

الكيمياء الحيوية ١ - د. فايزة القبيلي - المحاضرة السابعة

فئة بحث الإنزيمات

Enzymes

Enzyme Inhibitors مثبطات الإنزيمات

تفقد الإنزيمات فعاليتها عندما يتم تمسخها، و تفقد البنية الوظيفية لها. والسبب في ذلك هو المواد الكيميائية أو المعدلات السلبية. وقد تكون مواد عضوية أو شوارد لا عضوية.

• يتم تثبيط الإنزيمات بثلاث طرق:

• تثبيط تنافسي (عكوس)؛

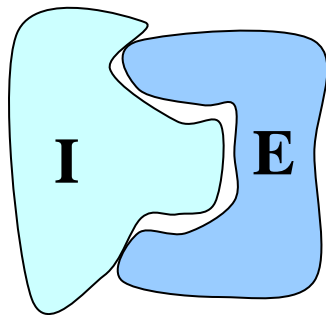
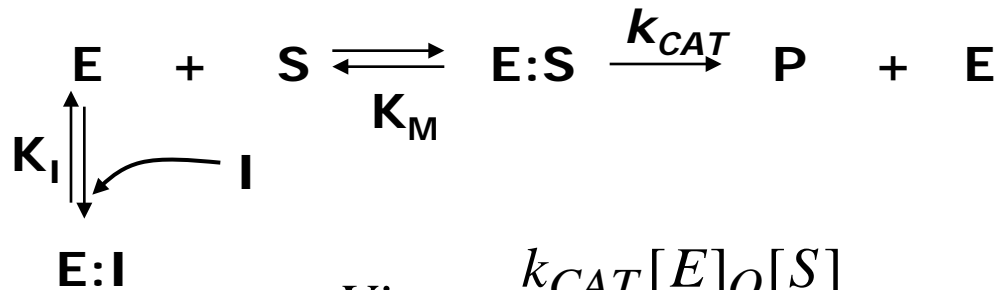
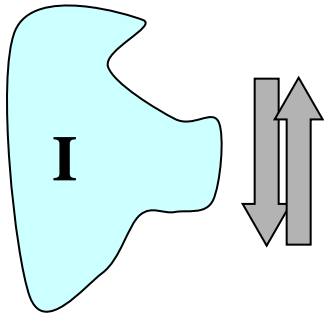
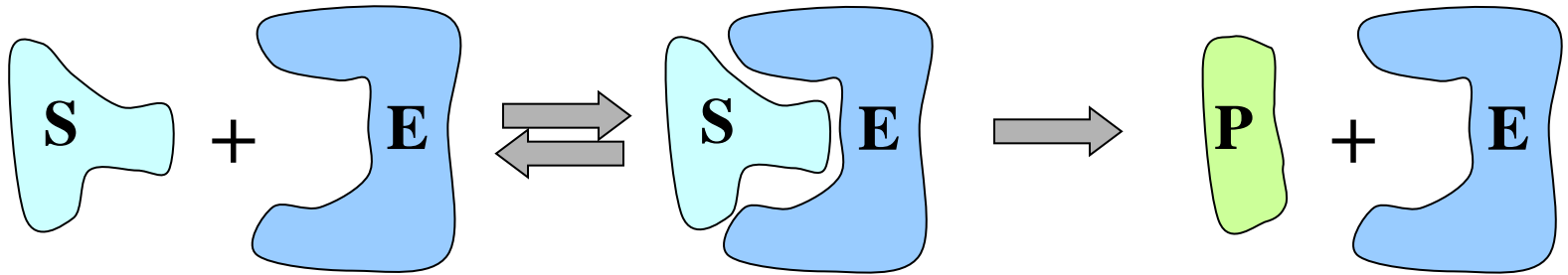
• تثبيط لا تنافسي (عكوس، أو لا عكوس)؛

• تثبيط تفارغي allosteric inhibition.

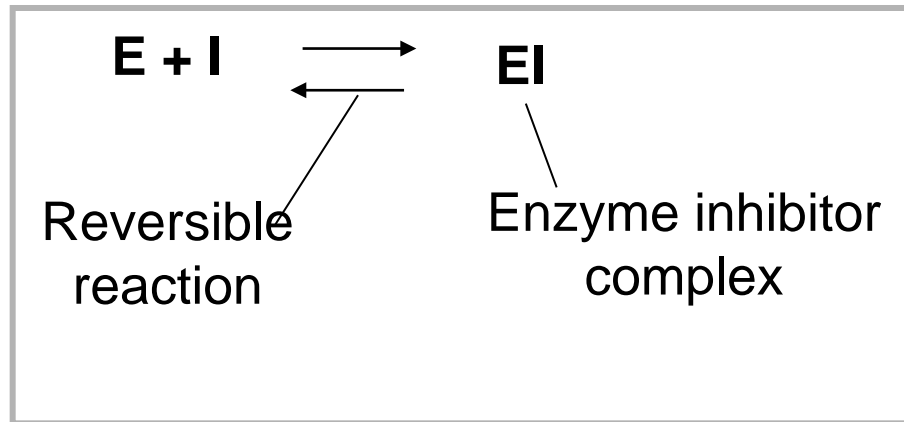
١- التثبيط التنافسي Competitive inhibition

يحدث هذا التثبيط عندما يشغل الموقع الفعال في الإنزيم بمادة مغايرة للركيزة الخاصة بالإنزيم، لكنها مشابهة لها بنيوياً وكيميائياً. وهو نوع من التثبيط العكوس.

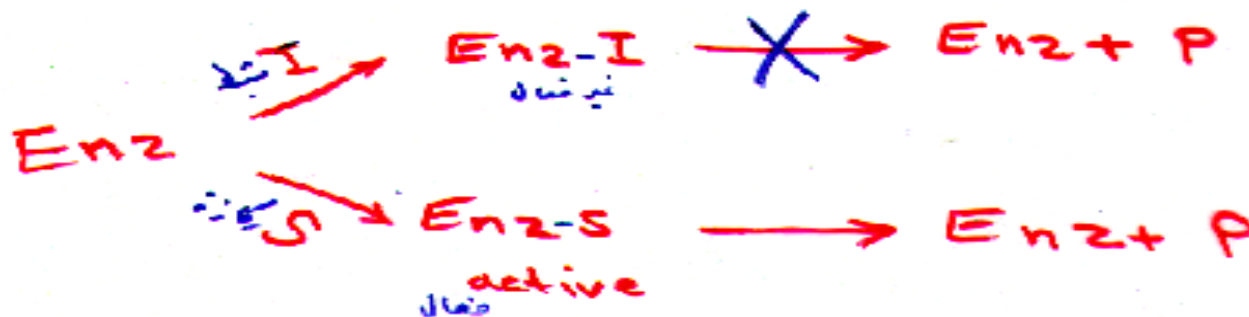
□ **Competitive Inhibition**



$$V_i = \frac{k_{CAT} [E]_0 [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + [S]}$$



- يتشكل مزيج من E-S و E-I لكن تعتمد كميتهما على:
- ألفة الإنزيم لكل من الركيزة Substrate و المثبط inhibitor؛
- كمية المثبط و الركيزة؛
- زمن حضارة الإنزيم مع الركيزة و المثبط.
- وتتنخفض الألفة بين الإنزيم و الركيزة بازدياد تركيز المثبط.



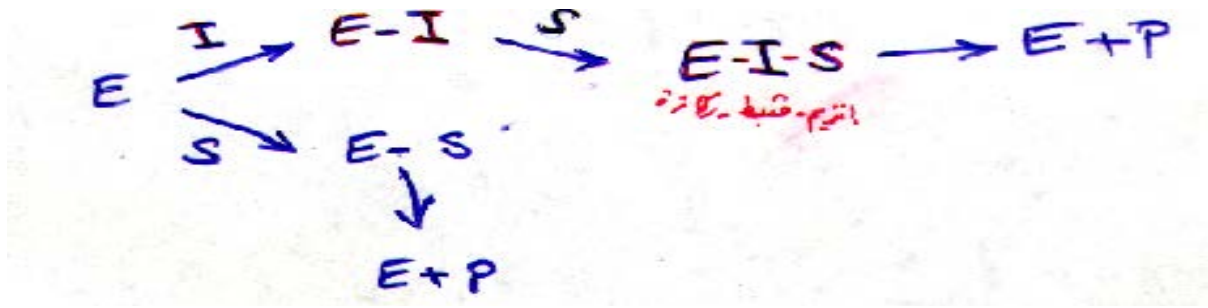
أمثلة على التثبيط التنافسي

- **ألوپورينول:** مثبط تنافسي للكانتين أكسيداز، أي يمنع أكسدة مركبات الكزانين، وتشكيل حمض أليوريك، ولذلك يُستخدم لمعالجة النقرس.
- **السلفوناميد:** مشابه بنيوياً لـ BABA الضروري لنمو البكتريا بتشكيله لحمض الفوليك، وبالتالي السلفوناميد مضاد لنمو البكتريا.
- **الميتوتريكسات:** البنية الكيميائية هي: ٤-أمينو N15 ميثيل فوليك أسيد. مشابه بنيوياً لحمض الفوليك، ومثبط تنافسي للفوليك ريدكتاز ويمنع تشكيل FH4. ويمنع اصطناع الـ DNA.
- **مثبطات MAO:** تعمل MAO على أكسدة الكاتيكولأمينات (مثل الأدرينالين Ad والنورأدرينالين NE، والأمفيتامين و الإيفدرين المشابهان للكاتيكولامين بنيوياً)، لذلك يزداد مفعول الكاتيكولامين عند استخدام هذه الأدوية.

يتراجع التثبيط بزيادة تركيز الركازة.

٢ - التثبيط اللا تنافسي Non-competitive Inhibition

يحدث عندما يكون المثبط غير متمائل مع الركيزة لا كيميائياً ولا بنيوياً. حيث يرتبط المثبط مع مناطق مختلفة من الإنزيم، مما يخفض من سرعة التفاعل الإنزيمي (السرعة العظمى للتفاعل). وهو يقسم إلى عكوس و لا عكوس.



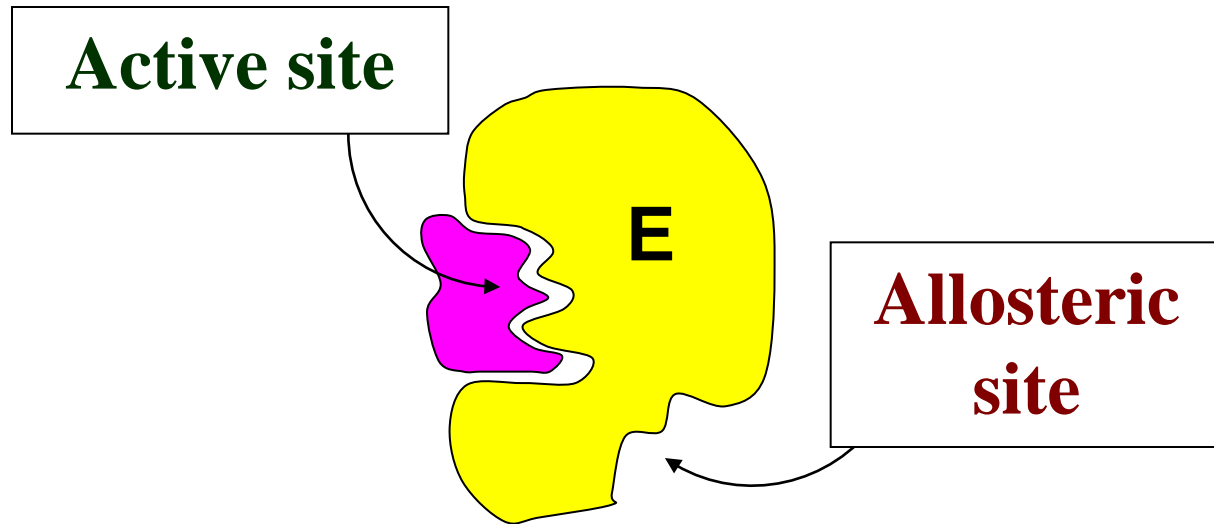
- التثبيط اللا تنافسي العكوس: إذا تم انفكاك المثبط عن الإنزيم دون أن تتبدل الفاعلية الإنزيمية.

- التثبيط اللا تنافسي اللا عكوس: يحدث في حال انخفاض أو انعدام الفاعلية الإنزيمية. وقد يكون بتأثير Hg^{+} ، Ag^{+} (شوارد معدنية ثقيلة)، أو عوامل مؤكسدة، حيث تنقص فاعلية الإنزيمات، ويتعلق التثبيط بتركيز هذه المثبطات.

٣ - البدالة: التثبيط التفارغي

The switch: Allosteric inhibition

Allosteric means “other site”



Enzyme Inhibition (Mechanism)

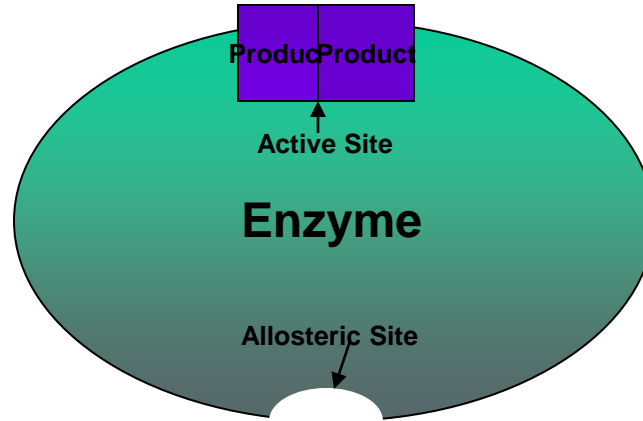
| | ▶ Competitive | □ Non-competitive | ⬢ Uncompetitive |
|--------------------------|--|---|--|
| Cartoon Guide | <p>Substrate</p> <p>Inhibitor</p> <p>Compete for active site</p> | <p>Different site</p> | <p>Uncompetitive</p> |
| Equation and Description | $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I$ \updownarrow EI | $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I$ \updownarrow $EI + S \rightarrow EIS$ | $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I$ \updownarrow EIS |
| | [I] binds to free [E] only, and competes with [S]; increasing [S] overcomes Inhibition by [I]. | [I] binds to free [E] or [ES] complex; Increasing [S] can not overcome [I] inhibition. | [I] binds to [ES] complex only, increasing [S] favors the inhibition by [I]. |

Enzyme Inhibition (Plots)

| | ▶ Competitive | ▣ Non-competitive | ◀ Uncompetitive |
|-------------------|---|---|--|
| Direct Plots | <p>v_0 vs $[S], \text{mM}$. V_{\max} unchanged, K_m increased to K_m'.</p> | <p>v_0 vs $[S], \text{mM}$. V_{\max} decreased to V_{\max}', $K_m = K_m'$.</p> | <p>v_0 vs $[S], \text{mM}$. Both V_{\max} and K_m decreased to V_{\max}' and K_m'.</p> |
| Double Reciprocal | <p>$1/v_0$ vs $1/[S]$. Intersect at Y axis. $1/V_{\max}$ unchanged, $1/K_m$ increased.</p> | <p>$1/v_0$ vs $1/[S]$. Intersect at X axis. $1/V_{\max}$ decreased, $1/K_m$ unchanged.</p> | <p>$1/v_0$ vs $1/[S]$. Two parallel lines. Both $1/V_{\max}$ and $1/K_m$ decreased.</p> |

Substrate

Normal Enzyme Function



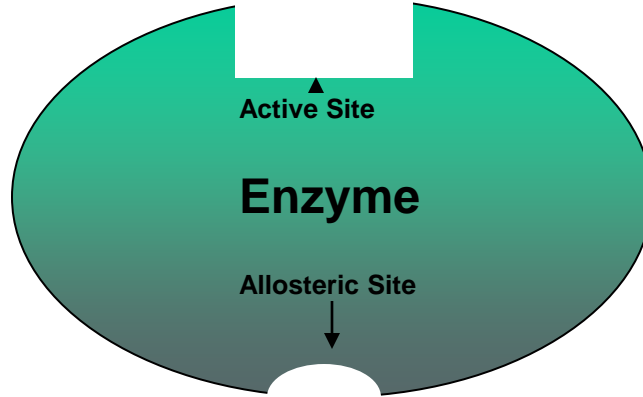
الوظيفة السوية للإنزيم:

- تلتصق الركيزة بالإنزيم في المقر الفعال وتحفز تشكيل ناتج.
- زيادة تركيز الركيزة يزيد سرعة التفاعل إلا أن تصبح المقدرات الفعالة بكاملها مشغولة.

Substrate

Competing Molecule

التثبيط التنافسي Competitive Inhibition



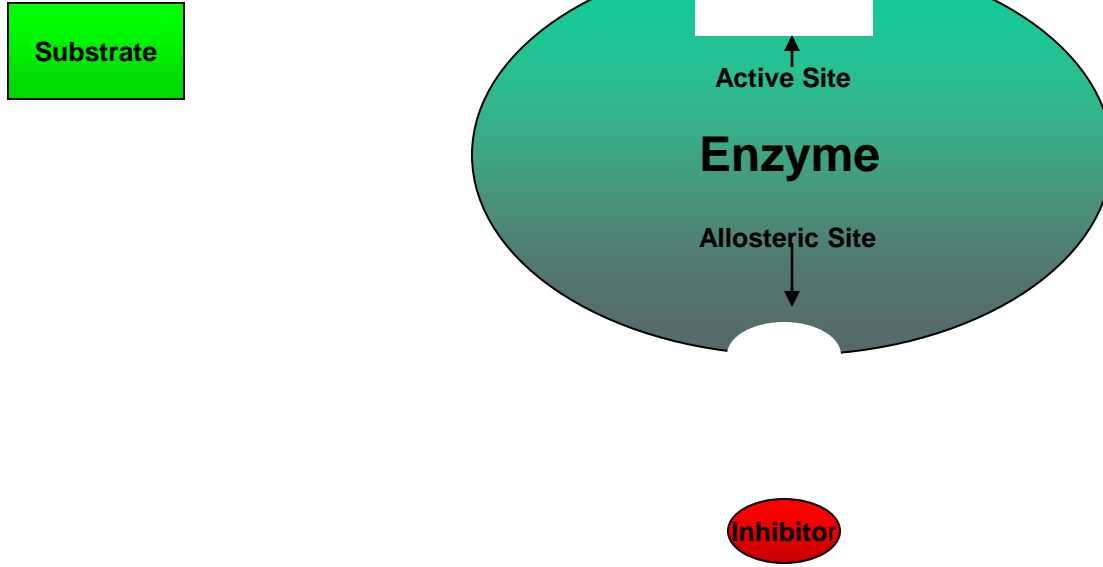
التثبيط التنافسي

- يتنافس جزيء مشابه للركيزة لكنه غير فعال على الارتباط بالمقر الفعال للإنزيم، ويمنع الركيزة من الارتباط مع الإنزيم، فلا يحدث تفاعل.
- زيادة تركيز الركيزة يمكن أن يتغلب على التثبيط.
- الأدوية هي غالباً مثبطات تنافسية competitive inhibitors.

Competitive Inhibition

- Example: Ethanol is metabolized in the body by oxidation to acetaldehyde, which is in turn further oxidized to acetic acid by aldehyde oxidase enzymes. Normally, the second reaction is rapid so that acetaldehyde does not accumulate in the body.
- A drug, **disulfiram (Antabuse)** **inhibits** the aldehyde oxidase which causes the accumulation of acetaldehyde with subsequent unpleasant side-effects of nausea and vomiting. This drug is sometimes used to help people overcome the drinking habit.

التثبيط اللاتنافسي Non-competitive Inhibition



التثبيط اللاتنافسي

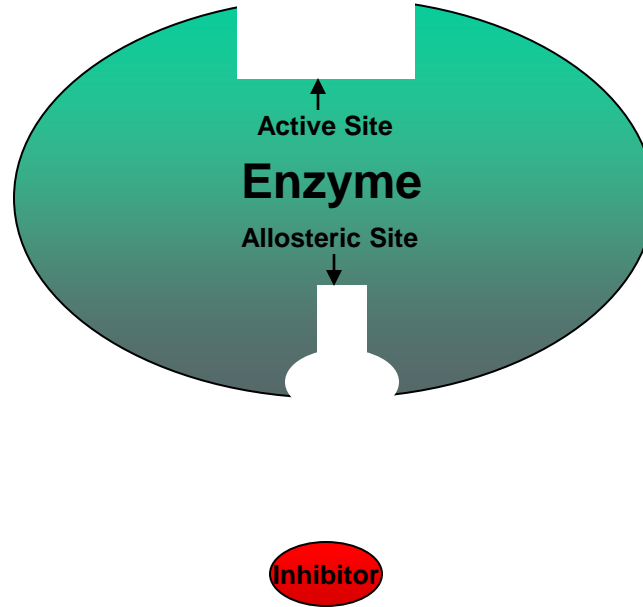
- يرتبط الجزيء المثبط بمقر التثبيط (allosteric site) inhibition site. وهذا يمنع ارتباط الركيزة ولا يحدث التفاعل.
- زيادة تركيز الركيزة لا يتغلب على التثبيط.
- مثال على ذلك التثبيط بالتقييم الراجع feedback inhibition

Non-competitive Inhibition

- If the inhibition is at a place remote from the active site, this is called allosteric inhibition. Allosteric means "other site" or "other structure". The interaction of an inhibitor at an allosteric site changes the structure of the enzyme so that the active site is also changed.
- Since many enzymes contain sulfhydryl (-SH), alcohol, or acid groups as part of their active sites, any chemical which can react with them acts as a noncompetitive inhibitor. Heavy metals such as Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} have strong affinities for -SH groups.
- Nerve gases such as diisopropylfluorophosphate (DFP) inhibit the active site of acetylcholine esterase by reacting with the hydroxyl group of serine to make an ester.

Substrate

التثبيط غير التنافسي Uncompetitive Inhibition



التثبيط غير التنافسي

- ترتبط الركيزة بالإنزيم وتعديل المقر الفعال لتسمح للمثبط بالارتباط.
- يبدل هذا الإنزيم ليمنع التفاعل على المقر الفعال.
- زيادة تركيز الركيزة غير مرغوب به.

Uncompetitive Inhibition

- An example of clinical importance is the use of Li^+ ions to treat manic depression, the effectiveness of which has been attributed to the uncompetitive inhibition of *myo*-inositol monophosphatase by Li^+ .

تنظيم فعالية الإنزيمات

يجري التنظيم بالتعديل التساهمي العكوس وغير العكوس.

• التعديل التساهمي غير العكوس

يتم إفراز بعض الأنزيمات بشكلها غير الفعال (طلائع الإنزيمات، وفي موقع التفاعل يجري حلمة الروابط الببتيدية الخاصة إما إنزيمياً، أو بسبب تبدلات في قيم الـ pH لتتحول إلى الشكل الفعال.

مثال: يتحول الببسينوجين إلى ببسين، و البلازمينوجين إلى بلازمين. وبعد الحلمة لا يمكن العودة مرة أخرى إلى الشكل الأولي (طليعة الإنزيم).

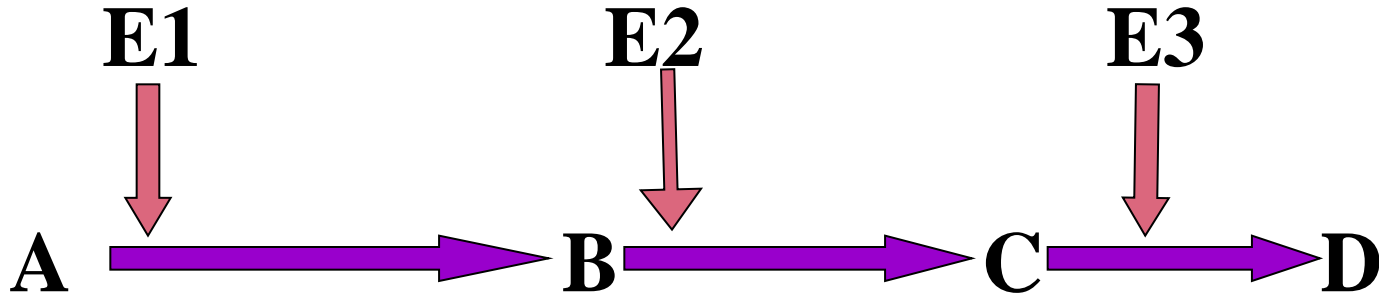
• التعديل التساهمي العكوس

يجري بإضافة أو نزع زمر الفسفور، أو الأدينيل، وهناك العديد من الإنزيمات تختلف في أشكالها الفعالة (فقد تكون مفسفرة، أو غير مفسفرة) كما يتطلب التفاعل.

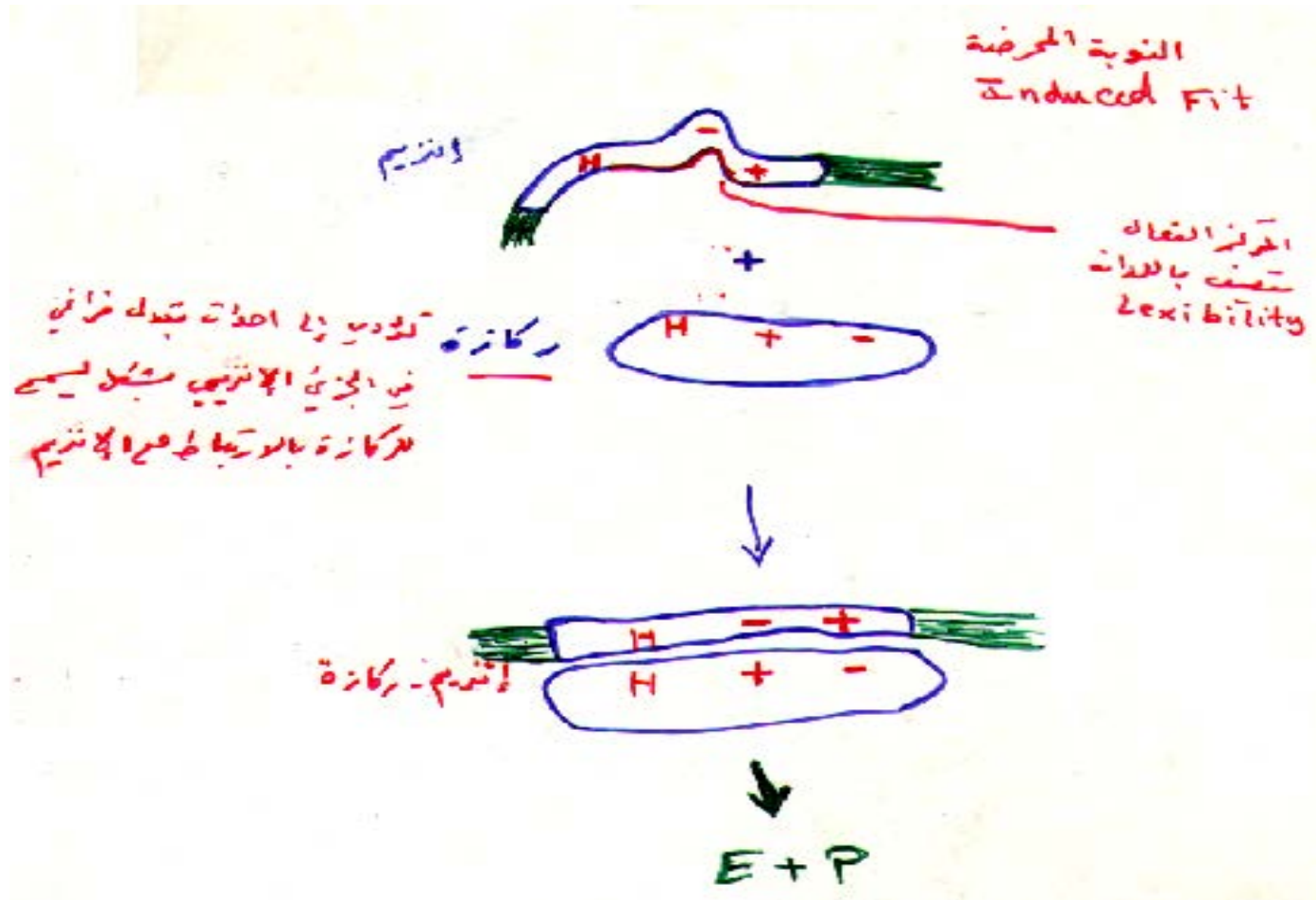
مثال: تعمل البروتين كيناز في العضلات على فسفرة الفسفوريلاز كيناز، والجليكوجين سينتيتاز.

تنظيم اصطناع الإنزيمات

- تركيز الإنزيمات عامل ضروري مسؤول عن الفعالية الإنزيمية، وبما أن الإنزيمات هي بروتينات بطبيعتها، فإن اصطناعها يتم تحت سيطرة الجينات.
- التثبيط بالتلقيح الراجع
- التراكيز المرتفعة من الناتج D تؤدي إلى تثبيط تحول A إلى B. أي D مثبط ارتجاعي لـ E1.
- التثبيط بالتلقيح الراجع التآزري التأثير المثبط بسبب ازدياد اثنين أو أكثر من المنتجات النهائية.



يستند التفسير الحديث لآلية فعل الإنزيمات إلى: طراز النوبة المحرصة
Induced fit للمركز الواسطي، حيث يتصف هذا المركز باللدانة **Lexibility**
 بحيث تؤدي الركيزة إلى إحداث تبدل فراغي في الجزيء الإنزيمي وبالتالي يمكن
 للركيزة أن ترتبط مع الإنزيم.



مصدر الإنزيمات

- إنزيمات مشتقة من البلازما: تعمل على ركازات موجودة في البلازما (مثل إنزيمات التخثر).
- إنزيمات مشتقة من الخلايا: تملك فعالية عالية في الخلايا و تفيض إلى الهيولى، و تُقسم إلى:
 - إفرازية: مشتقة بشكل أساسي من الغدد الهاضمة وتعمل في الفراغ خارج الخلوي.
 - استقلابية: تتوسط الاستقلاب.
- و تدخل الإنزيمات المشتقة من الخلية البلازما بمقادير صغيرة نتيجة لـ :
 - التقدم في عمر الخلية.
 - الانتشار عبر أغشية الخلايا غير المتخرية.
 - و تغادر البلازما نتيجة لـ :
 - إزالة التفعيل.
 - تقويض الجمعية العامة للبروتين.
 - و نادراً الإطراح في البول و الصفراء.

الآليات المحتملة المسؤولة عن الإطراح الشاذ :

- يمكن أن ترتفع الإنزيمات بفعل الأمراض التي تحرض على:
 - زيادة معدل تحررها.
 - نقصان معدل الإطراح أو التوزع.

١ - زيادة المستويات المصلية

A- زيادة التحرر: بسبب

* **نخر الخلايا** و يعتمد النموذج الناتج على :

- الإنزيمات الموجودة بشكل طبيعي في النسيج.

- نمط النخر و اتساعه.

* **زيادة نفوذية غشاء الخلية بدون تنخر الخلية**، كما في:

- المرحلة المبكرة من التهاب الكبد الفيروسي قبل ظهور اليرقان (S-GPT).

- الحثل العضلي المتقدم (الدولاز، S-GOT، CPK).

* **زيادة إنتاج الإنزيم ضمن الخلية**: تصادف أثناء المعالجة بالأدوية البانية للبروتين.

* زيادة في المصدر النسيجي للإنزيمات بسبب:

- زيادة معدل الإنتاج في الخلايا.
- أو زيادة عدد الخلايا أو الكتلة الخلوية (كالسرطان).

B- خلل الإطراح / التوزع:

* زيادة مستويات ALP، LAP المصلية لدى مرضى اليرقان الانسدادي.

* ارتفاع الإنزيمات في المرض الكلوي.

٢ - انخفاض الإنزيمات المصلية :

A- نقص تشكل الإنزيم بسبب:

- وراثي: فمثلاً في داء ويلسون ينخفض السيرولوبلازمين.
- مكتسب:

- في التهاب الكبد (ينخفض الكولين استراز الكاذب بسبب نقص انتاجه)

- أمراض البنكرياس (انخفاض أميلاز المصل).

B- التثبيط الإنزيمي:

فمثلاً تنخفض مستويات الكولين استراز الكاذب في التسمم بمبيدات الحشرات.

C- انخفاض العامل التميم.

وحدة فعالية الإنزيم المصلي

• يعبر عن الفعالية الإنزيمية بوحدات دولية

International units (IU)

• **التعريف:**

IU : فعالية الإنزيم التي تحول مكمول واحد من المادة

كل دقيقة تحت الشروط المثلى ودرجة حرارة محددة

ويعبر عنها بـ IU/ml.

قيمة الإنزيم المصلي

- **القيمة التشخيصية:** مثلاً : المعايير الإنزيمية لـ CK في يوم الاحتشاء المصلي تكون مفيدة للتشخيص إذا كانت تغيرات ECG غير مجدية للتشخيص.
- **في التشخيص التفريقي :** يفيد في التمييز بين مرضين متشابهي الأعراض أحدهما فقط يسبب ارتفاع إنزيم معين لا يرفعه الآخر (كالتمييز بين احتشاء العضلة القلبية والانصمام الرئوي حيث يترافق كل منهما مع ألم صدري).

LDH



GOT

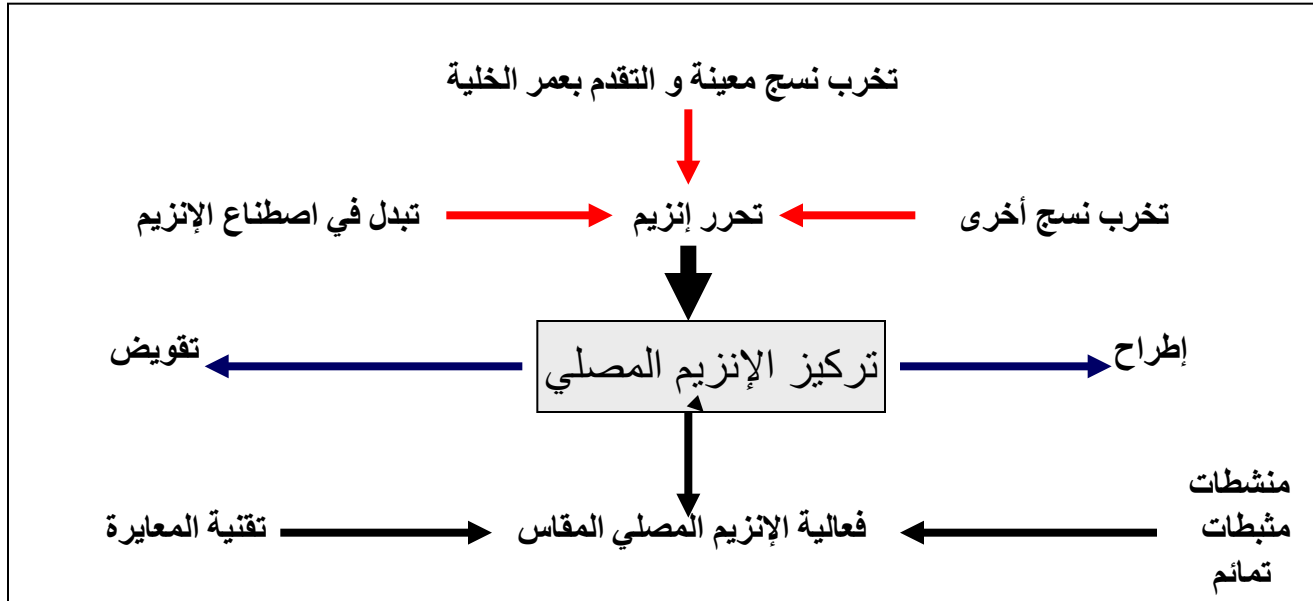


طبيعي

احتشاء العضلة القلبية

الانصمام الرئوي





القيمة التشخيصية للإنزيمات

الإنزيمات أساس الوظيفة الخلوية، أي خلل في إنشائها (بسبب الوراثة أو البيئة) يؤدي إلى تخريب الوظيفة الخلوية، وهي تقسم حسب ضرورتها إلى :

١- إنزيمات ضرورية لحياة الخلية

بدونها تموت الخلية، منها الإنزيمات الضرورية لاصطناع DNA و RNA و البروتين و الـ ATP.

٢- إنزيمات ضرورية لوظيفة معينة في الخلايا

بدونها يتشوش الاستقلاب، وهي تشاهد في بعض العيوب الوراثية التي تؤدي إلى عوز إنزيمي وبالتالي بعض الأمراض (عوز G6PD).

٣- إنزيمات غير ضرورية لوظيفة الخلايا

لا يؤدي غيابها إلى حدوث عيب صريح.

الأهمية التشخيصية لبعض الإنزيمات

- ١- الليباز Lipase: تزداد في التهاب المعثكلة الحاد، وسرطان المعثكلة.
- ٢- الأميلاز Amylase: تزداد في التهاب المعثكلة الحاد، و في التهاب الغدة النكفية.
- ٣- التربسين Trypsin: تزداد في التهاب المعثكلة الحاد.
- ٤- الفسفاتاز القلوية: تزداد في انسداد القناة الصفراوية، وفي داء باجيت (التهاب العظم المشوه)، وسرطانات العظم.
- ٥- الكولين استراز: تنخفض في الأمراض الكبدية، سوء التغذية، الأمراض الخمجية الحادة، داء باجيت، و في القصور الكلوي المزمن.
- ٦- ناقلات الأمين: وهي تضم
 - أ- SGOT (AST): ترتفع في أمراض الكبد الحادة، وفي احتشاء العضلة القلبية.
 - ب- SGPT (ALT): ترتفع في أمراض الكبد الحادة.

٧- نازعة الهيدروجين اللبنية Lactate dehydrogenase (LDH): تزداد في إحتشاء العضلة القلبية، وفي ابيضاض الدم الحاد والمزمن .

٨- كرياتين فسفو كيناز (CPK) : تزداد في احتشاء العضلة القلبية، والحتل العضلي Muscular dystrophy.

الإيزوإنزيمات Isoenzymes

- هي أشكال متعددة multiple forms للإنزيم.
- لها القدرة على تحفيز التفاعل المميز للإنزيم.
- تختلف في بنيتها لكونها ناتجة جينات genes بنيوية مختلفة. ويمكن أن تكون هذه المواضع الجينية على صبغيات مختلفة (الفسفاتاز القلوية لها عدة إيزوإنزيمات "مشيمية، كبدية، معوية"، الأميلاز لها إيزوإنزيمات "معتكلي ولعابي".

Allelozymes الأيلوزيمات: أشكال أخرى للإنزيم تنجم عن الموضع الجيني نفسه .

هناك أشكال أخرى للإنزيم قد تنتج عن مسببات غير وراثية، تنجم عن تعديل يصيب خطوات ما بعد الترجمة Post-translational.

تختلف الإيزوإنزيمات عن بعضها في :

- الفاعلية التحفيزية؛

- pH المثلى؛

- الخصائص الفيزيائية (وزن جزيئي، تعطيل حراري، رحلان كهربائي).

- الخصائص الكيميائية (مثل الاستجابة لمثبطات كيميائية مختلفة).

يمكن معايرة الإيزوإنزيمات بعدة طرق:

١- الرحلان الكهربائي: نتيجة اختلاف الشحنة، واختلاف الوزن الجزيئي.

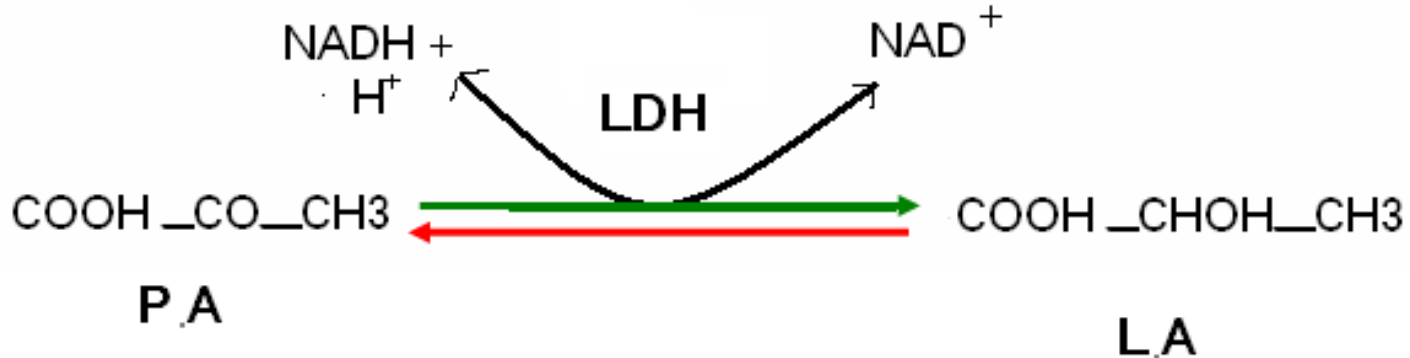
٢- استخدام مثبطات كيميائية نوعية: مثل الحموض الأمينية الميسرة، واليوريا.

٣- طرق فيزيائية: مثل التعطيل الحراري.

قيمة و أهمية الإيزوانزيمات المختلفة

١- إيزوانزيمات LDH

- تحفز الأكسدة العكسية للاكتات إلى بيروفات:



- تتواجد في المصل بشكل ٥ نظائر :

(LDH1 , LDH2, LDH3 , LDH4 , LDH5)

- تفصل النظائر بالرحلان الكهربائي، ويعود الاختلاف في الرحلان لاختلاف الشحنة بسبب اختلاف المحتوى من الحموض الأمينية.

- تحفز جميعها تفاعلات الأكسدة نفسه لكن بنسب مختلفة.

- تملك درجات **pH** وقيم **Km** فضلى مختلفة.

- يعود وجود الأيزوإنزيمات للاختلاف في البنية الرباعية للبروتين الإنزيمي.

الأهمية السريرية :

- يرتفع LDH المصل عند تخرب النسيج القلبية أو الكبدية و أحياناً قد يفيد تحديد منشأ الإنزيم في التشخيص السريري.
- في المصل الطبيعي الإيزوإنزيم السائد هو LDH2 والقمة الأقل لـ LDH5.
- بينما تسود بعد احتشاء القلب الإيزوإنزيمات الأسرع ارتفاعاً و هي (LDH1 و LDH2).
- في حين انه في التهاب الكبد الفيروسي الحاد تسود الإيزوإنزيمات الأبطأ ارتفاعاً (LDH4 و LDH5).

التمييز الكيميائي بين الأيزوإنزيمات:

يتم التمييز بينها اعتماداً على :

- * الثبات في الحرارة.
- * التثبيط باليوريا.
- * التفاعل مع ركازة متغيرة.

LDH الكبدية

يتثبط باليوريا

أقل فعالية تجاه أوكسو بوتيرات

LDH القلبية

أكثر ثباتاً تجاه الحرارة

يستخدم أوكسوبوتيرات

بشكل مفضل كثمالة

* كما ترتفع إيزوإنزيمات LDH في الخبثاء، حيث يترافق كل نمط سرطاني مع ارتفاع إيزوإنزيم معين.

٢ - إيزوانزيمات CPK

| النمط | السلسلة عديدة الببتيد | حركية الرحلان الكهربائي | الموجودات النسيجية |
|-------|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| CPK-1 | BB | حركية سريعة | الدماغ |
| CPK-2 | MB | | العضلة القلبية |
| CPK-3 | MM | حركية بطيئة | العضلات الهيكلية |

ويمكن فصل هذه الأيزوإنزيمات بـ :

- ١- الرحلان الكهربائي .
- ٢- كروماتوغرافيا التبادل الشاردي .

• ملاحظة :

بشكل طبيعي : CK-2 صغير جداً (يشكل ٤,٥ إلى ٢٠ %
من فعالية CK الكلي في البلازما) ولا يمكن التحري عنه
غالباً ، و يزداد في احتشاء القلب لحوالي ٢٠ ضعف .

٣- إيزوانزيمات الفسفاتاز القلوية

- الإيزوانزيمات الموجودة بشكل أساسي في المصل مشتقة من الكبد - العظام - الأمعاء والمشيمة

المعايرة : فصل النظائر بـ :

١- الرحلان الكهربائي

٢- التثبيط الكيميائي

٣- إزالة الفعالية بالحرارة.