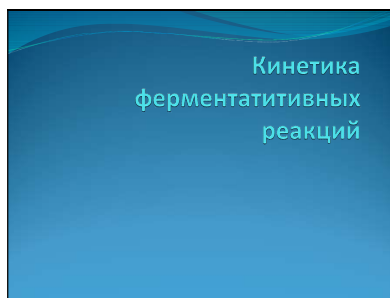
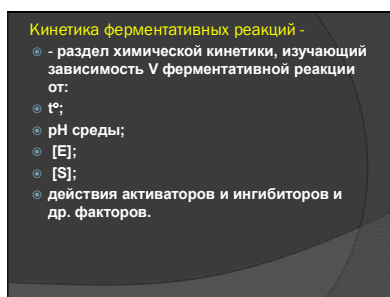


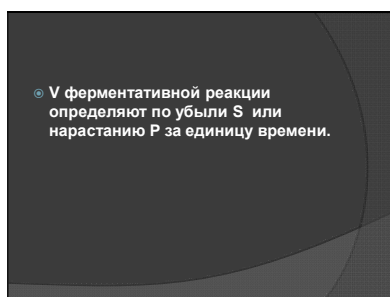
Слайд 1



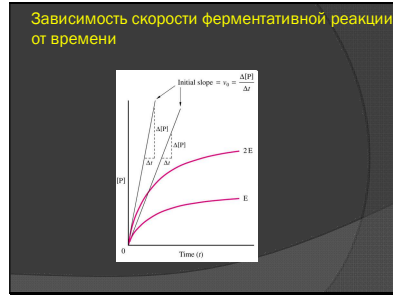
Слайд 2



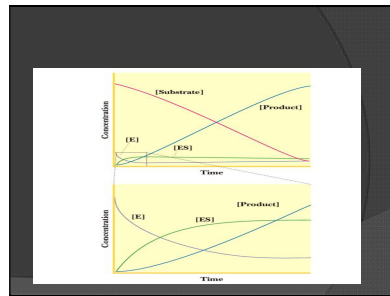
Слайд 3



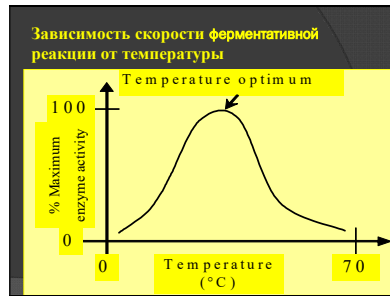
Слайд 4



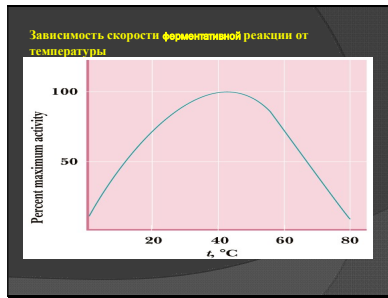
Слайд 5



Слайд 6



Слайд 7



Слайд 8

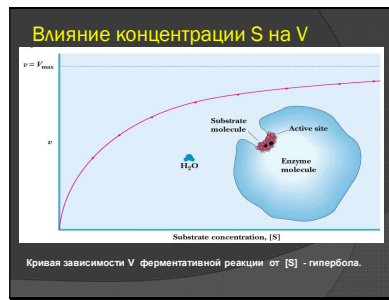
Tag-полимераза

- Выделена из микроорганизмов, живущих в горячих источниках, не инактивируется до 95°, используется для молекулярной диагностики заболеваний с использованием ПЦР.

Слайд 9



Слайд 16



Слайд 17

Леонор Михаэлис (1875-1949) и Мауд Ментен (1879-1960) пионеры в кинетике ферментов.

$$E + S \xrightleftharpoons[k_1]{k_2} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

Слайд 18

Константа Михаэлиса (Km)

- K_m - численно равна концентрации субстрата [S], при которой скорость равна половине максимальной ($1/2 V_{max}$).

V_{max} и K_m — кинетические характеристики эффективности E. V_{max} позволяет оценить эффективность действия E, определяет максимальную возможность образования P при данной [E] и в условиях избытка S.

Слайд 19

V_{max} и K_m

- Физический смысл K_m , — сродство E к S. Чем ↓ K_m , тем ↑ сродство E к данному S, тем > начальная скорость реакции и наоборот.
- Пример: в печени 2 E, фосфорилирующие глюкозу — глюкокиназа ($K_m = 10$ ммоль/л) и гексокиназа ($K_m < 0,1$ ммоль/л). Глюкокиназа, имеющая ↑ K_m и ↓ сродство к S (глюкозе) активна при ↑ [глю] в крови, т.е. в абсорбтивный период (период пищеварения), а гексокиназа, имеющая ↓ K_m и ↑ сродство к S активна при низкой [глю] в крови, т.е. в постабсорбтивный период (промежуток между приемами пищи).

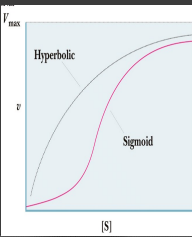
Слайд 20

Уравнение Михаэлиса-Ментен

- уравнение Михаэлиса – Ментен:
$$v = \frac{V_{max} [S]}{([S] + K_m)}$$
- Уравнение Лайнуивера-Бэрка:
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Слайд 21

Влияние [S] на V у аллостерических ферментов



У аллостерических E график зависимости V от [S] — не гипербола, а S-образная кривая (связывание одной молекулы S в одном каталитическом центре ↑ связывание S с другим центром — положительный кооперативный эффект).

Слайд 37

1. Аффинная метка

- Аналог субстрата имеет высокореакционную группу, отсутствующую в нативном субстрате
- Активный центр блокируется в результате образования ковалентной связи

Слайд 38

2. Суицидное ингибирование

- Аналог субстрата трансформируется как результат ферментативной активности,
- однако продукт превращения субстрата не диссоциирует из активного центра, из-за образования прочных связей

Слайд 39

3. Transition-state analogs

- **Definition.** These are substrate analogs whose structures closely resemble the transition state of the natural substrate.
- **Action.** Transition-state analogs do not covalently modify the enzyme but bind the active site so tightly that they irreversibly inactivate it.

Слайд 40

Значение изучения и использования в медицине ингибиторов

- Дают информацию о строении АКЦ Е, о составе его функциональных групп и природе химических связей;
- применяются при изучении изоферментов, отличающихся различной чувствительностью к I;
- в основе действия некоторых токсинов и ядов – ингибирование Е (НСN – дитохромы, ФОС – холинэстеразу);
- многие лекарства – конкурентные I Е (аллопуринол – I ксантиноксидазы, дикумарол – I г-глютамилкарбоксилазы, аспирин – ЦОГ, сульфаниламиды – структурные аналоги ПАБК – конкурентные I Е, необходимого микроорганизмам для синтеза фолиевой кислоты (ФК), прозерин – I холинэстеразы и др);
- I могут быть аналоги коферментов (аналог витамина ФК ампициллин - антибиотик - лечебный препарат);
- Активаторы Е (НСI - пепсин желудочного сока, желчные кислоты – панкреатическую липазу).

Слайд 41

Examples of Enzyme Inhibitors with Therapeutic Applications

Inhibitor	Target Enzyme	Effect or Application
Allopurinol	Xanthine oxidase	Treatment of gout
Aspirin	Cyclooxygenase	Antiinflammatory agent
5-Fluorouracil	Thymidylate synthetase	Antineoplastic agent
Lovastatin	HMG-CoA reductase	Cholesterol-lowering agent
Pargyline	Monoamine oxidase	Antihypertensive agent
Penicillin	Transpeptidase	Antibacterial agent

HMG-CoA = 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A.

Слайд 42

Мультимолекулярные (мультиэнзимные) ферментные системы

- ассоциация Е и коферментов в единый комплекс, имеет в составе разные Е, катализирующие последовательные превращения какого-либо S. Особенности:
- прочность ассоциации Е;
- промежуточные продукты передаются от одного АКЦ к другому, что делает работу мультиэнзимного комплекса эффективным.
- Примеры: ПДГ и α -кетоглутаратдегидрогеназный комплексы (окислительное декарбоксилирование ПВК и α -кетоглутарата), а также синтетаза ВЖК.

Слайд 43

Субклеточная локализация ферментов

Е расположены в различных органеллах соответственно их функции. Различные отсеки (комартменты) клетки различаются по набору Е и метаболизму – компартиментализация метаболизма.

- ⊙ в цитозоле (растворимая фракция) – Е гликолиза, пентозофосфатного пути распада глюкозы, активации АК, синтеза и распада гликогена, синтаза ВЖК и др;
- ⊙ в митохондриях (МТХ) – обменные процессы, обеспечивающие клетку энергией, т.е. ферменты ЦТК, окислительного фосфорилирования, окисления ЖК, ГДГ, синтаза δ- А.ПК и др;

Слайд 44

Субклеточная локализация ферментов

⊙ Лизосомы участвуют в процессах внутриклеточного переваривания, содержат 30 Е – в основном гидролазы: РНК-азы, эстеразы, протеазы. Лизосомальные Е участвуют в воспалительных процессах, повреждении клеток и некоторых наследственных заболеваниях метаболизма;

- ⊙ микросомальная фракция включает рибосомы и эндоплазматической ретикулум, содержит Е синтеза белков, аденил эстеразу, пероксилазину, глюкозо-6-фосфатазу, γ-глутамилтрансферазу и др;
- ⊙ ядро – 40 ферментов, в том числе репликативный комплекс, РНК – полимеразу и др;
- ⊙ клеточная (плазматическая) мембрана – ферменты транспорта веществ – транслоказы, аденилатиклаза (АЦ), γ - глутамилтрансфераза и др.

Слайд 45

Органоспецифические ферменты

Е, которые - только в одном-двух органах:

- ⊙ фруктозо 1-фосфаталядолаза, орнитинкарбамонлтрансфераза и урокиназа – в печени;
- ⊙ гистадаза – в печени и эпидермисе;
- ⊙ трансамидиназа – в почках и поджелудочной железе;
- ⊙ креатинкиназа – в сердечной и скелетной мышцах;
- ⊙ кислая фосфатаза – в предстательной железе, малоактивна в др. органах и т.д.

Слайд 46

Изоферменты

- изоферменты - белки, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся по первичной структуре, физико-химическим свойствам (молекулярной массой, средству к S, Vмакс, Km, ЭФ подвижностью, оптимуму pH и t, регуляторными свойствами), локализацией в клетке и органах.
- изоферменты – продукты экспрессии разных генов, т.е. различия между Е обусловлены генетически, а не вызваны посттрансляционными модификациями.

Слайд 47

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

- ПИРУВАТ +НАДН₂ ↔ ЛАКТАТ + НАД⁺
- ЛДГ -тетрамер из Н и М субъединиц, имеет 5 изоферментов.
- ЛДГ-1 НННН при ЭФ - с наибольшей скоростью к + (↑ при остром инфаркте миокарда)
- ЛДГ- 2 НННМ
- ЛДГ- 3 ННММ
- ЛДГ- 4 НМММ
- ЛДГ - 5 ММММ (↑ при заболеваниях печени)

Слайд 48

Лактатдегидрогеназа

Lactate Dehydrogenase Isozyme	Subunits
I ₁ (↑ under myocardial infarction)	НННН
I ₂	НННМ
I ₃	ННММ
I ₄	НМММ
I ₅	ММММ

Слайд 49

Креатинкиназа

- Креатинкиназа (КК) катализирует реакцию:
 $\text{КРЕАТИНФОСФАТ} + \text{АДФ} \leftrightarrow \text{КРЕАТИН} + \text{АТФ}$
имеет В и М протомеры.

3 изофермента:

- КК₁ ВВ – мозг
- КК₂ МВ – сердце (↑ при инфаркте миокарда)
- КК₃ ММ – скелетная мускулатура (↑ при травмах мышц и мышечных дистрофиях)

Слайд 50

Определение активности ферментов

- при оптимальных условиях:

- pH
- t°
- полном насыщении Е субстратом.

V ферментативной реакции пропорциональна [Е].

О скорости Е реакции судят или по скорости убыли S или по скорости образования P реакции.

Слайд 51

Единицы активности ферментов

- Международная единица активности (МЕ или U или U_{int}) - количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль вещества за 1 мин (мкмоль/мин):

$$1 \text{ ME} = \frac{1 \text{ мкмоль превращенного субстрата}}{1 \text{ мин}}$$

Количество превращенного субстрата (мкмоль)

$$\text{Активность в ME} = \frac{\text{Количество превращенного субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)}}$$

Слайд 52

Единицы активности ферментов

- В системе единиц СИ – катал (кат) – количество Е, которое превращает 1 моль S за 1 секунду (1 моль/с).

$$п \text{ катал} = \frac{\text{Количество превращенного субстрата}}{\text{Время (с)}}$$

- Удельная активность Е – число единиц ферментативной активности на 1 мг белка (мкмоль/мин/мг)

$$\text{Уд. ак} = \frac{\text{Количество превращенного субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)} \times \text{масса белка (мг)}}$$

Слайд 53

Проблемы медицинской энзимологии

3 направления:
энзимопатология,
энзимодиагностика,
энзимотерапия.

- энзимопатология (развитие некоторых болезней — энзимопатий, напр. галактоземии, фенилкетонурии, связано с наследственной недостаточностью или полным отсутствием синтеза даже одного Е; в основе патогенеза многих соматических заболеваний — нарушение регуляции и синтеза Е).

Слайд 54

Энзимодиагностика

- энзимодиагностика — 2 пути:
- диагностика заболеваний по активности Е в биологических жидкостях,
- использование Е как аналитических реагентов в клиничко-диагностических лабораториях для измерения концентрации глюкозы, ТАГ, ХС, мочевины в крови.

Слайд 61

Ферменты как диагностические реагенты

- **Description.** Many purified enzymes are now commercially available for use in the determination of components in blood and tissues. Such enzymatic assays are usually more specific, more sensitive, and faster than chemical determinations.
- **Clinical use.** Examples of clinically relevant compounds that can be determined enzymatically include glucose, urea, ethanol, and triglycerides.

Слайд 62

Использование ферментов как диагностических реагентов

Glucose oxydase	Determination of serum glucose level
Cholesterol oxydase	Determination of serum cholesterol level
Lipase	Determination of triacylglycerol level
Urease	Determination of serum urea level

Слайд 63

Иммобилизованные ферменты

- Фермент, ковалентно пришитый к любому органическому или неорганическому полимерному носителю – иммобилизованный. Иммобилизация Е обеспечивает высокую специфичность их действия, повышение стабильности. Иммобилизованные Е используются в промышленности (в том числе фармацевтической).
