

# ЕНЗИМИ

**Цел:** Да се характеризират ензимите като биокатализатори, да се опишат възможностите за тяхната регулация и да се покаже ползата от тези познания за клиничната практика.

**След работа с този раздел студентите ще могат да постигнат следните учебни цели:**

## А. Знания

1. да дадат определение за ензими, значение и видове;
2. да дадат определение за простетични групи и коензими и да дадат конкретни примери;
3. да опишат принципите за ензимната класификация и номенклатура и да ги подкрепят с конкретни примери;
4. да дадат определение за активен център;
5. да опишат как скоростта на ензимната реакция зависи от субстратната концентрация при ензими, подчиняващи се на Михаелис-Ментенова кинетика (да познават двете форми на уравнението на Михаелис-Ментен);
6. да дефинират кинетичните параметри на ензимната реакция  $K_m$  и  $V_{max}$  и как се определят чрез уравнението на Lineweaver-Burk;
7. да опишат как рН и температурата влияят на скоростта на ензимната реакция;
8. да опишат как ефектори (инхибитори и активатори) повлияват скоростта на ензимната реакция;
9. да изброят единиците за ензимна активност;

## Б. Разбирания

1. да обяснят приликите и разликите на ензимите с останалите катализатори;
2. да обяснят механизма на ензимно-катализираните реакции;
3. да обяснят ролята на витамините;
4. да разбират ролята на активния център и на останалата част от ензимната молекула;
5. да обяснят реакционната и субстратната специфичност на ензимите;
6. да обяснят защо зависимостта на скоростта на ензимните реакции от субстратната концентрация е хипербола, а не права линия както при химичните реакции;
7. да обяснят значението на  $K_m$  и  $V_{max}$ ;
8. да обяснят хода на кривата за зависимостта на скоростта на ензимната реакция от рН и температурата;
9. да обяснят разликите между конкурентни и неконкурентни инхибитори;
10. да обяснят основните характеристики на алостеричното повлияване;
11. да обяснят основните характеристики на фосфорилирането-дефосфорилирането и да дадат конкретен пример;

## В. Умения

1. да прилагат знанията си върху нуклеотиди и витамини, за да представят с формули никотинамидни и флавинови коензими;
2. да могат при зададена реакция да определят главната група на ензима, катализиращ реакцията;
3. при зададена стойност на  $K_m$  да могат да преценяват какво е сродството между ензима и субстрата;
4. да анализират уравнението на Михаелис-Ментен и да изведат дефиницията за  $K_m$ ;
5. да приложат познанията върху алостерично повлияване, за да обяснят оротатемия и подагра при някои пациенти;
6. да приложат познанията върху рН зависимостта на ензимната активност и върху  $K_m$ , за да обяснят повишена чувствителност към алкохол в някои пациенти с променени

- активности на алкохолдехидрогеназа и ацеталдехиддехидрогеназа;
7. да прилагат познанията си върху ензими за решаване на клинични случаи с инфаркт на миокарда - диагностика и терапия;
  8. да прилагат познанията си върху ензими за разбиране механизма на различни генетично обусловени ензимопатии (оротатурия, фенилкетонурия, различни случаи на подагра, синдром на Lesh-Nihan);
  9. да илюстрират принципа на метода Elisa.

#### 4.1 Обща характеристика на ензимите

##### 4.1.1 Резюме

Разбирането и възможностите за повлияване на всеки жизнен процес в норма и патология е немислимо без познаване на учението за ензимите.

Ензимите са биологични катализатори, за които са валидни всички общи свойства на катализаторите. Отличават се от тях по изключително високата си ефективност, специфичност (субстратна и реакционна) и възможността за регулация на активността и синтеза им.

Ензимите са високоспециализирани белтъчни молекули, които биват еднокомпонентни (съдържащи само белтъчна част) и двукомпонентни (съдържащи белтъчна и небелтъчна част). Ако връзката между двете съставни части е слаба, небелтъчната част се нарича коензим, ако връзката между двете части е здрава, ковалентна - небелтъчната част се определя като простетична група. Ролята на коензими и простетични групи се изпълнява от витамини или техни производни, от някои метални йони, фосфатни остатъци и др. От химична гледна точка част от коензимите са нуклеотиди, напр. АТФ. Някои от нуклеотидните коензими са едновременно и производни на витамини, напр. НАД, ФАД и др.

Броят на ензимите, участващи в осъществяване на метаболизма на клетката надвишава 3000. Те са разпределени в шест главни групи: I. Оксидоредуктази; II. Трансферази; III. Хидролази, IV. Лиази, V. Изомерази, VI. Синтетази.

Ензимното име има две части: напр. сукцинат дехидрогеназа. Първата част дава името на субстрата, а втората посочва типа на катализираната реакция. Всеки ензим има кодов номер, състоящ се от четири цифри. Първата дава типа на реакцията (главната група); втората и третата цифри дават допълнителна информация за характера и механизма на реакцията (определят подгрупата и подподгрупата). Четвъртата цифра е индивидуалният номер на ензима.

Активният център е малка част по повърхността на ензимната молекула, където се свързва субстратът, за да се превърне в продукт. В еднокомпонентните ензими активният център се състои от няколко отдалечени по протежение на веригата аминокиселинни остатъци, които са близко в пространството поради формираната третична структура на белтъчната молекула. От функционална гледна точка различните химични групи в активния център се определят като каталитични и контактни. В двукомпонентните ензими за формиране на активния център

групи предоставя и небелтъчната съставка. Тя предлага най-често каталитични групи, оставяйки за апоензима контактната функция.

Специфичността, реакционна и субстратна, е едно от най-съществените свойства на ензимите. Реакционната специфичност се определя от възможностите на групите в активния център да образуват или разграждат определен тип химични връзки. Субстратната специфичност се обяснява с високите стерични изисквания на активния център спрямо субстрата, произтичащи от определена ензимна конформация. Има различни модели за обяснение на субстратната специфичност: 1) на Фишер (абсолютно структурно и геометрично съответствие между активния център и субстрата), валиден за малък брой абсолютно специфични ензими; и 2) на Кошланд (индуцирано структурно притъкмяване плюс субстратно напрежение), валиден за повечето ензими. Стереоспецифичността се обяснява с множествено свързване на субстрата към активния център.

#### 4.1.2 Значение на ензимите

Учението за ензимите е основа на нашите познания върху всеки жизнен процес в норма и патология. Всеки физиологичен процес протича благодарение на каталитичното действие на определени ензими. Много заболявания непосредствено възникват от нарушения в ензимната катализа. Определянето на ензимни активности в кръв и други биологични течности дава ценни сведения за медицинската диагностика. Ензими се използват и за терапия при някои заболявания, напр. инфаркт на миокарда.

Поради това изучаването на особеностите на ензимите и на катализираните от тях реакции е рационален и съвременен подход в медицината.

#### 4.1.3 Определение и общи свойства на ензимите като катализатори

Ензимите са биокатализатори, ускоряващи определени химични реакции в клетката. Болшинството от ензимите са белтъци, предимно глобуларни. Отскоро се знае, че малка част от РНК, наречени рибозими (виж глава 3), също действат като биокатализатори. Тази глава е посветена на ензимите с белтъчна природа.

За ензимите са валидни всички общи свойства на катализаторите:

- 1) Увеличават скоростта на спонтанно протичащи реакции, без да изместват химичното равновесие.
- 2) Променят в еднаква степен скоростта на правата и на обратната реакция до достигане на химично равновесие.
- 3) Действуват в незначителни количества.
- 4) Понижават активиращата енергия на реакцията.

Ензимите, както и другите катализатори, снижават активиращата енергия, защото провеждат реакцията по друг път с по-ниски енергетични изисквания. Характерно е образуването на междинно съединение между изходното вещество (т.н. субстрат) и ензима, което се нарича ензим-субстратен комплекс. Възможно е да се образуват няколко междинни съединения. Независимо колко са междинните фази, активиращата им енергия е винаги по-ниска от тази за некатализираната реакция.

#### 4.1.4 Разлики между ензимите и останалите катализатори

Ензимите са високо специализирани белтъчни молекули. Отличават се от останалите катализатори по следните показатели:

1) Ензимите имат изключително висока ефективност - те ускоряват скоростта от  $10^9$  до  $10^{12}$  пъти. Като пример е дадена реакцията на разграждане на  $H_2O_2$  до вода и кислород. (вж табл. 4-1).

**Табл. 4-1.** Ефективност на ензимното действие. Сравнение на ензима каталаза с други катализатори [1].

Катализатор	Активираща енергия* (kJ/mol)	Увеличение на реакционната скорост
Без катализатор	75	1
Йодид	58	$8 \cdot 10^2$
Колоидна платина	50	$2 \cdot 10^4$
Каталаза	8	$3 \cdot 10^{11}$

\*Активираща енергия е количеството енергия, необходима за преминаване на всички молекули от едно вещество в активирано състояние. Енергетичната бариера на реакцията е разликата между активиращата енергия и средната енергия.

2) Въпреки че като общ клас съединения ензимите са катализатори с изключително широк спектър на действие и на практика катализират всички известни реакции в организмите, отделният ензим проявява висока специфичност по отношение природата на реакцията и структурата на субстрата.

3) Действат обикновено при по-меки условия - атмосферно налягане, рН около неутралното, невисока температура.

4) Активността и синтезата на ензимите в клетките строго се регулират.

## 4.1.5 Коензими и простетични групи

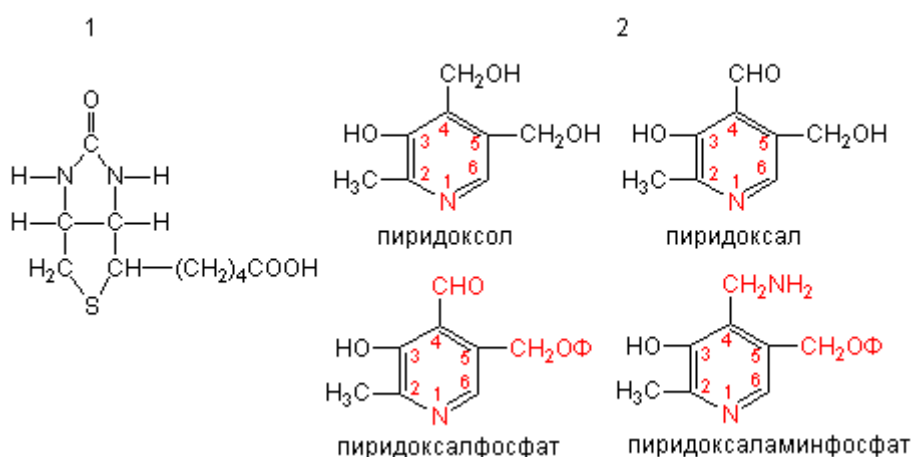
Освен еднокомпонентни, има и двукомпонентни ензими, които съдържат белтъчна съставка (апоензим) и небелтъчна съставка. Апоензимът е термолабилен, високомолекулен и не диализира през полупропускливи мембрани. Небелтъчната съставка е термостабилно, нискомолекулно вещество, което диализира през полупропускливи мембрани. Двукомпонентният ензим се означава като холоензим. В зависимост от дисоциацията на холоензима до апоензим и небелтъчна съставка, дисоциационната константа  $K$  има различни стойности (4.1.1). При ниски стойности на  $K$  преобладава холоензимът, т.е. връзката между апоензима и небелтъчната съставка е здрава и небелтъчната съставка се нарича простетична група. Ако връзката с апоензима е слаба, небелтъчната съставка се нарича коензим.



$$K = \frac{[\text{апоензим}] [\text{небелтъчна съставка}]}{[\text{холоензим}]} \quad (4.1.1)$$

- 1) ако  $K$  е ниска или  $\rightarrow 0$   
здрава връзка, простетична група
- 2) ако  $K$  е висока  
слаба връзка, коензим

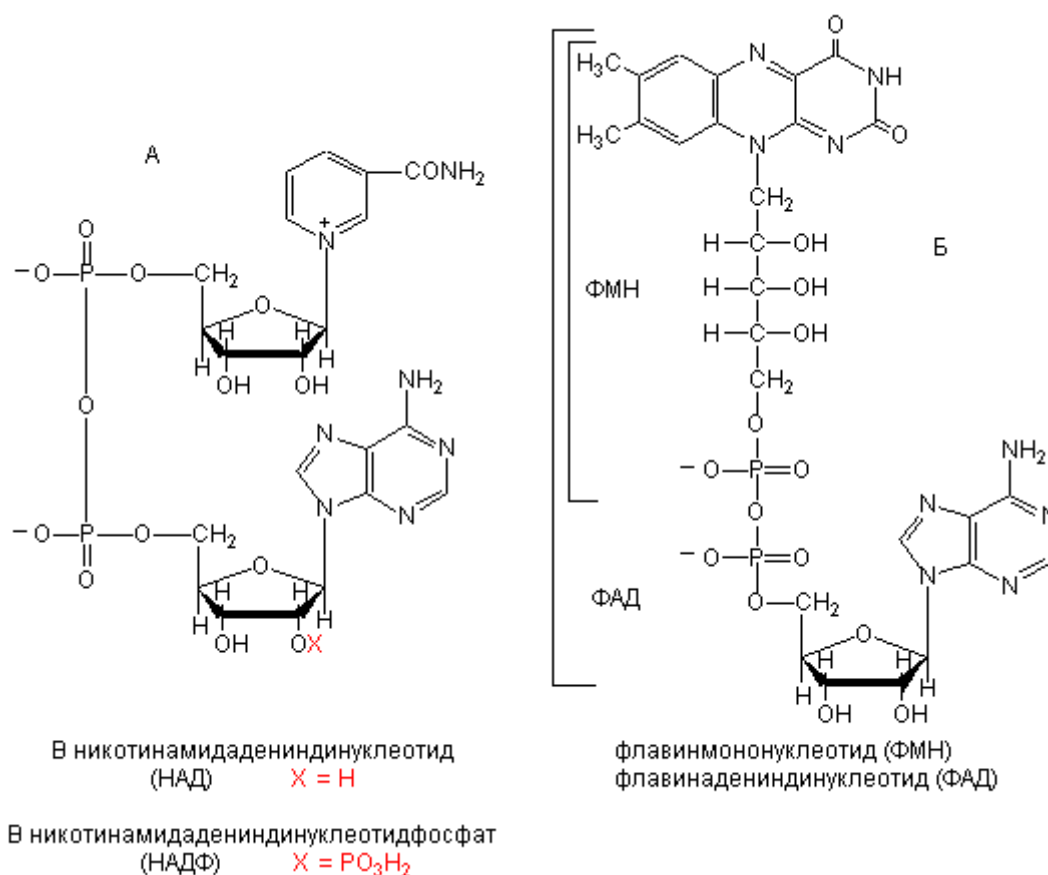
Като коензими или простетични групи функционират витамини или техни производни (витамините се синтезират в растенията и постъпват в организма на животните и човека с храната). Напр. витамин Н или биотин (фиг. 4-1-1) е простетична група на карбоксилази, свързана към апоензима с ковалентна връзка. Пиридоксалфосфат и пиридоксаминфосфат, близки производни на витамин В<sub>6</sub> (пиридоксол), са коензим на трансминази (фиг. 4-1-2-2). Метални йони и фосфатни остатъци често действат като простетични групи.



Фиг. 4-1. Примери за коензими и простетични групи.

- 1 - витамин Н (биотин) - простетична група на карбоксилази;
- 2 - витамин В<sub>6</sub> (пиридоксол), пиридоксал и активните производни пиридоксалфосфат и пиридоксаминфосфат, коензими на трансминази.

От химична гледна точка част от коензимите са нуклеотиди - напр. **АТФ** е преносител на фосфатна група и енергия. Други нуклеотидни коензими (фиг. 4-2) са едновременно и производни на витамини - напр. никотинамидаденин динуклеотид (НАД), пренасящ водород, е динуклеотид, който съдържа аденилов нуклеотид и друг нуклеотид с никотинамидна база. Последната е всъщност витамин РР. Подобен е случаят и с други Н-пренасящи коензими като флавинмоноклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). ФМН и ФАД съдържат базата рибофлавин (витамин В<sub>2</sub>).



**Фиг. 4-2.** Примери за нуклеотиди, съдържащи витамини и изпълняващи ролята на коензими.

А - никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ);

Б - флавиномононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД).

В зависимост от своята функция небелтъчните съставки се разделят на четири групи - вж табл. 4-2. Таблицата е почти изчерпателна, а от това ще заключим, че броят на коензимите не е много голям. Едни и същи коензими оперират с много ензими - напр.  $NAD^+$  е коензим на стотици дехидрогенази. Някои коензими участват в различни от химична гледна точка процеси - напр. пиридоксалфосфат взема участие както при трансаминиране, така и при декарбоксилиране на аминокиселини.

Табл. 4-2. Функции на коензимите и простетичните групи и връзки с витамините [2].

Коензим (простетична група) и функция	Съкращение	Име на съдържащия се витамин
I. Пренасящи водород		
1. никотинамидадениндинуклеотид	НАД	РР (никотинамид)
2. никотинамидадениндинуклеотидфосфат	НАДФ	РР (никотинамид)
3. флавиномононуклеотид	ФМН	В <sub>2</sub> (рибофлавин)
4. флавинадениндинуклеотид	ФАД	В <sub>2</sub> (рибофлавин)
5. убихинон	УХ	-
6. липоева к-на (липоат)	ЛК	-
II. Пренасящи групи		
7. Аденозинтрифосфат - пренася фосфатна група или АМФ-остатък	АТФ	-
8. пиридоксалфосфат - пренася аминогрупа	ПФ	витамин В <sub>6</sub> (пиридоксол)
9. уридиндифосфат - пренася гликозилни групи	УДФ	-
10. цитидиндифосфат - пренася фосфохолин	ЦДФ	-
11. аденозилметионин - пренася метилова група	-	-
12. тетраhydrofolat - пренася С <sub>1</sub> групи	ФН <sub>4</sub>	фолиева киселина
13. биотин - пренася -СООН група	-	биотин (витамин Н)
14. Коензим А - пренася ацилни групи	КоА	пантотенова киселина
15. тиаминпирофосфат - пренася С <sub>2</sub> групи	ТФФ	тиамин (витамин В <sub>1</sub> )
III. Коензими на изомеризиращи и лиази		
16. уридиндифосфат - изомеризиране на въглехидрати	УДФ	-



17. пиридоксалфосфат - декарбоксилиране на аминокиселини	ПФ	пиридоксол (витамин В <sub>6</sub> )
18. тиаминпирофосфат - декарбоксилиране на алфа-кетокиселини	ТФФ	тиамин (витамин В <sub>1</sub> )
19. метилкобаламин - вътрешномолекулни премествания на групи	-	В <sub>12</sub> (кобаламин)

#### 4.1.6 Номенклатура и класификация на ензимите

Понастоящем са известни над 3000 ензима.

Международният съюз по биохимия и молекулярна биология (IUBMB) е възприел система за ензимна номенклатура, която позволява класификацията да бъде недвусмислена, трайна и всеки новооткрит ензим да намира мястото си в нея [3].

Характерни за класификацията са следните особености:

- 1) Реакциите и ензимите, които ги катализират, се разделят на 6 големи групи, всяка от които съдържа от 4 до 13 подгрупи.
- 2) Ензимното име има 2 части.

Например за ензима малат дехидрогеназа първата част съобщава името на субстрата (в случая малат) или субстратите. Втората част, окончаваща на -аза (в случая дехидрогеназа), посочва типа на катализираната реакция.

- 3) Всеки ензим има кодов номер, състоящ се от 4 числа. Първото дава типа на реакцията (главната група); второто определя подгрупата, третото - подподгрупата и четвъртото е индивидуалният номер на ензима.

Напр. кодовият номер ЕС. 1.9.3.1 определя цитохром с оксидазата:

1 - главна група - оксидоредуктаза;

9 - подгрупа 9 - отнема електрони от хемни групи като донатор;

3 - подподгрупа 3 - предава електрони на кислород като акцептор,

1 - цитохром с оксидаза - първи ензим в подподгрупа 3, окисляващ цитохром с

Съкращението ЕС идва от Enzyme Commission (Ензимна Комисия).

Заради яснотата и недвусмислеността си тази система е препоръчвана за употреба при научните изследвания [1]. В учебниците и в клиничната практика се допуска употребата на по-кратки названия на ензимите.

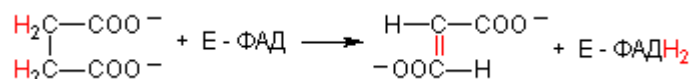
#### 4.1.7 Кратка характеристика на шестте главни групи ензимно-катализирани реакции

##### I. Окислително-редукционни реакции

Ензимите се наричат оксидоредуктази. Те катализират окислително-редукционни реакции.

Под действие на дехидрогенази от различни субстрати се отделят 2 атома водород.

Под действие на транселектронази се пренасят по 2 електрона. По-рядко в субстратите директно се внася кислород под действие на хидроксилази и оксигенази. По-долу е даден пример за сукцинат дехидрогеназа, която окислява сукцинат до фумарат (фиг. 4-3-1).



**Фиг. 4-3-1.** Пример за оксидоредуктаза.

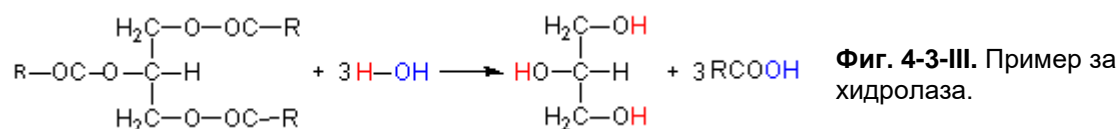
## II. Трансферазни реакции (прехвърляне на групи)

Ензимите са трансферази. Те катализират реакции на прехвърляне. Прехвърлят се разнообразни групи - съдържащи 1 въглероден атом (метилова, хидроксиметилова, формилова групи), ацилни радикали, гликозилни групи, аминок-групи, фосфатни групи и др. По-долу е даден пример за фосфотрансферазата хексокиназа, която пренася фосфатна група от АТФ върху глюкоза (фиг. 4-3-II).

глюкоза + АТФ  $\longrightarrow$  глюкозо - 6 - фосфат **Фиг. 4-3-II.** Пример за трансфераза.

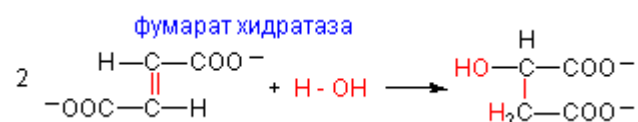
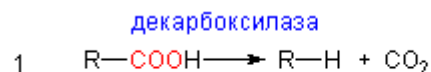
## III. Реакции на хидролиза

Ензимите са хидролази. В присъствие на вода те катализират реакции на хидролиза. Хидролизират се различни типове ковалентни връзки - естерни, киселинноамидни, пептидни, гликозидни, етерни, киселинно-анхидридни и др. По-долу е даден пример за хидролазата триацилглицерол липаза, която хидролизира триацилглицероли (мазнини) до глицерол и висши мастни киселини (фиг. 4-3-III).



## IV. Лиазни реакции

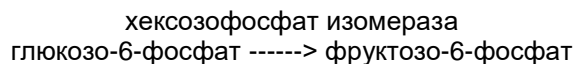
Ензимите са лиази. Те катализират процеси, при които една молекула се разгражда до две молекули, например декарбоксилаза (фиг. 4-3-IV-1). Често лиазните реакции са обратими - от две молекули се образува една нова - напр. виж присъединяване на вода към двойна връзка под действие на фумарат хидратаза (фиг. 4-3-IV-2). В една от подгрупите ензимите се наричат синтази. Не трябва да се бъркат със синтетазите от VI група.



**Фиг. 4-3-IV.** Пример за лиази.

## V. Изомеразни реакции

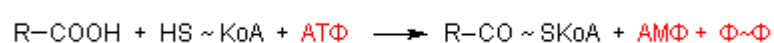
Ензимите са изомеразни. Изомеразните реакции могат да протичат като цис-транс-превръщане, вътрешномолекулярна оксидоредукция, вътрешномолекулярно пренасяне на групи и пр. Даден е пример за хексозофосфат изомераса, която превръща глюкозо-6-фосфат във фруктозо-6-фосфат (фиг. 4-3-V).



**Фиг. 4-3-V.** Пример за изомераса.

## VI. Лигазни (синтетазни) реакции

Ензимите са лигази (синтетази). При тези реакции от две молекули се синтезира нова молекула. Всяка синтеза е ендергонична и термодинамично невъзможна. Тя става възможна само ако се спрегне с едновременно протичаща силно екзергонична реакция (напр. хидролиза на АТФ). Лигазите (синтетазите) спрягат двата процеса. Даден е пример за ацил-КоА синтетаза, която образува ацил-КоА от мастна киселина и КоА с участието на АТФ (фиг. 4-3-VI).



**Фиг. 4-3-VI.** Пример за лигаза (синтетаза)

### Забележки:

Вода участва и при хидролизните процеси, и при лиазните, но по различен начин. Разликата между синтази и синтетази е, че само синтетазите изискват енергия, най-често под форма на АТФ.

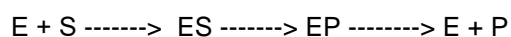
### 4.1.8 Представа за механизъм на ензимната катализа

Въпреки че в края на реакцията ензимите като катализатори се възстановяват непроменени, те фактически участват активно в хода на реакцията - образуват със субстрата (S) междинен ензимно-субстратен комплекс (ES).

ES комплекси са много нестабилни, имат къс живот, трудно се изолират и изучават. Не при всички ензимни белтъци се знае детайлната пространствена организация, което също затруднява изучаването на ES комплекси. Но има доказателства, че те наистина възникват:

- промяна в спектъра на ензима при взаимодействие със субстрата - напр. при пероксидаза с простетична група хем;
- чрез рентгеноструктурен анализ са получени преки доказателства за образуване на ES комплекси;
- изолиране на комплекси между ензим и инхибитор, който е структурен аналог на субстрата. Тези комплекси са по-стабилни и по-лесно се изолират.

В най-общ вид ензимно-катализираната реакция протича по следния начин:



В рамките на този комплекс субстратът се преобразува в продукт на реакцията (P), временно свързан с ензима като ензим-продуктен комплекс (EP). Продуктът се освобождава от ензима, който може отново да свърже нова молекула субстрат. Всеки от трите съставни процеса притежава своя активираща енергия, по-ниска от енергията на некатализирания процес.

Активиращата енергия може да се понижи по четири различни механизма:

- 1) киселинно-основна катализа (напр. при рибонуклеаза);
- 2) индуциране на напрежение в субстратната молекула (напр. при лизозим);
- 3) ковалентна катализа (напр. при серинови протеази);
- 4) ентропийни ефекти.

Тези механизми не са предмет на този въвеждащ курс. Често ензимните реакции са от смесен тип. Напр. при лизозим се наблюдава комбинация от първите два механизма.

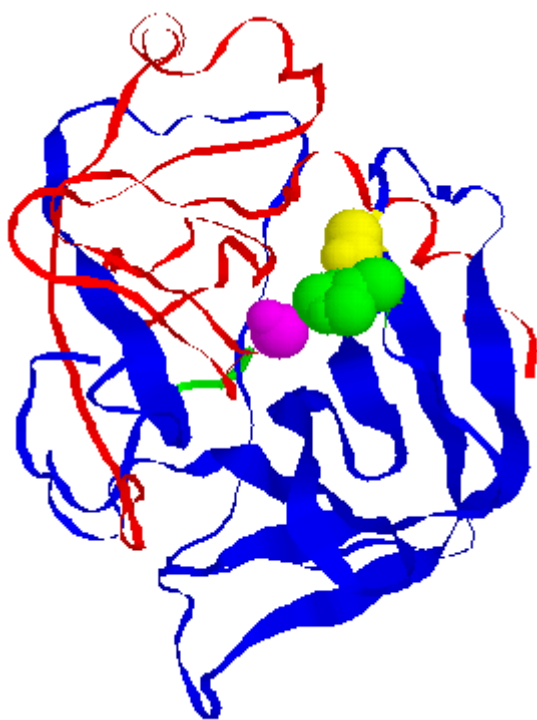
При реакциите, в които участва повече от един субстрат, или пък като втори субстрат действа някакъв коензим, реакцията протича по два главни механизма:

- 1) т.н. "пинг-понг"-механизъм (напр. при трансаминиране (глава 8);
- 2) последователен механизъм, като редът на свързването на субстратите може да бъде случаен или определен. Последователен механизъм се наблюдава при дехидрогеназите, в които ролята на втори субстрат се изпълнява от редокссистема.

## 4.1.9 Активен център

Ензимът взаимодейства със субстрата чрез своя активен център. Активният център е неголям участък по повърхността на ензимната молекула, където субстратът се свързва и се превръща в продукт.

В еднокомпонентни ензими активният център се състои от няколко аминокиселинни остатъка, които са отдалечени по протежение на полипептидната верига, но са близко разположени в пространството поради формиране на третична структура на белтъка. Напр. в активния център на химотрипсин участват Хис57, Асп102 и Сер195 (фиг. 4-4).



**Фиг. 4-4.** Представа за активен център в ензимната молекула.

Изображение на химотрипсин.

Аминокиселинните остатъци в активния център са представени с пълен пространствен модел (full space), както следва: Хис57 в зелено, Асп102 в жълто и Сер195 във виолетово.

Полипептидните вериги са в червено и синьо, модел тип "панделка". Образът е получен с програмата RasWin [4], ползвайки атомните координати на химотрипсин от файл 2cha.pdb [5] от PDB [6].

От химична гледна точка групите в активния център могат да бъдат най-различни -SH, -NH<sub>2</sub>, -OH, имидазолово ядро и пр. От функционална гледна точка според Кошланд се различават 2 вида групи (фиг. 4-5), участващи в активния център:

- каталитични (вземат пряко участие в реакциите на превръщане на субстрата в продукт).
- контактни (прикрепват субстрата към активния център така, че атакуемата от ензима връзка да попадне в обсега на действие на каталитичните групи). В случаите, когато катализираната реакция изисква включването на две или повече различни субстратни молекули, контактните групи ги довеждат до най-благоприятна за реагиране позиция. Така контактните групи съдействат най-много за високата скорост на ензимно катализираните реакции.

Блокирането на каталитични или контактни групи води до загуба на езимната активност.



**Фиг. 4-5.** Схематично представяне на функционалните групи в активния център в ензима (по Т. Николов [2] с разрешение): каталитични групи - червен цвят; контактни - син; конформационни групи извън активния център - зелен цвят. Несъществените за ензимната активност групи са нецветени.

Освен това важни са и т.н. конформационни или помощни групи, които са извън активния център, но именно те фиксират определена пространствена конформация на ензимната молекула. Атакуването на връзки между тези групи при денатурация също води до загуба на биологичната активност. В огромната ензимна молекула има и групи, които не са от значение за ензимната активност. Модифицирането им не променя активността. Те обаче могат да са от значение за регулиране на ензимната активност под действие на различни фактори.

При двукомпонентните ензими в активния център групи предоставя и небелтъчната съставка. Тя предлага най-често каталитични групи, оставяйки за апоензима контактната функция. Например различни редокссистеми (НАД, ФАД или др.) предоставят групи, които отнемат водород от различни субстрати на дехидрогеназите.

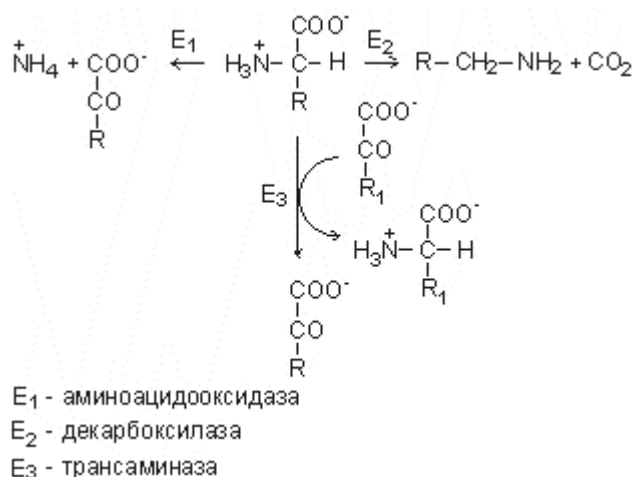
При ензими с четвъртична структура има различни възможности за оформяне на активния център - той може да бъде общ за цялостния комплекс от субединици, или всяка субединица да има свой отделен активен център. Възможно е някои субединици да носят каталитични центрове, а други субединици да поемат регулаторни функции поради наличието на т.н. алостерични центрове, на които ще се спрем по-късно.

#### 4.1.10 Специфичност на ензимното действие

Представата за механизма на ензимно-субстратното взаимодействие чрез активния център на ензима обяснява добре защо ензимите са най-специфичните катализатори в сравнение с всички останали катализатори. Специфичността, реакционна и субстратна, е едно от най-съществените свойства на ензимите.

## 4.1.10.1 Реакционна специфичност

Реакционната специфичност се определя от възможностите на включените в активния център аминокиселинни остатъци да образуват или разграждат определен тип химични връзки. Пример за различна реакционна специфичност е даден на фиг. 4-6, където три различни ензими аминокиселинооксидази ( $E_1$ ), трансминази ( $E_2$ ) и декарбоксилази ( $E_3$ ) превръщат един и същи субстрат (аминокиселини) в три различни процеса до различни продукти (за подробности виж глава 8):



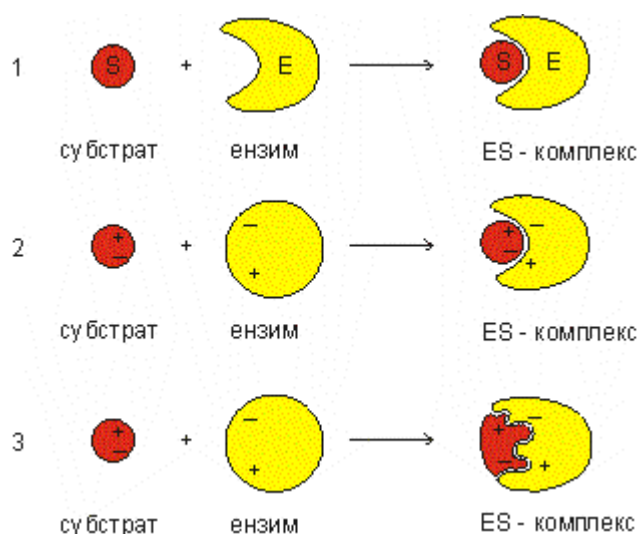
**Фиг. 4-6.** Различна реакционна специфичност на аминокиселинооксидази, трансминази и декарбоксилази на аминокиселини.

## 4.1.10.2 Субстратна специфичност

Субстратната специфичност се обяснява с високите стерични изисквания на активния център спрямо субстрата, произтичащи от определена ензимна конформация. Чрез пространствената организация на ензима се създава много добро химично и структурно съответствие на контактните и каталитичните групи в активния център към съответните групи от субстрата. Молекулните размери и разположението на йонни групи и хидрофобни участъци в ензима осигуряват възможност за свързване на определен, понякога единствен субстрат. Други ензими проявяват известна толерантност и могат да въздействат на няколко близки по структура субстрати. Например хексокиназата катализира фосфорилирането на глюкоза, фруктоза, маноза, глюкозамин и 2-дезоксиглюкоза, но с различна скорост.

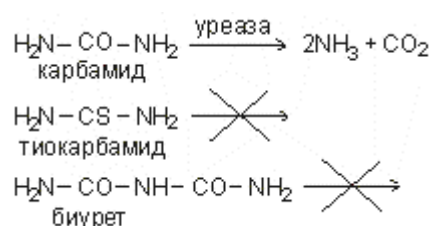
Съществуват различни модели за обясняване на субстратната специфичност на ензимите.

Според модела на Фишер съществува априори абсолютно структурно и геометрично съответствие между активния център и субстратната молекула, така както е съответствието между секретна брава и ключ (фиг. 4-7-1). Водородни, йонни връзки и хидрофобни взаимодействия допринасят за свързването между ензима и субстрата. Този модел добре обяснява абсолютната субстратна специфичност при малък брой ензими - напр. уреазата (фиг. 4-8), аргиназа, сукцинат дехидрогеназа, аминок-ацил-тРНК синтетази. Уреазата катализира единствено разграждането на уреа до амоняк и въглероден двуокис. Субстрати като тиокарбамид (има геометрично, но липсва химично съответствие) или биурет (има химично, но не и геометрично съответствие) не влизат в активния център. Изследвани са стотици съединения и резултатът е все един и същ - уреазата има един единствен субстрат. Абсолютната специфичност на аминок-ацил-тРНК синтетазите осигурява недопускане на грешки при белтъчната биосинтеза.



**Фиг. 4-7.** Модели за взаимодействието между субстрата и активния център на ензима

- 1 - Абсолютно структурно и химическо съответствие от типа "ключ-ключалка" (Фишер);
- 2 - Индуцирано структурно притъкмяване (Кошланд);
- 3 - Индуцирано структурно притъкмяване плюс субстратно напрежение (Кошланд).



**Фиг. 4-8.** Уреазата - пример за абсолютно специфичен ензим. Уреазата разгражда само карбамид, но не и близките по структура тиокарбамид и биурет.

Моделът на Фишер не може да обясни всички случаи на взаимодействие между ензима и субстрата. Според Кошланд активният център и субстратът не съвпадат напълно стерично. Взаимодействието на ензима и субстрата предизвиква конформационни промени в свързващото място, което се променя - увеличава се афинитетът към субстрата, преориентират се някои групи и се оформя каталитичният активен център. Това е т. н. модел за индуцираното структурно притъкмяване между ензима и субстрата (фиг. 4-7-2). Пример за подобни промени дава ензимът хексокиназа, която придвижва



един от домените си, за да обгърне глюкозата и да доближи групите от активния център до субстрата.

Най-голям брой експериментални наблюдения подкрепят модела, който е съчетание от индуцирано структурно притъкмяване и субстратно напрежение (фиг. 4-7-3). За да се осъществи реакцията, е необходимо да настъпят, макар и незначителни, конформационни изменения и в активния център, и в субстратната молекула. Необходимо е стерично донагласяне на реагиращите структури и в резултат се получава налягане и отслабване на атакуваните връзки. Например при свързване на субстрата от ензима лизозим, са доказани конформационни промени в част от субстратната молекула (хексозен пръстен преминава от стабилна "стол" в нестабилна "полу-стол"-конформация).

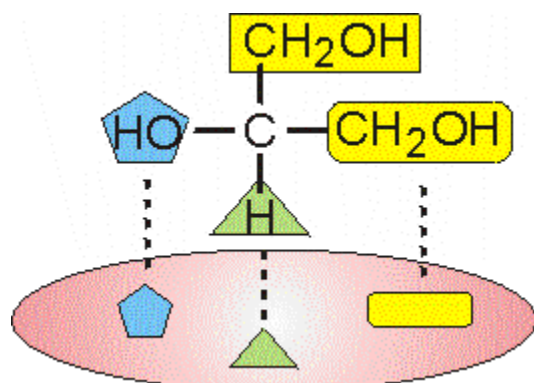
Ензимите, чиито субстрати или продукти са оптично активни вещества, проявяват стереоспецифичност (виж табл. 4-3 за примери).

**Табл. 4-3.** Примери за стереоспецифични ензими.

Ензим	Действие
Гликозидази	Разграждат само $\alpha$ - или само $\beta$ -гликозидна връзка. Проявяват абсолютна специфичност към една от съставките в гликозида
Малтаза	Действа на малтоза ( $\alpha$ -1,4-гликозидна връзка между 2 глюкозни остатъка); не действа на $\beta$ -гликозиди; не действа на $\alpha$ -гликозиди на галактоза; не действа на $\alpha$ -гликозиди на маноза;
Ензими от гликолиза и ПФП	Действат само на D-формите на метаболитите
Аминоацидооксидази	Действат само на D- или само на L-аминокиселини
Фумараза	Действа само на транс-изомера фумарат, не действа на цис-изомера малеинат
Рацемази	Превръщат обратимо един изомер в неговия антипод: напр. цис в транс, D в L

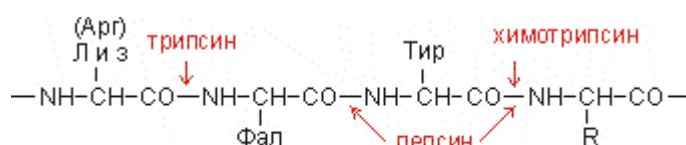
Стереоспецифичността се обяснява от Огстон с множествено (най-малко в три точки) свързване на субстрата към активния център. Ако само една група трябваше да се свърже с активния център, то много съединения биха подходили. Но комбинацията от три групи рязко намалява броя на възможните съединения. Това обяснява и защо химически напълно еднакви съединения, различаващи се само по положение на една група, се разпознават от ензима. Ензимите могат да различават и химически еднакви групи в симетрични субстратни молекули като например глицерол или цитрат. От глицерол се получава само L-глицерол-3-фосфат (фиг. 4-9). Симетричната цитратна

молекула се подлага на асиметрична атака от аконитазата при получаване на изоцитрат (виж глава 5).



**Фиг. 4-9.** Стереоспецифичност при някои ензими, дължаща се на множествоно свързване между субстрата и активния център. Пример: свързване на симетричен субстрат (глицерол) към асиметричния активен център на глицерол киназа.

Интересен е примерът с пептидазите от стомашно-чревния тракт. Те хидролизират не всички пептидни връзки в белтъци, а само при някои аминокиселинни остатъци - вж фиг. 4-10. Специфичността по отношение на остатъка при атакуваната пептидна връзка се дължи на различните групи, които има в свързващото място на всеки ензим. Трипсин (от панкреас) хидролизира пептидна връзка след базични положително заредени остатъци от лизин или аргинин, тъй като в мястото, свързващо субстрата, има отрицателно заредени групи. Пепсин (от стомашен сок) разгражда пептидни връзки преди и след ароматни остатъци. Химотрипсин (от панкреас) хидролизира пептидна връзка най-вече след ароматни остатъци. При пепсин и химотрипсин в свързващото място има хидрофобни групи, които взаимодействат с ароматните ядра на фенилаланин, тирозин и триптофан. С тази специфичност тези три пептидази, изолирани от животни и пречистени, са оказали неоценима услуга за установяване на първични структури на белтъци - виж глава 1.



**Фиг. 4-10.** Специфичност при пептидази.

Пептидаза	Място на действие
Пепсин	при Тир, Фал, Лев
Трипсин	след Лиз, Арг
Химотрипсин	след Тир, Фал, Три, Мет, Лев

Някои ензими, напр. карбоксилестеразите, са с по-слабо-изразена специфичност - изискват наличието само на определена химична връзка (естерна), без да имат строга избирателност към съставките, които изграждат тази връзка (различни киселини и алкохоли).

Биологичното значение на субстратната специфичност е огромно. Без това удивително свойство на ензимите, не е възможен какъвто и да е порядък в обмяната в клетката.

Благодарение на ензимната специфичност биохимията е постигнала големи успехи при изследване естеството на връзката ензим-субстрат, а оттам и за изучаване структурата на активния център на ензима. За тези изследвания се използват серия модифицирани субстрати, така че всяка от групите, участваща в реакцията, да бъде модифицирана в един от тези субстрати. Изследва се влиянието на модификацията върху процеса на свързването на субстрата и на способността на ензима да атакува субстрата.

Благодарение на субстратната специфичност може да се смесва чист субстрат с груб ензимен препарат, в който количеството на примесите надвишава 1000 пъти количеството на самия ензим, и в тези условия да се определя активността на ензима с достатъчна точност.

## 4.2 Ензимна кинетика

### 4.2.1 Резюме

Ензимната кинетика изучава промените в скоростта на ензимните реакции под влияние на различни фактори.

Експерименталната крива, описваща зависимостта на скоростта от концентрацията на субстрата, е правоъгълна хипербола. Тя отразява една от най-характерните особености на ензимните реакции, а именно насищането на ензима със субстрат. След определена концентрация, повишаването на концентрацията на субстрата не води до увеличение на скоростта и тя остава постоянна и максимална ( $V_{\max}$ ).

Ензимната кинетика е подробно анализирана от Михаелис и Ментен. В основата на анализа си изследователите поставят образуването на междинен ензим-субстратен комплекс.

Анализирайки математически зависимостта на скоростта ( $V$ ) на образуване и разграждане на ензим-субстратния комплекс от концентрацията на субстрата  $[S]$ , изследователите извеждат теоретично уравнение, отразяващо експериментално установената правоъгълна хипербола.

В тяхна чест това уравнение се нарича уравнение на Михаелис-Ментен.

Константата на Михаелис ( $K_m$ )

числено е равна на тази концентрация на субстрата, при която скоростта е равна на половината от

максималната.  $K_m$  е важна кинетична характеристика за всяка ензимна реакция, защото дава информация за сродството между ензима и субстрата. Колкото  $K_m$  е по-ниска, толкова сродството е по-високо.

Експерименталното определяне на ( $K_m$ ) и на  $V_{\max}$  от хиперболичната зависимост на  $V$  от  $[S]$  е неточно и създава затруднения. По тази причина за определянето им се използват различни

трансформации на уравнението на Михаелис-Ментен, най-популярната от които е уравнението на двойните реципрочни стойности или уравнение на Lineweaver-Burk.

Това е уравнение на права линия, с две

променливи  $1/V$  и  $1/[S]$ . От пресечните точки на получената права и осите на координатната сис

тема се определят двете кинетични характеристики - ( $K_m$ ) и на  $V_{\max}$ .

Определянето на ензимната активност се осъществява с помощта на директни и индиректни методи.

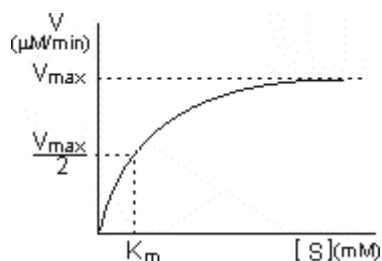
Активността на ензимите се изразява с помощта на единицата катал. Един катал е количеството активност, която превръща 1 мол субстрат за една сек.

Зависимостта на скоростта на ензимните реакции от рН е крива с максимум. Този ход се определя от промени в дисоциацията на функционални групи в активния център и извън него, както и на групи в субстратната молекула. Това рН, при което скоростта на ензимната реакция е максимална, се определя като рН оптимум. Зависимостта на  $V$  от температурата също е крива с максимум.. Понижаването на активността след достигане на температурния оптимум отразява биологичните свойства на катализатора и е свързано с промяна в структурата на активния център в резултат на топлинна денатурация на белтъчната молекула.

Познанията върху ензимната кинетика са необходими за разбиране на някои случаи на хетерогенното заболяване подагра, характеризиращо се с увеличено образуване на пикочна киселина. Последната има много ниска разтворимост и при увеличено образуване, се отлага в стави и др. тъкани, което е изключително болезнено. Аномално високата активност на ензима фосфорибозилпирофосфат синтетаза в едни пациенти се дължи на увеличена  $V_{max}$ , а в други на снижена  $K_m$  (увеличено сродство към субстрата). Промени в рН оптимума на алкохол дехидрогеназата и повишена  $K_m$  на ацеталдехид дехидрогеназата при азиатци е причина за повишената им чувствителност към етанол.

#### 4.2.2 Зависимост на скоростта на ензимната реакция от концентрацията на субстрата

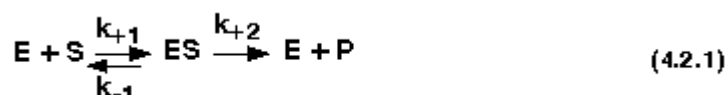
Ензимната кинетика изучава зависимостта на ензимно-катализираните реакции от различни фактори. Експерименталната крива, описваща зависимостта на скоростта на ензимната реакция от концентрацията на субстрата, е правоъгълна хипербола (фиг. 4-11). За разлика от химичните реакции, където скоростта нараства пропорционално на концентрацията на реагиращите вещества, тук скоростта нараства линейно само при ниски субстратни концентрации. При по-високи концентрации скоростта нараства забавено, а при много високи концентрации скоростта не зависи от субстратната концентрация и клони към определена максимална стойност. Тази зависимост, отличаваща ензимните от химичните реакции, се дължи на междинното образуване на ензим-субстратен комплекс.



Фиг. 4-11. Зависимост на скоростта на ензимната реакция от концентрацията на субстрата.

Michaelis и Menten са дали математически израз на описаната експериментално установена зависимост. Макар че и други учени са работили по този въпрос, изведеното уравнение и до днес се нарича уравнение на Михаелис-Ментен в тяхна чест.

Michaelis и Menten са разгледали случая на едносубстратна еднопосочна реакция, протичаща в два етапа със скоростни константи  $k_{+1}$ ,  $k_{-1}$  и  $k_{+2}$ :



Извеждането на уравнението на Michaelis-Menten се основава на допусканията, че:

- 1)  $k_{+2} \ll k_{-1}$ ,  $k_{+2} \ll k_{+1}$
- 2)  $[S] \gg [E]$ ,

Тогава общата скорост на процеса  $V$  ще се определя от най-бавния етап (разграждането на  $ES$  до ензим и продукт), т.е.

$$V = k_{+2} [ES] \quad (4.2.2)$$

Концентрацията на  $ES$  остава постоянна (стационарна), тъй като

$$V_{\text{образуване на } ES} = V_{\text{разграждане на } ES} \quad (4.2.3)$$

или съгласно закона за действие на масите:

$$k_{+1}([E] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \quad (4.2.4)$$

където  $([E] - [ES])$  е концентрацията на свободния ензим (разлика между началната концентрация и тази на ензима, ангажиран в  $ES$ ).

Чрез прости аритметични преобразувания се получава стойността на  $[ES]$ :

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (4.2.5)$$

В хода на преобразуванията отношението от скоростните константи се представя като една нова сборна константа, означавана като константа на Michaelis ( $K_m$ ):

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (4.2.6)$$

Значението на  $K_m$  ще бъде разгледано в т.4.2.4.

Ако получената стойност за  $[ES]$  в (4.2.5) се замести в (4.2.2), получава се първата форма на уравнението на Michaelis-Menten (4.2.7):

$$V = \frac{k_{+2} [E] [S]}{K_m + [S]} \quad (4.2.7)$$

При насищане, когато  $[S] \gg [E]$ , цялото количество ензим е включено в  $ES$  (няма свободен ензим), т.е.  $[ES] = [E]$ .

Тогава скоростта е максимална и се представя, както следва:

$$V_{\max} = k_{+2} [E] \quad (4.2.8)$$

Използвайки равенството (4.2.8), от (4.2.7) може да се получи и втора форма на уравнението на Michaelis-Menten (4.2.9):

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (4.2.9)$$

#### 4.2.3 Анализ на уравнението на Michaelis-Menten

В него има три променливи:  $V$ ,  $[S]$  и  $[E]$  (фиг. 4-13). Ще разгледаме следните случаи:

$$V = \frac{k_{+2} [E] [S]}{K_m + [S]} \quad V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

##### Анализ на уравнението на Michaelis-Menten

I. нека  $[S] = \text{const}$        $V = \text{const. } [E]$

II. нека  $[E] = \text{const}$

1) ако  $[S] \ll K_m$        $V = \text{const. } [S]$

2) ако  $[S] \gg K_m$        $V = V_{\max} = \text{const}$

Фиг. 4-13. Анализ на уравнението на Michaelis-Menten.

**I. Нека субстратната концентрация [S] да е постоянна**

Тъй като  $K_{+2}$  и  $K_m$  също са константи,

$$\text{то } V = \text{const. } [E] \quad (4.2.10)$$

т.е. скоростта зависи правопрпорционално от ензимната концентрация - графически зависимостта е права линия. Този частен случай на уравнението на Michaelis-Menten описва зависимостта на скоростта на реакцията от концентрацията на ензима.

**II. Нека ензимната концентрация [E] да е постоянна****1) При много ниски субстратни концентрации ([S] <<  $K_m$ )**

, в знаменателя може да се пренебрегне [S] и

$$V = \text{const. } [S] \quad (4.2.11)$$

т.е. скоростта при ниски субстратни концентрации зависи линейно от концентрацията на субстрата. Този частен случай описва началния линеен участък от хиперболата.

**2) При високи субстратни концентрации ([S] >>  $K_m$ ), в знаменателя може да се пренебрегне  $K_m$  и**

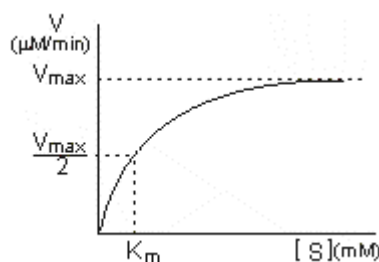
$$V = V_{\max} [S] / [S] = V_{\max} = \text{const} \quad (4.2.12)$$

т.е. скоростта при високи субстратни концентрации клони към максималната стойност и не зависи от концентрацията на субстрата. Този частен случай описва крайния участък от хиперболата в областта на платото.

**4.2.4 Дефиниция и значение на  $K_m$  и  $V_{\max}$** 

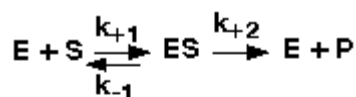
Ако се положи  $V$  да бъде равна на  $1/2$  от  $V_{\max}$  и се замести в уравнението на Michaelis-Menten (фиг. 4-14), то константата на Michaelis е равна на тази субстратна концентрация, при която скоростта на реакцията е равна на половината от максималната скорост.  $K_m$  има измерение на концентрация и нейните стойности са между  $1$  и  $10^{-8}$  мол/л.

$$\begin{aligned} \text{ако } V &= \frac{V_{\max}}{2} & \frac{V_{\max}}{2} &= \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \\ K_m + [S] &= 2[S] \\ K_m &= [S] \end{aligned}$$



**Фиг. 4-14.** Извеждане дефиницията за  $K_m$  като субстратна концентрация, при която  $V = V_{\max} / 2$ .

$K_m$  е важна кинетична характеристика за всеки ензим, защото дава ценна информация за сродството между ензима и субстрата, макар и с известно приближение. Това е така, защото реалната експериментално определяна  $K_m$  е близка по стойност до теоретичната дисоциационна константа  $K_s$  за разграждането на ензим-субстратния комплекс до ензим и субстрат в основното уравнение .



$$K = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

Фиг. 4-15. Сравнение на  $K_m$  и  $K_s$ 

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

$K_m$  се отличава от  $K_s$  само по това, че  $k_{+2}$  присъства в числителя за  $K_m$ .

По условие  $k_{+2} \ll k_{+1}$  и  $k_{-1}$ . Затова  $K_m$  е близка по стойност до  $K_s$ .

Ниска  $K_s$ , т.е. нисък числител (малки концентрации на свободния ензим и субстрат) и висок знаменател (висока концентрация на ES) означава високо сродство между ензима и субстрата. Така че, колкото  $K_s$  е по-ниска, толкова сродството между ензима и субстрата е по-високо. Обратно, висока  $K_s$  означава ниско сродство.  $K_s$  е теоретична константа, която не може да се измери експериментално, защото процесът в действителност не спира до образуване на ES, а продължава до образуване на продукт.  $K_m$  е реалната величина, която лесно се определя експериментално и която с близко приближение дава информация за сродството между ензима и субстрата. Колкото  $K_m$  е по-ниска, толкова сродството между ензима и субстрата е по-високо. Обратно, висока  $K_m$  означава ниско сродство.

Кинетичните характеристики  $K_m$  и  $V_{max}$  са специфични за всеки ензим. Те имат и практическо значение. При  $[S]$ , надвишаваща 100 пъти  $K_m$ , обикновено  $V = V_{max}$ . Това условие би трябвало да се спазва при определяне на ензимната активност.  $V_{max}$  отразява количеството на наличния ензим.  $K_m$  показва колко субстрат трябва да се използва, за да се измери  $V_{max}$ .

Информация за клинично приложение на кинетичните параметри има в т. 4.2.10.1.



4.2.5 Определяне на  $K_m$  и  $V_{max}$  чрез уравнението на Lineweaver-Burk

Експерименталното определяне на  $K_m$  от хиперболата е възможно. Но поради неточно определяне на  $V_{max}$  в областта на платото и необходимостта от голям брой точки, обикновено уравнението на Michaelis-Menten се трансформира в уравнение на двойните реципрочни стойности или уравнение на Lineweaver-Burk (4.2.10), както е дадено на фиг. 4-16. Това е уравнение на права линия от вида ( $y = ax + b$ ), неминаваща през началото на координатната система, с две променливи  $1/V$  и  $1/[S]$ . От пресечните точки на правата с осите се определят лесно и двете кинетични характеристики  $K_m$  и  $V_{max}$ .

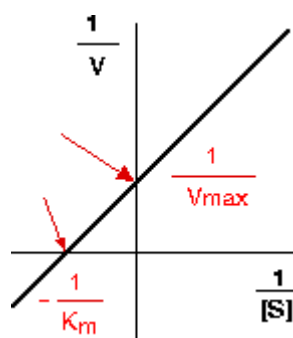
$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (4.2.9.)$$

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

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4.2.10)$$

$$y = ax + b$$

Променливи:  $\frac{1}{[S]}$  и  $\frac{1}{V}$



**Фиг. 4-16.**  
Уравнение на Lineweaver-Burk (4.2.10).  
Вляво - Извеждане;  
Вдясно - Графическо представяне на уравнението.

Ако  $\frac{1}{[S]} = 0$ , то  $\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}}$

Ако  $\frac{1}{V} = 0$ , то  $\frac{1}{[S]} = - \frac{1}{K_m}$

## 4.2.6 Единици ензимна активност

Не всички ензими са максимално пречистени, не се знае молекулната им маса. Затова количеството на ензима не се изразява в тегловни единици. Еднакво тегло в мг от два различно пречистени препарата съдържат различно количество чист ензим.

Използват се следните относителни единици за ензимна активност:

Една **международна единица** представлява това количество ензим, което е необходимо за превръщане на 1 микромол субстрат за 1 минута.

По-късно е въведена друга единица - **катал**. Един катал (кат) е количеството активност, която превръща 1 мол субстрат за 1 сек.

И за двете единици се използват техни подразделения - 1 микрокатал, нанокатал, пикокатал и пр.

## 4.2.7 Определяне на ензимна активност чрез директни и индиректни методи

## 1) Чрез директни спектрометрични или флуорометрични методи

При ензими, чиято небелтъчна съставка има характерни абсорбционни или флуоресцентни спектри във видимата или ултравиолетовата област, е възможно директно измерване на ензимната активност.

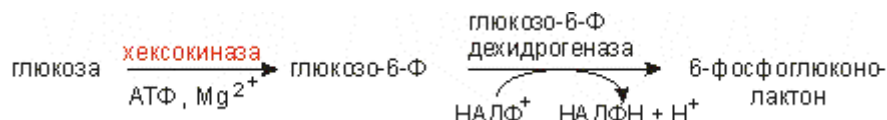
Напр. при дехидрогенази с коензими НАД или НАДФ се използва свойството, че в редуцирано състояние пиридиновите коензими имат максимум на поглъщане на светлината при 340 nm. Реакцията може да се следи при 340 nm или по увеличението на оптичната плътност за минута при редукцията или по нейното намаление при окислението на коензима. В дехидрогеназни реакции скоростта на образуване или изчезване на НАДН е директно пропорционална на ензимната концентрация, изразена в относителни единици. Така оптичната плътност при 340 nm се използва за количествен анализ на тези ензими.

Освен дехидрогенази, много други ензими могат да бъдат определяни чрез измерване скоростта на появата на цветен продукт или скоростта на изчезване на цветен субстрат.

В практиката се използват и флуоресцентни методи - когато небелтъчната съставка е флуоресциращо вещество. Напр. кофакторът пиридоксалфосфат има характерен спектър на флуоресценция и това прави неговото измерване лесно и удобно. Важно предимство на флуорометричните измервания е много по-високата им чувствителност спрямо спектрофотометричните, тъй като е нужно много по-малко количество вещество.

## 2) Индиректни методи

Те се прилагат при ензими, които не съдържат кофактори с характерни спектри на поглъщане или флуоресценция, но катализиращи реакции, спрегнати с дехидрогеназните - виж фиг. 4-17. Показано е определяне на хексокиназна активност, спрегната с глюкозо-6-Ф дехидрогеназна активност. Всички компоненти, освен хексокиназа, се добавят в излишък. Това са глюкозо-6-Ф дехидрогеназа, глюкоза, АТФ,  $Mg^{2+}$  и НАДФ<sup>+</sup>. Количеството на измерваната в пробата хексокиназа определя скоростта на цялостната реакция и следователно и скоростта на образуване на НАДФН, която се измерва при 340 nm.

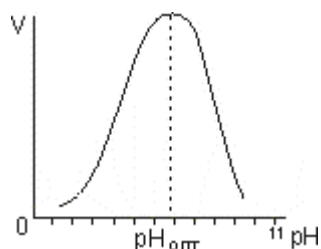


Фиг. 4-17. Индиректен метод за определяне на ензимна активност, в случая хексокиназа, чрез спрегане на реакцията с дехидрогеназна реакция.

## 4.2.8 Влияние на рН върху скоростта на ензимните реакции

Зависимостта на скоростта от рН е крива с максимум (фиг. 4-18). Този ход се определя от няколко ефекта на рН върху ензима и субстрата:

- 1) При екстремно ниски или високи рН настъпва денатурация на ензима;
- 2) Променят се зарядите на групи от субстратната молекула;
- 3) Променят се зарядите на групи от активния център на ензима или на важни конформационни групи извън него.



**Фиг. 4-18.** Ефект на рН върху скоростта на ензимната реакция.

Това рН, при което скоростта е максимална, се означава като рН оптимум. За повечето ензими рН оптимумът е около неутрални стойности на рН, но има и значителни отклонения - вж табл. 4-4. Наличието на различни йонизиращи групи в различните субстрати е причина за разлики в рН оптимума на един ензим.

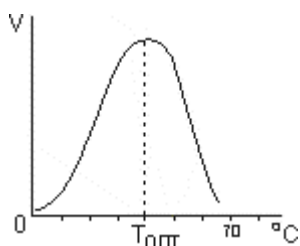
Табл. 4-4. рН оптимуми на някои ензими\*

Ензим	Субстрат	рН
пепсин	яйчен албумин	1,5
пепсин	казеин	1,8
α-глюкозидаза	α-метилглюкозид	5,4
α-глюкозидаза	малтоза	7,0
уреаза	карбамид	6,4-6,9
амилаза (панкреас)	скорбяла	6,7-7,2
амилаза (слад)	скорбяла	4,5
липаза (панкреас)	триглицериди	8,0
липаза (рициново семе)	триглицериди	4,7
кисела фосфатаза	α-глицерофосфат	4,5-5,0
алкална фосфатаза	α-глицерофосфат	9,0-10,0
аргиназа	аргинин	9,5-9,9
трипсин	белтъци	7,8

\*С разрешение от Т. Николов [2]

#### 4.2.9 Влияние на температурата върху скоростта на ензимните реакции

Зависимостта на скоростта на ензимната реакция от температурата е камбановидна крива с максимум (фиг. 4-19). Температурата, при която скоростта е максимална, се означава като температурен оптимум ( $T_{\text{опт}}$ ). Камбановидната крива е резултантна от две въздействия. Първоначално с увеличение на температурата скоростта нараства поради увеличаване кинетичната енергия на реагиращите молекули. След достигане на температурния оптимум, главно поради топлинна денатурация на ензима, скоростта започва да намалява. Температурният оптимум зависи от продължителността на топлинното въздействие. Ако ензимът действа по-продължително при по-висока температура, топлинната денатурация е по-изразена и температурният максимум се снижава.



**Фиг. 4-19.** Влияние на температурата върху скоростта на ензимната реакция.

За повечето ензими  $T_{\text{опт}}$  е около или малко над температурата, при която съществуват клетките, съдържащи тези ензими. Интересни са т.н. термостабилни ензими в микроорганизми в горещи минерални извори, чийто  $T_{\text{опт}}$  е близък до точката на кипене на водата.

При топлокръвните организми като човека, поддържащи постоянна телесна температура, промените в скоростта на ензимните реакции са без особено значение освен при хипотермия или треска. При животни, които не поддържат постоянна телесна температура, промените в скоростта на ензимните реакции е важна особеност, позволяваща оцеляването им.

#### 4.2.10 Приложение на познанията в медицината

##### 4.2.10.1 Промени в $K_m$ и $V_{\text{max}}$ за ензима ФРФФ синтетазата при случаи на подагра

Подаграта е хетерогенна група от заболявания, възникващи по различни причини, но обединени от увеличеното образуване на пикочна киселина в организма във всички случаи. Поради ниска разтворимост, пикочната киселина се отлага най-често в стави, но и в други тъкани, което е изключително болезнено.

Английският лекар Thomas Sydenham, който сам е страдал от подагра, дава следното образно описание на подагрена криза: "Болният ляга да спи и заспива, чувствайки се нормално. Около 2 часа през нощта той се пробужда от силна болка в големия пръст на крака, по-рядко в петата или в глезена. Усецането прилича на болка при навяхване, другите части на крака като че ли са потопени в студена вода. След това започва треперене и треска. След известно време болката достига максимум и се разпространява в костите и ставите на стъпалото и коляното. Сега вече това е гложеща болка, тя потиска и измъчва. Усецането в поразения крак е толкова остро, че болният не може да понася дори тежестта на спалното бельо и сътресението от крачки в стаята. Болният прекарва нощта в мъчения, безсъница, непрестанно въртейки болния

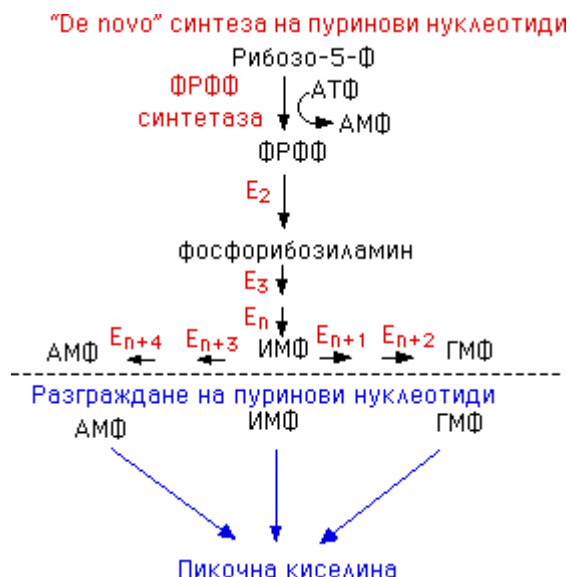
крак и променяйки позата. Той се мята през цялото време докато боли поразената става, все по-силно с развитието на пристъпа." (Цитатът е от Stryer, L. [2]).

Един от дефектните ензими, които са причина за усилено образуване на пикочна киселина, е фосфорибозилпирофосфат синтетазата (фиг. 4-20). Този регулаторен ензим от синтезата на пуринови нуклеотиди по т.н. път "синтеза *de novo*" е с аномално висока активност и това води до засилване на тяхната синтеза. При разграждането им като краен продукт в човека се образува повече пикочна киселина (урат).

Тази висока активност на ФРФФ синтетазата се дължи на мутации в гена за този ензим. Променената вследствие на мутации първична структура води до промени в конформацията и активността на ензима, отразени в промени на кинетичните параметри. В едни пациенти промените водят до снижена  $K_m$  за субстрата рибозо-5-фосфат, а в други пациенти - до повишена  $V_{max}$ [8].

Други нарушения в обмяната на пуринови нуклеотиди, водещи до подагра, са разгледани в т. 4.3.8.1.

и т. 4.4.6. - фиг. 4-40.

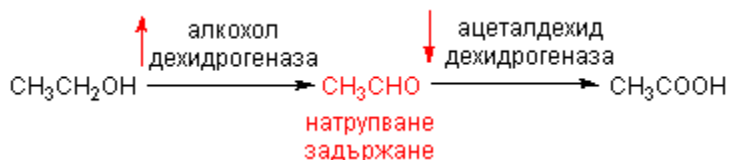


**Фиг. 4-20.** Опростена схема на обмяната на пуринови нуклеотиди (*de novo* синтеза и разграждане), обясняваща ролята на ФРФФ синтетазата за натрупване на пикочна киселина и развитие на подагра.

4.2.10.2 Променен рН оптимум на алкохол дехидрогеназа и повишена  $K_m$  на ацеталдехид дехидрогеназа при азиатци с повишена чувствителност към етанол

Азиатците са необикновено чувствителни към алкохол (по-лесно се опиват) и биохимичното обяснение се свежда до промени в ензимите, които метаболират алкохола.

Под действие на алкохол дехидрогеназа алкохолът се превръща в ацеталдехид, който всъщност предизвиква вазодилатация, зачервяване на лицето, ускорена сърдечна дейност (тахикардия). Ацеталдехидът се отстранява от ацеталдехид дехидрогеназа, която го окислява до ацетат (фиг. 4-21).



**Фиг. 4-21.** Разграждане на етанол под действие на алкохол дехидрогеназа и алдехид дехидрогеназа. При дефекти в ензимите, които го разграждат, се натрупва повече ацеталдехид, предизвикващ неприятните ефекти при пиене.

Алкохол дехидрогеназата има три полипептидни вериги (  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ), кодирани от различни гени. В участъка, кодиращ  $\alpha_1$ -веригата, са открити три алели, и съответно известни са три типа  $\alpha_1$ -вериги:  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_{12}$  и  $\alpha_{13}$  с рН оптимуми 10, 8.5 и 7.0 [9]. Причината са точкови мутации в два важни остатъка: Арг47 и Арг369, които в  $\alpha_1$ -веригата задържат с йонни връзки получаващия се НАДН и забавят отделянето му. В  $\alpha_2$ -веригата Арг47 е заменен с Хис, а в  $\alpha_3$ -веригата Арг369 е заменен с Цис (табл. 4-5). Хис и Цис имат пониски рК стойности и това измества рН оптимума към по-физиологични стойности. Улеснява се отделянето на НАДН, т.е. увеличава се активността на алкохол дехидрогеназата и след поемане на алкохол той бързо и лесно се окислява до вредния ацеталдехид.

**Табл. 4-5.** Точкови мутации в  $\alpha$ -веригите на алкохол дехидрогеназата\*

Остатък	рК <sub>a</sub> на остатъка	Верига	Остатъци	рН оптимум
Хис	6.0	$\alpha_1$	Арг47 + Арг369	10
Цис	8.3	$\alpha_2$	Хис47 + Арг369	8.5
Арг	12.5	$\alpha_3$	Арг47+Цис369	7.0

\* По данни на [9].

Освен увеличена активност на алкохол дехидрогеназата, в азиатци е налице и забавено окисление на ацеталдехида [10]. Липсата на митохондрийна ацеталдехид дехидрогеназа с ниска  $K_m$  е една от причините за по-високо ниво на ацеталдехид след поемане на алкохол (табл. 4-6).

**Табл. 4-6.** Форми на ацеталдехид дехидрогеназа\*.

Ензим	Европейци	Азиатци
Митохондрийна бързо движеща се при електрофореза форма на ацеталдехид дехидрогеназа с ниска $K_m$ (висок афинитет за ацеталдехид)	има	липсва
Цитоплазмена бавно движеща се при електрофореза форма на ацеталдехид дехидрогеназа с висока $K_m$ (нисък афинитет за ацеталдехид)	има	има

\*По данни от [10].

При тях има само цитоплазмена ацеталдехид дехидрогеназа с висока  $K_m$ . Наред с увеличената активност на алкохол дехидрогеназата това обяснява по-лесното опиване при азиатци.

### 4.3 Регулация на ензимната активност

#### 4.3.1 Резюме

За запазване на хомеостазата организмите регулират ензимната активност чрез:

- 1) промени в генната експресия (разгледано в гл. 15); и
- 2) чрез повлияване активността на наличните ензими посредством:
  - а) ефектори (инхибитори и активатори);
  - б) обратимо ковалентно модифициране, най-често фосфорилиране-дефосфорилиране.

Голяма част от съвременните фармацевтични средства действат като инхибитори на ензимното действие. Инхибиторите биват необратими и обратими. Необратимите инхибитори, сред които има силно действащи отрови, трайно снижават или прекратяват ензимната активност. Обратимите инхибитори биват конкурентни и неконкурентни.

Конкурентните инхибитори са структурни аналози на субстрати или на коензими. Тези инхибитори се свързват с групи от активния център на ензима. Инхибиторът взаимодейства само със свободен ензим. Ефектът на инхибиране зависи от съотношението в концентрациите на субстрата и инхибитора.

Голяма група антивирусни, антибактериални и антитуморни лекарствени средства, наречени антиметаболити, спадат към конкурентните инхибитори. Разгледани са следните антиметаболити: аналози на пуринови и пиримидинови бази, антибиотикът пуромицин; ацикловир и ациклогуанозин; сулфонамиди; метотрексат; алопуринол.

Неконкурентните инхибитори се свързват с групи извън активния център на ензима. Ефектът на инхибиране зависи само от концентрацията на инхибитора. Инхибиторът взаимодейства както със свободен ензим, така и с ензим-субстратен комплекс.

Ролята на ензимни активатори се изпълнява от други ензими, или от междинни метаболити, или от метални йони.

Протеазите, необходими за процесите на храносмилане, кръвосъсирване и разтваряне на кръвни съсиреци, се синтезират като неактивни предшественици. Превръщат се в активни ензими чрез необратимо протеолитично откъсване на един или повече пептиди от веригата на преензима. При това се отблокират важни групи, необходими за формиране на активния център.

Алостеричното инхибиране спада към неконкурентното инхибиране. Тъй като има и алостерично активиране, по-общо се говори за алостерично повлияване.

Алостеричните ефектори се свързват в специфични алостерични центрове, извън активния център. Това предизвиква конформационна промяна, която повлиява и ензимната активност. Обикновено алостерични ефектори са крайните продукти в синтезните вериги. Те повлияват или първия специфичен за веригата ензим или скорост-определящия ензим, или и двата, ако те не съвпадат.

Интересен е примерът с пациент, страдащ от подагра поради мутация, засягаща алостеричния център на един от регулаторните ензими от синтезната верига на пуринови нуклеотиди. Липсата на такъв център не позволява на ензима да "усети" натрупването на крайните продукти. Синтезата на пуриновите нуклеотиди се извършва непрекъснато, без спиране. А това създава условия за превръщането им в пикочна



киселина. Като пример е описана и възможността за лечение на оротатемия чрез крайните продукти в синтезната верига на пиримидинови нуклеотиди, които инхибират началните регулаторни ензими.

Обратимото ковалентно фосфорилиране-дефосфорилиране е широко използван и много важен механизъм за регулиране на ензимната активност. В много регулаторни ензими има специфични серинови и треонинови остатъци, които под действие на протеин кинази се фосфорилират, а под действие на фосфатази се дефосфорилират. Някои ензими са активни във фосфорилираната си форма (напр. гликоген фосфорилаза), а други в дефосфорилираната (напр. гликоген синтаза). Така се повлиява активирането на наличен ензим. Много рецептори за хормони и растежни фактори имат тирозин киназна или автотирозин киназна активност. Фосфорилират се тирозинови остатъци в самия рецептор и в други цитоплазмени ензимни и неензимни белтъци. Това фосфорилиране на свой ред активира различни каскади, като освен метаболизма, се повлиява и генната експресия, т.е. синтезата на нов ензим.

#### 4.3.2 Въведение

Независимо от промените във външното обкръжение, организмите запазват постоянно във вътреклетъчната среда благодарение на възможността за регулиране на ензимното действие. Това става чрез:

1) промени в абсолютното количество ензим като се индуцира или репресира неговата синтеза (виж гл. 15). Скоростта на разграждане на ензимната молекула също може да бъде контролирана.

2) промени в активността на налични ензими - посредством ефектори (инхибитори и активатори) и чрез обратимо ковалентно модифициране, най-често фосфорилиране-дефосфорилиране.

Ензимната активност може да бъде повлиявана *in vivo* от присъствието на инхибитори или активатори. Изследванията с ензимни инхибитори *in vitro* са допринесли за изясняване механизма на действието на различни ензими, за идентифициране на групи в активни центрове, за изучаване на метаболитни пътища, за изясняване токсичното или лечебно действие на различни вещества, за осветляване на различни аспекти от въпроси върху растеж, развитие, стареене, рак, инфаркт, действие на хормони.

Голяма част от съвременните фармацевтични средства представляват ензимни инхибитори, действащи по различни механизми. Бактериални и вирусни инфекции се лекуват почти изключително с лекарства, които инхибират активността на ензими от бактериите и вирусите.

Инхибиторите биват необратими и обратими.

#### 4.3.3 Необратимо инхибиране на ензимната активност

Като необратими инхибитори действат вещества, които блокират трайно и необратимо определена група в активния център на различни ензими, предоставена от апоензима или коензима - виж табл. 4-7. Повечето от тях са силно действащи отрови и изясняването на механизма на действие има значение за токсикологията.

Табл. 4-7. Примери за необратими инхибитори.

Необратими инхибитори	Повлияван ензим	Група от активния център, свързваща инхибитора
йодацетамид p-хлормеркурибензоат арсенови производни	тиолови ензими	-SH група от ензима
агенти, блокиращи алдехидни групи: цианиди, натриев бисулфид и др.	ензими, действащи с коензим пиридоксалфосфат	- CHO група от коензима
диизопропилфлуорфосфат (бойна отрова)	серинови протеази, естерази, напр. ацетилхолинестераза	- OH група от ензима
яйчен белтък авидин	карбоксилази	групи от коензима биотин

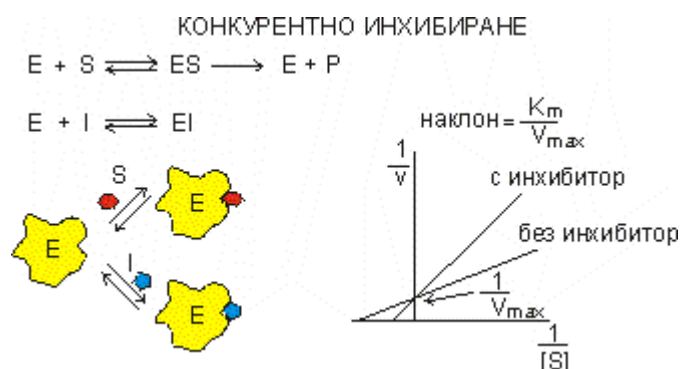
#### 4.3.4 Обратими конкурентни и неконкурентни инхибитори

Обратимите инхибитори биват конкурентни, неконкурентни и аконкурентни. Последните не са предмет на този курс.

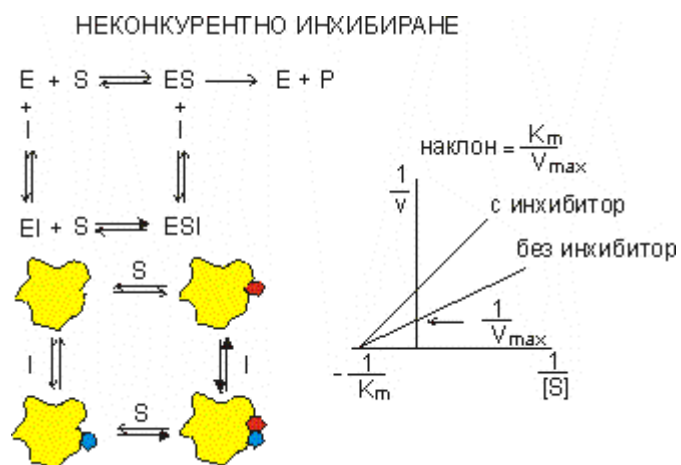
В табл. 4-8 са сравнени характеристиките на конкурентните и неконкурентните инхибитори.

Табл. 4-8. Сравнение на обратимо конкурентно и неконкурентно инхибиране.

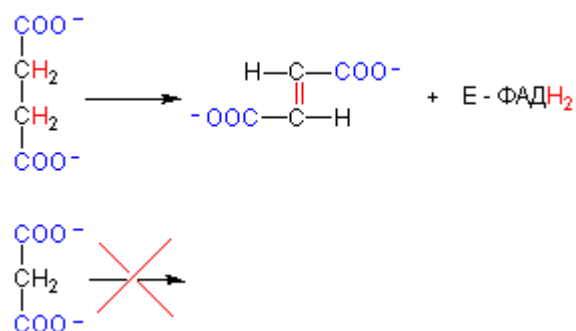
№	Конкурентно инхибиране	Неконкурентно инхибиране
1	Инхибиторът е структурен аналог на субстрата.	Инхибиторът не е структурен аналог на субстрата.
2	Инхибиторът се свързва с активния център на ензима.	Инхибиторът се свързва извън активния център на ензима.
3	Инхибиторът (I) реагира само със свободен ензим, не с ES. Получават се EI и ES комплекси (виж фиг. 4-22-1, дадена след табл. 4-8)	Инхибиторът реагира и със свободен ензим, и с ES. Получават се EI, ES и ESI комплекси (виж фиг. 4-22-2, дадена след табл. 4-8)
4	Ензимът има афинитет и към субстрата, и към инхибитора, затова инхибиторният ефект зависи от съотношението в концентрациите на субстрата и инхибитора.	Инхибиторният ефект зависи само от концентрацията на инхибитора.
5	$V_{\max}$ се запазва, $K_m$ се повишава (понижено сродство) (виж фиг. 4-22-1, дадена след табл. 4-8) Правите за неинхибиран и инхибиран ензим се пресичат в обща точка на ординатата (еднаква $V_{\max}$ ).	$V_{\max}$ се понижава, $K_m$ се запазва (непроменено сродство) (виж фиг. 4-22-2, дадена след табл. 4-8). Правите за неинхибиран и инхибиран ензим се пресичат в обща точка на абсцисата (еднаква $K_m$ ).
6	Примери: малонат (структурен аналог на сукцинат) инхибира сукцинат дехидрогеназата (виж фиг. 4-23)  Други примери - виж. следващата т. 4.3.5.	Примери: етилендиаминтетраацетат (ЕДТА) свързва метални йони, необходими за дейността на някои ензими; CN йон потиска активността на цитохром оксидазата. Виж също алостерично инхибиране - т. 4.3.7.



**Фиг. 4-22-1.** Конкурентно инхибиране. Инхибиторът реагира само със свободен ензим. Получават се ES и EI комплекси.



**Фиг. 4-22-2.** Неконкурентно инхибиране. Инхибиторът реагира и със свободен ензим, и с ES. Получават се EI, ES и ESI комплекси.



**Фиг. 4-23.** Пример за конкурентно инхибиране. Малонат, като конкурентен инхибитор на сукцинат, инхибира сукцинатдехидрогеназата. Чрез двете карбоксилни групи малонат се свързва с активния център на ензима, но тъй като няма две съседни метиленови групи, не може да бъде дехидрогениран.

#### 4.3.5 Антиметаболитите - конкурентни инхибитори по отношение на субстрати или кофактори на ензимите

Съвременната лекарствена терапия се основава на познанията за инхибиране на ензимното действие.

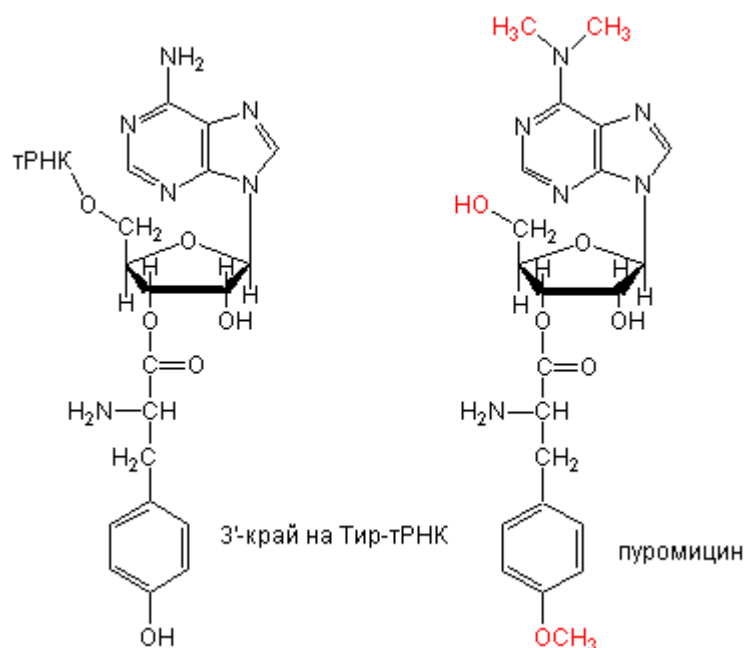
Лекарствата (антивирусни, антибактериални, антитуморни) се синтезират целенасочено с оглед инхибирането на определен ензим в определен метаболитен път, като стремежът е те да са с ограничена токсичност за пациента. Токсичността трудно може да се избегне, тъй като, с изключение на биосинтезата на клетъчната стена в бактерии, малко са метаболитните пътища, уникални за тумори, вируси или бактерии. Затова лекарствата, които убиват тези организми, са вредни и за клетките на човека и това трябва да се отчита при дозирането и времеприлагането.

Но при всички тези случаи се разчита на по-високата чувствителност на микроорганизмите или на туморните клетки към антиметаболитите в сравнение с тази на макроорганизма. По-високата чувствителност може да се дължи на това, че:

- 1) антагонистите засягат такива звена от обмяната, които са възлови за микроорганизма, а са второстепенни или липсват при макроорганизма;
  - 2) макроорганизмът разполага с разнообразни защитни средства, които потискат дейността на антагониста или намаляват неговата концентрация.
- Някои от тези антиметаболити са аналози на субстрати, други са аналози на коензими.

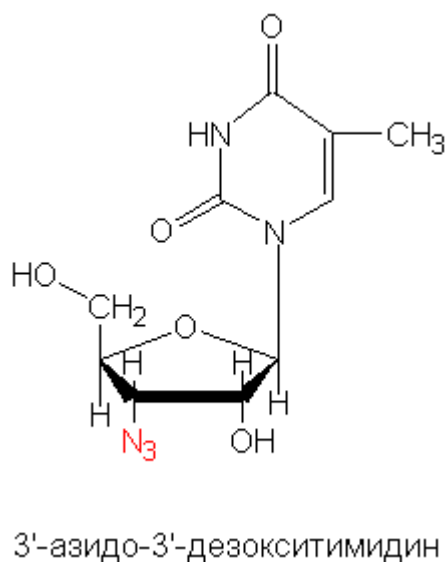
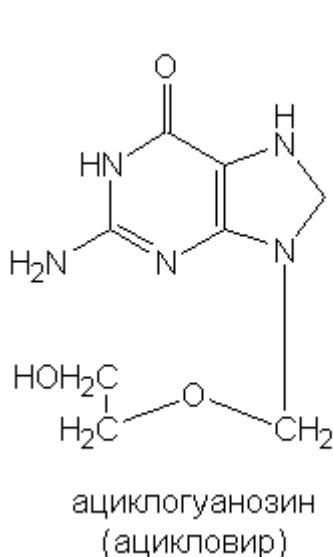
В глава 3 са разгледани аналози на пуринови и пиримидинови бази като 6-меркаптопурин, 5-флуорурацил, които наред с много други, прекратяват синтеза на нуклеиновите киселини в микроорганизми или тумори (т.3.11.1, фиг. 3-26). По-долу (на фиг. 4-24, 4-25, 4-26, 4-27, 4-28) са дадени примери за някои антиметаболити, използвани за терапия на различни заболявания.

Антибиотикът путомицин е структурен аналог на естерифицирания с аминокиселина 3'-край на Тир-тРНК и инхибира белтъчната биосинтеза в микроорганизми (фиг. 4-24).



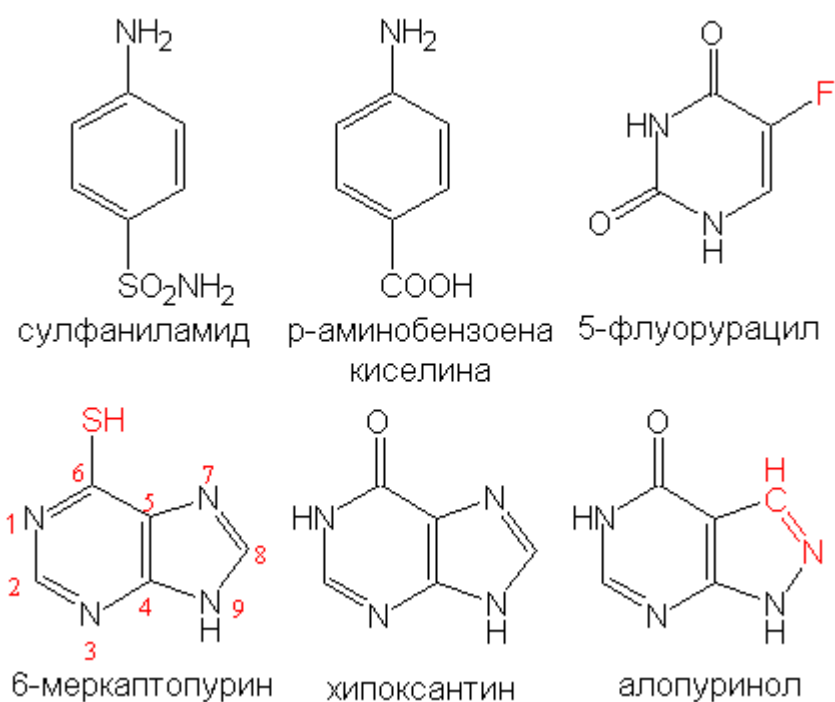
**Фиг. 4-24.** Путомицин - структурен аналог на Тир-тРНК, инхибитор на белтъчната биосинтеза.

На фиг. 4-25 са дадени формулите на ацикловир или ациклогуанозин (пуринов аналог) и 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT) (пиримидинов аналог). Това са антиметаболити, които се използват за забавяне развитието на вируси, причиняващи херпес и СПИН. Механизмът на тяхното действие е разгледан в глава 9.

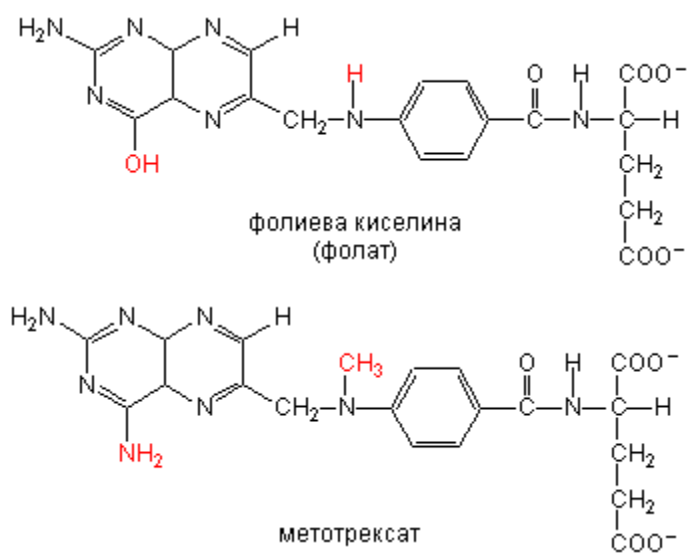


**Фиг. 4-25.** Примери за антиметаболити, използвани в терапията на СПИН - ацикловир или ациклогуанозин (пуринов аналог) и 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT).

Сулфонамидите са голям клас съединения с обща формула  $R - SO_2 - NHR'$ . Сулфонамидът е най-простият представител (фиг. 4-26). Той е антибактериален агент, защото е структурен аналог на *p*-аминобензоена киселина. *p*-Аминобензоената киселина е част от по-сложно съединение фолиева киселина (ФК) (фиг. 4-27), която е необходима за синтеза на нуклеотиди и НК и поради това за бактериалния растеж. Бактериите не могат да поемат ФК от гостоприемника, те трябва да я синтезират. Включването на сулфонамида във ФК я прави неактивна и бактериите не могат да растат и да се делят. Човекът не синтезира ФК, за него тя е витамин, който поема с храната. Затова сулфонамидът не е вреден за него в дозите, които убиват бактериите.

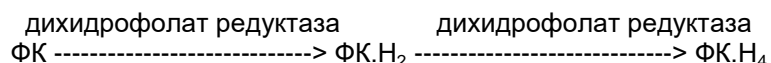


**Фиг. 4-26.** Структура на някои антиметаболити: сулфаниламид - антиметаболит на p-аминобензоена киселина; алопуринол - антиметаболит на хипоксантин; 5-флуорурацил - антиметаболит на пиримидинови бази; 6-меркаптопурин - антиметаболит на пуринови бази.



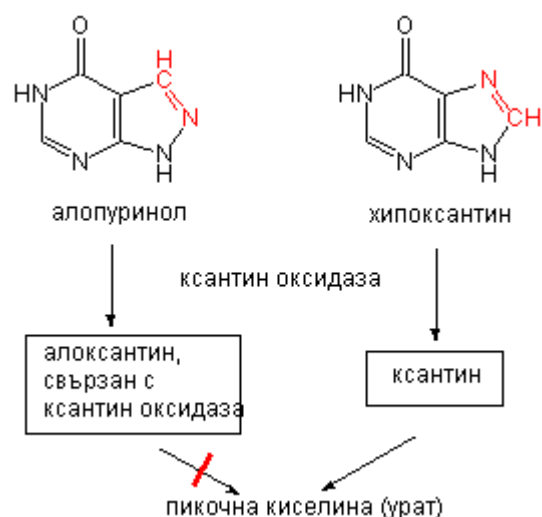
**Фиг. 4-27.** Структура на метотрексат, антиметаболит на фолиева киселина.

Метотрексат (аметоптерин) се използва за лечение на детска левкемия (злокачествено делене на левкоцити), тъй като е близък структурен аналог на фолиева киселина. Инхибира редуцията на фолат до ФК.Н<sub>2</sub> и ФК.Н<sub>4</sub>:



Метотрексатът се свързва 1000 пъти по-здраво от ФК.Н<sub>2</sub> и затова е мощен конкурентен инхибитор на ензима. Не се получава тетраhydroфолат (ФК.Н<sub>4</sub>), който е необходим за синтезата на ТМФ. Спира синтезата на ДНК, клетъчното делене и развитието на левкемията. Но бързо делящи се човешки клетки от костен мозък също са чувствителни към лекарството. Освен това продължителна употреба предизвиква амплификация на гена за ФК.Н<sub>2</sub>-редуктазата, увеличава се синтезата на ензима и растежът на резистентните клетки.

Особено интересен е примерът с алопуринол, използван при лечение на хиперурикемия и подагра. На фиг. 4-28 е сравнена структурата на алопуринол и хипоксантин. Разликата при тях е само в размяната на атомите 7 и 8. В началото алопуринол действа като субстрат на ксантин оксидазата, а после като неин инхибитор. Ензимът го превръща в алоксантин, който остава здраво свързан с активния център. Затова подобни инхибитори се наричат самоубийствени субстрати.



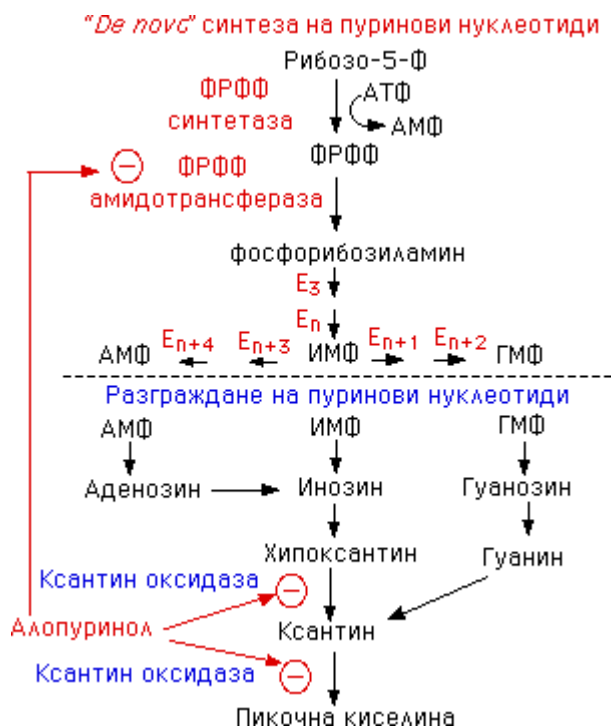
Фиг. 4-28. Структура и механизъм на действие на алопуринол върху ксантин оксидазата.

Като много близък структурен аналог на хипоксантин, алопуринол действа като неин "самоубийствен субстрат".

Фиг. 4-29 обобщава действието на алопуринол. Освен като инхибитор на ксантин оксидазата, алопуринол снижава общата скорост на образуване на пурины по пътя *de novo*, защото свързва част от ФРФФ, който е междинен метаболит и активатор на този път.



След въвеждане на алопуринол се прекратява образуването на пикочна киселина. Концентрацията на хипоксантин и ксантин (по-разтворими) в серума се увеличава, а тази на пикочната киселина се снижава. Намаленото образуване на пуринови нуклеотиди снижава образуването на пикочна киселина.



**Фиг. 4-29.** Действие на алопуринол при лечение на хиперурикемия и подагра:

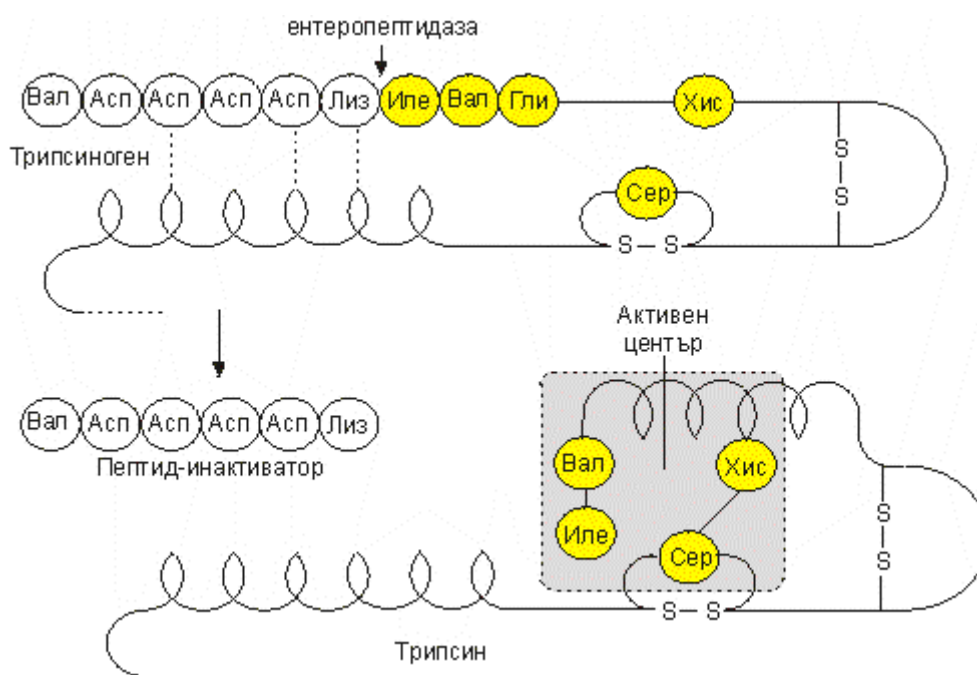
- 1) инхибира ксантин оксидазата като структурен аналог на хипоксантин;
- 2) снижава скоростта на синтеза на пуринови нуклеотиди, тъй като свързва ФРФФ, който е метаболит и активатор на този път.

#### 4.3.6 Активиране на ензимното действие

Активатори са вещества, които повишават скоростта на катализираната реакция. Могат да бъдат ензими, метаболити, метални йони. При металните йони е трудно да се разграничи точно дали йонът действа като активатор или кофактор.

Тук влизат и случаите на алостерично активиране (виж т.4.3.7) и на превръщане на неактивни ензимни предшественици (преензими или проензими) в активни ензими, разгледано по-долу.

Преензимите са предшественици на протеази, необходими за три важни типа процеси: храносмилане, кръвосъсирване и за разтваряне на съсиреците. Секретирането им като неактивни предшественици предпазва от смилателното им протеолитично действие, и така осигурява защита за тъканта, която ги произвежда. Освен това улеснява бързата им мобилизация, без да е необходима нова белтъчна биосинтеза. При превръщането им в активни ензими става необратимо протеолитично откъсване на един или повече пептиди от веригата на преензима, при което се намалява молекулното тегло, отблокират се важни групи, необходими за формиране на активния център. Настъпват конформационни промени и оформяне на активния център. Обикновено откъсването на блокиращия пептид или пептиди става под действие на друг ензим или автокаталитично. - така трипсиногенът съдържа в аминокрая хексапептид, който се отделя под действие на ентерокиназа (пептидаза от чревния сок), а също и на самия трипсин автокаталитично (фиг. 4-30).



**Фиг. 4-30.** Активиране на ензимния предшественик трипсиноген в активен ензим трипсин. По Т. Николов, с разрешение.

От химотрипсиноген (245 аминокиселинни остатъци), под действие на трипсин и автокаталитично, се извършват следните промени:

- 1) разкъсва се пептидната връзка между 15 и 16 остатъци. Междинно се получават две вериги: 1-15 и 16-245.
- 2) От 1-15 се отделя дипептида 14-15, а от 16-245 се отделя дипептида 147-148. Получават се три вериги 1-13, 16-146 и 149-245, които са свързани помежду си чрез дисулфидни връзки.

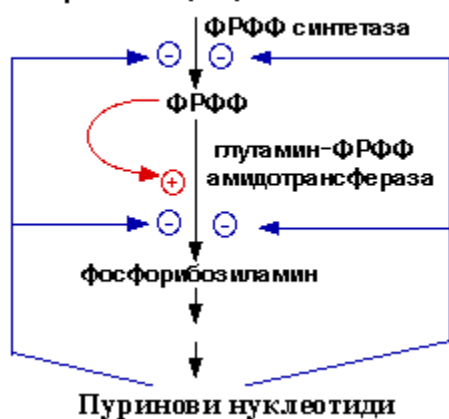
#### 4.3.7 Алостерично повлияване

От биологична гледна точка най-важното неконкурентно инхибиране е алостеричното инхибиране. Всъщност по-общото понятие е повлияване. То включва инхибиране и активиране. Ефекторите биват отрицателни (инхибитори) и положителни (активатори). При него крайният продукт в метаболитната верига или друго съединение повлиява първия специфичен за веригата ензим, или скорост-определящия ензим, или и двата заедно, ако не съвпадат. Ефекторът няма структурна прилика със субстрата на повлиявания ензим. Алостеричният ефектор се залавя не за активния център, а за друг алостеричен център и предизвиква конформационна промяна, която повлиява и активния център - активността на ензима се инхибира или увеличава. При потискане на начален ензим от крайните продукти в дадена верига се използва и израза ретроинхибиране или потискане чрез обратна отрицателна връзка.

В ензимната молекула има един активен център, но няколко алостерични центрове, чрез които ензимът приема сигнали за разнообразни регулаторни въздействия. Алостеричните ензими са обикновено с четвъртична структура и за тях не е валидно уравнението на Michaelis-Menten. Вместо правоъгълна хипербола, зависимостта на  $V$  от  $[S]$  е сигмоидна крива. Алостеричното повлияване е застъпено при важни синтезни вериги - напр. синтеза на пуринови (фиг. 4-31) и пиримидинови нуклеотиди (фиг. 4-32).

На фиг. 4-31 се вижда, че получаващите се като крайни продукти пуринови нуклеотиди (АМФ и ГМФ) действат като алостерични инхибитори на първите два ензима в собствената си синтеза по пътя *de novo*. Тези ензими ФРФФ синтетаза и глутамин-ФРФФ амидотрансфераза са регулаторни и скорост-определящи. ИМФ, предшественик на АМФ и ГМФ, също действа като алостеричен инхибитор на тези ензими. ФРФФ е не само субстрат, но и алостеричен активатор на втория ензим.

**Синтеза на пуринови нуклеотиди**  
рибозо-5-фосфат + АТФ



**Фиг. 4-31.** Пример за алостерични повлиявания в синтезата на пуринови нуклеотиди (опростена схема).

С отрицателен знак е представено алостеричното инхибиране на двата регулаторни ензими от крайните продукти ИМФ, АМФ и ГМФ, а с положителен знак е представено алостеричното активиране на амидотрансферазата от ФРФФ.

Пиримидиновите, както и пуриновите нуклеотиди инхибират алостерично собствената си синтеза, но съществува и по-сложна регулация между двата вида нуклеотиди - напр. АТФ активира синтезата на пиримидинови нуклеотиди ( фиг. 4-32 в т.

**т. 4.3.8.2.**

Така се уеднаквява скоростта на образуване на двата вида нуклеотиди.

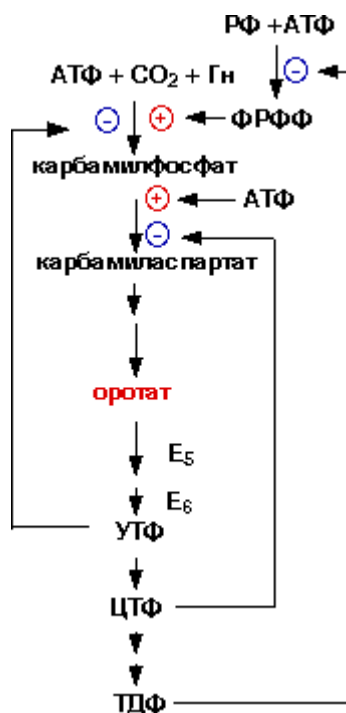
4.3.8 Примери за приложение на познанията върху алостерично повлияване в клиничната практика

4.3.8.1 Дефект в алостеричното повлияване на ФРФФ амидотрансфераза от крайните продукти - причинява подагра

Познанията върху алостерично повлияване позволяват да бъде обяснен и друг механизъм за възникване на подагра, освен разгледаните случаи в т. 4.2.10.1 (мутации в ензима, водещи до повишена  $V_{max}$  или намалена  $K_m$ ). Подагра може да възникне и поради мутация, засягаща алостеричен център за потискане на главния регулаторен ензим ФРФФ амидотрансфераза от крайните продукти (пуриновите нуклеотиди) [11] - виж фиг. 4-31 в т. 4.3.7. Дефектният алостеричен център не "усеща", че има достатъчно пуринови нуклеотиди и ензимът не се инхибира. Увеличеното количество на пуринови нуклеотиди е причина за получаване на повече пикочна киселина, както бе вече показано.

4.3.8.2 Лечение на оротатурия чрез алостерични инхибитори

Познанията върху алостерично повлияване позволяват провеждане на лечение при оротатурия. Това е наследствено заболяване, свързано с нарушения в синтеза на пиримидинови нуклеотиди (фиг. 4-32). Има недостатъчност на два ензима в биосинтезната верига на пиримидинови нуклеотиди: оротат фосфорибозил трансфераза ( $E_5$ ) и оротидин-5'-фосфат декарбоксилаза ( $E_6$ ), което води до натрупване на междинния метаболит оротат в кръвта, а оттам той минава и в урината. Липсват крайните продукти пиримидинови нуклеотиди, а те са необходими за синтеза на НК, за клетъчното делене, особено за еритропоезата. Пациентите са бледи и отпаднали.



Фиг. 4-32. Лечение при оротатемия чрез пиримидинови нуклеотиди, които като крайни продукти алостерично инхибират ендегенната синтеза.

На фиг. 4-32 е показано мястото на действие на пиримидиновите нуклеотиди като алостерични инхибитори върху началните регулаторни ензими в тяхната синтеза. УТФ и ЦТФ инхибират двата начални ензима, а ТДФ сменя активирация ефект на ФРФФ.

Приемането на липсващите нуклеотиди (а дори и нуклеозиди) подобрява състоянието. Изчезва оротат в урината. Това става, тъй като добавените нуклеотиди потискат чрез обратна връзка началните ключови ензими карбамилфосфат синтетезата и аспартат транскарбамилаза.

4.3.9 Регулация на ензимите чрез обратимо ковалентно фосфорилиране-дефосфорилиране. Пример - каскада за повлияване на гликогенфосфорилаза и гликогенсинтаза

#### 4.3.9.1 Общи принципи

Известни са различни случаи на регулиране на ензимната активност чрез обратима ковалентна модификация като метилиране, аденилиране, фосфорилиране и др. Сред тях обратимото ковалентно фосфорилиране-дефосфорилиране на ензими е най-широко застъпеният и съществен регулаторен механизъм. Селективното фосфорилиране се катализира от протеин кинази, а последващото дефосфорилиране - от протеин фосфатази.

Протеин киназите фосфорилират специфични остатъци в регулаторни ензими (хидроксилни групи от серин и треонин, фенолна група от тирозин и хистидинови остатъци) като пренасят върху тях  $\text{P}$ -фосфатна група от АТФ. Фосфатазите катализират хидролитното отделяне на фосфатната група от тези остатъци.

За някои от повлияваните ензими активна е фосфорилираната форма - напр. гликоген фосфорилаза. При други ензими активна е дефосфорилираната форма - напр. гликоген синтаза.

Протеин киназите и протеин фосфатазите се означават като конверторни ензими. Ензимите, повлиявани чрез фосфорилиране-дефосфорилиране се наричат интерконвертируеми ензими. Самите протеин кинази и протеин фосфатази могат да бъдат и интерконвертируеми - т. е. също да бъдат регулирани чрез фосфорилиране-дефосфорилиране. Конверторните ензими и интерконвертируемите ензими са част от регулаторни каскади, всяка от които реагира на сигнал, пренасян от хормон или вторичен посредник.

#### 4.3.9.2 Сравнение с ретроинхибиране

Обратимото ковалентно фосфорилиране-дефосфорилиране на ензими прилича на алостеричното инхибиране (ретроинхибиране - виж т. 4.3.7. със следните особености:

- 1) осигурява бърза регулация на ензимното действие в отговор на специфични физиологични сигнали.
- 2) действа в ранен етап на метаболитната верига, като обикновено се повлиява първият специфичен за веригата регулаторен ензим.
- 3) Въздейства върху алостерични центрове, а не върху каталитичния център.

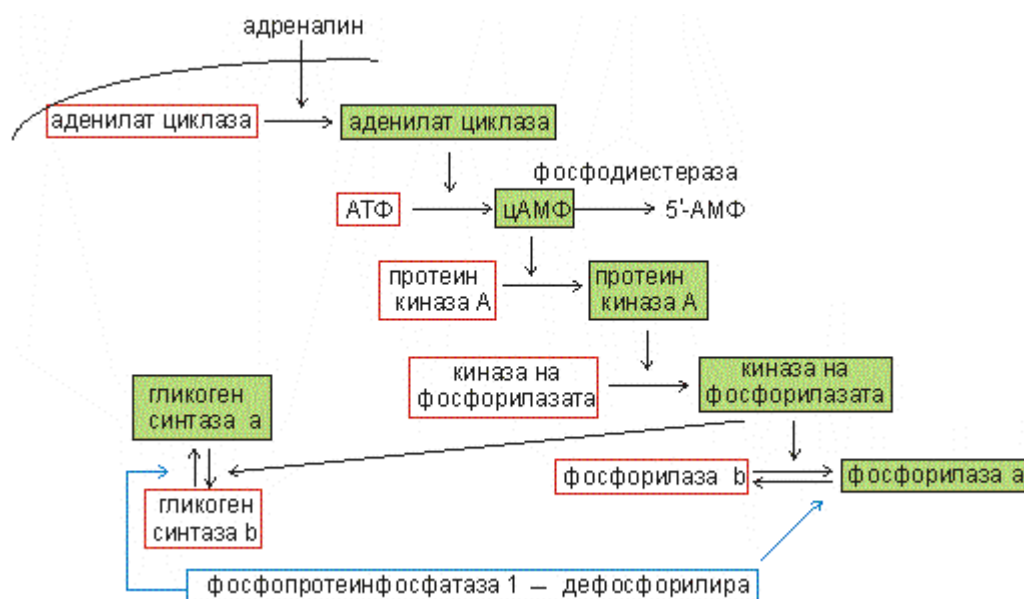
Различава се от ретроинхибирането по това, че при ретроинхибирането се повлиява единичен ензим и не участват хормонални и нервни въздействия. Регулацията чрез фосфорилиране-дефосфорилиране включва няколко ензима и е под директен нервни и хормонален контрол. Освен това се изисква АТФ като донатор на фосфатна група.

Ретроинхибирането действа, без да променя генната експресия, като повлиява активирането на наличен ензим. При фосфорилиране-дефосфорилирането в едни случаи генната експресия не се променя (напр. при описаната в т. 4.3.9.3. каскада, включваща протеин киназа А). Чрез фосфорилиране обаче могат да се задвижат и други пътища, водещи до промяна в генната експресия. Много рецептори за хормони (напр. инсулин) и растежни фактори имат тирозин киназна или автотирозин киназна активност. (виж т. 16.7.4). Фосфорилират се тирозинови остатъци в самия рецептор и в други цитоплазмени ензимни и неензимни белтъци. Това фосфорилиране на свой ред активира различни каскади, повлияващи генната експресия, т.е. синтезата на нов ензим.

#### 4.3.9.3 Пример - каскада за повлияване на гликоген фосфорилаза и гликоген синтаза чрез фосфорилиране-дефосфорилиране

На фиг. 4-33 е представена опростена схема за активиране на гликоген фосфорилазата и инхибиране на гликоген синтазата чрез каскада от реакции на фосфорилиране, задвижена от хормона адреналин, отделящ се при стрес. Свързването на този хормон към специфичен мембранен рецептор (разгледано подробно в гл. 17) води до активиране на ензима аденилат циклаза. Аденилат циклазата превръща АТФ в цикличен АМФ, който активира протеин киназа А. Оттук започват няколко реакции на фосфорилиране.

Протеинкиназа А фосфорилира и активира киназата на фосфорилазата, а тя фосфорилира неактивната гликоген фосфорилаза b и я превръща в активна гликоген фосфорилаза а, необходима за разграждане на резервното гориво гликоген.

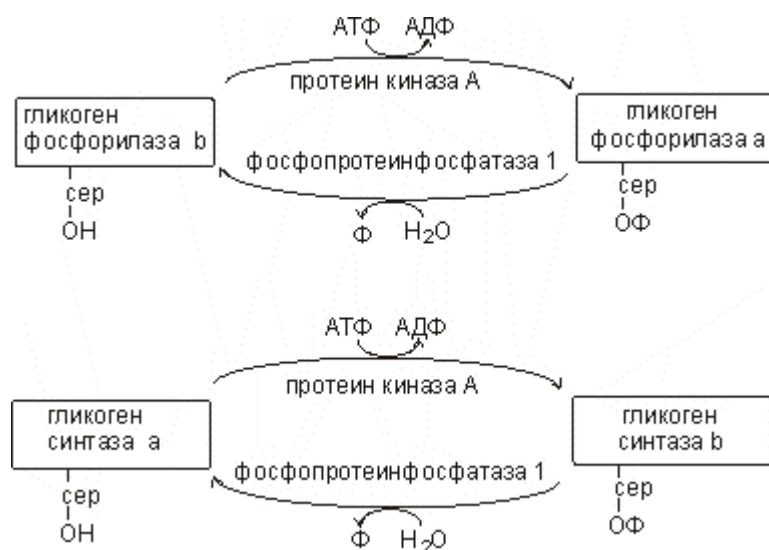


**Фиг. 4-33.** Пример за регулация на ензими чрез фосфорилиране-дефосфорилиране - активиране на гликоген фосфорилаза и инхибиране на гликоген синтаза чрез каскада от реакции на фосфорилиране, задвижена от хормона адреналин. Дефосфорилирането инхибира фосфорилазата и активира гликоген синтазата.

Протеин киназа А фосфорилира и гликоген синтаза а, но с това я инактивира - превръща я в неактивна гликоген синтаза b.

Така координирано и реципрочно се регулират регулаторните ензими на двата противоположни пътя - разграждане и синтеза на гликоген. Когато фосфорилазата е в активната си фосфорилирана форма, фосфорилираната гликоген синтаза е неактивна и обратно. Активната форма на фосфорилирания ензим се означава с буквата "а", а неактивната форма - с буквата "b". Дефосфорилирането чрез фосфопротеин фосфатаза 1 инхибира гликоген фосфорилазата и активира гликоген синтазата (фиг. 4-34).

Активните форми на ензимите са дадени на зелен фон, а неактивните - на червен. Мембранно-разположеният рецептор на адреналин и предаването на хормоналния сигнал са описани в глава 17.



**Фиг. 4-34.** Фосфорилиране на гликоген фосфорилаза и гликоген синтаза под действие на протеин киназа А и дефосфорилиране под действие на фосфопротеин фосфатаза 1.

#### 4.4 Клинично значение на ензимите

##### 4.4.1 Резюме

Познанията върху ензими намират широко приложение в клиничната практика. Голям брой заболявания са пряко свързани с промени в ензимна активност и нейното определяне дава ценна информация за протичащите в организма процеси. Определянето на ензимни активности в кръв и други биологични течности се използва в диагностиката на различни заболявания. Важно е спазването на определени правила, както при вземане на кръвни и други проби, така и при определяне на ензимната активност.

Съвременните направления в ензимната диагностика се основават на:

1) Доказване на нехарактерни за серума вътреклетъчни ензими;

Специфични маркери за заболяване на даден орган са напр. увеличението на кисела фосфатаза при карцином на простатата; на трансминази при вирусен хепатит и др. При инфаркт се следят промените в креатинфосфокиназа, глутамат-оксалацетат трансминаза и лактат дехидрогеназа. Особено ценни са изоензимите, специфични за даден орган - напр. МВ-изоензимът на креатинфосфокиназата произхожда само от миокарда, затова при сърдечен инфаркт винаги се следи този изоензим. Електрофореграми и денситограми на изоензими на лактат дехидрогеназата се използват за диагностика на сърдечни и чернодробни увреждания.

2) Установяване на промени в типичните за серума функционални ензими; Диагностично значение има намаляване на активността им, което е признак за нарушение във функцията на органа, който ги произвежда.

3) Доказване на генетично обусловени ензимопатии.

Това са наследствени заболявания, при които поради мутация в гена, се синтезира ензим с променена първична структура и пространствена организация, който не упражнява своята биологична функция. При блокиране на ензимното действие се натрупва субстратът на реакцията, който обикновено се насочва в страничен път и там се получават вредни съединения. Не се получава нормалният продукт и това допълнително оказва неблагоприятни ефекти.

4) Използване на специфични рестриктази за директно изследване секвенцията на ДНК и установяване дефекти в гените.

Ензимите намират приложение и за терапия на някои заболявания. Напр. стрептокиназа и алтеплаза се използват при инфаркт като тромболитични агенти, тъй като превръщат плазминоген в активен плазмин, който разтваря фибринови съсиреци. Аспарагиназа се използва при лечение на някои форми на левкемия, тъй като разграждайки аспарагин в плазмата, снижава нивото му под необходимото за туморните клетки.

Имобилизираните ензими (ензими, свързани към неразтворима мембрана) са по-стабилни спрямо денатуриращи фактори и поради това работят с висок капацитет продължително време. Прилагат се за бързи скриниращи изследвания на населението - напр. за определяне на холестерол с имобилизирана холестерол оксидаза. Използват се и във фармацевтичната промишленост за производство на някои лекарства.

Ролята на комплекси "ензим-антитяло" в клиничния анализ е разгледана чрез примера за определяне белтъците на вируса на СПИН по метода ELISA.

#### 4.4.2 Изисквания при определяне активността на ензими в клиничната практика

При вземане на кръвни проби за ензимни определения трябва да се избегне възможността за денатурация на интересуващите ни ензими. Недопустимо е интензивно разклащане и нагряване на кръвните проби. Трябва да се внимава и с използваните антикоагуланти или консерванти, тъй като някои от тях могат да действат инхибиращо върху някои ензими. Определенията за ензимна активност не трябва да се правят с хемолизирана кръв. Това е особено важно, тъй като освободените от еритроцитите ензими биха завишили резултатите.

Ензимната активност зависи от температурата и рН, така че за да се сравняват резултатите с нормалните стойности, необходимо е ензимните определения да се извършват при стандартни условия и излишък от субстрат. Въпреки старанията, обикновено има известни вариации в ензимната активност при различни лаборатории.

#### 4.4.3 Роля на нехарактерни за серума вътреклетъчни ензими за диагностиката на различни заболявания

Появата на неспецифични за плазмата вътреклетъчни ензими е ценно от диагностична гледна точка. Обикновено плазмените нива на тези ензими са ниски или нулеви. Увреждането на тъкани променя клетъчната мембранна пропускливост или предизвиква смърт на клетки, което води до освобождаване на вътреклетъчни ензими в плазмата. Когато има промени в пропускливостта, по-нискомолекулните ензими ще се появят първи в плазмата. Колкото е по-голям концентрационният градиент между клетъчните и извънклетъчните нива, толкова по-бързо ще дифундира ензимът навън. Цитозолните ензими се появяват преди митохондриите. Колкото по-голяма част от тъканта е увредена, толкова е по-голямо увеличението в плазменото ниво. Неспецифичните за плазмата вътреклетъчни ензими се отстраняват от плазмата с различни скорости, което зависи от стабилността на ензима и поемането му от ретикулоендотелната система.

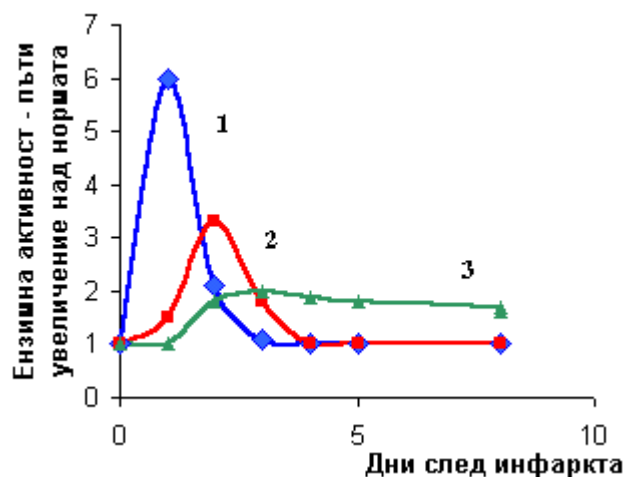


Има ензими, които са специфични маркери за заболяване на даден орган,. Напр. киселата фосфатаза от простатната жлеза се увеличава при карцином на простатата. При остър панкреатит се увеличават липаза и амилаза. При вирусен хепатит е увеличена глутаматпируват трансaminaза (синоним аланинаминотрансфераза).

На фиг. 4-35 са дадени ензимите, които най-често се използват за диагностика на инфаркт. Първи в серума (още след 4-я час) се увеличава ензимът креатинфосфокиназа. Обикновено между 12-ия и 14-ия час активността му е максимална. Стойностите му се нормализират между 48-ия и 60-ия час.

Малко по-късно, след 6-ия час, се повишава и глутамат-оксалацетат трансaminaза (синоним аспартат аминотрансфераза) и достига максимум между 12-ия и 14-ия час. Стойностите се нормализират след 4-ия ден.

Най-късно (след 24-ия до 48-ия час) се наблюдават увеличени нива на лактатдехидрогеназата. Активността е максимална между 4-ия и 6-ия ден. Стойностите обикновено се нормализират след 8-ия ден.



**Фиг. 4-35.** Ензимни профили след инфаркт на миокарда.  
1 - креатинфосфокиназа;  
2 - глутамат-оксалацетат трансaminaза (синоним аспартат аминотрансфераза);  
3 - лактатдехидрогеназа.

#### 4.4.4 Изоензими

##### 4.4.4.1 Определение

Изоензимите (изозими) са различни форми на един и същи ензим. Те имат еднаква субстратна и кофакторна специфичност, но различни  $K_m$  за субстрата или кофактора, или и за двата заедно.

Напр. малат дехидрогеназа от черен дроб на плъх и от *E. coli* катализират една и съща реакция, но имат различни физични и химични свойства. Най-често изоензимите се разграничават чрез електрофореза.

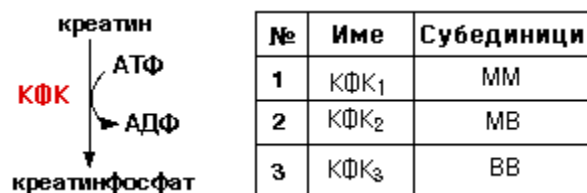
В рамките на един организъм има изоензими от различни органи - напр. лактат дехидрогеназа (ЛДХ), или от различни клетъчни органели - напр. малат дехидрогеназа (МДХ), глутамат-оксалацетат трансминаза (ГОТ).

Изоензимите са мултимерни комплекси. Те имат четвъртична структура и са образувани от свързването на различен брой независимо кодирани субединици. Поради разлики в първичната структура, субединиците имат различни изоелектрични точки и оттук комбинациите от тях имат различна електрофоретична подвижност. Субединиците се номерират, като № 1 получава най-бързо движещият се към анода изоензим.

Разделянето и идентифицирането на изоензимите има диагностично значение.

##### 4.4.4.2 Изоензими на креатинфосфокиназата (КФК)

Този ензим катализира обратимото фосфорилиране на креатин с АТФ (фиг. 4-36):



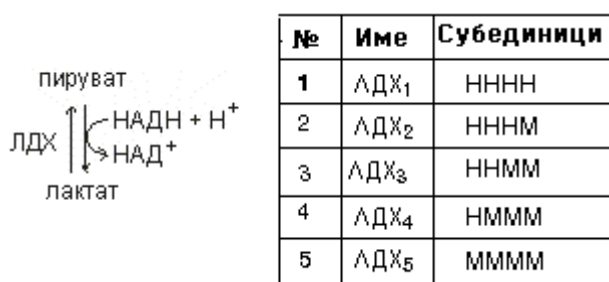
Фиг. 4-36. Действие и изоензими на креатинфосфокиназа.

Ензимът съдържа два вида субединици, означавани с буквите М и В (М - характерна за мускулите, от английската дума muscle и В - характерна за мозъка, от английската дума brain). При комбинацията на тези субединици могат да се получат и действително съществуват три димерни изоензима на креатинфосфокиназата. Единственият източник на МВ-изоензима в кръвта е миокардът и затова при потвърждаване на инфаркт на миокарда се следи този изоензим.

#### 4.4.4.3 Изоензими на лактатдехидрогеназата (ЛДХ)

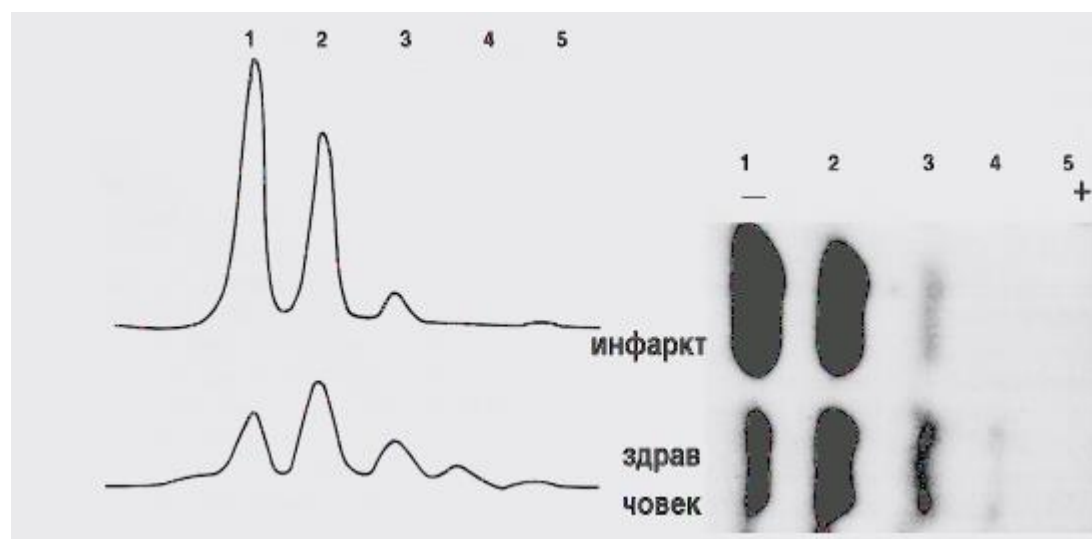
Този ензим катализира обратимата редукция на пируват до лактат. (фиг. 37). Тъй като ЛДХ е тетрамер от два вида субединици Н (от heart) и М (от muscle), възможни са 5 комбинации от тях или 5 вида изоензими, съдържащи различен брой от Н и М субединици.

Сумарната активност на ЛДХ в серума на здрав човек обикновено е 100-200 IU/L. ЛДХ се намира във всички тъкани. Увеличението на общата активност на ЛДХ в серума не е специфично за увреждането на някой орган. Увреждане на кой да е от тях може да доведе до освобождаване на ензима в кръвта.



**Фиг. 4-37.** Действие и изоензими на лактат дехидрогеназа.

Изследването на изоензимите на ЛДХ позволява да се определи от коя тъкан произхожда увеличението в плазмата изоензим. Съотношението на изоензимите на ЛДХ в човешкия серум се променя при различни заболявания - напр. инфаркт на миокарда (фиг. 4-38-I) или чернодробно увреждане (фиг. 4-38-II).

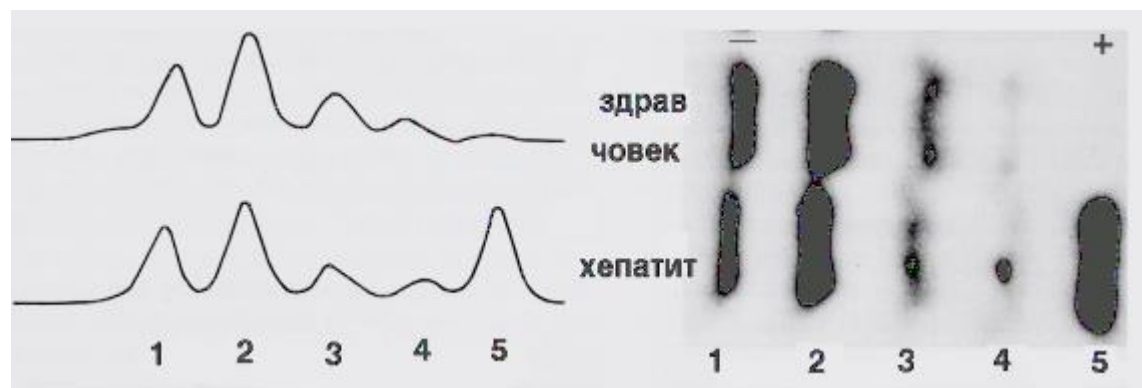


**Фиг. 4-38-I.** Електрофореграма и денситограма на изоензими на лактат дехидрогеназа. Електрофорезата е проведена върху целулозно-ацетатен гел, при рН 8.6. Най-бързо подвижен е изоензим 1. Пациент с инфаркт на миокарда е сравнен със здрав човек. Увеличени са изоензими 1 и 2.

На фиг. 4-38-I се вижда, че при инфаркт на миокарда са характерни две особености: а) увеличават се изоензими 1 и 2; б) изоензим 1 има по-високи стойности спрямо изоензим 2.

Промяната в изоензими 1 и 2 едновременно с поява на КФК<sub>2</sub> в 100 % от случаите е показател за инфаркт на миокарда.

На фиг. 4-38-II е даден електрофоретичният профил на изоензими на ЛДХ от пациент с хепатит и от здрав човек. За разлика от инфаркт, където са увеличени изоензими 1 и 2, при хепатит е увеличен изоензим 5.



**Фиг. 4-38-II.** Електрофореграма и денситограма на изоензими на лактат дехидрогеназа. Електрофорезата е проведена върху целулозно-ацетатен гел, при рН 8.6. Най-бързо подвижен към анода е изоензим 1. Пациент с хепатит е сравнен със здрав човек. Силно увеличен е изоензим 5.

#### 4.4.5 Промени във функционалните плазмени ензими - значение за диагностиката

Към функционалните плазмени ензими спадат преензимите за кръвосъсирване, преензимите за разтваряне на съсиреците, липопротеин липаза и др. Физиологичната им функция се реализира в плазмата, където се секретират главно от черния дроб. Присъствуват в кръвта в равни или по-високи концентрации, отколкото в тъканите.

Диагностично значение има намаляване на активността им, което е признак за нарушение във функцията на органа, където се синтезират.

Напр. лецитин-холестерол ацилтрансфераза (превръща лецитина в лизолецитин, а свободния холестерол в холестеролов естер) - при заболявания на чернодробния паренхим нейната активност намалява, в кръвта нараства концентрацията на свободния неестерифициран холестерол ( в норма свободният е 1/3 от общия).

Плазмената холинестераза разгражда ацетилхолин. Синтезира се в черния дроб.

Нейната намалена активност говори за увреждането му. Може да е признак за отравяне с фосфоорганични отрови - инсектициди, или хлороформ.

При сериозни увреждания на черния дроб като цироза не се произвеждат ензимите, необходими за обезвреждане на токсичния амоняк в урейния цикъл. Това може да доведе до амонячно отравяне и до чернодробна кома.

## 4.4.6 Доказване на генетично обусловени ензимопатии

Генетично-обусловените ензимопатии са наследствени заболявания, при които поради мутация в гена, се синтезира ензимен белтък с променена първична структура и променена пространствена организация, който не упражнява своята биологична функция. Спадат към т.н. молекулни болести или вродени метаболитни дефекти. Характерно за тях е, че при блокиране на ензимното действие се натрупва субстратът на реакцията, а не се получава нормалният продукт (фиг. 4-39). Натрупваният се субстрат може да се насочи в страничен път и там да се получат вредни токсични съединения. Липсата на нормално получаващия се продукт в блокирания метаболитен път допълнително оказва неблагоприятни ефекти.



Фиг. 4-39. Метаболитен блок при генетично обусловени ензимопатии.

В хода на този курс вече са разгледани примери за генетично обусловени ензимопатии - виж първите пет случая в табл. 4-9. Вижда се, че заболяване може да настъпи както при намалена активност (примери 1 и 2 от табл. 4-9), така и при увеличена активност на определен ензим, напр. ФРФФ синтетаза (примери 4-6). По-чести са случаите на ензими с намалена или липсваща активност.

Табл. 4-9. Примери за генетично обусловени ензимопатии.

№	Заболяване	Променен ензим	Активност
1	фенилкетонурия (т. 2.5.3)	фенилаланин хидроксилаза	намалена
2	оротатурия (т. 4.3.8.2)	оротатфосфорибозил трансфераза и оротидилат декарбоксилаза	намалена
3	подагра (т. 4.2.10.1)	ФРФФ синтетаза (увеличена $V_{max}$ )	увеличена
4	подагра (т. 4.2.10.1)	ФРФФ синтетаза (намалена $K_m$ )	увеличена
5	подагра (вж 4.3.8.1)	ФРФФ амидотрансфераза (загуба на алостерична чувствителност към пуринови нуклеотиди)	увеличена
6	подагра	гуанозил фосфорибозил трансфераза	намалена
7	синдром на Lesch-Nihan	гуанозил фосфорибозил трансфераза	липсва

Случаите 3, 4 и 5 в табл. 4-9 показват, че хетерогенното заболяване подагра може да възникне поради различни ензимни дефекти. Тук ще се дадат два допълнителни примера (№ 6 и 7 в табл. 4-9), също свързани с подагра.

Освен разгледания път *de novo* синтеза на пуринови нуклеотиди има и друг път, наречен синтеза от готови бази. Една от реакциите в този път (синтеза на ГМФ и ИМФ) е представена на фиг. 4-40. Тази реакция е пример за неизползване на субстрат, който повлиява друг обменен път. При намалена активност на ензима гуанозил/хипоксантин фосфорибозил трансфераза не се използва ФРФФ. Той се натрупва и стимулира пътя *de novo*. Синтезират се повече пурины и от тях повече пикочна киселина.



**Фиг. 4-40.** Механизъм на възникване на подагра при недостатъчност на гуанозин/хипоксантин-фосфорибозилтрансферазата. Ензимният блок води до неизползване и натрупване на ФРФФ, който усилва пътя *de novo*.

При пълна липса на гуанозин/хипоксантин фосфорибозил трансферазата се развива синдром на Lesch-Nihan (пример 7 от табл. 4-9). При това още по-тежко заболяване болните деца развиват всички признаци на подагра, но се наблюдават и психични отклонения - умствена изостаналост, агресивност по отношение на околните и стремеж да увреждат дори собствените си крайници. Следващите глави съдържат много други примери за генетично обусловени ензимопатии.

#### 4.4.7 Значение на рестриктази за директно изследване секвенцията на ДНК и установяване дефекти в гените

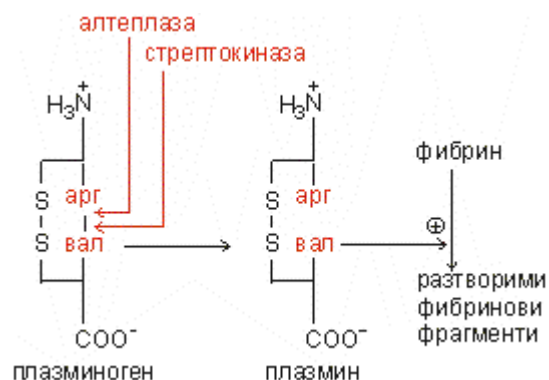
Рестриктазите са строго специфични ендонуклеази, които разкъсват полинуклеотидните вериги на ДНК в определени места. Те са изключително полезни за целенасочено срязване и картиране на генома, (както и за вмъкване на гени от един организъм в друг - генно инженерство).

Рестриктазите улесняват диагнозата на генетичните болести. Диагностицирането на тези болести чрез директни изследвания на секвенции от ДНК стана възможно благодарение на успехите на рекомбинантната ДНК технология (глава 16).

Чувствителността на тези методи е толкова голяма, че е възможна пренатална диагностика на наследствени заболявания. За целта се изследват клетки от амниотичната течност.

4.4.8 Ензими за терапия при инфаркт на миокарда и други заболявания

Съсирекът, предизвикал инфаркта, може да се разтвори под действие на активен плазмин. Активен плазмин се получава от неактивен плазминоген под действие на стрептокиназа и на алтеплаза (t-PA - съкратено от tissue plasminogen activator или тъканен активатор на плазминоген) - виж фиг. 4-41. Както стрептокиназата, така и алтеплазата се използват при лечение на инфаркт като тромболитични агенти. Техните качества са сравнени в табл. 4-10.



**Фиг. 4-41.** Значение на ензимите алтеплаза и стрептокиназа за терапия при инфаркт на миокарда.

**Табл. 4-10.** Сравнение на стрептокиназа и алтеплаза (t-PA) като тромболитични агенти.\*

Качество	стрептокиназа	алтеплаза (t-PA)
Селективност за фибринов съсирек	-	+
Предизвиква плазминемия	+	-
Намалява смъртността	+	+
Предизвиква алергична реакция	+	-
Предизвиква хипотензия	+	-
Приблизителна цена за лечението	\$400	\$2900

\*Данните са от Webb. J., Thompson C. [12]. Валутата е в канадски долари.

Колкото по-рано започне терапията, толкова по-голяма надежда има за болния. Вкарването на стрептокиназа или алтеплаза трябва да стане бързо, преди да е настъпило необратимо увреждане на сърдечния мускул и обикновено не по-късно след 12-ия час. Обикновено дори 1 час след инфаркта някои клетки са необратимо увредени, а 6 часа по-късно миокардът като цяло се счита увреден, ако не е предприето нищо.

Получената чрез рекомбинантна ДНК-технология алтеплаза е не по-малко активна от стрептокиназата, не причинява алергични реакции, не предизвиква хипотензия, но е много по-скъпа. Затова в много кардиологични центрове се използва стрептокиназа, освен ако няма контраиндикации за алергия, предишна употреба, или хипотензия.

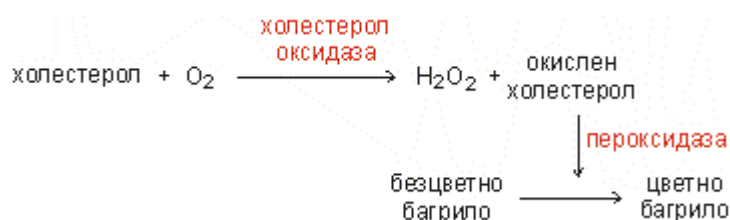
При някои форми на левкемия при възрастни се прилага терапия с ензима аспарагиназа. Този ензим разгражда аспарагин. Туморните клетки се нуждаят от аспарагин и го получават от плазмата на гостоприемника. Вкарването на аспарагиназа венозно намалява нивото на аспарагин в плазмата и това потиска жизнеспособността на тумора.

В бъдеще може би ще е възможно заместване на дефектни ензими.

#### 4.4.9 Роля на имобилизирани ензими в клиничния анализ и за производство на лекарства

Имобилизирани ензими се наричат ензимите, свързани към неразтворима матрица (мембрана). Те са значително по-стабилни спрямо денатуриращи фактори (рН, температура, детергенти) и работят с повишен капацитет продължително време. Използват се успешно в рутинни и скриниращи изследвания.

Например определяне на холестерол при скрининг на населението може да стане за няколко минути с минимално количество плазма 10  $\mu$ L (виж фиг. 4-42) с помощта на имобилизирана холестерол оксидаза, действаща спрегнато с пероксидаза. При окислението на холестерола под действие на този ензим, се отделя  $H_2O_2$ , който окислява безцветно багрило до цветен продукт. Последният се измерва спектрофотометрично. По подобен начин се определят и триглицериди с участието на имобилизирана липаза.



**Фиг. 4-42.** Пример за приложение на имобилизирана холестерол оксидаза и пероксидаза при определяне съдържанието на холестерол.

Имобилизираните ензими се използват и във фармацевтичната промишленост като високо специфични катализатори. Например имобилизирана  $\beta$ -галактозидаза се използва за намаление съдържанието на лактоза в млякото за хора, които страдат от заболяването лактозна непоносимост. Стереоспецифични имобилизирани ензими се използват за бързо и икономично промишлено превръщане на евтин предшественик в хормона преднизолон чрез хидроксилиране и дехидрогениране.

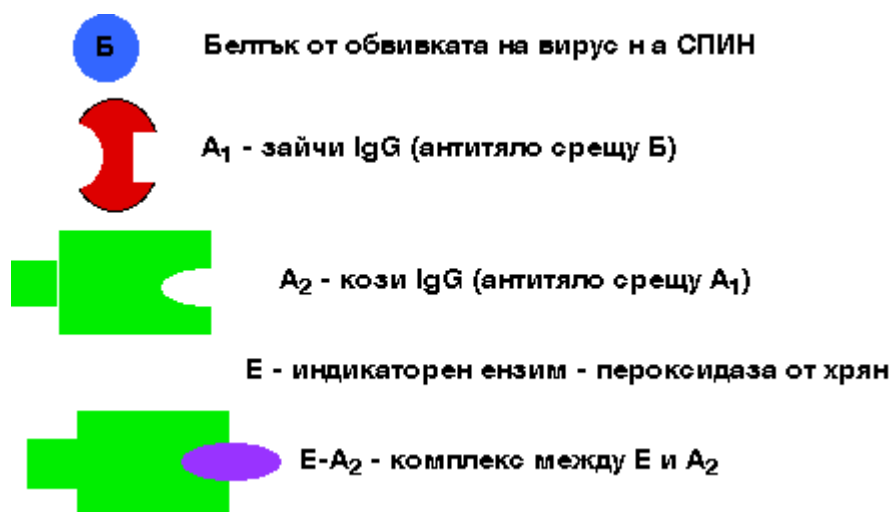


#### 4.4.10 Роля на комплекси "ензим-антитяло" в клиничния анализ - пример за определяне белтъците на вируса на СПИН чрез метода ELISA

Съкращението ELISA идва от английското название на метода: Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay.

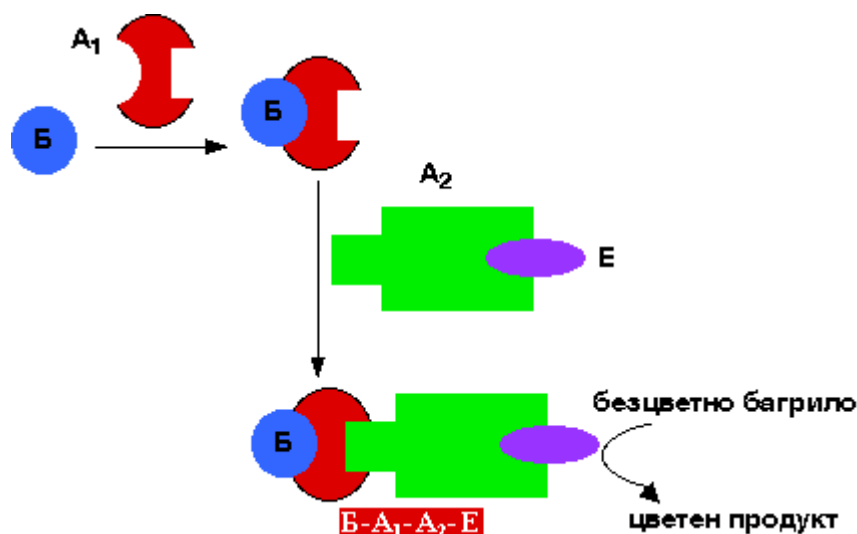
Свързването на индикаторен ензим (напр. пероксидаза) със специфично антитяло срещу белтъчен антиген, напр. от вируса на СПИН (HIV) позволява провеждане на изключително специфично и чувствително определяне на белтъците на този вирус. Пероксидазата се използва да катализира получаването на цветен продукт, който се спектрофотометрира и който е пропорционален на количеството на антигена в пробата.

При описание принципа на метода ELISA се използват означенията, дадени на фиг. 4-43-1:



**Фиг. 4-43-1.** Означения, използвани при определяне белтъка от обвивката на вируса на СПИН чрез метода ELISA.

Тестът за вируса на СПИН се извършва в полистиренови плаки с малки вдлъбнати цилиндърчета по начина, описан на фиг. 4-43-2.



Фиг. 4-43-2.  
Определяне на белтъка от обвивката на вируса на СПИН чрез метода ELISA.

Последователно се извършват следните операции:

- 1) получаване на  $A_1$ ,  $A_2$  и комплекса  $A_2-E$ .
- 2) инкубиране серума на пациента с подготвените антитела в реда, показан на фиг. 4-43-2, до получаване на четворен комплекс ( $B-A_1-A_2-E$ ). След всяко инкубиране несвързаните антитела се отмиват.
- 3) цветна реакция, катализирана от свързания  $E$ .
- 4) спектрофотометриране на цветния продукт, чиято екстинкция е пропорционална на количеството на вирусния белтък  $B$ .

Каталитичното действие на свързаната пероксидаза позволява измерването на много ниски количества от вирусния белтък.

#### 4.5 Насоки за самостоятелна работа

**4.5.1. Изберете главната страница на "Интерактивни тестове".** От нея изберете примерния тест "Ензими" в желан от Вас режим.

#### 4.5.2. Симулация на клиничен случай

Изберете Симулации на клинични случаи и от демонстрационните симулации изберете случай "Васил".

#### 4.6 Литература

1. Рапопорт С. М. (1966) Медицинская биохимия, Изд. "Медицина", Москва, стр. 144 (перевод с немецкого).
2. Николов, Т. (1995) Ензими, в: Ангелов, А., Е. Гачев, К. Данчева, А. Кръшкова, Т. Николов, Л. Сираков, Биохимия за медици и стоматолози, 1995, Университетско издателство "Св. Климент Охридски", София, стр. 81-127.
3. Enzyme nomenclature (1992) Recommendations of IUBMB committee, San Diego, New York, London, Sidney, Tokyo, Toronto, Academic Press или Systematic names and EC nomenclature numbers: <http://www.expasy.org/enzyme>
4. Sayle, R. <http://www.metaphorics.com>
5. Birktoft, J. J., Blow, D. M. J. Mol. Biol. 68, 1972, 187. The structure of crystalline alpha-chymotrypsin.
6. Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F. Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M (1977). J. Biol. Chem. 112, 535, Protein Data Bank. A computer-based archival file for the macromolecular structures
7. Страйер, Л. Биохимия, Пер. с англ. Мир, 1985, т. 2, стр. 275.
8. Becker, M. A., Kostel, P. J. Meyer, L. J. and Seegmiller, J. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1973, 2749. Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase: increased enzyme specific activity in a family with gout and excessive purine synthesis
9. Burnell, J. C., Carr, L. G., Dwulet, F. E., Edenberg, H. J., Li, T. -K and Bosron, W. F. Biochem. Biophys. Res. Commun. 146, 1987, 1227. The human b3 alcohol dehydrogenase subunit differs from b1 by a cys- arg-369 substitution which decreased NAD(H) binding.
10. Crabb, D. W. Edenberg, H. J., Bosron, W. F. and Li, T. -K. J. Clin. Invest. 83, 1989, 314. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity.
11. Sperling, O., Persky-Brosh, S., Boen, P. and DeVries, A. Biochem. Med. 7, 1973, 389. A human erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate synthetase mutationally altered in regulatory properties.
12. Webb, J., C. Thompson (1992) Thrombolysis for acute myocardial infarction. Can. Fam. Physician 38, 1415.