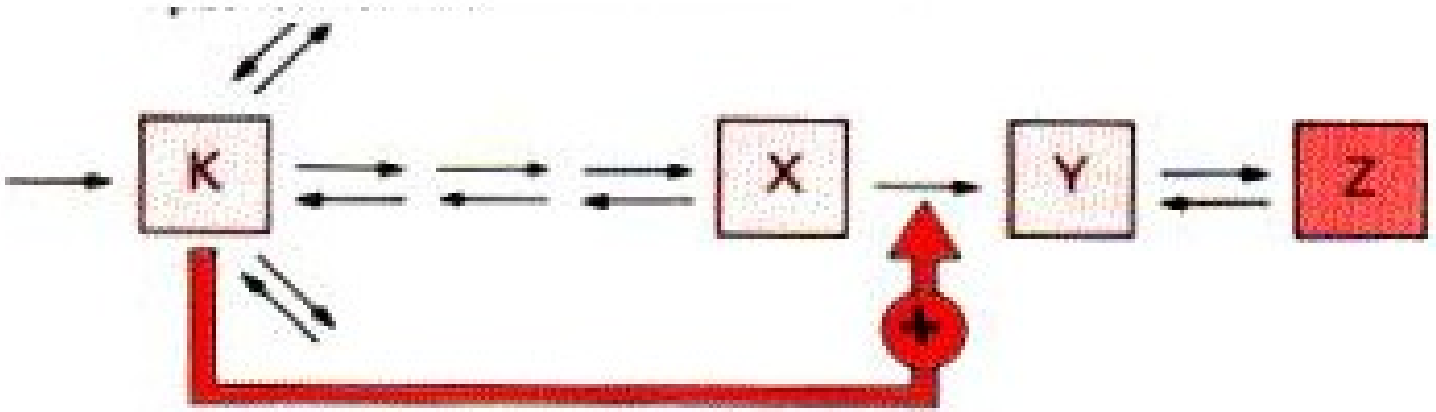
Обмежений протеоліз:
пепсиноген → пепсин



(-) зворотний зв’язок - інгібування кінцевим продуктом



(+) зворотний зв’язок - активація попередником



Медична ензимологія –

розділ біохімії, що вивчає роль ферментів у

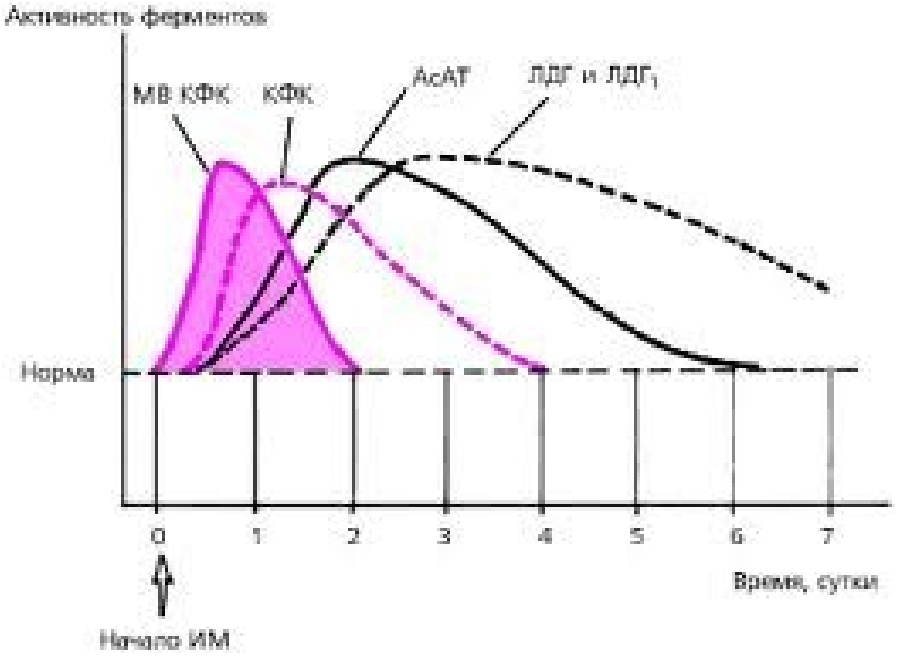
- **розвитку захворювань -** ***ензимопатологія***
- **їх діагностиці -** ***ензимодіагностика***
- **лікуванні -** ***ензимотерапія***

Ензимопатологія (ензимопатії) – захворювання, зумовлені відсутністю або зниженням активності ферментів

1. **Первинні** (вроджені) ензимопатії - фенілпіровиноградна кетонурія, альбінізм, глікогенози, сфінголіпідози, мукополісахаридози

2. **Вторинні** ензимопатії (дефіцит кофакторів, хронічні хвороби)

Ензимодіагностика – використання ферментів для діагностики захворювань



Ферменти – чутливі реагенти

(глюкозооксидаза та ін.)

Ферменти – маркери захворювань

Ферменти – індикатори захворювань

Міокард

- Креатинфосфокіназа (КФК-МВ)
- Аспартатамінотрансфераза (АСТ)
- Лактатдегідрогеназа ($ЛДГ_{1,2}$)

Інфаркт міокарду

Печінка

- Аланінамінотрансфераза (АЛТ)
- Лактатдегідрогеназа - $ЛДГ_{4,5}$

Гепатит

Підшлункова залоза

- Альфа-амілаза

Панкреатит

Ензимотерапія - використання ферментів, їх активаторів та інгібіторів для лікування захворювань

тромбози

рубці

патологія ШКТ

Дякую за увагу!