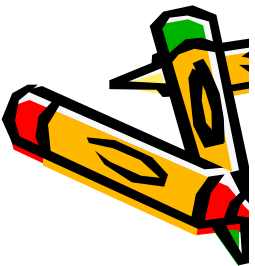
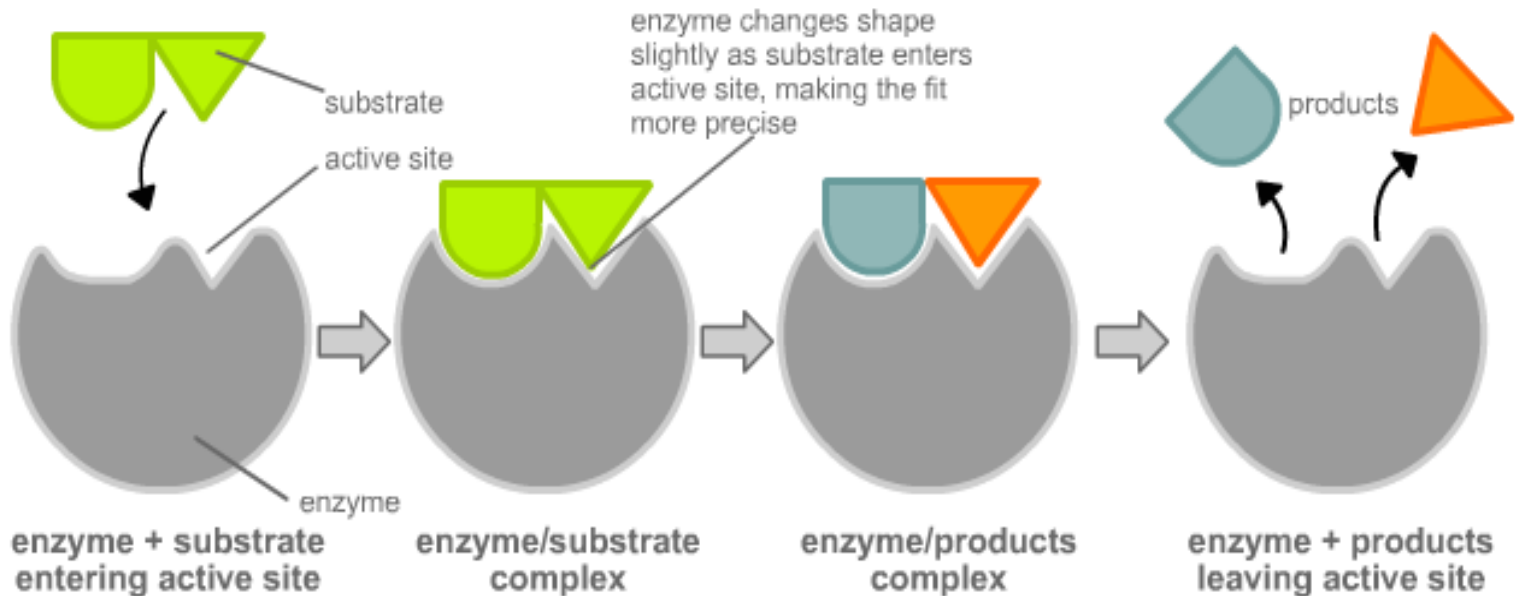


Лекция «КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ»

Автор: доцент Маглыш
Сабина Степановна



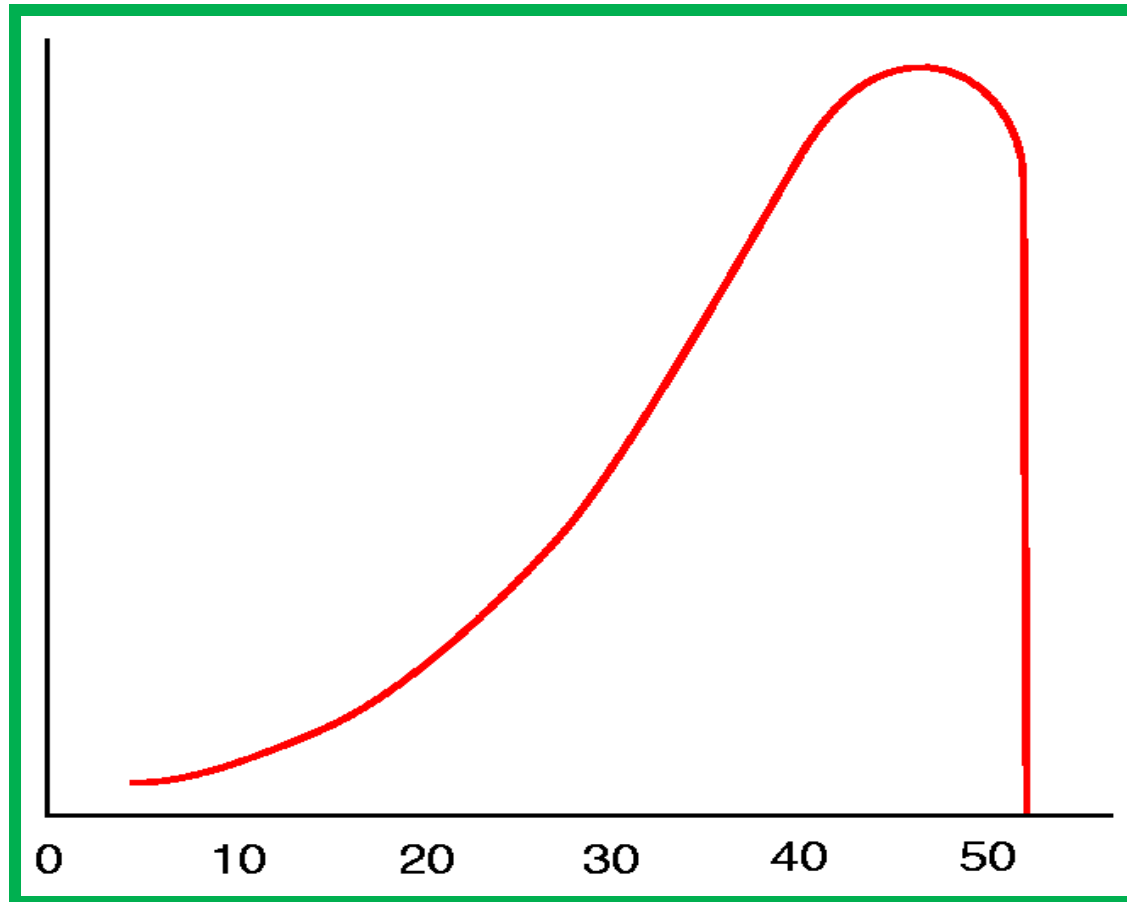
ВОПРОСЫ ЛЕКЦИИ



- **1.** Зависимость скорости ферментативных реакций от температуры, pH, концентрации субстрата и фермента.
- **2.** Кинетика ферментативных реакций: уравнения и графики Михаэлиса-Ментен и Лайнуивера-Берка.
- **3.** Механизмы регуляции активности ферментов: активаторы и ингибиторы ферментов, типы ингибирования; аллостерическая регуляция.
- **4.** Механизмы регуляция активности ферментов: генетический контроль количества фермента, ковалентная модификация, ограниченный протеолиз.
- **5.** **Первичные (врожденные) и вторичные (приобретенные) энзимопатии (УСРС).**
- **6.** Происхождение ферментов плазмы крови. Определение ферментов плазмы крови с диагностической целью (энзимодиагностика).
- **7.** Применение ферментов как лекарственных препаратов (энзимотерапия) и как аналитических реагентов.

1. Зависимость скорости ферментативных реакций от температуры, pH, концентрации субстрата и фермента.

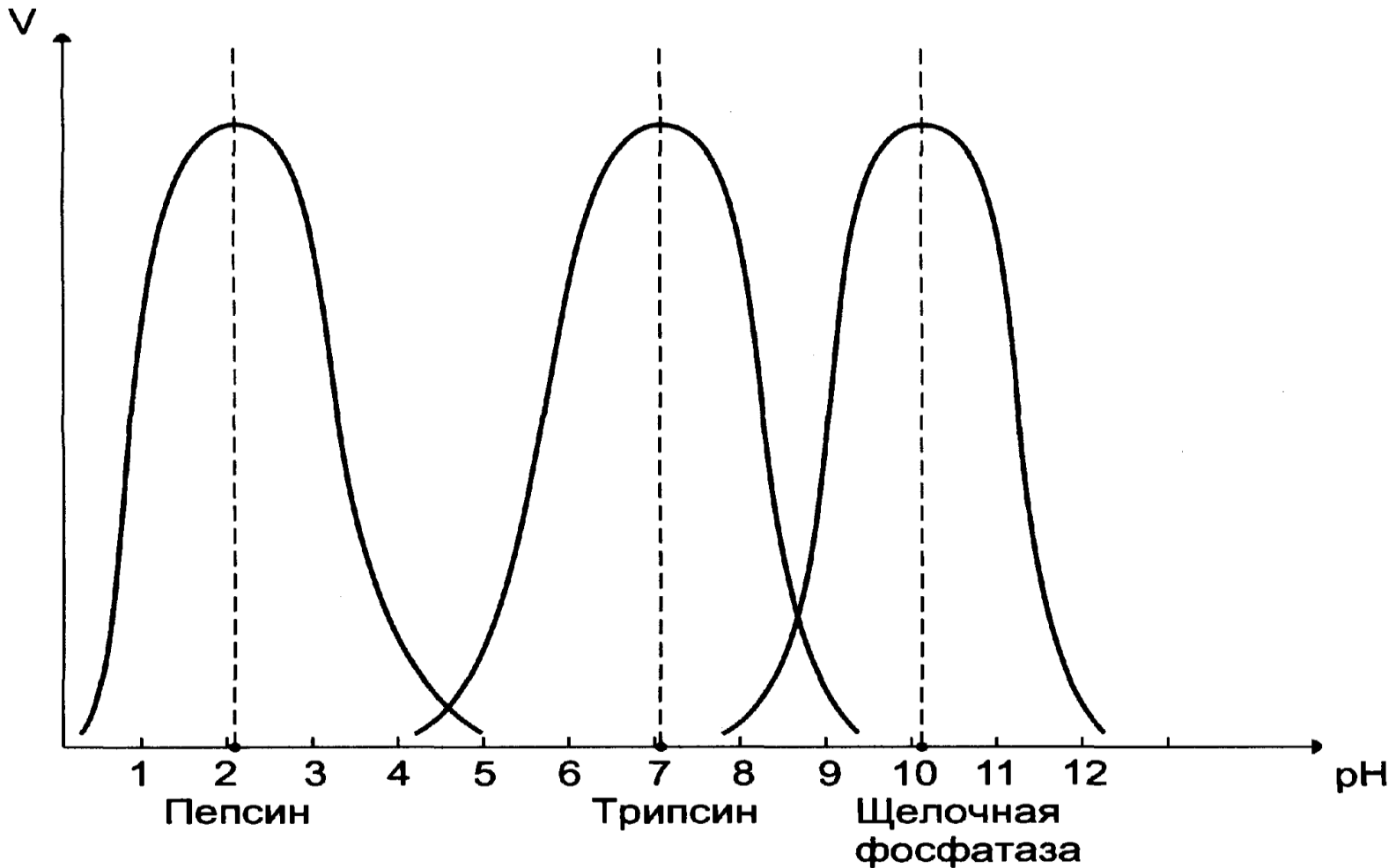
АКТИВНОСТЬ



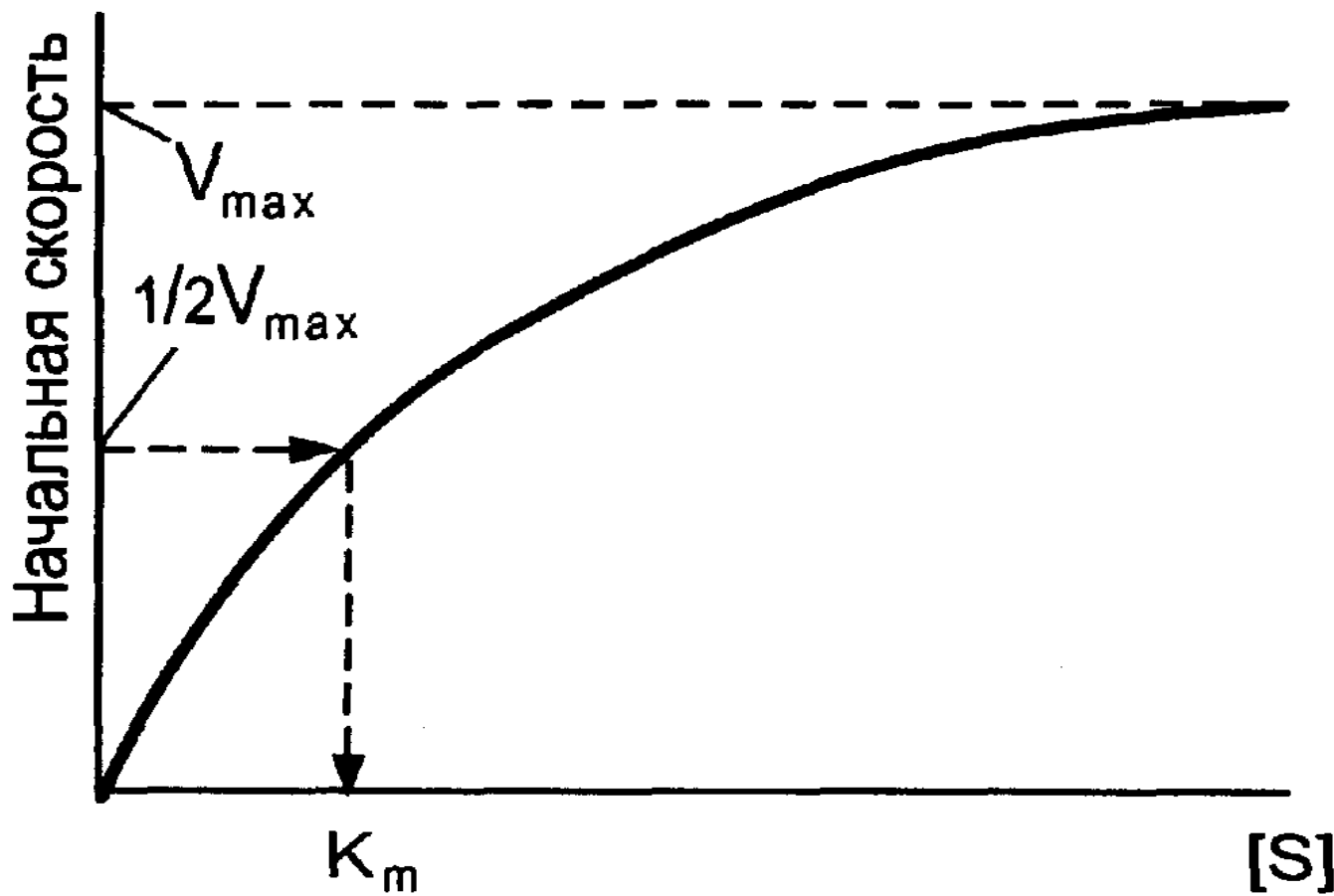
Температура



Зависимость скорости реакции от pH среды



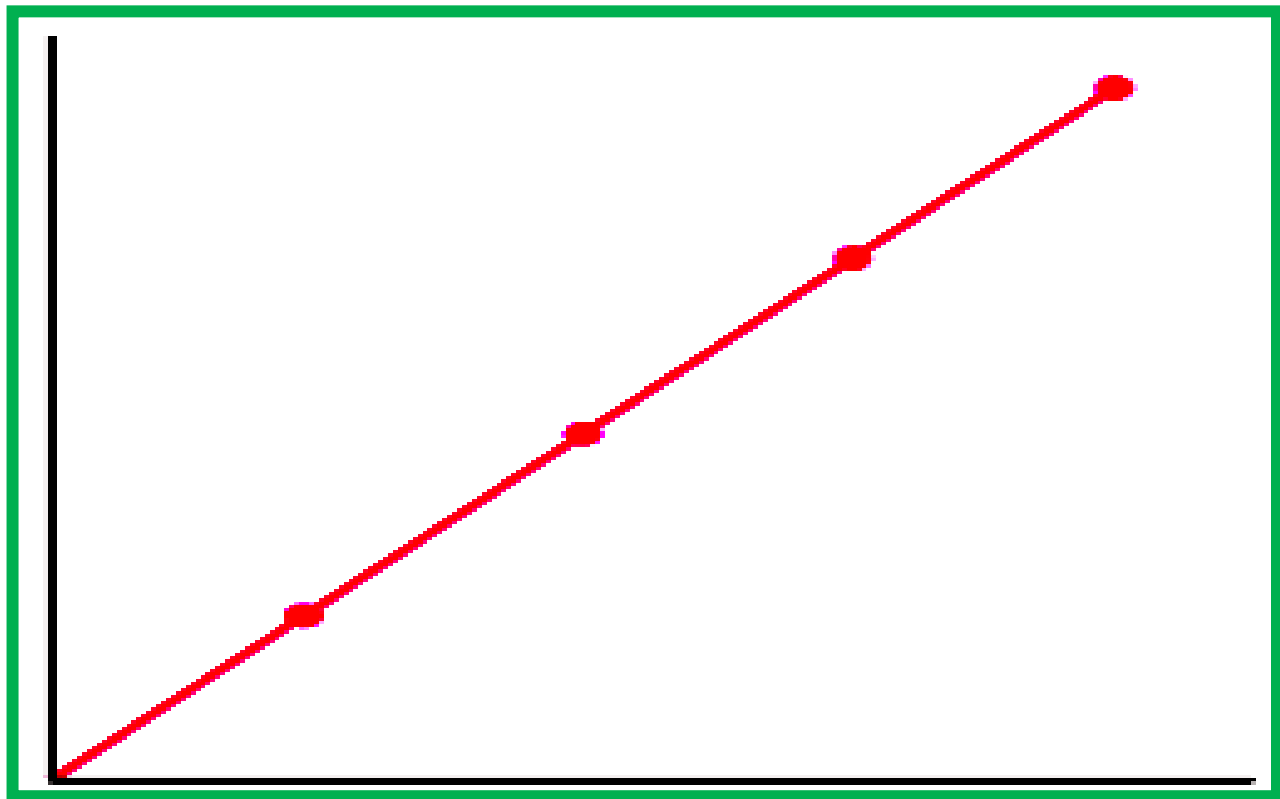
Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата



Зависимость скорости реакции от концентрации фермента



v



Концентрация фермента

$[E]$



2. Кинетика ферментативных реакций: уравнения и графики Михаэлиса-Ментен и Лайнуивера-Берка

Кинетика – зависимость скорости ферментативной реакции от различных факторов.

Общая теория кинетики ферментативного катализа была разработана Леонором **Михаэлисом** и Мод **Ментен** в 1913 г.

Они вывели уравнение зависимости скорости реакции от концентрации субстрата – **уравнение Михаэлиса-Ментен**

$$V_0 = V_{\max} \cdot [S] / K_s + [S]$$



Л. Михаэлис



М. Ментен

Уравнение Михаэлиса – Ментен

(уравнение Бриггса-Холдейна)

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

При условии, что

$$V_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$$

подставляем в уравнение Михаэлиса-Ментен вместо V_0 ее значение

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

и получаем уравнение:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

разделим обе части уравнения на V_{\max} и получим:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

решим его относительно K_m и получим:

$$K_m + [S] = 2[S];$$

$$K_m = 2[S] - [S];$$

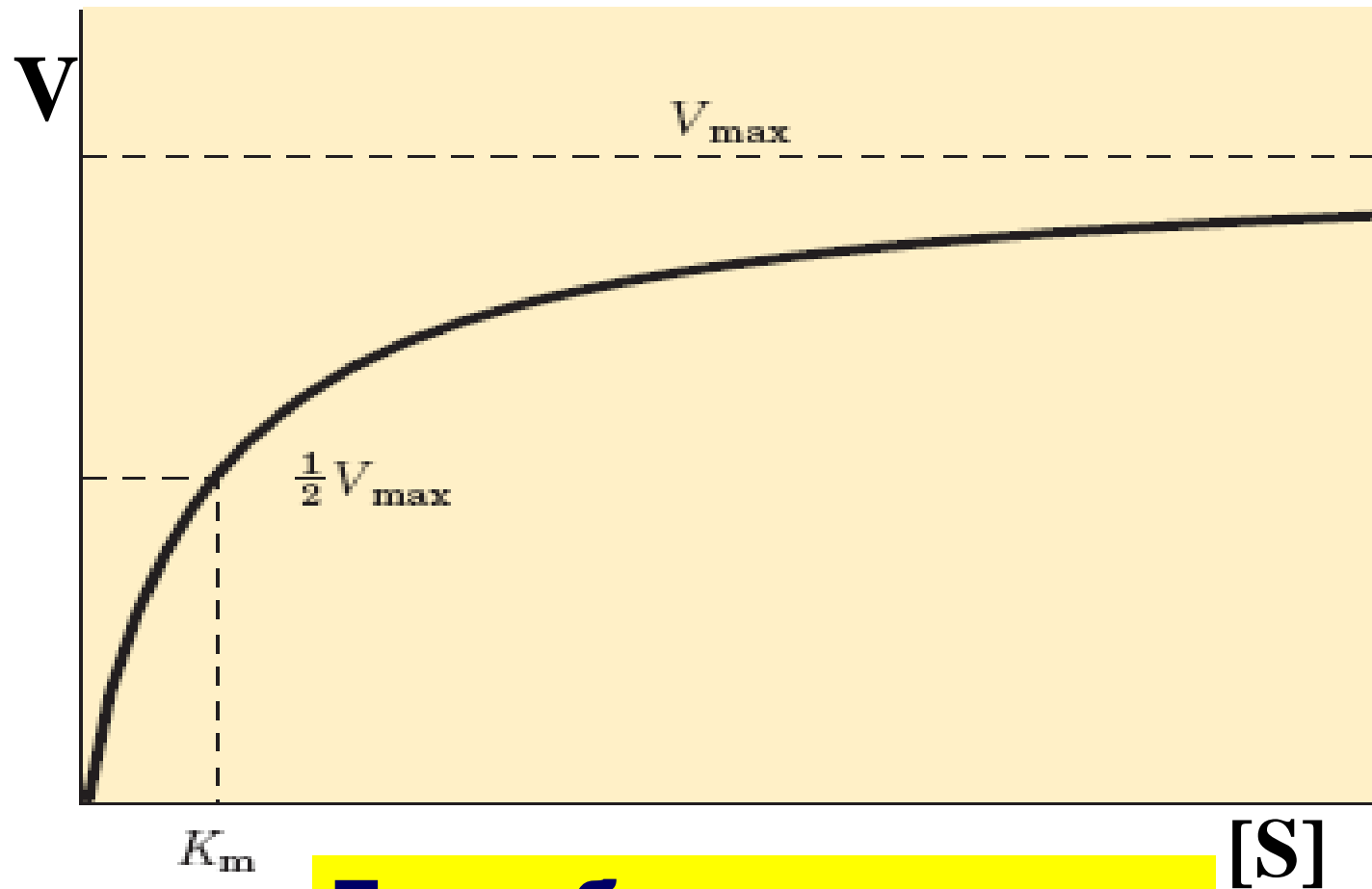
$$K_m = [S]$$

$$K_m = [S]$$

Константа Михаэлиса (K_m) - это концентрация субстрата при которой скорость ферментативной реакции равна половине от максимальной.

K_m характеризует сродство фермента к субстрату. Эти показатели обратно пропорциональны друг другу: чем больше K_m , тем ниже сродство, и наоборот.

График Михаэлиса-Ментен



**Гиперболическая
зависимость V от $[S]$**

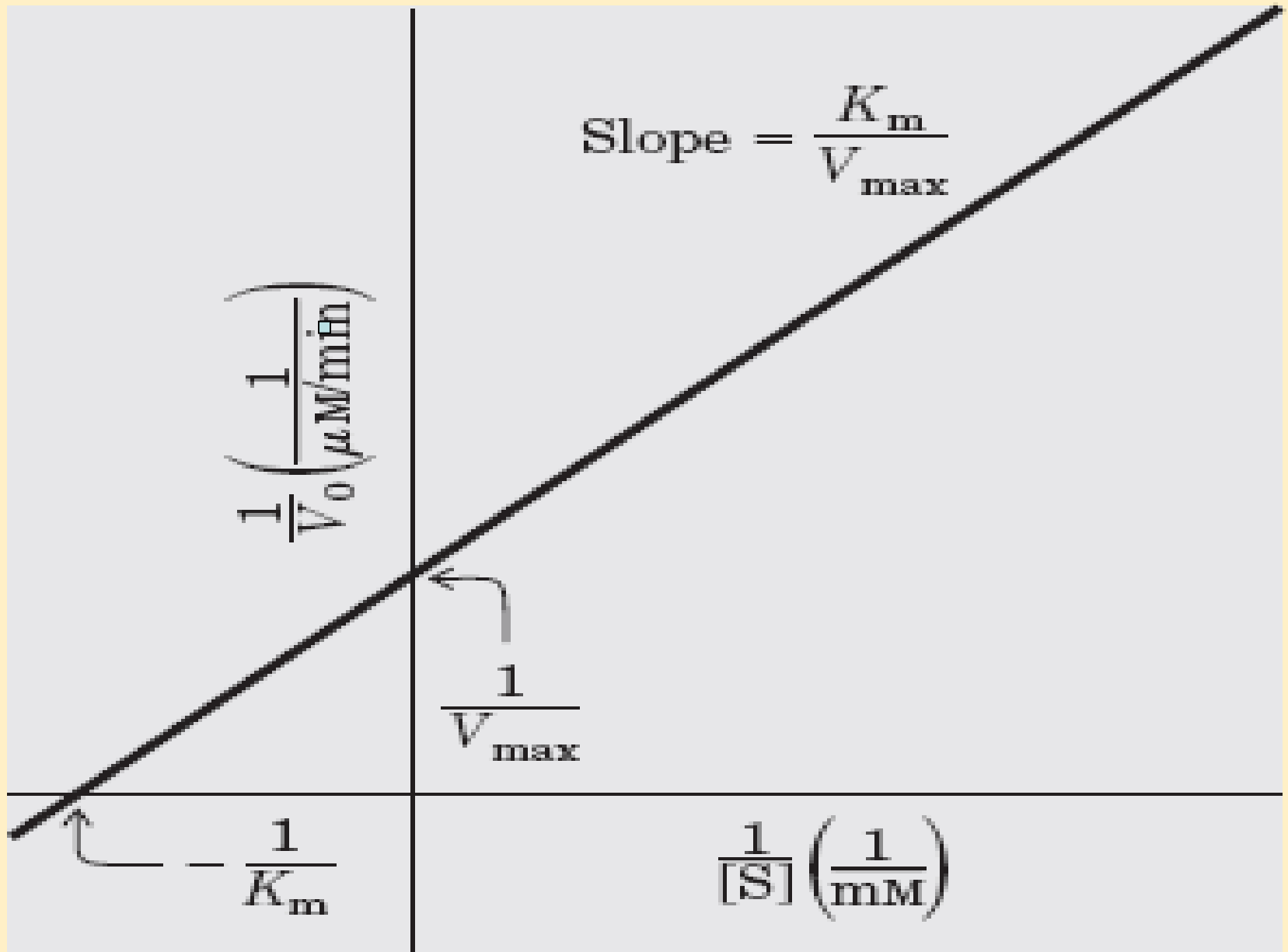
Уравнение и график Лайнуивера-Берка

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

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

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

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



3. Механизмы регуляции активности ферментов: ингибиторы и активаторы ферментов, типы ингибирования; аллостерическая регуляция

- Ингибиторы – вещества, снижающие скорость ферментативной реакции.
- Активаторы – вещества, повышающие скорость ферментативной реакции.

Ингибиторы ферментов:

- I. НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ.
- II. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ:
 1. НЕОБРАТИМЫЕ
 2. ОБРАТИМЫЕ:
 - КОНКУРЕНТНЫЕ
 - НЕКОНКУРЕНТНЫЕ

I. НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ

Они вызывают денатурацию молекул любых ферментов веществ **белковой природы**, что приводит к их инактивации. К ним относятся:

- 1. Концентрированные кислоты.
- 2. Концентрированные щелочи.
- 3. Соли тяжелых металлов.
- 4. Спирты, фенолы и др.

II. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ

Ингибируют определенные ферменты как **биокатализаторы**, за счет взаимодействия с ними.

1. НЕОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ

Необратимое ингибирование - наблюдается при образовании ковалентных связей между ингибитором и активным центром фермента. Фермент не может выполнять каталитическую функцию.

2. ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ

Связываются с ферментом слабыми нековалентными связями и легко отделяются от фермента. Обратимые ингибиторы могут быть:

- конкурентными;
- неконкурентными.

• КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

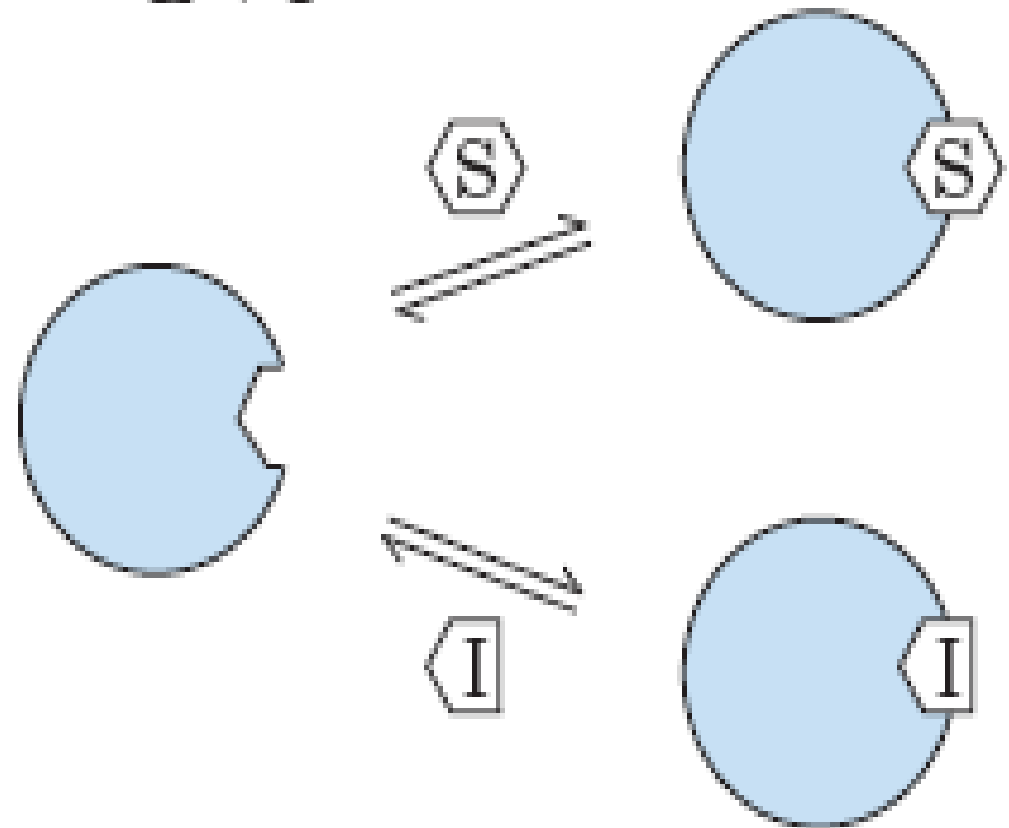
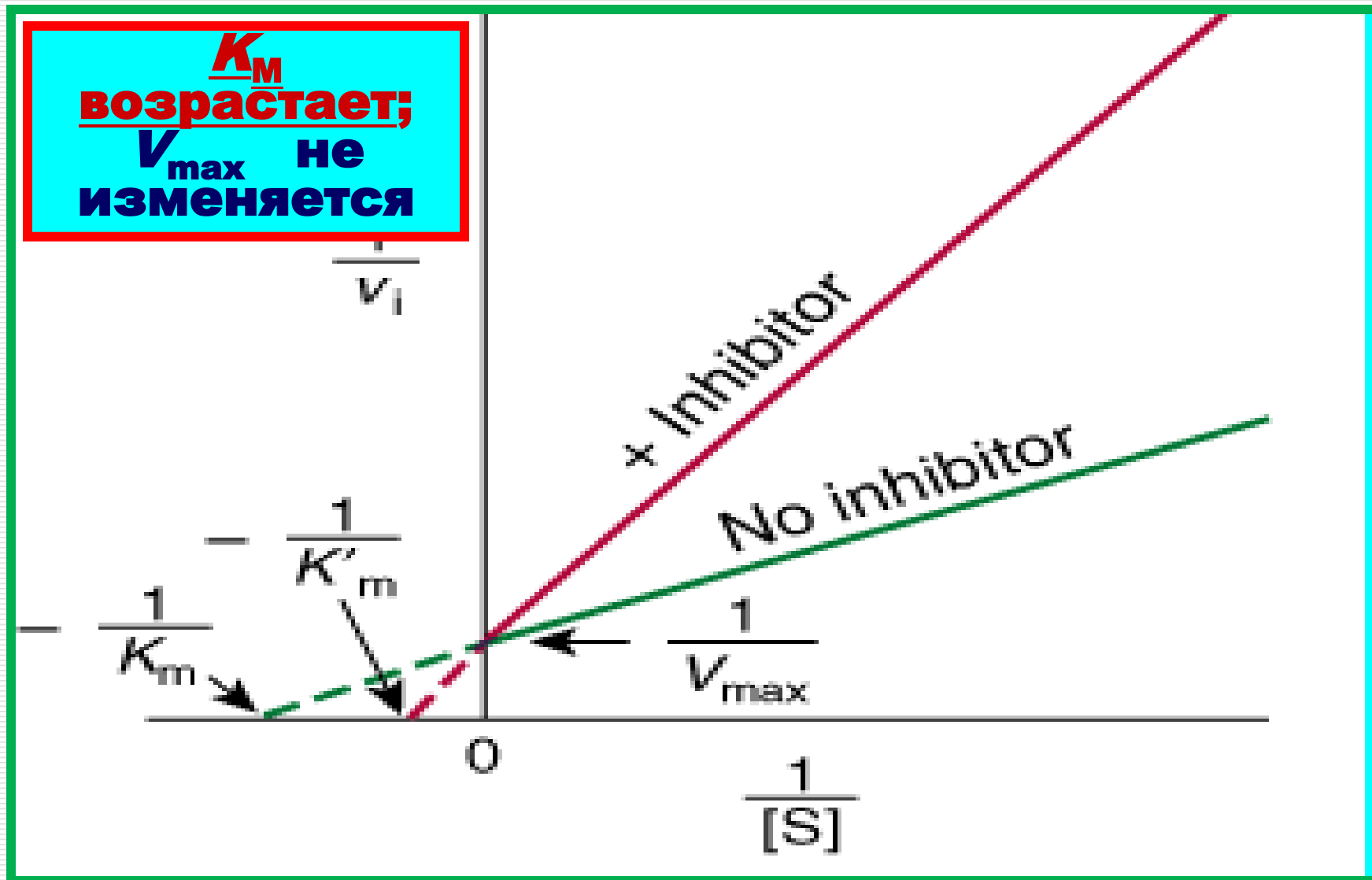


График Лайнуивера-Берка при конкурентном ингибировании



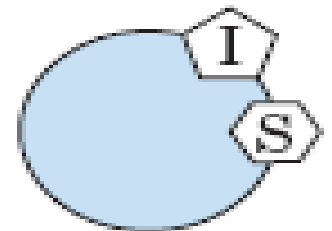
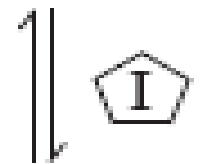
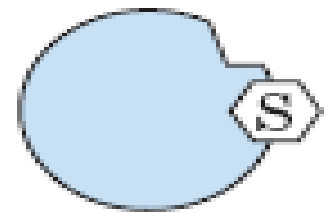
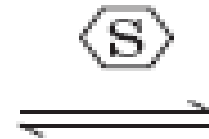
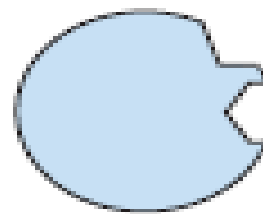
• НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ



+
I

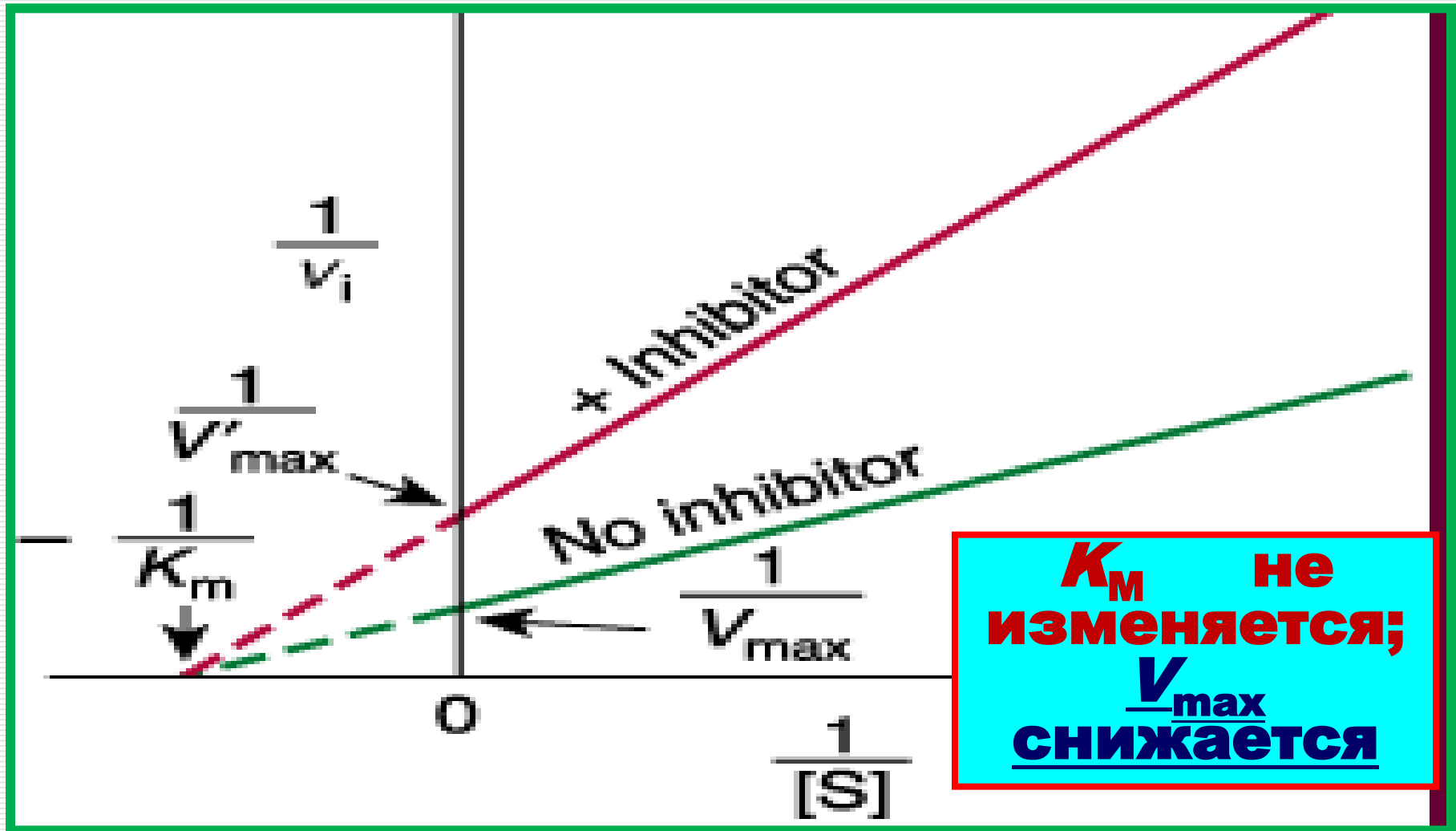


ESI

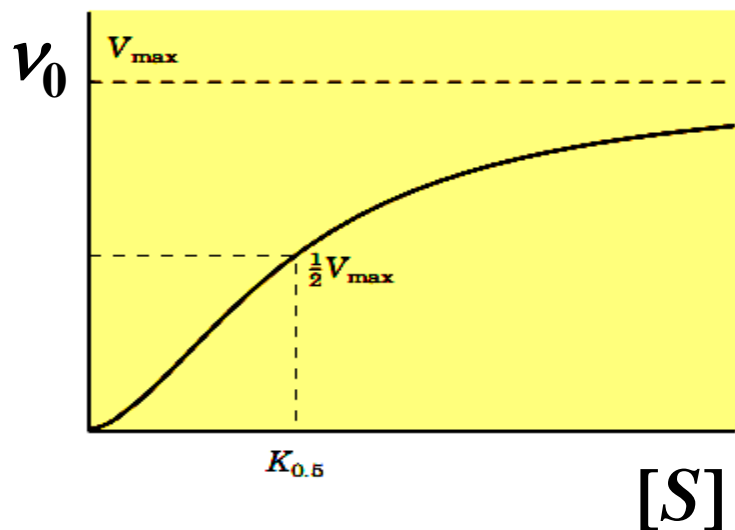


K_M не изменяется;
 V_{max} снижается

График Лайнуивера-Берка при неконкурентном ингибировании



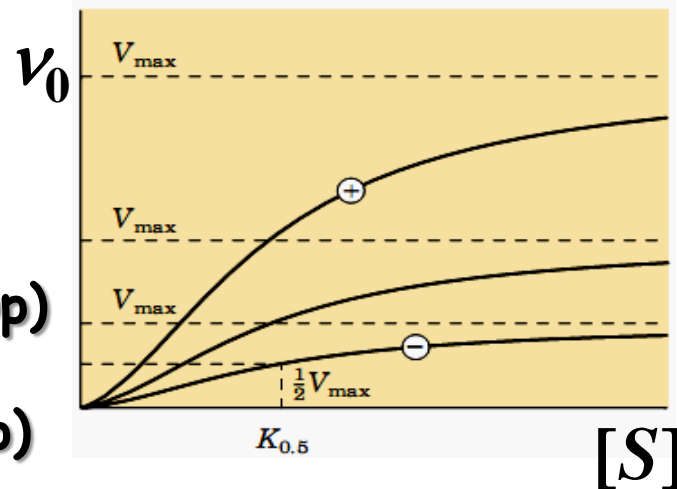
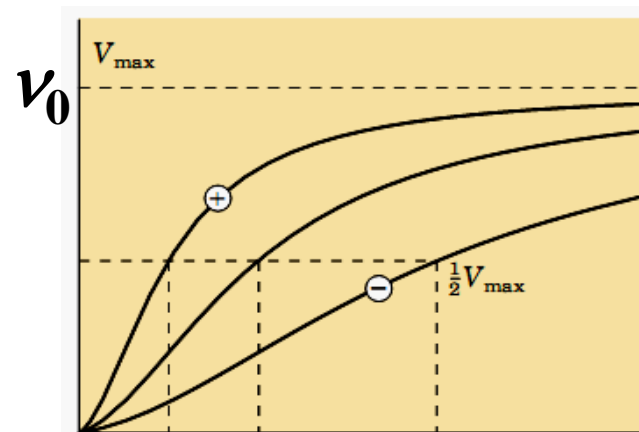
Аллостерическая регуляция - регуляция метаболических путей посредством изменения активности **аллостерических ферментов** под действием их специфических **модуляторов (эффекторов)**.



Сигмоидальная зависимость v_0 от $[S]$

+ - положительный модулятор (активатор)

- - отрицательный модулятор (ингибитор)



4. Регуляция активности ферментов: генетический контроль количества фермента; ковалентная модификация фермента; ограниченный протеолиз.

1) Обратимая ковалентная модификация - тип регуляции, при котором активность фермента изменяется в результате переноса на фермент *модифицирующей группы*.

Типы ковалентных модификаций:

- ◆ фосфорилирование (~ 30% ферментов);
- ◆ аденилирование;
- ◆ уридилирование;
- ◆ АДФ-рибозилирование;
- ◆ метилирование и др.

2) Генетический контроль - регуляция количества фермента .

Репрессия - уменьшение синтеза фермента в ответ на метаболические потребности.

Индукция - увеличение синтеза фермента в ответ на метаболические потребности.

3) Регуляция активности ферментов присоединением регуляторных белков - аденилатциклаза (присоединяется G-белок).

4) Изменение активности ферментов путем ассоциации/диссоциации протомеров - протеинкиназа А.

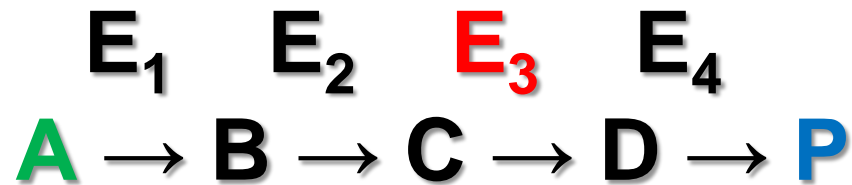
5) Регуляция активности ферментов частичным протеолизом - пепсиноген - пепсин.

5. Первичные (врожденные) и вторичные (приобретенные) энзимопатии (УСРС)

Первичные (наследственные, генетические) – характеризуются отсутствием, недостатком или дефектом структуры какого-либо фермента.

- Фенилкетонурия
- Альбинизм
- Галактоземия
- Гликогенозы

Сценарии первичных энзимопатий при нарушении синтеза фермента E_3



- 1. Нарушение образования конечного продукта P.**
Альбинизм – нарушение синтеза меланина в меланоцитах (недостаток тирозиназы).
- 2. Накопление субстратов-предшественников.**
Алкаптонурия – накапливается гомогентизиновая кислота → алкаптон (недостаток диоксигеназы).
- 3. Нарушение образования конечного продукта и накопление субстратов-предшественников.**
Болезнь Гирке (гликогеноз I) – гепатомегалия (недостаток глюкозо-6-фосфатазы).

Вторичные (приобретенные) энзимопатии - являются следствием патологических процессов, сопровождающихся нарушением активности ферментов: **панкреатит**
гепатит.

Их причинами могут быть:

- 1) недостаток** витаминов в питании;
- 2) нарушение процессов усвоения и транспорта** витаминов;
- 3) изменение сродства** кофермента к активному центру фермента.

6. Происхождение ферментов плазмы крови. Энзимодиагностика

- Собственные (секреторные)**
- Экскреторные**
- Индикаторные**

Степень повышения активности ферментов в плазме крови (ферментемии) зависит от:

- 1) массы пораженного органа;**
- 2) степени развития патологического процесса.**

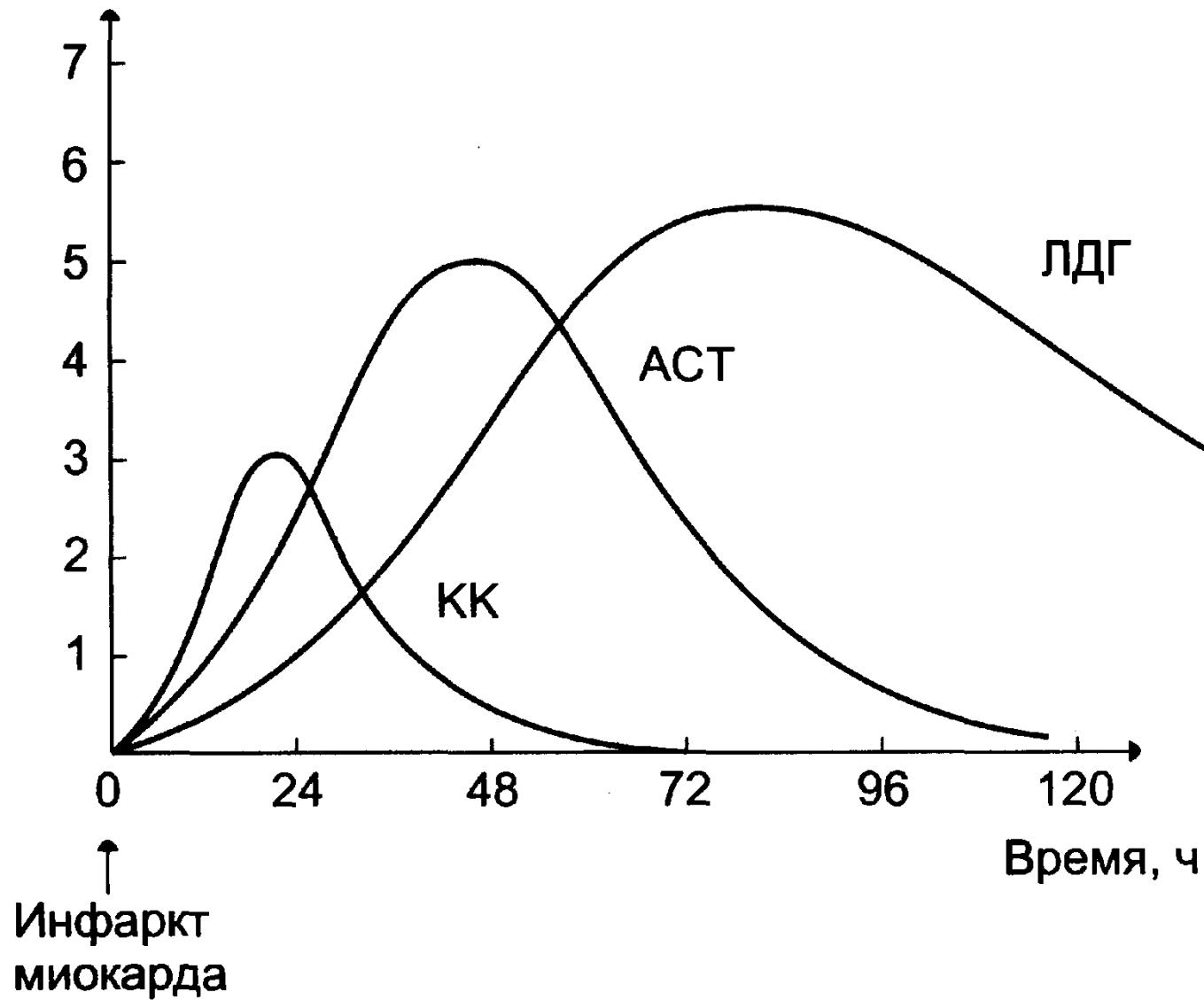




- **Собственные (секреторные)** ферменты плазмы крови синтезируются в печени и поступают в кровь:
 - протромбин,
 - проакцелерин.
- **Экскреторные** ферменты попадают в кровь из поврежденных протоков желез:
 - амилаза,
 - липаза
- **Индикаторные** (клеточные) ферменты поступают в кровь после повреждения органов.

Энзимодиагностика

Фермент в крови	Орган с патологией
ЛДГ₁, ЛДГ₂	Миокард
ЛДГ₃	Легкие
ЛДГ₄, ЛДГ₅	Печень, мышцы
Амилаза	Поджелудочная железа
Липаза	Поджелудочная железа
АлАТ	Печень
АсАТ	Миокард
Кислая фосфатаза	Предстательная железа
Щелочная фосфатаза	Кости



7. Применение ферментов в медицине как лекарственных препаратов (энзимотерапия), или как аналитических реагентов

Ферменты в лечебных целях могут при-

меняться по нескольким направлениям:

- **1.** Заместительная терапия (**мезим, фестал**).

- **2.** Комплексная терапия:

- - лечение гнойно-некротических и рубцовых процессов (**химотрипсин, лидаза** (гиалуронидаза));

- - тромболитическая терапия (**фибринолизин, урокиназа**);

- - противоопухолевые препараты (**аспарагиназа**);

- - противомикробные препараты (**ДНКаза**).



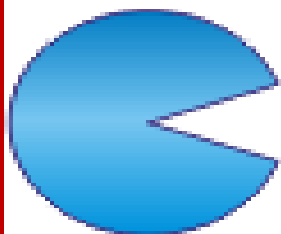
Лекарственные препараты – ингибиторы ферментов

Лекарственные препараты могут выступать в роли ингибиторов ферментов:

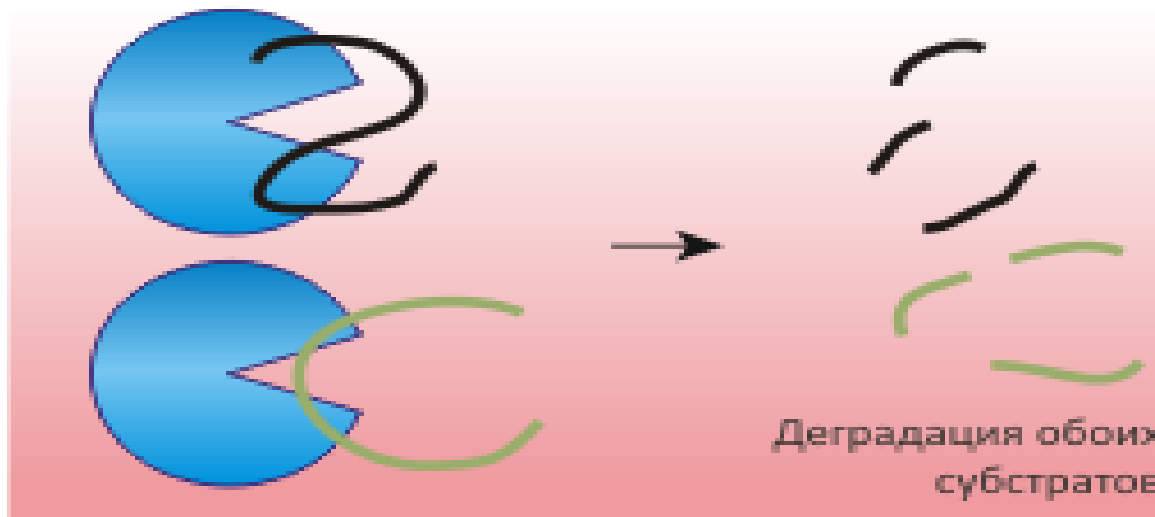
- **1) сульфаниламидные антибиотики** (*стрептоцид*);
- **2) антихолинэстеразные препараты** (*прозерин, фосфоорганические соединения*);
- **3) ингибиторы протеаз** (*контрикал, гордокс*);
- **4) ингибиторы моноаминооксидазы** (*антидепрессанты*);
- **5) ингибиторы ксантинооксидазы** (*аллопуринол*);
- **6) ингибиторы алкогольдегидрогеназы** (*тетурам*);
- **7) коферментные ингибиторы** (*антивитамины*).



Протеаза



→
Без
ингибитора



Субстрат 1



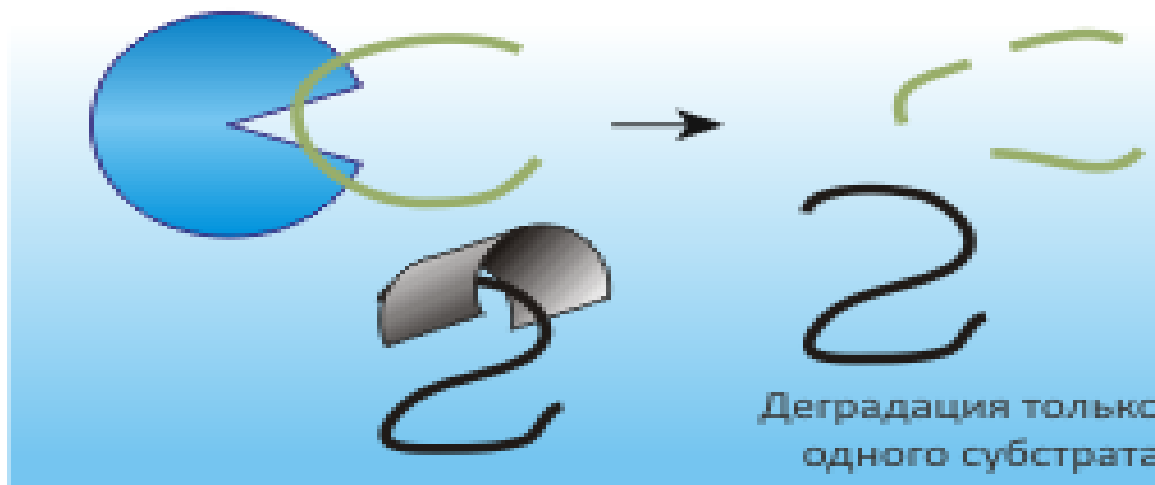
→
Ингибитор
протеазы



Субстрат 2



→
Маскировка
субстрата



Использование ферментов в качестве аналитических реагентов

Глюкозооксидаза	Определение концентрации глюкозы в крови
Холестерол-оксидаза	Определение холестерина в крови
Липаза	Определение триацилглицеролов в крови
Уреаза	Определение мочевины в крови

Рибозимы

Рибозимы – молекулы РНК, обладающие каталитической активностью (РНК-ферменты)

рибозимы

малые
(< 200 нуклеотидов)

у вируса гепатита D
сателлитной РНК
Варкуда

репликация вирусов

большие
(> 200 нуклеотидов)

интроны группы I
интроны группы II

автосплайсинг
РНК в органеллах

рибонуклеаза Р

Созревание тРНК

рибосомальная 28SРНК

синтез полипептидной цепи



**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ**

