الكيمياء الحيوية

بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرات الدراسات الاولية

الكيمياء الحيوية

مدرس المادة

أ. م. د.

علي عبد الواحد عبد الحسين

جامعة البصرة. كلية التربية للعلوم الصرفة. قسم الكيمياء

منهج المادة

ان الكيمياء الحيوية لها أهمية كبيرة في حياتنا اليومية حيث تنور عقولنا بنور الصحة من خلال فهم الدور الحيوي للانظمة الغذائية داخل جسم الانسان وكيفية اتباع نظام غذائي صحي يساهم في معالجة الامراض ويطيل من عمر الانسان.

ان منهج مادة الكيمياء الحيوية للفصل الاول والثاني للدراسات الاولية (المرحلة الثالثة/ قسم الكيمياء) يقسم الى سبعة فصول هي:

1. **الكاربوهيدرات.**
2. **الدهون.**
3. **الاحماض الامينية والبروتينات.**
4. **الفيتامينات.**
5. **الانزيمات.**
6. **النيوكليوتيدات والاحماض النووية.**
7. **الهورمونات.**

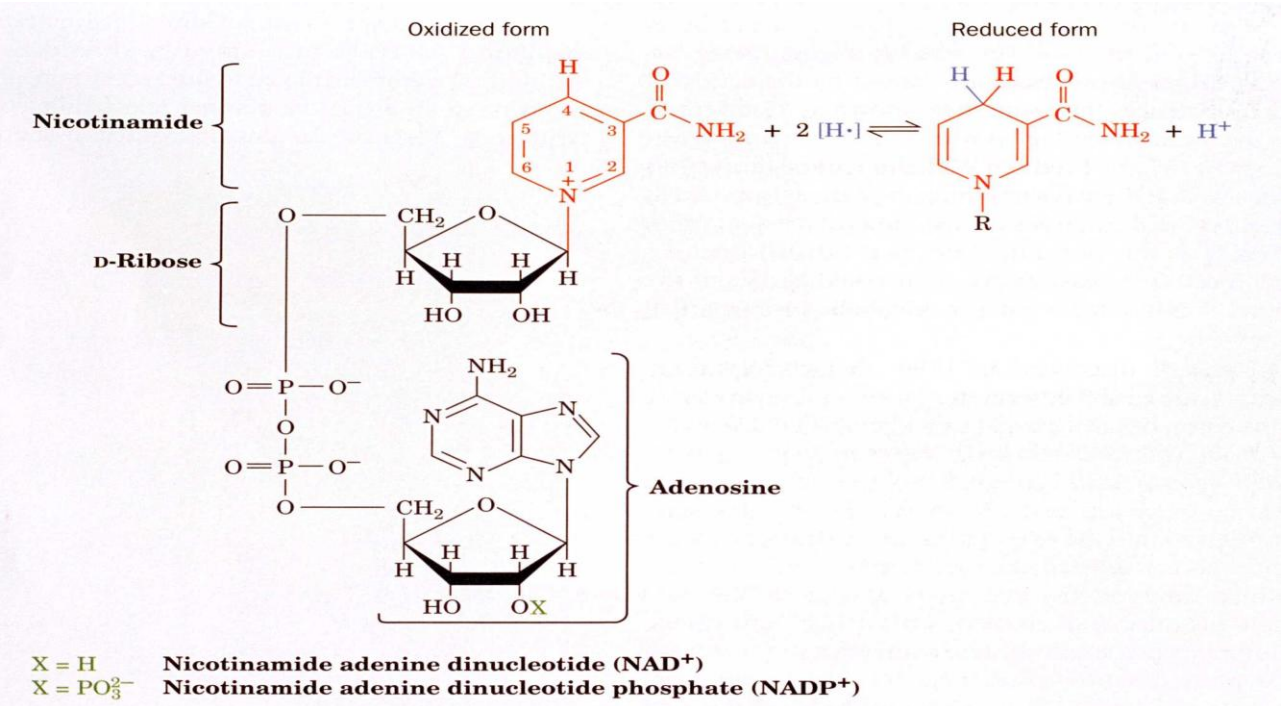
الفصل الخامس

الانزيمات
Enzymes

المقدمة:

الانزيمات هي بروتينات تتالف من الاحماض الامينية نفسها الموجودة في البروتين حيث تتكون من سلسلة او عدة سلاسل بيبتيدية. وتتكون بواسطة الخلايا الحية وتستطيع ان تعمل بصورة مستقلة خارج الخلايا الحية , كما تعمل على اتمام التفاعلات الكيميائية داخل جسم الكائن الحي دون أن تستهلك. تحوي الخلية الحية ما يقارب 1000 من الأنزيمات المختلفة تعمل بدرجة عالية من التخصص على جزيء معين أو مجموعة جزيئات تنتمي لعائلة واحدة. كما يحتوي البعض منها على مكونات ضرورية اخرى لفعالية الانزيم وتسمى بالعوامل المرافقة (المساعدة) Cofactor وتكون بشكل معادن مثل المغنيسيوم والحديد او تكون بشكل جزيئات عضوية معقدة وتسمى بمرافقات الانزيم وعند ارتباط العوامل المرافقة مع الانزيم بقوة فتسمى بالمجموعة الرابطة Prosthetic group. كان دكتور جميس بي سمنر وهو أمريكي الجنسية المتخصص في الكيمياء الحيوية أول من عزل إنزيماً خالصاً على شكل بلورات في عام 1926م حيث قام باستخلاص إنزيم البولاز وهو إنزيم محلل للبول من الفاصوليا. وأثبت أن الإنزيمات هي جزيئات بروتينية وفي عام 1969م قام العلماء ولأول مرة بتصنيع إنزيم كيميائياً من الأحماض الأمينية والذي يقوم بتفكيك حامض إلى جزيئات أحماض أمينية أخرى.

ويوضح التركيب الكيميائي التالي مثال على احد الانزيمات وهو Yeast alcohol dehydrogenase:



وهناك ثلاث انواع من الانزيمات هي:

1- **الانزيمات الاحادية Monoenzymes : وهي انزيمات تتالف جزياتها من سلسلة بيبتيدية واحدة وهذا النوع يساعد في تفاعلات التحلل المائي مثل انزيم Trypsin.**

2- **الانزيمات المعدودة Oligoenzymes: وهي انزيمات تتالف جزيئاتها من 2-60 سلسلة بيبتيدية وتدعى كل سلسلة بيبتيدية بوحدة ثانوية مثل انزيم Hexokinase .**

3- **الانزيمات المتعددة Polyenzymes: وهي مجموعة انزيمات مرتبطة مع بعضها وتشترك جميعا في مسار ما لتحويل مادة او مواد الاساس الى ناتج مثل المعقد Pyruvate dehydrogenase المكون من ثلاثة انزيمات تشترك في تحويل البايروفات الى Acetyl CoA.**

اهمية الانزيمات:

تستخلص الانزيمات من الانسجة الحيوانية والنباتية ثم تنقى وتستعمل للاغراض التالية:

1- **دراسة المسارات الايضية وتنظيم التفاعلات الجارية في ذلك المسار.**

2- **دراسة تركيب والية عمل الانزيمات.**

3- **تستعمل في الصناعة كعوامل مساعدة بايولوجية .**

الانزيمات المنتجة من قبل البكتيريا والفطريات في العديد من التطبيقات الصناعية والتي تشمل صناعة المشروبات والاغذية والمنظفات وكذلك العقاقير الطبية وغيرها مثل:

1- **انزيم الاميليز: وينتجه فطر Aspergillus . الذي يستعمل في صناعة الغراء وصابون الملابس.**

2- **انزيم الايبيز: وتنتجه بكتيريا Bacillus الذي يستعمل في دباغة الجلود وصناعة المنظفات وفى إنتاج الجبن.**

3- **انزيم البوتييز: وينتجه الفطر .Aspergillus الذي يستعمل في صناعة المنظفات والحبر والغراء والجبن وملين اللحم ومنظف الجرو..**

4- **انزيم ستربتوكاينيز: وتنتجه البكتيريا Streptococcus الذي يستعمل كعقار مذيب للجلطة الدموية.**

5- **انزيم المنفحة (الرينين): وتنتجه بكتيريا E. Coli المهندسة وراثيا والذي يستعمل في تصنيع الجبن.**

4- تستخدم دراسة فعالية الانزيمات الموجودة في مصل الدم سريريا كمؤشرات لمعرفة حالة مرضية (عند تعرض نسيج او عضو معين داخل الجسم الى ظرف معين يؤدي الى تحرر الانزيمات الى الدم وبالتالي فعند تحليل الدم وتحديد الانزيمات الموجودة فيه يمكن تحديد نوع المرض او النسيج المتاثر).

تصنيف الانزيمات:

تصنف الانزيمات حسب طبيعة التفاعل المحفز الى ستة اصناف هي:

1- الانزيمات المؤكسدة – المختزلة Oxido-Reductase enzymes:

وهي انزيمات تشمل جميع الانزيمات التي تعمل في تفاعلات الاكسدة مثل انزيم

Alcohol NAD^+ oxidoreductase والمرقم 1.1.1.1 .

2- الانزيمات الناقلة Transferase enzymes:

وهس انزيمات تشمل جميع الانزيمات التي تنقل مجموعة كيمياوية من مادة اساس لاخرى مثل نقل مجاميع الامين او المثيل او نقل مجاميع تحتوي الفسفور والكبريت مثل انزيم

Creutin phosphor transferase والمرقم 2.7.3.2 .

3- الانزيمات المميئة Hydrolases :

وهي انزيمات تشمل جميع الانزيمات التي تعمل في تفاعلات التحلل المائي مثل الانزيمات الهاضمة Lipase and Amylase ويشار له بالرقم 3.1.1.3 حيث ان رقم 3 يشير الى ان الانزيم مميء وهو يعمل على الاواصر الاسترية 3.1 وهي اواصر كاربوكسيلية.

4- الانزيمات الفاصلة بدون تميؤ Lyases :

وهي انزيمات تشمل جميع الانزيمات التي تعمل على حذف مجاميع كيمياوية بدون تميؤ حيث تزيح مجموعة من المادة الاساس لتكوين اصرة ثنائية او تضيف مجموعة الى الاصرة الثنائية للمادة الاساس لينتج اصرة مفردة وتعمل هذه الانزيمات على الاواصر (C-C, C-N, C-S, C-O) مثل انزيم

2- Oxoacid carboxy lyase (Pyruvate decarboxylase) والمرقم 4.1.1.1

وهو يعمل على الاواصر 4.1 (C-C) حاذفا مجموعة كاربوكسيل 4.1.1 .

5- الانزيمات المناظرة (المتماثلة) Isomerase :

وهي انزيمات تشمل جميع الانزيمات التي تعمل على تغير احد متناظرات مركب ما الى متناظر اخر له مثل انزيم Retinol isomerase والذي يتعلق بعملية الابصار والمرقم 5.2.1.3 .

6- الانزيمات المكونة Ligase:

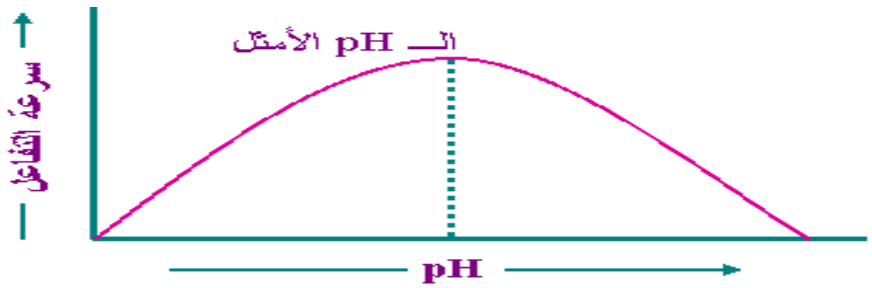
وهي انزيمات تشمل الانزيمات التي تعمل على تكوين اصرة بين جزيئتين معا او ربط نهايتي جزيء واحد لتكوين شكل حلقي وتقترن التفاعلات المحفزة بهذه الانزيمات بتكسر اصرة بايروفوسفات لـ ATP مثل انزيم Tyrosyl itRNA synthetase الذي يربط جزيئتين معا مكونا اواصر 6.1 (C-O) .

الخواص الحركية للانزيمات:

ان دراسة سرع التفاعلات الانزيمية والعوامل المؤثرة عليها يطلق عليه بعلم الحركية للانزيمات, وهناك عدة عوامل تؤثر على فعالية الانزيم اهمها:

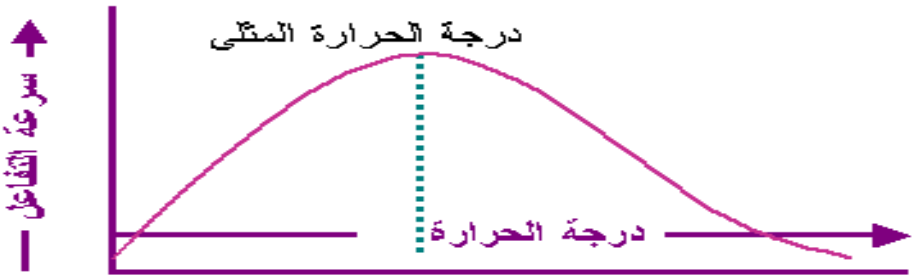
1- تاثير الدالة الحامضية:

لكل انزيم دالة حامضية معينة تدعى بالرقم الهيدروجيني الامثل للانزيم, حيث تكون عنده فعالية الانزيم بدرجتها القصوى, وتقل فعالية الانزيم فوق او تحت الرقم الهيدروجيني مثل انزيم Pepsin الذي يفرز داخل المعدة وله دالة حامضية مثلى قيمتها حوالي 2 وقيمة الدالة الحامضية للمعدة هو 3.2 وكما موضح في المخطط التالي:



2- تأثير درجة الحرارة:

ان ارتفاع درجة الحرارة يزيد من فعالية الانزيم بشرط ان لا يصل هذا الارتفاع الى الحد الذي يؤدي الى مسخ الانزيم, وان فعالية الانزيم تقع بين 10-50 درجة مئوية, كما ان الدرجة الحرارية التي يكون عندها التفاعل الانزيمي في سرعته القصوى يطلق عليها بالدرجة الحرارية المثلى للانزيم وكما موضح في المخطط التالي:



3- تأثير كمية الانزيم:

ان سرعة التفاعل تتناسب طرديا مع كمية الانزيم ضمن مدى واسع لذا ينبغي استعمال تركيز ثابت من المادة الاساس وبمقدار فائض عن حاجة الانزيم ويمكن استخدام هذه العلاقة لقياس كمية انزيم معين في مستخلص لنسيج معين او في سائل بايولوجي معين.

4- تأثير تركيز المادة الاساس:

عند ابقاء تركيز الانزيم ثابتا او عند التركيز الواطيء للمادة الاساس فان سرعة التفاعل الانزيمي (السرعة الاولية) تزداد بازدياد تركيز المادة الاساس لكنه عند الا ستمرار في زيادة تركيز المادة الاساس فان الزيادة في معدل السرعة تتباطيء الى ان تصبح السرعة ثابتة بالرغم من زيادة تركيز المادة الاساس ويطلق على هذه السرعة الثابتة عند التركيز العالي للمادة الاساس بالسرعة القصوى وكما موضح في المخطط التالي:

سوف نتطرق كمثال لدراسة حركية الانزيمات الى معادلة ميكائيل مينتين Michaelis menten لحساب قيمة السرعة القصوى وثابت ميكائيل.

في الحقيقة فان العامل المساعد و الانزيمات لا يصلون الى نقطة التوازن في التفاعل وهذا يعني ان الانزيمات تعجل (تسرع) التفاعل الامامي والعكسي بنفس العامل, كمثال لنفترض:

$$A \Longleftrightarrow B \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

في حالة غياب الانزيم فان:

ثابت سرعة التفاعل الامامي $Kf = 10^{-4}\ S^{-1}$

ثابت سرعة التفاعل العكسي $Kr = 10^{-6}\ S^{-1}$

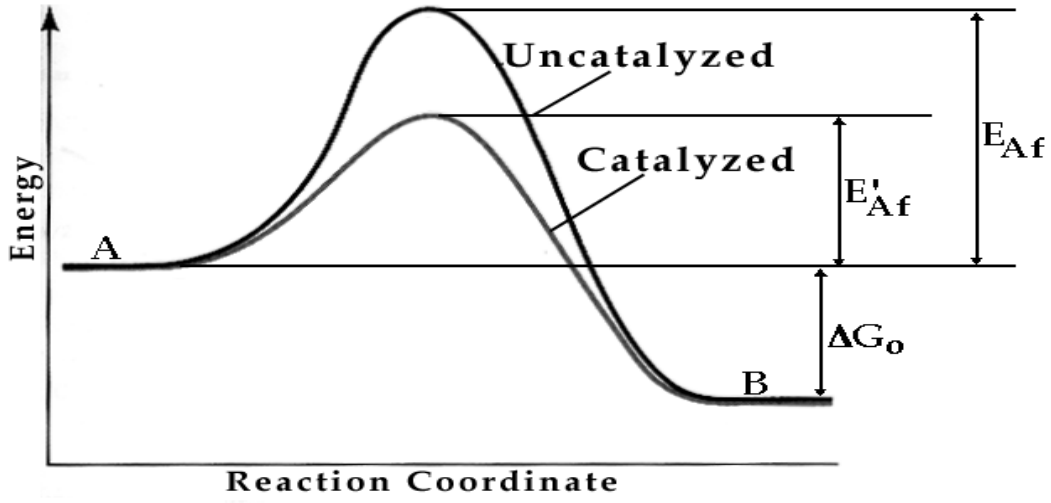
حيث يمكن حساب ثابت التوازن من خلال النسبة بين الثابتين اعلاه:

$$Keq = [B] / [A] = Kf / Kr = 10^{-4} / 10^{-6} = 100 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

في حالة غياب او وجود الانزيم فان تركيز التوازن لـ B اكثر 100 مرة من تركيز التوازن لـ A .

في حالة غياب الانزيم فان التفاعل قد يحتاج الى اكثر من ساعة لكي يصل الى حالة التوازن, بينما في حالة وجود الانزيم فالتفاعل يحتاج الى ثانية لكي يصل الى حالة التوازن.

في حالة تأثر سرعة التفاعل الامامي والعكسي بنفس الكمية, فان ثابت التوازن لا يتأثر بوجود الانزيم لنفس الكمية وكما موضح في الشكل التالي:



حيث:

E_{AF} = طاقة التنشيط للتفاعل الامامي بغياب العامل المساعد

E'_{AF} = كاقة التنشيط للتفاعل الامامي بوجود العامل المساعد

$\triangle G_o$ = التغير في الطاقة الحرة للتفاعل

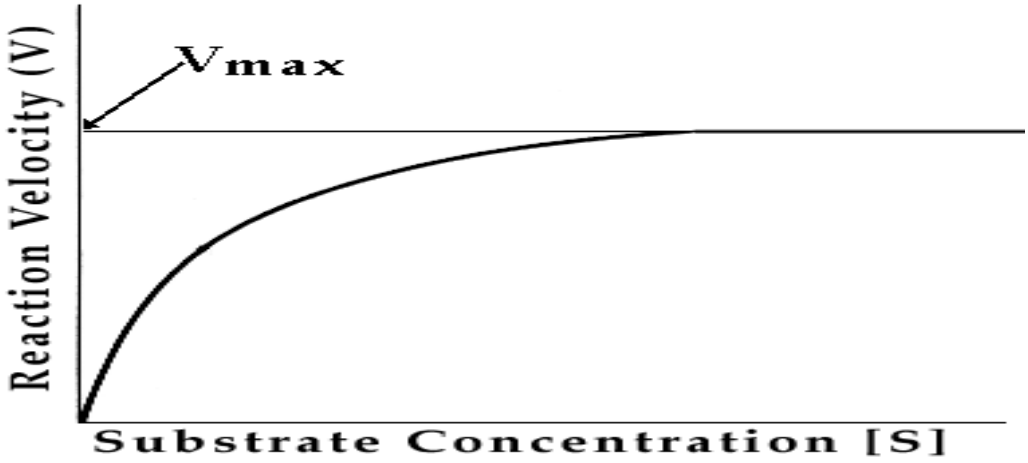
ويمكن توضيح العلاقة بين ثابت التوازن والتغير في الطاقة الحرة من خلال المعادلة التالية:

$$Keq = e^{-\triangle G_o / RT}$$

وبما ان التغير في الطاقة الحرة للتفاعل بوجود او عدم وجود العامل المساعد هو نفسه فان ثابت التوازن يبقى نفسه. يوجد سبب واحد يحدد كفاءة ووتخصص انزيم معين هو طريقة ارتباط او تفاعل الانزيم بالمادة المتفاعلة, والمسمى بالمادة الاساس في تفاعلات الانزيم.

ان دراسة ميكانيكية تفاعلات انزيم العامل المساعد عادة تكون من خلال قياس الحركية لنظام تفاعل انزيم- مادة اساس. وهذه الدراسات تتضمن قياس سرعة تفاعلات انزيم العامل المساعد لتراكيز مختلفة من الانزيم والمادة الاساس. المخطط التالي يوضح مثال على هذه الدراسة (رسم بياني بين سرعة التفاعل وتركيز المادة الاساس):

حيث:



V = سرعة التفاعل

$[S]$ = تركيز المادة الاساس

V_{max} = السرعة القصوى للتفاعل

نموذج مبسط يمثل العلاقة في المخطط اعلاه من خلال المعادلة التالية:

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\Longleftrightarrow}} ES \overset{K_2}{\Longrightarrow} E + P \;\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\; (3)$$

حيث :

E = الانزيم ; S = المادة الاساس ; ES = معقد انزيم – مادة اساس ; P = الناتج

K_1 = ثابت السرعة للتفاعل الامامي ; K_{-1} = ثابت السرعة للتفاعل العكسي

K_2 = ثابت السرعة للتفاعل الامامي للمعقد انزيم – مادة اساس

نحتاج الى علاقة من المخطط والرموز اعلاه للتعبير عن سرعة التفاعل حيث من المعادلة رقم (3) يمكن التعبير عن سرعة التفاعل من خلال المعادلة التالية:

$$V = K_2 [ES] \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (4)$$

تركيز معقد انزيم – مادة اساس غير معروف لكونه حالة وسطية اثناء التفاعل لذلك نفترض ان قيم تركيز معقد انزيم – مادة اساس هي معروفة, التعبير عن السرع في حالة تكوين او تفكك معقد انزيم – مادة اساس هي على التوالي:

$$[ES]_{formation} = K_1 [E] [S] \ldots\ldots\ldots\ldots (5)$$

اعادة ترتيب معادلة رقم (5) سوف نحصل على :

$$[ES]_{falls\ apart} = \{K_{-1} + K_2\} [ES] \ldots\ldots\ldots\ldots (6)$$

يمكن استخدام حالة مستقرة للتعبير عن سرعة التفاعل في حالة الكميات معروفة, اذا كانت الحالة مستقرة فان تركيز لمعقد انزيم – مادة اساس الوسطي يبقى ثابت, بينما تراكيز المتفاعلات والنواتج يتغير. الحالة المستقرة تحدث عندما تكون المعادلة رقم (5) تساوي المعادلة رقم (6):

$$K_1 [E] [S] = \{K_{-1} + K_2\} [ES] \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (7)$$

اعادة ترتيب معادلة رقم (7) سوف نحصل على :

$$[ES] = K_1 [E] [S] / \{K_{-1} + K_2\} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (8)$$

اعادة ترتيب معادلة رقم (8) سوف نحصل على :

$$K_M = K_{-1} + K_2 / K_1 \ldots\ldots\ldots\ldots (9)$$

K_M = ثابت ميكائيل Michaelis constant

نعوض معادلة رقم (9) في معادلة رقم (8) سوف نحصل على :

$$[ES] = [E] [S] / K_M \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (10)$$

في حالة تركيز الانزيم قليل جدا" [S] >> [E] فان تركيز المادة الاساس الغير مرتبطة او متفاعلة يكون مساوي للتركيز الكلي للمادة الاساس [S] . تركيز الانزيم [E] الغير مرتبط او المتفاعل يكون مساوي للتركيز الكلي للانزيم $E_\circ$ مطروح منه تركيز معقد انزيم – مادة اساس:

$$[E] = [E_\circ] - [ES] \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (11)$$

نعوض معادلة رقم (11) في معادلة رقم (10) نحصل على :

$$[ES] = [E_\circ] - [ES] [S] / K_M \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (12)$$

اعادة ترتيب معادلة (12) نحصل على:

$$[ES] = [E_\circ][S]/K_M / 1+[S]/K_M \;\ldots\ldots\ldots\ldots\; (13)$$

او

$$[ES] = [E_\circ][S] / K_M + [S] \;\ldots\ldots\ldots\ldots\; (14)$$

نعوض معادلة رقم (14) في معادلة رقم (4) نحصل على :

$$V = K_2 [E_\circ][S] / K_M + [S] \;\ldots\ldots\ldots\ldots\; (15)$$

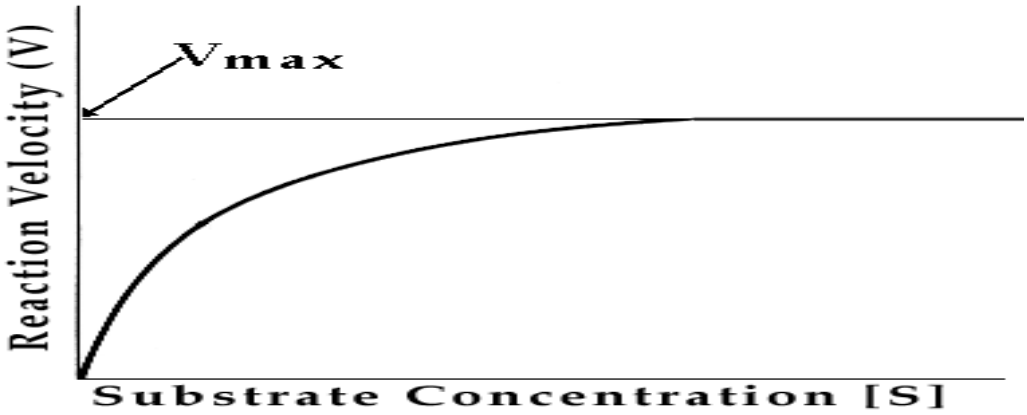
ان سرعة التفاعل القصوى (V_{max}) تحصل عندما تكون كل مواقع الانزيم مشبعة بالمادة الاساس , وهذا يحدث عندما ($[S] >> K_M$) لذلك فان قيمة ($[S] / [S] + K_M = 1$) , في هذه الحالة يمكن التعبير عن سرعة التفاعل القصوى في المعادلة رقم (15) كما يلي:

$$V_{max} = K_2 [E_\circ] \;\ldots\ldots\ldots\ldots\; (16)$$

نعوض معادلة رقم (16) في معادلة رقم (15) نحصل على :

$$V = V_{max} [S] / K_M + [S] \;\ldots\ldots\ldots\ldots\; (17)$$

في حالة رسم بياني بين V و [S] فسوف نحصل على الشكل التالي:



ان المعادلة رقم (17) تصف لنا سلوك حركية انزيم كنموذج من خلال مخطط الحركية في المعادلة رقم (3) , حيث في المعادلة رقم (17) عندما تركيز المادة الاساس يكون واطيء جدا" في حالة $[S] << K_M$ فان: $V \sim [S] V_{max} / K_M$ اي ان السرعة تعود الى تركيز المادة الاساس (وهو وصف للشكل الخطي في الشكل اعلاه).

وفي حالة التركيز العالي للمادة الاساس اي ان $[S] >> K_M$ فان: $V = V_{max}$

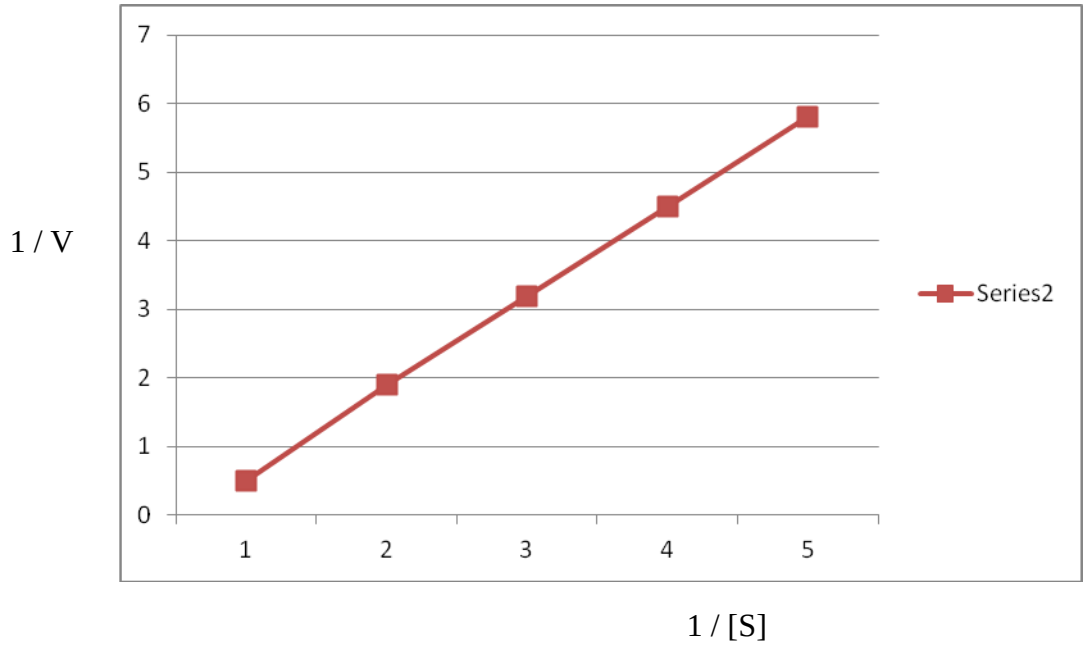
حيث يمكن اعادة ترتيب المعادلة رقم (17) كالتالي:

$$1 / V = 1 / V_{max} + K_M / V_{max}\ 1 / [S] \ldots\ldots\ldots\ldots (18)$$

في حالة $[S] = - K_M$, فان $1/V = 0$, $x\text{- intercept} = 1/ - K_M$, وعند رسم بياني بين $1 / V$ و $1 / [S]$ فيجب ان نحصل على خط مستقيم او منحنى يكون فيه:

$y\text{- intercept} = 1 / V_{max}$ والميل = K_M / V_{max} حيث تدعى هذه الطريقة بطريقة **Lineweaver- Burke**

وكما موضح في المخطط التالي:



في المعادلة رقم (18) في حالة $[S] = K_M$ فان $V = V_{max} / 2$, حيث يكون الانزيم اكثر فعالية اذا كانت قيمة ثابت ميكائيل قليلة عند التراكيز الواطئة للمادة الاساس. تعتمد قيمة ثابت ميكائيل K_M على:

1- خصوصية المادة الاساس.

2- الدالة الحامضية للمحلول.

3- درجة الحرارة التي يحصل فيها التفاعل.

ان قيمة ثابت ميكائيل لمعظم الانزيمات تتراوح بين ($10^{-1} - 10^{-7}$ M).

لتشخيص تفاعل الانزيم – العامل المساعد نوضح هنا مثال لكيفية حساب قيمة السرعة القصوى وثابت ميكائيل , حيث نحسب سرع مختلفة للتفاعل وتراكيز مختلفة للمادة الاساس للتفاعل ايضا ومن

ثم نقسمها وكما موضح في الجدول التالي:

[S] (mM)	V (mM/sec)	1/[S] (mM^{-1})	1/V (sec/mM)
8.33	3.62E-06	0.12	2.76E+05
5.55	3.39E-06	0.18	2.95E+05
2.77	2.75E-06	0.36	3.64E+05
1.38	1.99E-06	0.72	5.02E+05
0.83	1.49E-06	1.2	6.73E+05

نرسم رسم بياني بين 1/[S] و 1/V كما في الجدول اعلاه, سوف نحصل على خط مستقيم او منحنى تكون فيه:

قيمة ثابت ميكائيل K_M = 1.6 وقيمة السرعة القوى V_{max} = 4.32 X 10^{-6} mM/sec .

س/ ماهي وحدات ثابت ميكائيل K_M؟ لماذا يمتلك هذه الوحدات؟

توجد طريقتان اخريتان لحساب V_{max} و K_M من خلال اعادة ترتيب المعادلة رقم (18 و 17) وهما:

طريقة Hanes Wolf:

نضرب المعادلة رقم (18) بـ [S] , سوف نحصل على المعادلة التالية:

$$[S] / V = [S]/ V_{max} + K_M / V_{max}\ [S] / [S] \ldots\ldots\ldots (19)$$

اعادة ترتيب المعادلة رقم (19) سوف نحصل على المعادلة التالية:

$$[S] / V = [S]\ (1/ V_{max}) + K_M / V_{max} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (20)$$

وهي معادلة Hanes Wolf الخطية , حيث عند رسم بياني بين [S] / V و [S] سوف نحصل على خط مستقيم او منحنى يكون فيه Slope = 1 / V_{max} و y- intercept = K_M / V_{max} وفي حالة [S] = - K_M فان [S]/V= 0 , x-intercept = - K_M .

طريقة Scatchard :

من المعادلة رقم (17) والمبينة ادناه:

$$V = V_{max} [S] / K_M + [S]$$

اعادة ترتيب المعادلة (17) سوف نحصل على المعادلة التالية:

$$V_{max} = V (K_M + [S]) / [S] \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (21)$$

اعادة ترتيب المعادلة (21) سوف نحصل على المعادلة التالية:

$$V_{max} = V K_M / [S] + V \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (22)$$

نقسم المعادلة (22) على K_M نحصل على المعادلة التالية:

$$V_{max} / K_M = V / [S] + V / K_M \ldots\ldots\ldots\ldots (23)$$

اعادة ترتيب المعادلة رقم (23) لنحصل على المعادلة التالية:

$$V / [S] = V_{max} / K_M - V (1 / K_M) \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (24)$$

وهي معادلة Scatchard الخطية , حيث عند رسم بياني بين [S] / V و V فان:

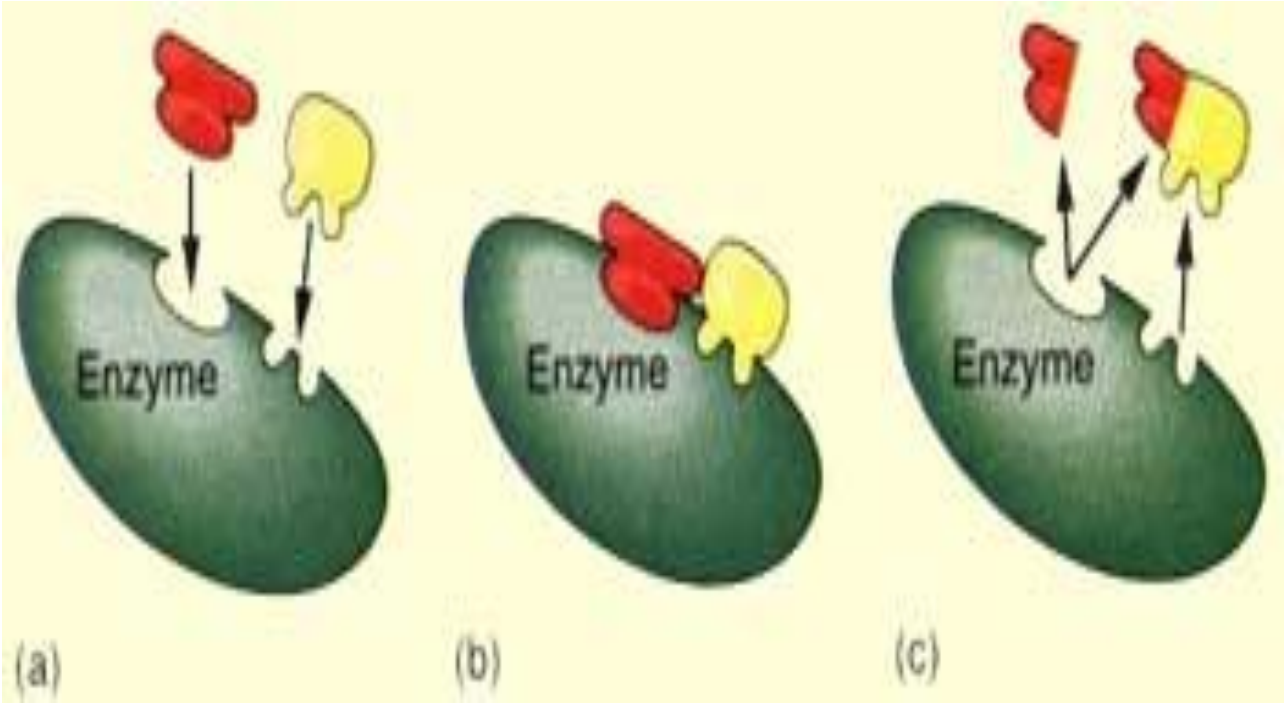
$$y\text{-intercept} = V_{max} / K_M , \quad Slope = 1/K_M ;$$

في حالة $V = V_{max}$ فان $V / [S] = 0$, $x\text{-intercept} = V_{max}$

ان المنحنى الناتج من العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز المادة الاساس يكون مناسب لمعادلة ميكائيل مينتين بواسطة تحليل الانحسار اللاخطي وهي طريقة مناسبة اليوم في معظم دراسات حركية انزيم معين حيث يفضل الباحثون استخدام طريقة ميكائيل مينتين لحساب قيمة السرعة القصوى وثابت ميكائيل بسبب ان اخطاء مضاعفة النتائج المعكوسة في حالة التركيز الواطيء من المادة الاساس عند خطأ التجربة في كثير من الاحيان تكون أعظم. كما ان استخدام الكمبيوتر في الوقت الحاضر يكون اكثر سرعة في التحليل. لذلك يفضل استخدام طريقة ميكائيل مينتين بدلا" من طريقة هانز ولف وسكاتجارد لحساب السرعة القصوى وثابت ميكائيل لانزيم معين.

الية عمل الانزيم:

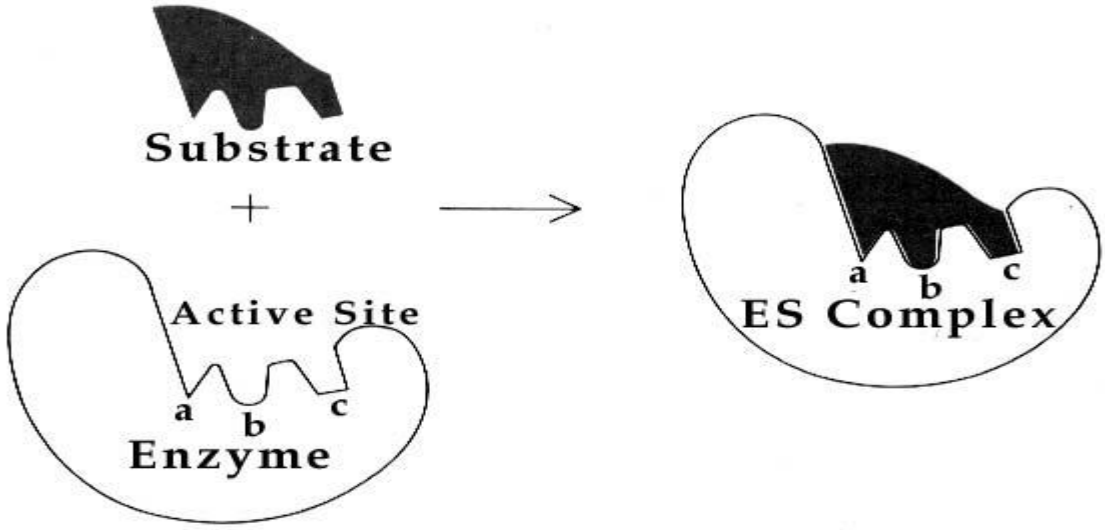
لكل انزيم تركيب خاص ودقيق يميزه عن غيره, وفي كل انزيم مركز منشط او اكثر مسؤول عن قيام الانزيم بعمله حيث يتلاءم الموقع الفعال هذا مع نوع مادة الاساس (substrate) التي يعمل عليها الانزيم , حيث ترتبط المادة الاساس في هذا المكان. في البدايه ترتبط مادة الاساس بالانزيم فيتكون مركبا "معقدا" مؤقتا (Enzyme-Substrate Complex). ثم يتحلل المركب المعقد المؤقت ليكون نواتج ويتحرر الانزيم وكما موضح في الشكل التالي :



وهناك فرضيتان وضعتا لتفسر الية عمل الانزيمات وهما:

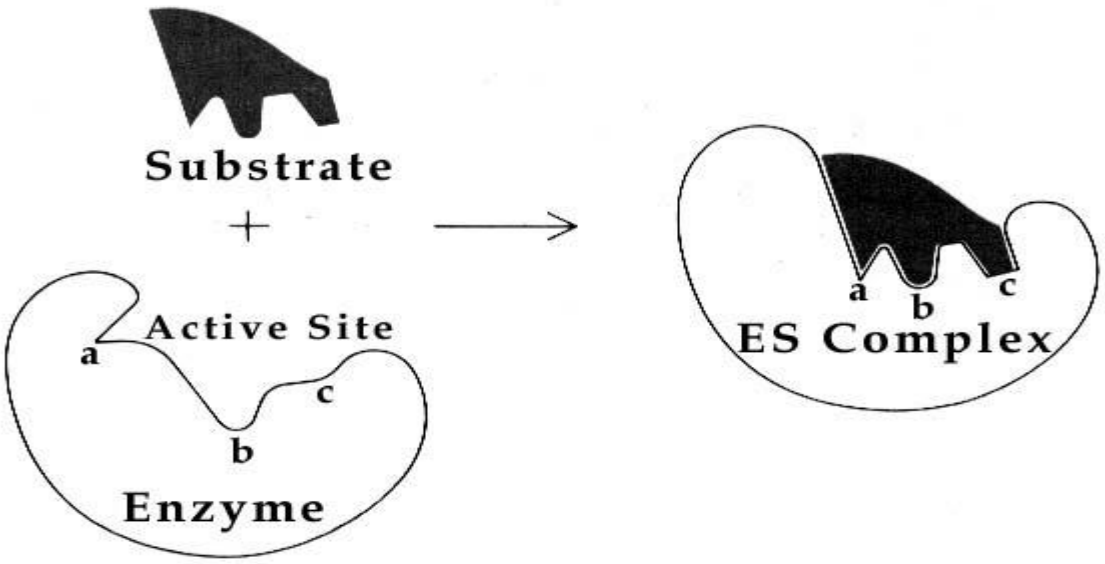
1- فرضية القفل والمفتاح:

اقترح العالم Fischer عام 1890 انه في التخصص الانزيمي يتوجب وجود تراكيب مكملة واحد للاخر بين الانزيم والمادة الاساس حيث يقترن الانزيم بالمادة الاساس اثناء عملية التحفيز بشكل يكون فيه الموقع الفعال للانزيم موافقا تماما للمادة الاساس وهو يشبه توافق عمل القفل والمفتاح واثناء هذه العملية يصبح معقد انزيم – مادة اساس له تركيب فضائي مجسم جديد وفعال حيث تتحرر المادة الاساس لتصبح مادة جيدية تتحرر بعدها من الانزيم الذي يستعيد شكلة الاصلي وكما موضح في الشكل التالي:

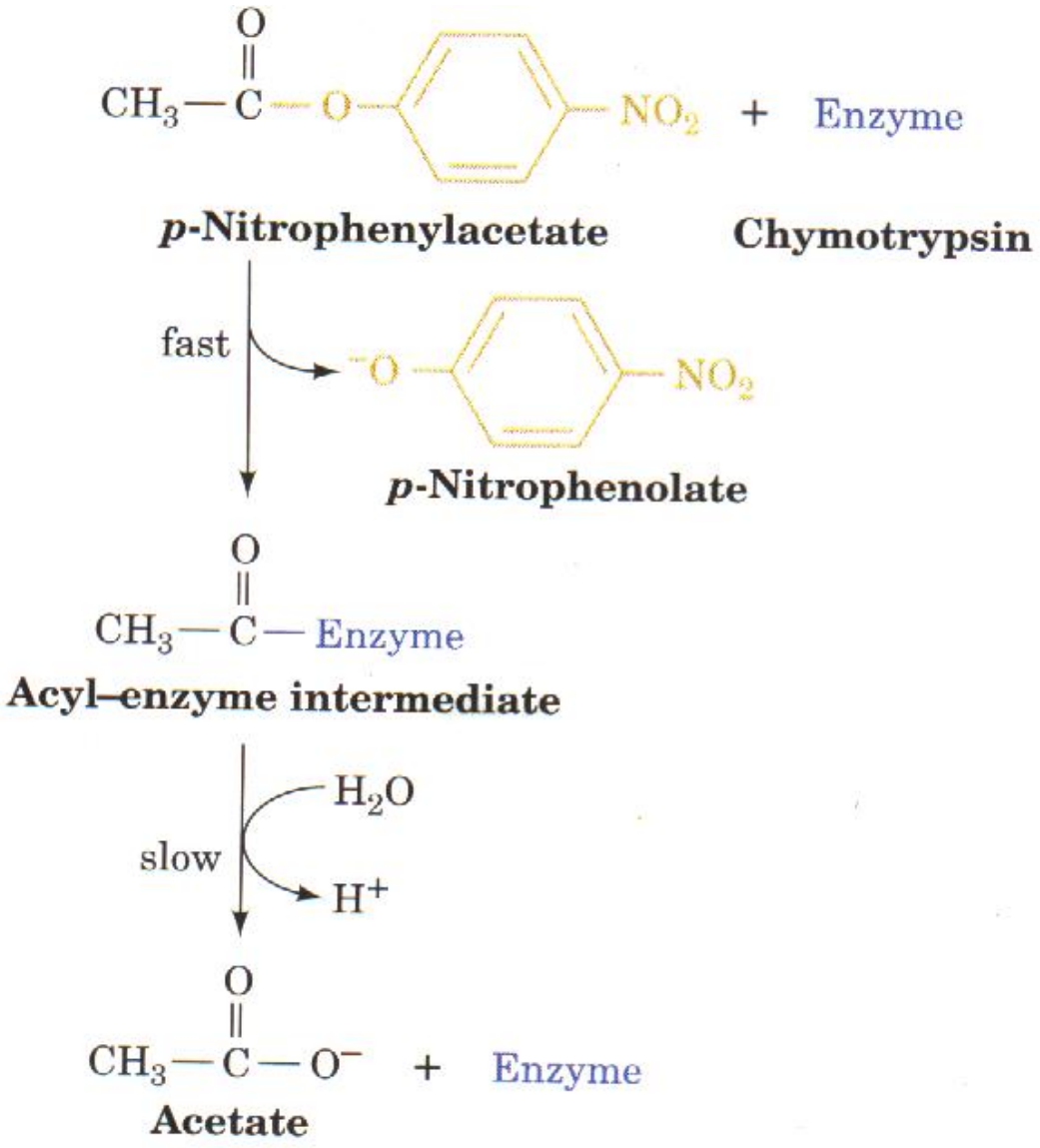


2- فرضية كوشلاند:

اقترح كوشلاند عام 1958 فرضية التوافق المستحث وهي تحوير لفرضية القفل والمفتاح حيث يفترض بان كلا من الموقع الفعال والمادة الاساس تمتلك نوعا من المرونة وان تركيب الموقع الفعال يكون مقاربا فقط لتركيب المادة الاساس وعند حدوث الاتحاد لتكوين معقد انزيم-مادة اساس يحثد تغير طفيف للهيئة المجسمة للانزيم حيث يحسن من التلاؤم مع المادة الاساس ويؤدي الى تحويل معقد انزيم-مادة اساس الى صورة اكثر فعالية فتؤدي الى تكوين الناتج الذي يتحرر من الانزيم حيث يستعيد الانزيم شكله الاصلي ,ويوضح الشكل التالي مثال على الفريضيتين:



كما يوضح المخطط التالي مثال على ميكانيكية عمل الانزيم:



وتتالف الانزيمات من:

1- الانزيمات المنظمة Allosteric enzymes :

للانزيمات المنظمة موقع اخر منظم يختلف عن الطرف المحفز للموقع الفعال ترتبط فيه المواد المؤثرة وتتكون عادة اصرة تساهمية بين المادة المؤثرة والانزيم حيث تتالف الانزيمات المنظمة من عدة وحدات لسلاسل ببيتيدية وتعمل هذه الانزيمات على تنظيم سرعة المسارات الايضية وحسب حاجة الخلية ولهذا تسمى بالانزيمات المنظمة.

2- الانزيمات المتماثلة الاصل Isoenzymes :

وهي الانزيمات التي تحتوي على عدد من الوحدات لسلاسل بيبتيدية من نوعين او اكثر والتي يمكن ان تتواجد باكثر من شكل جزيئي واحد مثل انزيم Lactate dehydrogenase .

تثبيط الانزيم Enzyme Inhibition:

يمكن تثبيط الانزيم من خلال خفض سرعة التفاعل الانزيمي بواسطة:

1- رفع درجة الحرارة. 2- تغير الدالة الحامضية. 3- اضافة احدى مرسبات البروتين المختلفة

4- اضافة مواد كيمياوية معينة تسمى بالمثبطات.

المثبطات Inhibitors :

وهي مواد كيمياوية معينة تعمل على خفض سرعة التفاعل الانزيمي من خلال تاثيرها على مجاميع معينة لنظام الانزيم وتكمن اهميتها في:

1- التعرف على المجاميع الوظيفية الموجودة في الموقع الفعل للانزيم.

2- التعرف على الية عمل الانزيم في تحفيزه لتفاعل معين.

3- تعطي معلومات مفيدة في توضيح المسارات الحياتية المختلفة.

4- توضح عمل بعض العقاقير والمواد السامة والمبيدات.

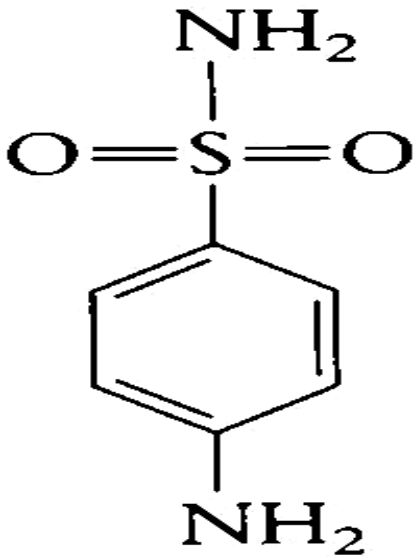
انواع التثبيط:

1- التثبيط العكسي Reversible Inhibition :

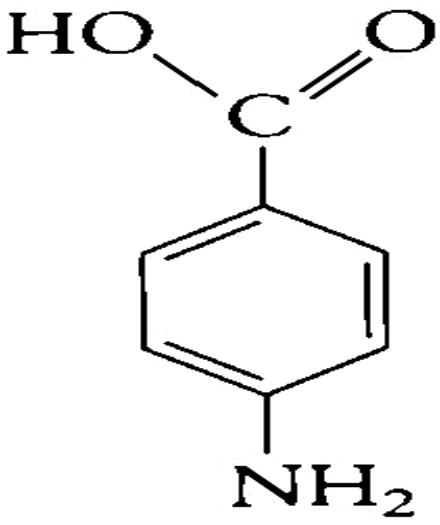
وهي المثبطات التي تتحد مع الانزيم مباشرة ويمكن ازالتها بعملية الفرز الغشائي او بالتخفيف ليسترجع الانزيم فعاليته ومن انواعها:

1- التثبيط التنافسي Competitative Inhibition :

وهو التثبيط الذي يكون فيه التركيب الكيمياوي للمثبط مشابها لتركيب المادة الاساس لذلك الانزيم وبالتالي فان هذا المثبط يتنافس مباشرة مع المادة الاساس لاحتلال الموقع الفعال للنزيم وتكوين المعقد EI مثل المثبط Sulfanilamide الذي يكون تركيبه مشابها للمركب P- aminobenzoic aicd وهو عامل لنمو البكتريا لذا يستخدم هذا المثبط كعلاج للحد من نمو البكتريا:



Sulfanilamide



PABA

ومن الامثلة الاخرى على المثبطات التنافسية:

1- طبيعية المصدر (المصدر والاهداف):

1. **Digitalis (fox glove; Na,KATPase)**
2. **Tetradotoxin (puffer fish; Na-Channel)**
3. **Cytochalasin B (fungi; glucose transporters)**
4. **Atropine (deadly nightshade; Acetylcholine receptor)**

2- صناعية (اهدافها واستخدامها):

1- **Ibuprofen (cyclo-oxygenase inhibitor - antiinflammatory)**

2- **Sulfanilamide (dihydropteroate synthetase; antibacterials - inhibit folate synthesis)**

3- **Neostigmine (acetylcholinesterase; prolong neuromuscular transmission - treat myasthenia gravis)**

4- **Indinavir (HIV protease II inhibitor; prevent HIV transmission and full-blown AIDS)**

2- التثبيط غير التنافسي العكسي Reversible noncompetitative inhibition :

وهو التثبيط الذي يكون فيه التركيب الكيمياوي للمثبط لا يشابه تركيب المادة الاساس او قد يشابه قليلا حيث يرتبط مع الانزيم في موقع اخر يختلف عن الموقع الفعال بغض النظر فيما اذا كان ذلك الانزيم حرا او مرتبطا بمادة اساس وفي هذه الحالة يمكن تكوين كلا من المعقد EIS , EI.

3- التثبيط اللاتنافسي Uncompetitive inhibition:

وهو التثبيط الذي يتحد فيه المثبط مع المعقد ES فقط لتكوين المعقد EIS حيث يعد المثبط اللاتنافسي جزءا من المثبط غير التنافسي العكسي لان كلاهما يحتويان المعقد EIS.

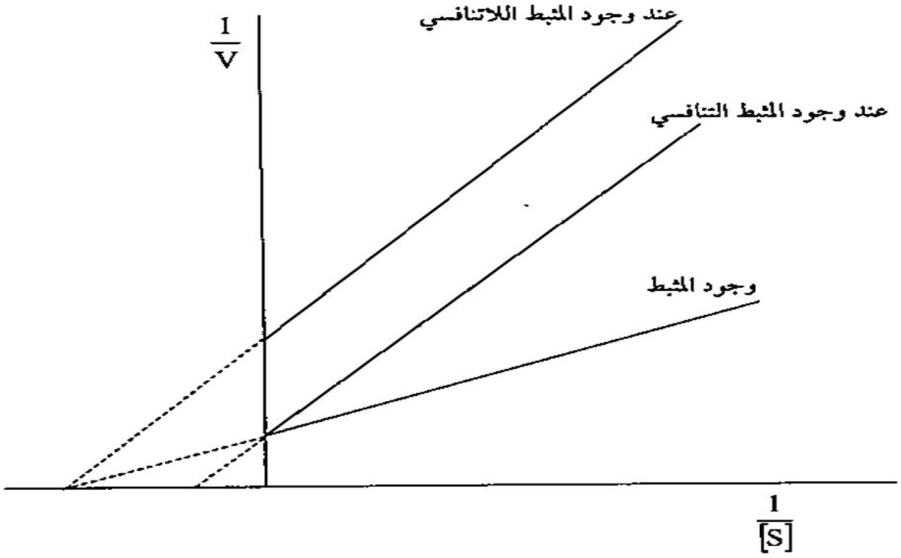
ومن الامثلة على التثبيط اللاتنافسي:

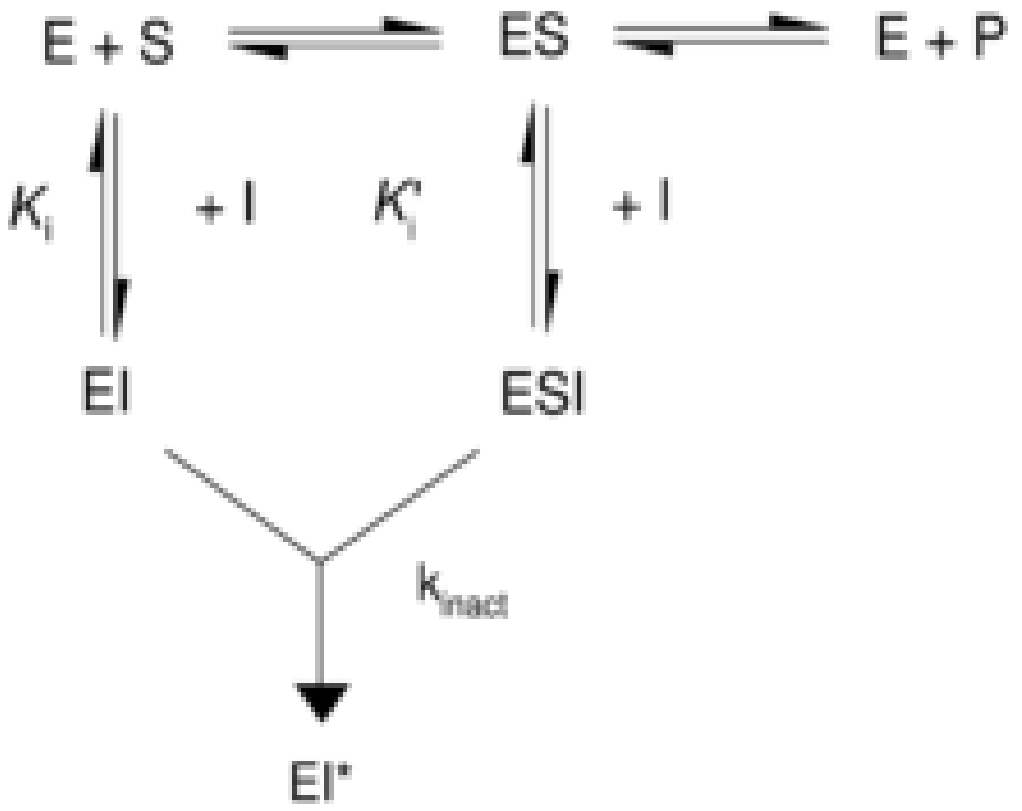
1- طبيعية المصدر (المصدر والاهداف):

1. **Caffeic Acid (tomato; lipoxygenase)**
2. **Caffeine (tea, coffee; Camp phosphodiesterase, glucose transporters)**

2- صناعية (اهدافها واستخدامها) 1

1- **Haloperidol (brain & endothelial cell Nitric Oxide Synthase inhibitor – anti-psychotic)**
2- **Trichostatin A (Histone DeAcetylase; anti-cancer)**
3- **mycophenolic acid (Inosine monophosphate transferase; Dengue virus)**





ان معادلة ميكائيل مينتين للتثبيط التنافسي واللاتنافسي والغير تنافسي تكون كالتالي:

$$V = V_{max(app)} [S] / K_{M(apparent\ in\ the\ inhibition)} + [S]$$

وهي معادلة رقم (17) حيث تكون في:

<u>التثبيط التنافسي</u> : يتناسب $K_{M(app)}$ طرديا" مع [I] وكما موضح في المعادلة التالية:

$$V_{max} = V_{max(app)} \; ; \; K_{M(apparent\ in\ the\ inhibition)} = K_M (1 + [I] / K_i)$$

حيث: K_i = ثابت التفكك عند ارتباط المثبط بالانزيم , [I] = تركيز المثبط

$K_{M(app)}$ = ثابت ميكائيل مينتين بوجود المثبط , $V_{max(app)}$ = السرعة القصوى بوجود المثبط V_{max} = السرعة القصوى بغياب المثبط.

تحسب قيمة K_i للتثبيط التنافسي من خلال المعادلة التالية:

$$K_i = [I] / (K_{M(app)} / K_M) - 1$$

التثبيط الغيرتنافسي: لا يتاثر $K_{M(app)}$ بتغير [I] لكن تركيز المثبط يخفض من كمية الانزيم لذلك $V_{max(app)}$ يتناسب عكسيا" مع [I] وكما موضح في المعادلة التالية:

$$V_{max(app)} = V_{max} / (1 + [I] / K_i)$$

$$K_{M(app)} = K_M$$

التثبيط اللاتنافسي: يتناسب $K_{M(app)}$ عكسيا" مع [I] وكما موضح في المعادلة التالية:

$$V_{max(app)} = V_{max} / (1 + [I] / K_i)$$

$$K_{M(app)} = K_M / (1 + [I] / K_i)$$

تحسب قيمة K_i للتثبيط اللاتنافسي والغير تنافسي من خلال المعادلة التالية:

$$K_i = [I] / (V_{max} / V_{max(app)}) - 1$$

وكمثال لدراسة انزيم معين له قيم $V_{max} = 100\ \mu mol/min$ و $K_M = 25\ \mu M$, حيث نثبط الانزيم بثلاثة مثبطات مختلفة هي:

التنافسي = $-K_i = 10\ \mu M$

الغير تنافسي = $-K_i = 10\ \mu M$

اللاتنافسي = $-K_i = 10\ \mu M$

كما ان قيم سرع السيطرة (Control) والتثبيط للانزيم قد قيست عند مدى 100 µM -2.5 بغياب (السيطرة) او وجود (التثبيط) لتركيز المثبط 10 µM . وكما موضح في الجدول التالي:

Inhibition	$K_{m(app)}$ µM	$V_{max(app)}$ µmol/min	K_i µM
None	25	100	
Competitive	50	100	10
Noncompetitive	25	50	10
Uncompetitive	12.5	50	10

وتوجد طريقة اخرى شائعة الاستخدام لحساب قيمة K_i وتسمى Dixon plots

1- <u>طريقة Dixon plots في التثبيط التنافسي:</u>

$$V = V_{max} [S] / K_{M(app)} + [S] \ldots\ldots.. (1)$$

وهي المعادلة رقم (17) حيث عند اعادة ترتيبها في المعادلة (1) نحصل على:

$$1 / V = K_{M(app)} / V_{max} [S] + [S] / V_{max} [S] \ldots\ldots. (2)$$

اعادة ترتيب في المعادلة (2) نحصل على:

$$1 / V = K_M / (1 + [I] / K_i) / V_{max} [S] + 1 / V_{max} \ldots\ldots (3)$$

اعادة ترتيب في المعادلة (3) نحصل على:

$$1 / V = [I] (K_M / K_i V_{max} [S]) + 1 / V_{max} (K_M / [S] + 1) \ldots\ldots. (4)$$

عند رسم بياني بين $1 / V$ و [I] سوف نحصل على خط مستقيم يكون فيه:

$$Slope = K_M / K_i V_{max} [S] ; \qquad y\text{-intercept} = 1 / V_{max} (K_M / [S] + 1)$$

When 1 / V = 0 , then:

$$[I] (K_M / K_i [S]) = {}^{-}(K_M / [S] + 1) \ldots\ldots. (5)$$

اعادة ترتيب المعادلة رقم (5) نحصل على:

$$[I] = {}^{-} K_i ([S] / K_M) (K^M / [S] + 1) = {}^{-} K_i (1 + [S] / K_M) \ldots\ldots.. (6)$$

$$[I] = {}^{-} K_i (1 + [S] / K_M) \ldots\ldots.. (7)$$

$$K_i = {}^{-}[I] / (1 + [S] / K_M) \ldots\ldots\ldots.. (8)$$

2- طريقة Dixon plots فى التثبيط الغيرالتنافسى:

$$V = V_{max(app)} [S] / K_M + [S] ....(1)$$

وهي المعادلة رقم (17) حيث عند اعادة ترتيبها في معادلة رقم (1) سوف نحصل على:

$$1 / V = (K_M / V_{max(app)} + [S]) + [S] / V_{max(app)} [S] .... (2)$$

اعادة ترتيب المعادلة رقم (2) نحصل على :

$$1 / V = K_M / (1 + [I] / K_i) / V_{max} [S] + (1 + [I] / K_i) / V_{max} .... (3)$$

اعادة ترتيب المعادلة رقم (3) نحصل على :

$$1 / V = (1 + [I] / K_i) (1/ V_{max}) (K_M / [S] + 1) .... (4)$$

اعادة ترتيب المعادلة رقم (4) نحصل على :

$$1 / V = [I] (1 / K_i V_{max}) (K_M / [S] + 1) + 1 / V_{max} (K_M / [S] + 1) ...... (5)$$

عند رسم بياني بين 1 / V و [I] سوف نحصل على خط مستقيم يكون فيه:

$$\text{Slope} = (1 / K_i V_{max}) (K_M / [S] + 1) ; \quad \text{y-intercept} = 1 / V_{max} (K_M / [S] + 1)$$

When 1 / V = 0 , then:

$$[I] (1 / K_i V_{max}) (K_M / [S] + 1) = {}^{-}(1 / V_{max} (K_M / [S] + 1))........ (6)$$

اعادة ترتيب المعادلة رقم (6) نحصل على :

$$[I] (1 / V_{max}) (K_M / [S] + 1) = {}^{-}K_i (1/ V_{max}) (K_M / [S] + 1) .... (7)$$

Then :

$$[I] = {}^{-}K_i .... (8)$$

3- طريقة Dixon plots في التثبيط اللاتنافسي:

$$V = V_{max(app)}\ [S] / K_{M(app)} + [S] \ldots\ldots\ (1)$$

وهي المعادلة رقم (17) حيث عند اعادة ترتيبها في معادلة رقم (1) سوف نحصل على:

$$1 / V = K_{M(app)} / V_{max(app)}\ [S] + [S] / V_{max(app)}\ [S] \ldots\ldots\ (2)$$

اعادة ترتيب في المعادلة (2) نحصل على:

$$1 / V = K_M / V_{max}\ [S] + (1 + [I] / K_i) / V_{max} \ldots\ldots\ (4)$$

اعادة ترتيب في المعادلة (4) نحصل على:

$$1 / V = 1 / V_{max}\ (K_M / [S] + 1) + [I]\ (1 / K_i V_{max}) \ldots\ldots\ (5)$$

عند رسم بياني بين 1 / V و [I] سوف نحصل على خط مستقيم يكون فيه:

$$Slope = 1 / K_i V_{max} \quad ; \quad y\text{-intercept} = 1 / V_{max}\ (K_M / [S] + 1)$$

When 1 / V = 0 , then:

$$[I]\ (1 / K_i V_{max}) = {}^{-}(1 / V_{max})\ (K_M / [S] + 1) \ldots\ldots\ (6)$$

اعادة ترتيب في المعادلة (6) نحصل على:

$$[I] / K_i = {}^{-}(K_M / [S] + 1) \ldots\ldots\ (7)$$

اعادة ترتيب في المعادلة (7) نحصل على:

$$K_i = {}^{-}[I] / (K_M / [S] + 1) \ldots\ldots\ (8)$$

2- التثبيط غير العكسي (تسمم الانزيم) Irreversible inhibition :

وهو التثبيط الذي يكون فيه تركيب المثبط لا يشابه تركيب المادة الاساس حيث تتحد المثبطات بقوة مع الانزيم ولا يمكن فصلها عنه بالتخفيف او بعملية الفرز الغشائي حيث يؤدي هذا الارتباط الى خفض فعالية الانزيم ثم توقفها كليا ويطلق عليه بتسمم الانزيم. كما ان زيادة تركيز المادة الاساس لا يلغي تاثير عمل هذه المثبطات مثل ايونات المعادن الثقيلة وIodo acetamide التي تتحد بقوة مع مجاميع ثايول لبعض الانزيمات.

<u>الفحص الكمي لفعالية الانزيم:</u>

يمكن قياس فعالية الانزيم في محلول او مستخلص نسيجي معين بواسطة الفحص الكمي نسبة الى التاثير المحفز الذي ينتجه ذلك الانزيم. كما من الضروري معرفة المعادلة الكلية للتفاعل المحفز لذلك الانزيم ومعرفة طريقة تحليلية بسيطة لتعيين اختفاء المادة الاساس او ظهور نواتج التفاعل, حيث تفحص الانزيمات عادة عند درجة الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة المثليين وكلك التركيز الاشباعي بالمادة الاساس.

<u>وحدة قياس فعالية الانزيم:</u>

ويقصد بها كمية الانزيم التي تسبب في تحويل مايكرومول واحد من المادة الاساس خلال دقيقة واحدة عند درجة حرارة الغرفة وتحت ظروف مثالية للقياس وتستعمل الوحدة Katal (kat) لقياس فعالية الانزيم وهي تشير الى كمية الانزيم اللازمة لتحويل مول واحد من المادة الاساس في الثانية وان العلاقة بين وحدة الانزيم و الكاتال هي: $U\ 10^7\ X\ 6 = 1\ kat$

<u>الفعالية النوعية للانزيم:</u>

ويقصد بها عدد وحدات الانزيم لكل ملغرام من البروتين ويستفاد منه لقياس نقاوة الانزيم.

<u>عدد التحول:</u>

ويقصد به عدد الجزيئات المتحررة من التفاعل لكل وحدة زمن بواسطة جزيئة واحدة من الانزيم عندما يكون الانزيم هو العامل المحدد للسرعة مثلا عدد التحول لانزيم Carbonic anhydrase هو $136\ X\ 10^6$ جزيئة/ دقيقة وهو اعلى عدد تحول معروف.

<u>تخصص الانزيم:</u>

تكون درجة تخصص الانزيم مع مادة اساس واحدة واكثر متفاوتة حيث تعتمد طبيعة تخصص الانزيم على عدد من العوامل المشتركة في ارتباط المادة الاساس بالانزيم وهي:

1- تجاذب المجموعات المشحونة للمادة الاساس مع مثيلتها في البروتين.

2- تداخل المجموعات الكارهة للماء مع مثيلتها في البروتين.

3- التاصر الهيدروجيني مع البروتين.

4- التداخل مع المجموعات المترابطة للبروتين.

اسئلة الفصل الخامس:

س1/ وضح ماذا تمثل الارقام 2.7.3.2 في تسمية الانزيم كرياتين فوسفو ترانسفيريس؟

س2/ الى ماذا يشير الرقم (5.2) والرقم (5.2.1) في انزيم ريتينول ايزوميريس؟

س3/ ماالمقصود بالرقم الهيدروجيني الامثل؟

س4/ ماالمقصود بالسرعة القصوى للانزيم؟ موضحا" كيف فسر سببها من قبل العالمين ميكايلس ومينتون؟

س5/ مالمقصود بالمحفز الموجب والسالب؟ وماهو تاثير اقتران المؤثران بالموقع المنظم؟

س6/ اين يوجد انزيم لاكتيت ديهايدروجينيس, موضحا" كيفية تكوين الاشكال الخمسة واهميتها لهذا الانزيم؟

س7/ وضح بمخطط الفرضية المقترحة لالية عمل انزيم الكيميوتريبسين؟

س8/ ماهي الظروف التي يعتمد عليها التثبيط التنافسي؟

س9/ وضح بالتفصيل رسم لينويفر-بيرك للتحقق من التثبيط التنافسي والتثبيط عير التنافسي العكسي والتثبيط اللاتنافسي؟

س10/ وضح كيف يتم تثبيط انزيم اسيتايل كولين استريس باستخدام المثبط داي ايسو بروبايل فلورو فوسفات؟ مع ذكر معادلة التثبيط؟

س11/ ماهي وظيفة المثبط داي ايسو بروبايل فلورو فوسفات و انزيم اسيتايل كولين استريس؟

س12/ وضح بمعادلة كيميائية العلم التخصصي لانزيم دي- حامض اميني- اوكسيديس؟ وماهي نوع الاحماض الامينية التي يتخصصها هذا الانزيم؟

س13/ وضح بالتفصيل تأثير الدالة الحامضية ودرجة الحرارة على الخواص الحركية للانزيمات؟