



Запорізький державний медичний університет

Кафедра клінічної лабораторної діагностики

Ферменти – структура, властивості, класифікація, механізм дії.

к.фарм.н. Євсєєва Людмила Володимирівна

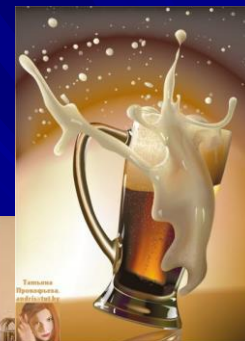
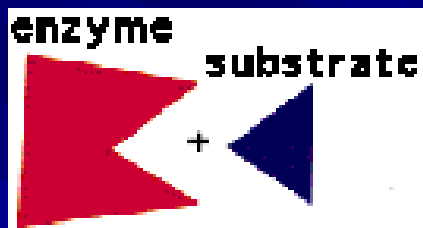
Ферменти - це специфічні білки, які прискорюють реакції, тобто відіграють роль біологічних каталізаторів.

E – Фермент

S – Субстрат

P – Продукт

*ES – фермент-
субстратний комплекс*



Історія вивчення ферментів



1856 р. у французькому місті Лілль г-н. Біго, власник фабрики з виробництва спирту, попросив Л. Пастера визначити причину захворювання спиртових чанів – відкриття бактерій.

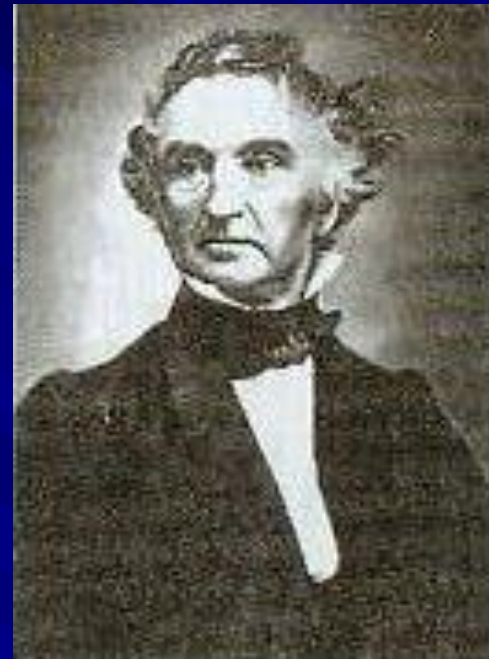
1876 р. Праця Пастера про бродіння

Історія вивчення ферментів



«Без живих дріжджів не може бути ніякого спирту»

Л. Пастер



«Ті люди, які думають, що процес бродіння обумовлений анімалькулями, подібні дітям, які вважають, що плин Рейну обумовлений обертанням колес водяних млинів, які стоять на його берегах»

Ю. Лібіх

Історія вивчення ферментів



1897 р. Е. Бюхнер
показав, що
можливо отримати
спирт БЕЗ живих
дріжджів.

«зимаза» -
речовина з
дріжджів.

Історія вивчення ферментів

Константин Сігізмундович Кірхгоф (Константин Готтліб Сігізмунд) – російський хімік. відкрив фермент, що міститься в екстракті з пророслого насіння ячменю та забезпечує перетворення крохмалю на глюкозу.



Пайен Ансельм

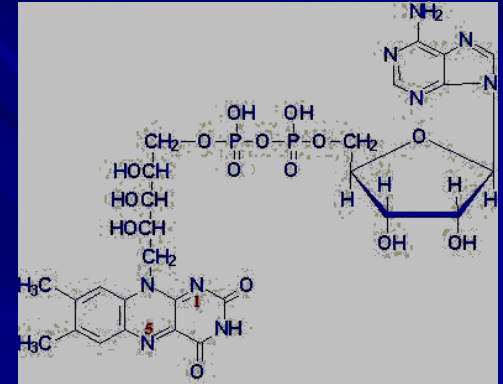
Пайен Ансельм (1795-1871) и Персо Жан-Франсуа (1805-1868) - У 1833 році вперше виділили та очистили фермент - амілазу пшениці, показали, що вона втрачає активність при нагріванні, і запропонував гіпотезу про центральну роль подібних речовин в біологічних процесах.

Терміни «ензим» і "фермент" німецький хімік Кюне запропонував тільки у 1877 р., а у 1893 р. німецький фізикохімік і філософ Оствальд, лауреат Нобілівської премії з хімії 1909 р., довів, що ферменти являються каталізаторами.

Структура ферментів

За будовою ферменти можуть бути:

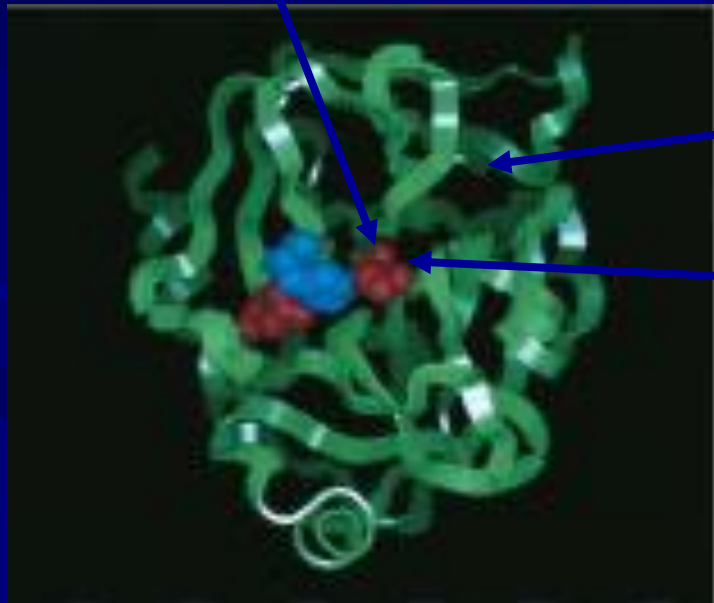
однокомпонентними, простими білками, які складаються тільки з амінокислот та двокомпонентними, складними білками.



-кофактор
(нековалентно
-зв'язаний);

Холофермент

простетична група
(ковалентно)

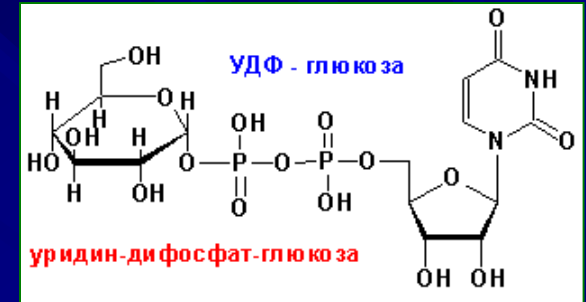
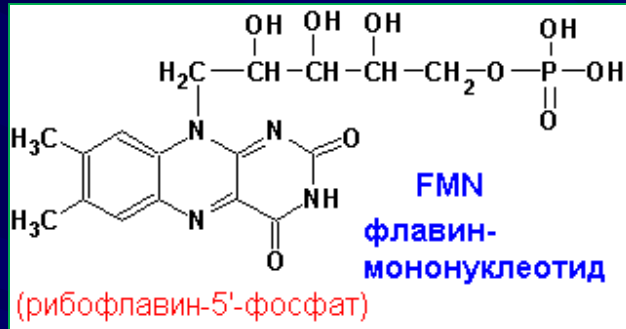


Апофермент

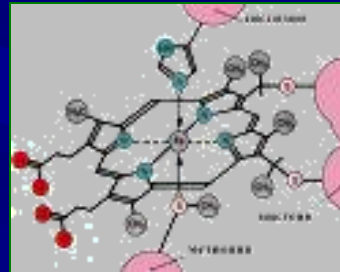
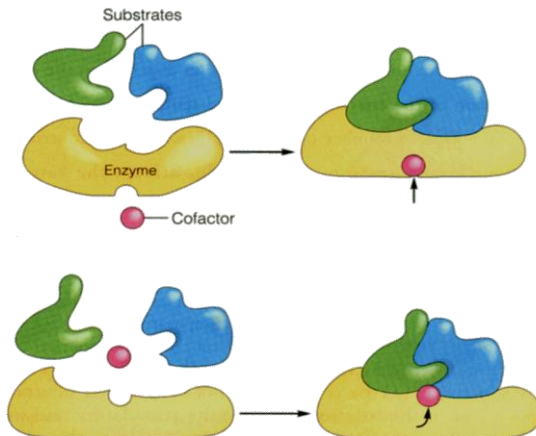
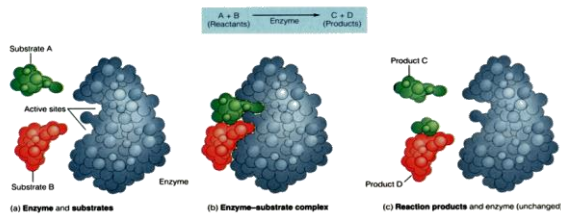
Кофермент



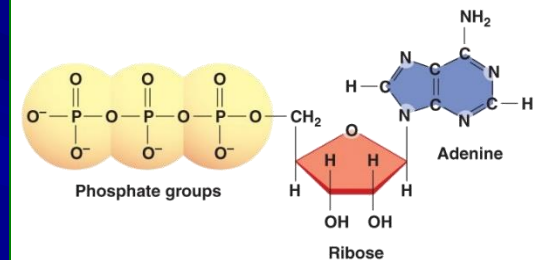
1. Участь в процесі каталізу,
2. Контакт ферменту та субстрату,
3. Стабілізація апоферменту.



The roles of cofactors in enzyme function



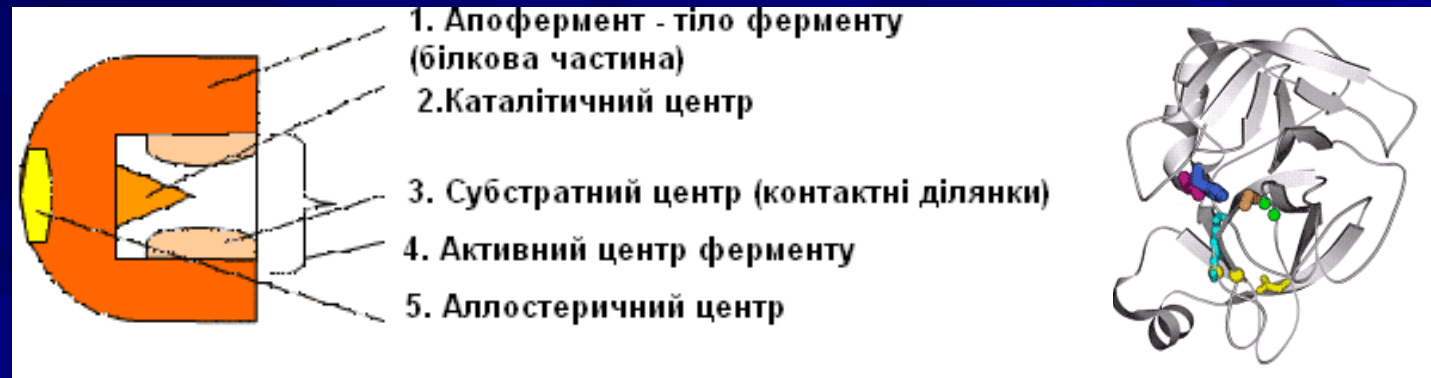
(a) ATP consists of three phosphate groups, ribose, and adenine.



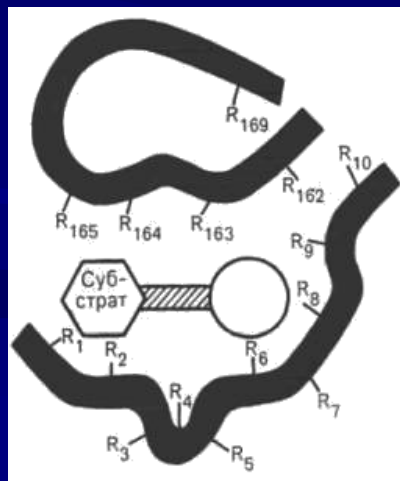
Copyright © 2008 Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

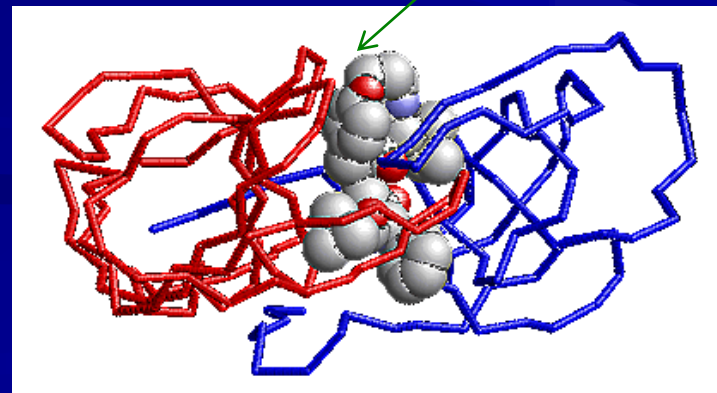
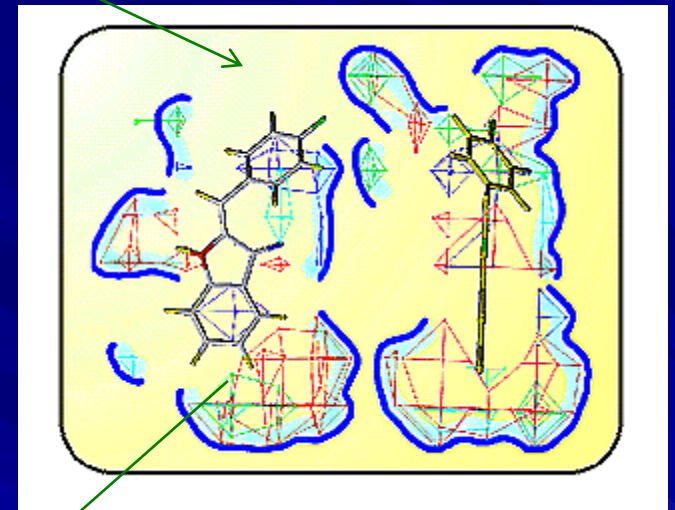
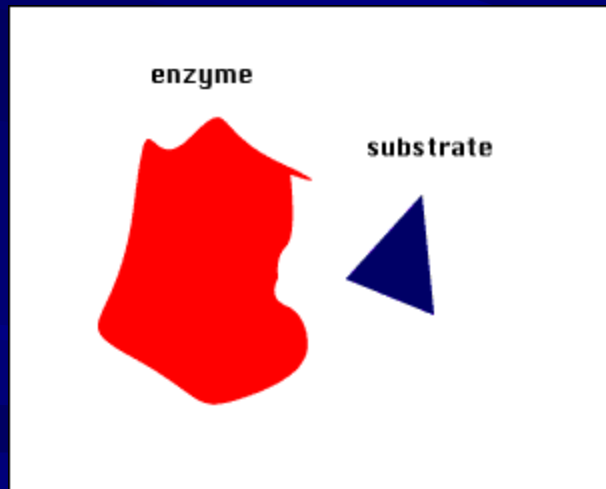
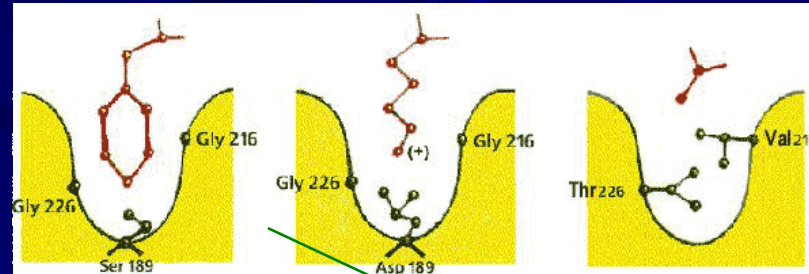
Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺

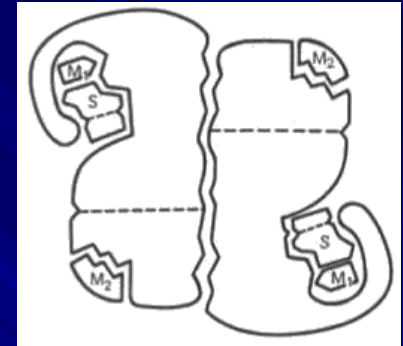
АКТИВНИЙ ЦЕНТР- частина молекули фермента де відбувається зв'язування та перетворення субстрата.



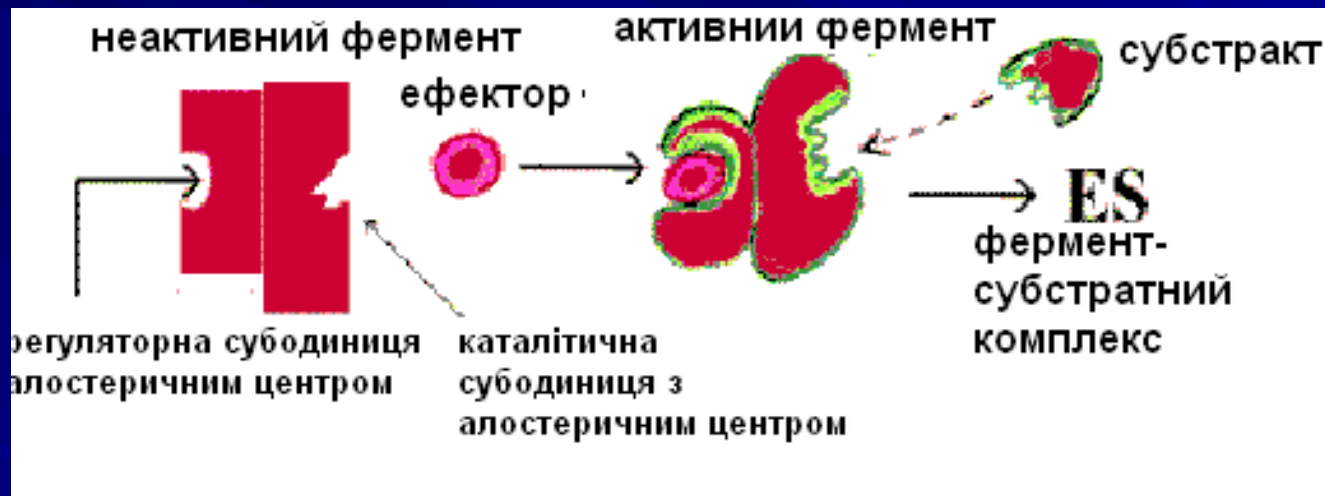
Частіше за все в каталітичних центрах однокомпонентних ферментів зустрічаються залишки Сер, Гіс, Три ,Арг, Цис, Асп, Глу и Тир







Алостеричний центр – ділянка молекули фермента поза його активного центру -
Регуляторний центр

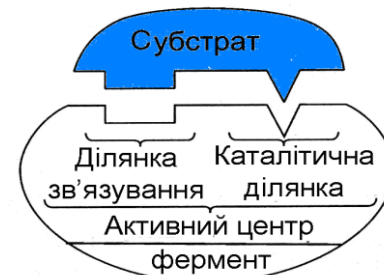
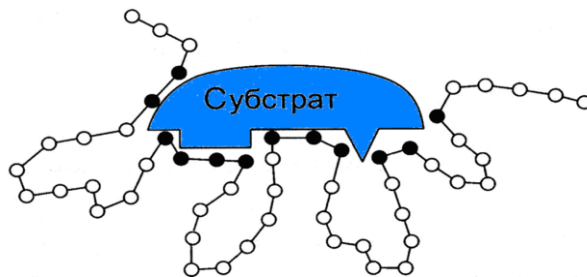


ОСНОВНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ ЯК БІОЛОГІЧНИХ КАТАЛІЗАТОРІВ

- 1) СПЕЦИФІЧНІСТЬ;**
- 2) КАТАЛІТИЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ;**
- 3) ЛАБІЛЬНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ;**
- 4) ЗДАТНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ДО РЕГУЛЯЦІЇ**

СПЕЦИФІЧНІСТЬ

СПЕЦИФІЧНІСТЬ – найбільш важлива властивість ферментів, що обумовлює важливість цих молекул. Розрізняють субстратну та каталітичну специфічність, які визначаються будовою активного центру .



Специфічність ферментів

Специфічність дії - це здатність ферменту каталізувати тільки конкретний тип хімічної реакції.

✓ абсолютна субстратна специфічність - перетворення тільки одного, визначеного субстрату;

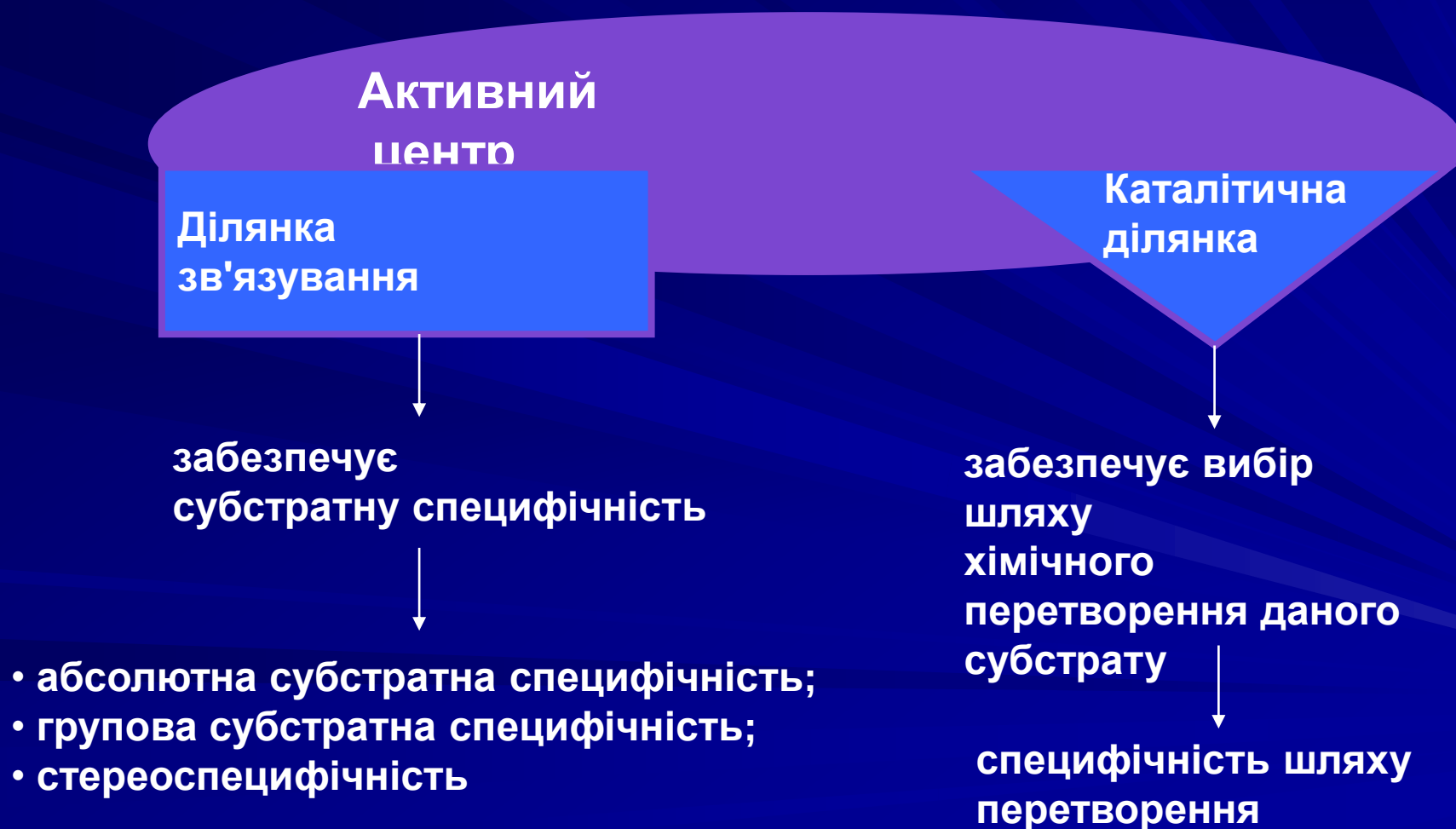
Аргіназа – розщеплення аргініну

✓ відносна субстратна специфічність - перетворення декількох, близьких за будовою, субстратів;

Пептидази – розщеплення пептидних зв'язків

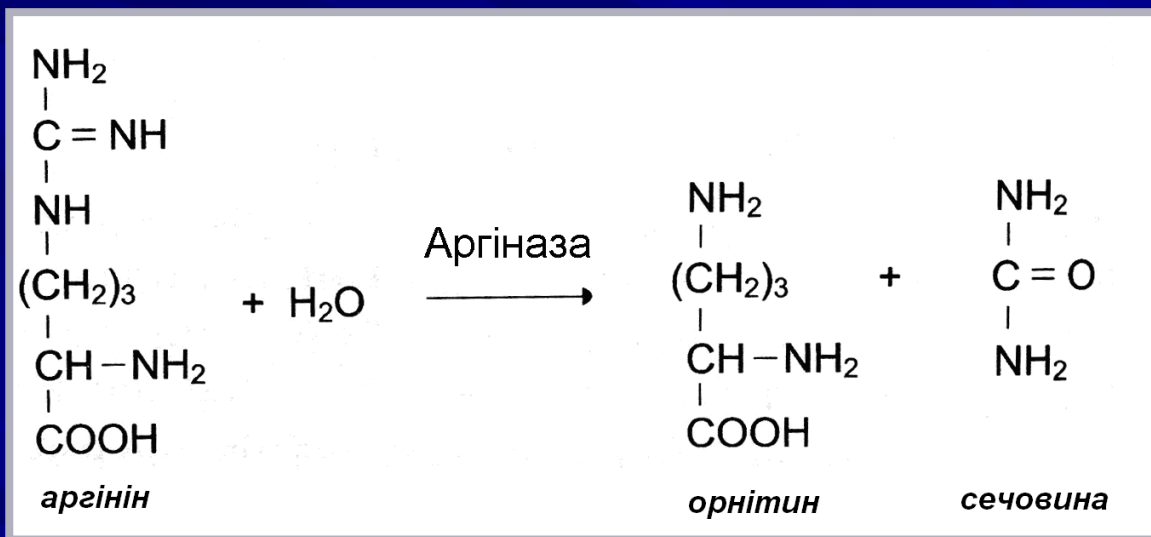
✓ стереоспецифічність - перетворення стереоізомерів.

Функціональна значимість окремих ділянок активного центру ферменту



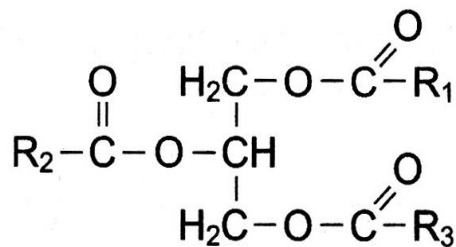
Абсолютна субстратна специфічність

Активний центр ферментів, якому притаманна абсолютна субстратна специфічність, є комплементарним лише до одного субстрату.

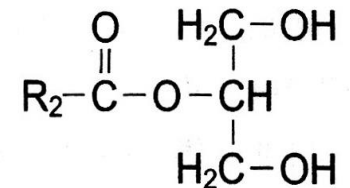
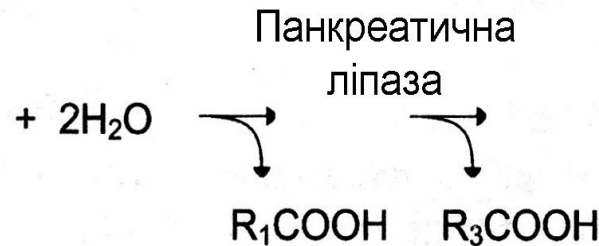


Групова субстратна специфічність

Більшість ферментів каталізує однотипні реакції з невеликою кількістю (групою) структурно схожих субстратів.



Триацилгліцерол



2-Моноацилгліцерол

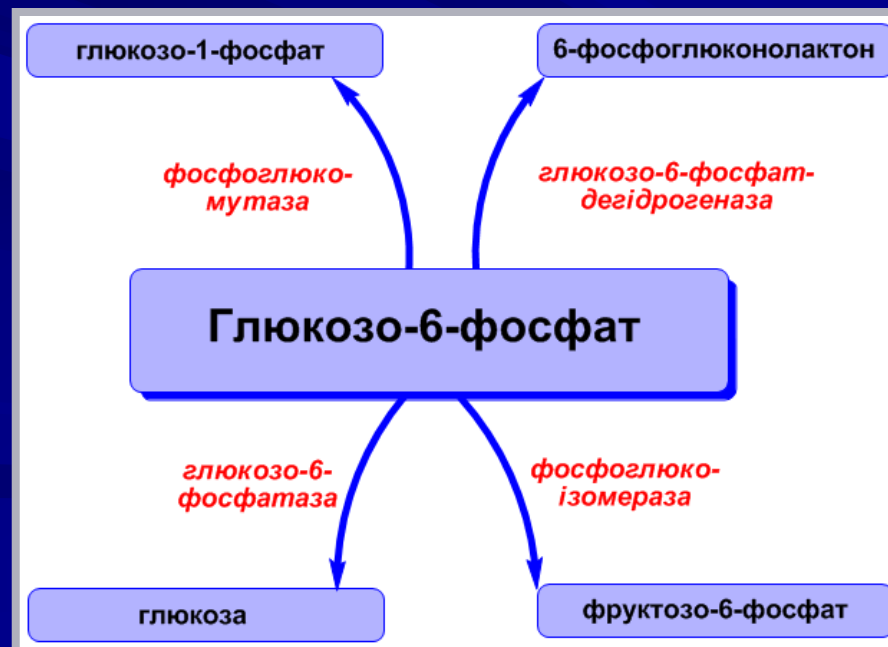
Стереоспецифічність

При наявності у субстраті декількох стереоізомерів фермент проявляє абсолютну специфічність до одного з них. В організмі людини спостерігають специфічність ферментів до наступних стереоізомерів:

- стереоспецифічність до D- цукрів;
- стереоспецифічність до L-амнокислот;
- стереоспецифічність до цис-транс-ізомерів;
- стереоспецифічність до α - та β -глікозидних зв'язків.

Каталітична специфічність

Фермент каталізує перетворення приєданого субстрату за одним із можливих шляхів його перетворення. Ця властивість забезпечується будовою каталітичної ділянки активного центру ферменту і називається каталітичною специфічністю, або специфічністю шляху перетворення субстрату.



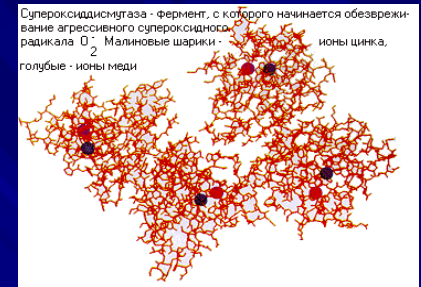
Загальні властивості ферментів і небілкових каталізаторів :

1. Ферменти катализують тільки енергетично вигідні реакції.
2. Ферменти не зміщують положення рівноваги, а лише прискорюють швидкість реакції.
3. Ферменти не входять до складу кінцевих продуктів реакції.
4. Ферменти не витрачаються в процесі каталізу та виходять з реакції в незмінному вигляді.



Відмінності ферментативного та хімічного каталізу:

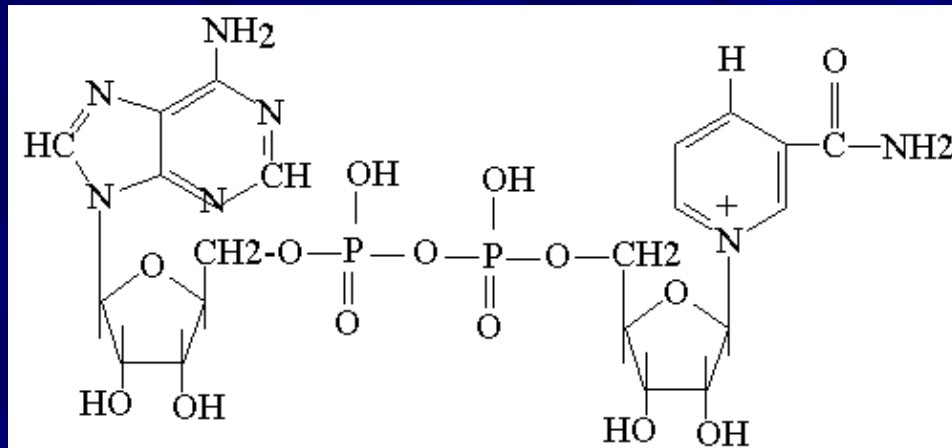
- 1) Швидкість ферментативного каталізу набагато вища, ніж небіологічного.
- 2) Ферменти виявляють високу специфічність.
- 3) Ферментативні процеси не дають побічних реакцій.
- 4) Ферменти каталізують реакції в м'яких умовах (рН, температура).
- 5) Каталітична активність ферментів регулюється.
- 6) Ферменти зберігають активність навіть після виділення з організму.



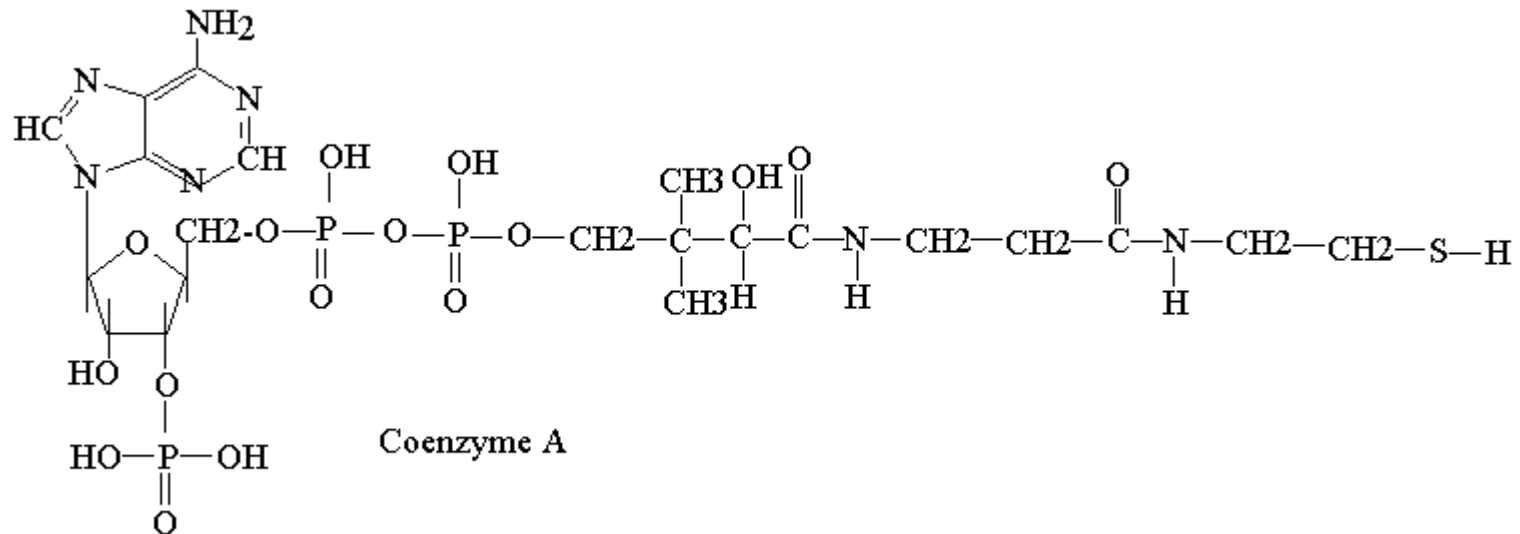
КОФАКТОРИ ТА КОФЕРМЕНТИ

Більшість ферментів для прояву ферментативної активності потребує низькомолекулярних органічних сполук небілкової природи (КОФЕРМЕНТИ) і/або іони металів (КОФАКТОРИ) .

Структура коферментів похідних водорозчинних вітамінів – НАД⁺ та КоА



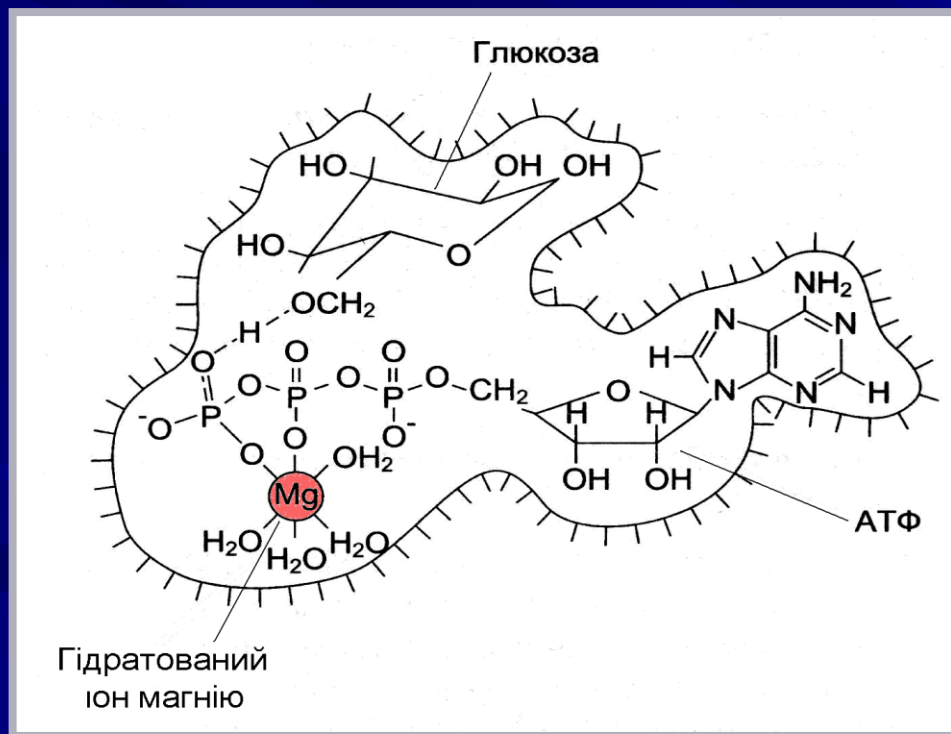
nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)



Coenzyme A

РОЛЬ МЕТАЛІВ У ПРИЄДНАННІ СУБСТРАТУ В АКТИВНОМУ ЦЕНТРІ ФЕРМЕНТУ

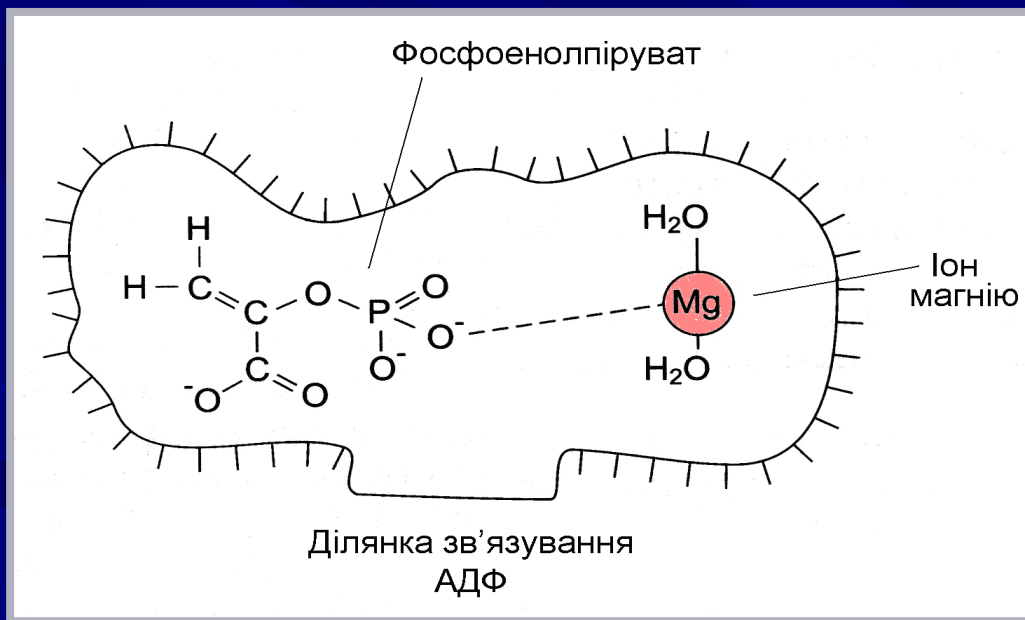
Участь іонів магнію у приєднанні субстрату в активному центрі гексокінази



В активному центрі гексокінази є ділянки зв'язування для молекули глюкози і комплексу Mg^{2+} —АТФ. У результаті ферментативної реакції відбувається перенесення кінцевого γ -фосфатного залишку АТФ на глюкозу з утворенням глюкозо-6-фосфату.

РОЛЬ МЕТАЛІВ У СТАБІЛІЗАЦІЇ ТРЕТИННОЇ ТА ЧЕТВЕРТИННОЇ СТРУКТУРИ ФЕРМЕНТУ

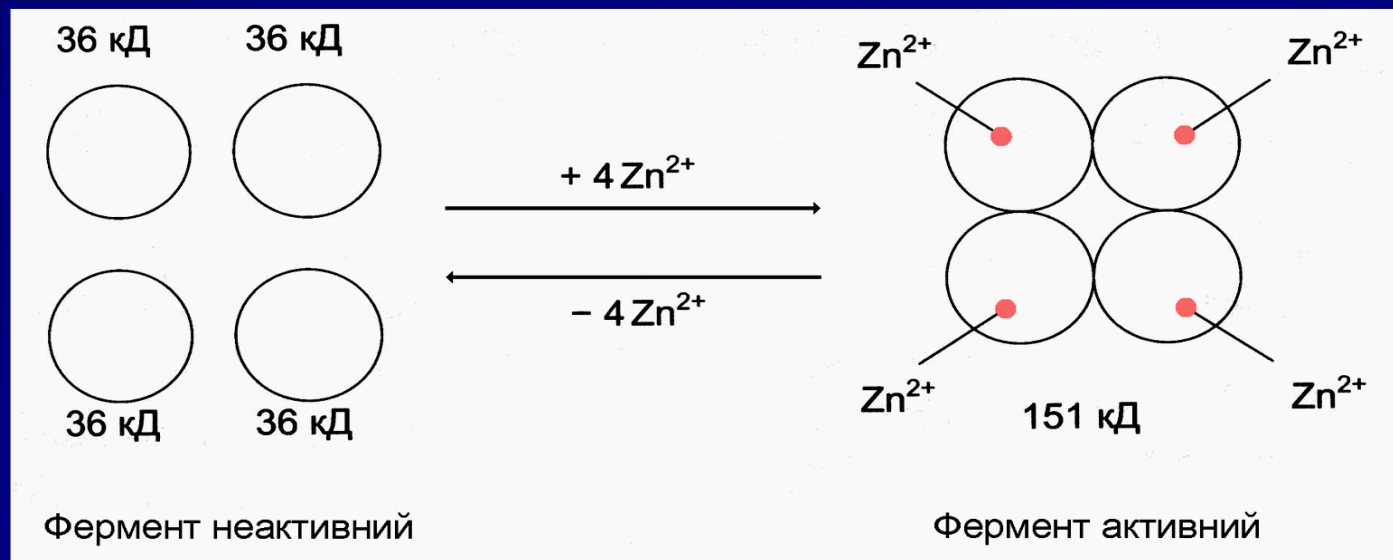
Участь іонів магнію у приєднанні субстрату в активному центрі піруваткінази



Активний центр піруваткінази має ділянки зв'язування для фосфоенолпірувату й АДФ. Mg^{2+} бере участь у стабілізації активного центру, що полегшує приєднання фосфоенолпірувату. Внаслідок ферментативної реакції утворюється піруват і АТФ.

РОЛЬ МЕТАЛІВ У СТАБІЛІЗАЦІЇ ТРЕТИННОЇ ТА ЧЕТВЕРТИННОЇ СТРУКТУРИ ФЕРМЕНТУ

Стабілізація четвертинної структури алкогольдегідрогенази іонами цинку



Алкогольдегідрогеназа складається з 4 субодиниць з молекулярною масою 151 кД. До складу ферменту входять 4 атоми Zn^{2+} , видалення яких призводить до втрати ферментом активності за рахунок дисоціації на 4 неактивні субодиниці з молекулярною масою 36 кД

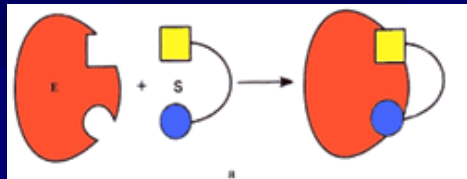
Йони	Фермент	Кофермент	Фермент
Fe^{2+} або Fe^{3+}	Цитохром оксидаза Каталаза Пероксидаза	Тиамин пірофосфат (ТРР)	Піруват дегідрогеназа Сукцинат дегідрогеназа Алкоголь дегідрогеназа
Cu^{2+}	Цитохром оксидаза	Флавін аденін динуклеотид (ФАД)	Піруват дегідрогеназа Сукцинат дегідрогеназа Алкоголь дегідрогеназа
Zn^{2+}	ДНК полімераза Алкоголь дегідрогеназа	Никотинамід аденін динуклеотид (НАД ⁺)	Піруват дегідрогеназа Сукцинат дегідрогеназа Алкоголь дегідрогеназа
Mg^{2+}	Гексокіназа Глюкозо-6- фосфатаза	Коензим А (СоА)	Ацетил-КоА карбоксилаза

Механізм дії ферментів

Розрізняють три основні етапи ферментативного каталізу.

1 етап. Приєднання субстрата до активного центру фермента.
Утворення фермент-субстратного комплексу

а)

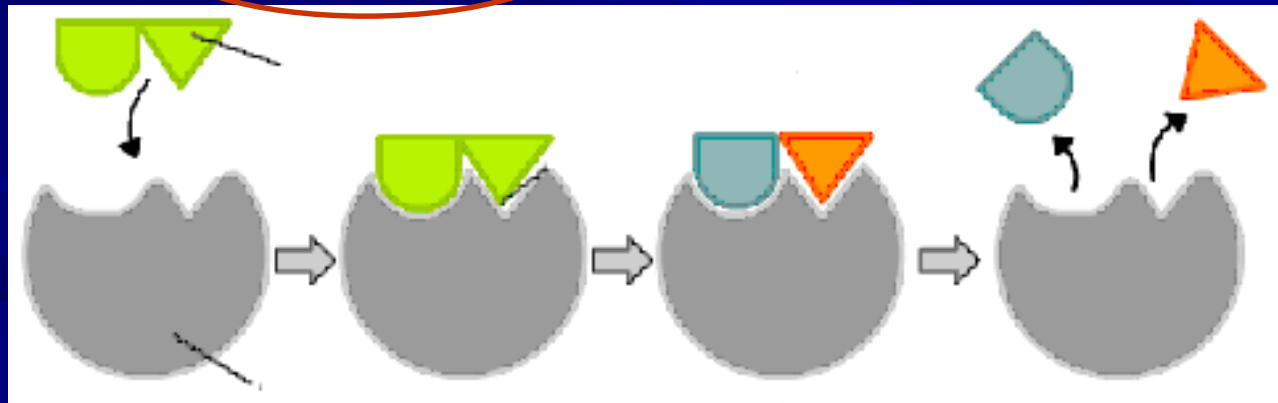
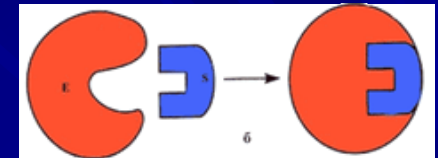


Взаємодія фермента з субстратом:

а) - модель «жорсткої матриці»;

б) - модель "перчатки - рука".

б)

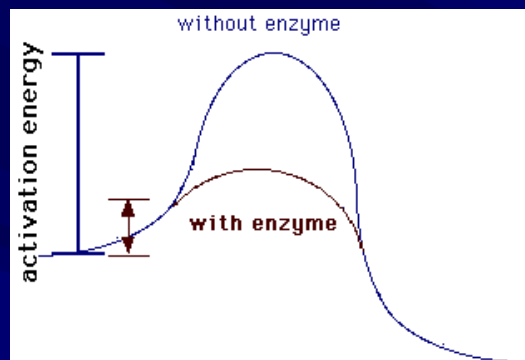


ПРОДУКТ

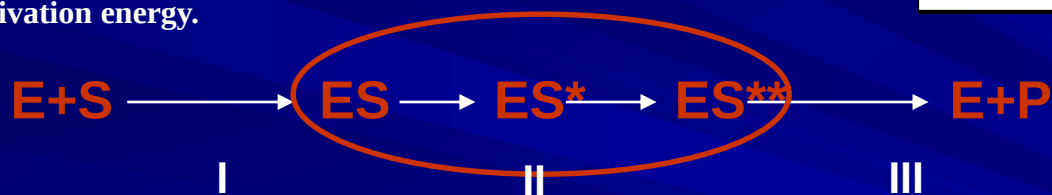
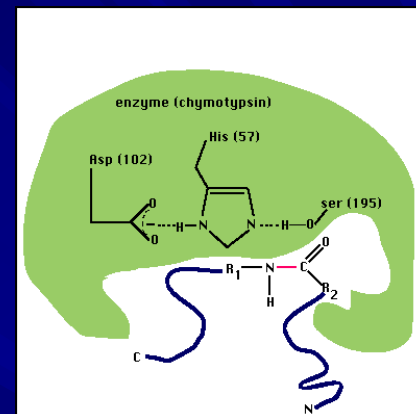
ФЕРМЕНТ

2 етап. Хімічні перетворення молекули субстрату в складі фермент-субстратного комплексу.

Фермент знижує енергію активації, необхідну для перетворення субстрату.



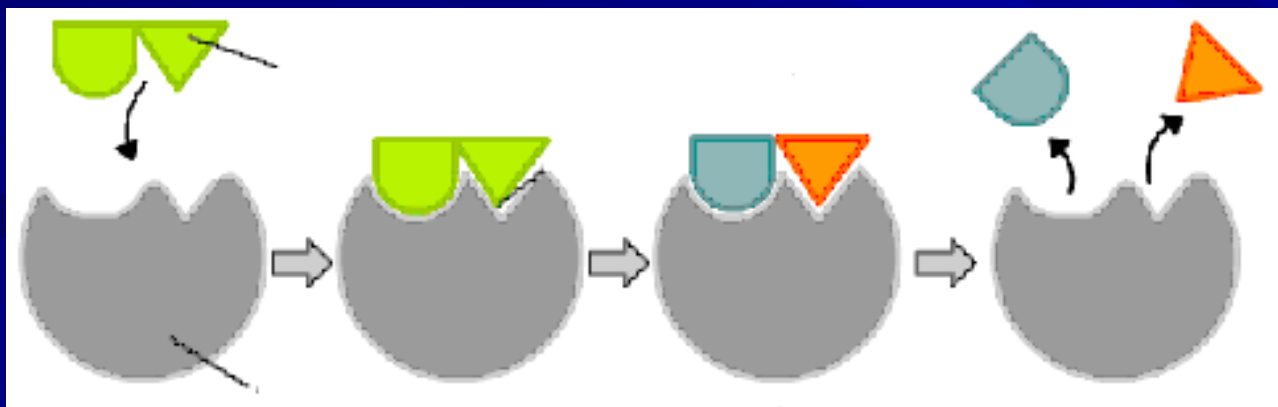
Enzymes catalyze reactions by lowering the activation energy.



СУБСТРАТ

ПРОДУКТ

ФЕРМЕНТ

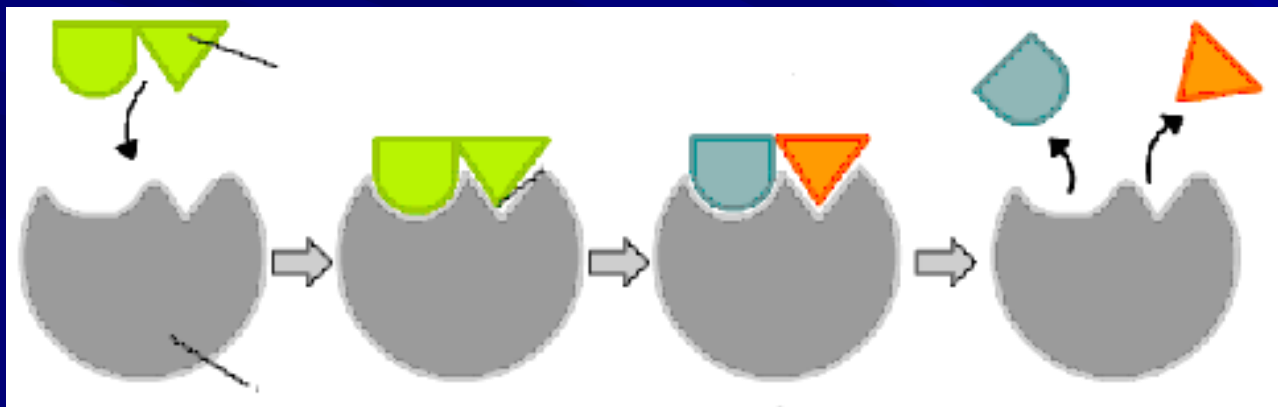


3 етап. Вихід продукта реакції з активного центру в оточуюче середовище.



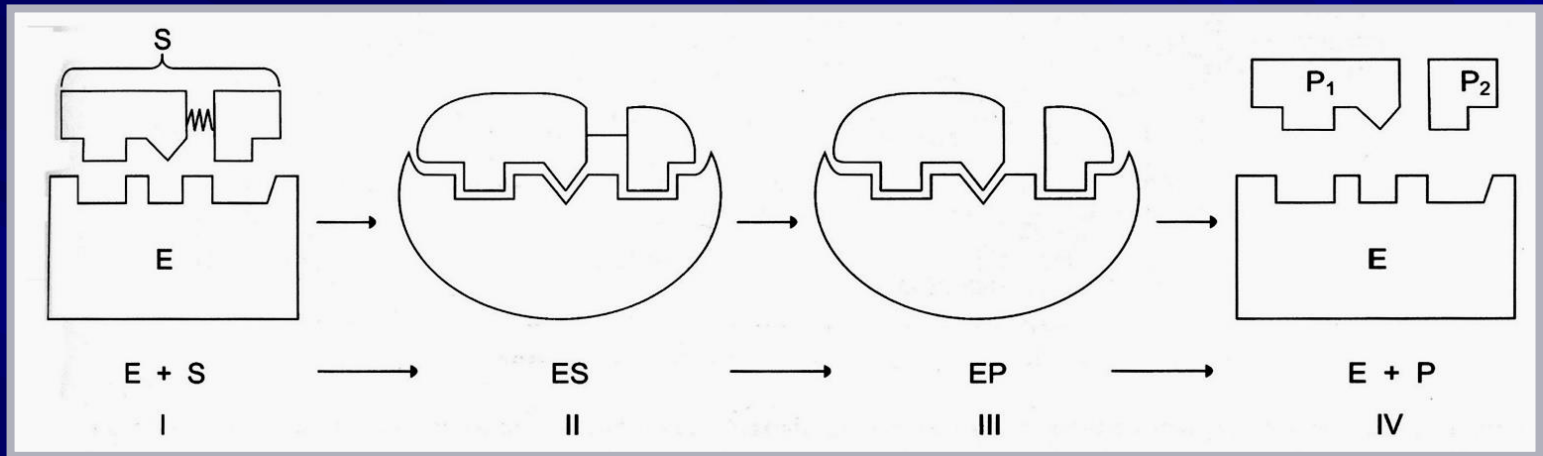
СУБСТРАТ

ФЕРМЕНТ



ПРОДУКТ

Етапи ферментативного каталізу

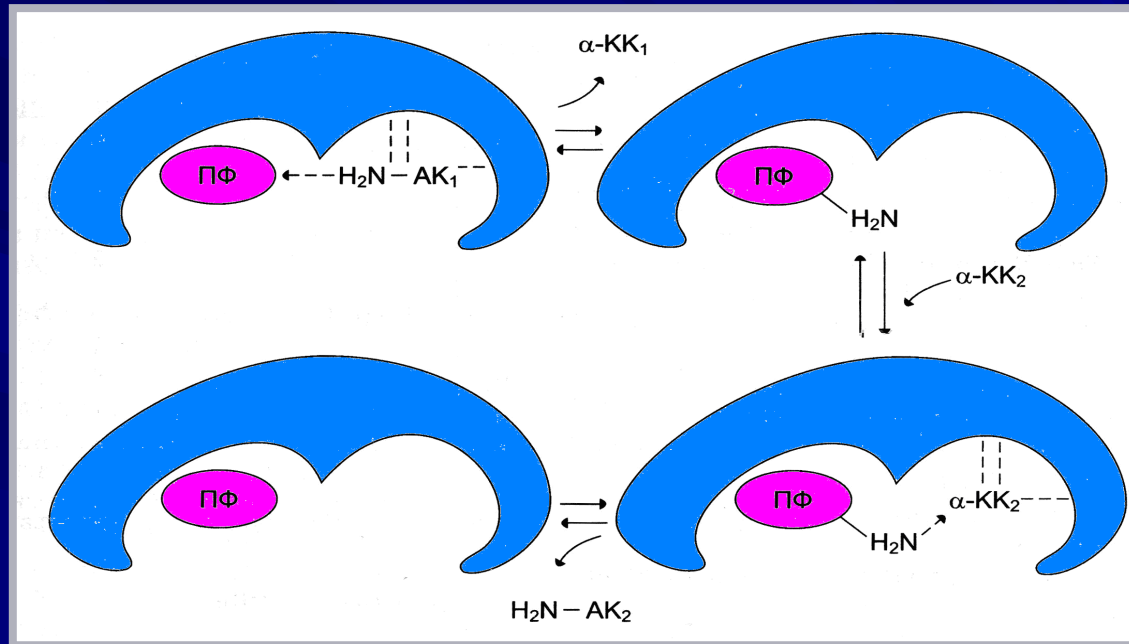


- I - етап зближення й орієнтації субстрату відносно активного центру ферменту;
- II - утворення фермент-субстратного комплексу (ES) у результаті індукованої відповідності;
- III - деформація субстрату й утворення нестабільного комплексу фермент – продукт (EP)
- IV - розпад комплексу (EP) з вивільненням продуктів реакції із активного центру ферменту та звільнення ферменту.

МУЛЬТИСУБСТРАТНІ РЕАКЦІЇ

МЕХАНІЗМ "ПІНГ-ПОНГ"

А. Реакції трансамінування за участю аміотрансфераз



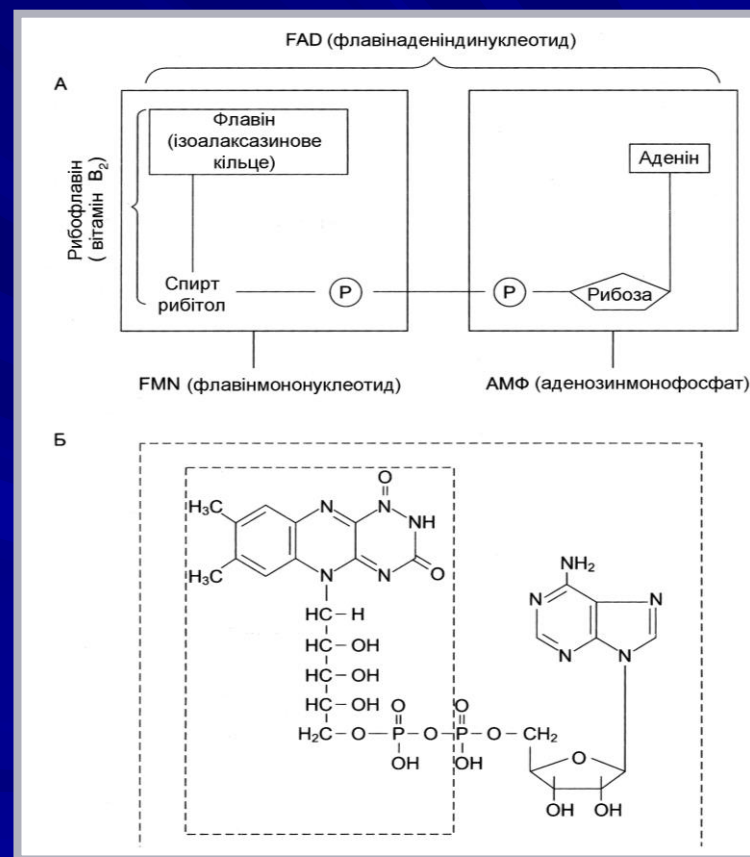
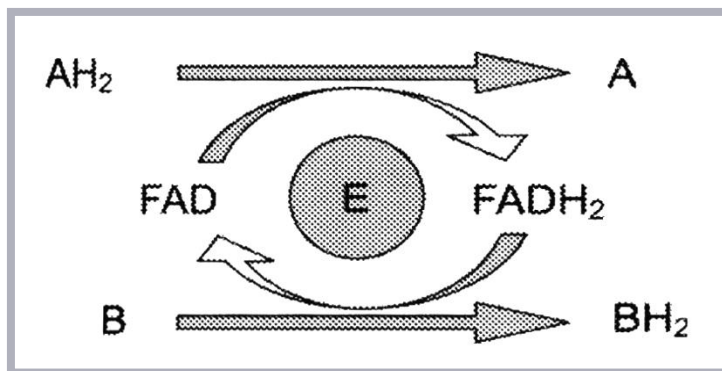
Кофермент піридоксальфосфат (ПФ), зв'язаний з ферментом, приймає α -аміногрупу від першої амінокислоти (AK_1), яка при цьому перетворюється на α -кетокислоту 1 (KK_1) і вивільнюється з активного центру ферменту. Далі до активного центру ферменту приєднується α -кетокислота 2 (KK_2), яка забирає аміногрупу від коферменту та перетворюється на α -амінокислоту (AK_2).

МУЛЬТИСУБСТРАТНІ РЕАКЦІЇ

МЕХАНІЗМ "ПІНГ-ПОНГ"

Б. Реакції дегідрування за участю коферменту FAD або FMN

Схема реакції дегідрування

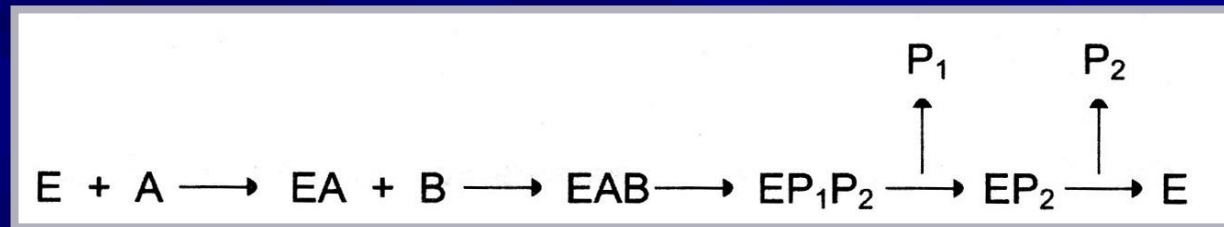


Структура (А) і хімічна будова (Б)
коферментів FMN і FAD

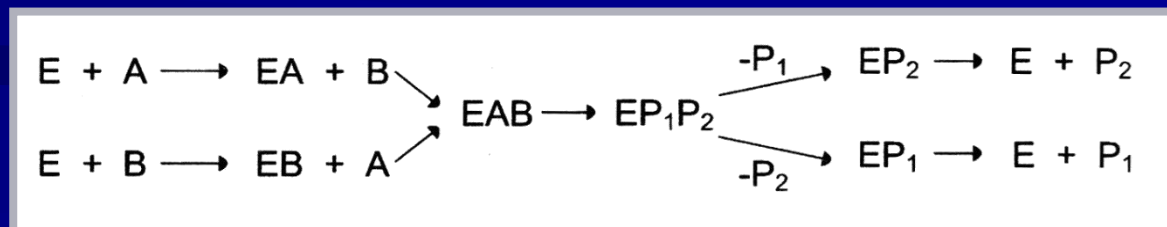
МУЛЬТИСУБСТРАТНІ РЕАКЦІЇ

ПОСЛІДОВНИЙ МЕХАНІЗМ

МЕХАНІЗМ ВПОРЯДКОВАНОЇ ВЗАЄМОДІЇ СУБСТРАТУ З АКТИВНИМ ЦЕНТРОМ ФЕРМЕНТУ



МЕХАНІЗМ ВИПАДКОВОЇ ВЗАЄМОДІЇ СУБСТРАТУ З АКТИВНИМ ЦЕНТРОМ ФЕРМЕНТУ

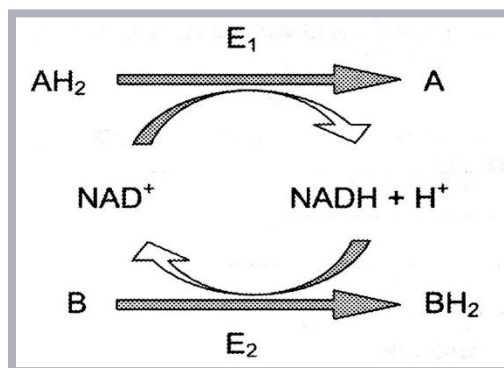


МУЛЬТИСУБСТРАТНІ РЕАКЦІЇ

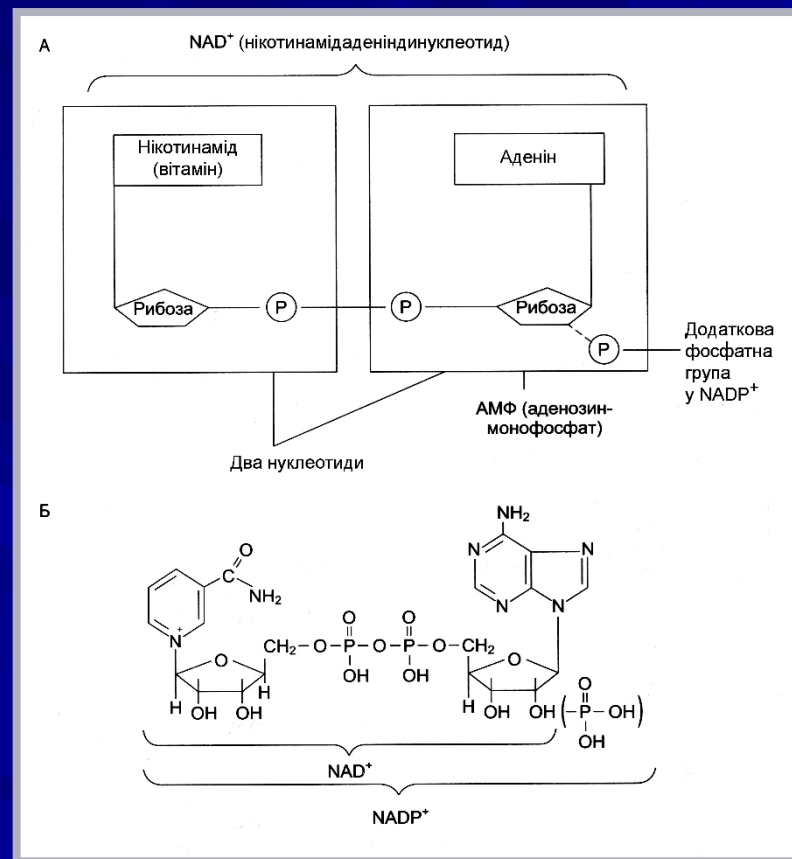
ПОСЛІДОВНИЙ МЕХАНІЗМ

Реакції дегідрування за участю коферментів NAD^+ або NADP^+

Схема реакції дегідрування



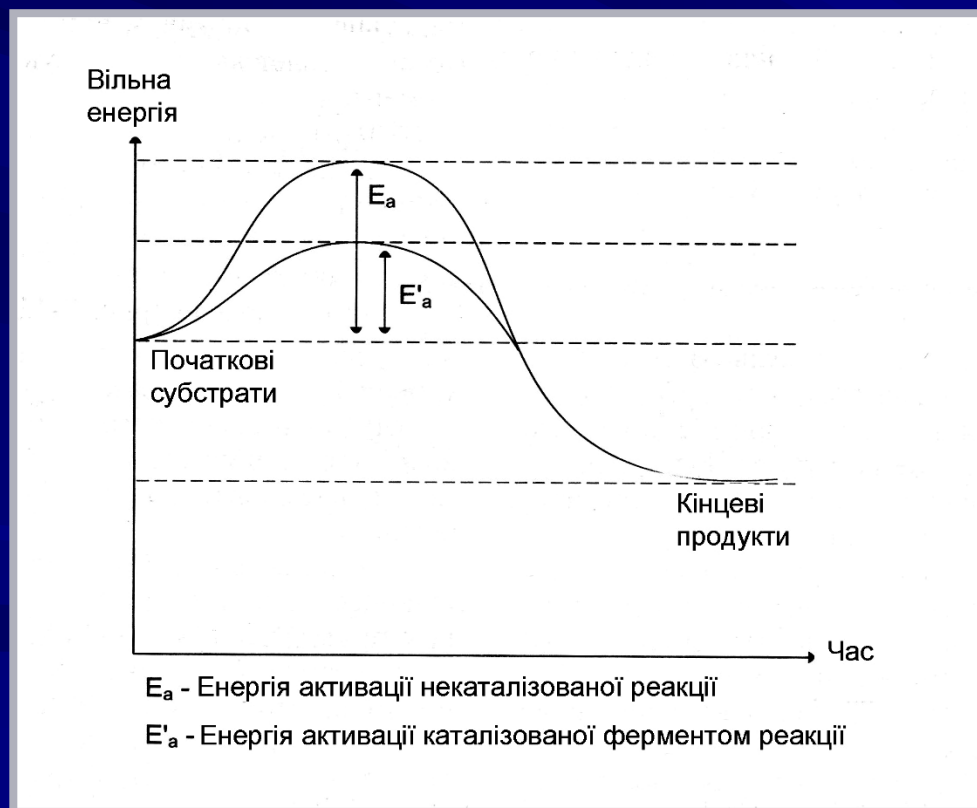
E_1, E_2 — ферменти



Структура (А) і хімічна будова (Б)
коферментів NAD^+ і NADP^+

МЕХАНІЗМ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ

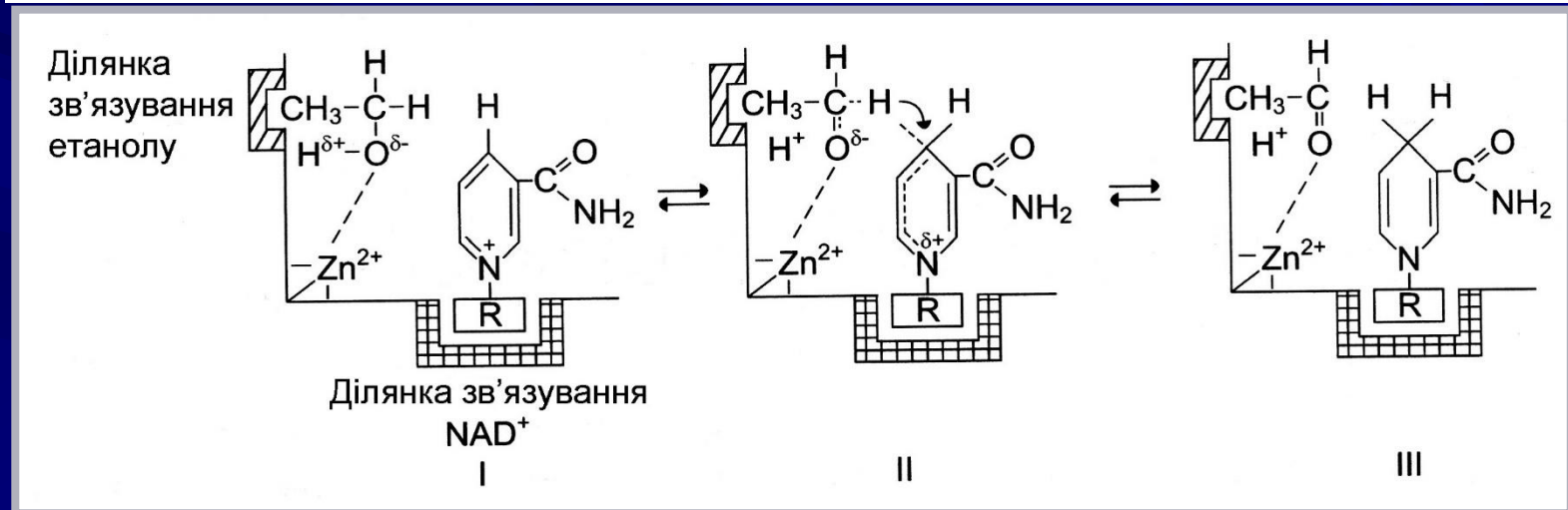
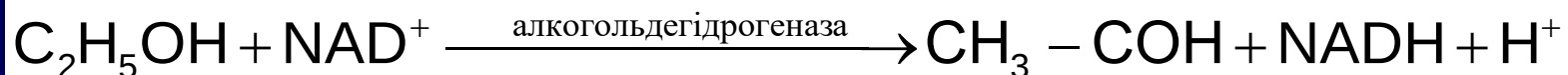
Зміна вільної енергії під час хімічної реакції, що каталізується і не каталізується ферментом



Фермент знижує енергію активації E_a , тобто знижує висоту енергетичного бар'єру, в результаті зростає частка реакційно-здатних молекул, отже, збільшується швидкість реакції.

Молекулярні механізми ферментативного каталізу

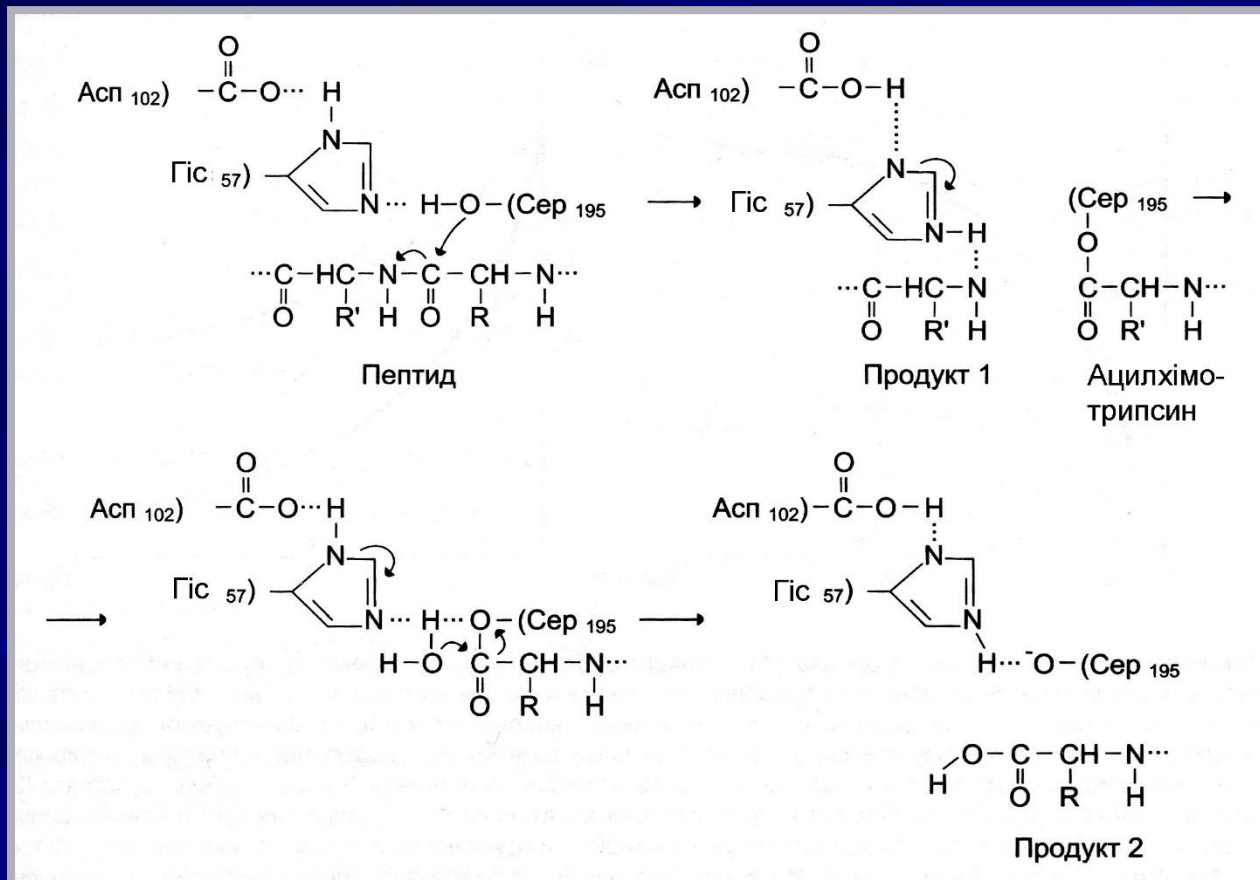
А. Кисотно-основний каталіз



- I - молекула етилового спирту має центр зв'язування, який забезпечує гідрофобну взаємодію активного центру та метильної групи спирту;
- II - позитивно заряджений атом цинку сприяє відщепленню протона від спиртової групи етанолу з утворенням негативно зарядженого атому кисню;
- III - формування відновленої форми NADH та оцтового альдегіду.

Молекулярні механізми ферментативного каталізу

Б. Ковалентний каталіз



Механізм ковалентного каталізу в активному центрі хімотрипсину.

Номенклатура ферментів

Способи номенклатури:

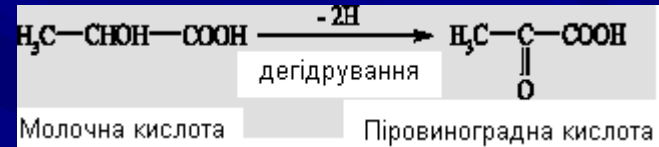
-Тривіальна назва (пепсин, трипсин)

-Робоча назва:

Назва субстрата+тип реакції+аза

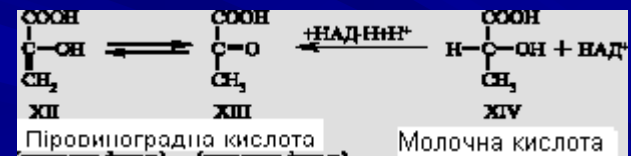
Лактатдегідрогеназа

Систематична назва:



Субстрат1:субстрат2-клас ферменту

L-лактат:НАД-оксидоредуктаза



Лецитин:холестерин-ацилтрансфераза

-Код ферменту

Клас.Підклас.Підпідклас.Індивідуальний номер

1.1.1.27

Класифікація ферментів

1. Оксидоредуктази	Окиснювально-відновні реакції	<i>Дегідрогенази</i>
2. Трансферази	Перенос груп від одного субстрату до іншого	<i>Аміотрансферази</i>
3. Гідролази	Разрыв связей с присоединением воды	<i>Естерази, ліпази, пептидази</i>
4. Ліази	Разрыв з'вязків з приєднанням води	<i>Декарбоксилази</i>
5. Ізомерази	Ізомерні перетворення в межах однієї молекули	<i>Таутомерази, мутази</i>
6. Ліази	Приєднання однієї молекули до іншої з використанням енергії АТФ	<i>Синтетази</i>

КФ 1.1.1.27 - Лактатдегідрогеназа

Класифікація ферментів

Підкласи – визначають, на яку групу в субстраті діє фермент.

Наприклад:

1. Оксидоредуктази

1.1. Діє на CH-OH групу донорів

1.2. Діє на альдегідну або кетону групу

1.3. Діє на CH-CH групу

Класифікація ферментів

Підпідкласи— вказують, яка речовина є вторим субстратом (якщо субстратів 2), або до якої групи речовин відноситься субстрат (якщо субстрат 1).

Наприклад:

1. Оксидоредуктази

1.1. Діють на СН-ОН групу донорів

1.1.1. Акцептором слугують НАД або НАДФ

1.1.2. Акцептором служить цитохром

1.1.3. Акцептором служить O_2

3. Гідролази

3.5. Діють на С-N зв'язки, які відрізняються від пептидних

3.5.1. В лінейних амідах

3.5.2. В циклічних амідах

3.5.3. В лінейних амідинах

Клітинна організація ферментативної активності

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



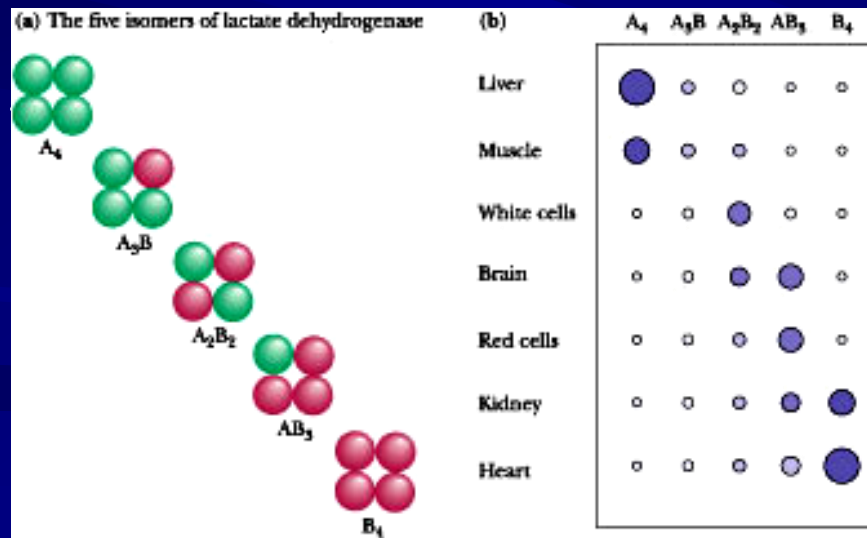
Мембранозв'язані ферменти – структурно-функціонально пов'язані з мембранами

МНОЖИННІ МОЛЕКУЛЯРНІ ФОРМИ ФЕРМЕНТІВ

ІЗОФЕРМЕНТИ

Ізоферменти, або ізоензими,— це форми одного й того ж ферменту, які знаходяться в різних тканинах, каталізують одну й ту ж реакцію, але відрізняються один від одного за фізичними та хімічними властивостями.

Ізоферментні форми лактатдегідрогенази



Печінка

Скілетні м'язи

Лейкоцити

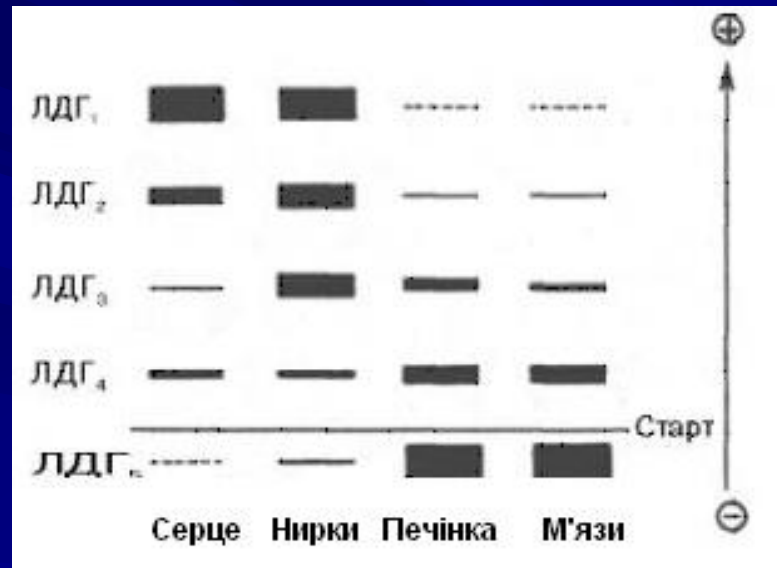
Мозок

Еритроцити

Нирки

Серце

Вивчення ізоферментів лактатдегідрогенази (ЛДГ) (та інших ферментів) в сироватці крові важливо для диференцировки діагностики уражених органів і тканин. За зміною ізоферментів в сироватці крові можна судити про місце патологічного процесу, та ступінь ураження органа або тканини.



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

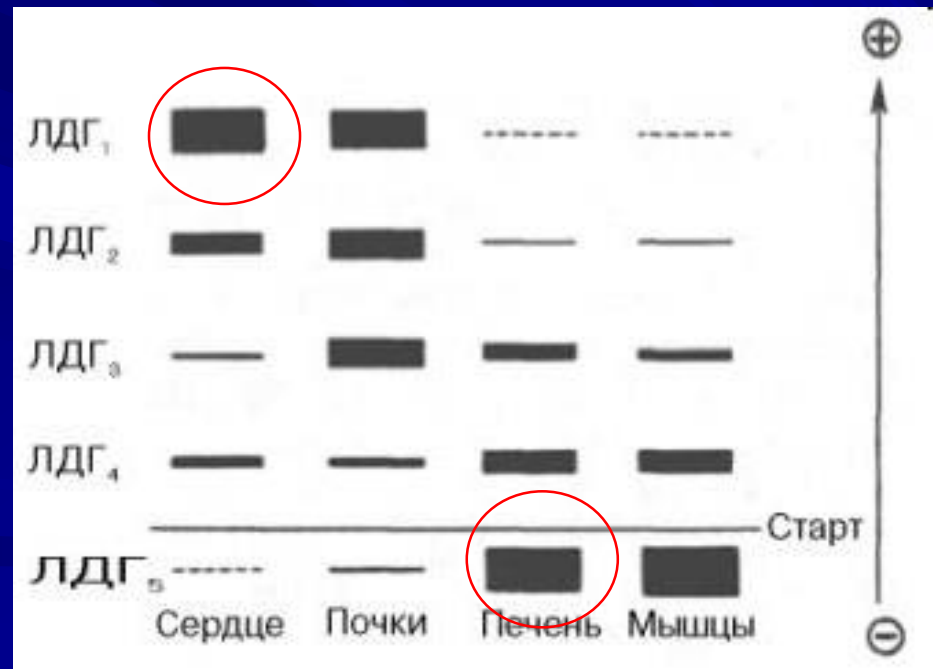
- будовою
- фіз.-хім. властивостями
- локалізацією в тканинах

ЛДГ₁: ЛДГ₂: ЛДГ₃: ЛДГ₄: ЛДГ₅
(Н4) (Н3М) (Н2М2) (НМ3) (М4)

Піруват + НАДН₂ ↔ Лактат + НАД

↑ ЛДГ_{1,2} – інфаркт міокарду

↑ ЛДГ_{4,5} – ураження печінки



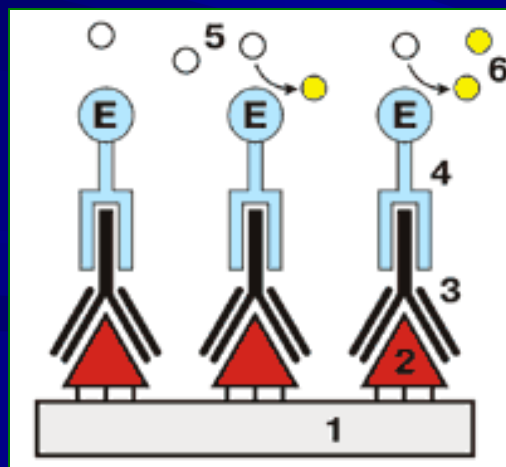
ІММОБІЛІЗОВАНІ ФЕРМЕНТИ

Імобілізація фермента – приєднання молекули фермента до носіїв, нерозчинних у воді.

Переваги:

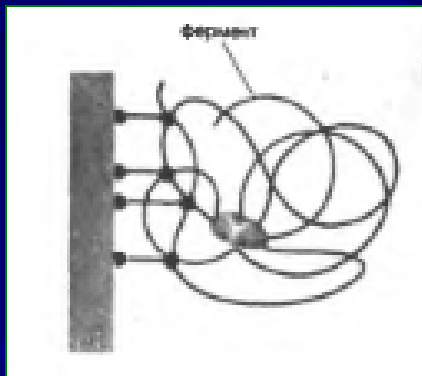
- 1.Збільшення стабільності,
- 2.Багаторазове використання,
- 3.Цілеспрямована зміна властивостей,
- 4.Полегшення регуляції.

Імобілізовані ферменти знаходять широке використання в аналітичній практиці і біохімічній технології.



Вимоги до носіїв:

- Висока хімічна стійкість,
- Висока міцність,
- Висока пористість,
- Можливість отримання в зручному вигляді (гранули, листи),
- Невисока вартість.



Природні ліпіди – компоненти біомембран – у вигляді шару на силікагелі, часто використовуються у якості носіїв.

ВИКОРИСТАННЯ ФЕРМЕНТІВ В МЕДИЦИНІ

1. Лікування захворювань шлунково-кишкового тракту (пепсин, ліпаза, амілаза),
2. Використання ферментів при лікуванні гнійних ран (трипсин, хімотрипсин),
3. Для розсмоктування рубців (гіалуронідаза),
4. Для лікування вірусних захворювань (дезоксирибонуклеазу),
5. Для лікування тромбозів та тромбофлебітів (стрептодеказа та інш.),
6. Лікування деяких форм лейкоза - аспарагіназа



Ферменти – індикатори захворювань

Міокард

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

Інфаркт
міокарду

Печінка

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

Гепатит

Підшлункова залоза

- Альфа-амілаза
- Трипсин

Панкреатит

Використання інгібіторів ферментів.

Прородні інгібітори протеїназ знайшли використання в терапії гострих панкреатитів, артритів, алергічних захворювань, при яких відмічається активація протеоліза та фібриноліза, яка супроводжується утворенням вазоактивних кінінів.



Ферментативні процеси є основою багатьох виробництв: хлібопекарства, виноробства, пивоваріння, сироваріння, виробництва спирту, чая, оцту.

Дякую за увагу!