

Запорізький державний медичний університет



Кафедра клінічної лабораторної діагностики

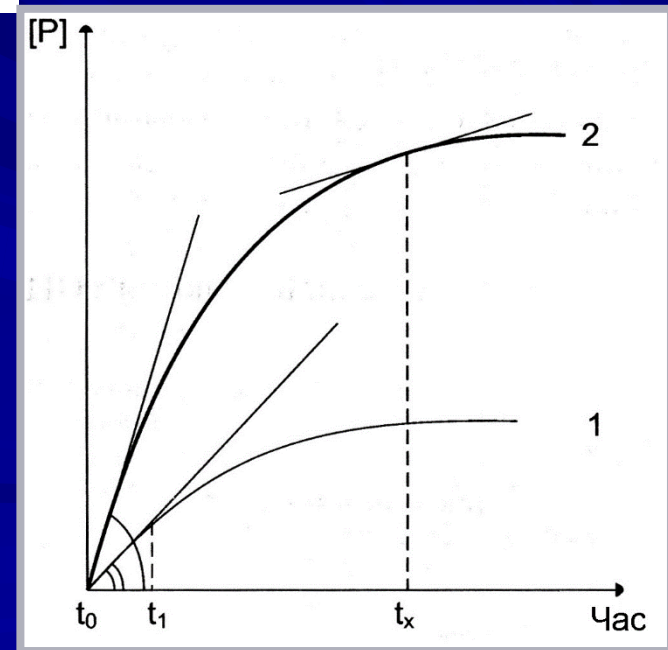
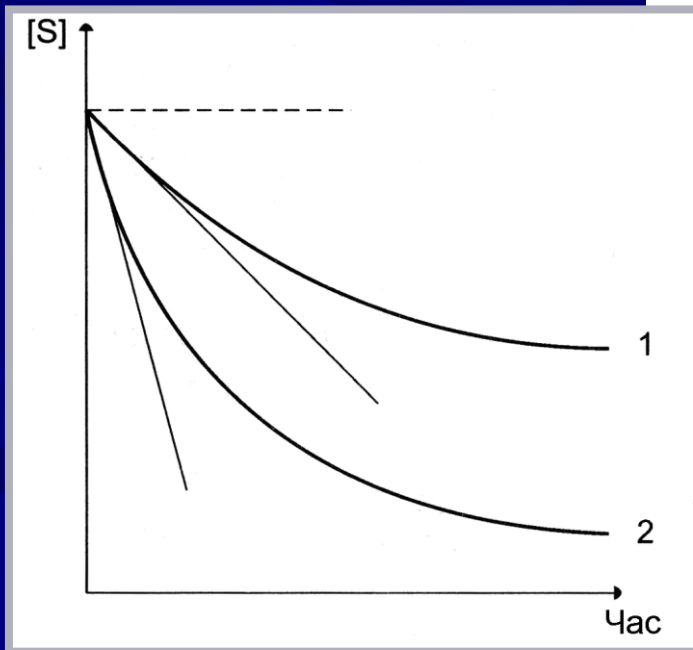
**Кінетика ферментативних реакцій.
Регуляція активності ферментів,
конкурентні та неконкурентні інгібітори.**

к.фарм.н. Євсєва Людмила Володимирівна

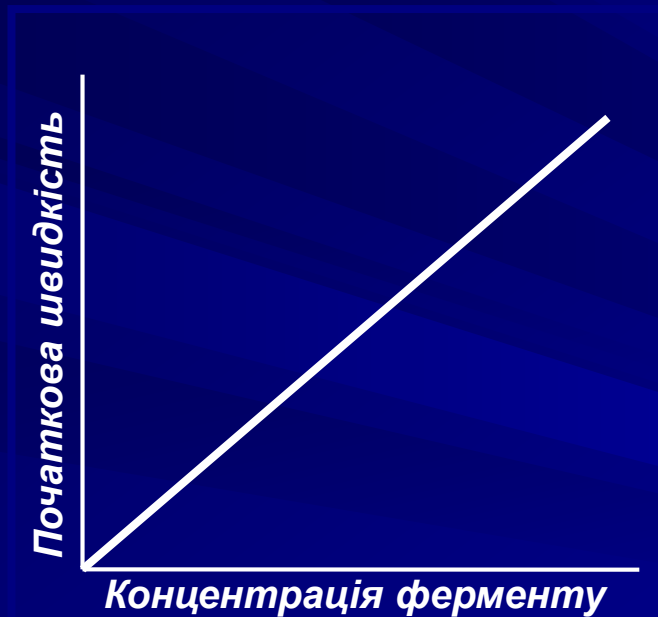
ОСНОВИ КІНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ

Швидкість ферментативної реакції виражається у зміні концентрації субстрату (зменшення) або продукту (збільшення) за одиницю часу:

$$V = \frac{d[S]}{t} = \frac{d[P]}{t}$$



Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації ферментів



Величини, які характеризують активність ферменту:

$$1 \text{ МО} = \frac{1 \text{ мкмоль перетвореного субстрату}}{1 \text{ хв}}$$

$$n \text{ МО} = \frac{\text{кількість перетвореного субстрату (мкмоль)}}{\text{час (хв)}}$$

$$n \text{ катал} = \frac{\text{кількість перетвореного субстрату (моль)}}{\text{час (с)}}$$

$$\text{ПА} = \frac{\text{кількість перетвореного субстрату (мкмоль)}}{\text{час (хв)} \times \text{кількість білка (мг)}}$$

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль субстрату} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ моль субстрату} \cdot \text{хв}^{-1} = 60 \times 10^{-6} \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} = 6 \times 10^{-7} \text{ МО}$$

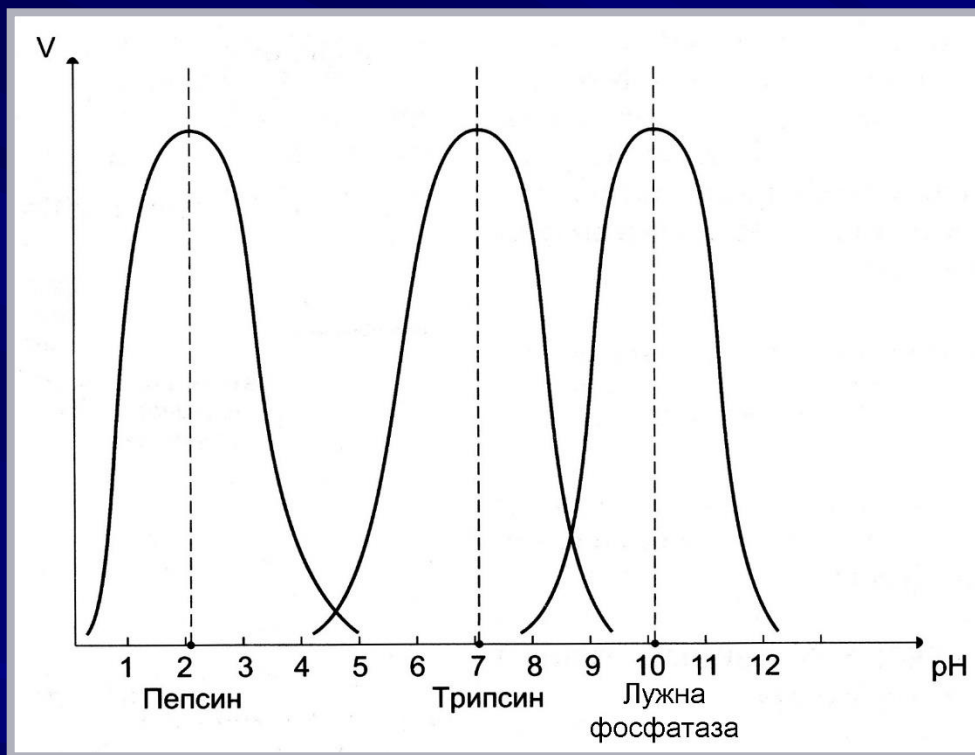
$$1 \text{ МО} = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} = 1/60 \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} = 1/60 \text{ мкат} = 16,67 \text{ нкат}$$

Залежність швидкості ферментативної реакції від температури середовища



Швидкість хімічної реакції, що каталізується ферментами, має свій температурний оптимум, перевищення якого супроводжується зниженням ферментативної активності, що виникає через термічну денатурацію білкової молекули

Залежність швидкості ферментативної реакції від рН середовища



Оптимальні значення рН для деяких ферментів

Фермент	рН
Піруваткарбоксіназа	4,8
Фумараза	6,5
Каталаза	6,8 – 7,0
Уреаза	6,8 – 7,2
Карбоксипептидаза	7,5

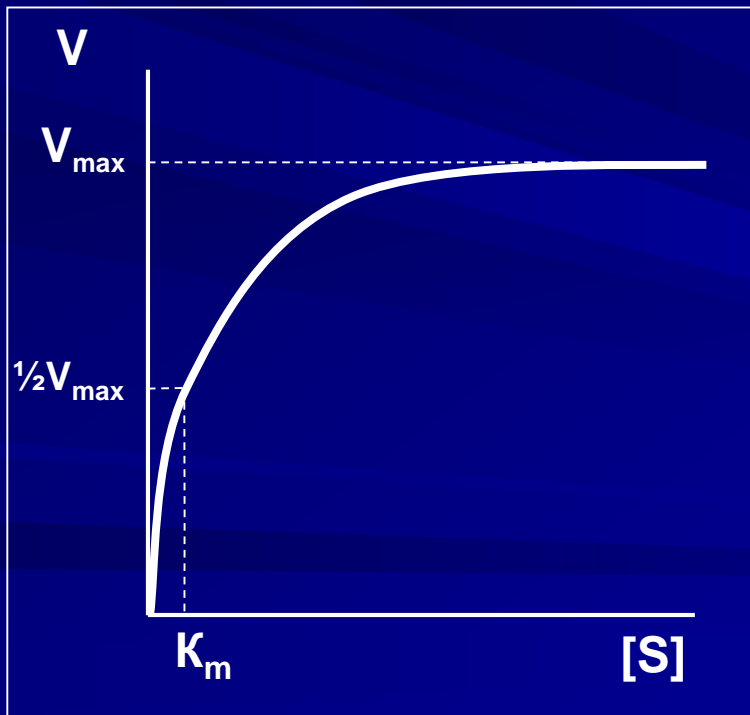
Залежність швидкості ферментативної реакції від кількості субстрату

Кінетика ферментативних реакцій визначається утворенням фермент-субстратного комплексу:



$$K_m = \frac{k_1 + k_2}{k_{-1}}$$

K_m – константа Міхаеліса

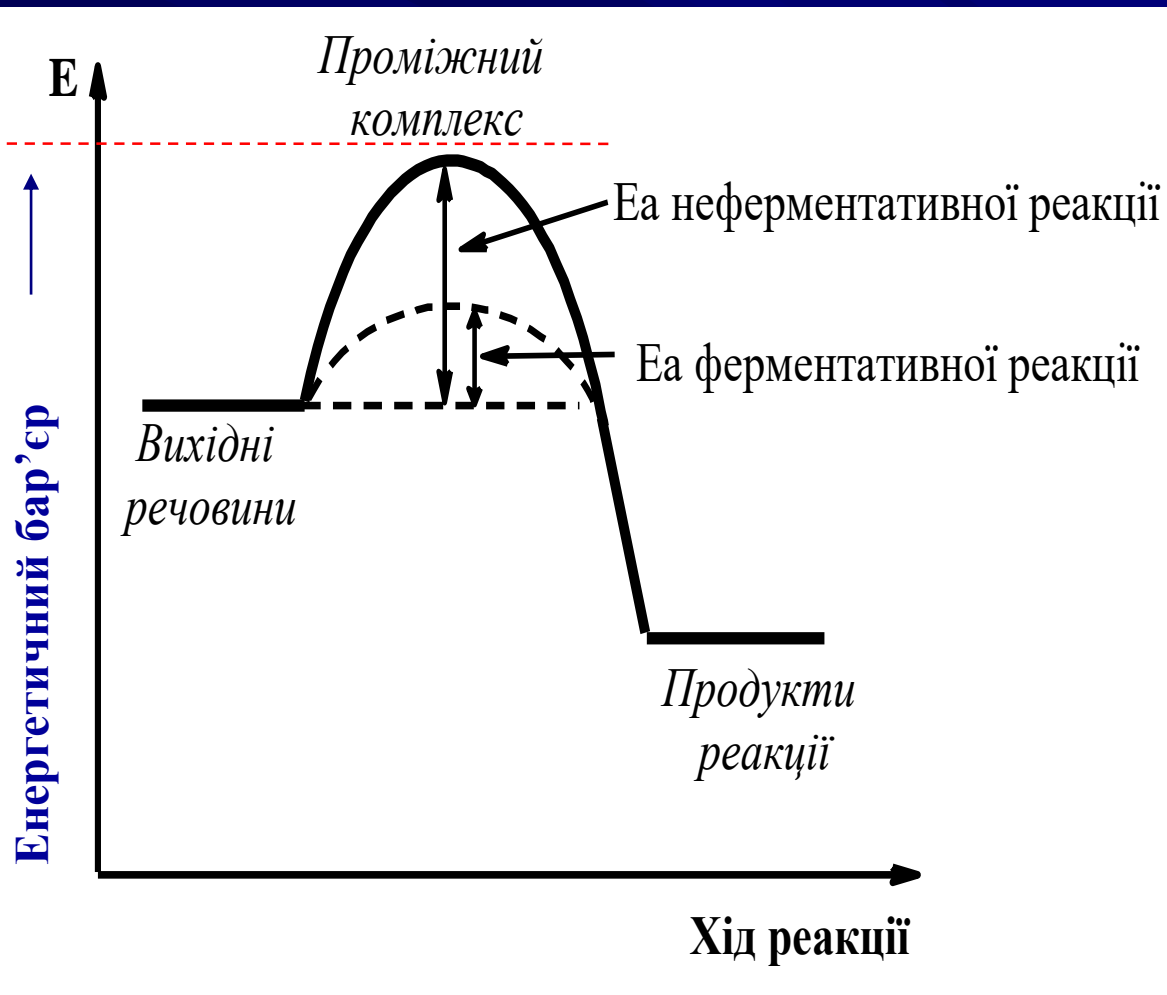


Рівняння Міхаеліса-Ментен

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

Енергетика ферментативних реакцій

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

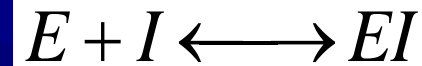
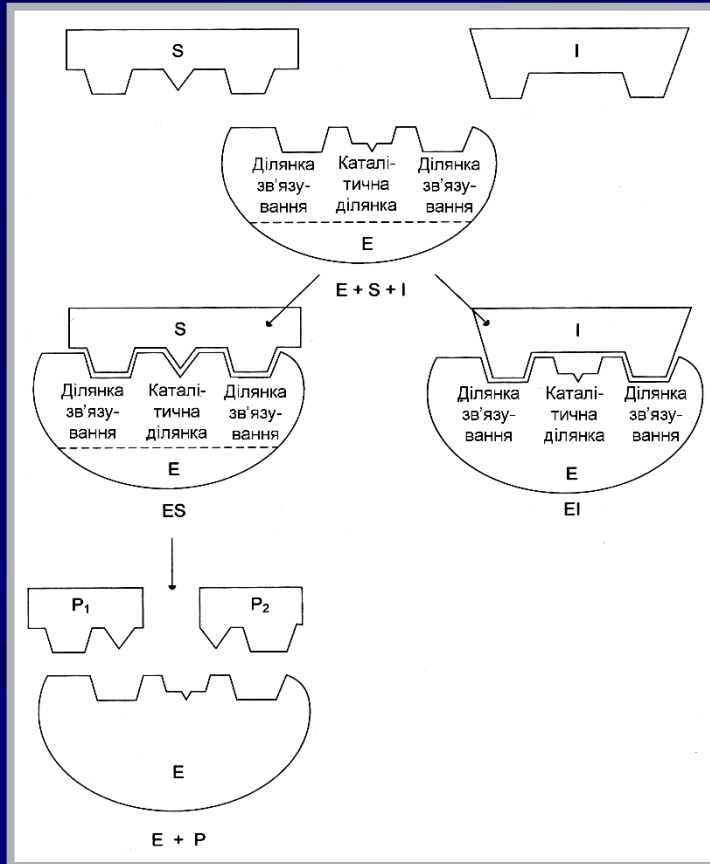


**!!! Ферменти
знижують
 E_a за
рахунок
утворення
 ES**

ІНГІБУВАННЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ

Зворотне інгібування

А. Конкурентне інгібування



Конкурентні інгібітори зменшують швидкість хімічної реакції та підвищують K_m для даного субстрату (зменшують спорідненість субстрату до ферменту). Тобто в присутності конкурентного інгібітора необхідна велика концентрація субстрату для досягнення $1/2V_{max}$

Конкурентні інгібітори:

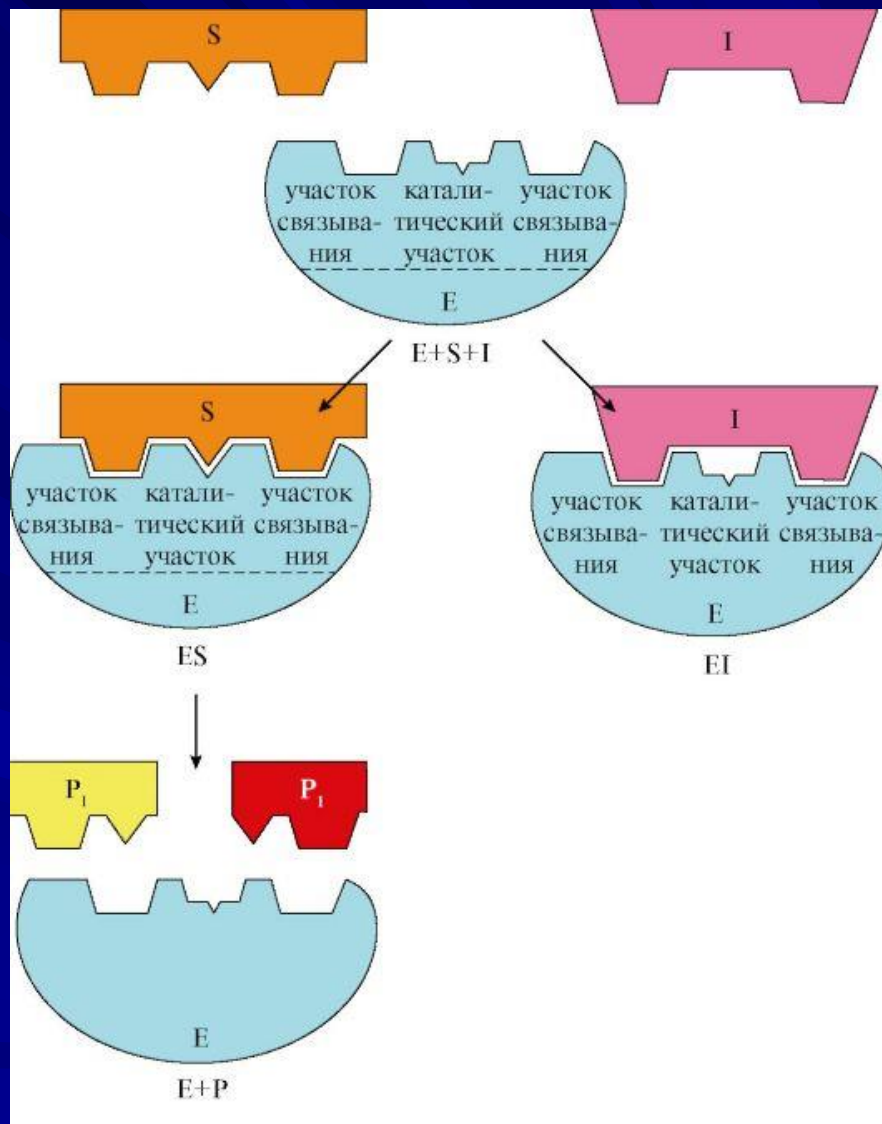
😊 структурно схожі на S

😊 взаємодіють з контактною ділянкою активного центру

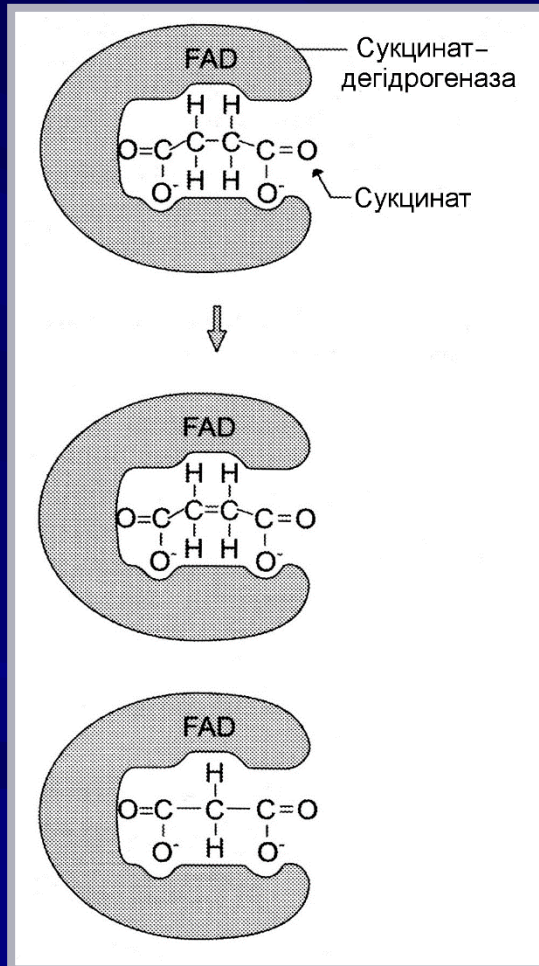
😊 діють за високих концентрацій ($I > S$)

😊 $\uparrow K_m$

😊 інгібування завжди оборотне!!!



Інгібування сукцинатдегідрогеназної реакції малоновою КИСЛОТОЮ



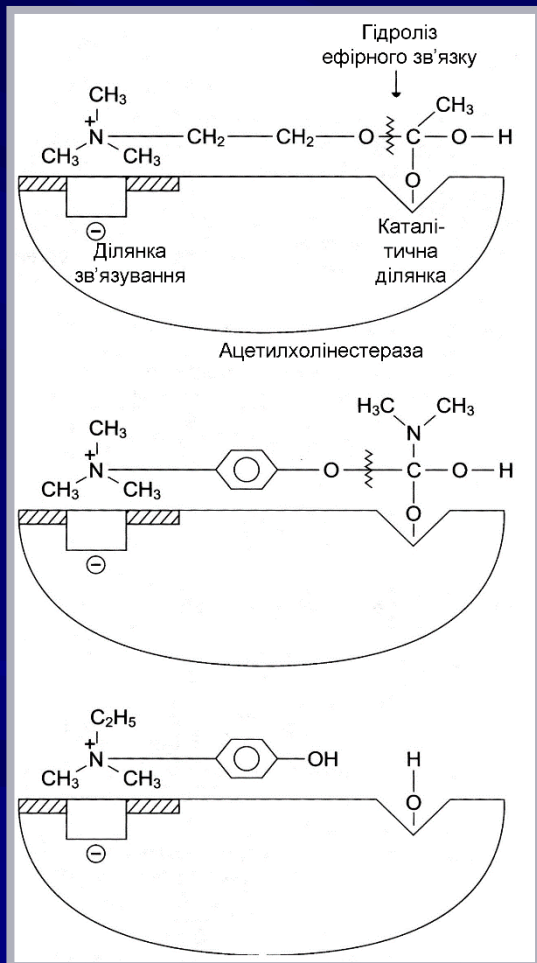
Сукцинат зв'язується з активним центром ферменту сукцинатдегідрогенази

Під час ферментативної реакції відбувається відщеплення двох атомів водню від сукцинату та приєднання їх до коферменту FAD. У результаті утворюється фумарат, який звільняється з активного центру сукцинатдегідрогенази

Малонова кислота – структурний аналог сукцинату, вона також зв'язується з активним центром сукцинатдегідрогенази. При цьому хімічної реакції не відбувається

Лікарські препарати як конкурентні інгібітори

Схема активного центру ацетилхолінестерази



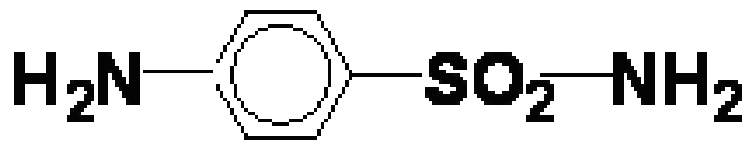
Приєднання ацетилхоліну в активному центрі ферменту. Стрілкою вказане місце гідролізу ефірного зв'язку в молекулі ацетилхоліну

Приєднання конкурентного інгібітора прозерину в активному центрі ферменту. Вказане місце гідролізу прозерину, але реакція йде набагато повільніше, ніж з ацетилхоліном

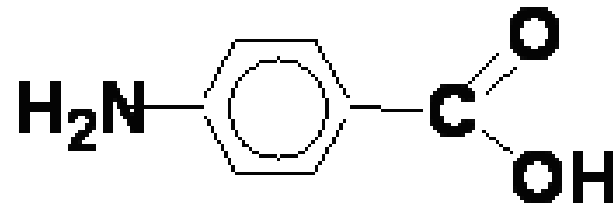
Приєднання конкурентного інгібітора ендорфонію до активного центру ферменту. Ендорфоній зв'язується в активному центрі ацетилхолінестерази, перешкоджаючи приєднанню ацетилхоліну

Конкурентні інгібітори в медицині:

- ❖ сульфаніаміди - аналоги ПАБК (антимікробні)
- ❖ метотрексат – аналог віт.В₉, блокує синтез ДНК
- ❖ дикумарини – аналоги віт.К, блокують синтез протромбіну (антизгортальні)
- ❖ прозерин - інгібітор ацетилхолінестерази



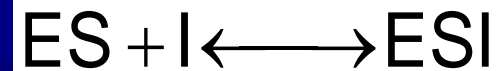
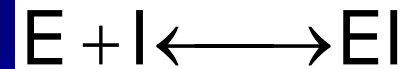
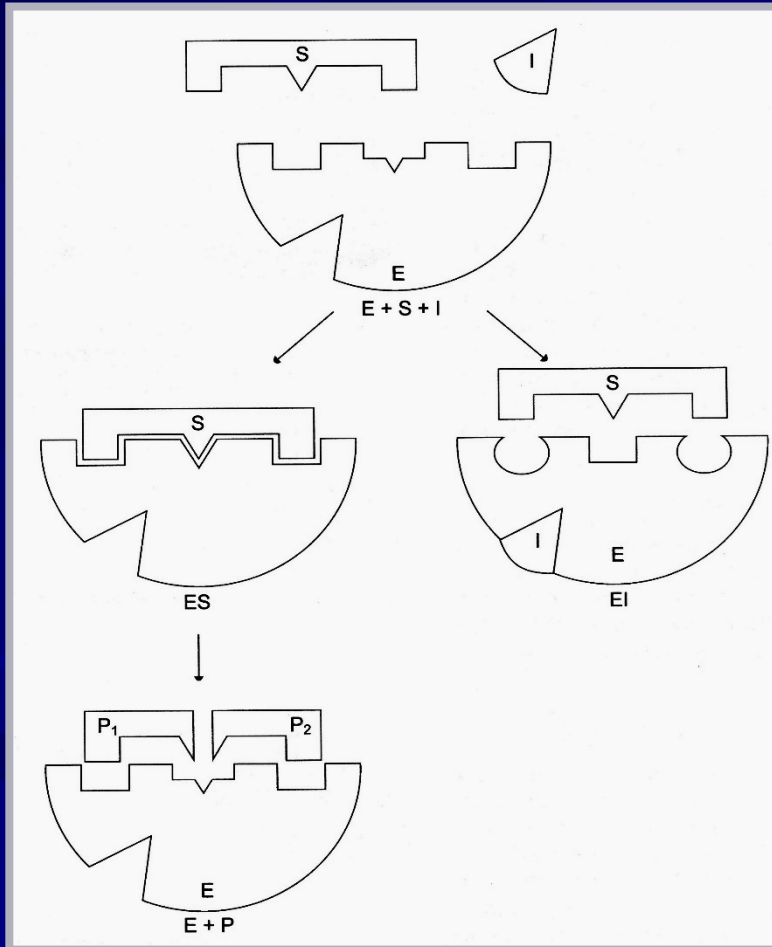
Стрептоцид



ПАБК

Зворотне інгібування

Б. Неконкурентне інгібування

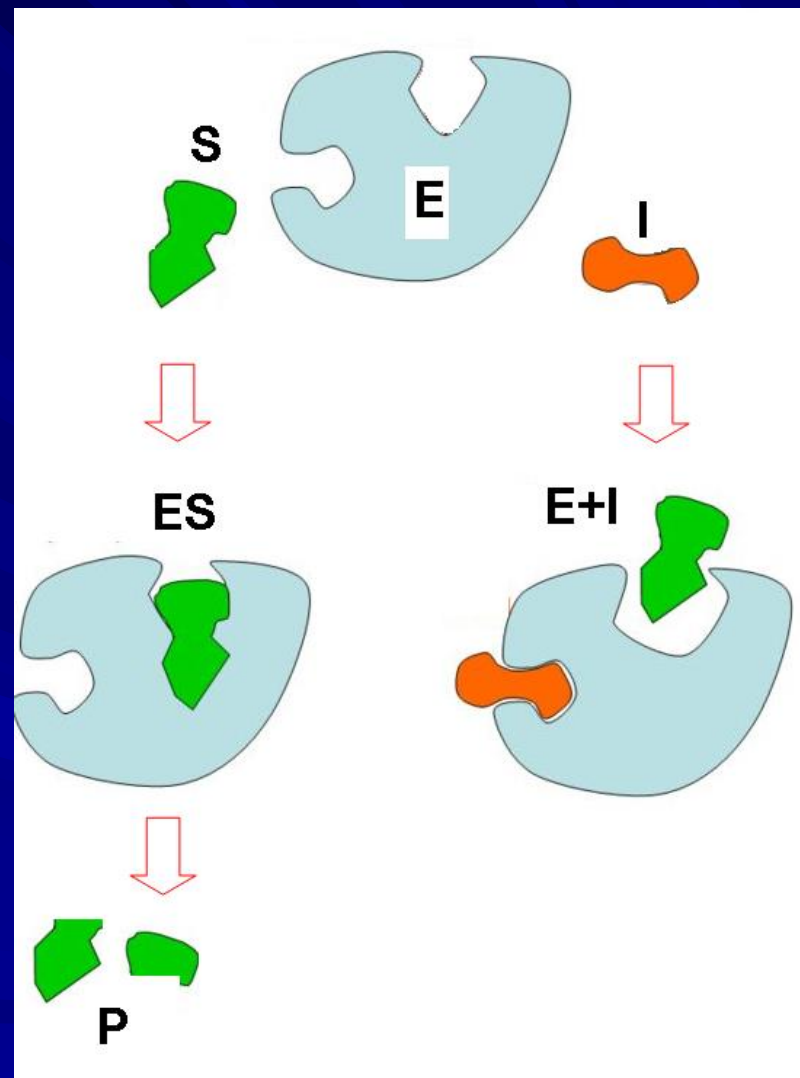


Неконкурентні інгібітори не є структурними аналогами субстратів. Вони можуть зв'язуватися або з ферментом, або з фермент-субстратним комплексом, утворюючи неактивний комплекс. Приєднання неконкурентного інгібітора викликає зміну конформації молекули таким чином, що порушується взаємодія субстрату з активним центром ферменту

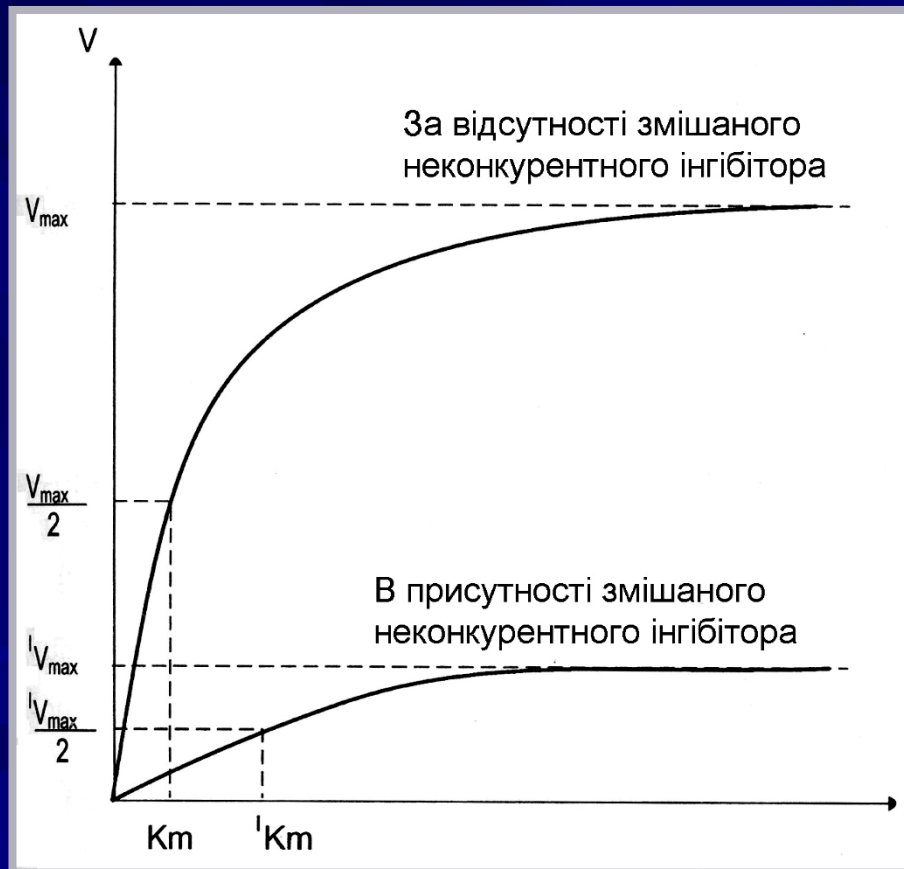
Неконкурентні інгібітори:

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

Часто є клітинними отрутами !!!



Вплив неконкурентного інгібітора на швидкість ферментативної реакції в залежності від концентрації субстрату



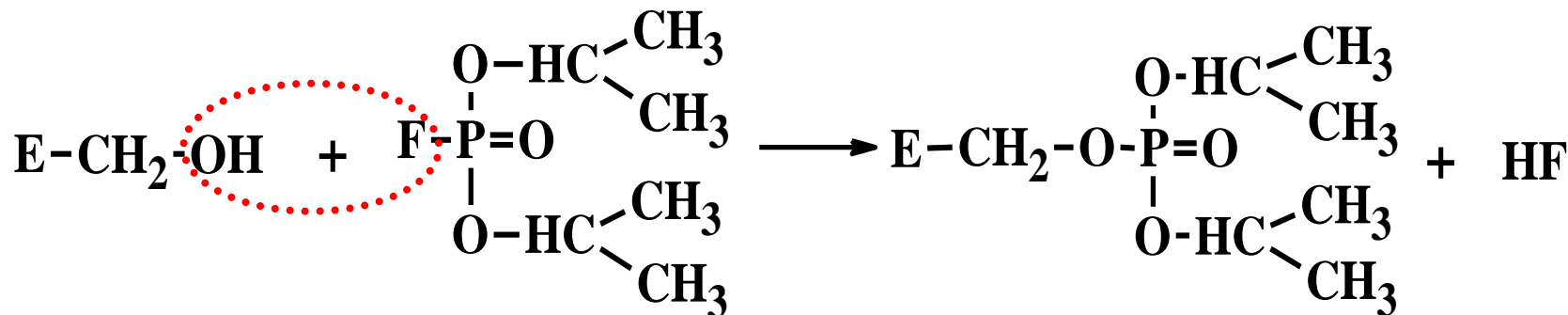
Неконкурентне інгібування характеризується зниженням V_{\max} ферментативної реакції та зменшенням спорідненості субстрату до ферменту, тобто збільшенням K_m .

Неконкурентні інгібітори:

➤ ФОС (отрути) – інгібітори ацетилхолінестерази

➤ тетурам – інгібітор ацетальдегід-дегідрогенази

➤ аспірин – інгібітор ЦОГ



Ацетилхолінестераза

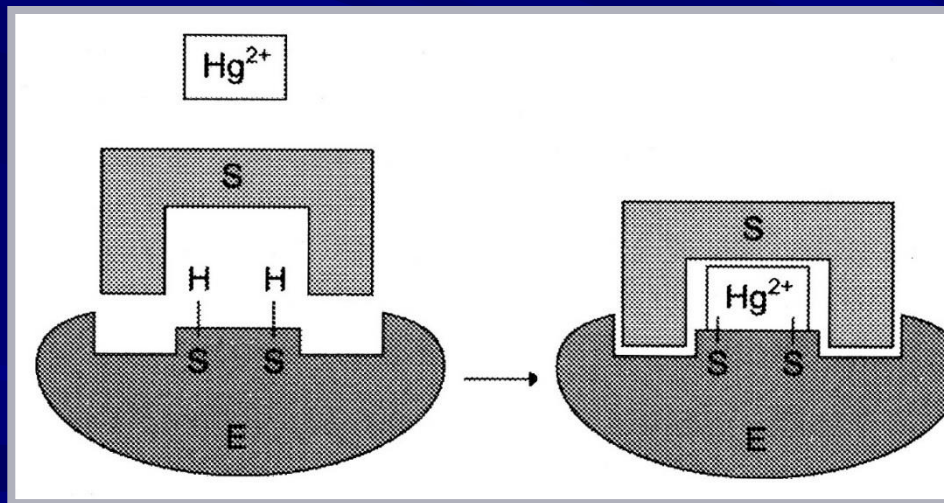
Диізопропілфторфосфат

Комплекс фермент-інгібітор

ІНГІБУВАННЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ

Незворотне інгібування

НЕЗВОРОТНЕ ІНГІБУВАННЯ спостерігають у випадку утворення ковалентних стабільних зв'язків між молекулою інгібітора та ферменту.

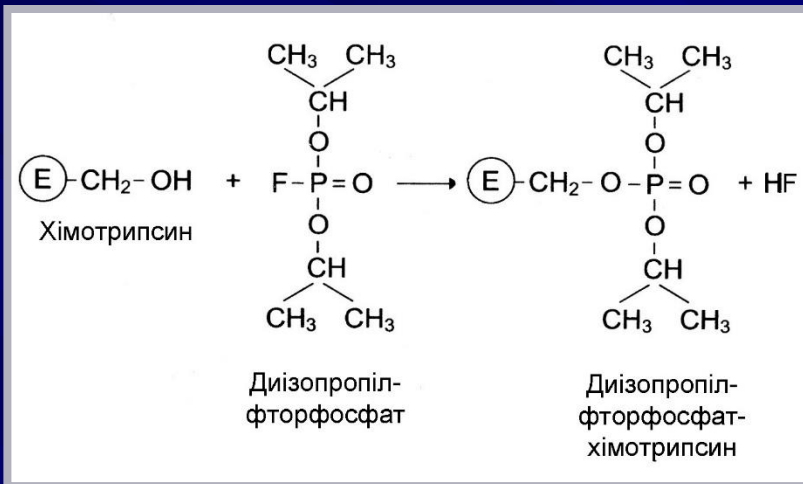


Механізм дії іонів ртуті як необоротного інгібітора

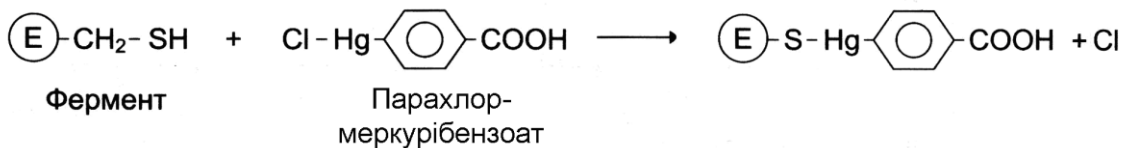
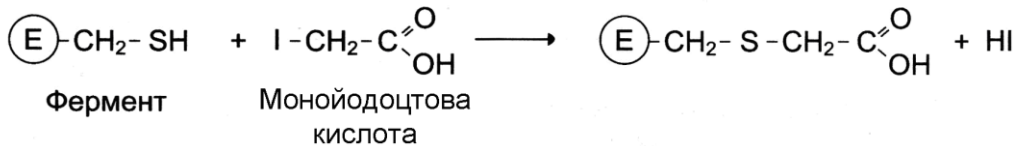
Іони ртуті в малих концентраціях блокують сульфгідрильні групи активного центру, що призводить до зниження швидкості фермента-тивної реакції

НЕЗВОРОТНЕ ІНГІБУВАННЯ

Специфічні та неспецифічні інгібітори



Диізопропілфторфосфат належить до *специфічних* незворотних інгібіторів, оскільки він утворює ковалентний зв'язок із гідроксильною групою серину, який знаходиться в активному центрі та відіграє ключову роль у процесі каталізу.



Моноіодоцтова кислота та парахлормеркурібензоат – *не-специфічні* інгібітори, оскільки вони реагують з будь-якими вільними SH-групами білків.

РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

МЕТАБОЛІЗМ – сукупність усіх метаболічних шляхів, що відбуваються в клітинах організму.

МЕТАБОЛІЧНІ ШЛЯХИ – послідовні перетворення одних сполук в інші.

КАТАБОЛІЗМ – розклад складних речовин до простих з вивільненням енергії.

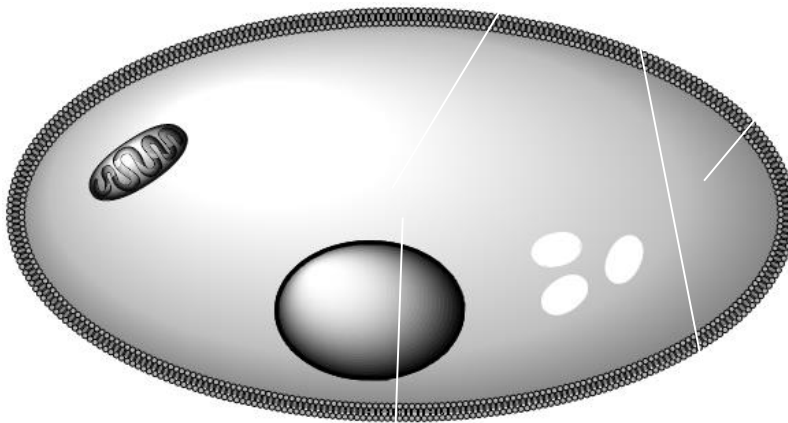
АНАБОЛІЗМ – синтез із простих речовин більш складних.

СТРУКТУРА МЕТАБОЛІЧНИХ ШЛЯХІВ

Типи метаболічних шляхів

Схема	Назва	Приклад
	<i>лінійний</i>	гліколіз
	<i>розгалужений</i>	синтез нуклеотидів
	<i>циклічний</i>	ЦТК синтез сечовини
	<i>спіральний</i>	β -окислення жирних кислот

Внутрішньоклітинна локалізація ферментів



ЯДРО
синтез ДНК і РНК

МІТОХОНДРІЯ

- окисне декарбоксилювання пірувату;
- ЦТК;
- окислення жирних кислот

ЦИТОПЛАЗМА

- гліколіз;
- глюконеогенез;
- синтез білка;
- синтез жирних кислот;
- синтез холестерину

ЛІЗОСОМИ

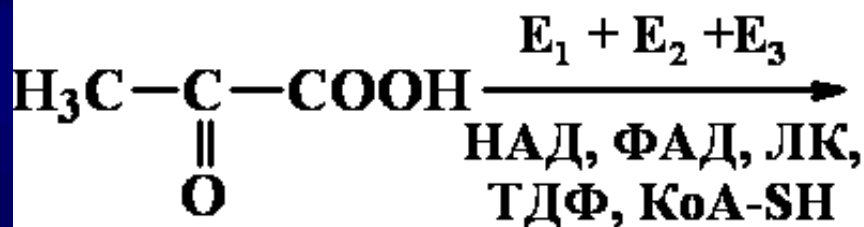
деградація комплексів
макромолекул

Піруватдегідрогеназний комплекс (ПДГ):

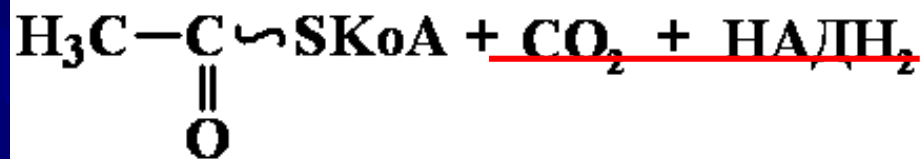
3 ферменти +

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

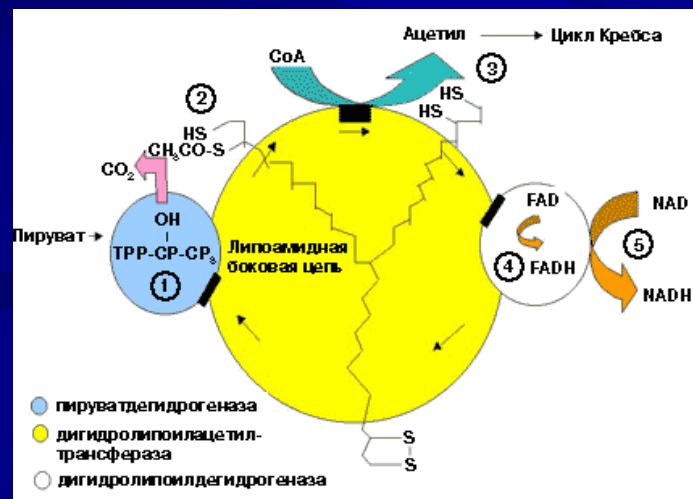
Р-ція окисного декарбоксилювання пірувату:



Піруват



Ацетил-КоА



Регуляція швидкості ферм. р-цій

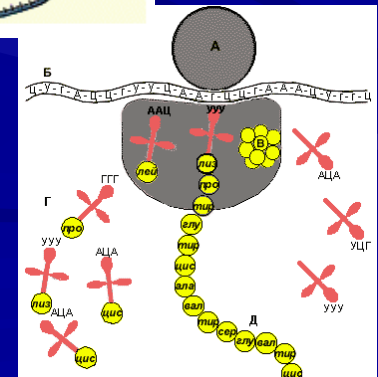
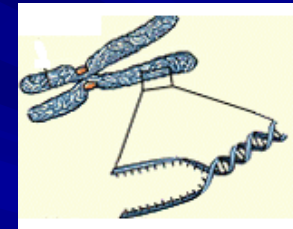
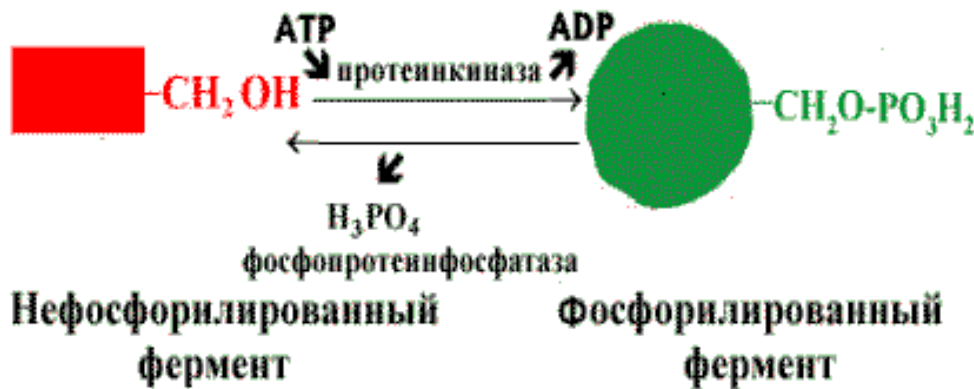
Зміна активності існуючих молекул ферменту - швидка (сек, хв)

Ковалентна модифікація

- Фосфорилування / дефосфорилування (глікогенфосфорилаза, глікогенсинтетаза)
- Обмежений протеоліз (пепсиноген \rightarrow пепсин)

Зміна кількості молекул ферменту – повільна (години, дні)

синтез ферменту – регуляція через геном (дія гормонів)



ПРИНЦИПИ РЕГУЛЯЦІЇ МЕТАБОЛІЧНИХ ШЛЯХІВ

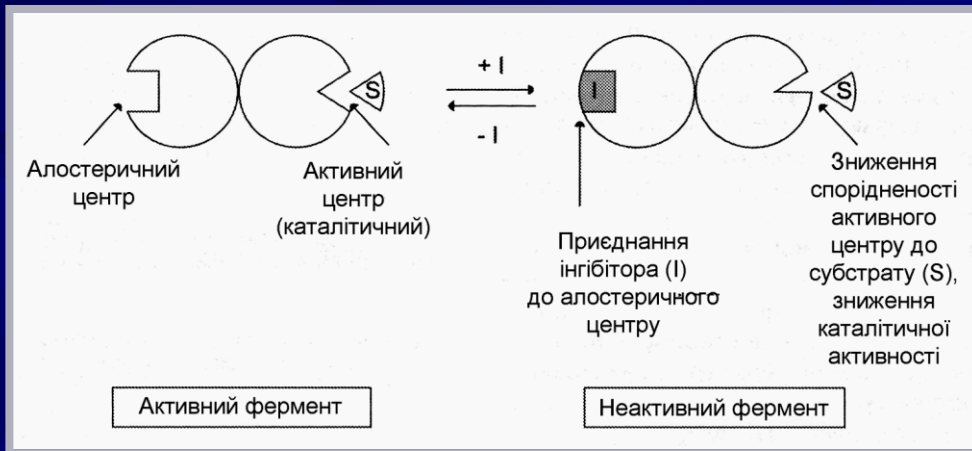
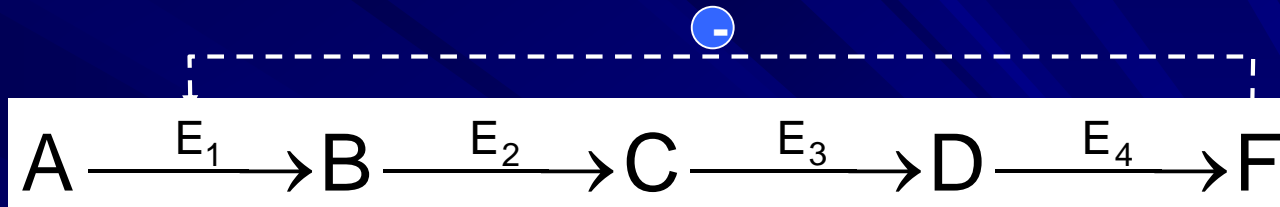
Регуляція швидкості ферментативних реакцій здійснюється на трьох незалежних рівнях:

- зміна кількості молекул ферменту;**
- доступність молекул субстрату та коферменту;**
- зміна каталітичної активності молекули ферменту**

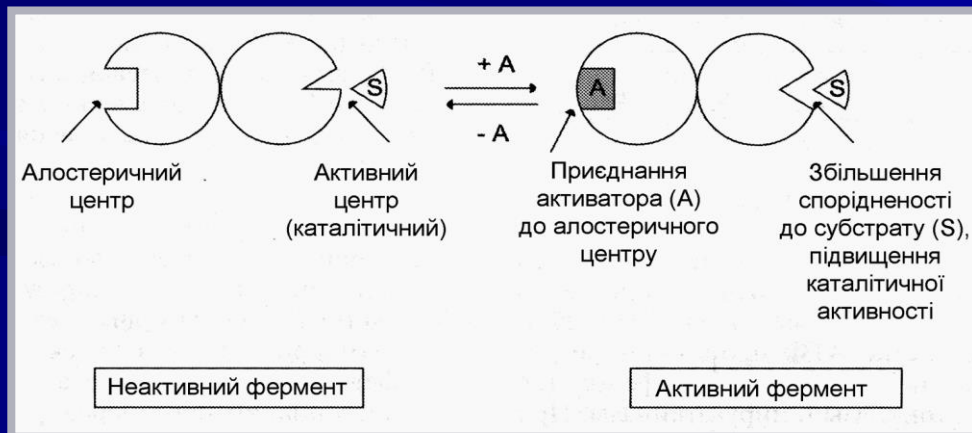
ОСНОВНІ СПОСОБИ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

- алостерична регуляція;
- регуляція за допомогою білок-білкових взаємодій;
- регуляція шляхом фосфорилування – дефосфорилування молекули ферменту;
- регуляція частковим (обмеженим) протеолізом

АЛОСТЕРИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ

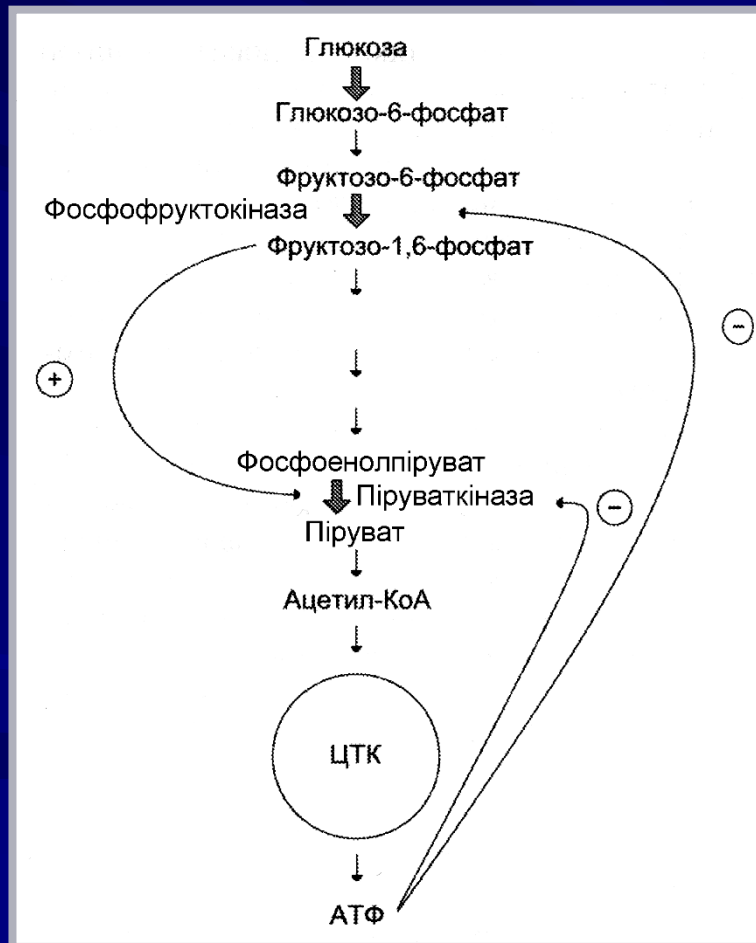
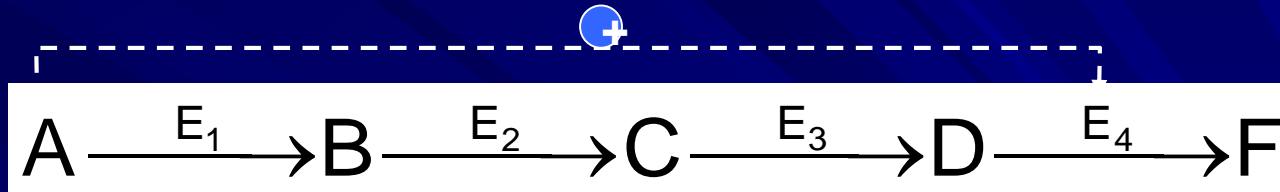


Дія негативного ефектора (інгібітора)



Дія позитивного ефектора (активатора)

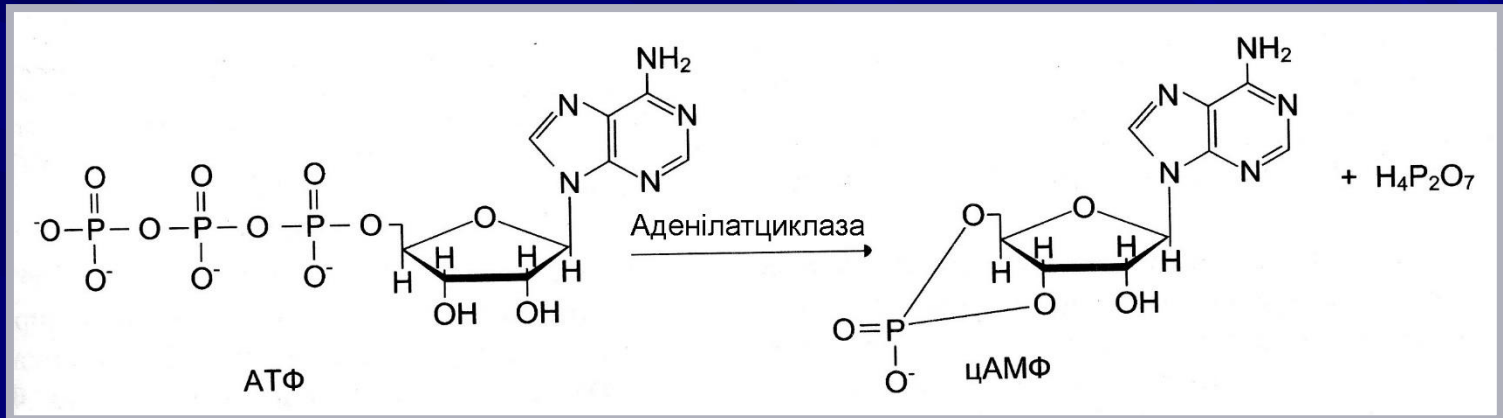
АЛОСТЕРИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ



Молекула АТФ приймає участь у ретроінгібуванні алостеричних ферментів фосфофруктокінази та піруват-кінази. Фруктозо-1,6-біфосфат – акти-ватор метаболічного шляху розпаду ГЛЮКОЗИ.

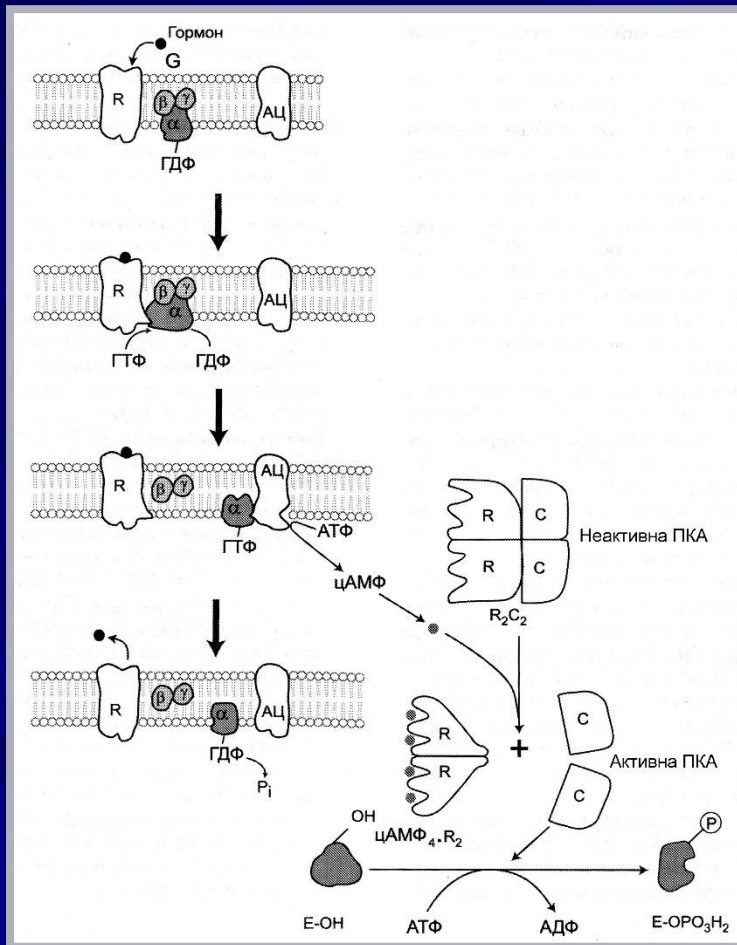
РЕГУЛЯЦІЯ ЗА ДОПОМОГОЮ БІЛОК-БІЛКОВИХ ВЗАЄМОДІЙ

1. Активація ферментів у результаті приєднання регуляторних білків



Активний центр аденілатциклази локалізований на цитоплазматичній стороні плазматичної мембрани. Активована аденілатциклаза каталізує реакцію утворення з АТФ циклічного 3',5'-АМФ (цАМФ) – вторинного, внутрішньоклітинного посередника дії гормонів.

2. Зміна каталітичної активності внаслідок асоціації або дисоціації протомерів ферменту

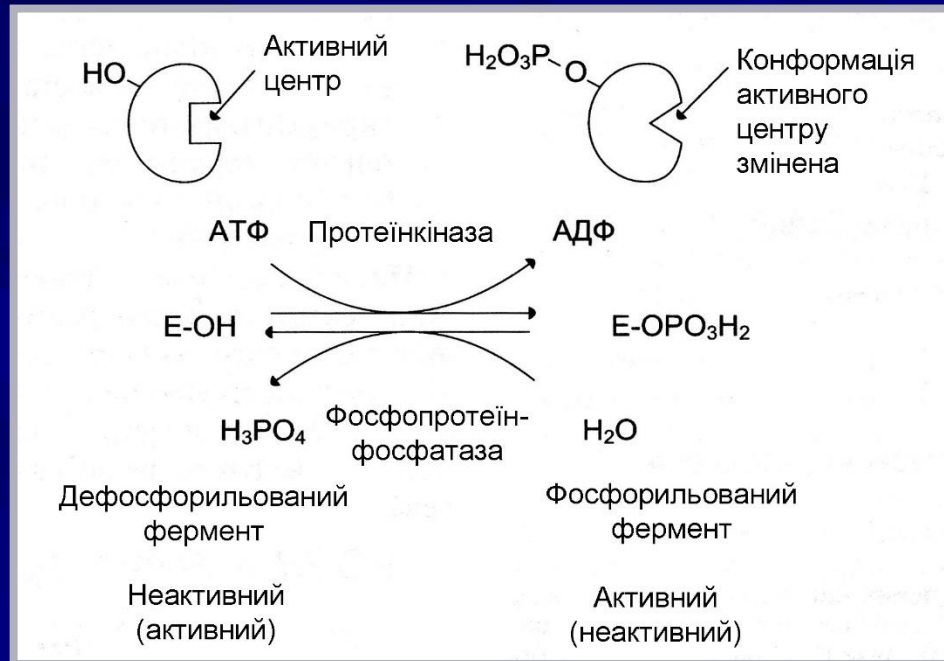


Регуляція активності аденілатциклази:

Гормон взаємодіючи з рецептором (R) на поверхні клітини, призводить до зменшення спорідненості ГТФ-зв'язуючого білка (G-білка, що складається з протомерів α , β , γ) до ГДФ і збільшення спорідненості до ГТФ. Приєднання молекули ГТФ до активного центру G-білка викликає дисоціацію комплексу на субодиниці α -ГТФ і димер $\beta\gamma$. Комплекс α -ГТФ активує аденілатциклазу, що сприяє синтезу із АТФ внутрішньоклітинних регуляторних молекул цАМФ.

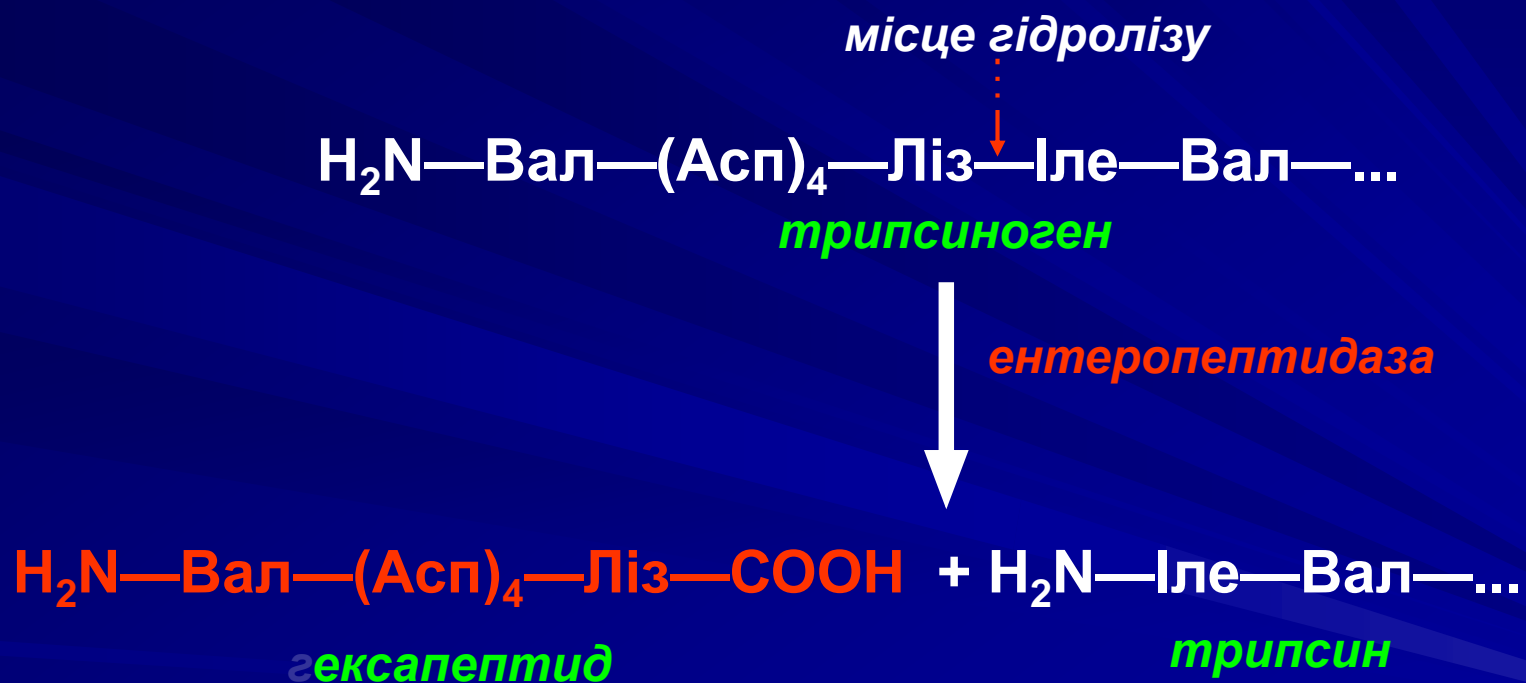
АЦ – аденілатциклаза; ПКА – протеїнкіназа А;
 P_i – H_3PO_4 .

РЕГУЛЯЦІЯ ШЛЯХОМ ФОСФОРИЛЮВАННЯ-ДЕФОСФОРИЛЮВАННЯ МОЛЕКУЛИ ФЕРМЕНТУ



Фосфорилування відбувається ферментами протеїнкіназами, а дефосфорилування – фосфопротеїнфосфатазами. Приєднання залишку фосфорної кислоти спричиняє зміну конформації активного центра і його каталітичної активності. При цьому результат може бути двояким: одні ферменти при фосфорилуванні активуються, інші, навпаки, стають менш активними.

РЕГУЛЯЦІЯ ЧАСТКОВИМ ПРОТЕОЛІЗОМ



Під дією ферменту кишечника ентеропептидази відбувається гідроліз пептидного зв'язку Ліз – Іле. У результаті відщеплення гексапептиду з N-кінця формується активний центр у залишеній частині молекули.

Дякую за увагу!