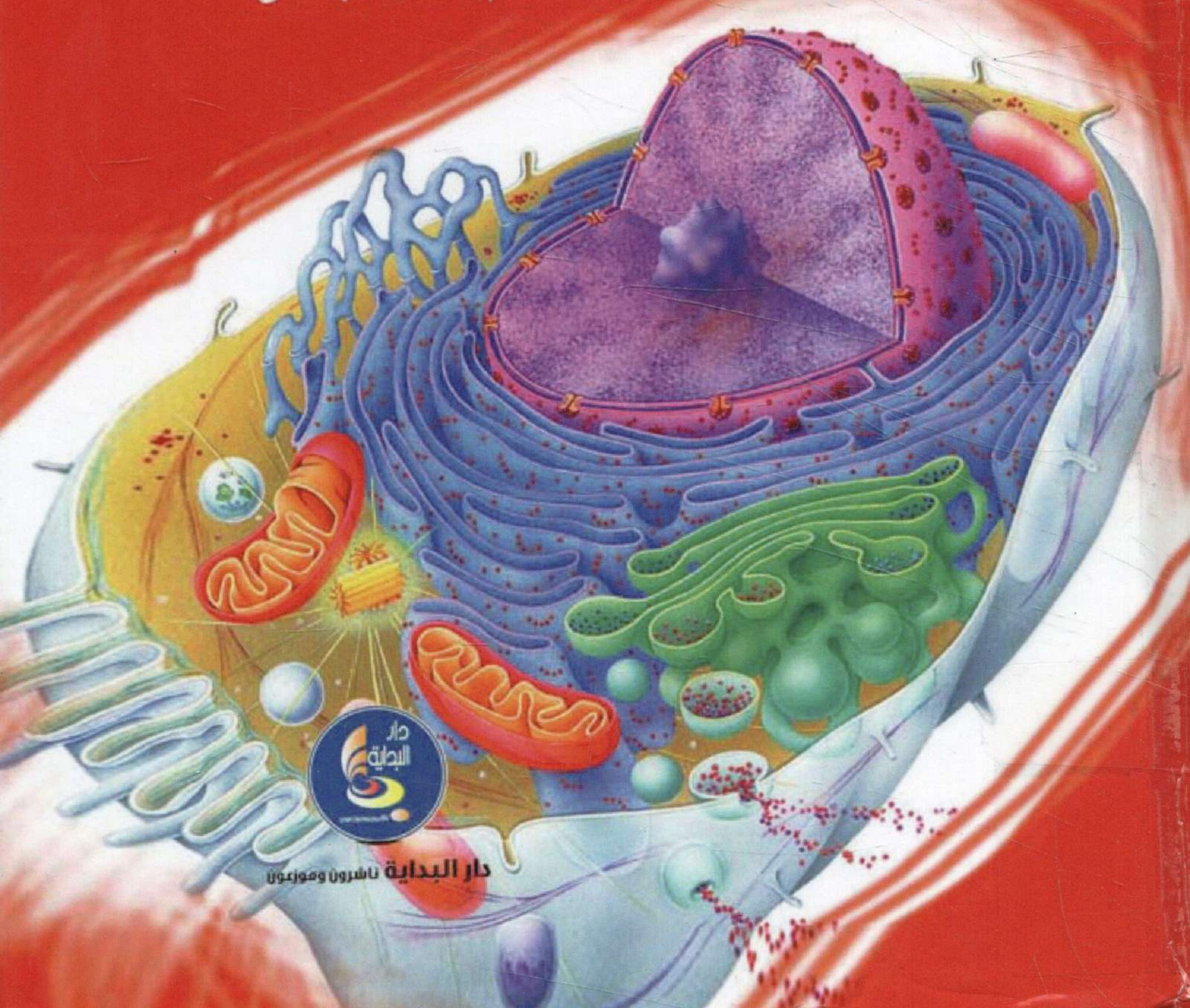
كيمياء الانزيمات

الأستاذ الدكتور
جاسم محمد جندل



دار البداية ناشرون وموزعون

مكتبة طريق العلم

لتحميل المزيد من الكتب

تفضلوا بزيارة موقعنا

www.books4arab.me

قال تعالى: ﴿قُل لَّوْ كَانَ ٱلْبَحْرُ مِدَادًا لِّكَلِمَٰتِ رَبِّى لَنَفِدَ ٱلْبَحْرُ قَبْلَ أَن تَنفَدَ كَلِمَٰتُ رَبِّى وَلَوْ جِئْنَا بِمِثْلِهِۦ مَدَدًا ﴿١٠٩﴾﴾

كيمياء الانزيمات

كيمياء الانزيمات

الأستاذ الدكتور
جاسم محمد جندل

الطبعة الأولى
2015م /1436 هـ

دار المستقبل للنشر والتوزيع

المملكة الأردنية الهاشمية

رقم الإيداع لدى دائرة المكتبة الوطنية (2014/9/4284)

547.75

جندل، جاسم محمد

كيمياء الانزيمات/ جاسم محمد جندل، عمان، دار المستقبل للنشر والتوزيع، 2014

( ) ص.

ر.أ.: 2014/9/4284

الواصفات: /الانزيمات// الكيميائيات الحيوية//

* يتحمل المؤلف كامل المسؤولية القانونية عن محتوى مصنفه ولا يعبر هذا المصنف عن رأي دائرة المكتبة الوطنية او اي جهة حكومية اخرى.

حقوق الطبع محفوظة

الطبعة الأولى

2015م /1436 هـ

دار المستقبل للنشر والتوزيع

عمان - وسط البلد - أول شارع الشابسوغ

تلفاكس : 4658263 6 962+

ص.ب 184248 عمان 11118 الأردن

info.daralmostaqbal@yahoo.com

مختصون بإنتاج الكتاب الجامعي

ISBN: 978-9957-521-52-3 (ردمك)

استناداً الى قرار مجلس الإفتاء رقم 2001/3 بتحريم نسخ الكتب وبيعها دون إذن المؤلف والناشر.

وعملاً بالأحكام العامة لحماية حقوق الملكية الفكرية فإنه لا يسمح بإعادة إصدار هذا الكتاب او تخزينه في نطاق استعادة المعلومات او استنساخه بأي شكل من الأشكال دون إذن خطي مسبق من الناشر.

بسم الله الرحمن الرحيم

المقدمة

إن الحمد لله نحمده ونستعينه ونستهديه ونستغفره ونعوذ بالله من شرور أنفسنا ومن سيئات أعمالنا من يهديه الله فهو المهتدى ومن يضلل فلن تجد له ولياً مرشدا وأشهد أن لا إله إلا الله وحده لا شريك له وأن محمد عبده ورسوله أما بعد، يا مولاي يا حبيبي يا إلهي يارب العالمين ربي قد وهبتني ذرة من العلم من غير حول مني ولا قوة فلك الحمد ولك الشكر، رب اوزعني أن أشكر نعمتك التي أنعمت علي وعلى والدي وأن اعمل صالحا ترضاه وأدخلني برحمتك في عبادك الصالحين، أسالك يا الله لا تحرمني من لذة النظر إلى جمال وجهك الكريم يوم المزيد، اللهم أني اشهد أني احبك، اللهم أني أتوق لرؤيتك، اللهم أني أحب النظر إليك يا بديع السموات والأرض ياذا الجلال والإكرام ياحي يا قيوم، يا حبيبي يالله لا تحرمني ذلك أرجوك يا مولاي إليك يارسول الله يا حبيبي ويا مهجة فؤادي ويامن أتوق لرؤيتك وتقبيل يدك عند الحوض وأشرب من يديك الكريمتين الشريفتين شربة ماء لا أظمأ بعدها أبداً يا من علمتنا ويا من بشرتنا ويا من هديتنا ويا من كنت رحمة لنا ويا صاحب أحن قلب وأرق فؤاد يا من ضحيت لنعيش ويا من تعذبت لنسعد ويا من صبرت وصابرت وعلّمت ونفّهت ويا من نسأل الله تعالى أن يحشرنا في لوائك وأن يكون لنا منزل بجوارك إليك يا حبيبي يارسول الله صلى الله وسلم وبارك الله عليك وعلى آل بيتك الأطهار وأصحابك أجمعين ومن تبعك بإحسان إلى يوم الدين إليكما يا أحبتي إلى من أسال الله سبحانه وتعالى أن يجعلهما في أعلى عليين مع النبيين والصديقين والشهداء والصالحين وحسن أولئك رفيقا رب أغفر هم وارحمهما كما ربياني صغيرا والداي إلى حسنة الدنيا التي غمرتني بالمودة والسكينة والرحمة إلى التي شاركتني حياتي حلوها ومرها سهلها وصعبها إلى التي ووفرت لي من سبل الحياة والرضا والسعادة والتي صبرت وتعبت وسهرت الليالي وتحملت وعانت وساندت ووقفت مني المواقف العظيمة دوما وابدأ لي التي لولاها لما وجد هذا العمل طريقه للوجود ما لم يكن مطلوبا منك شريكة حياتي في الدنيا والآخرة إن شاء الله زوجتي إلى زينة الحياة الدنيا الذين أدعو الله أن يرضى عنهم فلا يسخط عليهم أبدا إلى أملي الكبير وحبي العظيم وفلذة كبدي ومهجة فؤادي وحاملي رايتي من بعدي ومستقبلنا إن شاء الله تعالى

اولادى واحفادي إلى الذين أتمنى هم السعادة في الدنيا والآخرة وأن يجمعنا سوياً في رحمته ورضوانه في جنات النعيم ولا يتخلف أحدا عنا برحمته ورضوانه أخواني واخواتي وعائلاتهم وذوي أرحامنا إليكم جميعاً أيها المسلمين والمسلمات والمؤمنين والمؤمنات الأحياء منهم والأموات ومن هم حق علينا إلى يوم الحساب والى الذين أسأت إليهم وآذيتهم وظلمتهم ساحموني فقد سامحت كل من أساء إلي وظلمني وجعلت ثواب إساءتهم وظلمهم لي زكاة لي ادخرها عند الله عز وجل إلى جميع البشر الذين شاركتهم الحياة إليكم جميعا أهدى ثواب هذا العمل لا أقول لكم إلا جزاكم الله خيرا أسأل الله العلي القدير لكم جميعا الرحمة والرضوان والجنة بجانب رسول الله صلى الله عليه وسلم في الفردوس الأعلى وانه على كل شيء قدير وبالإجابة جدير "وَالَّذِينَ آمَنُوا وَاتَّبَعَتْهُمْ ذُرِّيَّتُهُم بِإِيمَانٍ أَلْحَقْنَا بِهِمْ ذُرِّيَّتَهُمْ وَمَا أَلَتْنَاهُم مِّنْ عَمَلِهِم مِّن شَيْءٍ كُلُّ امْرِئٍ بِمَا كَسَبَ رَهِينٌ" الطور\21، جعلنا الله تعالي منهم أجمعين أسأل الله تعالى أن يكتب ثوابه لكاتبه وناشره وقارئه وكل من ساعدوني سواء بطريق مباشر أو غير مباشر بدون علمهم وأن ينفعهم هذا العمل في دينهم ودنياهم ويلهمهم دعوة صالحة يدعونها لي بظهر الغيب والله الهادي إلى سواء السبيل والله من وراء القصد الله اكبر ولله الحمد وله المنة على نعمة تأليف كتاب كيمياء الانزيمات الذي يتضمن صفاتها، توزيعها الخلوي، نشاطها، تسميتها وتصنيفها، مرافقاتها، تركيبها البنائي، مواقعها الفعالة، ارتباطاتها بالمعان تخصصها، تحفيزها، تثبيطها، حركيتها، تفاعلاتها، مجاميعها البروتينية، انزيمات الهضم، الانزيمات المنظمة، انزيمات الاكسدة الحيوية، استخداماتها الحيوية، فصلها، تنقيتها، اليات وتقانات التحليل ثم تطبيقاتها الصناعية والغذائية والطبية وأقول والحق أقول بأنه ليس لي فضل في هذا العمل المتواضع سوى الفضل والمنة من الله الذي ألهمني ومنحني نعمة الاهتمام بالقراءة وألهمني الجمع والتنسيق والإعداد والتأليف وقد أفدت الناس واستفدت وأن يكون هذا العمل لي صدقة جارية بإذنه تعالى تعينني على أهوال يوم القيامة وشدته وأسأل الله أن يجعل لي أجرا في هذا العمل اقتسمه أنا والذين أخذت عنهم معلومات من مؤلفاتهم وكتبهم ومن شبكة الانترنيت وكل من ساعدوني سواء بطريق مباشر أو غير مباشر بدون علمهم انه عليم بذات الصدور ولما كنت بشرا ضعيفا فقيراً إلى رحمة ربي خطّاءً تواباً فأني أسأل إخوتي أن يوجهوني إذا ما رأوا في هذا الكتاب خطأ أو سهواً أو ضعفاً مني في فهم شيء من قوانين الله تعالى أو تقصير أو خطأ علمياً في نقل أو تحرّ أو تفسير أو اجتهاد خاطئ أو تقصير وهم منى جزيل الشكر والتقدير فالمسلم للمسلم

كالبنيان المرصوص يشد بعضه بعضا وإني أسال الله تعالى أن يكون عملنا هذا خالصاً لوجهه تعالى ومتقبلا وان يكون في ميزان حساناتنا "يَوْمَ لَا يَنفَعُ مَالٌ وَلَا بَنُونَ، إِلَّا مَنْ أَتَى اللَّهَ بِقَلْبٍ سَلِيمٍ" الشعراء\88،89 إني لا أنتظر من إخواني المؤمنين إلا كل مساعدة وعون وتوجيه فذلك لأن الله قال فيهم "إِنَّمَا الْمُؤْمِنُونَ إِخْوَةٌ فَأَصْلِحُوا بَيْنَ أَخَوَيْكُمْ وَاتَّقُوا اللَّهَ لَعَلَّكُمْ تُرْحَمُونَ" الحجرات\10، واني أسال الله العظيم أن يلحقنا بإخواننا المؤمنين الصالحين "رَبَّنَا اغْفِرْ لَنَا وَلِإِخْوَانِنَا الَّذِينَ سَبَقُونَا بِالْإِيمَانِ وَلَا تَجْعَلْ فِي قُلُوبِنَا غِلًّا لِّلَّذِينَ آمَنُوا رَبَّنَا إِنَّكَ رَؤُوفٌ رَّحِيمٌ" الحشر\10، ولا أدعو إلا كما دعا يوسف عليه السلام وعلى رسولنا الصلاة والسلام "رَبِّ قَدْ آتَيْتَنِي مِنَ الْمُلْكِ وَعَلَّمْتَنِي مِن تَأْوِيلِ الأَحَادِيثِ فَاطِرَ السَّمَاوَاتِ وَالأَرْضِ أَنتَ وَلِيِّي فِي الدُّنُيَا وَالآخِرَةِ تَوَفَّنِي مُسْلِمًا وَأَلْحِقْنِي بِالصَّالِحِينَ" يوسف\101 واني أدرك تماما إن هذه تجربة جديدة علي ولذلك اسأل من إخوتي ألا يؤاخذوني إذا ما وجدوا خطا أو سهو أو تحليلا خاطئاً فقد اجتهدت ما استطعت ولا أقول إلا كما قال شعيب عليه السلام وعلى رسولنا الصلاة والسلام "إِنْ أُرِيدُ إِلاَّ الإِصْلاَحَ مَا اسْتَطَعْتُ وَمَا تَوْفِيقِي إِلاَّ بِاللّهِ عَلَيْهِ تَوَكَّلْتُ وَإِلَيْهِ أُنِيبُ" هود \88 وأسأل الله سبحانه وتعالى أن ينزع الكبر والكبرياء والفخر والتفاخر من قلوبنا وان يجعل كل حركاتنا وسكناتنا وانفاسنا وكل ما وهبنا خالصاً لوجهه الكريم وان ينزع الغرور وفتنة العلم من قلوبنا ونفوسنا انه على كل شيء قدير وبالإجابة جدير والله تعالى ولي التوفيق.

المؤلف

الفصل الأول

الإنزيمات

الأنزيمات Enzymes

الإنزيمات هي عبارة عن عوامل مساعدة بيولوجية طبيعية، غروية، متغيرة بالحرارة، ذات طبيعة بروتينية، تخلق بواسطة الخلايا الحية والذي تحفز التفاعلات الكيمياوية التي تحدث داخل الخلية مما تزيد من سرعتها وهي عوامل متخصصة في عملها أي أن كل إنزيم يساعد في تفاعل معين لذلك يوجد عدد كبير منها الذي تعمل على مواد معينه يطلق عليها المادة الأساس substrateوهي لا تظهر فعاليتها عند عدم وجود بعض المكونات غير البروتينية الذي يطلق عليها العامل المرافق cofactor ويطلق على الجزء البروتيني غير الفعالapoenzyme بينما يطلق على الجزء البروتيني والعامل المرافق بالإنزيم الفعال holoenzyme وقد يكون العامل المرافق جزيئه عضوية يطلق عليها coenzyme أو يكون أيون معدني وعندما يرتبط الإنزيم مع العامل المرافق بقوه بحيث يكون من الصعب نزعه عن الإنزيم دون إلحاق الضرر بنفسه يطلق علية المجموعة الترقيعية أو الرابطة prosthetic group، تدخل الإنزيمات التفاعلات الكيمياوية وبكميات قليلة دون أي تغير في تركيبها الكيمياوي ويمكن استخلاصها من الخلايا دون أن تفقد نشاطها الحيوي وللإنزيمات مجالا واسعا في الاستعمالات الطبية، الزراعية، الصناعية والبحوث الأكاديمية حيث تستخدم في تشخيص العديد من الحالات المرضية بسبب تخصصها ولها تطبيقات واسعة في مجال التقانات الحديثة والتخليق الصناعي للمركبات الحيوية مثل الهرمونات والعقاقير الطبية والمشروبات الكحولية.

العامل المرافق cofactor: هو عبارة عن مركبات كيماوية إضافية تحتاجها الإنزيمات لنشاطها وهي إما أن تكون مركبات غير عضوية مثل أيونات الحديدوز، المنغنيز أو الزنك (جدول –1) أو يمكن أن تكون جزيئة عضوية معقدة تدعى المرافق الإنزيمي (جدول-2)، بعض الإنزيمات تحتاج إلى المرافق الإنزيمي مع واحد أو أكثر من الأيونات المعدنية لنشاطها ففي بعض الإنزيمات، فإن المرافق

جدول(1) بعض الإنزيمات الحاوية أو تحتاج عوامل مرافقة

العامل المرافق	الإنزيم
أيون الحديدوز أو الحديديك	Cytochrome oxidase , catalase , peroxidase
أيون النحاسيك	Cytochrome oxidase
أيون الزنك	DNA polymerase , carbonic anhydrase
أيون المغنيسيوم	glucose-6-phosphatase , hexokinase
أيون المنغنيز	arginase
أيون البوتاسيوم	pyruvate kinase
أيون النيكل	Urease
أيون المولبيدنم	Nitrate reductase
أيون السيلينيوم	Glutathione peroxidase

الإنزيمي والأيون المعدني لا ترتبط بقوة مع البروتين إلا انه في بعض الإنزيمات الأخـرى فإنها ترتبط بقوة بحيث يصعب فصلها عن الإنزيم يطلق عليها المجموعة الرابطة فالإنزيم الفعال كليا مع المرافق الإنزيمي أو الأيون المعدني يطلق عليها holoenzyme فالمرافقات الإنزيمية والأيونات المعدنية ثابتة عند التسخين، في حين أن الجزء البروتيني من الإنزيم تتغير صفاته الفيزياوية والكيماوية بالتسخين، فالمرافقات الإنزيمية هي ناقلات عرضية للمجاميع الوظيفية.

جدول(2) المرافقات الإنزيمية التي تحمل ذرات أو مجاميع وظيفية متخصصة

المرافق الإنزيمي	المجموعة المنقولة
ثيامين بيروفوسفيت	الديهايدات
فلافين أدنين ثنائي نيوكلوتيد	ذرات الهيدروجين
نيكوتين أدنين ثنائي نيوكلوتيد	أيون الهيدروجين
المرافق الإنزيمي A	مجاميع أسيل
بيردوكسال فوسفيت	مجاميع الأمين
5—اديتوسين منزوع الأوكسجين، كوبال أمين	ذرات هيدروجين، مجاميع الكيل
بايوسين	ثاني اوكسيد الكربون
رباعي هيدروفولات	مجاميع الفورميل

صفات الإنزيمات Properties of enzymes

1. **طبيعة البروتين:** الإنزيمات هي بروتينات بعضها يتكون من بروتينات بسيطة والبعض الآخر بروتينات مرتبطة، الجزء غير البروتيني من البروتينات المرتبطة يسمى المجموعة الرابطة أو الترقيعية prosthetic group ويكون التركيب البنائي الرباعي لبروتين الإنزيم مهم للنشاط التحفيزي catalytic activity عندما يحصل تغير في الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة مما يؤدي ذلك إلى تحطيم أو تغير التركيب البنائي الثلاثي tertiary structure مما يعيق أو يوقف عمل الإنزيم، بعض الإنزيمات المحللة مثل اللايزوزيم والباباييناpapain والتربسين وكاربوكسي ببتيديز carboxy peptidase والرايبونيوكليز ribonuclease تملك سلسلة ببتيدية متعددة منفردة في جزيئاتها monomeric enzymes وهناك عدد من alcoholdehydrogenase، aldolase, aspartatetrans carbamolase،, hexokinase , acetyl-CoA carboxylase , lactate catalase dehydrogenase الذي تملك اكثر من سلسلة ببتيدية متعددة أو وجود وحدات فرعية في كل جزيئاتها يطلق عليها oligomericenzymes، في تلك الإنزيمات يتكون التركيب البنائي الرباعيquarternary بسبب ارتباط مكونات الوحدات الفرعية مهم للنشاط التحفيزي والذي يمكن أن يفقد نشاطه التحفيزي عندما الإنزيم يتفكك إلى وحداته الفرعية ذات السلسلة الببتيدية الأحادية، بعض الأحيان، إنزيمات عديدة تحفز خطوات مختلفة من التفاعلات الذي تكون مرتبطة بقوة مع بعضها لتكوين نظام إنزيمي متعدد multienzyme system مثل fatty acid , pyruvate dehydrogenase system , α- synthetase system .ketoglutarate dehydrogenase system

2. **معقد المادة الأساس – الأنزيم Enzyme-substrate complex:** طبقا لثابت ميكليس Michael's – منتن Menten، يمكن لجزيئه الإنزيم E أن ترتبط مع المادة الأساس S لتكوين معقد المادة الأساس – الإنزيم E-S الذي يتفكك لتحرير إنزيم غير متغير ومادة أساس متغيرة هي الناتج P وان سرعة تكوين الناتج P نسبية إلى تركيز معقد الإنزيم – المادة الأساس.

$$E + S \longleftrightarrow ES \longleftrightarrow E + P$$

بعض الأحيان يكون المعقد ثابت نسبيا مما يمكن فصله كما هو الحال في معقد المادة الأساس- الأنزيم مثل glyceradehyde-3-phosphatedehydrogenase أو الكشف عنه وقياسه بواسطة المطياف spectrophotometer مثل معقدات المادة الأساس – الإنزيم للإنزيمات peroxidase catalase، إن جزيئة الإنزيم تملك عدد من الأحماض الأمينية الذي تكون المركز الفعال active center الذي تشارك في تكوين معقد المادة الأساس – الإنزيم خلال العمل التحفيزي، تلك الأحماض تقع في مسافات عن بعضها البعض الآخر في السلسلة الببتيدية إلا إنها تصبح مرتبة عن بعضها عند انطواء جزيئه الإنزيم بسبب التراكيب البنائية الثانوية والثلاثية، اقترح كوشلاند في فرضيته التوافق – المستحث fit– induced لا يمكن وجود جزيئة الإنزيم ها القدرة أن تكون مركز فعال عند غياب المادة الأساس إلا انه في حالة وجود المادة الأساس، فإن الإنزيم يعاني من تغيرات في الهيئة لان الأحماض الأمينية المختلفة تكون قريبة من بعضها البعض لتكوين الجانب الفعال المناسب لربط المادة الأساس ولكن طبقا للافتراضات الحديثة حول المركز الفعال، فإن جزيئة الإنزيم يمكن أن تملك بعض الأحماض الأمينية المكونة للموقع الرابط binding site بينما البعض الآخر من الأحماض الأمينية تكون الجانب أو الموقع التحفيزي catalytic site حيث يحصل ارتباط الأحماض الأمينية الرابطة مع المادة الأساس وتحجزها في الموقع الصحيح قرب الأحماض الأمينية التحفيزية الذي تحفز التغيرات في المادة الأساس، بعض الأحيان يلاحظ وجود ثلاث مجاميع مختلفة من جزيئات المادة الأساس ترتبط إلى ثلاث مجاميع فعالة مختلفة في مواقع مختلفة من α-helix من بروتين الإنزيم لتكوين معقد المادة الأساس- الإنزيم وهذه النقاط الثلاثة للارتباط بين الإنزيم والمادة الأساس يفسر التخصص المجسم stereospecificity للإنزيم، تحدث تفاعلات بين اثنان من المواد الأساس هي S_1, S_2 الذي يمكن تحفيزها بطريقتين رئيسية هي:

أ. **تفاعل الإزاحة المنفرد:** ترتبط المادة الأساس S_1 , S_2 مع الإنزيم واحد بعد الآخر أما في تسلسل مرتب خاص أو في تسلسل عشوائي، لذلك فأن S_1, S_2 ترتبط إلى جانب أو في موقع الارتباط من الإنزيم لتكوين معقد ثلاثي $E\text{-}S_1\text{-}S_2$ من الإنزيم والمادة

الأساس الذي يتفكك إلى إنزيم ومواد ناتجة P_2,P_1 الذي تتحرر أما عشوائيا أو بشكل تسلسل مرتب.

$$E + S_1 \longleftrightarrow E\text{-}S_1$$

$$E\text{-}S1 + S_2 \longleftrightarrow E\text{-}S_1\text{-}S_2 \longleftrightarrow E\text{-}P_1P_2 \longleftrightarrow EP_2 + P_1$$

$$EP_2 \longleftrightarrow E + P_2$$

ب. تفاعل كرة المنضدة: كل من مواد الأساس $S_2,\ S_1$ ترتبط بشكل منفرد مع الإنزيم في تسلسل مرتب ordered، كل واحد منها يكون معقد المادة الأساس – الإنزيم أو معقد المادة الأساس– الإنزيم $E\text{-}S_1$ حيث يتفكك ناتج أول P_1 وشكل محور من الإنزيم E_1 ثم ترتبط المادة الأساس الثانية مع الموقع الرابط للإنزيم المحور E_1 لتكوين معقد المادة الأساس – الإنزيم الثاني E_1S_2 الذي يتفكك لتكوين ناتج ثاني P_2 والشكل الأصلي من الإنزيم E.

$$E + S_1 \longleftrightarrow E\text{-}S_1 \longrightarrow E_1 + P_1$$

$$E_1 + S_2 \longleftrightarrow E_1\text{-}S^2 \longrightarrow E + P_2$$

هناك عدد من الإنزيمات المتناظرة isomerases, mutases الذي تحفز تفاعلات المادة الأساس المنفردة مثل phosphoglucose isomerase بينما عدد من phosphotransferases, acyl transferases , ,hydrolases hexokinase creatine kinase pyridine –linked dehydrogenases , lactate dehydrogenase , pepsin بينما transaminases تحفز تفاعلات ثنائية المادة الأساس من كرة المنضدة مثل glutamate–pyruvate transaminase، تكوين معقد المادة الأساس – الإنزيم يساعد في تحفيز أحد الطرق التالية بواسطة:

– شد الأصرة المناسبة في المادة الأساس ليساعد في تفكك تلك الأصرة.
– ربط الأصرة المناسبة في المادة الأساس القريبة من الموقع التحفيزي.

- تجهيز مجاميع وظيفية حامضية أو قاعدية مثل مجموعة الأمين أو الكربوكسيل أو السلفاهيدريل أو مجموعة الهيدروكسيل الفينولية للإنزيم لكسب أو منح أيون هيدروجين خلال التحفيز.
- تكوين معقدات مادة أساس – إنزيم تساهمية فعالة وغير ثابتة تتضمن ارتباط المادة الأساس مع حامض أميني في الموقع الفعال مثل الحامض الأميني السيرين في إنزيمات السيرين مثل acetyl cholinesterase والحامض الأميني السستائين في إنزيمات السلفاهيدريل مثل triose phosphate dehydrogenase والبابايين أو الحامض الأميني اللايسين في إنزيمات اللايسين مثل aldolase A, B، عمل العديد من الإنزيمات يكون عكسي، فإن المواد الأساس الذي لها ألفة عالية مع الإنزيم تسمى substrate والذي لها ألفة متخصصة تجاه الإنزيم تسمى products

3. **التخصص specificity**: إن ارتباط المادة الأساس مع الحامض الأميني الرابط في الإنزيم يحتاج وجود مجاميع خاصة على المادة الأساس أو هيئات خاصة من جزيئة المادة الأساس مما يجعل الإنزيم يرتبط مع أو يعمل على عدد محدود من المواد الأساس التي تملك تخصصات لازمة، التخصص للمادة الأساس يعتمد على الأحماض الأمينية أو مجاميع أخرى مثل الأيونات المعدنية في الموقع الفعال من الإنزيم وعلى الهيئة الخاصة في جزيئه الإنزيم، بعض الإنزيمات تبين تخصص المجموعة group specificity الذي يعمل فقط على أنواع معينه من الروابط أو المجاميع الكيمياوية في المواد الأساس ولا يعمل على المواد الأساس الخاصة منها، بعض الأحيان تخصص المجموعة يكون معقد، فأن الإنزيم يعمل على نوع معين من الروابط عندما الروابط ترتبط مع مجموعة معينه أو سلاسل جانبية في المادة الأساس وعلى سبيل المثال فان التربسين في العصير البنكرياسي يحلل الروابط الببتيدية المرتبطة إلى مجاميع الكربوكسيل في الأحماض الامينية القاعدية مثل الارجنين واللايسين، إن leucine aminopeptidase في العصير المعوي يحلل الأواصر الببتيدية الطرفية المرتبطة إلى اللايسين في الطرف النتروجيني من الببتيد، بعض الإنزيمات تملك أنواع مختلفة من التخصص المجسم stereospecificity بينما البعض الآخر يسلك تخصص ضوئي optical specificity الذي يحلل التغير فقط في مناظر ضوئي واحد من المادة الأساس بدون

التأثير على المناظر الآخر، D-amino acid oxidase L-amino acid oxidase في كبد وكلى اللبائن لا تظهر تخصص في العمل على المتناظرات D, L من الأحماض الأمينية، بعض الإنزيمات مثل fumarase يملك تخصص هندسي geometric specificity من نوع Cis أو Trans ويعمل بصورة خاصة إما على الشكل Cis أو الشكل Trans من المادة الأساس لكن ليست على كليهما.

4. **المرافقات الإنزيمية Coenzymes**: هي بعض المواد غير البروتينية الثابتة تجاه الحرارة يطلق عليها المجاميع الرابطة أو المرافقات الإنزيمية الذي تكون في ارتباط قريب من الإنزيم وتساهم في عمل الإنزيم، الجزء البروتيني من تلك الإنزيمات يعرف apoprotein وجزيئه الإنزيم المركبة تتألف من apoenzyme والمرافق الإنزيمي يطلق عليه الإنزيم الكامل holoenzyme.المرافق الإنزيمي لا يتغير في نهاية التفاعل التحفيزي، بعض الأحيان يمكن أن يتغير خلال التفاعل، إلا انه يعود إلى حالته الطبيعية بعد عدد من التفاعلات، مثال الشكل المؤكسد من المرافق الإنزيمي نيكوتين أميد أدنين ثنائي نيوكلوتيد NAD^+ يختزل إلى NADH عندما يعمل كمرافق إنزيمي لإنزيمات dehydrogenase اللاهوائية إلا انه تعاد أكسدته إلى NAD^+ بوجود NADH-dehydrogenase في المايتوكوندريا، المرافق الإنزيمي يتقبل مجموعة معينه ينتزعها من المادة الأساس بواسطة الإنزيم أو يهب مجموعه معينة يضيفها إلى المادة الأساس بواسطة الإنزيم، بعض الأحيان تكون المرافقات الإنزيمية معقدات وسطية مع المواد الأساس فعلى سبيل المثال فإن المرافق الإنزيمي بيريدوكسال فوسفيت لإنزيم amino transferase تكون قاعدة شيف كمركب وسطي مع الأحماض الأمينية (الجدول -3).

جدول (3) بعض المرافقات الأنزيمية

المرافق الإنزيمي	الإنزيمات التي تحتاجها
NAD^+	Lactate dehydrogenase, triose phosphate dehydrogenase alcohol dehydrogenase.
$NADP^+$	Maleic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase
FAD	D-amino acid oxidase, aldehyde oxidase, succinate dehydrogenase

المرافق الإنزيمي	الإنزيمات التي تحتاجها
FMN TPP Pyridoxal phosphate H_4folate CoA Cobamide Coenzyme Biotin ATP	Glycolate oxidase , NADH-dehydrogenase Transketolase Pyruvatedehydrogenase , serinedehydratase pyridoxal phosphate , α-ketoglutarate dehydrogenase , transaminase Formyl transferases such as transformylase .acyl transferase such as diglyceride acyltransferase diol dehydrase methylmalonyl isomerase , ribonucleotide reductase , acetyl –CoA carboxlase , pyruvate carboxylase Phosphotransferase such as glucokinase

بعض المعادن يمكن أن تكون جزء أساسي من المجموعة الرابطة مثل الزنك في carbonic anhydrase أو النحاس في ascorbic acid oxidase أو المغنيسيوم في transketolase, enolase أو الحديديك (معقد بروتين- كبريت- حديد) في adrenodoxin و ferredoxin أو المولبيدنم أو الحديد أو الكبريت في molybdo ferredoxin، المواقع الفعالة لبعض الإنزيمات يمكن أن تحتوي أيونات معدنية مثل المغنيسيوم في إنزيم الماليك و isocitrate dehydrogenase، في بعض الحالات وحتى في المستحضرات الإنزيمية ذات النقاوة العالية تحتوي أيونات معدنية، فأن نزعها يسبب فقد في نشاط الإنزيم، أحيانا الأيونات أحادية الشحنة الموجبة مثل أيون الصوديوم والبوتاسيوم تحتاج تلك الأيونات للمحافظة على هيئتها الصحيحة للإنزيم، طبقا لفرضية فشر، فإن المرافقات الإنزيمية تمتص أو ترتبط أولا على apoenzyme مما يسهل ذلك ارتباط المادة الأساس إلى الإنزيم.

5. **تأثير تركيز المادة الأساس:** الزيادة في تركيز الإنزيم الذي تبدأ من قيم منخفضة تسبب ارتفاع نسبي في نشاط الإنزيم لكن تركيز المادة الأساس المرتفع يساعد على وصول سرعة نشاط الإنزيم إلى القيمة القصوى الذي عند زيادة التركيز فوق تلك القيمة لا

يسبب أي زيادة في نشاط الإنزيم بالرغم من الزيادة التي تحصل في تركيز الإنزيم ويمكن توضيح ذلك من المنحني الذي يحصل عليه من العلاقة بين سرعة التفاعلات الإنزيمية وتركيز المادة الأساس (الشكل- 1) في تراكيز منخفضة للمادة الأساس فأن جميع جزيئات الإنزيم لا تتشبع بجزيئات المادة الأساس، عند زيادة تركيز المادة الأساس، فأن عدد كبير من جزيئات الإنزيم تبدأ بالتفاعل مع المادة الأساس، لذلك فأن سرعة عمل الإنزيم تزداد تدريجيا، يمكن الحصول على سرعة التفاعل الإنزيمي v لتفاعل المادة الأساس المنفرد في تركيز المادة الأساس يحصل علية من معادلة ميكيليس – منتن.

$$v = V[S] / Km + [S] \quad or \quad Km = [S] \times (V/v - 1)$$

حيث أن V هي أقصى سرعة تفاعل أنزيمي. v هي سرعة التفاعل الإنزيمي

[S] هي تركيز الإنزيم في مول\ لتر Km هي ثابت ميكيليس

ثابت ميكيليس هو تركيز الإنزيم في المولات لكل لتر الذي فيه يحافظ على نصف السرعة القصوى، الإنزيم الذي يعمل على عدة مواد أساس فأن تقدير ثابت ميكليس للمواد الأساس المختلفة يساعد في مقارنة ألفة الإنزيم لتلك المواد الأساسية المختلفة، ارتفاع قيمة ثابت ميكيليس للمادة الأساس يخفض من ألفة الإنزيم لتلك المادة الأساس كما أن ثابت ميكيليس يمثل ثابت تفكك التفاعلات العكسية المحفزة بالإنزيمات والذي لا يتأثر بواسطة تركيز الإنزيم، العوامل التي يمكن أن تؤثر على ارتباط الإنزيم والمادة الأساس بالإضافة إلى سرعة التفاعلات الأمامية والخلفية هي الأس الهيدروجيني، درجة الحرارة، القوة الايونية وبعض المثبطات وتلك العوامل لها تأثير على ثابت ميكيليس ويقدر ثابت ميكليس بيانيا من double reciprocal أو من رسم line weaver Burke plot حيث يكون خط مستقيم والذي يحصل عليه من 1/v و1/[S] فالعمود على الخط المستقيم يعطي مقلوب السرعة القصوى 1/V والخط الأفقي عليه يعطي القيمة السالبة لمقلوب ثابت ميكيليس 1/Km- وانحدار الخط يعطي Km/V- وبعض الأحيان يستعمل تعبير Vm بدلا من V لتمثيل السرعة القصوى بينما في التفاعلات ثنائية المواد الأساس أو ما يطلق

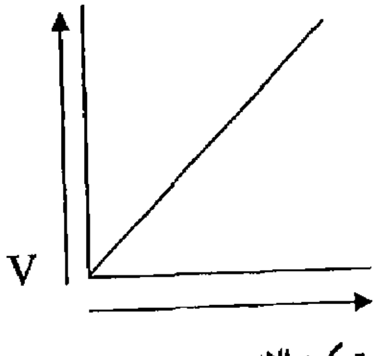
عليهـا الإزاحـة المنفـردة single displacement فأنـه يمكـن تحـوير معادلـة ثابـت ميكيليس كالآتي:

$$V = Vm / Ks_1 Km_1 / [S_1][S_2] + Km_1 / [S_1] + Km_2 / [S_2] + 1$$

حيث أن Ks_1 هـو ثابـت تفكـك (ثابـت المـادة الأسـاس) لمعقـد المـادة الأسـاس – الإنـزيم مـن المـادة الأسـاس (S_1) الـذي يـرتبط أولا مـع الإنـزيم، $[S_1]$, $[S_2]$ هـي تراكيـز المـادتين الأساسـية بينمـا Km_1 Km_2 تمثـل ثوابـت ميكيلـيس، حيـث أن Ks_1 يعطـى بواسطة التعبير $[E][S_1] / [ES_1]$ أما في تفاعلات ثنائيـة المـادة الأسـاس لكـرة المنضـدة، فانه يمكن افتراض أن معادلة ميكيليس – منتن كالآتي:

$$V = \frac{Vm}{Km_1 / [S_1] + Km_2 / [S_2] + 1}$$

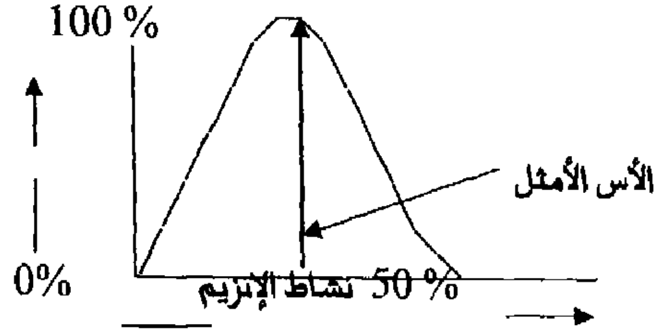
6. **تأثير تركيز الإنزيم:** الزيـادة في تركيـز الإنـزيم تسـبب ارتفـاع نسـبي في السـرعة الأوليـة للتفاعل الإنزيمي، لذلك يحصل على خط بيـاني مسـتقيم مـن العلاقـة بـين سـرعة عمـل الإنزيم وتركيز الإنزيم (الشكل- 1)، أن زيادة عدد جزيئات الإنـزيم يزيـد مـن سـرعة ارتباطات المادة الأساس بالإنزيم مما يجهز ذلك جزيئات إنـزيم لمـادة إضـافية مـن المـادة الأسـاس.



الشكل(1) تأثير تركيز الإنزيم على سرعة التفاعل

7. **تأثيرات ناتج أو نواتج التفاعل:** إن وجود نواتج التفاعل في وسط التفاعل يخفض من عمل الإنزيم جزئيا لأن التفاعــل العكسي يؤدي إلى تكوين مـادة أسـاس بسـبب عـدم توفر مواقع فعالة لبعض جزيئات الإنـزيم بسـبب أشغالها بواسـطة نـواتج التفاعـل في الجسم، بعض الانخفاض يحصل في عمل الإنزيم إلا انه يمكن منعة بسبب التفاعلات التي تحدث في نواتج التفاعل المتسلسلة لتفاعل إنزيمي واحد الذي يتغير بواسطة تفاعل إنزيم قادم من التفاعلات المتسلسلة والذي تمنع من تكوين ارتباط مع الموقع الفعال للإنزيم.

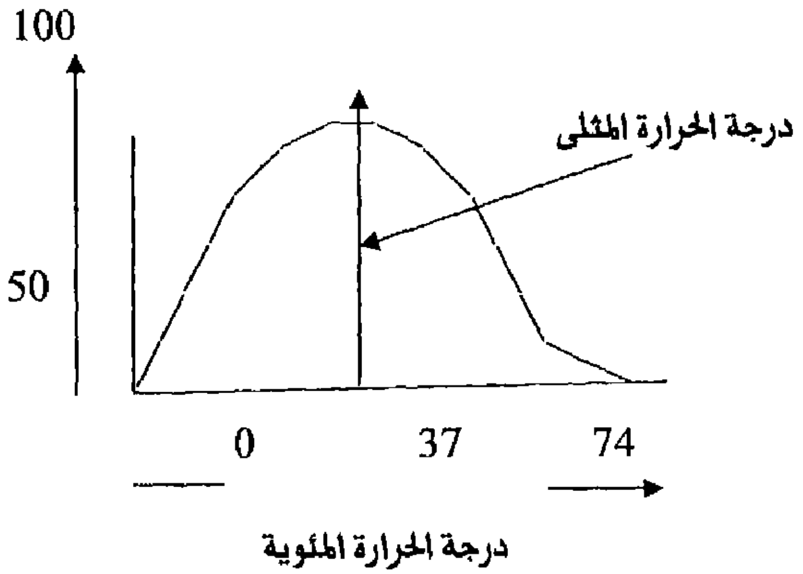
8. **الأس الهيدروجيني pH:** كل إنزيم يستطيع العمل في أس هيدروجيني معين يطلق عليه الأس الهيدروجيني الأمثل optimum pH للإنزيم ويقل نشاط الإنـزيم تـدريجيا فـوق وتحت القيمة المثلى (الشكل-2)، التغيرات في الأس الهيدروجيني لها تأثير علـى الإنـزيم في طريقة مختلفة لأن التباين في الأس الهيدروجيني يؤثر على تـأين المجـاميع المختلفـة في المواقع الرابطةbinding sites والمواقع التحفيزيـة catalytic sites للإنزيم كمـا لها نفس التأثير على المادة الأساس مما يقلل ذلك مـن تكـوين معقـد المـادة الأسـاس – الإنـزيم والتحفيـز catalysis، تغـيرات الأس الهيـدروجيني تسـبب تغيرات في هيئـة البروتين – الإنـزيم بواسـطة اضـطراب الأواصـر المختلفـة الـذي تحجـز التركيـب البنـائي الثلاثي ممـا يؤدي ذلك إلى فقد نشاط الإنـزيم، الـتغيرات في الأس الهيـدروجيني ممكـن أن يثبط نشـاط الإنـزيم بسـبب تفكـك الرابطـة بـين المجموعـة الرابطـة و apoenzyme بعض الإنزيمات مثل الببسين يمكن إن يعمل على اكثـر مـن مـادة أسـاس واحـدة لـذلك فأن الأس الهيدروجيني له يتغير من مادة أساس إلى أخرى، الببسين لـه أس هيـدروجيني امثل هو 2,2 لهضم الهيموكلوبين، لكـن أفضـل عمـل لـه علـى ألبـومين البـيض في أس هيدروجيني هو 1,5، التباينات في تركيز المادة الأساس أو درجة الحرارة لـه تـأثير علـى الأس الهيدروجيني.



الأس الهيدروجيني

الشكل (2) تأثيرات الأس الهيدروجيني على نشاط الإنزيم

9. **تأثيرات درجة الحرارة:** لكل أنزيم درجة حرارة معينته يعمل فيها والذي يطلق عليها درجة الحرارة المثلى optimum temperature الذي فيها الإنزيم يملك أقصى نشاط لكن يقل نشاط الإنزيم تدريجيا عند ارتفاع أو انخفاض درجة الحرارة عن هذا الحد (الشكل –3)، لدرجات الحرارة تأثيرات مضاعفة على الإنزيم، الارتفاع بدرجة الحرارة يعجل من التفاعل الإنزيمي بواسطة زيادة تجهيز طاقة التنشيط للجزيئات المتفاعلة إلا أن ارتفاع درجة الحرارة قد يؤدي إلى تحطيم التراكيب الثانوية والثلاثية للبروتين الإنزيمي بسبب ارتفاع الطاقة الحركية للجريئة ويمكن أن يؤدي إلى تغير في صفاتها الفيزياوية والكيماوية أي دنترة البروتينات denaturation، معامل درجة الحرارة temperature coefficient أو ما يطلق عليهQ10 أو الزيادة في سرعة التفاعل لكل 10درجات بينما انخفاض درجة الحرارة يساعد على حفظ جريئة الإنزيم، لكن ارتفاع درجة الحرارة يساعد في سرعة التفاعل التحفيزي، عند درجة الحرارة المثلى، فإن جزيئة الإنزيم والتفاعل التحفيزي في حالة اتزان لضمان أقصى عمل إنزيمي، فدرجة الحرارة المثلى لمعظم الإنزيمات في الأنسجة البشرية تكون قريبة من درجة حرارة الجسم الاعتيادية وهي 37م، أن لتركيز الإنزيم والأس الهيدروجيني والوقت اللازم للتفاعل تأثير على درجة الحرارة المثلى، الوقت القصير للتفاعل يرفع من درجة الحرارة المثلى.



الشكل(3) تأثيرات درجة الحرارة على نشاط الإنزيم

10. **تنشيط الإنزيم بواسطة الأيونات المعدنية activation with metal ions:**

يزداد عمل بعض الإنزيمات بواسطة بعض الأيونات المعدنية مثل أيونات الكالسيوم، البوتاسيوم، الحديديك، ألنحاسيك، الزنك، المغنيسيوم فتلك الأيونات المعدنية تحفز الإنزيمات في إحدى الطرق التالية:

أ. تعمل كواهبة أو قابلة للإلكترونات خلال التحفيز.

ب. تكوين معقدات غير ذائبة مع منتجات التفاعل لكي تزيد من سرعة التفاعل الأمامي.

ج. تحفز تكوين معقدات المادة الأساس – الإنزيم بواسطة جعل الإنزيم والمادة الأساس قريبة من بعضها.

د. إنتاج تغيرات في الهيئة التركيبية في التراكيب البنائية الثانوية والرباعية.

هناك ثلاث أنواع من المعقدات الثلاثية التي تتكون بين الإنزيم E والمادة الأساسS والأيون المعدني M ومعقدات ربط المادة الأساس– المعدن – الإنزيم هي E –M-S ومعقدات ربط المادة الأساس – الإنزيم – المعدن M-E-S ومثال ذلك إنزيمات

glutamate synthetase, enolase hexokinase وفي حالات عديدة، فأن الأيونات المعدنية تكون معقدات متشابكة مع مجاميع الأمين، الكربوكسيل والفينول.

11. **تنشيط تساهمي غير عكسي Irreversible covalent activation**: يمكن فرز بعض الإنزيمات المحللة للبروتين بشكل غير فعال يطلق عليها زايموجين zymogens أو مولدات الإنزيمات proenzymes (جدول – 4).

12. **التثبيط العكسي reversible inhibition**: يمكن انخفاض عمل الإنزيم بوجود بعض المواد المسماة المثبطات inhibitors الذي تؤثر على حركيات kinetics عمل الإنزيمات بواسطة تكوين معقدات عكسية مع أن الإنزيمات الحرة أو معقد المادة الأساس– الإنزيم أو كلاهما ويمكن تقسيم التثبيط العكسي إلى ثلاث أنواع هي:

أ. تثبيط عكسي تنافسي أو تثبيط مضاهي للمادة الأساس competitive,substrate analogue المثبط يحمل تراكيب مماثلة إلى المادة الأساسية الحقيقية للإنزيم بحيث تتنافس مع المادة الأساس لتشغل جانب الارتباط لجزيئة الإنزيم حيث يتم أشغال موقع الارتباط بواسطة المثبط بسبب تكوين معقد المثبط – الإنزيم I–E حيث يفقد الإنزيم قابليته للارتباط مع المادة الأساس، فالزيادة التدريجية في تركيز المثبط يسبب انخفاض تدريجي لألفة الإنزيم تجاه المادة الأساس مما يؤدي ذلك إلى زيادة تدريجية في قيمة ثابت ميكليس Km وهو ما يطلق عليه منحنيات double reciprocal curve الذي يتم الحصول عليه من العلاقة بين مقلوب السرعة الملحوظة 1/v ومقلوب تركيز المادة الأساس 1/[S] في تراكيز مثبطات مختلفة [I] حيث توجد هناك قيم مختلفة لثابت ميكليس عند وجود تراكيز مختلفة للمثبط (الشكل-5)، ارتفاع تركيز المثبط يخفض من مقلوب ثابت ميكليس المنظور apparent Michael's constant (Km) مع ارتفاع قيمة ثابت ميكليس المنظور للإنزيم.

جدول (4) تنشيط مولدات الإنزيمات

مولد الإنزيم	المنشط	ناتج التنشيط
بروثرومبين	Prothrombinase	ثرومبين + ببتيد متعدد غير فعال
بروفيبرينوجين	fibrinolysokinase	فيبرونيولايسين + ببتيد غير فعال
ببسينوجين	pepsin or HCl	ببسين + ببتيد غير فعال
تربسينوجين	enterokinase or trypsin	تربسين + ببتيد سداسي غير فعال
برورنين	HCl	رنين + ببتيد غير فعال
كيموتربسينوجين	تربسين وكيموتربسين	ألفا- كيموتربسين + ببتيدات ثنائية غير فعاله
بروكاربوكسي ببتيديز A	تربسين	كربوكسي ببتيديز A + ببتيد غير فعال

إن التركيز العالي من المادة الأساس يمكن أن يزيل التثبيط التنافسي بسبب إخراج المثبط من الارتباط مع الإنزيم مما ينتج السرعة القصوى للإنزيم عند غياب المثبط، ارتفاع تركيز المثبط وكذلك ارتفاع تركيز المادة الأساس تعطي أقصى سرعة مما تجعل التثبيط التنافسي عكسي ويعتمد على التراكيز النسبية للمثبط والمادة الأساس، أن الارتفاع التدريجي في قيمة Km المنظورة مع ارتفاع تركيز المثبط يسبب زيادة تدريجية في انحدار منحنى double-reciprocal مما يشير ذلك إلى انخفاض نشاط الإنزيم مما يعطي السرعة الملحوظة v للتفاعل تساوي Km[I] / vKi حيث أن:

Km هي ثابت ميكليس الحقيقي للإنزيم غير المثبط.

V هي السرعة القصوى بوجود أو عدم وجود المثبط.

Ki هي ثابت تفكك معقد المثبط – الإنزيم وبوجود المثبط التنافسي،

فأن معادلة ميكليس – منتن تكون محورة كالآتي:

v= Vki [S] / Km Ki [S] = Km[I]

وعلى سبيل المثال للتثبيط التنافسي الذي يتضمن تثبيط succinate dehydrogenase بواسطة المالونيت و L-lactate dehydrogenase بواسطة اوكساميت oxamate و aconitase بواسطة fluorocitrate و monoamine oxidase بواسطة monoguanidines حيث أن المثبط malonic acid والمادة الأساس succinic acid لإنزيم succinic dehydrogenase.

ب. تثبيط لا تنافسي **non-competitive inhibition**: لا يوجد تشابه تركيبي للمثبط مع المادة الأساس، لذلك لا ينافس المادة الأساس لإشغال الموقع الرابط في الإنزيم، لكن يحصل ارتباط مع المواقع الأخرى للإنزيم الذي تكون حرة في معقد المادة الأساس – الإنزيم، يحصل تثبيط بواسطة تغير في التركيب البنائي ثلاثي الإبعاد للإنزيم بسبب ارتباط المثبط مع ذلك الموقع في الإنزيم الحر ومعقد المادة الأساس – الإنزيم لتكوين معقدات مثبط المادة الأساس – الإنزيم E-S والمثبط – الإنزيم E-I وهذه الارتباطات تخفض من تكوين معقد المادة الأساس – الإنزيم وتفككه إلى مادة ناتجة وموقع الارتباط لا يتأثر بالمثبط وثابت ميكليس لا يتغير والانحدار التفاعل المثبط أكثر من ذلك للتفاعل المثبط وهو يساوي Km[I] / VKi، حيث أن المثبط لا يعمل بأشغال الموقع الفعال للإنزيم ولا يبعده عن الارتباط ويعطي أقصى سرعة عند زيادة تركيز المادة الأساس فعلى سبيل المثال فأن أيونات المعادن الثقيلة مثل أيونات الفضة والرصاص والزئبقيك تثبط إنزيمات السلفاهيدريل triose phosphate dehydrogenase أو إنزيم البابين عند ارتباطها مع مجاميع السلفاهيدريل للإنزيمات السيانيدات لها القدرة على تثبيط بعض الإنزيمات عندما تتفاعل مع الأيونات المعدنية في المجاميع الرابطة مثل الكاتاليز و cytochrome oxidase و EDTA ممكن أن يثبط الأنزيمات المعتمدة على أيون المغنيسيوم مثل enolase أو تثبيط triose phosphate dehydrogenase بواسطة الزرنيخ.

ج. تثبيط غير تنافسي: يرتبط المثبط فقط مع معقد المادة الأساس – الإنزيم في عدد من التفاعلات ثنائية المادة الأساس ومتعددة المادة الأساس لتثبيط تفككه الطبيعي إلى نواتج التفاعل إلا انه لا يرتبط مع الإنزيم الحر وليست لها تأثير مثبط مباشر على تكوين معقد المادة الأساس – الإنزيم حيث أن التفاعل المثبط اكبر من التفاعل غير

المثبط (1/V) بواسطة Vki /[I] مما يشير ذلك بأن المثبط يخفض من السرعة القصوى الذي تقل تدريجيا مع الارتفاع في تركيز المثبط.

13. **تثبيط تساهمي غير عكسي irreversible covalent inhibition**: يحصل ارتباط لمجموعة المثبط مع المجموعة الوظيفية للإنزيم بواسطة أواصر تساهمية لتكوين معقد غير فعال ثابت نسبيا، فأن diisopropyl fluorophosphate الذي يضيف مجموعة فوسفيت إلى مجموعة الهيدروكسيل من الحامض الاميني السيرين الفعال في الإنزيم مثل التربسين elastase و acetyl cholinesterase لتثبيط التفاعل، كما أن خلات اليود و iodoacetamide لها القدرة على تثبيط إنزيمات السلفاهيدريل مثل triose phosphate dehydrogenase والباباين بواسطة تفاعلها مع الحامض الاميني السستائين بينما ثنائي مركب خلات الايوديد من تثبيط إنزيمات الهستدين مثل إنزيم ribonuclease و– succinyl CoA synthetase بواسطة تفاعلها مع الهستدين.

14. **التحوير المنظم allosteric modulation**: بعض الأحيان يزداد أو يثبط نشاط الإنزيم بسبب التغيرات في الهيئة التركيبية بسبب الربط اللاتساهمي للمادة الأساس أو بسبب مواد نواتج الهدم المختلفة مع بعض الأحماض الامينية من الإنزيم في مواقعها الفعالة، لأن الموقع المنظم يتكون بواسطة الأحماض الأمينية يعرف بالموقع المنظم للإنزيم، فأن التحوير في نشاط الإنزيم يعرف بالتحوير المنظم، الإنزيمات ذات السلسلة المتعددة oligomeric enzymes مع أكثر من موقع ربط – للمادة الأساس ينظم بواسطة بعض التأثيرات المنظمة، المواقع الفعالة والمنظمة تقع على الوحدات الفرعية للاسبارتيت من الإنزيمات المنظمة ذات السلسلة الببتيدية المتعددة، بعض المواد تزيد أو تخفض من نشاط الإنزيم بواسطة ربطها مع الموقع المنظم والذي تعرف المؤثرات المنظمة السالبة negative allosteric effectors والمؤثرات المنظمة الموجبة positive allosteric effectors، المؤثرات المنظمة السالبة هي التثبيط المنظم الذي يتم ربطها مع الموقع المنظم والذي يسبب تغير في التراكيب البنائية الثلاثية والرباعية للإنزيم أو تغير في العلاقة بين الوحدات الفرعية للإنزيمات ذات السلسلة الببتيدية، تثبيط

aspartate transcarbamoylase لبكتريا القولون بواسطة CTP مهم للتثبيط المنظم، الموقع المنظم يملك تخصص للمؤثرات أو المحورات، لذلك تكون مواد معينه فقط تعمل كمؤثرات منظمة، جاذبية مواد الأساس لبعض الإنزيمات المنظمة يطلق عليها k enzymes الذي تتغير بواسطة تثبيط منظم أو بالتنشيط، فأن معظم ثابت ميكيليس لها هو Km' والذي لا يحدث تغير في سرعتها لقصوى (V) بسبب التأثيرات المنظمة، بعض الإنزيمات المنظمة الأخرى تعرف M enzymes الذي لا تبين أي تغير في ثابت ميكليس Km بسبب التحويرات المنظمة إلا إنها تسبب ارتفاع أو انخفاض في السرعة القصوى بسبب التحويرات الموجبة أو السالبة المنظمة، يعمل التثبيط المنظم كأساس للتغذية المرتدة feedback كمثبط لعدد من الإنزيمات في الجسم ففي بعض الحالات الناتج النهائي لسلسلة من التفاعلات المحفزة بالإنزيمات يمكن تثبيطها للإنزيمات أولا بواسطة ربطها الموقع المنظم من تلك الإنزيمات، إنزيم aspartate transcarbamoylase الذي يحفز الخطوة الأولي من سلسلة التفاعلات في تحويل الاسبارتيت وكاربامويل فوسفيت إلى CTP يتم تثبيطه بواسطة التأثير المنظم للتغذية المرتدة للناتج النهائي CTP، إنزيم trhreonine deaminas الذي يعمل في الخطوة الأولى من تحويل التريونين إلى Ile يمكن تثبيطه بواسطة تأثير التغذية المرتدة للحامض الاميني Ile، إن كل المثبطات للتغذية المرتدة لا تكون بسبب التأثير المنظم كما أن كبح التغذية المرتدة feed back repression للناتج النهائي يخفض من نشاط الإنزيم في بعض الحالات، أحيانا نفس المؤثر المنظم له تأثير على الأنزيمات المنظمة للاسبارتيت الذي تحفز التفاعلات المضادة على سبيل المثال، ارتفاع تركيز ATP له تأثير منظم للإنزيم phosphofructokinase الذي يحفز تحويل الفركتوز- 6- فوسفيت إلى فركتوز 1، 6- ثنائي فوسفيت كخطوة في انحلال السكر إلا أن نفس التركيز من ATP له القدرة على تعجيل نشاط إنزيم FADase في تحفيز تحلل FAD إلى FMP كخطوة في تخليق الكلايكوجين أي أن ATP يمكن أن يخفض من انحلال السكر ويزيد من تخليق الكلايكوجين، التحويرات التساهمية العكسية reversible covalent modification ويتم التثبيط التساهمي العكسي وتثبيط الإنزيمات إما بواسطة الفسفرة ونزع الفسفرة أو إضافة الأدنين

adenylation ونزع مجموعة الأدنين deadenylation للإنزيمات بوجود إنزيمات أخرى حيث تتكون آصرة تساهمية بين المجموعة المحورة والإنزيم فعلى سبيل المثال ، الارتفاع في الكلوتامين الخلوي الداخلي في بكتريا القولون *E.Coli* يحفز glutamine synthetase, adenyl transferase لتحفيز نقل مجاميع حامض الادينيليك من ATP إلى الحامض الاميني Tyr للإنزيم glutamine synthetase(Gbs) لتحويله إلى شكل فعال(GSb) ثم إعادة تنشيط GSb إلى Gsa بسبب نزع مجموعة ادينيليت من Gbs بواسطة deadenylase وإنزيم pyruvate dehydrogenase لا ينشط تساهميا protein kinase الذي يسبب فسفرة السيرين في decarboxylase والذي يعاد تنشيطة بواسطة نزع مجموعة الفوسفات بوجود phosphatase، glycogen phosphorylases في الكبد والعضلات يمكن تنشيطها بواسطة الفسفرة للحامض الاميني Ser بوجود kinase و ATP والذي تتحول إلى غير نشط بواسطة نزع مجموعة فوسفيت بوجود phosphatases. glycogen synthetase في الكبد والعضلات يتحول إلى شكل غير نشط بواسطة فسفرة الحامض الاميني Ser بوجود ATP وإنزيمglycogen synthetase والذي يعاد تنشيطه عند نزع مجموعة فوسفيت بوجود إنزيم phosphatase.

15. **التحوير التخصصي modification of specificity**: يمكن تغير تخصص المادة الأساس لبعض الإنزيمات ذات السلسلة الببتيدية المتعددة بواسطة ارتباطها مع المادة المحورة والذي ما هي إلا بروتين بدون نشاط إنزيمي، فالإنزيم يستطيع الارتباط مع نوع جديد من المادة الأساس مما يسبب ذلك تغير في التفاعل التحفيزي ونواتج التفاعل، فأن إنزيم N-acetyl lactosamine synthetase في غشاء كولجي يملك UDP-galactose و N-acetyl glucosamine كمادة أساس الذي يحفز نقل مجموعة الكالاكتوسيل من المادة الأساس الأولى إلى الثانية لتكوين N-acetyl lactosamine، في الغدد اللبنية الفارزة، إن ألفا-لاكتالبيومين المخلق في الرايبوسوم يرتبط مع نفس الإنزيم مما يغير من تخصص موقعة الفعال مما يتغير إلى lactose synthetase ما عدا كلوكوز بدلا من N-acetyl glucosamine كمادة

أساس ثانية وانتاج لاكتوز بواسطة تحفيز نقل مجموعة الكالاكتوسيل من -UDP galactose إلى الكلوكوز، يقل إنتاج ألفا-لاكتالبيومين في حالة عدم الإفراز ويسترجع الإنزيم إنتاج N - acetyl lactosamine بدلا من اللاكتوز.

UDP-galactose + glucose ⟷ UDP + lactose

16. الحث induction والكبح repression: بعض الأحيان توجد الإنزيمات اعتياديا في الأعضاء والأنسجة في كميات بوجود المادة الأساس أو المواد المشابه تركيبيا للمادة الأساس وبعض الإنزيمات المحفزة induced enzyme يتم هدمها وعلى سبيل المثال يتم تحفيز إنزيم Try-pyrolase(oxygenase) في البكتريا بسبب وجود Try أو α-methyl tryptophan ويتم تحفيز glutamate dehydrogenase الخاص بالمرافق الإنزيمي NAD^+ في الخمائر بوجود حامض الكلوتاميك وكذلك تحفيز penicillinase في عدد من البكتريا من ضمنها Bacillus cereus بسبب وجود البنسلين ويمكن مناقشة التحفيز على أساس ظاهرة operon أي في كل كروموسوم يمكن بقاء واحد أو أكثر من الجينات التركيبية structural genes والجين العامل operartor gene قريبة من بعضها البعض الآخر والذي تكون وظيفتها كوحدات جينية تسمى operon. DNA للجين التركيبي يخلق نوع معين من mRNA الذي يساهم في تخليق الإنزيم أو البروتين المعين بينما الجين العامل يحفز تخليق m RNA بواسطة الجينات التركيبية المجاورة مما يؤثر على تخليق الإنزيم. الجين المنظم regulator gene الموجود في الكروموسوم يساهم في تخليق توع معين من mRNA الذي يساعد في تكوين بروتين يسمى repressor (الكابح) والذي عند وجوده في الخلية يربط نفسه مع المحفز مما يسبب تغيرات في الهيئة التركيبية في الكابح مما يجعله بشكل غير فعال مما تقل قابليته للارتباط مع الجين العامل ويمنع تكوين mRNA المحفز بواسطة الجين التركيبي، تخليق الإنزيمات المناسبة بواسطة الجينات التركيبية قد يزيد أو يقلل هذه العملية الذي يطلق عليها الكبح repression.عندما يوجد المستحث induced في الخلية فإنه يرتبط مع الكابح repressor أو يحدث تغيرات تركيبية في الكابح مما يجعل الكابح غير نشط وتقل فاعليته للارتباط مع الجين العامل مما يصبح الجين العامل حر من التأثير المثبط للكابح

وهو ما يطلق عليه إزالة الكبح depression وتحفيز الجينات التركيبية المناسبة لتخليق mRNA والذي يساهم في تخليق الرايبوسوم للإنزيمات المعينة، إن المحفز يحفز تخليق الإنزيمات ذات العلاقة بواسطة مجموعة من الجينات التركيبية في operon من خلال إزالة الكبح للجين العامل للاوبيرون، هذه الظاهرة تعرف الحث ألتناسقي coordinate induction، أن كبح الجين العامل يثبط كل الجينات التركيبية للاوبيرون ويقلل من إنتاج مجاميع الإنزيمات لمسالك تخليقية حيوية خاصة وهذه الظاهرة تعرف الكبح ألتناسقي، في بعض الحالات من التثبيط للتغذية المرتدة للإنزيمات، فأن الناتج النهائي لسلسلة التفاعلات الإنزيمية لها القدرة على تثبيط الخطوة الأولى من تلك السلسلة بسبب كبح تخليق الإنزيمات لتلك الخطوة (كبح الناتج النهائي end product repression) حيث يعمل الناتج النهائي كابح مرافق(co-repressor) الذي يرتبط مع apo-repressor غير نشط الذي هو بروتين متكون بمساعدة الجين المنظم، المعقد الناتج هو holo-repressor فعال الذي يستطيع ربط نفسه إلى الجين العامل مما يؤدي إلى كبح الجين التركيبي الذي له علاقة مع تخليق الإنزيم المناسب، في بعض الحالات، فأن apo-repressor وحده لا يستطيع ربط نفسه إلى الجين العامل، لذلك فأن تخليق الإنزيم يستمر عند غياب الناتج النهائي للتفاعل وعلى سبيل المثال فأن كبح الناتج النهائي يتضمن كبح إنزيم Amlev synthetase الذي يحفز الخطوة الأولى في تخليق الهيم بواسطة الهيم أو إنزيم Try-synthetase الذي يحفز تخليق Try في بكتريا القولون E.coli بواسطة Try أو الإنزيمات الذي تحفز تخليق Arg بواسطة Argininase وبعض الإنزيمات يمكن كبحها بواسطة وجود مادة أو أكثر من النواتج النهائية الذي يطلق عليها multivalent repression، عدد كبير من الإنزيمات لا تحتاج إلى أي تحفيز لأن عملها أو تركيزها لا يؤثر عليه بواسطة المستحثات inducers أو الكابحات repressors لان الجينات العاملة لا تبقى في حالة كبح، لذلك لا تحتاج إلى إزالة الكبح، بعض الإنزيمات تعرف بالإنزيمات التأسيسية أو التكوينية constitutive enzymes بعضها يتكون بسبب تغير في جيناتها المنظمة أو جيناتها العاملة، لذلك فأن الكوابح لا تستطيع الارتباط مع الجين العامل الذي يستمر في تحفيز الجينات التركيبية لانتاج الإنزيمات التأسيسية.

17. **الوزن الجزيئي:** الإنزيمات مركبات منخفضة الوزن الجزيئي ويتراوح وزنها الجزيئي ما بين 12640 لإنـزيم الرايبونيـوكليز و13930 لإنـزيم اللايـزوزيم و22600 لإنـزيم كيموتربسـين و96000 لإنزيـم hexokinase و117000 لإنزيـم -Tyr synthetase و 495000 لإنـزيم glycogen phosphaorylase وواحـد مليون لإنزيم glutamate dehydrogenase و 2300000 لإنزيـم fatty acid synthetase.

18. **التأين:** يحصل تأين للعديد من الأحماض الأمينية المكونة للإنزيمات طبقا للمجاميع الوظيفية التي تحملها وتختلف المجاميع الوظيفية حسب الوسط وطبيعة المجموعة الوظيفية فيها وتختلف الإنزيمات في عدد الأحماض الأمينية الحامضية والقاعدية والمتعادلة ومقدارها وكميتهما، فالأحماض الأمينية الحامضية والقاعدية والمتعادلة وما تحتويه من مجاميع حامضية (وجود مجاميع هيدروكسيل) أو قاعدية (مجاميع الأمين) تؤدي إلى وجود شحنات سالبة أو موجبة على التوالي ويتوقف نوع الشحنات على الأس الهيدروجيني للوسط ونوع المجموعات وعددها ونوع الأحماض الأمينية.

19. **الترسيب precipitation:** يمكن ترسيب الإنزيمات من محاليلها بطرق مختلفة تعتمد على نوعها، بعض الإنزيمات تترسب نتيجة تأثير العوامل الفيزياوية مثل درجة الحرارة والضوء والاهتزازات بينما البعض الآخر بواسطة الأملاح الذائبة.

20. **الأكسدة:** تعتبر مجاميع السلفاهيدريل الموجودة في بعض الإنزيمات مثل إنزيمات الأكسدة والاختزال ضرورية لنشاط الإنزيم والذي عند أكسدتها تنتج روابط كبريتيدية S-S، عند وجود بعض العوامل المؤكسدة مثل الأوكسجين الجوي مما يؤدي ذلك إلى فقد نشاط الإنزيم نتيجة تغيرات في شكل الإنزيم ويمكن إعادة نشاط الإنزيم بواسطة إضافة مركبات السلفاهيدريل المختزلة مثل كلوتاثايون أو السستين R-SH التي تختزل روابط ثنائية الكبريتيد الموجودة في الإنزيم إلى سلفاهيدريل ويمكن حدوث العكس في حالة إنزيم ribonuclease الذي يفقد فعاليته بسبب اختزال أواصر ثنائية الكبريتيد مما يفقد التركيب البنائي الثانوي.

21. **الإشعاع radiation:** الإنزيمات ذات حساسية عالية تجاه الأشعة ذات الأطوال الموجية القصيرة ذات الطاقة العالية كما هو الحال في الأشعة فوق البنفسجية والأشعة

السينية وأشعة بيتا واسعة كاما حيث يتم أكسدة الإنزيمات بواسطة البيروكسيدات الناتجة عن تأثير الإشعاع ذات الطاقة العالية في الخلايا، حيث يحصل فقدان نشاط الإنزيم نتيجة تأثيرات الإشعاع على جينات الحامض النووي الرايبوزي منزوع الأوكسجين DNA.

التوزيع الخلوي الداخلي للإنزيمات

Intracellular distribution of enzymes

هناك مئات الإنزيمات الذي تكون مرتبة في داخل الخلية بصفة منتظمة مما تجعل تلك الإنزيمات تحفز التفاعلات الايضية الذي لها علاقة بها والذي تقع بجوارها وهي توجد داخل عضيات مختلفة في الخلية، فأن نوية الخلية الحيوانية تحتوي بعض الإنزيمات مثل RNA-polymerase،polynucleotide kinase, DNA-polymerase الذي تساعد في تخليق الحامض النووي وإنزيمات للتخليق الحيوي للبروتينات الأساسية مثل الهستونات الذي يستفاد منها لتكوين البروتين النووي والذي تقع في النوية أيضا، الإنزيمات مثل permeases الذي تساعد في نقل الجزيئات والأيونات عبر غشاء الخلية وATPase الذي يعتمد على أيونات الصوديوم والبوتاسيوم الذي تساعد في نقل أيونات الصوديوم والبوتاسيوم خلال غشاء الخلية و adenyl cyclase الذي يقوم في عمل ا لعديد من الهرمونات في خلايا الأنسجة فهي توجد في غشاء الخلية مثل dipeptidases , disaccharidases, phosphatases مرتبطة إلى غشاء microvilli، الإنزيمات الناقلة للإلكترونات مثل إنزيمات السايتوكروم، السلسلة التنفسية والبروتينات الفلافينية الناقلة للإلكترونات مثل NADH-dehydrogenase وإنزيمات الفسفرة التاكسدية تقع جميعها في الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا بينما إنزيمات دورة حامض الستريك وإنزيمات أكسدة بيتا للأحماض الدهنية و ornithine transcarbamoylase لتخليق اليوريا وAsp-amino transferase تقع في سائل الحشوة داخل المايتوكوندريا بينما يحجز غشاء المايتوكوندريا الخارجي بعض إنزيمات hexokinases, cytochrome b5 kynurenine hydroxylase ويحتوي اللايزوزوم إنزيمات hydrolases لتحليل البروتينات، الكلايكوجين و RNA,DNA، كربوهيدرات متعددة مخاطية، اللبيدات، الفوسفات، الكبريتات والفوسفولبيدات، يوجد ATPase الذي يعتمد على الكالسيوم

الايوني في غشاء sarcoplasmic reticulum لألياف العضلات، أغشية أجسام كولجي تحمل إنزيمات تساعد في تخليق اللاكتوز ,acetyllactosamine بينما توجد الإنزيمات الذي تساعد في تخليق الستيرويدات والفوسفولبيدات والكلسيريدات الثلاثية وكلوكيورونيدات glucuronides والسكريات المتعددة المخاطية في أغشية الشبكة الاندوبلازمية بينما ترتبط الرايبوسومات مع الشبكة الذي تحتوي إنزيمات لتخليق السلاسل الببتيدية من الأحماض الأمينية المنشطة بينما توجد إنزيمات انحلال السكرglycolysis وتخليق الكلايكوجين وتخليق الأحماض الدهنية ومسلك فوسفيت السكر الخماسي وهدم البيورينات والبيرميدينات في الجزء السائل المايتوكونديري الخارجي من السايتوبلازم (السايتوسول) أما amino acid –t RNA synthetase الذي يحفز الأحماض الامينية لتخليق السلسلة الببتيدية وعدد من إنزيمات تخليق الكلوكوز من مركبات غير كربوهيدراتية gluconeogenesis من منتجات هدم الكربوهيدرات مثل البيروفيت واللاكتيت الذي تقع في السايتوسول.

الطبيعة الفيزيوكيماوية للإنزيمات: تتركب معظم الإنزيمات من جزيئين هما المرافق الإنزيمي مع a po-enzyme وكلاهما غير فعاله إنزيميا عندما يتم فصل بعضها عن البعض الآخر، التخصص الإنزيمي للمادة الأساس يعود إلى الجزء apoenzyme، كل التحاليل الكيماوية للإنزيمات تبين بأن apoenzyme هو بروتين مركب من وحدات من الأحماض الأمينية من النوع ألفا، الإنزيمات ذائبة في الماء وصفاتها الفيزيوكيماوية متشابه للبروتينات الأنبوبية الذائبة في الماء، تطرأ عليها تغيرات فيزيوكيمياوية أي دنترة denaturation بسبب الحرارة والحموضة والقلوية أو العوامل الأخرى مما يحطم ذلك من نشاط الإنزيمات، تبين الإنزيمات تفاعلات لونية، بعض الإنزيمات مثل الببسين تتكون من بروتينات أنبوبية حبيبيه بسيطة بدون أي مجاميع رابطة أو مرافقات إنزيمية، الإنزيمات إما أن توجد بشكل وحدات منفردة أو تجمعات لعدد من الوحدات الفرعية، كل وحدة فرعية تملك مركز فعال ترتبط إليه المادة الأساس خلال التفاعل.

بعض الظواهر الجزيئية للإنزيمات Some molecular aspects: هناك بعض المكونات التي لها علاقة بالإنزيمات لأن نشاط الإنزيمات يحتاج إلى مشاركة جزئية إضافية أو أيون قبل أن يؤدي الإنزيم وظيفته التحفيزية ومن هذه المركبات هي:

1. الإنزيمات كعوامل مرافقة enzymes as cofactors، يمكن تقسيم العوامل المرافقة إلى ثلاث مجاميع رئيسية هي:

أ. المجاميع الرابطة prosthetic groups.

ب. المرافقات الإنزيمية coenzymes .

ج. المنشطات المعدنية metal activators.

المجاميع الرابطة: بعض البروتينات تحتوي على عناصر تركيبية غير مشتقة من الأحماض الأمينية وهذا النوع من البروتينات يطلق عليها بروتين مرتبط والذي يكون مهم في النشاط البيولوجي والذي يطلق عليها المجموعة الرابطة، والذي ترتبط تساهميا إلى البروتين أو ترتبط بقوه عن طريق تداخلات غير تساهمية وذلك لان البروتين يتركب من جزء متعدد الببتيد يطلق عليه apo protein بينما الجزء الإضافي الآخر هو المجموعة الرابطة وهي بعض أجزاء البروتينات الذي ترتبط بقوة مع البروتين أي ارتباط المرافقات الإنزيمية بقوة إلى جريئة الإنزيم أو بعبارة أخرى هو الجزء غير الحامض الاميني من البروتين أو الجزء غير البروتيني المرتبط مع الإنزيم، أي المجموعة الرابطة هي عامل مرافق مرتبط بقوه مع بروتين الإنزيم، أي أن جزئ بور فرين من hemoprotein peroxidase والفلافين FAD المرتبط بقوه مع إنزيم succinic dehydrogenase ما هي إلا مجاميع رابطة.

المرافقات الإنزيمية: المرافقات الإنزيمية هي جزيئات صغيرة متغيرة بالحرارة وعضوية تتفكك بسرعة من بروتين الإنزيم أي إنها لا ترتبط بقوة مع الجزء البروتيني من الإنزيم والذي يمكن فصلها عن الإنزيم بالتحليل أو الفصل الغشائي dialysis ومن الأمثلة عليها هي NAD^+, $NADP^+$, H_2folate CoA,TPP سوف نتكلم عنها بالتفصيل في الفصل الرابع.

المنشطات المعدنية: يحتاج عدد كبير من الإنزيمات إلى أيونات معدنية أحادية التكافؤ وموجبة الشحنه مثل أيونات البوتاسيوم والصوديوم أو ثنائية التكافؤ وموجبة الشحنه مثل أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم والزنك الذي يمكن أن ترتبط بقوة أو لا ترتبط بقوة إلى بروتين الإنزيم والذي ترتبط مع المجاميع الفينولية، الأمينية، الفوسفوريل أو الكاربوكسيل كما أن أيون الحديدوز يرتبط إلى البورفرين وأيون الكوبالت الذي يرتبط إلى معقد فيتامين السيانوكوبالامين أو ما يطلق عليه B_{12}.

2. **الإنزيمات كبروتينات:enzymes as proteins** الإنزيمات هي بروتينات في طبيعتها حيث أمكن بلورة urease والببسين والتربسين حيث وجد بان الإنزيمات لها صفات مشابه تماما للبروتينات، بعض الإنزيمات مثل الببسين و urease والرايبونيوكليز تكون بروتينية نقية في حين إنزيمات أخرى تحتوي بالإضافة إلى البروتين إلى بعض الأيونات المعدنية أو مجاميع عضوية غير بروتينية، بعض الإنزيمات المرتبطة مع تفاعلات الأكسدة والاختزال تكون متغيرة بالحرارة ولا يمكن تحليلها أو فصلها غشائيا مقارنة مع المرافقات الإنزيمية الثابتة تجاه الحرارة والذي يمكن فصل مكوناتها غشائيا، الجزء غير البروتيني في الإنزيمات يسلك درجات مختلفة من الارتباطات إلى البروتين بعضها يكون منشطات معدنية والآخر مرافقات إنزيمية حيث أن بعض الإنزيمات يتكون من عدد من الوحدات الفرعية يتراوح من 2 – 8 وحدات فرعية الذي ممكن أن تكون متماثلة أو مختلفة، النشاط التحفيزي يختلف مع سلوك التفكك والارتباط للوحدات الفرعية الذي تحدث في اليوريا ويمكن تقسيم الإنزيمات وحسب الوحدات الفرعية إلى ثلاثة أقسام هي:

أ. الإنزيمات ذات السلسلة الببتيدية الأحادية أو ما يطلق عليها monomeric enzymes وهي إنزيمات تتكون من سلسلة ببتيدية واحدة فقط والذي فيها الموقع الفعال للإنزيم.

ب. الإنزيمات متعددة السلسلة الببتيدية oligomeric enzymes وهي الإنزيمات التي تحتوي من إلى أكثر من 60 وحدة فرعية المرتبطة بقوة لتكوين بروتين إنزيمي فعال.

ج- معقدات الإنزيم المتعددة multienzyme complexes وهي عدد من الإنزيمات التي تساهم في سلاسل متعاقبة من التفاعلات في نقل المادة الأساس والذي يرتبط بقوة معه.

3. الإنزيمات كعوامل محفزة enzymes as catalyst: الإنزيمات تعمل كعوامل مساعدة وذلك بسبب قدرتها على زيادة سرعة التفاعلات الكيماوية المعينة في الخلايا لان الإنزيمات تكون ذات تخصص عالي في عملها لان العوامل المساعدة تعجل من سرعة التفاعلات الكيماوية بسبب خفض الطاقة الحرة للتنشيط حيث ترتبط مع المواد المتفاعلة لانتاج حالة انتقال تملك اقل طاقة حرة من حالة الانتقال للتفاعل غير المحفز حيث يتولد العامل المساعد عند تكوين منتجات التفاعل وهي لا تستطيع من تغير حالة توازن التفاعلات الإنزيمية الذي تحفزها ولا تستهلك ولا تتغير بسبب تلمك التفاعلات حيث تختلف الطاقة الحرة للجزيئات بدرجة حرارة ثابتة المبينة في الشكل اعلاه إلا أن بعض الجزيئات تكون غنية جدا بالطاقة وبعضها فقيرة جدا إلا أن معظم الجزيئات تملك محتوى طاقة حرة قريب من المعدل فعندما يحدث التفاعل الكيمياوي الإنزيمي، فأن بعض الجزيئات تملك طاقة داخلية أكثر من الأخرى كافية لجلب الجزيئات إلى القمة لتحويلها إلى الحالة الانتقالية، فأن طاقة تنشيط التفاعل هي كمية الطاقة بالسعرات اللازمة لجلب جميع الجزيئات في مول واحد من المادة بدرجة حرارة معينه إلى الحالة الانتقالية أي سرعة أي تفاعل كيماوي تتناسب مع تركيز الجزيئات في الحالة الانتقالية ويمكن زيادة سرعة التفاعل الكيمياوي إما بزيادة درجة الحرارة الذي تزيد الحركة الحرارية للجزيئات ومن ثم زيادة الجزء الذي يملك طاقة داخلية كافية للدخول في الخلايا الانتقالية أو أن تعجيل التفاعل الكيمياوي يتم من خلال إضافة عامل مساعد يعجل من التفاعل الكيمياوي فالعامل المساعد يخفض طاقة التنشيط للتفاعلات الكيمياوية مما يسمح للجزيئات الكبيرة من المادة أن تتفاعل وهذا ما يحدث عندما ترتبط الإنزيمات مع المادة الأساس خلال التحفيز.

الإنزيمات المتناظرة Isozymes or Isoenzymes: الإنزيمات المتناظرة هي أشكال جزيئيه متعددة من الإنزيمات متميزة طبيعيا عن بعضها البعض الآخر، ذات نشاط

تحفيزي متشابه، لذلك تحفز نفس التفاعل الكيمياوي ويمكن تميزها عن بعضها البعض الآخر بواسطة الاختلافات الفيزياوية والكيماوية والمناعية وقدرتها الحرارية وصفات الهجرة في المجال الكهربائي والصفات التنظيمية وهي ترتبط مع أنواع مختلفة من السلاسل الببتيدية بنسب وتسلسلات مختلفة ويمكن أن يختلف بعضها عن البعض الآخر في بعض الظواهر في الصفات في مجال الهجرة في المجال الكهربائي والصفات التحفيزية والحركية مثل الفتها تجاه المواد الأساس ويمكن تحوير نشاطها بواسطة عوامل مختلفة طبقا لا احتياجات الأنسجة لها ومن تلك الإنزيمات المتناظرة هي lactate dehydrogenases, alkaline phosphatases aldolases, carbonic anhydrases ,hexokinases وهذه الإنزيمات تساهم في العمليات الحياتية في الخلايا وذات أهمية طبية وهي توجد في أمصال الإنسان وفي أمصال وأنسجة اللبائن والبرمائيات والطيور والحشرات والحيوانات الدقيقة ووحيدة الخلية والنباتات وهذه الإنزيمات لها شحنات مختلفة في درجة حامضية معينة حيث تكون خمسة مناطق في مجال الهجرة في المجال الكهربائي بالنسبة لإنزيم lactate dehydrogenases ويتكون الإنزيم من أربع سلاسل ببتيدية متعددة وهناك شكلين أساسيين هما H في القلب و M في العضلات وممكن وجود شكل ثالث هو A في السبيرماتوزوا وتكون السلاسل الببتيدية متشابه ولكن تختلف في السلاسل الببتيدية الأربعة مما تعطي خمسة احتمالات ممكنة من الإنزيم هي M_4, HM_3, H_2M_2, H_4 وجميعها توجد في الأنسجة إلا أن أكثرها شيوعا في الأنسجة هو H_4 وهو ذو سعة تاكسدية عالية لذلك تحفز أكسدة اللاكتيت إلى بيروفيت أكثر من اختزال البيروفيت إلى لاكتيت ويحتوي التحليل المثالي لإنزيم lactate dehydrogenase على المكونات التالية:

1. مادة أساس مختزلة.
2. مرافق إنزيمي-+NAD.
3. مادة ناقلة للإلكترون بين NADH وصبغة phenazine methosulfate .
4. محلول منظم.

وتختلف متناظرات إنزيم lactate dehydrogenases عن بعضها البعض الآخر في التركيب البنائي الرباعي وتتكون جزيئه الإنزيم الفعال من أربعة وحدات ذات وزن

جزيئي حوالي 34000 للنوعين H,M ومجموع وزنها الجزيئي 13000 وتملك الجزيئة الرباعية فعالية التحفيز في الإنزيم وتلك الوحدات تخضع إلى مناطق وراثية معينة، لذلك فهي مهمة في تشخيص العديد من الأمراض السريرية وذلك لأنها تتأثر بالحالات المرضية المختلفة حيث إنها تختلف في توزيعها وتعطي إشكال مختلفة حسب نوع المرض وشدته وهي إنزيمات تتشابه في عملها على نفس المادة الأساس إلا إنها تختلف بالنسبة للسرع القصوى V max وثوابت ميكليس Km المختلفة كما تعطي قيم RF مختلفة عندما يتم فصلها بواسطة الهجرة في المجال الكهربائي وكما ذكر بأنها تتكون من سلسلتين من السلاسل الببتيدية المتعددة أو اكثر الذي تختلف في مكوناتها من الأحماض الأمينية وتسلسلها.

الفصل الثاني

النشاط الإنزيمي

النشاط الإنزيمي Activity of enzyme

النشاط الإنزيمي هو الوقت اللازم لحدوث كمية معينه من التغير في صفة ما تحت الظروف القياسية أو بتعبير آخر هو كمية الإنزيم المحفز لتكوين كمية من المادة الأساس في وقت معين تحت ظروف قياسية معينه من الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة فالمواد الأساسية اللازمة لنشاط الإنزيم تحفز الإنزيم أما بواسطة ارتباط الإنزيم مع بعض المجاميع فيه أو بواسطة تحديد انحلال المادة البروتينية أو بواسطة تنشيط المادة الأساس حيث يمكن الاستفادة من التغيرات التي تحصل في الصفات الفيزيوكيمياوية للمواد المتفاعلة في متابعة سرعة التفاعلات الإنزيمية الذي يمكن قياسها من تقدير الوقت اللازم لحدوث التغير تحت الظروف المناسبة ولقياس نشاط الإنزيم في نموذج ما يجب قياس معدل سرعة التفاعل المحفز بواسطة الإنزيم في ذلك النموذج والذي يعبر عنه بالوحدة الإنزيمية حيث أن سرعة التفاعل تتناسب مع كمية الإنزيم الموجودة في النموذج تحت الظروف المناسبة ثم يقارن المعدل مع معدل تفاعل محفز بواسطة كمية معينه من إنزيم عالي النقاوة ومنه يمكن حساب كمية الإنزيم في المستخلص مقدرا بالميكروغرام على أن يتم التقدير تحت نفس الظروف، هناك العديد من الإنزيمات ذات الأهمية في التشخيصات السريرية لا توجد في حالة نقية لذلك من الصعب تقدير عدد الميكروغرامات منها في النموذج لذلك يعبر عنها على شكل إنزيمي محدود ثم مقارنة كميتها النسبية من الإنزيمات في النموذج ويعبر عن وحدات الإنزيم بالميكرومول من المادة الأساس المتفاعلة مع الإنزيم أو المركب الناتج خلال دقيقة أو ساعة تحت ظروف معينه أي أن الوحدة العالمية للتفاعل الإنزيمي هي عدد الميكرومولات المتكونة بالدقيقة الواحدة ويمكن استعمال وحدات أخرى مناسبة وعلى سبيل المثال وحدة بودانسكي Bodansky unit هي كمية الإنزيم المحفز phosphatase لتكوين 1 ملغم من الفسفور على شكل فوسفيت غير عضوي في 100 مل من مصل الدم خلال ساعة واحدة تحت ظروف قياسية معينة من درجة حرارة واس هيدروجيني حيث أن التفاعلات تحدث تحت تفاعلات متخصصة، ففي حالة إنزيم dehydrogenase يحتاج إلى مرافق إنزيمي NADH, NADPH الذي تمتص الضوء عند طول موجي 330 نانوميتر وعند تغير NADH إلى NAD^+ وبالعكس يتغير التخصص الضوئي optical specificity أي تتغير الكثافة الضوئية عند طول موجي 340 نانوميتر حيث يتناسب

معدل التغير في الكثافة الضوئية طرديا مع نشاط الإنزيم وعلى هذا الأساس يمكن تعريف وحدة الإنزيم للإنزيمات النازعة للهيدروجين بالتغير الحاصل في الكثافة الضوئية مقداره 0,001 عند طول موجي 340 نانوميتر خلال دقيقة واحدة.

العوامل المؤثرة على النشاط الإنزيمي

1. **تركيز المادة الأساس:** يزداد نشاط الإنزيم مع الزيادة في تركيز المادة الأساس إلى الحد الأقصى ثم يتوقف نشاطه ومن المحتمل في هذا التركيز من المادة الأساس، فأن كمية الإنزيم تصبح محدودة وبعض الإنزيمات يحصل تثبيطها حتى بواسطة التركيز العالي من المادة الأساس وهذه الظاهرة تعرف تثبيط المادة الأساس substrate inhibition وهناك نوعين من الرسوم البيانية الذي يحصل عليها من رسم العلاقة بين تركيز المادة الأساس ونشاط الإنزيم حيث يتم الحصول على خط مستقيم من العلاقة بين الإنزيم والمادة الأساس الذي يتكون من وحدة واحدة أما عندما يتكون الإنزيم من عدة وحدات فرعية فأنه يحصل تداخل بين الوحدات الفرعية (الإنزيمات المنظمة allosteric enzymes) أو يسلك منحني بشكل حرف S.
2. **الأس الهيدروجيني:** بسبب الطبيعة البروتينية للإنزيمات، فأن الإنزيمات تكون حساسة جدا للتغيرات في الأس فبعض الإنزيمات تملك درجتين من الأس الهيدروجيني المثلى أو يكون الأس الهيدروجيني لها ليست حاد بل يكون ذو مدى وبصورة عامة يقع الأس الهيدروجيني الأمثل للإنزيمات ما بين 4 و9 الذي يعتمد على نقطة التعادل للأس الهيدروجيني للإنزيم وعلى المادة الأساس الذي يعمل عليها الإنزيم.
3. **تركيز الإنزيم:** الزيادة في تركيز الإنزيم يزيد نشاط الإنزيم، فأن في حالة وجود زيادة من المادة الأساس يزداد نشاط الإنزيم بواسطة الضعف من سرعة تكوين ناتج التفاعل مع زيادة تركيز الإنزيم حيث يصل أقصى نشاط إنزيمي عندما كل جزيئات المادة ترتبط إلى الإنزيم عندها أي زيادة في تركيز الإنزيم لا يؤثر على تكوين ناتج التفاعل.
4. **الأيونات المعدنية:** هناك عدد كبير من الإنزيمات التي تكون غير فعالة ما لم يتوفر لها بعض الأيونات المعدنية مثل المغنيسيوم، الكالسيوم، المنغنيز، الزنك، الصوديوم والبوتاسيوم ففي بعض الحالات فأن الأيونات الموجبة لا ترتبط بقوة مع الإنزيمات بينما

في حالات أخرى ترتبط بقوة مع الإنزيمات فالأيونات السالبة تكون فعالة في زيادة نشاط الإنـزيم مثـل أيونـات الكلوريـد الـذي يزيـد نشـاط إنـزيم اميليـز اللعـاب أي أن تركيـز الأيونات له تأثير على نشاط الإنزيمات.

5. درجة الحرارة: في جميع التفاعلات الإنزيمية، فأن ارتفاع درجة الحرارة 10 درجات مئويـة يضـاعف مـن سـرعة التفـاعلات مـا بـين 5 – 40م، بـدرجات الحـرارة العاليـة يـتحطم الإنزيم لا عكسيا عنـدما تكون درجة الحرارة 50 إلى 60م بسبب طبيعتها البروتينيـة فبعض الإنزيمات تكون فعالـة بدرجة حـرارة اكثـر مـن 60م، إنزيمـات الأنسـجة الجافـة مثل البذور والسبورات تكون اكثر مقاومة لدرجة الحرارة العالية، العلاقـة بـين نشـاط الإنزيم ودرجة الحرارة.

6. جهد الأكسدة والاختزال: الإنزيمات حساسة جدا لجهد الأكسدة والاختـزال في الخلايـا، إنزيمات الأكسدة والاختـزال تسبب تغير جهد الأكسدة والاختـزال للمركبـات في الخليـة وتتـأثر بعـض الإنزيمـات بواسـطة جهـد الأكسـدة والاختـزال بسـبب وجـود مجـاميع السلفاهيدريل الذي تكون سريعة الأكسدة.

7. مثبطات الإنزيم: يمكن تثبيط نشاط الإنزيمات بواسطة أنـواع مختلفـة مـن المـواد، بعـض المثبطـات تمـاثل المـواد الأسـاس لعمـل الإنـزيم في تركيبهـا البنـائي، فـأن مثـل تلـك المثبطات تتحد مع الإنزيمات في المواقـع الذي ترتبط أليهـا المـواد الأسـاس ممـالا تسـمح بوجود جزيئات حرة من الإنزيمات أن ترتبط مع المادة الأساس وهذا النوع مـن المثبطات يطلق عليها المثبطات التنافسية competitive inhibitors والتثبيط هو تثبيط تنافسي competitive inhibition، عند زيادة المادة الأسـاس، فأنـه تـتم إزاحـة المثبط من الإنزيم مما يزيد ذلك من سرعة نشاط الإنزيم فعلى سبيل المثال يمكن تثبيط نشـــاط الإنـــزيم succinic dehydrogenase بواسـطة حـامض المالونيـك لان المالونيت يتنافس مع السكسـنيت بسبب تشابه تركيبها البنائي.

$HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COOH$	$HOOC\text{-}CH_2\text{-}COOH$
Succinic acid	malonic acid

عدد من الأدوية المضادة للبكتريا تعمل كمثبطات تنافسية للإنزيمات، عقاقير السلفا تكون مثبطات تنافسية لإنزيمات بارا-امينو حامض البنزويك والذي يعتبر فيتامين أساسي لعدد من البكتريا وهي مركبات تشبه تركيبيا إلى sulfanilamide الذي يثبط نمو البكتريا الذي تحتاج إلى بارا-امينو حامض البنزويك، المثبطات اللا تنافسية لا تكون متخصصة جدا وترتبط لا عكسيا مع الإنزيم وعدد من الإنزيمات الحاوية مجاميع سلفاهيدريل يمكن تثبيطها بواسطة Hg, As وعدد من الإنزيمات الحاوية نحاس وحديد يمكن تثبيطها بواسطة السيانيد لأن السيانيد يرتبط مع تلك العناصر المعدنية مما يمنعها للقيام بدورها في عمل الإنزيم، المثبطات اللاتنافسية تختلف عن العوامل الأخرى أو المثبطات لأنها تحطم ترابط الإنزيم.

8. **نشاط الإنزيم:** نقل الكربون والطاقة في العمليات الايضية له علاقة بتركيب أو تخليق الإنزيم وتنشيط مولدات الإنزيمات الذي تكون غير عكسية، آلية عمل الإنزيم يقلل من نشاطه التحفيزي لذلك يكون بطئ النشاط التحفيزي لبعض الإنزيمات ويمكن أن يقل أو يزيد عكسيا، فأن مؤثرات نشاط الإنزيم الذي تخفض النشاط الإنزيمي التحفيزي يطلق عليها معـــدلات سالبة negative modulators بينما الذي تزيد من النشاط التحفيزي يطلق عليها معـــدلات موجبة positive modulators حيث تعمل تلك المؤثرات أو المعدلات كمنظمات طبيعية في العمليات الايضية داخل الخلية الحية وهناك نوعين من المعدلات أحدهما تنافسي والآخر لا تنافسي ويعتمد ذلك على زيادة أو نقصان التثبيط عند زيادة تركيز المادة الأساس.

تنظيم نشاط الإنزيم Regulation of enzyme activity: يتأثر نشاط الإنزيم بتغير تركيز المادة الأساس، تركيز الإنزيم نفسه، المرافقات الإنزيمية، المنشطات، المثبطات ودرجة الحرارة حيث يلعب كلا منهما دورا اتزانيا في تنظيم نشاط الإنزيم وتتأثر قابلية نشاط الإنزيمات المنظمة الرئيسية بواسطة معدلات منظمه منخفضة الوزن الجزيئي والذي لها تركيبا بنائيا مشابها قليلا أو كثيرا للمواد الأساس أو المرافقات الإنزيمية وبالنظر لأهمية تقسيم العمليات الايضية في الخلايا للكائنات الحية فأن العمليات الايضية تجري أما في السايتوسول أو في داخل المايتوكوندريا أو في داخل جسيمات خلوية معينه الذي تسمح

بتنظيم عمل الإنزيمات في تلك المناطق ويعيق عملها بعض المعدلات الخارجية لأن نقل المواد الأساسية عبر الحواجز التقسيمية مسيطر علية عن طريق آليات مكوكية تسمح بتحويل المواد المراد انتقالها إلى شكل قابل للنفاذ خلال الحاجز التقسيمي مما يحصل انتقال وتحول إلى الشكل الأصلي في الطرف الآخر وهذه التحولات داخل الخلايا تحتاج إلى نشاط محفز للإنزيم مما يعطي برهان قاطع على أن الإنزيم يوجد على شكلين مفصولين طبيعيا الواحد عن الآخر مما يسهل ذلك من تنظيم عملها أو نشاطها، ويمكن تنظيم نشاط الإنزيم كما يلي:

1. **التنظيم بواسطة تركيز المادة الأساس:** تتغير سرعة العديد من التفاعلات الإنزيمية فقط نتيجة للتغير في تراكيز المادة الأساس وعندما يحافظ على تركيز الإنزيم بشكل منتظم وتركيز المادة الأساس تقريبا نفس ثابت ميكليس، فأن سرعة التفاعل الإنزيمي تنتج اقل تغير في تراكيز المواد المتفاعلة والمواد الناتجة، وعندما يكون التنظيم كلي للإنزيم والمادة الأساس، فأن اتجاه التفاعل العكسي يمكن أن يتحول الذي فيه تركيز الإنزيم يحفز التفاعل العكسي الذي فيه تركيز المادة الأساس المتكون في الحالة الأولى يكون ثابت والناتج B أزيل من التفاعل، فأن هناك سريان ثابت يساوي 0,1 السرعة القصوى للإنزيم حيث تصبح سرعة التفاعل القصوى هي 0.1 x Vmax لأن تركيز الناتج B يحافظ عليه ولكن عندما يوجد الإنزيم ضعف سرعته السابقة، فأن زيادة تركيز المادة الأساس يعجل من التفاعل حتى تصبح سرعة إزالة المادة الأساس موازية للسرعة التي تكونت فيها في التفاعل السابق وعندما لا تحصل أي زيادة في تركيز المادة الأساس فان تركيز المادة الأساس F يزداد بمقدار 31% عندما يكون الناتج B كمية ثابت حيث أن F=B ويمكن ملاحظة مضاعفة سرعة جريان المركبات خلال التفاعل الإنزيمي في الحالة الأولى والثانية الذي يسبب فقط 30% زيادة في تركيز المادة الأساس F عندما يكون تركيز الناتج B هو كمية ثابتة مع استمرار التفاعل.

مثال: يمكن توضيح مثال أولي للاستعمال الفسيولوجي الفعال لتركيز المادة الأساس للسيطرة على العمليات الايضية بواسطة الإنزيمات الذي تحفز نقل الفوسفيت من ATP إلى الكلوكوز.

$$\text{ATP + glucose} \longrightarrow \text{ADP + glucose-6-phosphate}$$

يعتبر ذلك أول تفاعل يحدث في الخلايا للاستفادة من الكلوكوز حيث يحفز التفاعل بواسطة إنزيم يسمى hexokinase وهو من الإنزيمات غير المتخصصة جدا لسكر الكلوكوز حيث يساعد على تحفيز سكر الكلوكوز للعمليات الايضية وهو تفاعل غير عكسي تحت ظروف الأنسجة وهناك أربعة أنواع من هذا الإنزيم في الأنسجة وهذه الأنواع شائعة في الدماغ والكبد (جدول – 5).

جدول (5) ثابت ميكليس للكلوكوز و ATP لإنزيم hexokinase

Enzyme glucose	type	Km ATP	Km
Brain hexokinase	type-I	$4x10^{-4}$ M	$5x10^{-5}$ M
Liver hexokinase	type-IV	$1x10^{-4}$ M	$2x10^{-2}$ M

تركيز ATP في الدماغ والكبد يساوي تقريبا 10^{-3} مولار أو اكثر وهو اكثر من km لكلا النوعين، تركيز الكلوكوز في الدم يجهز الدماغ والأنسجة الأخرى بمقدار $5x10^{-3}$ مولار لذلك يمكن أن يزيد إلى $9x10^{-3}$ مولار بعد استهلاك كميات كبيرة من الكربوهيدرات ويمكن أن ينخفض إلى $3x10^{-3}$ مولار خلال الصيام أو الجهد العضلي الثقيل فالكبد يعمل تحت ظروف مختلفة فهو يستلم الدم من الأمعاء خلال الدورة الشريانية بالإضافة إلى الدورة الوريدية ويملك الدم الشرياني تركيز مرتفع من الكلوكوز خلال امتصاص الأغذية الغنية بالكربوهيدرات وكل القيم لتركيز الكلوكوز هي اكثر من km للكلوكوز مع brainhexokinaseالذي يعتمد على تجهيز الكلوكوز لغرض الطاقة، m لإنزيم الكبد أعلى من تركيز الكلوكوز الموجود في الدم الشرياني فان فسفرة الكلوكوز تحفز بواسطة هذا الإنزيم الذي يكون حساس جدا لتركيز الكلوكوز، الكبد ينتج كلوكوز بدلا من استهلاكه وينزع اكبر كمية من الكلوكوز من الدم اكثر من انتاجة ويحصل توازن بين الإنتاج والاستهلاك عند تركيز للدم قريب من0,006 مولار، الارتفاع في تركيز الكلوكوز يعجل من نشاط إنزيم hexokinase في الكبد لأن الإنزيم يعمل في تركيز اقل من تركيز المادة الأساس المشبعة في حين الإنزيم في الدماغ يكون قريبا من المشبع لذلك يكون حساس نسبيا إلى التغيرات في تركيز الكلوكوز.

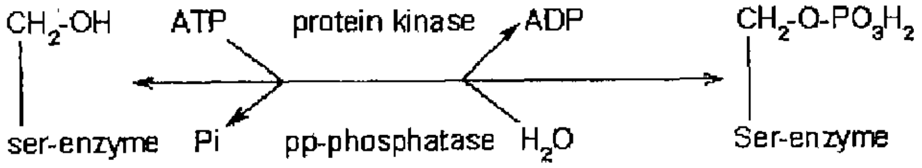
2. **التنظيم بواسطة المُعدلات modulators أو المؤثرات effectors:** في معظم الأنظمة الإنزيمية ذات التنظيم الذاتي فان الإنزيم الأول في التسلسل يثبط بواسطة الناتج النهائي product or feedback هذا النوع من الإنزيمات يطلق عليها الإنزيمات المنظمة Allosteric or regulator enzymes ونواتج العمليات الايضية المثبطة يطلق عليها المؤثرات effectors أو المّعدلات modulators بينما بعض الإنزيمات المنظمة يمكن تنشيطها أو تحفيزها بواسطة معدلات معينة، جميع الإنزيمات المنظمة تملك مواقع تحفيزية الذي تربط المادة الأساس بالإضافة إلى ذلك تملك واحد أو أكثر من المواقع المنظمة regulatory or allosteric sites لربط نواتج الايض المنظمة الذي تعرف بالمؤثرات أو المُعدلات، حيث يكون الموقع التحفيزي من الإنزيم متخصص للمادة الأساس بينما الموقع المنظم يكون متخصص للمعدلات، لذلك يمكن تنظيم نشاط الإنزيم المنظم بواسطة تحوير الإنزيم عن طريق استخدام مؤثرات منظمة منخفضة الوزن الجزيئي والذي تملك أو لا تملك تركيب بنائي مشابها إلى المادة الأساس أو المرافقات الإنزيمية، تثبيط الناتج النهائي end product inhibition أو feed back inhibition هو تثبيط نشاط الإنزيم في المسلك الايضي الحيوي بواسطة الناتج النهائي لذلك المسلك، يمكن توضيح تثبيط نشاط الإنزيم من التخليق الحيوي للمادة D من المادة A المحفزة بواسطة الإنزيم الأول والثاني والثالث.

$$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C \xrightarrow{E_3} D$$

أن التركيز المرتفع من الناتج النهائي D يثبط تحويل A إلى B وذلك بسبب قدرة D للارتباط مع E_1 أو تثبيطه، فأن D يعمل كمؤثر منظم سالب negative allosteric effectors أو مثبط الناتج النهائي feed back inhibitors للإنزيم الأول E_1 لذلك فأن تثبيط الناتج النهائي للإنزيم الأول بواسطة D ينظم تخليق D وعندما يرتبط D إلى الإنزيم في الموقع المنظم يبعده عن الموقع التحفيزي الخاص بالمادة الأساس فالإنزيمات ذات النشاط المنظم يمكن تنظيمها بواسطة المؤثرات المنظمة مثل مثبطات الناتج النهائي feed back الذي تربط المؤثر في الموقع المنظم، الإنزيمات المنظمة الذي تملك نشاط إنزيمي في الموقع

التحفيزي من الإنزيم يمكن تحويرها بواسطة المؤثرات الإنزيمية في الموقع المنظم ويمكن تحوير الإنزيمات المنظمة بواسطة التقانات الكيمياوية أو الفيزياوية لجعلها غير حساسة تجاه المؤثرات المنظمة بدون تغير في نشاطها الإنزيمي ويمكن دنترة المواقع المنظمة بواسطة اليوريا، أشعة اكس، الإنزيمات المحللة للبروتينات أو من خلال تنظيم القوة الايونية أو الأس الهيدروجيني بدرجة صفر – 5م أو بواسطة الانجماد أو التسخين، المؤثرات المنظمة تحمي الموقع التحفيزي من الدنترة denaturation تحت الظروف الذي لا تستطيع عندها المادة الأساس من حمايته لان المؤثرات ترتبط في الموقع التحفيزي مما تحمية عند عدم توفر المادة الأساس.

3. التنظيم بواسطة الفسفرة **Regulation by phosphorylation**: يمكن تغير نشاط الإنزيم من خلال تغيرات في التركيب البنائي وذلك بإضافة مجموعة فوسفيت إلى مجاميع الهيدروكسيل في الإنزيم (الشكل-4)، هذه المجاميع في داخل السلسلة



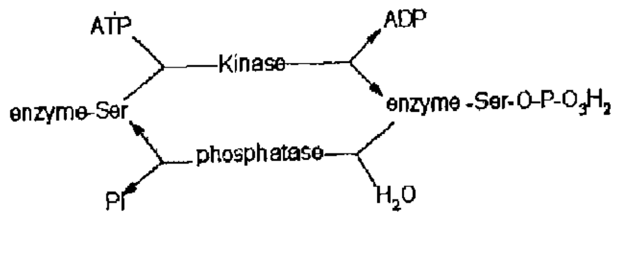
الشكل(4) تنظيم نشاط الإنزيم بالفسفرة

ترتبط مع الحامض الأميني السيرين، الثريونين أو التايروسين في السلسلة الببتيدية المتعددة، نقل مجموعة الفوسفيت إلى الإنزيم المنظم من ATP الذي يحفز التفاعل بواسطة إنزيم آخر مثل protein kinase حيث يتم نزع مجاميع الفوسفيت بواسطة إنزيم آخر لخزنها مثل phosphoprotein phosphatase، الإنزيمات المتأثرة تماثل الإنزيمات الأخرى في تداخلها التعاوني بسبب وجودها على هيئات فعالة وغير فعالة، لكن الفروقات الأساسية هي تحويلها من هيئه إلى أخرى الذي يثبت بوجود أو عدم وجود مجموعة استر الفوسفيت على الإنزيم ويمكن تنشيط أو تثبيط نشاط الإنزيم بواسطة الفسفرة وذلك بإضافة أو نزع مجاميع الفوسفيت فأن وجود أو عدم وجود مجاميع الفوسفيت على الإنزيم المنظم يعتمد على النشاطات النسبية لأنزيم phosphoprotein phosphatase protein kinase الذي تحفز التفاعلات التنافسية، glycogen phosphorylase

الذي يسيطر على تحطيم وهدم الكلايكوجين للاستفادة من الكلوكوز في العمليات الايضية يمكن أن يكون على هيئة فعالة بالفسفرة حيث يتم نقل مجموعة الفوسفيت إلى الإنزيم بوجود إنزيم محفز آخر هو kinase حيث يتم تنشيط الإنزيم kinase بواسطة المؤثرات مما يجعله قادر على فسفرة العديد من جزيئات الإنزيم مما تجعل الإنزيم ذو فعالية ونشاط عالي لتحطيم وهدم الكلوكوز.

4. **تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التحوير التساهمي:** يتم التنشيط أو التثبيط التساهمي العكسي للإنزيمات بسبب إما الفسفرة أو أزالتها أو إضافة الأدنين adenylation أو إزالة الأدنين deadenylation من جزيئه الإنزيم بمساعدة بعض الإنزيمات، فالخاصرة التساهمية المتكونة بين المجموعة المحورة والإنزيم تلعب دوراً مهماً في نشاط الإنزيم وعلى سبيل المثال فأن الارتفاع في محتوى الكلوتامين الخلوي الداخلي في بكتريا القولونE.coli يحفز إنزيمات glutamine synthetase, adenyltransferase لنقل مجاميع حامض الادينيليك من ATP إلى الحامض الأميني Tyr في glutamine synthetase(Gsa) لتحويله إلى شكل غير فعال GSb ثم إعادة تنشيط GSb إلى Gsa بسبب إزالة مجموعة adenylate من GSb بواسطة deadenylase ثم يثبط pyruvate dehydrogenase تساهميا بواسطة protein kinase الذي يسبب فسفرة الحامض الأميني السيرين للإنزيم decarboxylase الذي يعاد نشاطه بالفسفرة بواسطة الفوسفوريليز، تنشيط glycogen phosphorylase الموجودة في الكبد والعضلات بالفسفرة للحامض الأميني السيرين بمساعدة ATP kinase ثم تثبيط من خلال نزع مجاميع الفوسفيت بمساعدة phosphatases وتثبيطglycogen synthetase الموجودة في الكبد والعضلات بالفسفرة لبعض جزيئات الحامض الأميني السيرين بمساعدة ATP و glycogen synthetase kinase الذي يعاد نشاطه من خلال نزع مجاميع الفوسفيت باستخدام إنزيم الفوسفوريليز ويلاحظ من ذلك أن التحوير العكسي لنشاط الإنزيم التحفيزي يحدث بواسطة ارتباطات تساهمية لمجموعة الفوسفيت الشائعة في اللبائن والنيوكلوتيدات الشائعة في البكتريا فالإنزيمات التي يطرأ عليها تحوير تساهمي مما يؤثر ذلك على نشاطها الإنزيمي الذي يطلق عليها إنزيمات التحويل الداخلي interconvertible

enzymes الذي توجد بحالتين نشطتين أحدهما مرتفع والآخر منخفض الكفاءة التحفيزية اعتمادا على الإنزيمات الفوسفاتية أو منزوعة مجموعة الفوسفيت الذي تكون ذات نشاط تحفيزي فعال (جدول-6) وتتم فسفرة الحامض الأميني السيرين لتكوين فوسفوسيريل أو فسفرة الحامض الأميني التايروسين لتكوين فوسفوتايروسيل ففي بعض الحالات النادرة حيث تحتوي إنزيمات التحويل الداخلي عدد من الأحماض الأمينية السيرين والتايروسين الذي تتم فسفرتها بشكل منتخب ويحدث ذلك بأعداد تتراوح من 1 – 3 أحماض أمينيه تسمى موقع الفسفرة وهذه المواقع الذي من المحتمل أن لا تكون موقع تحفيزي ويتم تحفيز الفسفرة وإزالتها بواسطة protein phosphatases protein kinases (الشكل-5) البروتينات المحولة converter protein نفسها يمكن أن تكون إنزيمات تحويل داخلي (جدول-6) حيث أن protein kinase phosphatases protein kinase , kinases, للبروتينات المحولة حيث أن phosphatases هي بروتينات تحويل داخلي يمكنها تنظيم نشاطها ويكون نشاط protein phosphatases, protein kinases تحت تأثير سيطرة هرمونية وأن التفاعلات (الشكل-6) تمثل التحويل الداخلي لسكر الكلوكوز والكلوكوز-6-فوسفيت أو تحويل الفركتوز والفركتوز-1 ،6- ثنائي الفوسفيت وأن نشاط إنزيماتkinasesالذي تحفز التفاعل1 و 3 وإنزيمات الفوسفاتيز الذي تحفز التفاعلات 2 و 4 في الشكل(6) يمكنها تنظيم نشاط الإنزيمات أما في حالة عدم التنظيم فإنها تعمل معا لتحفيز التحلل المائي غير المسيطر عليها وتنظيم نشاط الإنزيم بواسطة الفسفرة أو إزالتها يضاهي تنظيم الإنزيمات بواسطة تثبيط الناتج النهائي لأنها تنظم سريان نواتج الايض وفقاً للإشارات الفسيولوجية المعنية كما تعمل كلاهما بلا تغير في الملامح الوراثية وتحمل مواقع منظمة بدلا من تحفيزية.



الشكل(5) تحوير تساهمي لإنزيم منظم بواسطة الفسفرة وإزالتها

Glucose +ATP ⟶ ADP + glucose-6-phosphate ------- 1

Glucose-6-phosphate + H_2O ⟶ glucose + Pi ------ 2

ATP + H_2O ⟶ ADP + Pi

Enzyme-Ser-OH +ATP ⟶ enzyme-Ser-phosphate +ADP - 3

Enzyme-Ser-phosphate +H_2O ⟶ enzyme-Ser-OH+Pi --- 4

ATP + H_2O ⟶ ADP + Pi

الشكل(6) فسفرة وأزالها للإنزيات

جدول(6) تغير نشاط الإنزيات بالفسفرة وإزالتها التساهمية

الإنزيم	نشاط منخفض	نشاط مرتفع
استل-CoA كربوكسيليز	مفسفر	منزوع الفسفرة
كلايكوجين سايننثيز	مفسفر	منزوع الفسفرة
بيروفيت ديهايدروجينيز	مفسفر	منزوع الفسفرة
HMG-CoA reductase	مفسفر	منزوع الفسفرة
خلات نشطة- كربوكسيليز	مفسفر	منزوع الفسفرة
كلايكوجين فوسفوريليز	منزوع الفسفرة	مفسفر
citrate lyase	منزوع الفسفرة	مفسفر
فوسفوريليز كاينيز	منزوع الفسفرة	مفسفر
ريديكتيز كاينيز	منزوع الفسفرة	مفسفر

5. تنظيم نشاط الإنزيات بواسطة التحلل المائي للبروتينات: يمكن تنظيم نشاط الإنزيات بواسطة انحلال البروتين مثل تحويل الببسينوجين، التربسينوجين، الكيموتربسين و procarboxy peptidase إلى أشكالها الفعالة ويمكن تنشيط hosphorylase kinase B أو تحويل glycogen synthetase المعتمد على الكلوكوز-6-فوسفيت إلى الشكل غير المعتمد عليه بواسطة تحلل البروتينات المحدود كما يلعب تحلل البروتين المحدود دوراً مهماً في تنظيم نشاط الإنزيم المهم في تخثر الدم كما يمكن

تحويل fibrinogen إلى fibrin بواسطة إنزيم thrombin بواسطة تحلل البروتين المحدود الموجود تحت الظروف الفسيولوجية الاعتيادية وهو إنزيم البروثرومبين غير الفعال حيث ينشط بسلسلة من التفاعلات الذي تتضمن تفاعلات تنشيطية منظمة.

6. **التنظيم بواسطة الأيونات المعدنية:** تلعب الأيونات المعدنية دوراً أساسياً في التركيب البنائي وتحفيز اكثر من ربع الإنزيمات المعروفة كما تلعب دوراً تنظيمياً مهماً وخاصة في التفاعلات التي تحتاج إلى ATP حيث يكون معقد الأيون المعدني – ATP مادة أساسية لبعض التفاعلات الايضية حيث يمكن الحصول على أقصى نشاط إنزيمي عندما تكون النسبة المولارية من ATP إلى الفلز وحدة واحدة تقريبا، وتعتبر الزيادة في المعدن أو ATP عاملاً مثبطاً لنشاط الإنزيم، لان ثنائي وثلاثي فوسفيت النيوكلوتيد يكون معقدات ثابتة مع الأيونات الفلزية ثنائية التكافؤ لها القدرة أن تؤثر على التراكيز الخلوية الداخلية للأيونات المعدنية الحرة مما تزيد من نشاط تلك الإنزيمات وعلى سبيل المثال، ففي حالة غياب الأيونات المعدنية، فأن glutamine synthetase لبكتريا القولون يظهر ترتيب مرخي الذي يكون غير فعال من الناحية التحفيزية إلا أن إضافة أيونات المغنيسيوم والمنغنيز تحول الإنزيم إلى الشكل الفعال أي الشكل المشدود بالإضافة إلى ذلك، فأن إضافة الأدنين إلى الإنزيم synthetase يغير من تخصص الأيون ثنائي التكافؤ Mg^{+2} إلى Mn^{+2}، حيث يكون نشاط الإنزيم الحاوي أدنين حساس تجاه نسبة ATP إلى Mg^{+2}، في حين لا يحدث ذلك في الإنزيم الخالي من الأدنين وهذا السبب فأن نشاط إنزيم التخليق الحاوي على الأدنين له القابلية لتنظيم نشاطه بواسطة نسب ATP إلى أيون الفلز.

7. **تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة معقدات الجزيئات الكبيرة:** يساعد ترتيب الأنزيمات الذي تحفز التفاعلات الايضية المتسلسلة والمتعاقبة على شكل معقدات للجزيئات الكبيرة في تنسيق النواتج الوسطية للإنزيمات الايضية بين الإنزيمات بدون توازن مسبق بالإضافة إلى ذلك يحصل تغير في هيئة أحد مكونات المعقد الذي ينتقل بواسطة التداخلات البروتينية – البروتينية إلى الإنزيمات الأخرى في المعقد.

8. **تنظيم نشاط الإنزيم بالتثبيط التنافسي العكسي:** reversible competitive

غالبا ما يشابه تركيب المثبط التنافسي العكسي تركيب المادة الأساس للإنـزيم ممـا يؤدي ذلك إلى تنافسهما على موقع الربط على الإنـزيم وهـذا مـا يـؤدي إلى أمـا أشـغال أحـد المجاميع الفعالة في الموقع الفعال للإنزيم أو أن ارتباط المثبط بالإنزيم يتم في مكان من الموقـع الفعال بحيث يجعل هذا الموقـع غير مناسب لاستقبال جزيئه من المـادة الأسـاس أو أن المـادة الأساس نصل إلى الموقع الفعـال إلا انـــه لا يحصـل أي تفاعـل وفي أي مـن الحـالات اعـلاه، فأنـه سـيكون مركـب معقـد وعلـى سبيل المثـال يعتـبر المالـــونيت مثـبط تنافسـي عكسـي في التفاعـــل الـذي يحفـز بواســـطة إنـزيم succinate dehydrogenase، إن للمالونيـت مجموعتا كربوكسيل كما هو الحال للمـادة الأسـاس سكسـنيت وذلـك تـتمكن المالونيـت مـن الارتبـاط مـع الإنـزيم في موقـع الـربط للسكسـنيت علـى الإنزيـم حيـث يحصـل نـزع ذرتـي هيـدروجين مـن السكسـنيت لتكـوين فيومـــاريت الـذي يملـك آصـرة مزدوجـة ولمـا كـان للمالونيـت ذرة كربـون واحـدة بـين مجمـوعتي الكربوكسـيل ممـا يـؤدي ذلـك إلى عـدم حصـول المالونيت بوجود الإنزيم.

$$\begin{array}{ccc} CH_2\text{-}COOH & & CH\text{-}COOH \\ | & \longrightarrow & || \\ CH_2\text{-}COOH & & CH\text{-}COOH \end{array}$$

Succinic acid fumaric acid

يعتمد تأثير المثبط التنافسي العكسي على مـا يلـي: تركيـز المثـبط، تركيـز المـادة الأسـاس والألفة النسبية بين المثبط والمادة الأساس للإنـزيم عنـد تراكيـز معينـة مـن المثـبط والمادة الأساس فإذا كان تركيز المادة الأسـاس منخفضـا ، فـأن المثـبط سيتنافس مـع المـادة الأسـاس بسهولة على الموقع الفعال للإنزيم مما يـؤدي إلى درجـة عاليـة مـن التثبـيط أمـا إذا كان تركيز الإنزيم والمثبط ثابتة مع زيادة في تركيز المادة الأساس تقل قابلية المثبط لمنافسـة المادة الأساس على الموقع الفعال على الإنزيم ممـا تقـل قابليـة التثبـيط إمـا اسـتعمال تركيـز عالي من المادة، فأن المادة الأساس يكون عدد جزيئاتها كبيرا جدا مقارنه مع عدد جزيئات المثبط ففي هذه الحالة يمكن إهمال درجة التثبيط لذلك فان السرعة القصوى سوف لا تتبـدل في التثبيط التنافسي إلا أن قيمة km الظاهرية ستزداد بسبب التثبيط حيث يرمز لها km^-

عند وجود المثبط ويمكن توضيح حركيات الحالة المستقرة لتفاعل إنزيمي بوجود مثبط تنافسي عكسي(I) الذي فيه

$$E + S \underset{k-1}{\overset{k1}{\longleftrightarrow}} ES \longrightarrow E + P$$

حيث إن k1 هو ثابت تحلل التفاعل بين E I.

$$ki = [E][I] / [EI]$$

حيث إن ki هو ثابت التثبيط، إذ يحصل توازن بين الإنزيم والمثبط بعد التفاعل

$$[E][S] / [ES] = k-1 + k2 / km$$

$$[Eo] = [E] + [ES] + [EI]$$

$$= [E] + [ES] + [E][I] / ki$$

$$= [E](1 + [I] / ki) + [ES]$$

$$[E] = [Eo] - [ES] / (1 + [I] / ki)$$

$$km = [Eo] - [ES][S] / (1 + [I] / ki) [ES]$$

$$km (1 + [I] / ki) = [Eo] - [ES][S] / [ES]$$

$$vo = Vmax [So] / [So] + km (1 + [Io] / ki)$$

المعادلة الأخيرة هي نفس معادلة ميكليس – منتن عدا أن km يزداد بمقدار(1+[Io]/ki) حيث يكون تركيز كل من المادة الأساس والمثبط اكبر من تركيز

الإنزيم، لذلك فأن $[S]\approx[So]$ مثل $[I]\approx[Io]$، لذلك فأن السرعة القصوى لا تتغير في حين تتغير km، حيث أن:

$$km^{-} = km\ (1 + [Io] / ki)$$

حيث أن km^{-} هو قيمة km الظاهرية بوجود المثبط التنافسي [Io] حيث أن kiتكون مساوية لتركيز المثبط التنافسي والذي تكون ضعف قيمة km ويمكن توضيح معادلة لانيويفر – برك عند وجود مثبط تنافسي عكسي ويمكن الحصول على معادلة مشابه لمعادلة التثبيط التنافسي إذا كان موقع الربط المثبط معزولا عن الموقع الذي ترتبط به المادة الأساس عندما يكون ارتباط المادة الأساس بالإنزيم يحجب موقع الربط بسبب التغير في تركيب جزيئة الإنزيم أو بسبب آلية أخرى، حيث يرتبط المثبط مع الإنزيم وليس مع الإنزيم مع المثبط ES، لهذا السبب يكون المثبط تنافسي إما في حالة وجود المثبط يمكن الحصول على رسم لا نيويفر – برك الذي تكون فيه السرعة القصوى هي نفسها عند وجود أو عدم وجود المثبط حيث تكون قيمة km مختلفة بغض النظر عن آلية نشاط الإنزيم وعمله في التفاعل ويمكن استعمال المثبط التنافسي لتوضيح العمليات الايضية وذلك بسبب تراكم المركبات الوسطية الايضية فعلى سبيل المثال استعمل العالم كريب الفعل التثبيطي للمالونيت لدراسة دورة حامض الستريك الذي يعتبر إنزيم succinate dehydrogenase أحد الإنزيمات المشاركة فيها، كما استعملت المثبطات التنافسية في الطب والزراعة كأدوية علاجية أو في المواد القاتلة للحشرات أو في مكافحة الأدغال لتحطيم أو منع أو إعاقة نمو الأحياء المجهرية غير المرغوب بها فمثلا استعمل السلفانواميد في الطب على نطاق واسع كمثبطات تنافسية للإنزيمات البكتيرية في تخليق H_4 folate من بارا – امينو حامض البنزويك، ويستفاد من دراسة المثبطات التنافسية وكيفية ارتباطها بنفس موقع المادة الأساس في:

1. دراسة العوامل التي تتحكم بارتباط المادة الأساس مع الموقع الفعال على الإنزيم.
2. التفاعلات الإنزيمية التي تشارك فيها مادتين أساسيتين للإنزيم.
3. توضيح آلية التفاعل الإنزيمي.
4. دراسة تنظيم نشاط الإنزيمات في العمليات الايضية داخل الخلية.

9. **تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التثبيط اللاتنافسي:** المثبطات اللا تنافسية تثبط نشاط الإنزيم بواسطة ارتباطها مع الإنزيم في طريقة ما بحيث لا يمكن إزاحتها بواسطة المادة الأساس، بل يمكن منعها لحدوث التفاعل الإنزيمي أي أن المثبط يرتبط مع الإنزيم في موقع يختلف عن موقع ربط المادة الأساس مما يؤدي إلى تحطيم نشاط الإنزيم عن ارتباطه أما مع الموقع التحفيزي أو بسبب التغيرات التي تحصل في التركيب البنائي للإنزيم مما يؤثر على الموقع التحفيزية وتحت هذه الظروف يكون التفاعل كالآتي:

$$E + I \longleftrightarrow EI \text{ and } ES + I \longleftrightarrow ESI$$

تقل قيمة السرعة القصوى في التثبيط اللا تنافسي إلا أن قيمة km لا تتغير بسبب كون المثبط لا يؤثر على موقع الارتباط للمادة الأساس وان ثابت التحلل ki متشابه ويطلق عليه ثابت المثبط فإذا أردنا إيجاد السرعة الأولية vo عندما يكون $km \approx ks$.

$$Ks = [E][S] / [ES]$$

$$Ks = km$$

$$Km = [E][S] / [ES]$$

وعند وجود مثبط لا تنافسي والذي يرتبط بدرجة متساوية مع الإنزيم أو ES .

$$ki = [E][I] / [EI] = [ES][I] / [ES1]$$

$$[Eo] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$= [E] + [ES] + [E][I] / ki + [ES] [I] / ki$$

$$= [E] + [ESI] (1+[I] /ki)$$

$$[E]+[ES] = [Eo] / (1+[I] / ki)$$

$$[E] = [Eo] / (1+ [I] / ki)- [ES]$$

باستمرار الحل نحصل على

vo=Vmax / (1+ [I]/ki) x [Eo] / ([So] +km)

هناك حالات قليلة من التثبيط اللا تنافسي للتفاعلات الإنزيمية التي تشارك فيها مادة أساس واحدة فقط ومن ابسط الأمثلة لذلك هو أيون الهيدروجين، فأن بعض الإنزيمات مثل الكيموتربسين الذي يثبط عمله عند زيادة تركيز الهيدروجين لأن موقعه الفعال يتضمن قابل للبروتون كما تعتبر العناصر المعدنية الثقيلة والجزيئات العضوية التي ترتبط مع مجموعة السلفاهيدريل التي تعود إلى الحامض الأميني السستين من أفضل الأمثلة للتثبيط اللاتنافسي كما تعتبر مجاميع السيانيد من المثبطات اللا تنافسية لارتباطها مع الأيونات المعدنية في الإنزيمات المعدنية مما يؤدي ذلك إلى تحطيم نشاط الإنزيم، فالخواص السمية لبعض المركبات مثل السيانيد وأول اوكسيد الكربون وكبريتيد الهيدروجين وأيونات العناصر المعدنية الثقيلة تعود لفعل تلك المركبات كمثبطات لبعض الإنزيمات.

10. **تنظيم الإنزيم بواسطة التثبيط غير التنافسي:** uncompetitive يرتبط المثبط فقط مع المركب المعقد بين الإنزيم والمادة الأساس ولا يرتبط مع الإنزيم الحر حيث يحصل تغير في هيئة الإنزيم عند ارتباط المادة الأساس مع الإنزيم مما يؤدي ذلك عدم التأثير على موقع الربط المثبط أو يحصل ارتباط المثبط مع الإنزيم المرتبط مع المادة الأساس ففي هذه الحالة لا يمكن التغلب على هذا التثبيط عند زيادة تركيز المادة الأساس مما يؤدي ذلك إلى تغير قيمة km والسرعة القصوى لنشاط الإنزيم ومثال على ذلك هو تثبيط نشاط aryl phosphatase بواسطة الهيدرازين.

11. **تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التداخلات التعاونية:** بعد أن يتم بناء الإنزيمات بشكل وحدات متعددة متداخلة فيما بينها تعاونيا مما تحدث تغيرات في تراكيز المواد الأساس للإنزيم وعندما يكون تداخل الوحدات الفرعية متماثلة كل منها مع الموقع التحفيزي، فأن الحركيات الناتجة يطلق عليها بالحركيات المدارية المتجانسة homotropic kinetics وسبب التداخلات ناتج عن وجود اكثر من موقع ربط واحد على الإنزيم فمن المحتمل أن يحصل تداخل بين مواقع الربط خلال عملية الربط الذي يطلق عليها بالتداخلات التعاونية cooperactivity وتحدث التداخلات

التعاونية الموجبة عندما يؤدي ربط جزيئه واحدة من المادة الأساس للإنزيم إلى زيادة ألفة الإنزيم إلى جزيئات أخرى من المادة الأساس أو إلى جزيئات أخرى تختلف عن المادة الأساس للإنزيم أو تحدث تداخلات تعاونية سالبة عندما يؤدي ربط جزيئه واحدة من المادة الأساس للأنزيم إلى نقصان أو انخفاض ألفة الإنزيم إلى جزيئات أخرى من نفس المادة الأساس للإنزيم أو إلى جزيئات أخرى تختلف عن المادة الأساس وتحدث تداخلات تعاونية مدارية متجانسة عندما يؤثر ربط جزيئة واحدة من المادة الأساس على ربط جزيئات أخرى لاحقة من نفس مادة الأساس أو تحدث تداخلات تعاونية مدارية غير متجانسة عندما يؤثر ربط جزيئه واحدة من المادة الأساس على ربط جزيئات من مادة أساس مختلفة أي أن تأثير التداخلات التعاونية يكون أما مدارات متجانسة موجبة أو سالبة أو مدارات غير متجانسة موجبة أو سالبة ويعتبر التثبيط المنظم مثال على التداخلات التعاونية غير المتجانسة السالبة بينما يعتبر التنشيط المنظم مثال على التداخلات التعاونية غير المتجانسة السالبة ويمكن توضيح التعاونية الموجبة والسالبة في التداخلات وعلاقتها مع رسم ميكليس – منتن، لنيويفر – برك ومع هل Hillأن وجود وعدم وجود تداخلات تعاونية يعطي صفات حركية موضحة في الشكل أعلاه، في الحالات الاعتيادية يوضح رسم ميكليس – منتن العلاقة بين السرعة الأولية والتركيز للمادة الأساس ويمكن تميز التعاونية الموجبة بسهولة من خلال المنحني الذي يكون بشكل حرف S إلا انه من الصعب تميز مركبات ميكليس – منتن عن حركيات التعاونية السالبة ويمكن ملاحظة الفروقات اكثر في رسم لانيويفر – برك الذي فيه التعاونية الموجبة تعطي منحني تقعره للأعلى بينما التعاونية السالبة تعطي منحني تقعره للأسفل بالمقارنة مع الخط المستقيم للمنحني أ مقارنه مع ميكليس – منتن، الرسم اللوغاريتمي هل Hill يعطي منحنيات مرتبة ومستقيمة، المؤثرات المدارية غير المتجانسة تعطي تغيرات في المنحني بشكل حرف S إذا أدى ارتباط المادة الأساس الأولى إلى زيادة ألفة الإنزيم، فأن ذلك سيؤدي أيضا إلى زيادة نشاط الإنزيم في عملية الارتباط الثانية للمادة الأساس ففي حالة وجود تداخلات تعاونية متجانسة، فأن تركيز المادة الأساس يعطي منحني بشكل حرف S وفي حالة وجود تداخلات تعاونية متجانسة سالبة، فأن تركيز المادة الأساس لا يعطي منحني بشكل حرف S وهذا يعطي طريقا لدراسة تأثير التداخلات التعاونية الموجبة والسالبة على نشاط الإنزيم، لان

الفعل التعاوني الموجب يزيد ألفة الإنزيم مع المادة الأساس بينما الفعل التعاوني السالب يقلل من ألفة الإنزيم تجاه المادة الأساس له.

12. **تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التحوير الكيمياوي:** يمكن تحوير الإنزيم بواسطة تحوير السلسلة الطرفية لأحد الأحماض الأمينية إلى صيغة مختلفة باستخدام مثبطات لا عكسية مما يؤدي ذلك إلى فقد نشاط الإنزيم وذلك عندما يكون الحامض الأميني في الموقع الفعال إلا انه يحدث فقد في نشاط الإنزيم بسبب حدوث تغير في التركيب البنائي الرباعي للإنزيم بسبب تحوير أحد الأحماض الأمينية غير الموجودة داخل الموقع الفعال إلا أن الإنزيم يفقد نشاطه عند تحوير السلسلة الطرفية لأحد الأحماض الأمينية عند معاملته بمركبات كيماوية عند عدم وجود المادة الأساس إلا انه يسترجع نشاطه عندما يعامل بكميات كبيرة من المادة الأساس لتشبع الإنزيم وتشير الدراسات إن وجود المادة الأساس للإنزيم لا يعمل فقط على حماية موقع ربط المادة الأساس، بل انه يعمل على حماية الأحماض الأمينية المجاورة التي توجد في موقع التحفيزي، فأن تحوير موقع التحفيز يؤدي إلى فقد نشاط الإنزيم كليا وقد يحتفظ الإنزيم ببعض نشاطه التحفيزي بسبب تحوير موقع الربط بحيث لا تتمكن المادة الأساس من الارتباط بالإنزيم بالرغم من قدرتها للوصول إلى الموقع التحفيزي بحركة عشوائية مما يجعل السرعة القصوى ثابتة عند وجود تركيز عال جدا من المادة الأساس مما يؤدي ذلك إلى تحوير موقع الربط مما يزيد من ثابت ميكليس ويمكن تثبيطribonuclease عند إضافة خلات اليود بسبب الكلة alkylation المستدين في الموقع 119 و12 في الموقع الفعال للإنزيم أو أكسدة الأحماض الأمينية His, Try, Met, Cys بواسطة الأوكسجين المنشط أو المثيلين الأزرق أو روز البنغال لإيقاف نشاط الإنزيم أو يمكن الكلة مجموعة الثايول بواسطة المركبات الهالوجينية أو الكلة السستين في الموقع 25 لإنزيم البابايين بواسطةiodoacetamide مما يسبب فقد نشاط الإنزيم، يفقد إنزيم البابايين نشاطه بفعل p-chloromercuribenzoate الذي يهاجم مجاميع السلفاهيدريل الموجودة في الموقع الفعال وأن الأكسدة الضوئية لإنزيم الكيموتربسين يؤدي إلى أكسدة الحامض الأمينيMet في الموقع 192 مما يسبب ذلك فقد جزئي لنشاط الإنزيم ويحتوي الموقع الفعال للإنزيم على الأحماض الأمينية التالية , His, Cys, Ser, Met, Tyr

والـذي تلعـب دوراً مهمـاً في تحـوير الإنزيمـات وخفـض Asp, Glu, Lys, Try نشاطها كليا أو جزئيا بواسطة المركبات الكيماوية.

13. **تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التغير في الأس الهيدروجيني**: يختلف نشاط الإنزيم مع تغير الأس الهيدروجيني لأن خواص السلاسل الطرفية المتاينه للأحماض الأمينية يعتمد على الأس الهيدروجيني لأن التغير في الأس الهيدروجيني يؤدي إلى تغيرات في التركيب البنائي الثلاثي مما يؤدي إلى تغير الصفات الفيزياوية الكيمياوية (دنترة) لبروتينات الإنزيم أي إن نشاط الإنزيم يعتمد على درجة تأين السلاسل الطرفية لبعض الأحماض الأمينية لان النشاط التحفيزي للإنزيم يعتمد على السلاسل الطرفية ومعظم الإنزيمات تملك أس هيدروجيني مميز الذي تملك أقصى نشاط لها فوق أو تحت هذا الأس الهيدروجيني يقل نشاط الإنزيم، العلاقة بين نشاط الإنزيم والأس الهيدروجيني لأي إنزيم تعتمد على

أ. المجاميع المتاينة في الموقع الفعال على الإنزيم الذي يساهم في ارتباط المادة الأساس.

ب. المجاميع الوظيفية لجزيئات الإنزيم الذي تساهم في الارتباط إلى الإنزيم.

ج. المجاميع الوظيفية لجزيئات الإنزيم المسؤولة عن العمل التحفيزي.

د. المجاميع الأخرى لجزيئات الإنزيم التي تكون متاينه والتي يمكن تقدير شكلها الفعال في الجزيئة ويمكن قياس نشاط الإنزيم في أس هيدروجيني معين لان ثابت ميكليس لعدد من الإنزيمات يتغير مع الأس الهيدروجيني.

السيطرة على النشاط الإنزيمي: النشاط الإنزيمي له تأثير على العديد من العوامل بعضها يكون أساسي لتنظيم الايض.

1. تقل سرعة التفاعل الإنزيمي عند تجمع المنتج $v= d[P]/dt$ وسبب الانخفاض في السرعة هو تحويل الناتج P إلى مادة أساس نتيجة عكس التفاعل مع ارتفاع [P] وعندما يكون$Keq = [P] / [S]$.

2. توفر المادة الأساس والعوامل المرافقة تقدر النشاط الإنزيمي.

3. هناك سيطرة وراثية عند زيادة كمية الإنزيم المخلق أو المتحلل بواسطة الخلية.

4. يمكن تنظيم الإنزيمات بواسطة التحوير التساهمي حيث يحصل ارتباط تساهمي عكسي للمجموعة الكيمياوية ويمكن تحويل الإنزيم الفعال كليا إلى شكل غير فعال بسيط بواسطة ارتباط تساهمي للمجموعة الوظيفية مثل مجموعة الفوسفوريل، توجد بعض الإنزيمات بشكل غير فعال ما لم تتحول تخصصيا إلى الشكل الفعال من خلال إضافة تساهمية لمجموعة وظيفية وتفاعلات التحوير التساهمي تحفز بواسطة إنزيمات محولة الذي تتعرض إلى تنظيم ايضي والتحوير التساهمي هو تغير ثابت للإنزيم وهناك إنزيمات تحويل مختلفة لإزالة التحوير والذي لا يستمر لفترة طويلة لأنها تفاعلات عكسية مما يتحول الإنزيم إلى الشكل غير المحور.

5. يمكن تنشيط أو تثبيط النشاط الإنزيمي من خلال التداخلات غير التساهمية للإنزيم مع جزيئات صغير عدا المادة الأساس وهذا النوع من السيطرة يعبر عنه allosteric regulation لأن المنشطات أو المثبطات ترتبط إلى الإنزيم في موقع آخر عدا الموقع الفعال.

6. تنظيم الإنزيم من العمليات المهمة للخلية وهي تتضمن zymogens , isozymes و modulator proteins.

الزايموجينات Zymogens: معظم البروتينات فعالة كليا عند تخليقها إلا إن بعضها الآخر يخلق بشكل غير فعال والذي تسمى zymogens أو proenzymes والذي تصبح فعاله كليا عند تحلل بروتيناتها إلى ببتيد بواسطة أصره واحدة أو العديد من الأواصر الببتيدية ويتم النشاط بسبب تحلل البروتين مائيا بواسطة عملية عكسية وتنشيط الإنزيم والبروتينات المهمة فسيولوجيا الأخرى نتيجة تحلل البروتين مائيا، فالأنسولين هو بروتين هرموني يخلق بشكل جزيئه مولدة غير فعاله والذي عند تحلله مائيا ينتج الهرمون الفعال فالأنسولين هو منظم ايضي مهم الذي يتولد بواسطة تحلل الشكل غير الفعال مائيا proinsulin.

الإنزيمات المحللة للبروتين في القناة الهضمية: تعمل إنزيمات القناة الهضمية على تحلل البروتينات الغذائية الذي تخلق في المعدة والبنكرياس بشكل زايموجين (جدول-7) وعند النشاط التحللي للبروتينات فأن تلك الإنزيمات لها القدرة أن تكون مواد ارتباط المادة الأساس

الفعالة تحفيزيا حيث يحصل تنشيط الكيموتربسينوجين وهو يتكون من سلسلة ببتيدية مكونه من 245 حامض أميني مرتبطة بواسطة خمسة روابط ثنائية الكبريتيد حيث يتحول الكيموتربسينوجين إلى شكل فعال هو π-chemotrypsin نتيجة نشاط إنزيم التربسين الذي يشقق الأصرة الببتيدية للأحماض الأمينية الارجنين في الموقع 15 والايسوليوسين في الموقع 16وهذا الإنزيم الفعال إنزيميا يعمل على جزيئه أخرى من π-chemotrypsin لتكوين جزيئتين ببتيدية نتيجة تشقق الأواصر الببتيدية بين الحامض الأميني السرين في الموقع 14 والأرجنين في الموقع 15 وكذلك بين الحامض الأميني الثريونين في الموقع 147 والحامض الأميني في الموقع 148 والناتج النهائي هذه العملية هو α-chemotrypsin الذي فيه ثلاث سلاسل ببتيدية هي A من الحامض الأميني 1 – 13، B من 16-146 و C من 149 – 245 الذي تبقى مرتبطة معا بسبب وجود رابطتين من الأواصر ثنائية الكبريتيد، أحدهما من A إلى B والأخرى من B إلى C ولتحويل المركب من غير فعال إلى فعال يحتاج تشقق أحد هذه الأواصر.

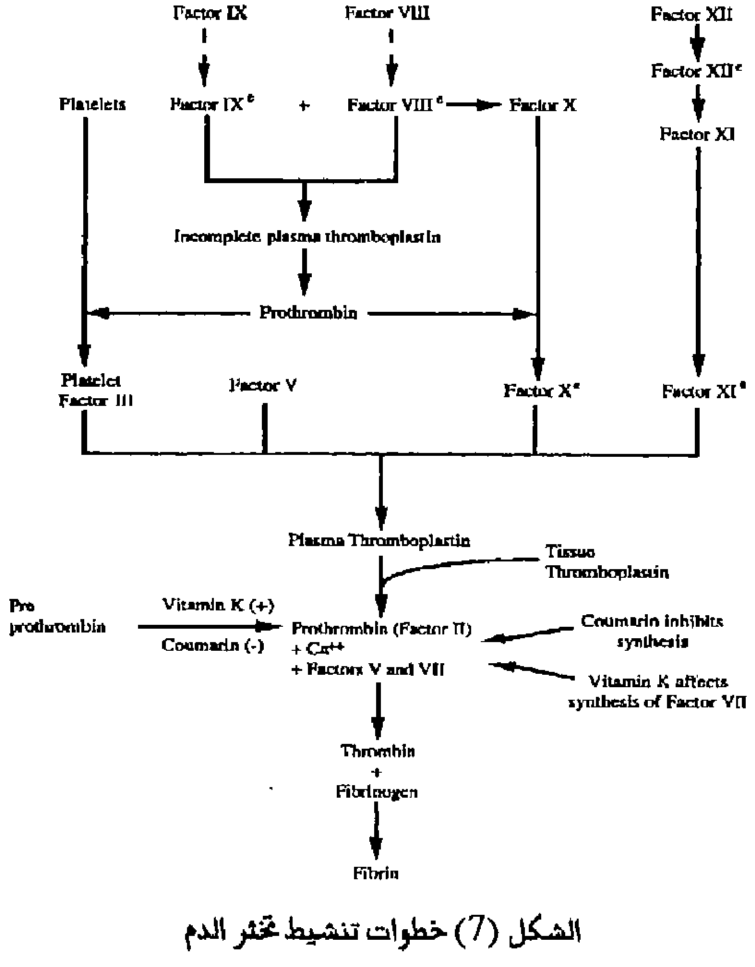
جدول (7) الزايموجينات البنكرياسية والمعدية

المنشأ	الزايموجين	البروتيز الفعال
البنكرياس	التربسينوجين	التربسين
البنكرياس	الكيموتربسينوجين	الكيموتربسين
البنكرياس	بروكاربوكسي ببتيديز	كربوكسي ببتيديز
البنكرياس	proelastase	elastase
البطن	الببسينوجين	الببسين

تخثر الدم: تكوين الخثرة ناتج عن سلسلة من أنشطة الزايموجين (الشكل- 7) مما يسبب تخثر الدم بسرعة عند حدوث الجرح وهناك 7 عوامل تخثرة فعالة هي Ser proteases هي IXa, VIIa, Xa, XIIa, XIa ,kallikrein و thrombin، وهناك مسلكين لتكوين خثره الدم هما intrinsic pathway والذي يحدث عندما يكون الدم في اتصال فيزياوي مع الأسطح الشاذة بسبب الجرح و extrinsic pathway الذي يعجل بواسطة العوامل المتحررة من أنسجة الجرح (الشكل -7) ويعمل الثرومبين على تحفيز

ببتيد غني في الشحنات السالبة من fibrinogen الذي يتحول إلى fibrinوهي جزيئه ذات شحنات سطحية مختلفة حيث يتجمع الفايبرين إشعاعات ليفية مرتبة الذي تكون مثبته بواسطة روابط عرضية تساهمية حيث يعمل الثرومبين على تشقق الآصرة الببتيدية بين Arg-Gly.

اللايزوزيمات: عدد من الإنزيمات توجد في اكثر من شكل رباعي تختلف في كمياتها النسبية للمكافئات التركيبية من الامثله لها lactate dehydrogenase الذي يوجد بشكل خمسة متشابهات إنزيمية تعتمد على ارتباط اثنان من الوحدات الفرعية المختلفة هيما A, B والذي تتضمن A_4, A_3B, A_2B_2, AB_3, B_4 وتختلف في صفاتها الحركية باختلاف الفتها النسبية للمواد الأساس المختلفة وحساسيتها للتثبيط بواسطة المركبات الناتجة وهي تختلف باختلاف الأنسجة.



الشكل (7) خطوات تنشيط تخثر الدم

البروتينات المحورة Modulator proteins: وهي بروتينات تحور النشاط الايضي عندما ترتبط إلى الإنزيم مما تؤثر على نشاط الإنزيم وبعض الإنزيمات مثل protein kinase توجد بشكل جزيئه ثنائية الوحدات الفرعية التحفيزية والوحدات الفرعية التنظيمية وتكون الوحدات الفرعية التنظيمية بروتينات محورة الذي تخفض من نشاط الوحدات الفرعية التحفيزية والذي تفككها ينشط الوحدات الفرعية التحفيزية، ومن الامثله الأخرى للبروتينات المحورة هو إنزيم-phosphoprotein phosphatase inhibitor I والذي عندما تتم فسفرته في أحد الأحماض الأمينية للسيرين فأنه يرتبط إلى إنزيم phosphoprotein phosphatase الذي يثبط نشاط الفوسفاتيز.

الفصل الثالث

تسمية وتصنيف
وترقيم
الإنزيمات

تسمية وتصنيف وترقيم الإنزيمات

تسمية الإنزيمات: Nomenclature of enzymes حتى مطلع هذا القرن كانت تسمية الإنزيمات هي مسؤولية الباحثين، فأعطيت أسماء عادية اعتمادا على طبيعة التفاعلات، طبيعة المركبات المتفاعلة وطبيعة المادة الأساس الذي يعمل عليها الإنزيم وأسماء الباحثين المكتشفين لها وبما أن الإنزيمات تتفاعل مع بعض المواد الأساسية المعينة وقد سميت الإنزيمات بوضع المقطع in في نهايتها مثل pepsin, trypsin, chymotrypsin papain أو تسمى طبقا للمادة الأساس مع وضع المقطع ase في نهاية اسم المادة الأساس الذي يعمل عليها فالإنزيم الذي يحلل اليوريا يسمى urease والإنزيمات المحللة للفوسفيت هو phosphatase، بعض الأحيان تسمى الإنزيمات طبقا لطبيعة التفاعل الذي تحفزه مما تسمى الإنزيمات النازعة للهيدروجين dehydrogenases والذي تنقل المجاميع الكيمياوية تسمى transferase أو الكاتاليز للإنزيمات المحللة للبيروكسيد أو البورتينيز للإنزيمات المحللة للبروتينات في القناة الهضمية مثل الببسين والتربسين وبسبب الارتباك الناتج عن الأسماء التجارية وبالنظر للمحاولات السابقة في وضع نظام لتسمية الإنزيمات نتج عنها مجموعة مشوشة ومركبة من الأسماء غير النظامية، في عام 1961 وبسبب عدم وجود طريقة ثابتة في تسمية الإنزيمات وبسبب كثرتها توجب تبني طريقة نظامية في تسميتها وتصنيفها حيث قام المؤتمر العالمي للكيمياء الحيوية بوضع بعض القواعد لتسمية الإنزيمات وتصنيفها حيث قدمت اللجنة الخاصة بتسمية الإنزيمات توصياتها عام 1964 وثم تنقيح التوصيات عامي 1974, 1978 حيث اعتبر تقريرها هو الأساس في نظام تسمية الإنزيمات المعمول بها حاليا حيث خصصت لجنه الإنزيمات اسم نظامي لكل إنزيم إضافة إلى الاسم الاعتيادي الدارج ويشمل الاسم النظامي اسم المادة الأساس أو طبيعة التفاعل وقد تكون أحد أصناف الإنزيمات الست الرئيسية أو قد تكون تحت الصنف لأي من الأصناف الستة ويوضح الاسم النظامي للإنزيم والأرقام التي أعطيت لها من قبل اللجنة المخصصة بذلك طبيعة التفاعل الذي يساعد فيه الإنزيم وقد يكون الاسم للإنزيم طويلاً لذلك يستخدم للاسم الدارج للإنزيم على نطاق واسع كما أوصت لجنة الإنزيمات باستعمال بعض الأسماء الاعتيادية للإنزيمات خاصة تلك التي تعتبر مقبولة.

تصنيف الإنزيمات Classification of enzymes: اعتمد تصنيف الإنزيمات الحديث إلى تقسيمها إلى ست مجاميع رئيسية اكثر سهولة ودقة اعتمادا على نوع واليات التفاعل وكل قسم إلى تحت قسم ولكل قسم وتحت قسم رقم معين يدل عليه وكل تحت قسم إلى فرع وكل فرع يشمل مجموعة من الإفراد ولكل منهما رقم معين وفي هذا التقسيم يعبر عن الإنزيم بأربعة أقسام ويدل الرقم الأول على القسم والرقم الثاني على تحت القسم والرقم الثالث على النوع والرقم الرابع على الإنزيم، ويفصل بين الأرقام الأربعة نقاط وتسبق بحرفين هما EC يسمى code number.

ترقيم الإنزيمات Numbering of enzymes: يمكن تصنيف الإنزيمات الى ست مجاميع طبقا للتفاعلات الكيمياوية الذي تحفزها (جدول– 8) حيث يتم التصنيف بواسطة الترقيم ويتكون التصنيف من أربع أرقام وهناك سبع أصناف فرعية subclass من الانزيم الذي تنقل المجاميع الحاوية فوسفات ويشمل الصنف الفرعي الأول إنزيمات phosphotransferases مع مجموعة كحول كقابل ومن تلك الإنزيمات هو ATP:D-glucose-6-phosphotransferase والذي يعطى رقم تصنيف هو 2.7.1.2 وهذا العدد يكتب E.C. ومعنى ذلك enzyme commission ويقع تحت الصنف 2.7.1.1 وهو ATP:D-hexose -6-phosphotransferase وهذا الانزيم يعتمد على ATP الذي ينقل مجموعة الفوسفيت إلى مجموعة الهيدروكسيل في ذرة الكربون السادسة من السكر سداسي ذرات الكربون.

جدول (8) التصنيف النظامي للإنزيمات طبقا إلى نظام التسمية النظام

E.C.No.	Name ,subname
1	Oxidoreductases(oxidation –reduction reactions)
1.1	Acting on CH-OH group of donors
1.1.1	**With NAD or NADP as acceptor**
1.1.3	With O2 as acceptor
1.2	Acting on the =C=O group of donors
1.2.3	With O2 as acceptor
1.3	Acting on the CH-CH group of donors
1.3.1	With NAD or NADP as acceptor
2	Transferases (transfer of functional groups)

E.C.No.	Name ,subname
2.1	Transfering C-1 groups
2.1.1	Methyltransferases
2.1.2	Hydroxymethyl transferases & formyltransferases
2.1.3	Carboxyltransferases & carbamoyltransferases
2.2	Transferring aldehydic or ketonic residues
2.3	Acyltransferases
2.4	Glycosyltransferases
2.6	Transferring N-containing groups
2.6.1	Aminotransferases
2.7	Transferring P-containing groups
2.7.1	With an alcohol group as acceptor
3	Hydrolases(hydrolysis reactions)
3.1	Cleaving ester linkage
3.1.1	Carboxylic ester hydrolases
3.1.3	Phosphoric monoester hydrolases
3.1.4	Phosphoric diester hydrolases
4	Layases (addition to double bonds)
4.1	C=C layses
4.1.1	Carboxy layases
4.1.2	Aldehyde lyases
4.2	C=O lyases
4.2.1	Hydrolases
4.3	C=N lyases
4.3.1	Ammonia lyases
5	Isomerases(isomerization reactions)
5.1	Racemases & epimerases
5.1.3	Acting on carbohydrates
5.2	Cis-trans isomers
6	Ligases (formation of bonds with ATP cleavage)
6.1	Forming C-O bonds
6.1.1	Amino acid –RNA ligases
6.2	Forming C-S bonds
6.3	Forming C-N bonds
6.4	Forming C-C bonds
6.4.1	Carboxylases

فالإنزيم المتخصص لسكر الكلوكـــــوز هـو glucokinase (E.C.2.7.1.2) وغـير المتخصـص يعـرف hexokinase(E.C.2.7.1.1) وكلمـة kinase هـو تعـبير تجاري للإنزيمات الذي تعتمد على ATP مثل phosphotransferase.

أولا: الصنف الأول: إنزيمات الأكسدة والاختزال Oxidoreductases

تشمل جميع الإنزيمات التي تحفز أكسدة واختزال المواد الأسـاس الـذي يعمـل عليهـا الإنزيم فالأكسدة تتم بواسطة الإنزيمات أما بواسطة إضافة الأوكسجين إلى المـادة الأسـاس أو بواسطة إزالة هيدروجين أو إلكترون من المادة الأساس ويشير الرقم الثاني في دليل التصنيف لإنزيمـات الأكسـدة والاختـزال إلى المـادة الـذي تعطـي أو تهـب الهيـدروجين أو الإلكترونـات في التفاعل ويشير الرقم الثالث إلى المادة الذي تأخذ الهيدروجين أو الإلكترون، المواد التي تعطي أو تهب الهيدروجين أو الإلكترون هي:

1. الإنزيمات التي تعمل على الكحول كمجموعة واهبة للإلكترون =CHOH.
2. الإنزيمات التي تعمل على الالديهايدات والكيتونات O= C = .
3. الإنزيمات التي تعمل على اصرة الكربون – كربون المزدوجة -CH=CH- .
4. الإنزيمات التي نعمل على الأمينات الأولية $-CH_2NH_2$.
5. الإنزيمات التي تعمل على الأمينات الثانوية -CH-NH = .
6. الإنزيمات التي تعمل على قبول إلكترون من NAD^+, $NADP^+$.
7. الإنزيمات التي تعمل على مجموعات الهيم الواهبة للإلكترونات.
8. الإنزيمات التي تعمل على ثاني بيرو كسيد الهيدروجين لمجموعة قابلة للإلكترون

1.Oxidoreductase

1.acting on the $-CH_2OH$ group of donors.

1.with NAD^+ or $NADP^+$ as a acceptor.

27. L-lactate: NAD_+ oxidoreductase

E.C 1.1.1.27 (lactate dehydrogenase)

وتشمل إنزيمات الأكسدة والاختزال الإنزيمات التالية:

dehydrogenases, hydroxylases , oxygenases peroxidases , reductases , oxidases.

E.C 1.1.3.4 glucose oxidase

E.C 1.6.4.6 nitrate oxidoreductase

E.C 1.10.3.1 phenolase

E.C 1.11.1.6 catalase

E.C 1.11.1.7 peroxidase

E.C 1.99.2.1 lipoxidase

E.C 1.1.1.8 α-glycerophosphate dehydrogenase

E.C 1.1.1.41 isocitrate: NAD+ oxidoreductase

E.C 1.4.3.3 D-amino acid oxidase

E.C 1.1.1.1 alcohol dehydrogenase

E.C 1.4.1.2 glutamate dehydrogenase

E.C 1.9.3.1 cytochromeoxidase

E.C 1.4.1.3 glutamic dehydrogenase

ثانيا: الصنف الثاني: إنزيمات النقل Transfereases: وهي الإنزيمات التي تحفز نقل مجاميع معينه من جزيئه المادة الأساس إلى جريئة مادة أساس أخرى وهي تساعد على نقل مجاميع أحادية ذرة الكربون مثل الفورميل، الكربوكسيل والمثيل أو مجاميع الديهايدية أو كيتونية، الأسيل، الالكيل، كلايكوسيل، فوسفات، كبريتات ونتروجين، و Transferases تشمل transaldolase , transketolase , transaminases, transmethylase, ومن الأمثلة النظامية لها هي:

E.C 2.1.1.2	guanidine acetate methyl transferase
E.C 2.3.1.6	choline acetylase
E.C 2.6.1.2	glutamate alanine aminotransferase
E.C 2.7.1.2	glucokinase
E.C 2.1.3.1	carboxyl transferase
E.C 2.7.1.1	hexokinase
E.C 2.4.1.1	phosphorylase

ثالثا: الصنف الثالث: إنزيمات التحلل المائي

وهي الإنزيمات الذي تساعد في تحطيم المواد الأساسية بالتحلل المائي ولا تشمل الإنزيمات الذي تساعد في إضافة أو إزالة الماء من المركبات مثل enolase, fumarase وهي الذي تحلل اصرة الاستر والكلايكوسيدية والببتيدية واصرة كربون – نتروجين عدا الببتيدية أو تسبب إزالة أو نزع مجموعة الكربوكيسيل والالديهايد ومجموعة الحامض الكيتوني (مجموعة الكربوكسيل+ مجموعة الكربونيل) وتشمل الإنزيمات التالية esterases , glycosidases , lipases , amidases, amylases, phosphatases , ribonucleases , peptidases, trypsin.

E.C 3.1.13 lipase

E.C 3.2.1.2 β-amylase

E.C 3.2.1.1 α-amylase

E.C 3.2.1.3 glucoamylase

E.C 3.4.4.4 trypsin

E.C 3.2.1.4 cellulase

E.C 3.6.1.3 ATPase

E.C 3.2.1.15 pectinase

E.C 3.2.1.23 D-galactosidase

E.C 3.2.1.20 α-glucosidase

E.C 3.1.1.11 pectase

E.C 3.4.4.1 pepsin

E.C 3.1.1.2 aryl esterase

E.C 3.4.4.3 rennin

E.C 3.4.4.5 chymotrypsin

E.C 3.4.4.12 ficin

E.C 3.4.4.24 bromelain

E.C 3.4.4.17 fungal protease

E.C 3.4.4.16 bacterial protease

رابعا : الصنف الرابع: الإنزيمات النازعة lyases: وهي الإنزيمات الذي تساعد على تشقق أواصر كربون – كربون ، كربون– أوكسجين، كربون – نتروجين بدون تحلل مائي أو أكسدة واختزال مما تنتج أو تنزع اصرة مزدوجة في المواد الأساسية عن طريق نزع أو إضافة مجموعة تاركة أواصر مزدوجة أو إضافية مجاميع إلى الاصرة المزدوجة ومن الإنزيمات النازعة هي decarboxylases , aldolases , synthetases or synthease , hydrases or hydratases or dehydratases , deaminases , nucleotide cyclases ويمكن توضيح تفاعلاتها كالأتي

$$R\text{-}CA\text{-}CB\text{-}R^{-} \longleftrightarrow R\text{-}C{=}C\text{-}R^{-} + AB$$

ومن تلك الإنزيمات حسب نظام التسمية هي:

E.C 4.1.1.22 His decarboxylase

E.C 4.2.1.2 fumarase

E.C 4.3.2.1. Arg succinase

E.C 4.2.1.13 Ser dehydratase

خامسا : الصنف الخامس: إنزيمات التناظر Isomerases: وهي الإنزيمات الذي تحفز الترتيب الجزيئي الداخلي دون تغير في تركيز المركبات عدا المواد الأساس، حيث تحول المواد الأساس إلى مناظراتها البصرية والهندسية الموضعية وتشمل الإنزيمات التالية racemases, epimerases, mutases isomerases ومن هذه الإنزيمات حسب نظام التسمية الحديثة هي:

E.C 5.1.3.2 UDP-glucose epimerase

E.C 5.3.1.1 triose phosphate isomerase

E.C 5.2.1.3 retinene isomerase

E.C 5.1.3.1 ribulose phosphate –3-epimerase

E.C 5.1.1.1 alanine racemase

سادسا: الصنف السادس: الإنزيمات الرابطة **ligases**: وهي الإنزيمات الذي تربط اثنين من المواد الأساس معا لتكوين أو أصر مع طاقة مشتقة من تحطيم بعض المركبات ذات الطاقة العالية مثل ATP, GTP وهي تعمل على تكوين اصرة معينه وتقسم حسب الأواصر المتكونة وهي الإنزيمات الذي تعمل على تكوين اصرة كربون – أوكسجين، كربون – كبريت ، كربون – نتروجين، كربون – كربون، ومن الأمثلة عليها هي:

E.C 6.1.1.7 alanyl-tRNA-synthetase

E.C 6.2.1.1 acetate thiokinase

E.C 6.3.1.2 glutamine synthetase

E.C 6.4.1.1 pyruvate carboxylase

E.C 6.2.1.3 acyl CoA synthetase

E.C 6.2.1.4 succinate thiokinase

E.C 6.4.1.2 acetyl –CoA carboxylase

الفصل الرابع

المرافقات الإنزيم

المرافقات الإنزيم Coenzymes

هناك عدد كبير من الانزيمات الذي تحمل وظيفة تحفيزية تعتمد على التركيب البنائي للبروتينات بينما البعض الاخر يحتاج الى مكونات غير بروتينية تسمى العوامل المرافقة cofactors (جدول – 9) فالعوامل المرافقة قد تكون ايونات معدنية أو جزيئات عضوية يطلق عليها المرافقات الانزيمية coenzymes والعوامل المرافقة اقل تعقيدا من البروتينات وهي ثابته للحرارة عندما تحضن في حمام مائي يغلي بينما تتم دنترة البروتينات تحت تلك الظروف، العديد من المرافقات الانزيمية هي فيتامينات أو تحتوي فيتامينات كجزء من تركيبها البنائي وتكون المرافقات الانزيمية فعاله في التفاعلات الانزيمية للانزيم وهي تعمل كمركبات وسطية تحمل مجاميع وظيفية في تحويل المواد الاساس لعمل الانزيم الى منتجات وفي معظم الحالات فأن المرافق الانزيمي يرتبط مع الانزيم لربما بواسطة اواصر تساهمية ومن الصعب فصلها الى جزئين، بعضها مرتبط بقوة الى المرافق الانزيمي يشار لها المجاميع الرابطة prosthetic groups للانزيم وتسمى المعقدات الفعاله تحفيزيا والمجاميع الرابطةhaloenzymeوالبروتين بدون المجموعة الرابطة يسمى apoenzyme وهو غير فعال انزيميا ، المرافقات الإنزيمية هي عبارة عن مركبات عضوية تحتاجها العديد من الإنزيمات لفعاليتها وغالبا ما تكون فيتامينات ومشتقاتها وتعمل أحيانا كعوامل مساعدة في حالة عدم وجود الإنزيمات وتختلف قوة الأواصر بين المرافق الإنزيمي والإنزيم من حاله لأخرى، فالعامل المرافق cofactors المرتبط بقوة مع الإنزيم يسمى المجموعة الرابطة والمرتبطة بارتخاء مع الإنزيم تعتبر مادة أساس مرافقة cosubstrate لأنها ترتبط مع جزيئة الإنزيم البروتينية في بداية التفاعل وتغادر الإنزيم في نهايته بعد تغير شكلها أي أن المرافقات الإنزيمية ترتبط مع الإنزيم قبل المادة الأساس وبالإمكان إعادتها إلى حالتها الأصلية بواسطة إنزيمات أخرى في الخلية، وظيفة المرافقات الإنزيمية كقابلة أو كواهبة لمجاميع معينه تنقلها إلى المادة الأساس أو نقلها من المادة الأساس وهي تعمل في ارتباط مع إنزيم واحد أو مع إنزيمين مختلفين كقابلة في تفاعل واحد وكواهبة في التفاعل الآخر أي إن عمل المرافق الإنزيمي مزدوج coupled مع اثنين من التفاعلات الإنزيمية ووظيفتها كعامل مساعد catalyst وعندما يرتبط بقوة مع الإنزيم فهو يعمل على نقل مجموعة بين اثنين من المواد الأساس للإنزيم حيث يكون قابل للمادة

الأساس الأولى وواهب للمادة الأساس الثانية بعد النقل الثاني يرجع المرافق الإنزيمي إلى حالته الأصلية والذي يستطيع أن يعيد عملة مره أخرى وبعض المرافقات الإنزيمية تملك تركيب بنائي قريب من الفيتامينات وهي من المركبات الغذائية الأساسية الذي يجب تجهيزها في الغذاء (الجدول -9).

العوامل المرافقة Cofactors: عدد كبير من الإنزيمات يحتاج مركبات إضافية قبل قيامها بوظيفتها التحفيزية لزيادة نشاطها وهي مركبات ثابتة تجاه الحرارة ويمكن تقسيمها إلى ثلاث مجاميع تتضمن المجاميع الرابطة أو الترقيعية prosthetic groups، المرافقات الإنزيمية Coenzymes، المنشطات المعدنية activators، المجاميع الرابطة هي عوامل مرافقة ارتباطها قوي ومتين مع بروتين الإنزيم ومن الامثله لها هي وحدة البورفرين لإنزيم hemoprotein peroxidase والفلافين -أدنين ثنائي نيوكلوتيد في succinic dehydrogenase،المرافق الإنزيمي هو جزيئات عضوية صغيرة وثابته تجاه الحرارة والذي تتفكك بسرعة من بروتين الإنزيم ويمكن فصلها عن الإنزيم بالتحليل الغشائي dialysis مثل H_4folate, FAD FMN, $NADP^+$ NAD^+ ومجموعة المنشطات المعدنية أو الأيونات المعدنية يحتاج لها عدد كبير من الإنزيمات للأيونات المعدنية الموجبة أحادية التكافؤ مثل البوتاسيوم والصوديوم أو ثنائية التكافؤ مثل أيونات الكالسيوم، المغنيسيوم، المنغنيز والزنك.

جدول(9) بعض المرافقات الإنزيمية والمجاميع الذي تنقلها

المجموعة المنقولة	المرافق الانزيمي
مجموعة أسيل	Coenzyme A
مجموعة فورميل ومجاميع أحادية الكربون	H_4folate
ثاني اوكسيد الكربون	Biotin
مجموعة أمين للحامض الأميني	Pyridopxal phosphate
الديهايد	Thiamine pyrophosphate
هيدروجين	Nicotinamide adenine dinucleotide
	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
هيدروجين	Flavin mononucleotide

المجموعة المنقولة	المرافق الانزيمي
هيدروجين هيدروجين: مجموعة أسيل هيدروجين	Lipoic acid Coenzyme Q

وهي أما مرتبطة بقوة مع بروتين الإنزيم أو لا ترتبط بقوة معه وذلك نتيجة تشابكها مع المجاميع الفينولية، الأمينية، الفوسفاتية، الكربوكسيلية فعلى سبيل المثال فان أيون الحديدوز يرتبط إلى وحدة البورفرين وأيون الكوبالت يرتبط إلى فيتامين B_{12} فالإنزيم الكامل الفعال تحفيزيا مع المرافق الإنزيمي أو الأيون المعدني يطلق عليه holoenzyme فالعوامل المرافقة ثابتة تجاه الحرارة ويمكن نزعها من بروتين الإنزيم بالفصل الغشائي dialysis.

تقسيم المرافقات الإنزيمية: تقسم طبقا للتفاعلات كالآتي:

1. المرافقات الإنزيمية الذي تنقل مجاميع عدا الهيدروجين مثل Coenzyme A , tetrahydrofolate, S-adenosyl methionine, biotin, thiamine pyrophosphate , pyridoxal phosphate.
2. المرافقات الإنزيمية الذي تنقل هيدروجين مثل $NADP^+$, NAD^+ , ATP , FM FAD lipoic acid , Coenzyme Q , ATP , adenosyl methionine uridine , phosphoadenyl sulfate , cytidine diphosphate diphosphate , glutathione.
3. المرافقات الإنزيمية لإنزيمات التناظر مثل uridine diphosphate , pyridoxal phosphate ,thiamine pyrophosphate, glutathione, B_{12} Coenzyme.

دور المرافقات الإنزيمية في الايض وحالات نقص الفيتامينات: العديد من الإنزيمات تعمل على المواد الأساسية لها فقط عندما توجد هناك عوامل مرافقة في الخلية، الذي يمكن فصلها بسهولة من الإنزيمات بواسطة التحليل الغشائي، العوامل المرافقة اللا عضوية مثل

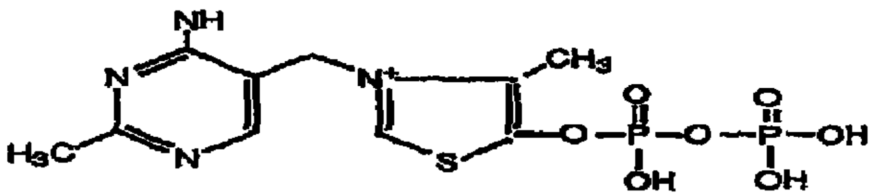
أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم تحتاجها الإنزيمات لتعجيل نشاطها الذي يطلق عليها منشطات الإنزيمات والذي ترتبط مع الإنزيم والمادة الأساس وتساهم في عمل بعض المرافقات الإنزيمية ولا تكون متخصصة كليا في عملها لذلك تعمل على تغير نشاط الإنزيم في بيئات مختلفة، المرافقات الإنزيمية ثابتة بالحرارة نسبيا وهي جزيئات عضوية لحد ما ذات تركيب بنائي معقد والذي يمكن فصلها بعيدا عن الإنزيم مما تسبب فقد في نشاط الإنزيم ويمكن تميز المرافقات الإنزيمية أحيانا عن المجموعة الرابطة وهو تعبير عن كل المواد غير البروتينية المرتبطة إلى البروتين حتى المركبات الذي لا تسبب أي تأثير تحفيزي، المرافقات الإنزيمية تلعب دوراً مهماً في تفاعل الإنزيم كحاملة لبعض المجاميع المعينة والذي تعاني من تغيرات كيمياوية معروفة خلال التفاعل الإنزيمي ويمكن اعتبارها مواد أساسية مرافقة cosubstrate اعتمادا على النظام الإنزيمي ويمكن أن تربط بين أنظمة إنزيمية مختلفة الذي لها علاقة بتفاعلات نقل المجموعة وتلعب المرافقات الأنزيمية دوراً مهماً في نشاط الإنزيمات وهناك أمثلة عديدة لنفس المرافق الإنزيمي المتضمنة تفاعلات مختلفة كليا تعتمد على مركب بروتيني معين يرتبط آلية المرافق الإنزيمي، بعض الفيتامينات الذائبة في الماء تكون مركبات تركيبية مهمة لبعض المرافقات الإنزيمية مثل الثيامين، الرايبوفلافين، النياسين، البيريدوكسين، حامض البانتوثينك، حامض الفوليك، البيوتين وفيتامينات أخرى لنفس المجموعة، عدد من تلك الفيتامينات يحتوي فوسفيت بشكل نيوكلوتيد، والنيوكلوتيدات هي أصلا مركبات من الأحماض النووية إلا إنها تظهر على نطاق واسع الانتشار في الخلية ومن الأمثلة على المرافقات الإنزيمية هي FMN, FAD, NAD^+ , $NADP^+$, CoA UDPG, ولفهم المرافقات الإنزيمية لابد من دراسة التفاعلات الذي تشارك فيها، بعض التفاعلات التي تحتاج إلى مرافقات إنزيمية يحصل ارتباط المرافق الإنزيمي قبل تداخل الإنزيم والمادة الأساس، حيث تطرأ تغيرات في التركيب البنائي للمرافقات الإنزيمية خلال التفاعل، لكن بخلاف المادة الأساس الذي هي الأخرى يطرأ عليها تغير يمكن توليدها في الخلية الوظيفية، يلاحظ أن البيريدين ومرافقات الفلافين بالرغم من كونها ناقلات للهيدروجين إلا إنها تساهم في عدد من تفاعلات الأكسدة والاختزال البيولوجية في الايض، العديد من المرافقات الإنزيمية تحتوي على فيتامين كجزء من تركيبها البنائي لذلك السبب فان تلك الفيتامينات تلعب دوراً أساسياً في التغذية لذلك يمكن ملاحظة أعراض نقص الفيتامينات وعلاقتها بالأمراض معروفة وبما أن المرافقات الإنزيمية غالبا ما تحتوى على فيتامينات

كجزء من تركيبها البنائي لذلك فإن عدد منها تحتاجها الإنزيمات الذي لها علاقة بالايض للأحماض الأمينية وخاصة البيريدوكسال فوسفيت كما أن فيتامينات نيكوتيناميد، ثيامين، رايبوفلافين، حامض البانتوثينيك وحامض ليبويك عناصر مهمة في المرافقات الإنزيمية في عمليات الأكسدة والاختزال الحيوية كما تعمل المرافقات الإنزيمية لحامض الفوليك والكوباميد في ايض الكربون الأحادي، ويعمل البيريدوكسال فوسفيت في تفاعلات انتقال مجموعة الأمين وكحامل في نقل المجموعة الأمينية بين الأحماض الكيتونية من نوع ألفا وعند تحويل جزيئة من الحامض الأميني Ala إلى الحامض الكيتوني بيروفيت تكتسب جزيئة واحدة من بيريدوكسال فوسفيت ذات الشكل الالديهايدي مجموعة أمين، فإن الشكل الأميني للمرافق الإنزيمي لا يعتبر ناتج نهائي للتفاعل لان الشكل الالديهايدي يتكون مرة ثانية بعد انتقال مجموعة الأمين إلى الحامض الكيتوني كلوتاريك من نوع ألفا مكونا بذلك كلوتاميت كما تظهر أهمية قدرة العضلات التي تعمل تحت الظروف اللاهوائية على تحويل حامض البيروفيت إلى حامض لاكتيت ليست في جزيئات البيروفيت واللاكتيت أنفسهما، بل في تحويل NADH إلى NAD^+ الذي بدون NAD^+ ولا يمكن استمرار انحلال السكر ويتوقف عمل العضلة أي أن تحت الظروف اللاهوائية تساعد عملية تحويل البيروفيت إلى لاكتيت في إعادة أكسدة NADH مما يسمح ذلك بتكوين ATP ويمكن ملاحظة تجدد NAD^+ لا هوائيا في العديد من التفاعلات الذي تستخدم حامض البيروفيك كمواد مؤكسدة إلى NADH ويتم اختزال تلك المواد في نفس الوقت.

التركيب البنائي وآلية عمل المرافقات الإنزيمية

أولا: المرافق الإنزيمي Thiamin pyrophosphate: يوجد في البقوليات والأنسجة الحيوانية والخمائر يشكل ثيامين ثنائي الفوسفيت فأن التركيب البنائي يتكون من وحدة ثيازول مرتبطة بها وحدتين من الفوسفيت تربط بينهما مجموعة اثيلين (الشكل-8) في طرف وفي الطرف الأخر من حلقة الثيازول يرتبط بيريميدين pyrimidine بواسطة جسر مثيلين أي يتكون من حلقتين غير متجانستين، النشاط الإنزيمي له علاقة مع نزع مجموعة الكربوكسيل غير التاكسدية للأحماض الكيتونية من نوع ألفا مثل حامض البيروفيك والفا-كيتو حامض الكلوتاريك وإنزيمات phosphoketolase transketolase، الوظيفة

الفسيولوجية والكيماوية الحيوية للمرافق الإنزيمي TPP تتضمن نزع مجموعة الكربوكسيل التاكسدية للأحماض الكيتونية من نوع ألفا.



Thiamin pyrophosphate (TPP)

الشكل(8) التركيب البنائي للثيامين بيروفوسفيت

ويساهم كمرافق إنزيمي في التفاعلات المتضمنة الإنزيمات التالية: 2-keto acid oxidases2-keto acid decarboxylases, transketolase, phosphoketolase, pyruvate decarboxylase و TPP يرتبط بقوة مع الإنزيم، لذلك يعتبر كمجموعة رابطة ويساهم في نقل مجاميع الأسيل والكربوكسيل ويعمل المرافق الإنزيمي في نزع مجموعة الكربوكسيل من الأحماض الكيتونية مثل حامض البيروفيك والفا- كيتو كلوتاريك ونشاط المرافق الإنزيمي TPP في تلك الحالات له علاقة مع حامض الليبويك كما يساهم المرافق الإنزيمي TPP في أكسدة حامض البيروفيك كما يساهم في تحويل حامض البيروفيك إلى ثاني اوكسيد الكربون واسيتالديهايد بواسطة pyruvate decarboxylase في الخمائر كما يعمل على تكوين ألفا- كيتول 2-ketol الذي يتم هدمه بواسطة transketolase في مسلك فوسفيت السكر الخماسي ويساعد في نقل مجموعة كربون ثنائية من الكيتون إلى كربون الديهايد للسكر الالدوزي، نقص الثيامين يخفض نشاط transketolase ويخفض ايض فوسفيت السكريات الخماسية مثل ribulose-5-phosphate من خلال مسلك الفوسفيت للسكر الخماسي بسبب تجمع السكريات الخماسية في كريات الدم الحمراء والأنسجة، يساعد TPP في ايض الكربوهيدرات لانه يساعد على إنتاج الطاقة من الكلوكوز في الدماغ والأعصاب من أكسدة الكلوكوز، الجزء الوظيفي في TPP هو حلقة الثيازول الحاوية كبريت حيث إن ذرة الهيدروجين في ذرة الكربون الثانية يتم استبدالها في الوسط السائل مما تساهم في التفاعل وذلك لأن ذرة الهيدروجين تتفكك بسهوله بشكل بروتون مكونه كاربانيون carbanion الذي يساهم في نزع مجموعة

الكربوكسيل ويعمل كناقل للاسيتالديهايد الفعال أو كلايكوالديهايد الفعال حيث ترتبط مجموعة الالديهايد إلى حلقة الثيازول.

آلية التفاعلات الذي لها علاقة بالمرافق الإنزيمي TPP

أ. **تحويل البيروفيت إلى اسيتالديهايد:** بعض الخمائر تحتوي pyruvate decarboxylase الذي يحول حامض البيروفيك إلى اسيتالديهايد وثاني اوكسيد الكربون حيث يستفاد الإنزيم من TPP كمرافق إنزيمي وأيون المغنيسيوم.

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH \xrightarrow{\text{pyruvate decarboxylase}} CH_3CHO + CO_2$$

ب. **أكسدة حامض البيروفيك إلى خلات نشطة:** يتم تحويل حامض البيروفيك إلى خلات نشطة بواسطة معقد إنزيمي متعدد Multiple enzyme complex الذي يسمى Pyruvic dehydrogenase حيث يتم نزع مجموعة الكربوكسيل التاكسدية من نوع ألفا الذي يحدث في المايتوكوندريا بعد تكوين حامض البيروفيك في السايتوسول خلال الخلال السكر والتفاعل يتضمن ست عوامل مرافقة هي CoA NAD, lipoic acid , FAD ,Mg^{+2}, TPP

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + CoASH + NAD^+ \longrightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + NADH + H^+$$

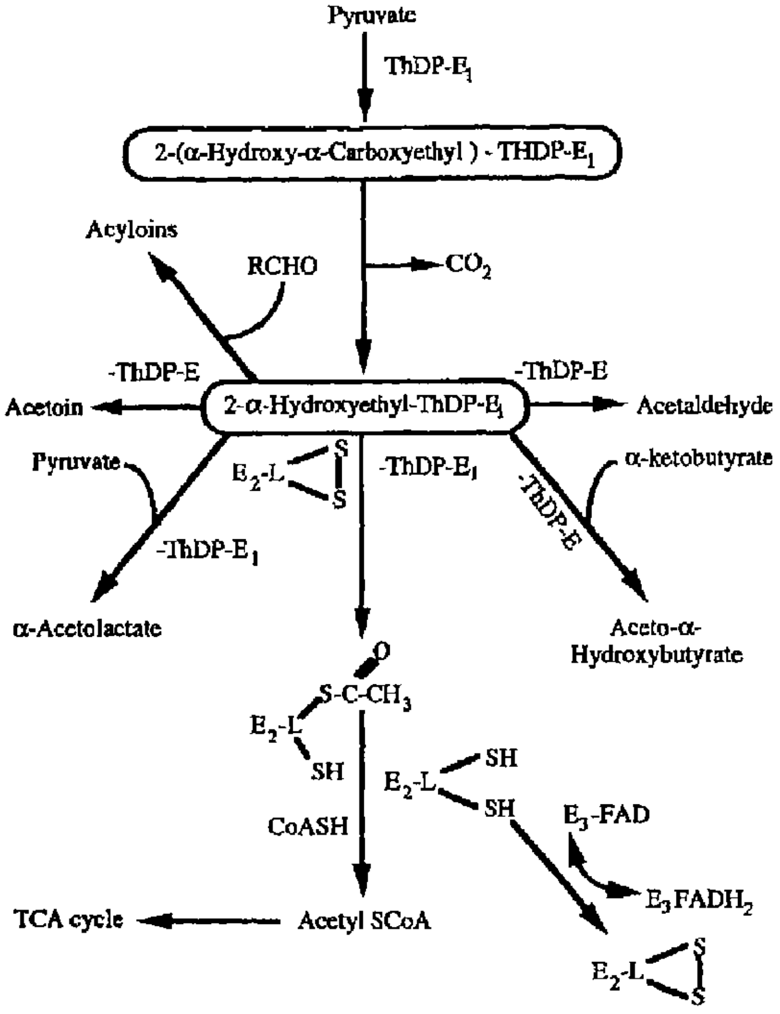
يحدث التفاعل أعلاه بوجود حامض الليبويك و TPP و FAD، وأيون المغنيسيوم حيث تعمل كعوامل مرافقة تحفيزية بالإضافة إلى CoA, NAD الذي تعمل كعوامل مرافقة وتتم عملية تحويل البيروفيت إلى خلات نشطة في أربع مراحل (الشكل- 8) هي:

1. يتم نزع مجموعة كربوكسيل من حامض البيروفيك بعدما يرتبط مع TPP بوجود pyruvate dehydrogenase A الكربون بين النتروجين والكبريت في حلقة الثيازول ذات الحامضية العالية، يحصل تأين الثيامين بيروفوسفيت لتكوين carbanion الذي تضاف إليه بسرعة مجموعة كربوكسيل من البيروفيت، حيث تعمل ذرة النتروجين للحلقة ذات الشحنه الموجبة في الثيامين بيروفوسفيت كمستهلكه للإلكترون لتثبيت تكوين الشحنه السالبة الذي تكون ضرورية لنزع مجموعة الكربوكسيل ثم إضافة بروتون لتكوين hydroxy ethyl TPP.

2. تتم أكسدة مجموعة الهيدروكسيل اثيل المرتبطة مع TPP لتكوين مجموعة الخلات الذي يتم نقلها إلى lipoamide المؤكسد حيث تتحول مجموعة ثنائي الكبريتيد في lipoamide إلى مجموعة سلفاهيدريل وهذا التفاعل يحفز بواسطة E_2dihydrolipoyl transacetylase وهو جزء من معقد الإنزيم المتعدد لينتج acetyl lipoamide.

3. يتم نقل مجموعة الخلات من acetyl lipoamide إلى CoA لتكوين الخلات النشطة وهذا التفاعل يحفز بواسطة dihydrolipoyl transacetylase أو ما يسمى E_2 واصرة الثايواستر الغنية بالطاقة تحفظ بشكل مجموعة خلات ليتم نقلها إلى CoA.

4. الشكل المؤكسد من lipoamide يتولد لاكتمال التفاعل و NAD^+ هو العامل المؤكسد في هذا التفاعل الذي يحفز بواسطة إنزيم E_3 أو ما يسمى dihydrolipoyl dehydrogenase.



الشكل (8) أكسدة البيروفيت إلى الخلات النشطة

$$\text{Dihydrolipoamide} + NAD^+ \longrightarrow \text{lipoamide} + NADH + H^+$$

الـــذي هو جزء من معقد الإنزيم المتعدد و FAD هي المجموعة الترقيعية لهذا الإنزيم.

ج. نقـل الالديهايـد الفعـال: يحتـوي transketolase علـى TPP المـرتبط بقـوة معـه كمجموعة رابطة حيث يتم نقل مجموعـة الالديهايـد النشـطة إلى القابـل الـذي هـو سـكر الديهايـــدي في transketolase بينمـــا في pyruvate dehydrogenase هـــو lipoamide، فأن موقع الإضافة في الإنزيم للمادة الأساس الكيتونية هو حلقة الثيازول من المجموعة الرابطة حيث تكون ذرة الكربون الثانية من حلقـة الثيـازول ذات حامضـية عاليـة مما تتبـاين بسـرعة لتعطي carbanion الـذي يضـاف إلى مجموعـة الكربونيـــل

للمـــــادة الأســـــاس الكيتونيـــــة الـــــذي هـــــي sedoheptulose-7-phosphate، xylulose-5-phosphate، fructose-6-phosphate, ويفقد المركب addition compound مجموعة R-CH-OH لينتج مركب ذو شحنة سالبه هو كلايكوالديهايد فعال ويعمل النتروجين ذو الشحنة الموجبة في حلقة الثيازول المستهلك للالكترون لتحفيز تكون شحنة سالبة على المركب الوسطي الفعال، مجموعة الكربونيل للقابل الالديهايدي المناسب تتكثف مع وحدة كلايكو الديهايدية فعاله لتكوين سكر كيتوني جديد يتحرر من الإنزيم.

د. تحويل ألفا – كيتوكلوتاريت إلى سكسنيل نشط: تطرأ على الحامض ألفا- كيتوكلوتاريت نزع مجموعة كربوكسيل تأكسدية لتكوين سكسنيل نشط بوجود 2-ketoglutarate dehydrogenase وهو إنزيم معقد يحتاج إلى عوامل مرافقة مثل TPP Lipoate NAD^+, FAD, CoA,ويعتبر السكسنيل النشط عبارة عن ثايواستر ذو طاقة عالية.

$$\text{2-ketoglutarate} + NAD + CoASH + TPP \longrightarrow \text{succinyl-CoA} + CO_2 + NADH + H^+$$

ه. تحويل السكر الكيتوني إلى خلات الفوسفيت وكلسيرالديهايد فوسفيت: يساهم phosphoketolase في ايض السكريات الخماسية في بعض البكتريا مثل:

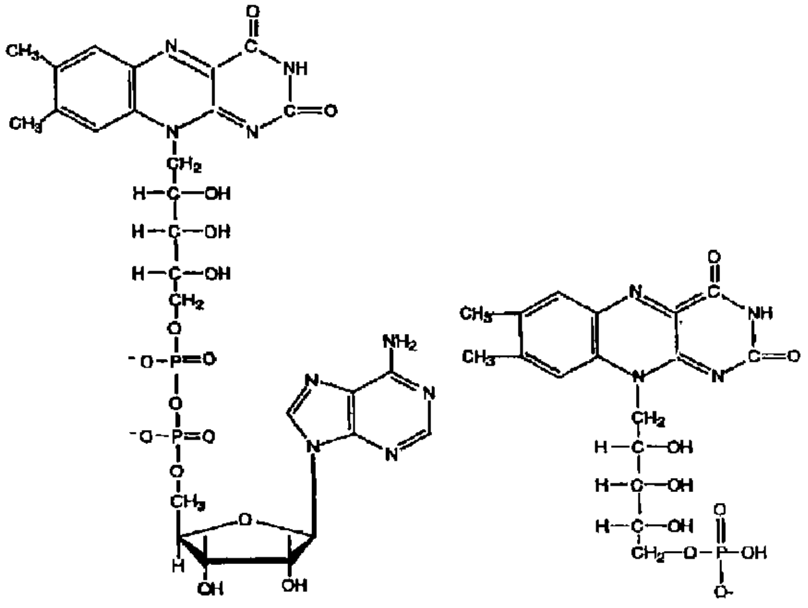
$$\text{D-xylulose-5-phosphate} + Pi \longrightarrow \text{acetyl phosphate} + \text{glyceradehyde phosphate}$$

يساعد الإنزيم في نقل مجموعة الكيتول (هيدروكسي مثيل) من الجزيئة الواهبة إلى الالديهايد القابل ويحفز transketolase نقل مجموعة الكيتول من X-5-P الى ribose-5-phosphate لتكـــــــــوين sedoheptulose-7-phosphate وكلسيرالديهايد-3- فوسفيت ووظيفة TPP بأن له القدرة على تكوين carbanion

بواسطة تفكك البروتون من ذرة الكربون الثانية من حلقة الثيازول حيث يستطيع الكاربانيون المتكون من التفاعل مع واهب الكيتول لتكوين منتوج إضافي الذي يعاد ترتيب الالكترونات له مما يتفكك بطريقة ما لتكوين مركب الديهايدي الذي يترك مجموعة الكيتول علىTPP لتكوين، dihydroxyethyl-TPP الناتج الإضافي، يتفاعل TPP-ketol مع الالديهايد القابل لتكوين ناتج كيتولي واهب مع توليد كاربانيون ويمكن توضيح العديد من السكريات الكيتونية الواهبة للكيتول والالديهايدات القابلة الذي هي سكريات الديهايدية والذي تعمل كجزيئات واهبة وقابله للإنزيم، Transketolase حيث يكون الواهب الكيتولي هي السكريات الكيتونية D- D-xylulose-5-phosphate fructose-6-phosphate, D-sedoheptulose-7-phosphate بينما يكون الالديهايد القابل هي السكريات الالديهايدية مثل D- D-ribose-5-phosphate glyceraldehyde-3-phosphate , D-erythrose-4-phosphate.

$$R_1CHOHCOCH_2OH + R_2\text{-}CHO$$
$$\downarrow$$
$$R_1CHO + R_2CHOHCOCH_2OH$$

ثانيا: المرافقات الإنزيمية FAD, FMN: يتحول فيتامين الرايبوفلافين B_2 في الجسم إلى شكلين فعالين هما فلافين أحادى نيوكلوتيد flavin mononucleotide الذي مختصرة هو FMN والفلافين أدنين ثنائي نيوكلوتيد flavin adenine dinucleotide الذي مختصره هو FAD (الشكل-9) وتساهم المرافقات الإنزيمية الفلافينية مع عدد من الإنزيمات التي تقوم بنقل الإلكترونات وتكوين ATP وأكسدة الأحماض الدهنية وتخليق البيريميدينات والفسفرة التاكسدية والعديد من تفاعلات الأكسدة والاختزال ومن الصعب جدا تحديد كل أنواع الإنزيمات التي تساهم فيها FMN و FAD الذي تتقبل أيون هيدريد من NADH مع بروتون من البيئة أو زوج من ذرات الهيدروجين من أنواع مختلفة من المركبات العضوية الوسطية لعمليات الهدم والبناء مثل الأحماض الأمينية وثايواسترات الأحماض الدهنية والبيريميدينات والالديهايدات والأحماض الهيدروكسيلية وحامض السكسنيك.



FAD FMN

الشكل (9) الفلافين احادي النيوكلوتيد FMN والفلافين ادينين ثنائي النيوكلوتيد FAD

عدة أنواع من تلك التفاعلات تتضمن إزالة ذرتين من الهيدروجين من ذرتي كربون متجاورة لتكوين اصرة مزدوجة، في العديد من الأحياء المجهرية وهناك نوعين من dehydrogenases وكلاهما بروتينات فلافينية الذي تساهم في تفاعلات نزع مجموعة الأمين التاكسدية إلا أنها تعتبر جزء من الأحماض الأمينية للعمليات الهدمية أحدهما متخصص للأحماض الأمينية من النوع اليساري L-amino acids يسمى L-amino acid oxidase.

$$L\text{-}R\text{-}CH(NH_2)COOH + H_2O + E\text{-}FMN \downarrow RCOCOOH + NH_3 + E\text{-}FMNH_2$$

هذا الإنزيم يحتوي FMN كمجموعه رابطة وهو يوجد في الشبكة الاندوبلازمية في الكبد وهو ذو فعالية ضعيفة ولا يلعب دوراً مهماً في نزع مجموعة الأمين من الأحماض الأمينية في معظم الحيوانات ماعدا اللايسين ويعمل D-amino acid oxidase على تحفز التفاعل التالي:

$$D\text{-}RCH(NH_2)COOH + H_2 + E\text{-}FAD$$

$$\downarrow$$

$$RCOCOOH + NH_3 + E\text{-}FADH_2$$

يحتوي D-amino acid oxidase علىFAD كمجموعة رابطة الذي يقع في في الخلايا الكبدية حيث تقوم بأكسدة الأحماض الأمينية اليمينية المشتقة من الجدران الخلوية للبكتريا، النيوكلوتيدات الفلافينية المختزلة للإنزيمات لها القدرة أن تتفاعل مع الأوكسجين الجزيئي لتكوين بيروكسيد الهيدروجين.

$$E\text{-}FMNH_2 + O_2 \longrightarrow FMN + H_2O_2$$

$$E\text{-}FADH_2 + O_2 \longrightarrow FAD + H_2O_2$$

ويتم تحلل البيروكسيد إلى ماء وأوكسجين بواسطةCatalase.

$$H_2O_2 \longrightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$$

يساعد D-amino acid oxidase على أكسدة الحامض الأميني اللايسين الى الحامض الكيتوني من نوع ألفا المقابل وهذه الإنزيمات تنزع مجموعة الأمين بشكل امونيا بعد نزع الهيدروجين من الحامض الأميني بواسطة الإنزيمات الفلافوبروتينية المسماة amino acid oxidases الذي عندما تنزع هيدروجين من الحامض الأميني لتكوين حامض اميني والذي يؤدي ذلك الى اختزال المجموعة الرابطة للإنزيم الذيFAD, FMN وعندما يتفاعل الحامض الاميني مع الماء تلقائيا يكون حامض كيتوني من نوع ألفا وامونيا بينما الفلافين المختزل تعاد أكسدته مع الأوكسجين جزيئي لانتاج بيروكسيد الهيدروجين وهذه العملية تحدث في المايتوكوندريا والميكروسومات الذي يحمل FAD كمجموعة رابطة ويحصل تكوين S-CoA– acyl بوجود acyl-CoA synthetase وهناك ثلاث أنواع من إنزيمات synthetases في الخلايا جميعها تملك FAD كمجموعة رابطة، الأول متخصص لذرات كربون من 4 إلى 6 من acyl-CoA والثاني من 6 إلى 14 والثالث من 6 إلى 18 ذرة كربون لا يتاكسد $FADH_2$ مباشرة بواسطة الأوكسجين بل يتأكسد، Dihydroorotic

acid dehydrogenase يحفز تكوين حامض الاوروتيك عند تخليق البيريميدين بواسطة نزع ذرتي هيدروجين من ذرتي كربون متجاورتين لتكوين اصرة مزدوجة بين ذرتي الكربون، حيث تعاد أكسدة الشكل المختزل للفلافين بواسطة dehydrogenase الذي يعتمد على NAD^+.

succinic dehydrogenase الذي يحتوي FAD كمجموعة رابطة يحفز نزع ذرتي هيدروجين من ذرتي كربون متجاورتين من حامض السكسنيك لتكوين حامض الفيوماريك، القابل الوسطي (العامل المؤكسد) للإلكترونات هو FAD المرتبط مع الإنزيم تلقائيا وبعض المرافقات الفلافينية مثل mono oxygenases لها القدرة أن ترتبط مع الأوكسجين الجزيئي بطريقة بحيث يتم اختزال الأوكسجين الجزيئي إلى ماء بدلا من بيركسيد الهيدروجين، حيث تمنح ذرة الأوكسجين للمادة الأساس مما تضيف لها مجموعة هيدروكسيل بينما ذرة الأوكسجين الأخرى تحرر ماء.

$$RH + O_2 + FADH_2 \longrightarrow ROH + H_2O + FAD$$

تحدث أكسدة الأحماض الدهنية في داخل المايتوكوندريا حيث يحصل نزع ذرتي هيدروجين من ذرات الكربون ألفا وبيتا أي الثانية والثالثة من fatty acyl-CoA بعد تنشيط الحامض الدهني بوجود fatty acid acyl dehydrogenase، كأنزيم متخصص لمدى معين من أطوال الأحماض الدهنية ويرتبط بالإنزيم FAD بقوة مكونا مجموعة رابطة معه الذي يتم اختزالها،الشكل المختزل من الإنزيم لا يتفاعل مع الأوكسجين بشكل مباشر الذي يمنح إلكتروناته إلى السلسلة التنفسية عن طريق بروتين فلافيني ناقل للإلكترون مما يختزل بعض حاملات الإلكترونات في السلسلة التنفسية.

$R\text{-}CH_2CH_2CO\text{-}S\text{-}CoA$

Fatty acid acyl

$$\downarrow \; E\text{-}FAD \rightarrow E\text{-}FADH_2 \quad \text{(Acyl dehydrogenase)}$$

$R\text{-}CH{=}CH\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA$

Trans-2,3-enoyl –CoA

في الخطوة الثالثة من نزع مجموعة الكربوكسيل التاكسدية للبيروفيت إلى خلات نشطة يتم نقل مجموعة الخلات إنزيميا من مجموعة lipoyl في dihydrolipoyl transacetylase إلى مجموعة الثايول في المرافق الإنزيمي A لتكوين الخلات النشطة مما تترك الإنزيم بشكل حر، مجموعة الثايول الحرة للإنزيم تعاد أكسدتها إلى ثنائي الكبريتيد بواسطة الإنزيم الثالث dihydrolipoyl dehydrogenase (E_3-FAD) الذي فيه مجموعة FAD مختزلة الذي تعمل لتقابل الهيدروجين، حيث يصبح $FADH_2$ مرتبط مع الإنزيم E_3-$FADH_2$ في الخطوة الأخيرة تعاد أكسدة $FADH_2$ إلى FAD بواسطة NAD وكل خطوة تتضمن إضافة إلكترون منفرد إذا حصل إضافة إلكترون واحد مع بروتونه في نفس الوقت يتكون مركب شبه فعال هو شبيه الكوينون semiquinoneويملك semiquinone تركيب ذو إلكترون غير مزدوج الذي يشارك مع إلكترونات غير مزدوجة غالبا ما يكون في المعادن، xanthine dehydrogenase يحتوي FAD كمجموعة رابطة وظيفته يعمل كإنزيم dehydrogenase في الكبد ويتم تكوين حامض الاوروتيك من أكسدة dihydroorotic acid بواسطة dihydroorotic dehydrogenase الذي يحمل FMN,FAD في مجموعته الرابطة، aerobic dehydrogenases أو ما تعرف بالأكسدة الذاتية الذي تملك FMN أو FAD في مجموعته الرابطة بقوة، حيث يكون المرافق الإنزيمي جزء من الإنزيم حيث يختزل بواسطة استلام الإلكترونات والبروتونات من المادة الأساس مما يسبب مكافئات الاختزال إلى الأوكسجين الجزيئي لتكوين بيروكسيد

الهيدروجين كنـاتج للتفاعـل، $FADH_2$ المتكونـة خلال انحلال السكر وأكسدة الأحماض الدهنية ودورة حامض الستريك هي جزيئه ذات طاقة عالية لأنها تملك زوج من الإلكترونات الذي يملك جهد نقل عالي، فعند انتقال الإلكترونات إلى جزيئة أوكسجين فأنها تؤدي إلى تحرير كمية كبيرة من الطاقة، وخلال عملية الفسفرة التاكسدية يحصل تكوين ATP نتيجة نقل الإلكترونات من $FADH_2$ إلى الأوكسجين الجزيئي بواسطة سلسلة من ناقلات الإلكترون والفسفرة التاكسدية تحدث بواسطة أنظمة تنفسية تقع في الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا ويتم تجهيز معظم $FADH_2$ من دورة حامض الستريك وأكسدة الأحماض الدهنية وعند أكسدة $FADH_2$ تنتج جزيئتين من ATP ويتم نقل الإلكترونات خلال السلسلة التنفسية بواسطة حاملات أو ناقلات الإلكترون خطوة خطوة من $FADH_2$ إلى الأوكسجين مما يؤدي ذلك إلى إبعاد البروتونات خارج المايتوكوندريا، ففي الفسفرة التاكسدية يتم تحويل جهد نقل الإلكترون في $FADH_2$ إلى جهد نقل الفوسفيت في ATP، يلاحظ مما سبق أن بعض الإنزيمات الفلافينية الحاوية FMN كمجموعة رابطة هي NADH-dehydrogenase في القلب و L-amino acid oxidase في الكلى و NADPH-Cyt C reductase في الخمائر بينما الإنزيمات التي تملك FAD كمجموعة رابطة هي succinic dehydrogenase في القلب و choline dehydrogenase في الكبد و D-amino acid oxidase في الكلى والكبد و acyl-CoA dehydrogenase في الكبد والقلب و glucose oxidase في الفطريات، بعض الإنزيمات الحاوية على FMN, FAD في مجموعتها الرابطة هي sulfate reductase، تلك المرافقات الإنزيمية ترتبط مع apoenzyme بواسطة اصرة تساهمية وهي تعمل مع الإنزيمات على أكسدة المواد الأساس بواسطة تحفيز نزع مجموعة الهيدروجين من المادة الأساس خلال نشاطها التحفيزي، فإن وظيفة المرافقات الإنزيمية كقابلة للهيدروجين من المادة الأساس أو كواهبة هيدروجين إلى المادة الأساس.

ثالثا: المرافقات الإنزيمية NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH: يشتق من النيكوتين امايد المرافقات الإنزيمية التالية:

1-Nicotinamide adenine dinucleotide ومختصرة للشكل المؤكسد NAD^+ والمختزل هو NADH.

2-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ومختصرة للشكل المؤكسد هو $NADP^+$ والمختزل هو NADPH ويساهم NAD^+ في تفاعلات أكسدة الكحول، DNA-ligase ,glycerophosphate dehydrogenase NAD-dehydrogenase glutamate –pyruvate dehydrogenase pyruvate dehydrogenase , α-keto glutarate dehydrogenase الذي تعمل في نقل أيون الهيدريد، الأكسدة والاختزال، اعادة الأكسدة بواسطة الأوكسجين، Q، سلسلة نقل الالكترون، انحلال السكر واكسدة الاحماض الدهنية، وعند أكسدة الايثانول في الكبد بواسطة alcohol dehydrogenase في السايتوسول الذي يستخدم NAD^+ كقابل يتحول إلى اسيتالديهايد الذي يتأكسد إلى خلات بواسطة إنزيم مايتوكونديري هو aldehyde dehydrogenase المرتبط مع NAD، أما $FADH_2$ المتكون من تفاعلات الأكسدة السابقة تهب مكافئاتها الاختزالية إلى السلسلة التنفسية المايتوكوندرية.

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \longrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$$

$$CH_3CHO + NAD^+ + H_2O \longrightarrow CH_3COOH + NADH + H+$$

معظم الأزواج الإلكترونية التي تدخل السلسلة التنفسية ناتجة عن عمل dehydrogenase الذي تستعمل المرافقات الإنزيمية NAD^+,$NADP^+$ كقابلات الكترونية الذي يطلق عليها الإنزيمات النازعة للهيدروجين المرتبطة المرافق NAD^+ ,$NADP^+$ وجميعها تحفز التفاعلات العكسية ومعظم تلك الإنزيمات المتخصصة للمرافق الإنزيمي NAD^+ وقليل منها متخصص للمرافق الإنزيمي $NADP^+$ كقابلة للإلكترون مثل glutamate dehydrogenase الذي يتفاعل مع إما NAD^+ أو $NADP^+$ وبعضها يقع في السايتوسول والبعض الأخر في المايتوكوندريا ومن أهم الإنزيمات النازعة للهيدروجين المرتبطة مع NAD^+ المهمة في العمليات الايضية للكربوهيدرات هي glyceraldehyde phosphate dehydrogenase lactate dehydrogenase في السايتوسول وإنزيم pyruvate dehydrogenase في

المايتوكوندريا، ثلاث إنزيمات نازعة للهيدروجين مرتبطة مع NAD^+ وتساهم في دورة حامض الستريك في المايتوكوندريا هي isocitrate dehydrogenase

α-ketoglutaratedehydrogenase, malate dehydrogenase
ومن الإنزيمات الأخرى في المايتوكوندريا هي 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase في دورة أكسدة الأحماض الدهنية و Glu-dehydrogenase , β-hydroxybutyrate dehydrogenase الذي تساهم في هدم الأحماض الدهنية.

بعض التفاعلات المحفزة بواسطة NAD(P)-dehydrogenase

NAD-linked dehydrogenase

Isocitrate + NAD^+ ⟷ α-ketoglutarate + CO_2 + NADH+ H^+

A-ketoglutarate+CoA+NAD^+⟷succinyl-CoA +CO_2+NADH+H^+

L-malate + NAD^+ ⟷ oxaloacetate + NADH + H^+

Pyruvate + CoA+ NAD^+ ⟷ acetyl-CoA +CO_2+NADH+H^+

Glyceraldehyde–3-phosphate+Pi+NAD^+

↕

1,3-diphosphoglycerate +NADH + H^+

lactate + NAD^+ ⟷ pyruvate + NADH + H^+

NADP-linked dehydrogenase

Isocitrate + $NADP^+$ ⟷ α-ketoglutarate+CO_2+NADPH+H^+

Glucose-6-phosphate+ $NADP^+$

↕

6-phosphogluconate + NADPH + H^+

NAD / NADP –linked dehydrogenase

L-glutamate + H_2O +NAD^+/$NADP^+$

↕

α-ketoglutarate +NH_3 + NADH

تلك الإنزيمات تساعد في نزع ذرتي هيدروجين من المواد الأساس، أحدهما تنقل كأيون هيدريد H^- إلى NAD^+ أو $NADP^+$ والأخرى تظهر بشكل أيون هيدروجين في الوسط ,كل أيون هيدريد يحمل اثنان من المكافئات المختزلة، أحدهما بنتقل بشكل ذرة هيدروجين إلى الكربون الرابعة في حلقة النيكوتين امايد والأخرى بشكل إلكترون إلى نتروجين الحلقة، معظم الإنزيمات النازعة للهيدروجين في الخلايا تنقل ذرات هيدروجين من المواد الأساس إلى NAD^+ وهذا المرافق الإنزيمي يجمع أزواج المكافئات المختزلة من المواد الأساس المختلفة في شكل جزيئي واحد هو NADH كما أن NAD^+ يستطيع أيضا جمع المكافئات المختزلة من المواد الأساس الذي يعمل عليها dehydrogenase المرتبطة مع $NADP^+$ وهذا ممكن أن يحدث بواسطة pyruvate nucleotide transhydrogenase وهو إنزيم معقد يحفز التفاعل التالي:

$$NADPH + NAD^+ \longleftrightarrow NADP^+ + NADH$$

يمكن نقل زوج من المكافئات المختزلة من NADH إلى -NADH dehydrogenase الذي يقع في الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا حيث يحصل ارتباط قوي للمجموعة الرابطة للإنزيم مما يعطي الشكل المختزل وهذه المجموعة الرابطة هي FMN الذي تحتوي جزيئه من فيتامين B_2 أو الرايبوفلافين، يعتبر -NADH dehydrogenase أحد أفراد dehydrogenase المرتبطة بالفلافين أو البروتينات الفلافينية، نقل مجموعتين مكافئتين مختزلتين من NADH إلى -NADH dehydrogenase.

$$NADH + H^+ + E\text{-}FMN \longleftrightarrow NAD^+ + E{=}FMNH_2$$

في الخطوة الثالثة من أكسدة الأحماض الدهنية، فأنه يتم نزع هيدروجين من -L-3 hydroxyacyl-CoA بوجود 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase الذي يحتاج NAD^+ لتكوين 3-ketoacyl-CoA حيث أن NAD^+ قابل للإلكترون ومتخصص.

$$L\text{-}3\text{-hydroxyacyl-S-CoA} + NAD^+ \updownarrow 3\text{-keto acyl -SCoA} + NADH + H^+$$

يكون الإنزيم ذو تخصص مطلق للمتناظرات من نوع L وان NADH المتكون في التفاعل السابق يهب مكافئاته المختزلة لإنزيم NADH-dehydrogenase للسلسلة التنفسية، الكلوتاميت يعاني من نزع مجموعة الأمين التاكسدية بواسطة L-glutamate dehydrogenase الذي يحتاج إلى NAD^+ كقابل للمكافئات الاختزالية

$$L\text{-glutamate} + NAD^+ + H_2O \longleftrightarrow \alpha\text{-ketoglutarate} + NH_3 + NAD$$

وهو الإنزيم المسؤول عن معظم الامونيا المتكونة في الأنسجة الحيوانية، وتحتوي السلسلة التنفسية للمايتوكوندريا عدد كبير من البروتينات الناقلة للإلكترونات الذي تعمل بشكل متسلسل لنقل الإلكترونات من المادة الأساس إلى الأوكسجين الذي يوضح السلسلة التنفسية لسبع من حاملات الإلكترونات وهناك 15 أو اكثر من مجموعة كيماوية في سلسلة نقل الإلكترون الذي تقبل وتنقل المكافئات الاختزالية بشكل متسلسل، وفي المرحلة الثانية من انحلال السكر (الشكل -10) تتم أكسدة كلسيرالديهايد -3- فوسفيت إلى 3- فوسفوكلسيريل فوسفيت بوجود glyceraldehyde phosphate dehydrogenase الذي يحتاج إلى NAD لتحفيز التفاعل العكسي.

D-glyceraldehyde-3-phosphate + NAD^++Pi

↕

3-phosphoglycerol- phosphate + NADH + H^+

حيث يكون قابل الهيدروجين في تفاعل G-3-Pdehydrogenase هو المرافق الإنزيمي NAD^+.

$$SH_2 + NAD_+ \longleftrightarrow S + NADH + H^+$$

واختزال NAD^+ يسير بواسطة النقل الإنزيمي لأيون الهيدريد: H^- من مجموعة الالديهايد في كلسيرالديهايد-3- فوسفيت إلى الموقع الرابع من حلقة النيكوتين امايد من NAD^+ مما يؤدي ذلك إلى اختزاله في مواقع الحلقة الأول والرابع لانتاج المرافق الإنزيمي المختزل NADH بينما تظهر ذرة الهيدروجين الأخرى من المادة الأساس في الوسط بشكل أيون الهيدروجين هذا السبب فإن الاختزال الإنزيمي للمرافق الإنزيمي NAD^+ يتضمن تكوين أيون الهيدروجين.

$$\text{substrate} + NAD^+ \longleftrightarrow \text{oxidized substrate} + NADH + H^+$$

في الأنسجة الحيوانية وتحت الظروف الهوائية، فإن يحصل تكوين البيروفيت و NADH من أكسدة الكلسيرالديهايد -3- فوسفيت الذي تعاد أكسدته إلى NAD^+ بواسطة الأوكسجين بينما

D-glyceraldehyde-3-phosphate

NADH+H^+ ↕ NAD_+

3-phosphoglyceroyl phosphate

ADP ↕ ATP

3-phosphoglycerate

$\updownarrow$

2-phosphoglycerate

$\updownarrow$

phosphoenol pyruvate

$\updownarrow$

Pyruvate

$NAD^+ \updownarrow NADH$

Lactate

الشكل(10) المرحلة الثانية من انحلال السكر

تحت الظروف اللاهوائية، فإن NADH المتكونة بواسطة انحلال السكر لا يمكن إعادة أكسدته بواسطة الأوكسجين، بل تعاد أكسدته إلى NAD^+ بواسطة البيروفيت محولة البيروفيت إلى لاكتيت ففي هذه الحالة، فإن الإلكترونات المتكونة من أكسدة G-3-P يتم وهبها إلى NAD^+ والذي يتم حملها بشكل NADH إلى البيروفيت، حيث يحفز اختزال البيروفيت بواسطة إنزيم lactate dehydrogenase الذي يكون L-lactate.

$$Pyruvate + NADH + H^+ \longleftrightarrow L\text{-lactate} + NAD^+$$

أو يتم أكسدة البيروفيت إلى acetyl-CoA وثاني اوكسيد الكربون عن طريق نزع ذرتي هيدروجين بوجود pyruvate dehydrogenase الذي يقع في خلايا eukaryotic في المايتوكوندريا أو في خلايا prokaryotes السايتوبلازم.

$$Pyruvate + NAD^+ + CoASH \longleftrightarrow acetyl\text{-}CoA + NADH + CO_2$$

ويعمل NADH على تنظيم pyruvatedehydrogenase complex و citrate synthetase في دورة حامض الستريك لتكوين acetyl-CoA والسترات على التوالي، عندما تكون نسبة NAD^+ /NADH عالية لأن زيادة مستوى NADH كمثبط أيضا لإنزيم citrate synthetase وتحدث أكسدة الستريت إلى ألفا- كيتوكلوتاريت وثاني اوكسيد الكربون بواسطة نوعين مختلفين من isocitrate dehydrogenases المرتبطة مع NAD^+، ومن ناحية أخرى، فإن NADH و NADPH تعتبر محورات مثبطة لنشاط إنزيم isocitrate dehydrogenase وهناك عدد من monooxygenases الذي تحفز التفاعلات الذي فيها واحد فقط من ذرات الأوكسجين الذي يتم دمجها إلى المادة الأساس العضوية والأخرى تختزل إلى H_2O بوجود NADHأو NADPHويعتبر المرافق الإنزيمي $NADP^+$ القابل الإلكتروني الطبيعي في الكلوروبلاست.

$$2H_2O + 2NADP^+ \longleftrightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

حيث تسري الإلكترونات من الماء إلى $NADP^+$بينما في المايتوكوندريا، فإن الإلكترونات تسري في الاتجاه المعاكس من NADH أو NADPH إلى الأوكسجين، اختزال D-ribose في RNA إلى 2-deoxy-d-ribose يحتاج زوج من ذرات الهيدروجين الذي تهب بواسطة nADPH عن طريق بروتين ناقل للهيدروجين هو thioredoxin وهو بروتين يملك زوج من مجاميع السلفاهيدريل الذي تحمل ذرات الهيدروجين من NADPH إلى RNA، فالشكل المؤكسد من thioredoxin يختزل بواسطة NADPH في تفاعل يحفز بواسطة إنزيم thioredoxin reductase.

الشكل المختزل من thioredoxin يختزل nucleotide diphosphates (NDPs) إلى deoxy ribonucleotide diphosphates(dNDPs) في تفاعل يحفز بواسطة إنزيم ribonucleotide reductase فالتفاعل الأول من مسلك فوسفيت السكر الخماسي هو نزع ذرتي هيدروجين إنزيميا من كلوكوز -6- فوسفيت بواسطة glucose-6-phosphate dehydrogenase لتكوين 6- فوسفوكلوكونيت ويحتاج الإنزيم إلى $NADP^+$ كمرافق إنزيمي الذي يعمل كقابل للالكترون

عن طريق تكوين 6- فوسفو- كلوكونو- سكما-لاكتون كمركب وسطي ثم نزع ذرتي هيدروجين ونزع مجموعة الكربوكسيل من المركب 6- فوسفوكلوكونيت لتكوين سكر كيتوني خماسي ذرات الكربون هو D-ribulose-5-phosphate مما يؤدي التفاعل لتوليد NADPH (الشكل-11)، المرحلة النهائية من تخليق الكولسترول تبدأ بتكوين جسر حلقي من السكوالين الذي تحتاج إلى أوكسجين جزيئي لتكوين saqualene epoxideوهو مركب وسطي فعال يستخدم الأوكسجين و NADPH ومن ثم تحويله إلى lactosterol بواسطة cyclase وأخيرا تكوين كولسترول بواسطة نزع مجاميع مثيل واختزال الاصرة المزدوجة بواسطة NADPH، يتم اختزال اوكزالوالخلات إلى ماليت بواسطة NADH بوجود malate dehydrogenase في السايتوسول.

$$\text{oxaloacetate} + NADH + H^+ \longrightarrow \text{malate} + NAD^+$$

ثم نزع مجموعة الكربوكسيل التاكسدية بواسطة إنزيم الماليت النازع للهيدروجين المرتبط مع $NADP^+$.

$$\text{Malate} + NADP^+ \longrightarrow \text{pyruvate} + CO_2 + NADPH$$

$$\text{Glucose-6-phosphate} + 2NADP^+ + H_2O$$

$$\updownarrow$$

$$\text{D-ribose-5-phosphate} + CO_2 + 2NADPH + H^+$$

Glucose-6-phosphate

$NADP^+ \rightarrow NADPH + H^+$ | Glucose-6-phosphate dehydrogenase

$\downarrow$

6-phosphoglucose-δ-lactone

H_2O ↓ Lactonase → H^+

6-phosphogluconate

↓ $NADP^+$ → $NADPH + H^+ + CO_2$ **dehydrogenase**

D-ribulose-5-phosphate

↓

D-ribose-5-phosphate

الشكل(11) مسلك فوسفيت السكر الخماسي

يتم تكوين NADPH من كل acetyl-CoA يتم نقلها من المايتوكوندريا إلى السايتوسول لذلك تتكون 8 جزيئات من NADPH عندما يتم نقلها من الخلات النشطة الى السايتوسول لتخليق البالميت، ويحتاج التفاعل الى 6 جزيئات إضافية من NADPH مصدرها هو مسلك فوسفيت السكر الخماسي وعندما NAD^+ و $NADP^+$ تتحلل مائيا بواسطة pyrophosphorylase تعطي نياسين رايبونيوكلوتيد كالآتي:

$NAD^+ + H_2O$ ⟶ niacin ribonucleotide + AMP

$NADP^+ + H_2O$ ⟶ niacin ribonucleotide + ATP

كما يمكن تحلل NAD^+ بواسطة NADase إلى نيكوتين امايد حر الذي يفقد مجموعة الامايد بواسطة تحلل مائي آخر مع نيكوتين امايد لتكوين نياسين.

$NAD^+ + H_2O$ ⟶ niacinamide + ATP-ribose

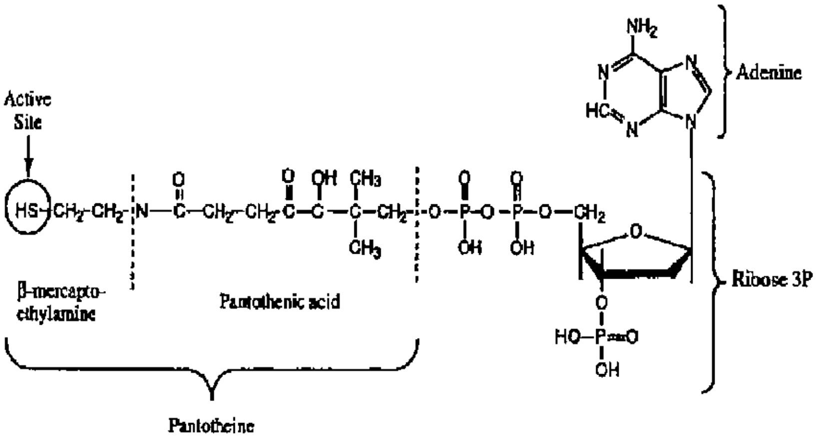
Nicotinamide + H_2O ⟶ niacin + NH_2

الإنزيمات النازعة للهيدروجين والذي تحتاج إلى NAD^+ و $NADP^+$ تحفز أكسدة الكحولات الأولية والثانوية والالديهايدات، ألفا وبيتا-هيدروكسي الأحماض الكربوكسيلية والأحماض الأمينية من نوع ألفا(جدول-10).

جدول(10) التفاعلات المحفزة بواسطة إنزيمات نيكوتين أميد نيوكلوتيد

ENZYME	SUBSTRATE	COA	RODUCT
alcohol	Ethano	NAD^+	Acetaldehyde
dehydrogenase	Isocitrate	NAD^+	α-ketoglutarate
isocitrate	G-3-P	,$NADP^+$	DHAP
dehydrogenase	Lactate	NAD^+	Pyruvate
GP-dehydrogenase	G-3-P	NAD^+	Diphosphoglyc
lactic	Malate	NAD^+	erate
dehydrogenase	Glucose-6-P	$NADP^+$	Pyruvate
G-3-P	Glutamate	NAD^+	Phosphoglucon
dehydrogenase	Oxid.	NAD^+,NA	ate
Malic enzyme	glutathione	DP^+	α-ketoglutarate
G-6-P	p-	NADPH	red.
dehydrogenase	benzoquinone	**NADH**	Glutathione
Glu dehydrogenas		**NADPH**	hydroquinone
Glutathione	nitrate	**NADH**	
reductase			nitrate
Quinone reductase			
Nitrate reductase			

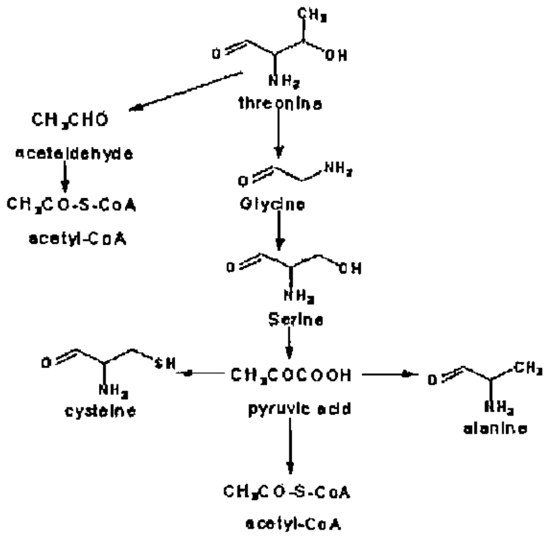
رابعا: المرافق الإنزيمي A أو CoA: يتحول حامض البانتوثينيك في الجسم الى المرافق الانزيمي A (coenzyme A) ومختصرة CoA أو CoASH.



يعمل المرافق الإنزيمي A مع عدد من الإنزيمات التي تتضمن التفاعلات الآتية:

1. نقل مجموعة الخلات إذ أن مجموعة الثايول للمرافق الإنزيمي تتحول بعملية الاستلة إلى استر ثايول، الخلات النشطة الذي تدخل في العديد من التفاعلات التي تحتاج إلى ذرتين من الكربون حيث أن المرافق الإنزيمي هو مجموعة ثايول نشطة حيث ترتبط أليها مجاميع الخلات الذي ترتبط معها تساهميا لتكوين استرات الثايول خلال نقل مجموعة الخلات حيث تتكون خلات نشطة من نزع مجموعة الكربوكسيل التاكسدية للبيروفيت بوجود pyruvate dehydrogenase كما تتكون الخلات النشطة من تنشيط الخلات الناتجة من الايثانول في الكبد بواسطة إنزيم acyl-CoA synthetase قصير السلسلة.

$CH_3COOH + COASH + ATP \longrightarrow CH_3COSCoA$
+AMP + Pi تتكون الخلات النشطة أيضا من هدم الهياكل الكربونية لعشرة من الأحماض الأمينية وعندما تدخل دورة حامض الستريك، فإن خمسة منها تتحول إلى خلات نشطة عن طريق بيروفيت والخمسة الأخرى تتحول إلى acetoacetyl-CoA الذي يتشتق إلى خلات نشطة، الأحماض الأمينية الخمسة الذي تدخل عن طريق البيروفيت هي Ala , Cys, Gly Ser , Thr (الشكل-12).



الشكل(12) تكوين الخلات النشطة من مسالك بعض الأحماض الأمينية

يخلق الكولسترول من الخلات النشطة حيث يحصل ارتباط مجاميع الخلات معا بطرق مختلفة وتساهم الخلات النشطة في تكوين السترات عند تكثيف الخلات النشطة مع oxaloacetate بوجود citrate synthetase حيث يحصل تكثيف كربون المثيل لمجموعة الخلات في الخلات النشطة مع مجموعة الكربونيل للاوكزالوالخلات ثم يحصل تشقق استرات الثايول لتكوين المرافق الإنزيميA الحر، المرافق الإنزيمي الحر يساهم في الفسفرة التاكسدية للجزيئات الأخرى من البيروفيت لتكوين خلات نشطة مرة ثانية الذي تدخل مرة أخرى دورة حامض الستريك ويمكن تنظيم تكوين الخلات النشطة بواسطة pyruvate dehydrogenase في الأنسجة الحيوانية من خلال عملية التحوير التساهمي وأكسدة الأحماض الدهنية يؤدي إلى تحرير مركبات ثنائية الكربون بشكل خلات نشطة الذي يبدأ تكوينها من نهاية الكربوكسيل للسلسلة الكربونية للأحماض الدهنية بواسطة عدد من التفاعلات الإنزيمية المتسلسلة والمتعاقبة وتكوين كل جريئة من الخلات النشطة يتطلب نزع أو إزالة أربع ذرات هيدروجين من الأحماض الدهنية بواسطة dehydrogenases، ويمكن تثبيط أكسدة البيروفيت إلى خلات نشطة عن طريق زيادة مستوى الخلات النشطة، يمكن تنظيم انحلال السكر وتكوين الكلوكوز من مصادر غير كربوهيدراتية بواسطة التفاعلات المحفزة بالانزيمات fructose diphosphatase, pyruvate carboxylase phosphofructokinase لأنها تؤثر على إنتاج الخلات النشطة كما

تساهم الخلات النشطة في تنظيم acetyl-CoA–acetyl transferase acetyl-CoA carboxylase, pyruvate kinase.

2. نقل مجموعة الخلات للأحماض الدهنية في عمليات تخليق الدهون بعد دخول الأحماض الدهنية المشبعة بشكل acyl-CoA إلى حشوة المايتوكوندريا يطرأ عليها نزع ذرتي هيدروجين إنزيميا في ذرات الكربون ألفا وبيتا (ذرات الكربون الثانية والثالثة) لتكوين اصرة مزدوجة في سلسلة الكربون مما ينتج trans-Δ^2-enoyl-CoA بوجود إنزيم acyl-CoA dehydrogenase.

$$\text{Fatty acid-S-CoA + E-FAD} \updownarrow \text{Trans-}\Delta^2\text{-enoyl-S-CoA + E-FADH}_2$$

حيث يتم نزع ذرتي هيدروجين من الحامض الدهني الاثيلي ونقلها إلى FAD الذي هي المجموعة الرابطة المرتبطة بقوة مع الإنزيم وتحدث أكسدة الأحماض الدهنية المستلمة من قبل السايتوسول من بعض الأحماض الدهنية التي مصدرها الدم أو الناتجة عن هدم الكلسيريدات الثلاثية الخلوية بواسطة lipase، فأول التفاعلات الإنزيمية للأحماض الدهنية تحفز بواسطة acyl-CoA synthetase الذي يحفز التفاعل التالي.

$$\text{RCOOH + ATP + CoASH} \longleftrightarrow \text{RCOSCoA +AMP + Pi}$$

3. نقل مجموعة سكسنيل للحصول على سكسنيل المرافق الإنزيمي A من حامض ألفا- كيتوكلوتاريك في دورة حامض الستريك بوجود معقد α-ketoglutarate dehydrogenase.

$$\alpha\text{-ketoglutarate + NAD}^+ \text{ +CoA} \updownarrow \text{succinyl-CoA + CO}_2 \text{ + NADH}$$

ثم تحويل سكسنيل المرافق الإنزيمي A إلى سكسنيت في الخلايا عن طريق فسفرة GDP إلى GTP بوجود succinyl-CoA synthetase.

4. تحويل ثلاثة من الأحماض الأمينية هي Ile,Met ,Val إلى سكسنيل المرافق الإنزيمي A خلال سلسلة من التفاعلات الإنزيمية، ويعتبر مركب وسطي في دورة حامض الستريك.

5. يعمل كمرافق إنزيمي لإنزيمات acyltransferases الذي تساهم في تفاعلات إضافة الخلات ونقلها.

6. تحفز thiolases,thiokinases, thiophorases ارتباط مجاميع الأسيل مثل palmityl, malonyl, acetoacetyl, acetyl مع CoA عن طريق مجموعة السلفاهيدريل لتكوين معقدات acyl –CoA مثل palmityl-CoA و acetyl-CoA فإن معقدات acyl-CoA تساهم في نقل مجاميع acetyl, acyl وتخليق وهدم الأحماض الدهنية.

7. الاستلة تتضمن إضافة الخلات إلى sulfanilamide في الكبد لتكوين N-acetylsulfanilamide أو إلى phenylaminobutyrate لتكوين acetylphenylaminobutyrate ولتكوين acetyl choline والذي تحتاج إلى CoA.

8. تخليق بعض السكريات المتعددة المخاطية الذي تحتاج CoA مثل هياليورونيك وكبريتات الكوندروينتين chondroitin sulfates من خلال تكوين N-acetylhexosamine phosphate بواسطة الاستله.

9. يساهم المرافق الإنزيمي في تخليق الكانكليوسيدات والسكريات المتعددة لفصائل الدم وبعض السكريات المتعددة المخاطية من خلال تكوين N-acetylneuraminic acid أو NANA.

10. يساهم في أكسدة بيتا للأحماض الدهنية من خلال تكوين acyl-CoA وتكوين الأجسام الكيتونية مثل خلات الخل من الخلات النشطة المنتجة بواسطة أكسدة بيتا.

11. يساهم في العمليات الايضية للخلات وخلات الخل من خلال تكوين السترات من الخلات النشطة.

12. يساهم في تفاعلات الأكسدة من خلال دورة حامض الستريك الذي تحتاج CoA إلى إنزيمات pyruvate dehydrogenase, α-ketoglutarate dehydrogenase.

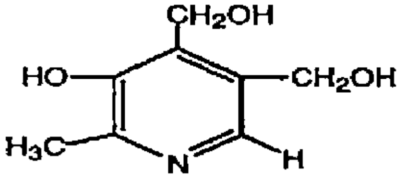
13. يساهم في تخليق الكولسترول من خلال تكوين HMG-CoA من الخلات النشطة وخلات الخل.

14. يساهم في تخليق الأحماض الدهنية من الخلات النشطة والمالونيت النشطة.

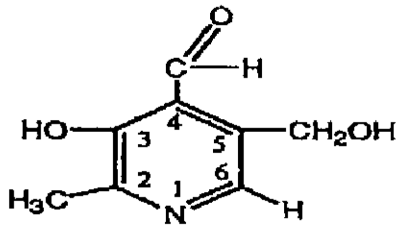
15. يساهم في تخليق الهيم باستعمال السكسنيت النشط وهذا ما يفسر سبب فقر الدم عند نقص حامض البانتوثينيك.

خامسا: المرافق الإنزيمي بيريدوكسال فوسفيت pyridoxal phosphate:

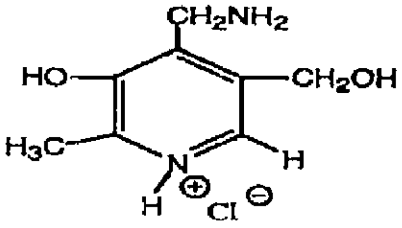
الأشكال الفعالة من فيتامين B_6 والموجودة في الجسم تعمل كمرافقات إنزيمية هي البيريدوكسال فوسفيت pyridoxal phosphate والبيريدوكسامين فوسفيت pyridoxamine phosphate.



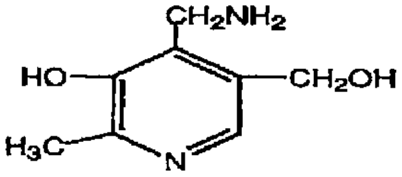
Pyridoxine



Pyridoxal



Pyridoxine HCl



Pyridoxamine

الــذي تســاهم كمرافقــات إنزيميــة لعــدد مــن decarboxylases, racemases , synthetases , transaminases dehydrogenases، ويساهم البيريدوكسال فوسفيت في تحفيز عدد من تفاعلات هدم وبناء الأحماض الأمينية مثل نقل مجموعة الأمين، نزع مجموعة الكربوكسيل، تحويل الشكل من D إلى L وبالعكس فهو يســاعد في نقــل مجموعــة الأمــين كمرافــق إنزيمــي cotransaminase لإنــزيم aminotransferases (transaminases) مثــــــــــــــــــــــــــل Glu-Ala aminotransferase--Aspaminotransferase, Glu- في الكبد والكلى، فإن المرافق الإنزيمي البيريدوكسال فوسفيت يستلم مجموعة الأمين من الحامض الأميني لتكوين البيريدوكسامين فوسفيت الذي يعاد تحويله إلى البيريدوكسال فوسفيت عندما يهب مجموعة الأمين إلى الحامض الكيتوني مما يؤدي ذلك إلى تكوين حامض أميني مقابل للحامض الكيتوني (الشكل-13).

Amino acid-1

Pyridoxal phosphate ⟶ Schiff base-1

H_2O

Keto acid-I

Pyridoxamine phosphate ⟶ Schiff base -II

Keto acid-II ⟶ Schiff base-III

H_2O

Amino acid -II

Pyridoxal phosphate ⟶ Schiff base IV

الشكل(13) عمل المرافق الإنزيمي بيريدوكسال فوسفيت كناقل لمجموعة الأمين

في كل خطوتين تتكون قاعدة شيف كمركب وسطي ترتبط إلى الإنزيم بواسطة ربط المرافق الإنزيمي مع المادة الأساس المقابلة كما يكون البيريدوكسال فوسفيت مرافق إنزيمي لإنزيمات الأحماض الأمينية amino acid racemases مثل-Ala Glu-racemase racemase الذي تحفز التحويل الداخلي للأشكال D,L للأحماض الأمينية أو لإنزيم Ser-dehgydratase لبكتريا القولون وليست لإنزيم Ser-Thr dehydratase في الكبد أو لإنزيم cystathionine -γ-lyase cytothionase و cytathionine – γ-synthetase وإنزيم cystathionine –β-synthetase الذي يساهم في العمليات الايضية للسستائين والسستاثايونين في الكبد أو لإنزيمات amino acid decarboxylases مثل إنزيمات ,L-aromatic amino acid decarboxylase, 5-hydroxy-Try-decarboxylase وليست Glu-α-decarboxylase His-decarboxylase أو Amlev synthetase الذي يحفز تكوين δ-aminolevulinate خلال تخليق بورفرين أو لإنزيم Ser-hydroxymethylase الذي يحفز نزع aldol من السيرين لتكوين Gly والفورمالديهايد أو لإنزيم تشقق الكلايسين Gly-synthetase الذي يحفز تكوين مركب أحادى الكربون من Gly مثل تخليق الكلايسين من مركب أحادى الكربون بواسطة تفاعل عكسي أو لإنزيمkynureninase الذي يحفز هدم kynurenine وتخليق النياسين منه، في العديد من العمليات لنقل مجموعة الأمين من الأحماض الأمينية تتكون قاعدة شيف الوسطية بواسطة ربط المادة الأساس مع المرافق الإنزيمي، كما يساعد المرافق الإنزيمي في نقل المجاميع الأمينية خلال الغشاء الخلوي والامتصاص المعوي الفعال للأحماض الأمينية من النوع L كما يساعد في تخليق الأحماض الأمينية الأساسية عن طريق تحويل linoleic acid إلىarachidonic acid, تحويل السستين والسستائين إلى بيروفيت عن طريق cysteine sulfinic acid يحفز بواسطة إنزيم يحتوي على بيريدوكسال فوسفيت، الحامض الأميني الكلايسين يتفاعل مع succinyl-CoA لينتج ألفا- امينو- بيتا كيتو حامض الاديبيك α-amino-β-ketoadipic acid الذي يتم نزع مجموعة الكربوكسيل العائدة له لانتاج سكما امينو حامض ليفيولينيك δ-amino levulinic acid الذي يحفز بواسطة إنزيم δ-amino-levulinic acid synthetase الذي هو إنزيم بيريدوكسال فوسفيت الموجود في الشبكة الاندوبلازمية في خلايا الكبد، في المرحلة الأخيرة

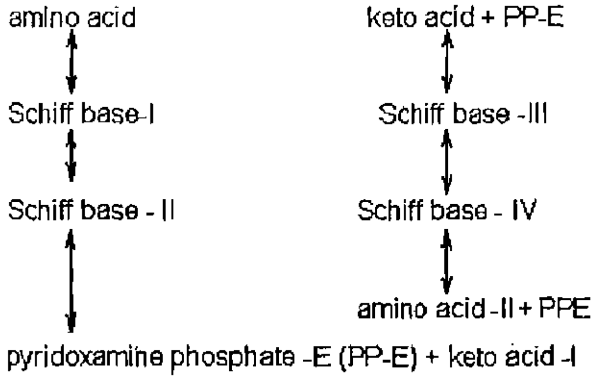
من تخليق السستائين، فإن إنزيم cystthionase الذي هو إنزيم بيريدوكسال فوسفيت يحفز تشقق cystathionine لانتاج سستائين حر.

cystathionine ⟶ α-ketoglutarate +NH_3 + cysteine

نزع مجموعة الكربوكسيل إنزيميا من السيرين للفوسفاتيديل سيرين يؤدي إلى تكوين فوسفاتيديل ايثانول أمين ويحفز التفاعل بواسطة إنزيم يحتوي بيريدوكسال فوسفيت كمجموعة رابطة ويعتقد بأنها قاعدة شيف الذي تتكون بين مجموعة الأمين ألفا في السيرين وبيريدوكسال فوسفيت كخطوة وسطية.

phosphatidyl serine ⟶ phosphatidyl ethanolamine + CO_2

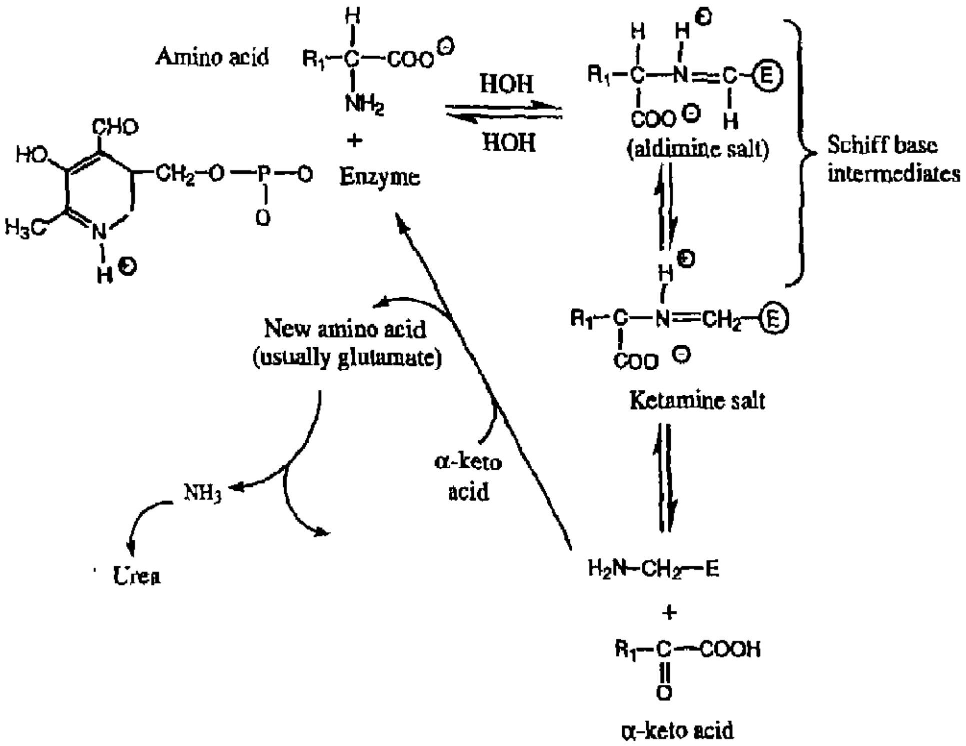
إنزيم phosphorylase a يملك وزن جزيئي 380000 ويتالف من أربع وحدات فرعية متماثلة، كل وحدة فرعية تحتوي فوسفوسيرين وهو أساس للنشاط التحفيزي للإنزيم وجزيئة المرافق الإنزيمي بيريدوكسال فوسفيت الذي ترتبط تساهميا مع السيرين، البيريدوكسال فوسفيت يلعب دورا مهما في تكوين قاعدة شيف لان الوظيفة الأساسية للبيريدوكسال فوسفيت كناقل للمجاميع الأمينية أو الأحماض الأمينية فهي المفتاح الرئيسي لعملة هي مجموعة الالديهايد الذي تكون شكل عكسي لقاعدة شيف، خلال الدورة التحفيزية في إنزيمات تنقل مجموعة الأمين transaminases، فإن المرافق الإنزيمي تطرأ علية عملية نقل عكسي بين مجموعته الالديهايدية والمرافق الإنزيمي البيريدوكسال فوسفيت والشكل الحاوي مجموعة أمين، هذه الدورة تحدث في مرحلتين (الشكل -14).



الشكل(14) تكوين قواعد شيف خلال تفاعلات نقل مجموعة الامين

المرحلة الأولى: يتقبل معقد الإنزيم البيريدوكسال فوسفيت مجموعة أمين من واهب مجموعة الأمين مع تكوين معقد إنزيم البيريدوكسال فوسفيت الذي تحدث عن طريق تكوين اثنان من قواعد شيف.

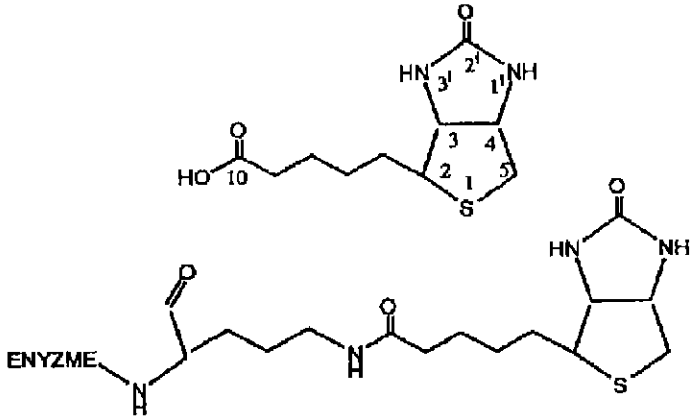
المرحلة الثانية: يكون معقد الإنزيم البيريدوكسال فوسفيت قاعدة شيف مع قابل مجموعة الأمين حيث أن مجموعة الأمين تذهب إلى الحامض الكيتوني حيث يعمل المرافق الإنزيمي كناقل لمجاميع الأمين من الحامض الأميني إلى الحامض الكيتوني ومجموعة الالديهايد للبيريدوكسال فوسفيت تكون قاعدة شيف مع مجموعة الأمين آيتا ζ في الحامض الأميني اللايسين في الإنزيم، فإن مجموعة الأمين القادمة من المادة الأساس تزيح مجموعة الأمين الذي مصدرها الإنزيم لتكوين معقد مادة أساس مع الإنزيم، تحويل هوموسيرين فوسفيت homoserine phosphate إلى الثريونين بوجود Thr-synthetase (إنزيم البيريدوكسال فوسفيت) و Ser-dehydratase مثل amino transferases وبعض الأنواع الأخرى من الانزيمات المتضمنة في العمليات الايضية للأحماض الأمينية الذي تحتوي بيريدوكسال فوسفيت كمرافق إنزيمي، وتحتوي amino transferases على بيريدوكسال فوسفيت الذي يرتبط مع أو يهاجم الأحماض الأمينية الحرة، فالمرافق الإنزيمي يثبت بواسطة سلسلة ببتيدية متعددة



للإنزيم بطريقة ما تجعل مجموعة الأمين ترتبط مع الحامض الأميني اللايسين لتكوين aldimine السيرين يرتبط مع البيريدوكسال فوسفيت على transferase الذي ينقل مجموعة الهيدروكسي مثيل إلى ذرات النتروجين في الموقع الخامس والعاشر من H_4folate.

$$\text{Serine} + H_4\text{folate} \longrightarrow \text{Gly} + 5,10\text{-methylene } H_4\text{-folate}$$

سادسا: المرافق الإنزيمي البيوتين Biotin: يتحول البيوتين في الجسم إلى الشكل الفعال البيوسايتين biocytin الناتج عن اتحاد البيوتين مع وحدة لايسين لبعض الإنزيمات التي تتضمن تكوين أو استهلاك ثاني اوكسيد الكربون حيث يحصل الارتباط بين مجموعة الكربوكسيل للبيوتين ومجموعة الأمين في الوقع آيتا للحامض الأميني اللايسين (الشكل-15).



الشكل(15) البيوتين واشكاله الفعالة

يعمل البيوسايتين مرافقا إنزيميا لبعض الإنزيمات مثل carboxylase التي تتضمن تفاعلاتها إدخال ثاني اوكسيد الكربون ومن الأمثلة لها.

acetyl-CoA + CO_2 ⟶ malonyl-CoA

propionyl-CoA + CO_2 ⟶ methylmalonyl-CoA

pyruvate + CO_2 ⟶ oxaloacetate

يعمل البيوتين كمرافق إنزيمي أو مجموعة رابطة لإنزيمات ATP-carboxylase مثل إنزيم pyruvate carboxylase الذي يحفز إضافة مجموعة الكربوكسيل إلى بيروفيت لتكوين اوكزالوالخلات و acetyl carboxylase الذي يضيف مجموعة الكربوكسيل إلى الخلات النشطة لتكوين malonyl-CoA و β-methyl crotonyl – CoA carboxylase الذي يضيف مجموعة الكربوكسيل إلى المركب β-methyl crotonyl–CoA لتكوين β-methyl glutaconyl –CoA، ويسبب propionyl –CoA carboxylase إضافة الكربوكسيل إلى propionyl-CoA لتكوين D-methyl malonyl-CoA، يساعد البيوتين في تثبيت ثاني اوكسيد الكربون على المواد الأساس المختلفة، يرتبط البيوتين تساهميا مع مجموعة الأمين آيتا للحامض الأميني اللايسين في جزيئة الإنزيم مما يساعد holocarboxylase synthetase أو biotyl-carboxylase synthetase و ATP لتكوين معقد الإنزيم – المادة الأساس الذي يعمل holocarboxylase.

biotin + apocarboxylase + ATP ⇄ Biotin –enzyme +AMP +Ppi

خــــلال إضــــــافة مجموعـــــــة الكربوكســــيل، فـإن CO_2 يـؤدي إلى تكويـــن carbonic phosphoric anhydride كمركـب وسـطي فعـال الـذي ينقـل الفوسفيت مـن ATP، معقـد الإنـزيم – البيـوتين يـرتبط مـع CO_2 للمركـب الوسـطي ممـا يــؤدي ذلك إلى تكويـــن معقـد الإنـزيم – كاربوكسـي بيـوتين الـذي تنتقـل CO_2 إلى المـادة الأساس، يساعد البيوتين في التخليق الحيوي للأحماض الدهنية، الكلوكوز مـن مصادر غير كربوهيــدراتية gluconeogenesis مـن حامض البروبيونيك وكـذلك يسـاهم في تكـوين اوكزالو الخلات وهدم الليوسين إلى أجسـام كيتونيـة وتخليـق البيوريـنـات والبيريميـدينات ولـه دور مهـم كمرافـق إنزيمي لإنـزيم carbamoyl phosphate synthetase، ويسـاهم أيضـــا في نقـــل مجموعـــة الكربوكســيل مـــن جزيئـــة واحـــدة إلى الأخـــرى بواســـطة إنزيمـاتcarboxytransferases مثـل methyl malonyl-CoA pyruvate carboxyltransferase للبكتريا المنتجة لحامض البروبيونيك، حيث يحمل معقد الإنزيم – البيوتين ثاني اوكسيد الكربون من المادة الأســاس الأولى إلى المـادة الأسـاس الثانيـة.هناك العديد من التفاعلات المحفزة بواسطة البيوتين هي:

1. تفاعــلات تحويـــل الخــلات النشـــطة إلى مالونيـت نشـطة بوجـود acetyl-CoA carboxylase

$$CH_3\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + CO_2 + ATP$$

$$\updownarrow$$

$$HOOC\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + ADP + P$$

Malonyl-CoA

2. تفاعــلات تحويـــل حــامض البيروفيـــك إلى اوكـــزالوالخلات بوجـــود pyruvate carboxylase

$CH_3COCOOH + ATP + CO_2$

Pyruvic acid

↕

$HOOC\text{-}CH_2COCOOH + ADP + Pi$

malonic acid

هـذا التفاعـل غـير عكسـي ويحتـاج إلى acetyl-CoA كعامـل مرافـق وهـو مـن التفاعلات المهمة في تنظيم ايض الكربوهيدرات.

3. تحويـــل propionyl-CoA إلى methyl malonyl-CoA بوجـــود إنزيـــم proionyl-CoA carboxylase.

$CH_3CH_2CO\text{-}S\text{-}CoA + CO_2 \longrightarrow CH_3CH(COOH)CO\text{-}S\text{-}CoA$

Propionyl-CoA ↓

phosphenolpyruvate ⟵ oxaloacetate ⟵ succinyl-CoA

↓

Glucose

4-تحويل البيروفيت بوجود مثيل مالونيت نشط إلى اوكزالوالخلات والبروبيونيل نشط بوجود إنزيم methyl malonyl-CoA oxaloacetate transcarboxylase.

$CH_3COCOOH$ $CH_3\text{-}CH(COOH)\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA$

Pyruvic acid   methylmalonyl-CoA

$HOOC\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}COOH$ $CH_3\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA$

Oxaloacetic acid propionyl-CoA

5. تفـــاعلات إضـــافة مجموعـــة الكربوكســـيل للمركـــب 5-amino-imidazole ribonucleotide لتكوين 5-amino-imidazole –4-carboxylic acid ribonucleotide.

6. تفاعلات إضافة الكربوكسيل إلى اليوريا لتكوين allophanic acid في بعض الخمـائر والطحالب الذي لا تملك إنزيم urease، وعند إضافة مجموعـة هيدروكسـيل إلى حـامض الوفانيك وبوجود hydrolase يتحول إلى ثاني اوكسيد الكربون وامونيا.

$$NH_2\text{-CO-}NH_2 + CO_2 \longrightarrow NH_2\text{-CO-NH-COOH}$$

Urea allophanic acid

ومن التفاعلات الأخرى المحفزة بواسطة البيوتين هي إضافة مجموعة الكربوكسـيل إلى geranyl-CoA و Fanesyl-CoA كما يسـاهم في نـزع مجموعـة الكربوكسـيل مـن methyl malonyl-CoA لتكـوين proionyl-CoA أو اوكزالـوالخلات إلى حـامض البيروفيك.

سابعا: مرافقات حامض الفوليك **Folic acid coenzymes**: يتحول حامض الفوليـك في الجسـم إلى الشـكل المختـزل الفعـال هـو رابـع هيـدروحامض الفوليـك tetrahydrofolic acid (H_4folate) الـذي يعمـل نـاقلا لمجموعـة حاويـة علـى ذرة كربون واحدة وهناك عدة أنواع من المرافقات الإنزيمية الذي تعود إلى آلية وهي:

formyl tetrahydrofolate methenyl tetrahydrofolate

methyl tetra hydrofolate methelene tetrahydrofolate

formimino tetrahydrfolate

والذي تعمل كواهبـــات لوحـــدات أحاديـة الكربـون في عمليـات التخليـق الحيـوي المختلفة. مرافقات الفولاسين تساهم في العمليات الايضية للمركبـات أحاديـة ذرة الكربـون،

المجموعات أحادية الكربون مثل الفورمات، الفورم اميينو ، الهيدروكسي مثيل والفورميل الذي ترتبط تساهميا مع ذرة النتروجين الخامسة والعاشرة من الفولاسين الفعال لتكوين مرافقات الفولات مثل:

N^5-formyl H_4folate, N^{10}-formyl H_4folate , N^5-formimino H_4folate, N^5,N^{10}-methylene H_4folate , N^5,N^{10}-methenyl H_4folat,N^5-methylH_4folate. (الشكل –16)، إن تشقق الكلايسين بواسطة إنزيم تشقق الكلايسين glycine synthetase يساعد على تحويل H_4folate إلى N^5,N^{10}-methylene H_4folate.

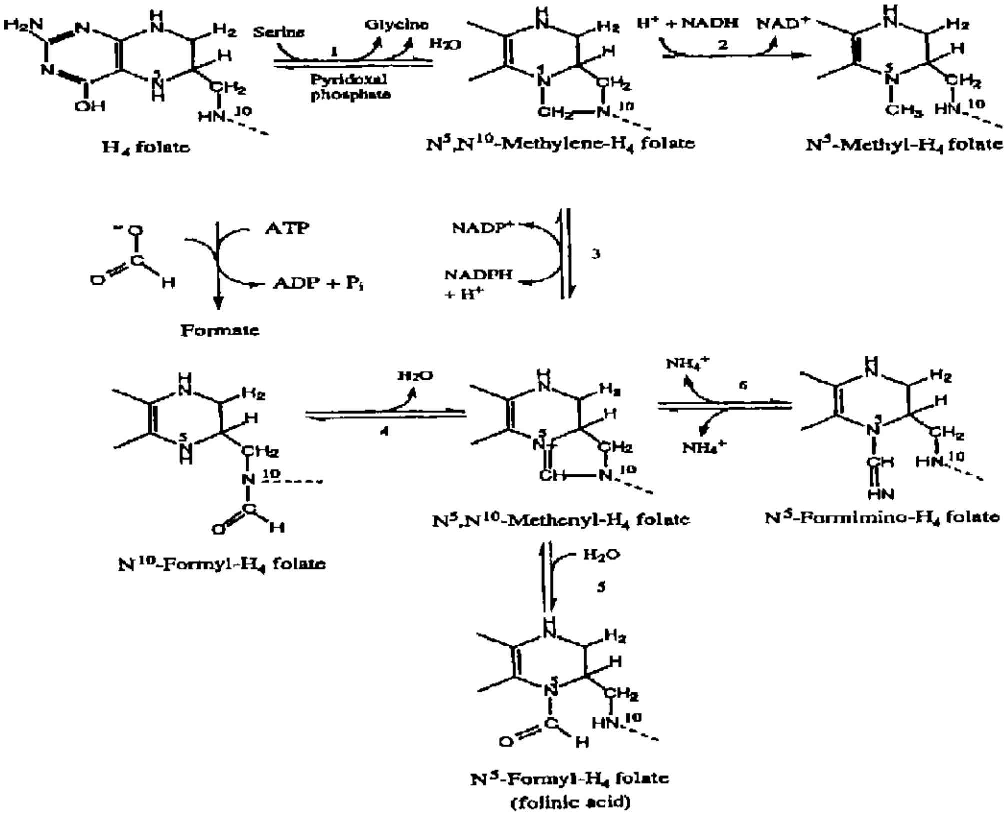
$$\text{glycine} + H_4\text{folate} \longleftrightarrow CO_2 + NH_3 + N^5,N^{10}\text{-methylene } H_4\text{folate}$$

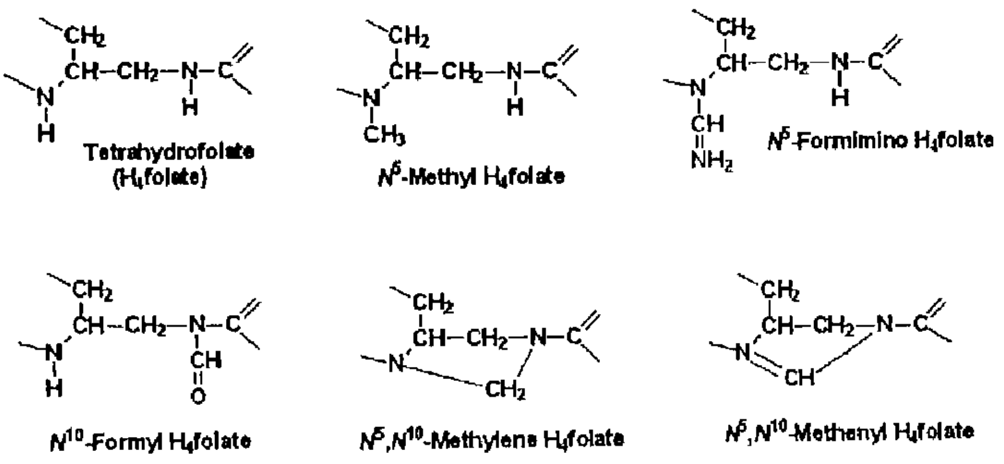
يحصل تحويل داخلي بين مرافقات الفولاسين في الأنسجة الذي تلعب دورا مهما في نقل وايض المركبات أحادية الكربون فعلى سبيل المثال:

1. ذرات الكربون الثانية والثامنه من حلقة البيورين مشتقة من N^5-formyl H_4folate N^5,N^{10}-methylenyl H_4folate على التوالي بوجود إنزيم نقل الفورميل transformylases.
2. يمكن إضافة مجموعة مثيل إلى الهوموسستائين في بكتريا القولون لتكوين المثيونين بساعدة N^5-methyl H4folate بوجود إنزيم نقل المثيل methyl transferase والمرافق الإنزيمي كوبامين، NADH ,FAD, S-adenosyl methionine، مجموعة المثيل للمركب يتم نقلها إلى المرافق الإنزيمي cobamide لتكوين مثيل كوباميد الذي يتم نزع مجموعته المثيلية والذي يتم استلامها بواسطة الهوموسستائين.

3. يساعد المرافق الإنزيمي N^5-formyl H_4folate في تغير الكلوتاميت إلى N-formyl glutamate.

$$Glu + N^5\text{-formyl } H_4folate \longleftrightarrow N\text{-formyl glutamate} + H_4folate$$





الشكل(16) التركيب الكيمياوي لمشتقات حامض الفوليك

4.يساعد المرافق الإنزيمي N^5,N^{10}-methylene H_4folate في تحويل الكلايسين إلى سيرين حيث أن مجموعة المثيل من المرافق الإنزيمي تذهب لتكوين بيتا-كربون من السيرين والسيرين من ناحية أخرى يعمل كمصدر لمجموعة المثيلين (ذرة الكربون الأولى) الذي يتحول إلى كلايسين بوجود H_4folate.

5. التحويل الداخلي للكلوتاميت و formimino glutamate يحتاج مساهمة المرافق الإنزيمي للفوليت.

6. مجموعة المثيل في الثايمين مصدرها هو N^5,N^{10}-methylene H_4folate.

7. يساهم المرافق الإنزيمي للفولاسين في تخليق البيوريناات وإضافة المثيل إلى pyrimidine uracil لتكوين ثايمين thymine وكذلك يخفض التخليق الحيوي للثيامين والبيورينات عند نقص الفولاسين.

8. يكون المرافق الإنزيمي للفولاسين أساسي في تخليق الأحماض النووية وخاصة DNA.

9. يتم اختزال H_4folate إلى H_2folate بواسطة dihydrofolic reductase.

$$H_4\text{folate} + NADPH + H^+ \longrightarrow H_2\text{folate} + NADP^+$$

$$H_2\text{folate} + NADP^+ + H^+ \longrightarrow H_4\text{folate} + NADP^+$$

10.يساعد في دمج الفورميل الناتجة عن هدم البيورينات والبيريميدينات والأحماض الأمينية مثل المثيونين، الهستدين، الفالين والسيرين، في هذا التفاعل، فإن حامض الفوليك يعمل كمنشط أو ناقل لوحدات الكربون الفردية في تفاعلات الأكسدة المختلفة حيث ترتبط وحدات الكربون الفردية إلى ناقل الإنزيم في مواقع تكوينه أو التفاعلات الذي تحدث عند ارتباطاتهما.

12. يساعد في تشقق الكلايسين بواسطة إنزيم Gly-synthetase الذي يساعد في تحويل حامض tetrahydrofolic acid إلى N^5,N^{10}-methylene tetra folic acid.

$$Gly + H_4folate$$

$$\updownarrow$$

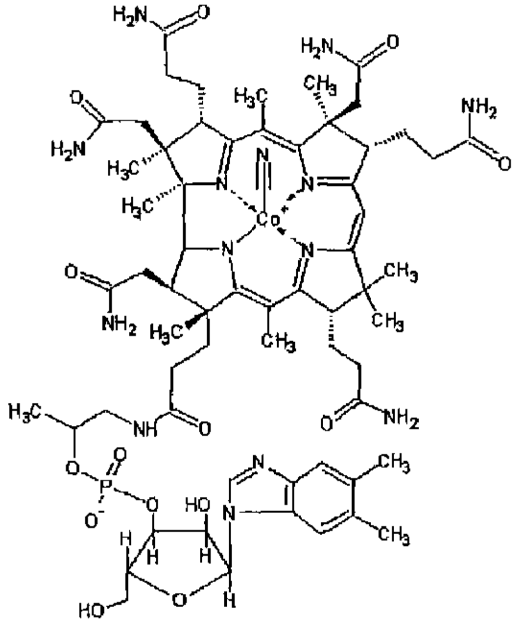
$$CO_2 + NH_3 + N^5,N^{10}\text{-methylene tetra hydrofolic acid}$$

13-المرافق الإنزيمي N^{10}-formyl tetra hydrofolic acid هو الشكل الفعال من مرافقات الانزيم لحامض الفوليك في معظم تفاعلات الهدم بينما N^5,N^{10}- methylene $H_4folate$ يمكن تحويله إلى N^5-methyl $H_4folate$ بوجود reductase الذي يعتمد على NAD^+

ثامنا: المرافق الإنزيمي حامض الليبوييك Lipoic acid: وهو من فيتامينات B المعقدة وهناك نوعين هما الشكل المؤكسد والشكل المختزل، يتحد في الجسم مع الحامض الأميني اللايسين للإنزيم مما يتحول إلى الشكل الفعال لايبواميد lipoamide، يساهم المرافق الإنزيمي lipoamide في أكسدة مجموعة الهيدروكسي اثيل في المرافق الإنزيمي ثيامين بيروفوسفيت إلى مجموعة الخلات ثم نقلها إلى lipoamide العامل المؤكسد في هذا لتفاعل هو مجموعة ثنائي الكبريتيد disulfide في lipoamide مما تتحول إلى سلفاهيدريل، يحفز هذا التفاعل بواسطة dihydrolipoyl transacetylase لانتاج acetyl lipoamide ثم نقل مجموعة الخلات من acetyl lipoamide إلى المرافق الإنزيمي A لتكوين الخلات النشطة بوجود إنزيم dihydrolipoyl transacetylase ثم توليد الشكل المؤكسد من lipoamide بوجود إنزيم يحتاج NAD^+ هو dihydrolipoyl dehydrogenase، يعمل lipoamide كعامل مرافق لمعقدات انزيمية متعددة مثل α-ketoglutaric dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase وهي الإنزيمات الحاوية lipoyl تحفز توليد ونقل مجاميع الأسيل وفي تفاعلات الاختزالية المتبوعة بإعادة الأكسدة والذي تتضمن حامض الليبوييك، يتفاعل معقد الثيامين -اسيلول a cylol مع حامض الليبوييك المؤكسد لتكوين معقد acylol الذي يعاد برتيبة لتكوين ثيامين حر ومعقد حامض اللايبوييك – أسيل acyl، حيث يتأكسد acylol إلى مجموعة أسيل مما يتحول الشكل المؤكسد من الليبويك إلى الشكل المختزل والذي تعاد أكسدته بواسطة إنزيم يحتوي FAD لتكوين الشكل المؤكسد من lipoyl ويحمل tarns

succinylase مجموعة lipoyl كعامل مؤكسد والذي يعمل على تحويل استرات الثايول سكسنيل ذات الطاقة العالية إلى شكل مفيد بواسطة نقل مجموعته السكسنيل الى جزيئة CoA القادمة مما يكون المرافق الإنزيمي للسكسنيل، فائدة transsuccinylase يكمل نزع مجموعة الكربوكسيل التاكسدية لالفا- كيتوكلوتاريت وحجز جزء من الطاقة بشكل استرات الثايول، تتم أكسدة البيروفيك بواسطة decarboxylase الذي يحفز نزع مجموعة الكربوكسيل مما يؤدي ذلك الى ربط ذرتي الكربون المتبقية مع الثيامين بيروفيت لتكوين مجموعة هيدروكسي اثيل مرتبطة مع الثيامين hydroxy- ethyl TPP وبوجود dehydrogenase الذي يحفز نقل مجموعة الهيدروكسي اثيل الىlipoyl والذي تتم أكسدتها الى خلات نشطة عن طريق ارتباط الخلات مع المرافق الإنزيمي A، يتم نزع ذرتي هيدروجين من مجموعة الهيدروكسي اثيل للاسيتالديهايد الفعال لتكوين الخلات الذي تنتقل الى مجموعة السلفاهيدريل في الشكل المختزل من حامض الليبوييك بوجود lipoate acetyl transferase الذي يملك حامض اللايبوييك لمجموعة رابطة متصلة تساهميا، حيث يتم اختزال حامض اللايبوييك الى ثنائي هيدرولايبوييك عن طريق نقل ذرات الهيدروجين من مجموعة الهيدروكسي اثيل الى مجموعة ثنائي الكبريتيد في حامض اللايبويك،يتم انتقال مجموعة الخلات إنزيميا الى مجموعة السلفاهيدريل من CoA لتكوين خلات نشطة الذي تترك معقد الإنزيم وتتم إعادة أكسدة ثنائي هيدروحامض اللايبوييك الى حامض اللايبويك عن طريق نقل ذرات الهيدروجين الى FAD في المجموعة الرابطة في lipoamide dehydrogenase

تاسعا: المرافق الإنزيمي كوباميد Cobamide: يتحول فيتامين B_{12} أو ما يطلق عليه سيانوكوبال أمين cyanocobalamine في الجسم الى الشكل الفعال المرافق الإنزيمي B_{12} أو المرافق الإنزيمي cobamide coenzyme إذ أن مجموعة السيانيد تستبدل بواسطة 5- ديوكسي ادينوسين الذي يتصل عن طريق ذرة الكربون الخامسة لسكر الرايبوز(الشكل-17).



الشكل (17) تركيب cyanocobalamin

ويشترك المرافق الإنزيمي لفيتامين B_{12} مع عدد من الإنزيمات التي تدخل في تفاعلات انتقال ذرة الكربون وهي كسر اصرة كربون – كربون مثل تحويل السكسنيل النشط الى مثيل مالونيل نشط بوجود methyl malonyl CoA mutase أو كسر اصرة كربون – أوكسجين مثل 2-هيدروكسي بروبانول الى بروبانالديهايد propanaldehyde بوجود diol dehydrase.

$$CH_3CH(OH)CH_2OH \longrightarrow CH_3\,CH_2CHO + H_2O$$

أو يعمل كواهب لمجموعة المثيل مثل تحويل الهوموسستائين الى مثيونين بوجود إنزيم Met-synthetase.

$$CH_2(SH)CH_2CH(NH_2)COOH \rightarrow CH_3\text{-}S\text{-}CH_2CH(NH_2)COOH$$

أو كسر اصرة كربون – نتروجين مثل تحويل اللايسين الى شكل مناظر بوجود إنزيم lysine mutase.

$CH_2(NH_2)(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$

$$\downarrow$$

$CH_3CH(NH_2)(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$

يساعد المرافق الإنزيمي في التخليق الحيوي ونقل مجاميع المثيل ويساهم في تفاعلات تكوين المثيونين من الهوموسستائين وإضافة مجموعة مثيل الى اليوراسيل لتكوين ثايمين وميثان وخلال إضافة مجموعة المثيل الى الهوموسستائين لتكوين المثيونين في بكتريا القولون، فإن مجموعة المثيل تنتقل من N^5-methyl H_4folate الى المرافق الإنزيمي المختزل كوباميد أو ما يسمى deoxyadenosyl cobalamine لتكوين مثيل كوباميد ثم نقل مجموعة المثيل من مثيل كوباميد الى الهوموسستائيين بواسطة methyl transferase فالكوباميد يعمل كمرافق إنزيمي لانزيمات isomerases , mutases مثل β-Lys isomerase و Glu-mutase و methyl malonyl-CoA mutase وبعض dehydrases مثل glycerol dioldehydrase, dehydrase و ethanolamine deaminase

عاشرا: المرافق الإنزيمي ادينوسين ثلاثي الفوسفيت **Adenosine triphosphate**: يملك ثلاث جزيئات من حامض الفسفوريك مع ادينوسين رايبوز نيوكلوتيد ويملك اصرتين مزدوجتين غنية بالطاقة والذي تساهم في نقل مجموعة اورثوفوسفيت وتحرير ADP، ادينوسيل أحادي الفوسفيت وتحرير بيروفوسفيت، مجموعة ادينوسيل وتحرير اورثوبيروفوسفيت ومجموعة ثنائي الفوسفيت وتحرير AMP، يعتبر نقل مجموعة اورثوفوسفيت من أهم تفاعلات ATP الذي يتم نقلها بواسطة ATPase إلى جريئة ماء بينما kinases بنقلها إلى هيدروكسيل واسيل لمجاميع الاميدات،amides تفاعل ATP مع حامض الكبريتيك بمساعدة أيون المغنيسيوم وبوجود adenosine-5¯-phosphosulfate-3¯-phosphokinase ،ATP و sulfurylase ومن المحتمل وجود فيتامين A يؤدي إلى تكوين adenosine-3¯-phosphate-5¯-phosphosulfate أو ما يطلق عليه الكبريتات الفعالة، عندما يرتبط الثيامين مع ATP بوجود thiaminokinase يؤدي إلى تكوين ثيامين بيروفوسفيت ويساهم ATP

في تكــوين البيريدوكســال فوســـفيت مـــن البيريدوكســـال في الكبـــد والـــدماغ بمساعدة،pyridoxal kinase

pyridoxal + ATP ⟶ Pyridoxal phosphate

نقــل مجموعـــة الفوســـفيت مـــن الفوســـفواينول بيروفيـــت إلى ADP بوجـــود pyruvate kinase الذي يعتمد على أيونات البوتاسيوم – المغنيسيوم لتكـوين ATP مــع أينــول بيروفيــت، تــتم إضــافة مجموعــة الفوســفيت إلى ميفالونيــت لتكــوين 5- فوسفوميفالونيت بمساعدة ATP وإنزيـــم mevalonate kinase وأيون المغنيسيوم ثم تضاف إلية مجموعة فوسفيت من ATP وبوجود phosphomevalonate لتكوين ميفالونيــت - 5 - بيروفوسـفيت ثـم تضـاف إليـه أيضـا مجموعـة فوسـفيت بوجـود إنـزيم kinase وبمســاعدة ATP وأيــون المغنيســيوم لتكــوين ميفالونيــت -3- فوســفو-5- بيروفوسفيت (الشكل-18)، يســاهم في تحويـل الخـلات إلى الخـلات النشـطة بوجـود المرافـق الإنزيمي A بوجـودacetate thiokinase ويسـاهم في تكـوين كاربامويـل فوسـفيت مـن تكثيـف غـير عكسـي للامونيـا وثـاني اوكسـيد الكربـون ومجموعـة الفوســـــفيت الـذي مصـــدرها هو ATP بوجود أيون المغنيســـــيوم وإنزيـم carbamoyl phosphate synthetase.

$$CO_2 + NH_3 + 2ATP \longrightarrow NH_2\text{-}CO\text{-}O\text{-}PO_3H_2$$

Carbamoyl phosphate

$$HOOC\text{-}CH_2C(OH,CH_3)CH_2CH_2OH$$

Mevalonic acid

↓ ATP Mevalonate kinase → ADP

$$HOOC\text{-}CH_2C(OH,CH_3)CH_2CH_2\text{-}O\text{-}P\text{-}O_3H_2$$

5-phosphomevalonic acid

↓ ATP, Phosphomevalonate kinase → ADP

$HOOC\text{-}CH_2\text{-}C(OH,CH_3)\text{-}CH_2CH_2\text{-}O\text{-}P_2O_6H_3$

Mevalonate-5-pyrophosphate

↓ ATP , Kinase → ADP

$HOOC\text{-}CH_2\text{-}C(CH_3)(O\text{-}PO_3H_2)\text{-}CH_2CH_2\text{-}OP_2O_6H_3$

Mevalonate-3-phospho-5-pyrophosphate

الشكل(18) دور ATP في تخليق ميفالونيت

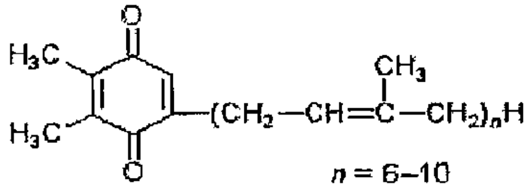
يحصل تكوين ATP عند تقلص العضلات بسبب فقد مجموعة الفوسفيت من الكرياتين فوسفيت الذي يهبها إلى ADP بوجود creatine kinase، يتحول المثيونين إلى S-adenosyl-Met وهو ما يطلق عليه المثيونين الفعال عندما يستلم مجموعة اديونوسيل من ATP تحت تأثير methyl adenosyltransferase ويتكون حامض الاسبارتيك من نزع مجموعة أمين من خلال الخل والذي يتحول إلى اسبارجين عندما يستلم مجموعة امايد من Gln في سايتوسول الكبد بمساعدة Asn synthetase وأيون المغنيسيوم.

$$Gln + Asp + ATP \longrightarrow Glu + Asn + AMP + Ppi$$

يساهم ATP في تحويل الرايبوز-5- فوسفيت إلى 5- فوسفورايبوسيل -1- بيروفوسفيت عن طريق نقل البيروفوسفيت من ATP إلى ذرة الكربون الأولى من الرايبوز

بوجــــــــــــود ribose-phosphate pyrophosphokinase أو phosphoribosyl pyrophosphate synthetase الذي يزداد نشاطه مع زيادة ATP.

إحدى عشر: المرافق الإنزيمي Q: هناك نوعين من مركبات benzoquinone موجودة في الأنسجة والذي تختلف قليلا عن بعضها البعض الآخر هي ubiquinone الموجود على نطاق واسع في الأنسجة الحيوانية والبكتيرية الذي موقعها في الأنسجة الحيوانية هي المايتوكوندريا ويكون عـــدد وحدات isoprenoid يساوي 10 في المايتوكوندريا ومن 6-9 في الكائنات الواطئة، أما في الأنسجة النباتية فأن موقعها هو الكلوروبلاست وتسمى plastoquinone الذي فيه عدد



Plastoquinone

الايزوبرينويــــد بســـاوي 9 يســــتخدم CoQ في مناقشــــة وظيفــــة ubiquinone10(CoQ_{10})

وهو مركب ضروري في نقل الإلكترون في المايتوكوندريا، يختلف طول السلسلة الجانبية مع مصدر المايتوكوندريا في الأنسجة الحيوانية، ينقل الإلكترونات من المادة الأساس إلى الأوكسجين وهو يوجد في شكلين هما المؤكسد والمختزل وبسبب وجوده بشكل مؤكسد أو مختزل فهو يعمل كحامل إلكترون إضافي بين المرافقات الإنزيمية الفلافينية والسايتوكروم وهو قابل للإلكترونات ليست فقط من NADH-dehydrogenase، بل كذلك من المكونات الفلافينية لإنزيم succinic dehydrogenase, glycerol phosphate dehydrogenase,fatty acid acyl –CoA dehydrogenase حيث يكون CoQ ناقل إلكترون فقط في السلسلة التنفسية وهو لا يرتبط بقوة أو يرتبط تساهميا إلى البروتين وهو يحمل الإلكترونات بين البروتينات الفلافينية والسايتوكرومات في سلسلة نقل الإلكترون وهو شائع في الحالات الطرفية من العمليات الايضية التاكسدية فهو يختزل بواسطة $FADH_2$,$FMNH_2$ وهو يرتبط مع واحد أو اكثر من البروتينات الحاوية حديد والذي يعمل على جمع المكافئات الاختزالية ليست من NADH-dehydrogenase فقط، بل

ذلك من dehydrogenases اخرى مرتبطة مع الفلافين في المايتوكوندريا وخاصةsuccinate dehydrogenase و acyl –CoA dehydrogenase في دورة أكسدة الأحماض الدهنية والمرافق الإنزيمي Q يعمل كجزيئة حاملة للإلكترونات بين البروتينات الفلافينية ونظام السايتوكروم في لبيدات غشاء المايتوكوندريا لانه يذوب في الدهن، حيث يحصل نقل الإلكترون في خطوتين ما بين NAD^+, CoQ، في خطوة لنقل إلكترون واحد من السايتوكروم b إلى الأوكسجين وفي الخطوة الثانية يتم اختزال جريئة واحدة من الأوكسجين الجزيئي إلى أيونات $2OH^-$ اللازمة لاربع إلكترونات ويمكن توضيح طبيعة CoQ والسايتوكروم c من تفاعل الأكسدة والاختزال، ففي الخطوة الأولى هي أكسدة المادة الأساس بواسطة NAD بوجود إنزيم substrate dehydrogenase.

$$Substrate + NAD^+ \longrightarrow oxidized\ substrate\ \ NADH + H^+$$

حيث يتم نقل الإلكترونات من المادة الأساس إلى NAD^+ وهناك تجهيز محدود من NAD^+الذي ينتج عن NADH من التفاعل التالي:

$$NADH + H^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2 + P$$

وتحصل أكسدة NADH بواسطة Q في الغشاء الداخلي لانتاج فوسفيت ذات طاقة عالية مما يتحول Q المؤكسد إلى الشكل المختزل dihydroubiquinone (Q_{10}) ولكن هناك تجهيز محدود للمرافق الإنزيمي Q، لذلك يعاد إنتاجه من الناتج المختزل

$$QH_2 + 2Cyt\ c \longrightarrow Q + 2H^+ + 2\ reduced\ \ Cyt\ c + Pi$$

حيث ينتج هذا التفاعل للفوسفيت ذات الطاقة العالية لان كل جريئة من السايتوكروم c تحمل إلكترون واحد فقط، في حين NAD و Q تحمل اثنان من الإلكترونات بسبب الحاجة إلى جزيئتين من السايتوكروم c، ليست كل تفاعلات الأكسدة للمواد الأساس يمكن أن يتم إنجازها في الخلايا مع NAD كحامل للإلكترون، لأن بعض المواد الأساس تتم مهاجمتها بواسطة عوامل مؤكسدة قوية الذي يمكن توليدها بدون تكوين فوسفيت ذات طاقة عالية، بعض تفاعلات الأكسدة يتم تحفيزها بواسطة dehydrogenases الذي تحتاج بروتينات فلافينية على سطح حشوة المايتوكوندريا في الغشاء الداخلي وهذه العوامل تساعد على نزع ذرات الهيدروجين مع إلكترونات مرتبطة من نواتج العمليات الايضية ونقلها إلى Q.

الفصل الخامس

المعادن في الإنزيمات

المعادن في الإنزيمات Metals in enzymes

اكثر من 25% إلى 33% من الإنزيمات المعروفة تحتاج إلى أيونات معدنية ترتبط بقوة مع الإنزيمات كجزء من تركيبها البنائي أو تحتاجها لنشاطها لأن بعض الإنزيمات يمكن تحفزها بواسطة الأيونات المعدنية، وظيفة الأيونات المعدنية في الإنزيمات تمت دراستها بواسطة التقانات التالية:

التذبذب المغناطيسي النووي Nuclear magnetic resonance (NMR)

التذبذب المغزلي الإلكتروني electron spin resonance(ESR)

الأشعة السينية لعلم البلورة X-ray crystallography

سرعة استرخاء البروتون proton relaxation rate (PRE)

تستعمل تلك التقانات لدراسة ومعرفة تكوين وتحلل المعقدات المعدنية وتفاعلاتها مما يسهل ذلك من دراسة دور الأيونات المعدنية في التحفيز الإنزيمي، فالأيونات المعدنية الداخلة في التركيب البنائي للإنزيمات لا يمكن نزعها عن الإنزيم ما لم يؤدي ذلك إلى تحطيم التركيب البنائي ففي بعض الإنزيمات المتضمنة البروتينات الفلافينية المعدنية تتفاعل عكسيا مع الأيونات المعدنية لتكوين معقدات البروتين – المعدن الذي تكون عامل مساعد فعال فالمعقد يمثل بروتينات ذات هيئة فعالة ومتخصصة في عملها مما تعمل الأيونات على تثبيت الهيئة التركيبية للبروتينات فالأيونات المعدنية لها القدرة أن تتقبل زوج من الإلكترونات لتكوين آصرة كيماوية والأيونات المعدنية يمكن أن تعمل كحوامض عامه للتفاعل مع المواد المتعادلة أو غير الأيونية ولها القدرة أن ترتبط مع اكثر من مادة واحدة أي أن لها القدرة أن تتفاعل مع 2، 4 أو 6 مركبات، الأحماض الأمينية الحرة أو في حالة ارتباطات ببتيدية في البروتينات تملك عدة مجاميع لها القدرة أن تكون معقدات مع الأيونات المعدنية مثل مجاميع الأمين والكربوكسيل لها القدرة للارتباط مع المعادن ومن المجاميع التي لها القدرة للارتباط مع الأيونات المعدنية هي مجموعة السلفاهيدريل في الحامض الأميني السستائين وحلقة الاميدازول في الهستدين مهمة في تكوين معقدات البروتين – المعدن وتقريبا كل

الإنزيمات الذي تحفز التفاعلات المتضمنة مجاميع الفوسفات تحتاج أيونات المغنيسيوم أو المنغنيز كعوامل مرافقة وغالبا ما تحتوي أيونات معدنية تملك أكثر من شحنه موجبة واحدة مثل الحديدوز والحديديك فالشحنات الموجبة تعمل على استقرارية الحالة الانتقالية بفعل التداخلات الالكتروستاتيكية وهذا هو آلية العمل التحفيزي بواسطة المعادن فالأيونات المعدنية لها القدرة لربط عدة مجاميع عندما تأخذ أزواجا من الإلكترونات الحرة لتكوين أواصر تناسقية وهي أحد أنواع الأواصر التساهمية التي تملك زوج من الإلكترونات تجهز بواسطة إحدى الذرتين اللتين تربطهما الآصرة، لذلك تساهم الأيونات المعدنية في عمل الإنزيمات بطرق مختلفة كما تعمل الأيونات المعدنية على تقريب الأنزيم والمادة الأساس من بعضها البعض الآخر بواسطة تكوين أواصر تناسقية كما تسبب الأيونات المعدنية إجهاد المادة الأساس مما تعمل الأيونات المعدنية على مسك المجاميع المتفاعلة في التركيب البنائي ذات البعد الثلاثي كما تعمل الأيونات المعدنية على استقرارية التركيب البنائي الفعال للإنزيم.

تقسيم الإنزيمات حسب وجود المعادن: يمكن تقسيم الإنزيمات الحاوية معادن إلى قسمين هما:

1. **الإنزيمات المعدنية:** وهي الإنزيمات التي تملك معدن واحد كأحد مكونات الإنزيم ولا يمكن استبدال المعدن بسهولة مع معدن آخر مثل carbonic anhydrase ,Carboxypeptidase aldolase ,alkaline phosphatase ,alcohol dehydrogenase وهي الإنزيمات الحاوية على الزنك أو phenol oxidase الذي يحتوي نحاس أو إنزيم مرتبط مع المنغنيز مثل pyruvate oxidase أو cytochrome oxidase الذي يحتوي الحديد والنحاس وإنزيم xanthine oxidase الذي يحتوي الحديد الموليبدنم.

2. **الإنزيمات المحفزة بواسطة المعادن:** مثل ATPase الذي يعتمد على الكالسيوم والمغنيسيوم و oxaloacetate,decarboxylase و enolase تحتاج أيون المغنيسيوم وهذه الأيونات يمكن استبدالها من الإنزيم بسهولة، الإنزيمات المعدنية تحتوي كميات معلومة من الأيونات المعدنية الوظيفية الذي تحتفظ بها خلال تنقية الإنزيمات ففي حالة الإنزيمات الحاوية على المعادن، فأن المعدن يرتبط بقوة مع الإنزيم ويبقى الإنزيم

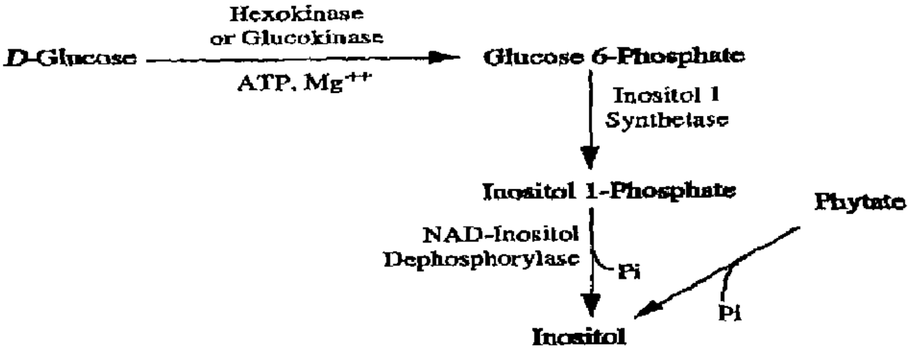
محتفظا به حتى في حالة تنقيته بينما في حالة الإنزيمات المحفزة بالمعادن يكون ارتباط المعدن بالإنزيم اقل قوة فهناك حاجة لإضافة أيونات معدنية لزيادة نشاط الإنزيم مرة أخرى، فأن التمييز بين المجموعتين يعتمد على ألفة الإنزيم تجاه الأيونات المعدنية إلا أن الآلية التي بواسطتها تستطيع الأيونات المعدنية القيام بوظيفتها تكون متشابه في كلا المجموعتين.

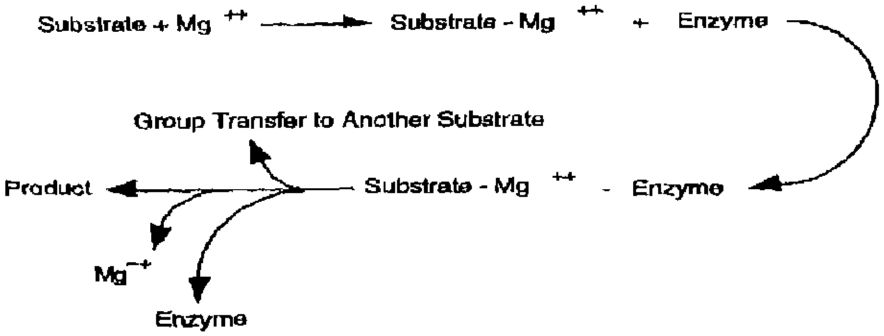
الأيونات المعدنية كعوامل مرافقة Metal ions as cofactor: بعض الإنزيمات تتألف فقط من أحماض أمينيه ولا تحتوي على مجاميع كيماوية عدا الأحماض الأمينية مثل إنزيم pancreatic ribonuclease بينما بعض الإنزيمات الأخرى تحتاج لنشاطها إلى مركبات كيماوية إضافية يطلق عليها العوامل المرافقة والعوامل المرافقة يمكن أن تكون غير عضوية مثل أيونات الحديدوز، المنغنيز والزنك (جدول-11) أو يمكن أن يكون العامل المرافق هو جزيئة عضوية معقدة يطلق عليها المرافق الإنزيمي coenzyme، بعض الإنزيمات تحتاج المرافق الإنزيمي مع واحد أو اكثر من الأيونات المعدنية لنشاطها، في بعض الإنزيمات، فأن المرافق الإنزيمي أو الأيون المعدني يرتبط ليست بقوة إلى البروتين، بل يكون مرتبط في بعض الإنزيمات بقوة إلى البروتين ففي هذه الحالة يطلق عليها المجموعة الرابطة prosthetic group وعندما يكون الإنزيم كامل وفعال تحفيزيا مع المرافق الإنزيمي والأيون المعدني يطلق علية holoenzymeوعندما يكون الإنزيم ثابت تجاه التسخين (المرافق الإنزيمي والأيون المعدني)، في حين الجزء البروتيني من الإنزيم يطلق عليهapoenzyme الذي تطرأ عليه تغيرات فيزياوية وكيماوية (دنترة) بالتسخين، يمكن للأيون المعدني أن يلعب دوراً مهماً كجسر لربط المادة الأساس مع الإنزيم معا من خلال تكوين معقد تناسقي أو تعمل الأيونات المعدنية كمجاميع تحفيزية مثل ذرات الحديد في الإنزيم كما في catalase الذي يحفز تحلل بيروكسيد الهيدروجين الذي تكون مراكز تحفيزية في الإنزيم، بعض أملاح الحديد البسيطة لها القابلية لتحليل بيروكسيد الهيدروجين والذي تزداد قابليتها مع زيادة البروتين الإنزيمي.

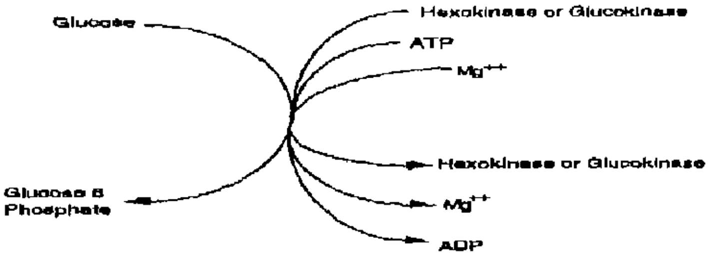
جدول(11) بعض الإنزيمات الحاوية أو تحتاج أيونات معدنية كعوامل مرافقة

الأنزيمات	الأيونات المعدنية
cytochrome oxidase	Fe^{+2} or Fe^{+3}
ascorbic oxidase	Cu^{+1} or Cu^{+2}
DNA polymerase	Zn^{+2}
Hexokinase	Mg^{+2}
Pyruvate phosphokinase	K^{+1}
Urease	Ni^{+2}
Nitrate reductase	Mo
Glutathione peroxidase	Se
Arginase	Mn^{+2}
ATPase	Na^{+1}

يلاحظ بان الأيونات المعدنية لها دور تحفيزي ودور تركيبي في 25- 33% من الإنزيمات المعروفة بالإضافة إلى ذلك لها دور تنظيمي وخاصة في التفاعلات الذي يكون فيها ATP كمادة أساس ويلاحظ أقصى نشاط أنزيمي عندما تكون المادة الأساس للتفاعل هو معقد أيون معدني-ATP عندما تكون النسبة الجزئية للمادة ATP إلى الأيون المعدني حوالي واحد، زيادة الأيون المعدني أو ATP يعمل على تثبيط التفاعل بسبب تثبيط نشاط الإنزيم، ففي حالة غياب الأيون المعدني، فأن glutamine synthetase الذي يكون ذو تركيب بنائي مرتخي relaxed غير فعال من الناحية التحفيزية، فأن إضافة أيونات Mg^{+2} أو Mn^{+2} تحول الإنزيم إلى الحالة الفعالة وهي الشكل المشدود tightened إلا أن إضافة الأدنين إلى الإنزيم يغير من تخصص الإنزيم للأيون الثنائي Mg^{+2} إلى Mn^{+2}، الإنزيم الحاوي أدنين يكون حساس تجاه نسبة ATP إلى Mn^{+2} بينما المنزوع الأدنين لا يكون حساس تجاه تلك النسبة لذلك فأن الإنزيم الحاوي على أدنين يمكن تنظيم نشاطه بواسطة السيطرة على نسبة ATP إلى أيون الفلز ودور Mg^{+2} كعامل مرافق في فسفرة الكلوكوز.







إنزيمات البروتين الفلافينية Flavoprotein enzymes: وهي تشمل العديد من الإنزيمات الحاوية على أيونات معدنية بالإضافة إلى المجموعة الفلافينية والذي تكون أساسية في نشاط الإنزيم لذلك يطلق عليها أحيانا metalloflavoprotein، فالإنزيمات التي تعود إلى المجموعة تتميز بتركيبها البنائي متعدد المكونات وظيفتها نقل الإلكترونات من المادة الأساس إلى الأوكسجين دون نقلها إلى المواد المؤكسدة مثل النترات والنتريت و NAD^+ وهي إنزيمات ذات سلسلة أحادية الببتيد بعضها يحتوي على اكثر من أيون معدني، فإن aldehyde oxidase في الكبد يحتوي حديد وكذلك xanthine oxidase في الكبد بالإضافة إلى ذلك يحتوي Mo^{+2} أو الكبريت وهو يحفز أكسدة الزانثين في أنسجة اللبائن إلى حامض اليوريك مع إنتاج بيروكسيد الهيدروجين ويحتوي NADPH nitrate reductase على Mo^{+2} وكذلك يوجد في sulfite oxidase ويحتوي

للبكتريا المثبتة للنتروجين على nitrogenase في مجموعتها الرابطة لجميع Mo, Fe ,S الإنزيمات في النقل الداخلي للإلكترون خلال تفاعلات الأكسدة والاختزال.

وظيفة الأيونات المعدنية في الإنزيمات

1. الحديد: يعتبر الحديد من العناصر المعدنية النادرة المعروفة بخصوص وظيفته الحيوية فهو أحد مركبات مجموعة الهيم وهو من البروتينات الناقلة للأوكسجين مثل الهيموكلوبين والمايوكلوبين وكذلك في البروتينات المايتوكوندرية الحاملة للإلكترون مثل السايتوكروم c، بعض الإنزيمات تحتوي الهيم كمجموعة رابطة، فأن cytochrome oxidase يساهم في تحفيز اختزال الأوكسجين الجزيئي إلى ماء بواسطة الإلكترونات القادمة من جزيئات الغذاء حيث تعاني ذرات الحديد تغيرات في قوى التكافؤ الدائرية (الحلقية) بين الحديديك والحديدوز لنقل الإلكترونات من السايتوكروم c إلى الأوكسجين الجزيئي كما يساهم cytochrome p450 في تفاعلات إضافة مجموعة الهيدروكسيل إنزيميا وكذلك نقل الإلكترونات إلى الأوكسجين وتتضمن إنزيمات الهيم الأخرى catalase الذي يحفز تحلل بيروكسيد الهيدروجين و peroxidase الذي يحفز أكسدة المواد العضوية المختلفة بواسطة البيروكسيدات، إنزيمات الهيم هي معقدات بروتين – بورفرين – حديد الذي تساهم في نقل الإلكترونات وأكسدة الأنسجة وهذه هي catalases peroxodases,lactate dehydrogenases ,tryptophan –2,3-dioxygenase cytochromes, flavoprotein dehydrogenases، أن معقدات الحديد – بورفرين المختزل تعمل كمجموعة رابطة لإنزيم nitrate reductase في النباتات وكذلك sulfate reductase بينما الإنزيمات الحاوية حديد وخالية من الهيم تشمل بعض الإنزيمات المؤكسدة أو الحاملة للإلكترون حيث يوجد الحديد في المجموعة الرابطة وليس في ارتباط مع البورفرين وتشمل هذه الإنزيمات بعض إنزيمات البروتين الفلافيني مثل α-glycerophosphate dehydrogenases و NAD-dehydrogenase في المايتوكوندريا و xanthine aldehyde oxidase, dihydroorotate dehydrogenase oxidase, في الكبد وقد يوجد الحديد مع الفلافين والكبريت وفي ارتباط تساهمي مع البروتين الإنزيمي وكذلك يوجد الحديد غير الهيمي في الإنزيمات الحاملة للإلكترون

مثل ferredoxin adrenal cortexmicrosomes adrenodoxin إلا أن المجموعة الرابطة للإنزيم قد تحتوي معقد الحديد – الكبريت وخالي من الفلافين وهو صنف من الإنزيمات الحاوية حديد ذات وظيفة مهمة في تفاعلات نقل الإلكترون في الحيوانات والنباتات والخلايا البكتيرية، تلك الإنزيمات لا تملك مجموعة هيم، بل تتميز باحتوائها على إعداد متساوية من ذرات الحديد والكبريت ومثال ذلك هنا هو ferredoxin في الكلوروبلاست ووظيفتها حمل الإلكترونات من الكلوروفيل المهيج بالضوء إلى قابلات الإلكترون المختلفة، وهي مهمة في تفاعلات نقل الإلكترون في المايتوكوندريا.

2. النحاس: يلعب النحاس دورا مهما في النشاط التحفيزي لإنزيم cytochrome oxidase الذي يحتوي على الحديد والنحاس في مجموعته الرابطة الناقلة للإلكترون وذرة النحاس في cytochrome oxidase تتحول من نحاسيك إلى نحاسوز كما تساهم في نقل الإلكترونات إلى الأوكسجين كما يوجد النحاس في المجموعة الفعالة لإنزيم Lysyl oxidase الذي يكون رابطة مستعرضة بين سلاسل الببتيد المتعددة في الكولاجين والايلاستين كما يوجد في المجاميع الرابطة لإنزيمات metalloprotein oxidase مثل cytochrome oxidase , uricase lactase, ascorbic oxidase, tyrosinase,phenolase, يقل نشاط cytochrome oxidase في المايتوكوندريا عند نقص النحاس وفقد صبغة الشعر عند نقص النحاس في الأغنام بسبب انخفاض نشاط tyrosinase في تخليق ميلانين melanin وتحتوي بلازما الإنسان على oxidoreductase copper-protein الذي يسمى non- ceruloplasmin ferroxidase كما يحتوي superoxide dismutase على جزيئتين من النحاسيك واثنين من الزنك لكل جزيئة والذي تساهم في تغير جذر superoxide إلى هيدروجين بيروكسيد بينما يحتوي superoxide dimutase في المايتوكوندريا على بروتين مختلف مع أيونات Mn^{+2} بدلا من نحاسيك و Zn^{+2} في مجموعته الرابطة.

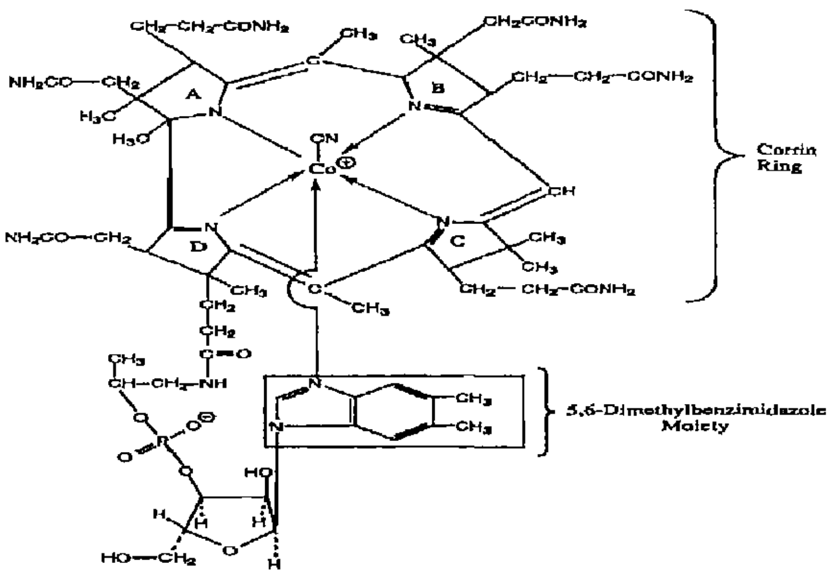
3. الزنك **Zinic**: مركب أساسي لعدد كبير من الإنزيمات وهو يوجد في إنزيمات dehydrogenase المرتبطة مع NAD^+, $NADP^+$ وهي الإنزيمات التي تحفز نقل

أيونات الهيدريد من المادة الأساس إلى المرافق الإنزيمي NAD^+,$NADP^+$ فعلى سبيل المثال يحتاج alcohol dehydrogenase في الكبد إلى NAD^+ وهو يساهم في نزع ذرتي هيدروجين من الايثانول لانتاج اسيتالديهايد وهو يحتوي ذرتين من أيون الزنك الذي تربط NAD^+ إلى الموقع الفعال من الإنزيم كما يكون مركب أساسي لإنزيمات DNA , RNA polymerase الذي تساهم في التفاعلات الإنزيمية المتضمنة في تكرار وترجمة المعلومات الوراثية كما يوجد في إنزيم carbonic anhydrase الذي يحفز إضافة ماء إلى ثاني اوكسيد الكربون لتكوين حامض الكربونيك وكذلك في إنزيمات تحلل البروتين مثل Carboxypeptidase الذي يفرز في الأمعاء الدقيقة ويعتبر superoxide dimutase الموجود في السايتوسول الكبد والدماغ وخلايا الدم الحاوي معقد بروتين – زنك – نحاس مع اثنين من Zn^{+2}\ جزيئة ومن الإنزيمات الحاوية زنك هي الإنزيمات الموجودة في العصير المعوي Leucine aminopeptidase وإنزيم pyruvate carboxylase في الخمائر وإنزيم methylmalonyl-oxaloacetate transcarboxylase في بكتريا البروبيونيك وإنزيم retinene reductase في الشبكية والذي تساهم في توليد رودوبسين في العين خلال التكيف للظلام بعد الإضاءة.

4. المنغنيز Mn^{+2}: يعمل المنغنيز إما بشكل عامل مرافق أو كمحفز لعدد من الإنزيمات منها cholinesterase ,ACP holoprotein synthetase , arginase , isocitrate dehydrogenase , enolase ,lipoprotein lipase ,glycyl –glycine dipeptidase, 5-oxoprolinase , leucine aminopeptidase ,phosphotransferase , phosphatidyl inositol kinase ,glycolipid galactose transferase، فأن إنزيم arginase الذي يحلل الأرجين إلى يوريا كناتج نهائي هدم المجاميع الأمينية في الإنسان وهو يحتوي على Mn^{+2} مرتبط بقوة مع الإنزيم مما يكون أساس لنشاط الإنزيم ويعمل المنغنيز كعامل مرافق لبعض الإنزيمات الناقلة للفوسفيت وفي التفاعلات الإنزيمية الذي تنتج أوكسجين خلال التركيب الضوئي في الكلوروبلاست في النبات.

5. الكوبالت: يعمل الكوبالت كمرافق إنزيمي لعدد من glycyl-glycine dipeptidase في العصير المعوي و methyl-malonyl acetoacetate

transcarboxylase في بكتريا حامض البروبيونيك و aldolase في الخمائر ففي بعض تلك الإنزيمات، فأن أيون الكوبالت يمكن أن يستبدل بواسطة Mn^{+2} أو Zn^{+2} كعوامل مرافقة وهو يمكن أن يحل محل الزنك في carbonic anhydrase أو المغنيسيوم في Amlev synthetase بالإضافة إلى كل ذلك يمكن للكوبالت أن يكون أحد مكونات فيتامين سيانوكوبال أمين أو ما يطلق عليه B_{12} الموجود في



المرافق الإنزيمي كوباميد وهو يوجد في إنزيمات β-lysine Isomerase ribonucleotide triphosphate reductase,methylmalonyl-CoA .dialdohydrase isomerase , thymidylate synthetase

6. السيلينيوم Se: يملك glutathione peroxidase على السيلينيوم الذي يمنع التلف التاكسدي للهيموكلوبين بسبب اختزال بيروكسيد الهيدروجين والبيروكسيدات للأحماض الدهنية مع تحفيز أكسدة الكلوتاثايون المختزل.

7. المولبيدم Mo: يعتبر أحد مكونات الإنزيمات التي تحتوي حديد خالي من الهيم مثل aldehyde oxidase في الكبد و xanthine oxidase في الكبد والأمعاء والحليب، فأن xanthine oxidases تحتوي Mo^{+2}، كبريت، حديد وفلافين وهي تحفز أكسدة الزانثين إلى حامض اليوريك لانتاج بيروكسيد الهيدروجين، وكذلك يوجد في NADPH nitrate reductase وفي sulfite oxidase الذي يحتوي المولبيدم

وهيم وخالي من الفلافين في مجموعته الرابطة والذي تأكسد الكبريتيت غير العضوي إلى كبريتات وإنزيم nitrogenase في البكتريا المثبتة للنتروجين يملك موليبدنم وحديد وكبريت في مجموعتها الرابطة، أن الموليبدنم في الإنزيمات المذكورة أعلاه تساهم في نقل الإلكترونات الداخلية خلال تفاعلات الأكسدة والاختزال.

8. **بعض العناصر النادرة الأخرى:** تملك المواقع الفعالة لبعض الإنزيمات الفلافينية مثل flavin dehydrogenases على ألفاناديوم مثل xanthine oxidase الذي يحفز أكسدة بعض البيورينات لانتاج حامض اليوريك الذي يملك مجموعة رابطه من FAD وحاوية على موليبدنم وفاناديوم أما السليكون فهو يوجد في حالة سليكا والنيكل وهو أحد مكونات Urease

دور الأيونات في تكوين معقدات العناصر الثلاثية Ternary complexes

معقدات المادة الأساس -المعدن – الإنزيم هي معقدات العناصر الثلاثية بين الموقع التحفيزي للإنزيم En والأيون المعدني M والمادة الأساس S بنسبة 1:1:1، كل الاحتمالات الأربعة للإنزيمات المحفزة بالمعادن فالإنزيمات المعدنية لا تستطيع تكوين معقدات En-S-M لأنها تحفظ المعدن من خلال عمليات التنقية حيث أن معظم وليست كل إنزيمات kinases مثل ATP-phosphotransferase لها القدرة أن تكون معقدات جسر – المادة الأساس من نوع En-nucleotide-M بينما إنزيمات phosphotransferase الذي تستعمل البيروفيت أو الفوسفواينول بيروفيت كمادة أساس وهي الإنزيمات التي تحفز التفاعلات الأخرى من الفوسفواينول بيروفيت و carbpoxylases من معقدات جسر – المعدن، بعض الإنزيمات يمكنها أن تكون نوع واحد من معقدات جسر مع واحد من المواد الأساس ومن هذه المعقدات هي:

أ. **معقدات جسر – الإنزيم enzyme –bridge complexes:** يمثل معقدا ت جسر – الإنزيم الشكل M-En-S فأن المعدن في معقدات جسر – الإنزيم له دور في عملية المحافظة على التركيب البنائي والتكوين الفعال لإنزيم glutamine synthetase أو تكوين جسر معدني مع المادة الأساس لإنزيم pyruvate kinase

بالإضافة إلى الدور التركيبي للمعدن، فأن الأيون المعدني في إنزيم pyruvate kinase بأنه يحجز مادة أساس واحدة في مكان ثم ينشطها.

ب. معقدات جسر – المادة الأساس substrate –bridge complexes: معقدات جسر– المادة الأساس هو En-S-M وهو يتضمن تكوين معقدات جسر – المادة الأساس للعناصر الثلاثية من نيوكلوسيدات ثلاثية الفوسفيت مع الإنزيم، المعدن والمادة الأساس وذلك بسبب إزاحة الماء بواسطة ATP من المجال التناسقي المعدني.

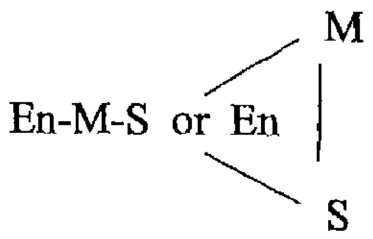
$$ATP\text{–}M\,(H_2O)^{6+2} \longleftrightarrow ATP\text{-}M(H^2O)_3^{-2} + 3H_2O$$

ترتبط المادة الأساس لتكوين معقدات العناصر الثلاثية مع الإنزيم

$$ATP\text{-}M\,(H_2O)_3^{-2} + En \longleftrightarrow EN\text{-}ATP\text{-}M(H_2O)^{-2}$$

في تفاعلات phosphotransferase فأن الأيونات المعدنية تنشط ذرات الفسفور لتكوين معقد أدنين – فوسفيت متعدد ذات هيئة تركيبية مناسبة في المعقد الرباعي الفعال.

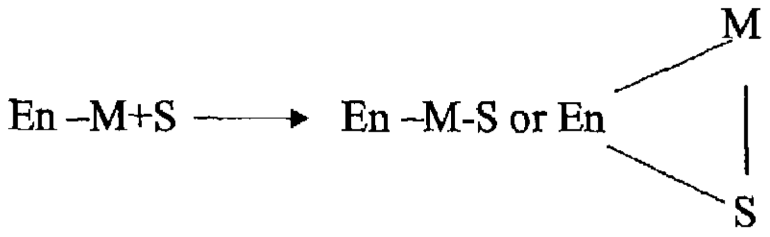
ج. معقدات جسر – المعدن: أثبتت دراسات الأشعة السينية لعلم البلورات وتعاقب الببتيدات بان الحامض الأميني الهستدين له علاقة بارتباط المعدن في الموقع الفعال في العديد من الإنزيمات مثل Carboxypeptidase A, ,methemoglobin cytochrome c, metmyoglobin , rubredoxin أما فيما يخص آلية تكوين المعقدات الثنائية وهي معقدات الفلز–الإنزيم وخطوة تحديد السرعة يتم فيها ترحيل الماء من المجال التناسقي للأيون المعدني ففي العديد من الإنزيمات الببتيدية peptidases يكون تنشيط الإنزيمات بواسطة الأيونات المعدنية منخفض ويحتاج إلى عدة ساعات لاكتمال التفاعل فأن التفاعلات البطيئة تعيد الترتيب البنائي الشكلي للمعقدات الثنائية للمعدن – الإنزيم إلى الشكل الفعال.



ارتباط المعدن Metal binding: يحصل إعادة ترتيب للتركيب البنائي الشكلي الفعال لتكوين E nz.

$$Enz\text{-}M(H_2O)^{6-n} \longrightarrow En\text{-}M(H_2O)^{6-n}$$

كما يحصل ارتباط المادة الأساس S مع معقد المعدن – الإنزيم الثنائي لتكوين معقد جسر -معدن ثلاثي في الإنزيمات المعدنية.



دور الأيونات المعدنية في تحفيز الإنزيمات: يمكن أن تساهم الأيونات المعدنية في كل من أربعة آليات التي تجعل من التفاعلات الكيماوية مهمة وهي:

1. **تحفيز الحامض – القاعدة العام:** وهو الذي تشبه الأيونات المعدنية والبروتونات الذي هي حوامض لويس الباحثة عن الإلكترونات والذي تستطيع أن تقاسم أو تشارك في تكوين زوج من الإلكترونات في آصرة سكما كما يمكن أن تعتبر الأيونات المعدنية أحماض جيدة وممتازة فأنه يمكن وجودها في المحلول المتعادل والذي تملك اكثر من شحنه موجبة واحدة لذلك يمكن لها أن تكون آصرة بآي ومع كل ذلك فهي تختلف عن البروتونات لان الأيونات المعدنية تعمل كقالب ذو ثلاث أبعاد لتوجيه وربط المجاميع القاعدية على الإنزيم أو المادة الأساس.

2. **التحفيز التساهمي:** تستطيع الأيونات المعدنية أن تستقبل الإلكترونات عن طريق أواصر سكما وبآي لتنشيط الباحث عن الإلكترونات أو الباحث عن النواة (التحفيز الحامضي – القاعدي العام) وعند إعطاء أو وهب الإلكترونات فان الأيونات المعدنية تستطيع أن تنشط الباحث عن النواة أو تعمل كباحث عن النواة ويساعد المجال التناسقي للمعادن في تقريب الإنزيم والمادة الأساس أو تكوين تشابك يحدث انحناء أو اعوجاج في أما الإنزيمات أو المادة الأساس أو يحجب الأيون المعدني الباحث عن النواة مما يمنع أي تفاعل جانبي محتمل.

3. **تقارب المواد المتفاعلة:** يساعد المجال التناسقي للمعادن في تقارب الإنزيم والمادة الأساس مع بعضها البعض الآخر مما يسبب ذلك انحناء أو اعوجاج بسبب التشابك أما في الإنزيم أو المادة الأساس.

4. **استحداث الشد في الإنزيم أو المادة الأساس:** يحصل اعوجاج أو التواء بسبب تشابك الأيونات المعدنية مع الإنزيم والمادة الأساس بسبب الشد بينهما مما يمنع حدوث أي تفاعل جانبي ممكن حدوثه فالسيطرة الكيماوية للتفاعلات المحفزة بواسطة الإنزيمات يمكن إنجازها بواسطة المجال التناسقي للمعدن كي تعمل كقالب ذي ثلاث أبعاد يحمل المجاميع الفعالة في اتجاهات فراغية معينه.

تنشيط الإنزيمات بواسطة الأيونات المعدنية

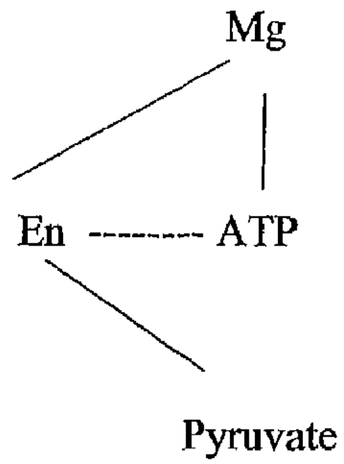
1. **تنشيط الإنزيمات بواسطة الأيونات المعدنية الموجبة القلوية أحادية الشحنة:** يحصل ارتباط ضعيف للأيونات المعدنية القلوية الأحادية الشحنه الموجبة مثل أيونات البوتاسيوم والصوديوم لتكوين مركبات معقدة مع الإنزيمات ويعتبر أيون البوتاسيوم من اكثر الأيونات الموجبة انتشارا داخل الخلية والذي يعمل على تنشيط العديد من الإنزيمات وخاصة تلك الإنزيمات التي تساعد في نقل مجاميع الفوسفيت أو تفاعلات الطرد أو الإبعاد حيث يرتبط أيون البوتاسيوم مع المجاميع ذات الشحنه السالبة على الصيغة غير الفعالة للإنزيم مما يحدث الارتباط تغير في الصيغة غير الفعالة إلى الصيغة الأكثر فعالية للإنزيم مثل pyruvate kinase الموجود في العضلات الذي يحتوي أربع وحدات فرعية فان الإنزيم يحتاج إلى أيون معدني أحادى الشحنه الموجبة بالإضافة إلى

ذلك يحتاج أيونات المنغنيز أو المغنيسيوم والذي ترتبط جميعا في الموقع الفعال للإنزيم حيث يرتبط إلى الإنزيم المرتبط مع أيون البوتاسيوم بمجموعة الكربوكسيل للفوسفواينول بيروفيت PEP مما يسبب ذلك تغيرا في التركيب البنائي للإنزيم مما يسهل ذلك في زيادة سرعة التفاعل نحو الأمام عند تكوين معقد $PEP–En\text{-}Mn^{+2}$.

2. **تنشيط الإنزيمات بواسطة الأيونات الموجبة القلوية ثنائية الشحنه:** تساهم ذرات الأوكسجين في أواصر الأيونات المعدنية القلوية ثنائية الشحنه الموجبة مثل أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم في تكوين أواصر تناسقية مما يؤدي ذلك إلى تكوين مركبات معقدة ثماني الأوجه يطلق عليها octahedral وتتجمع أيونات المغنيسيوم داخل الخلايا التي تبادلها مع أيونات الكالسيوم الموجودة خارج الخلايا وذلك لان الإنزيمات التي تحتاج أيونات الكالسيوم لنشاطها غالبا ما توجد خارج الخلايا مثل amylase اللعاب والبنكرياس حيث يحافظ أيون الكالسيوم على التركيب البنائي اللازم لنشاط الإنزيم وهناك العديد من الإنزيمات الموجودة داخل الخلايا وتحتاج إلى أيونات وتشير الدراسات التي أجريت إلى وجود جميع الأنواع المختلفة من المركبات المعقدة الثلاثية التي تساهم فيها الأيونات الموجبة ثنائية الشحنة حيث تكون معظم إنزيمات kinases معقدات من نوع En-N-M حيث أن N هي نيوكلوتيدات متفاعلة.

$$\text{Creatine} + \text{Mg-ATP} \longrightarrow \text{Mg-ADP} + \text{phosphocreatine} + H^{+}$$

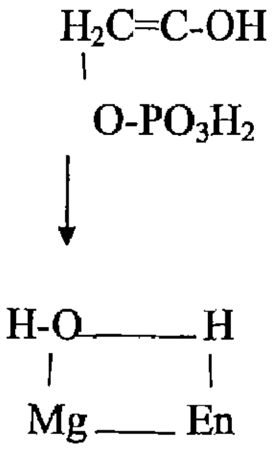
أن المادة الأساس الحقيقية للإنزيم هي Mg-ATP ويحصل التفاعل نتيجة تكوين معقد Mg-ATP-En-creatine حيث أن الأيونات الموجبة ثنائية الشحنه يرتبط مع ألفا- فوسفيت أو بيتا- فوسفيت للنيوكلوتيد ولا يرتبط مع كاما- فوسفيت التي تنتقل إلى الكرياتين حيث يعمل الأيون الموجب في التوجيه الصحيح للمركب المعقد وقد يساعد في تحطيم آصرة بيروفوسفيت عن طريق سحب الإلكترونات من بيتا- فوسفيت وللتفاعل الكلي آلية حركية من نوع توازن سريع مرتب عشوائيا مع تكوين معقد ذات طريق مسدود، $\text{Creatine-En-ADP-}Mn^{+2}$ ويشمل التفاعل الذي يساعد فيه pyruvate kinase على تكوين مركب معقد حلقي يشترك فيه الأيون المعدني



ومن الأمثلة الأخرى للتفاعل الذي يساهم فيه إنزيم enolase هو

$$\text{Phosphoenolpyruvate} + H_2O \longleftrightarrow \text{2-phosphoglycerate}$$

يتكون إنزيم enolase من وحدتين فرعيتين لذلك هناك حاجة إلى ايونين من المغنيسيوم لجعل الجزيئة ثنائية السلسلة الببتيدية فعالة ومستقرة بالإضافة إلى ذلك هناك حاجة إلى ايونين من المغنيسيوم لكل موقع فعال يكون في حالة ارتباط للمادة الأساس به وتشير الدراسات بان الأيونات الموجبة المرتبطة مع الإنزيم لها القدرة أن ترتبط مع جزيئة ماء لتكوين مجموعة هيدروكسيل من نوع ا تناسقي لها القدرة على مهاجمة PEP.



وهناك القليل من الإنزيمات مثل glutamine synthetase لبكتريا القولون التي لها آلية تتضمن تكوين مركب معقد مرتبط بجسر مع الإنزيم وهذا ما يجعل للأيون الموجب ثنائي الشحنه دور تركيبي متخصص.

3. **تنشيط الإنزيمات بواسطة انتقال الأيونات المعدنية النادرة:** ترتبط أيونات المعادن النادرة مثل النحاس، الزنك، الموليبدنم، الحديد والكوبالت الانتقالية مع الإنزيمات بقوة اكبر مقارنة مع الأيونات المعدنية أحادية أو ثنائية الشحنه الموجبة وهذه غالبا ما تكون الإنزيمات المعدنية وهذه الإنزيمات تلعب دوراً مهماً في المرافقات الإنزيمية وهي توجد بكميات قليلة في الكائنات الحية لان للكميات الكبيرة من العناصر النادرة تأثير سمي على الإنزيمات ويحتويnitric oxidoreductase على أيونات الحديد والموليبدنم النادرين وهو من الإنزيمات الذي توجد في المركب المعقد الذي ينشط النتروجين للبكتريا المثبتة له أما الحديد فهو أحد مكونات الهيموكلوبين والكوبالت في فيتامين B_{12} وsuper oxide dimutase الذي يحتوي على النحاس الذي يساعد على نزع OO^{-} الفعال جدا بواسطة أكسدة الزانثين بواسطة الأوكسجين الجزيئي عند وجود xanthine oxidase.

$$2OO^{-} + 2H^{+} \longleftrightarrow H_2O_2 + O_2$$

ويتكون super oxide dimutase في خلايا الدم الحمراء للأبقار من وحدتين فرعيتين تحتويان على ايونين من النحاس وإيونين من الزنك فان لأيونات النحاس دوراً ووظيفة تركيبية مهمة بينما تشارك أيونات النحاس في التفاعل الكيمياوي.

$$En\text{-}Cu^{+2} + OO^{-} \longrightarrow En\text{-}Cu^{+1} + O_2$$

$$En\text{-}Cu^{+1} + OO^{-} + 2H^{+} \longrightarrow En - Cu^{+2} + H_2O_2$$

كما يكون لأيونات الزنك دورا مساعدا في التفاعل الكيمياوي لإنزيم carboxy peptidase A الذي يعمل على إزالة الحامض الأميني الحاوي على مجموعة كربوكسيل حرة في الطرف الأميني الكربوكسيلي بشرط أن يكون الحامض الأميني ذو سلسلة طرفية لا قطبية فالإنزيم carboxy peptidase A الذي مصدرة البنكرياس في الأبقار يتكون من سلسله ببتيدية واحده ويملك ذرة زنك واحدة ويحتوي الموقع الفعال على أيون الزنك المرتبط بالحامض الأميني الهستدين في الموقع69 والكلوتاميك في الموقع 72 والهستدين في الموقع196 وجزيئه ماء كما يحتوي الموقع الفعال على شق ضيق طويل لدخول المادة الأساس

وعلى جيب لربط السلسلة الطرفية للحامض الأميني الحاوي على المجموعة الكربوكسيلية الحرة حيث يحصل تجاذب الكتروستاتيكي بين المجموعة الكربوكسيلية الطرفية وبين الارجنين في الموقع 142 أثناء التفاعل ويحل الأوكسجين الكربونيلي الذي يعود للآصرة الببتيدية المتحللة محل جزيئات الماء الذي تكون مرتبطة مع الزنك وبسهل الأيون المعدني على تحلل الآصرة الببتيدية عن طريق سحب الإلكترونات من مجموعة الكربونيل وان التايروسين في الموقع 248 يقع في موقع في المركب المعقد بين الإنزيم والمادة الأساس بحيث يسهل من إعطاء بروتون إلى نتروجين الآصرة الببتيدية المتحللة وتشير الدراسات بأن المجموعة الكربوكسيلية الذي تعود للحامض الأميني Glu في الموقع270 تعمل كقاعدة مساعدة لجعل جزيئة الماء المهاجمة باحثه عن النواة وان ارتباط المادة الأساس بالإنزيم يؤدي إلى تحريك كم من Arg في الموقع145 و Glu في الموقع270 والتايروسين في الموقع 248 إلى مواقع جديدة قريبة من المادة الأساس مما يؤدي ذلك إلى طرد جزيئة الماء من الموقع الفعال مما تخلق ظروف محبه للماء مما يجعل المادة الأساس ترتبط بالموقع الفعال بقوة مما يسبب ذلك من حدوث تغيرات في التركيب البنائي مما يسمح للمادة الأساس أن تدخل إلى الموقع الفعال.

الفصل السادس

التركيب البنائي للإنزيمات

التركيب البنائي للإنزيمات Structure of enzymes

بما أن جميع الإنزيمات هي عبارة عن مواد بروتينية، فهي تتكون من أحماض أمينية من النوع ألفا amino acids متصلة مع بعضها كوحدات بنائية بواسطة روابط ببتيدية peptide linkages مكونة بذلك سلاسل طويلة أحادية monomer أو متعددة قصيرة السلسلة oligomer فأن تسلسل وترتيب وتعاقب الأحماض الأمينية في الإنزيمات تكون متخصصة ويقرر نوع الإنزيم وتتكون بعض الإنزيمات من الأحماض الأمينية فقط مثل الببسين والتربسين أو قد تحتوي على مركبات أخرى إضافة إلى الأحماض الأمينية والتي تكون مرتبطة بقوة أو لا ترتبط بقوة إلى الأحماض الأمينية وغالبا ما تكون مركبات لا عضوية يطلق عليها الإنزيمات المعدنية metal enzymes ويحصل ترتيب هذه المكونات بعضها مع البعض الآخر وتركيبها البنائي المجسم (التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد) في الفراغ ثم الهيئة التركيبية conformation والشكلية configuration الذي تكون علية السلسلة الببتيدية للإنزيم بسبب التوزيع الفضائي ونتيجة لالتفاف السلسلة الببتيدية حول بعضها أو انفصالها بسبب وجود أو عدم وجود الأواصر بين السلاسل الببتيدية المتعددة أو حتى ضمن السلسة الببتيدية الواحدة وتختلف الإنزيمات بعضها عن البعض الآخر في التركيب البنائي حسب عدد ونوع وترتيب الأحماض الأمينية بالنسبة لبعضها في السلسلة أو السلاسل الببتيدية المكونة لها والتوزيع الفراغي للذرات والمجموعات لكل سلسلة ببتيدية ويحدد ذلك درجة الالتواء أو الانحناء أو الالتفاف أو الانطواء على طول السلسلة الببتيدية مما يحدد الشكل للسلسلة سواء كان حلزوني أو مبروم ثم شكل تكوين التركيب البنائي ثلاثي الإبعاد للإنزيم.

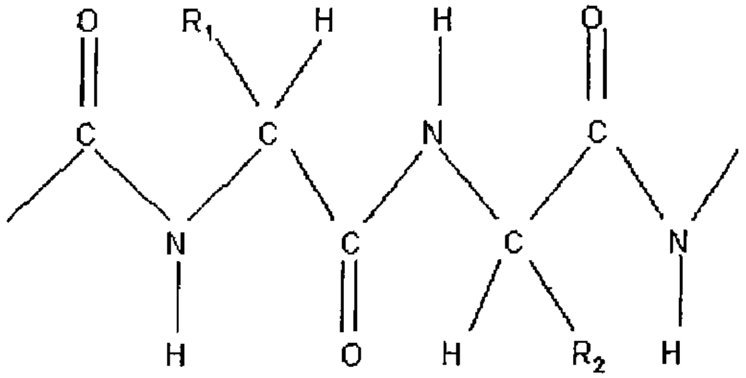
الأواصر المسؤولة عن التركيب البنائي: يثبت التركيب البنائي للإنزيمات بصورة عامه بواسطة صنفين من الأواصر القوية هي الأواصر الببتيدية والأواصر ثنائية الكبريتيد وثلاث أصناف من الأواصر الضعيفة مثل الآصرة الهيدروجينية والآصرة المحبة للماء والآصرة الالكتروستاتيكية بالإضافة إلى أواصر قوى فان در فال وأواصر أيونية والأواصر التناسقية فالتركيب البنائي الأولي للإنزيمات مشتق من الروابط التساهمية للأحماض الأمينية من نوع ألفا المكونة للإنزيمات بواسطة أواصر ببتيدية من نوع ألفا peptide bonds حيث تأخذ

السلسلة الببتيدية الشكل الذي يحدد التركيب البنائي المجسم ثلاثي الإبعاد للإنزيم من خلال الالتفاف الحلزوني المبروم على طول السلسلة الببتيدية وحول بعضها أو يتكون الإنزيم من سلاسل ببتيدية متعددة قصيرة السلسلة oligomeric enzymes يلتف أو يرتبط بعضها مع البعض الآخر والذي يساعد على ثبات السلاسل مع بعضها وتلك الأواصر أو الروابط الآنفة الذكر والذي تعمل على أحكام تثبيت السلسلة في الأوضاع التي تأخذها الإنزيمات حيث تحصل تداخلات منظمه بواسطة ثلاثة أنواع مختلفة من القوى هي التفاف الجزيئات الإنزيمية وارتباط المادة الأساس إلى الإنزيم والتداخلات الخلوية في الأنظمة الحيوية وتلك التداخلات تحتاج إلى أواصر الكتروستاتيكية وأواصر هيدروجينية وقوى فان در فال وتلك الأواصر اللاتساهمية الأساسية الثلاثة تختلف في متطلباتها الهندسية والقوة والتخصص وهي أيضا تتأثر بطرق مختلفة بوجود الماء، فالمجاميع المشحونة على المادة الأساس تتداخل مع المجموعة المشحونة على الإنزيم مما يسبب ذلك قوى أو تداخلات الكتروستاتيكية وارتباط glycyl –tyrosine إلى carboxypeptidase A يسبب أيضا تداخلات الكتروستاتيكية

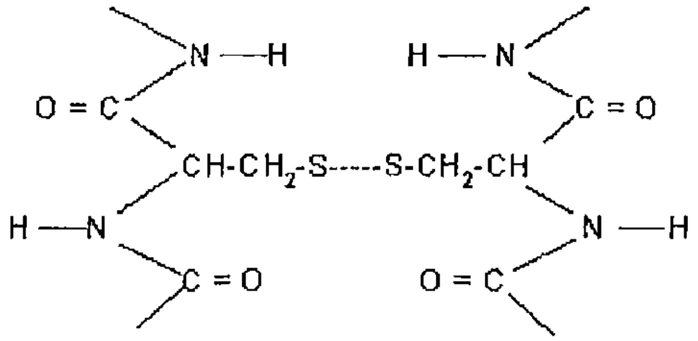
1. **الأواصر الببتيدية peptide bonds**: يتكون التركيب البنائي الأولي للإنزيم من ارتباط الأحماض الأمينية بعضها مع البعض الآخر بواسطة روابط ببتيدية تساهمية ناتجة عن ارتباط ذرة الكربون الذي تحمل مجموعة الكربوكسيل في حامض أميني مع ذرة النتروجين للمجموعة الأمينية في الموقع ألفا من الحامض الأميني الآخر ولا توجد هناك حرية للدوران حول الآصرة الذي تربط بين ذرتي الكربون والنتروجين المكونة للآصرة الببتيدية، فإن الذرات الأربعة (الأوكسجين، الهيدروجين، الكربون، النتروجين) تقع في نفس المستوى، ولكن هناك حرية الدوران حول الأواصر الأخرى من السلسلة الببتيدية الذي يمكن توضيحها في الشكلين التاليين.

$$R\text{-}CH(NH_2)COOH + R_1\text{-}CH(NH_2)\ COOH$$
$$\downarrow$$
$$R\text{-}CH(NH_2)\ CO\text{-}NH\text{-}CH(COOH)R_2$$
$$\uparrow$$

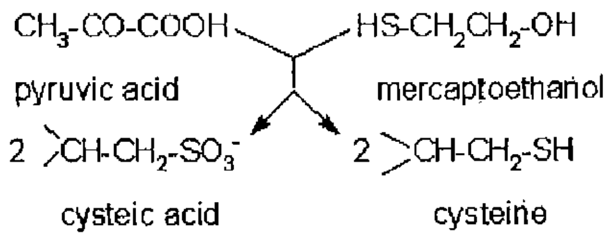
آصرة ببتيدية



2. **أواصر ثنائية الكبريتيد bonds disulfide**: تتكون أواصر ثنائية الكبريتيد بين اثنان من الأحماض الأمينية السستائين cysteine لربط سلسلتين مع بعضهما البعض الآخر أو ناتجة عن ارتباط الأواصر الكبريتية وثنائية الكبريتيد الموجودة بين جزيئتين من السستين cystine للحفاظ على التركيب البنائي الثلاثي الأبعاد للإنزيمات وهي آصرة ثابتة نسبيا وتقاوم الظروف الاعتيادية لدنترة البروتين وتتأكسد آصرة ثنائية الكبريتيد بواسطة حامض البيرفورميك أو تختزل بواسطة بيتا- ميركابتوايثانول لتكوين جزيئتين من السستائين ويمكن فصل السلسلة الببتيدية المتعددة المرتبطة بواسطة أواصر ثنائية الكبريتيد بدون التأثير على التركيب البنائي الأولي (الشكل –19) وترتبط آصرة ثنائي الكبريتيد بين سلسلتين متوازيتين في إنزيم ribonuclease (الشكل-20).

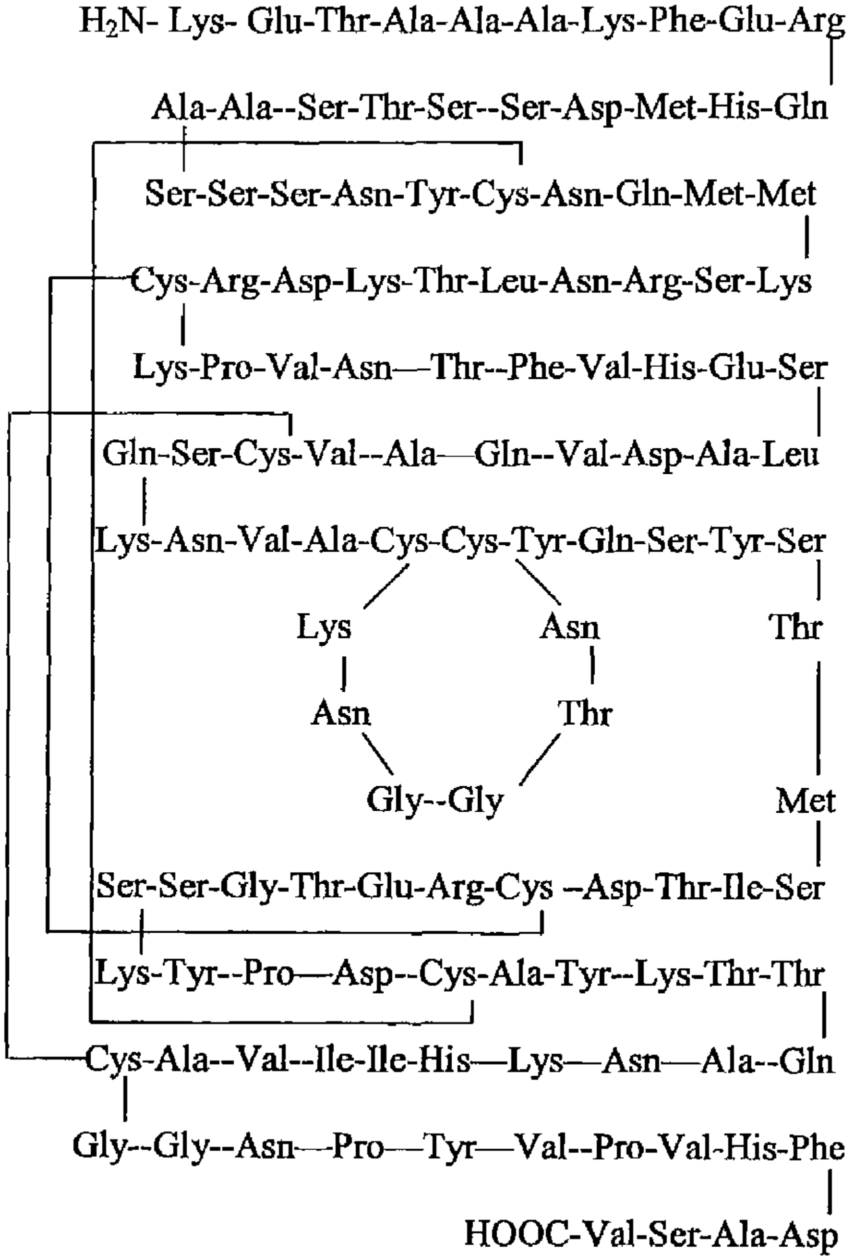


سلسلة ببتيدية مرتبطة بواسطة آصرة ثنائية الكبريتيد



الشكل (19) تشقق أصرة ثنائي الكبريتيد بواسطة أكسدة البيروفيك والاختزال بواسطة بيتا – ميركابتوايثانول

3. **الأواصر الهيدروجينية hydrogen bonds:** تتكون الأواصر الهيدروجينية في داخل السلسلة الببتيدية والذي تربط الأحماض الأمينية الناتجة عن مشاركة ذرات النتروجين وذرات الأوكسجين الكربونيلي الموجودة في السلسلة الببتيدية الواحدة أو في السلاسل الببتيدية المتعددة في الإنزيمات وهي تلعب دوراً مهماً في المحافظة على التركيب البنائي لبروتينات الإنزيمات، هناك العديد من المواد الأساس للإنزيمات الذي تكون غير مشحونة مع ذلك فهي ترتبط إلى الإنزيمات مع ألفة عالية مع تخصص عالي أيضا حيث تحصل تداخلات بين المواد الأساس غير المشحونة وكذلك مع معظم المواد الأساس المشحونة عن طريق تكوين أواصر هيدروجينية حيث تساهم ذرة الهيدروجين مع ذرتين أخرى، فإن الذرة الذي تكون اكثر ارتباط مع الهيدروجين تسمى واهبة الهيدروجين بينما الذرة الأخرى تسمى قابلة الهيدروجين.



الشكل(20) تسلسل الأحماض الأمينية في إنزيم ribonuclease البقري

يوضح أواصر ثنائية الكبريتيد

فالأصرة الهيدروجينية تعتبر وسط في نقل البروتون من الحامض إلى القاعدة، فالذرة القابلة تملك شحنه سالبة جزئيا الذي تجذب ذرة الهيدروجين، فالذرة الواهبة في الآصرة الهيدروجينية في الانظمه البيولوجية هي ذرة أوكسجين أو نتروجين (الجدول-13).

جدول(13) أنواع الأواصر الهيدروجينية وإبعادها

الأبعاد بالانكستروم	الآصرة
2.70	O ——— H-------O
2.63	O ——— H-------O-
2.88	O ——— H-------O
3.04	N ——— H-------O
2.93	N^+ ——— H-------O
3.10	N ——— H-------N

طاقة الآصرة الهيدروجينية تتراوح ما بين 3-7 كيلو سعره \ جول وتكون الأواصر الهيدروجينية أقوى من أواصر فان در فال وتلعب الآصرة الهيدروجينية دورا مهما في ارتباط المادة الأساس مع الإنزيم وعلى سبيل المثال يمكن ملاحظة ارتباط اليوريدين في المادة الأساس إلى إنزيم الرايبونيوكليز البنكرياسي الذي يشقق حامض الرايبونيوكليك (الشكل-20) حيث توجد هناك ثلاثة أواصر هيدروجينية هي:

أ. واحدة ناتجة عن مجاميع C=O في اليوردين مع النتروجين الببتيدي H---N.

ب. مجموعة H---N في حلقة اليوردين في المادة الأساس تكون آصرة مع مجموعة OH- للحامض الأميني الثريونين.

ج. مجموعة C=O في الحلقة الأخرى تكون آصرة هيدروجينية مع مجموعة OH- في الحامض الأميني السيرين.

تستطيع السلاسل الجانبية للحامض الأميني والسلسلة الببتيدية أن تكون أنواع مختلفة من الأواصر الهيدروجينية وإحدى عشر حامض أميني من مجموع 20 حامض أميني لها القدرة أن تكون أواصر هيدروجينية من خلال سلسلتها الجانبية.

4. الأواصر الالكتروستاتيكية **electrostatic bonds**: هي أواصر ملحية بين والمجاميع المشحونة المتعاكسة في السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية، المجموعة الأمينية في الوضع ابسيلون للحامض الأميني اللايسين تحمل شحنه موجبة في الأس

الهيدروجيني الفسيولوجي حيث تتكون الأواصر الالكتروستاتيكية في التراكيب البنائية الثلاثية والرباعية بين الأحماض الأمينية المكونة للإنزيمات ذات الشحنات المختلفة، حيث يحصل تداخل الكتروستاتيكي لثبات التركيب البنائي لجزيئات البروتين الإنزيمي، المادة الأساس ذات الشحنه السالبة يمكن أن تكون آصرة الكتروستاتيكية مع السلسلة الجانبية ذات الشحنه الموجبة من الحامض الأميني اللايسين أو الارجنين حيث أن مجموعة الاميدازول في الحامض الأميني الهستدين ومجموعة الأمين الطرفية لها القدرة العالية للارتباط مع المادة الأساس ذات الشحنه السالبة، فأن مواقع الربط على الإنزيم تملك مجاميع كربوكسيلية ذات شحنه سالبة على الأحماض الأمينية الكلوتامين والاسبارجين ومجاميع كربوكسيلية طرفية على السلسلة الببتيدية المتعددة.

5. **الأواصر غير المحبة للماء hydrophobic bonds**: الآصرة غير المحبة للماء أو التداخلات غير المحبة للماء هي ميل المركبات الهيدروكربونية للتجاذب مع بعضها البعض الآخر في البيئة المائية حيث تتكون أواصر في المناطق غير المحبة للماء في بروتين الإنزيم والذي تلعب دوراً مهماً في استقرار التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد لان المحيط المائي يشجع المجاميع الحاوية على الشحنات في بروتين الإنزيم لتكوين أواصر مع جزيئات الماء المحيطة بها بدلا من تكوينها مع مجموعة أخرى حاوية على شحنه لأن السلاسل الجانبية غير القطبية للأحماض الأمينية المتعادلة في الإنزيمات لها القابلية للارتباط مع بعضها البعض الآخر في الماء بسبب التداخلات غير المحبة للماء مما قد تؤدي إلى التفاف جزيئات الإنزيمات عند ارتباط الإنزيم مع المادة الأساس.

6. **التداخلات الايونية ionic interactions**: هي التداخلات الضعيفة التي تحدث بين المادة الأساس والإنزيم لا تساهميا، فان ارتباط كلايسيل- تايروسين كمادة أساس إلى الإنزيم carboxy peptidase a لا تساهميا سيعمل الإنزيم على تشقق مجاميع الكربوكسيل الطرفية من المادة الأساس، فأن مجاميع الكربوكسيل الطرفية ذات الشحنه السالبة في السلسلة الببتيدية الثنائية للمادة الأساس تتداخل مع مجاميع كوانيدينيوم ذات الشحنه الموجبة في الحامض الأميني الارجنين في الإنزيم مما يؤدي ذلك إلى تكوين تداخلات أيونية بينهما.

7. **قوى فان در فال:** هي الأواصر الضعيفة الناتجة عن تأثير الجزيئات ثنائية القطبية وهي تلعب دورا مهما في التحكم في الشكل ثلاثي الإبعاد الذي يحتله بروتين الإنزيم في الفراغ وهي تجاذب غير متخصص بين أي ذرتين وهي أواصر أو تداخلات ضعيفة واقل تخصص من التداخلات الالكتروستاتيكية والهيدروجينية ولكن لا تقل أهمية عنها في علوم الحياة وهي توزيع الشحنه الإلكترونية حول نواة ذرة يتغير مع الزمن وهي مهمة عند ارتباط نقط ذرات مواد أساس قريبة من ذرات عدد من الإنزيمات حيث يحصل تداخل عدد كبير من ذرات المادة الأساس مع عدد من ذرات الإنزيمات، تشير الدراسات التي أجريت حول التركيب البنائي للإنزيمات، بأنه يختلف من إنزيم لآخر بسبب الاختلافات بين عدد ونوع الأحماض الأمينية المكونة للسلاسل الببتيدية للإنزيمات المختلفة وكيفية ترتيبها في السلاسل الببتيدية الأحادية أو المتعددة وكذلك الاختلافات في التوزيع الفراغي المجسم للذرات والمجاميع للسلاسل المختلفة للإنزيمات ودرجة الالتفاف أو الالتواء أو الانحناء أو الاعوجاج على طول السلسلة الببتيدية مما يؤدي ذلك إلى تكوين شكل حلزوني أو مبروم وكذلك اختلافها في التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد ونوع الأواصر والروابط الذي تساعد على ثبات التركيب البنائي للسلسلة أو السلاسل الببتيدية الأحادية أو المتعددة للإنزيمات مثل الأواصر الببتيدية والهيدروجينية وثنائية الكبريتيد والتداخلات الايونية، الالكتروستاتيكية وغير المحبة للماء مما يعطي ذلك الشكل أو الهيئة الذي تحدد التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد وهذه الأوضاع تعطي المستويات المختلفة للتركيب البنائي.

مستويات التركيب البنائي

1. **التركيب البنائي الأولي primary structure:** يحدد نوع وعدد وتركيب الأحماض الأمينية في السلسلة أو السلاسل الببتيدية في الإنزيمات وكيفية تتابعها وتعاقبها في السلسلة الببتيدية وهذا يمثل الهيكل الكربوني لسلسلة الببتيد وما يتصل بها من ذرات ومجموعات وتحديد موقع الأواصر ثنائية الكبريتيد في حالة وجودها حيث يحصل ارتباط الأحماض الأمينية بعضها مع البعض الآخر بواسطة روابط ببتيدية مما يؤدي ذلك إلى فقد جزيئة ماء وقد يحتوي الإنزيم على سلسلة ببتيدية أحادية أو على سلاسل ببتيدية

متعددة كل سلسلة لها تركيب بنائي أولي خاص بها وهي سلاسل لها بعد ثلاثي في الفراغ وقد تدور الجزيئات بحرية حول الأواصر التساهمية لتنتج عدد غير محدد من ترتيب السلاسل الببتيدية المتعددة في الفراغ مما يعطي ذلك تراكيب بنائية اكثر استقرارا، يعتبر إنزيم ribonuclease أول الإنزيمات التي تم التعرف على تعاقب الأحماض الأمينية الموجودة فيها حيث يعتبر الإنزيم من الإنزيمات ذات السلسلة الببتيدية الأحادية والذي يحتوي على 124 حامض أميني في تركيبة البنائي الأولي مع وجود أربعة روابط ثنائية الكبريتيد، يبدأ الطرف النتروجيني بالحامض الأميني اللايسين (رقم -1) وتنتهي السلسلة الببتيدية في الطرف الكربوكسيلي الذي ينتهي بالحامض الأميني الفالين ذي التسلسل 124 حيث توجد في السلسلة الببتيدية ثمانية أحماض أمينيه كبريتية هي السستائين مكونه أربعة روابط عرضية في الإنزيم (الشكل-20) ويتكون التركيب البنائي الأولي لإنزيم اللايزوزيم من 129 حامض أميني يبدأ الطرف النتروجيني بالحامض الأميني اللايسين والذي سلسلته الببتيدية أحادية ينتهي طرفها الكربوكسيلي بالحامض الأميني الليوسين وتملك السلسلة ثمانية أحماض أمينيه كبريتية مع أربعة أواصر كبريتيدية مما يؤدي ذلك إلى تكوين أربعة عرضية (الشكل-21).

H_2N-Lys-Val-Phe-Gly-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Ala
Tyr-Asp- Asp-Leu-Gly-His-Arg-Lys-Met-Ala
Arg - Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asp-Try-Val-Cys
Thr-Asp-Phe– Asp-Ser-Glu-Phe– Lys-Ala-Ala
Glu-Ala-Thr-Asp-Arg-Asp -Thr- Asp-Gly-Ser
Ser-Asp-Ile -Gly-Leu-Ile- Gly-Tyr –Asp -Thr
Arg-Try-Try-Cys-Asp -Asp-Gly-Arg-Thr-Pro
Cys-Pro-Ile-Asp-Cys-Leu-Asp-Arg-Ser-Gly
Ser -Ala-Leu-Leu-Ser-Ser-Asp-Ile -Thr-Ala
Ser-Val-Ile-Lys-Lys-Ala -Cys – Asp-Val-Ser
Asp - Gly-Asp-Gly-Met-Asp-Ala-Try-Val-Ala
Val-Asp-Thr-Gly-Lys-Cys- Arg-Asp-Arg-Try
Glu-Ala-Try-Ile-Arg-Gly-Cys-Arg-Leu-COOH

الشكل(21) التركيب البنائي الأولي للايزوزيم

2. **التركيب البنائي الثانوي Secondary structure**: يتضمن التركيب البنائي الثانوي كيفية التفاف أو التواء سلسلتين أو اكثر من السلاسل الببتيدية في الإنزيمات متعددة السلاسل الببتيدية قصيرة السلسلة oligoneric لتكوين أشكال متخصصة وثابتة عن طريق أواصر هيدروجينية وهو ما يطلق عليه التركيب البنائي الشكلي أو التكويني conformation حيث تلتف السلاسل مع بعضها بشكل حلزوني مما يحدد نوع التوزيع الفراغي المجسم للإنزيمات والذي يتكون بواسطة الأواصر الهيدروجينية بين مجاميع NH– و C=O وقد تتكون ضمن monomeric enzymes و oligomeric enzymes ويتضمن التركيب البنائي أشكال مختلفة هي:

أ. **الحلزون ألفا α-helix**: وهو يتضمن سلسلتين ببتيديتين أو اكثر تلتف حول بعضها البعض الآخر التفافا حلزونيا مما يكون الشكل الحلزوني وطول اللفة الواحدة يصل 3,6 وحدة حامض أميني لكل دورة من المنحني حيث تبرز مجاميع R إلى الخارج من العمود الفقري للسلسلة الببتيدية والشكل الحلزوني ناتج عن وجود الأواصر الهيدروجينية التي تربط أوكسجين الكربونيل ونتروجين الامايد ويلاحظ بأن أواصر الببتيد تتعاقب بمسافات منتظمة لذلك تكون أيضا منتظمة.

ب. **الصفيحة المطوية من نوع بيتا β-pleated sheet**: يحصل ترتيب سلاسل الببتيد للإنزيم على امتداد بعضها البعض الآخر لتكوين أشكالا تعرف بالصفائح المطوية الذي تكون مستقرة بسبب وجود الأواصر الهيدروجينية التي تربط مجموعة الكربونيل مع مجموعة الامايد حيث تكون مجاميع R الذي تقع في أعلى الصفائح وأسفلها ونتيجة للدراسات التي أجريت على إنزيم الرايبونيوكليز البقري باستعمال طريقة الانكسار للأشعة السينية الذي بين بان الأبعاد الجزيئية للإنزيم هي حوالي 3.2x 2.8 x 2.2 نانوميتر كما لاحظت الدراسة وجود قليل من الحلزون ألفا في دورتين في منطقة الأحماض الأمينية في المواقع من 2 –12 ودورتين أخرى قريبة من الأحماض الأمينية في المواقع من 28 –35 ويكون التركيب البنائي للإنزيم اكثر ظاهريا مقارنة مع البروتينات ولا يوجد قسما منه مخفي كما يوجد أيون الفوسفيت في الموقع التحفيزي للإنزيم قريب من الحامض الأميني للهستدين في الموقع 12,119 واللايسين في الموقع 7، 41 حيث أن الحامض الأميني الهستدين في الموقع 48

يتضمن الموقع التحفيزي ويعمل إنزيم subtlilisin على تشقق الإنزيم إلى سلسلة ببتيدية S قصيرة وبروتين S طويل مع فقد النشاط الإنزيمي.

3. **التركيب الثلاثي tertiary structure**: يتضمن الشكل العام ثلاثي الأبعاد للإنزيم الناتج عن تداخلات المجاميع الجانبية مع بعضها بحيث تصبح السلسلة الببتيدية المتعددة للإنزيم مطوية بشدة ومكثفة بشكل مرصوص ويحافظ التركيب الثلاثي على الشكل الذي يساهم في تكوينه الارتباط بين الأحماض الأمينية الذي يكون موقعها متباعدا في التركيب البنائي الأولي، قد تتقارب مع بعضها عند تكوين الشكل ثلاثي الأبعاد للإنزيم بسبب الالتواء للسلاسل الببتيدية وتساهم أواصر ثنائية الكبريتيد في تثبيت التركيب البنائي الثلاثي بالإضافة إلى الروابط الأخرى وتمت دراسة التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد بواسطة الانكسار للأشعة السينية لعدد من الإنزيمات كما أعطت التحاليل للأشعة السينية لعلم البلورات تفاصيل التراكيب البنائية ثلاثية الأبعاد للإنزيمات التالية: -hexokinase , transcarbamoylase acetyl CoA carboxylase , carbonic anhydrase , chymotrypsin, carboxypeptidaseA ,ribonuclease , lactate dehydrogenase , carboxylase , RNA-polymerase glycogen phosphorylase, .lysozyme,

إنزيم اللايزوزيم lysozyme: يوجد الإنزيم في الدموع ومخاط الأنف وقشع الأنسجة والإفرازات المعدية والحليب وبياض البيض وهو يحفز تحليل وتشقق بعض الخلايا البكتيرية بواسطة تحفيز التشقق التحللي لمكونات السكريات المتعددة لجدران الخلايا وتحليل أواصر بيتا -4,1- لحامض النيورامينيك N-acetyl-neuraminic acid في السكريات المتعددة المخاطية أو الببتيدية المتعددة المخاطية ويعمل الإنزيم الموجود في الدموع ومخاط الأنف على تحلل جدران الخلايا البكتيرية وتشير دراسات التركيب الثلاثي الأبعاد للإنزيم بواسطة الانكسار للأشعة السينية إن الإنزيم يتكون من سلسلة ببتيدية متعددة منفردة تتكون من 129 حامض أميني مع وزن جزيئي 14600، السلسلة مرتبطة عرضيا بواسطة أربعة روابط ثنائية الكبريتيد، تسلسل الأحماض الأمينية في السلسلة

الأحادية متعددة الببتيد(الشكل- 22) وهي المسؤولة عن قابلية الثبات العالية والجريئة ذات شكل كروي متراص ذو أبعاد 3.0 x4.4x3.0 نانوميتر

H_2N-Lys-Val –Phe-Gly-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Ala

Ala-Met -Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr

Arg -Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asn-Try-Val-Cys

Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Ser-Asn-Phe-Asn-Thr

Gln-Ala-Thr-Asn-Arg-Asn -Thr-Asp-Gly-Ser

Thr- Asp -Tyr-Gly-Ile-Leu-Gln-Ile - Asn-Ser

Arg -Try-Try-Cys-Asn-Asp-Gly-Arg-Thr-Pro

Gly-Ser-Arg-Asn-Leu-Cys-Asn-Ile-Pro-Cys

Ser-Ala -Leu- Leu-Ser-Ser-Asp-Ile-Thr-Ala

Ser-Val-Asn-Cys - Ala-Lys-Lys-Ile-Val-Ser

Asp-Gly-Asp-Gly-Met-Asn-Ala-Try-Val-Ala

Try-Arg-Asn-Arg-Cys-Lys-Gly-Thr-Asp-Val

Gln-Ala-Try-Ile-Arg-Gly-Cys-Arg-Leu-COOH

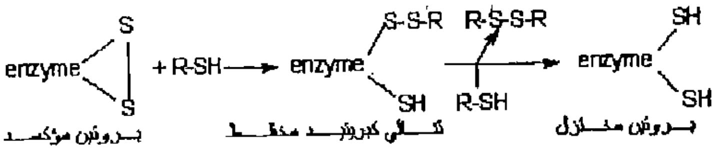
الشكل(22) التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد وتسلسل الأحماض الأمينية لأنزيم اللايزوزيم

الصيغة المميزة في التركيب هي وجود صفائح مطوية غير متوازية تتضمن الأحماض الأمينية في المواقع من 41-45 و50-54 مع أحماض أمينيه مرتبطة في المواقع 46-49 مطوية بشكل عقدة دبوس الشعر، تثبت الصفيحة المطوية بواسطة أواصر هيدروجينية

من نوع N—H---O=C متضمنة المجاميع الببتيدية للسلسلة الأحادية متعددة الببتيد وهناك منطقة قصيرة من الحلزون ألفا تكون مقابله للأحماض الأمينية في المواقع من 5-15 و24-34 و88-96، داخل الجزيئة يتألف تقريبا من أحماض أمينيه غير قطبية المهمة في التداخلات غير المحبة للماء الذي تزيد من ثبات جزيئة الإنزيم وخاصة التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد لا تحتوي جزيئة الإنزيم شق وسطي عميق يخفي المنطقة الفعالة المتكونة من ست مناطق ثانوية التي تربط عدة مواد أساس أو المثبطات الإنزيمية ويعتقد بأن الأجزاء المسؤولة عن كسر وتحطيم الآصرة التي تقع ما بين الأحماض الأمينية الحامضية في الموقع 52 لحامض الاسبارتيك والموقع 35 لحامض الكلوتاميك حيث أن حامض الكلوتاميك في الموقع 35 يمنح بروتون الآصرة للخلات في المادة الأساس بينما الحامض الأميني الاسبارتيك في الموقع 52 ذو شحنه سالبه يعادل أيون الكاربونيوم الناتج من الجهة الخلفية حيث أن الانحناء أو الانطواء في الجزيئة يكون معقد.

الرايبونيوكليز Ribonuclease: وهو الإنزيم الذي يحلل RNA والذي يتألف من سلسلة أحادية متعددة الببتيد تحتوي 124 حامض أميني الذي يحتوي أربعة أواصر ثنائية الكبريتيد والذي يمكن أن تتأكسد لا عكسيا بواسطة حامض البيرفيك لتعطي حامض السستائين ويمكن أكسدة الإنزيم في 8 مولار من الامونيا والإنزيم المؤكسد يملك 1% من نشاط الإنزيم ويمكن دنترة الإنزيم الخالي من اليوريا وبيتا - ميركابتوايثانول لإعادة النشاط تدريجيا حيث تحصل أكسدة السلفاهيدريل في الإنزيم المدنتر بواسطة الأوكسجين وإعادة انطواء الإنزيم تلقائيا إلى الشكل الفعال، وتتضمن آلية التحفيز مجاميع الاميدازول في الهستدين الذي تعمل كعامل تحفيزي حامضي – قاعدي عام ومجموعة الأمونيوم في اللايسين الذي تربط المادة الأساس ذات الشحنه السالبة مثل مجموعة الفوسفيت ومجموعة الهيدروكسيل الذي تعمل nucleophile كما أن الموقع الفعال يتضمن الأحماض الأمينية حيث يرتبط RNA مع الإنزيم في مجموعة البيرميدين في موقع معين ويرتبط بواسطة اصرتين هيدروجينيتين تتضمن اللايسين والهستدين ومجموعة الهيدروكسيل في سكر الرايبوز للمادة الأساس القريب من الفسفور تصبح ذات صفة nucleophilic من خلال الآصرة الهيدروجينية مع شكل قاعدي للهستدين الآخر حيث يتم اخذ بروتون من الهستدين 12 مما يصبح قاعدة عام ونتيجة تكوين الفسفوثنائي الاستر الذي يكون ثنائي

الشحنه السالبة مما يكون آصرة أوكسجين – فسفور الذي تنتقل إلى بروتون الهستدين في الموقع 119 الذي يعمل كحامض عام إحدى نهايات المادة الأساس الذي تحمل مجموعة هيدروكسيل حرة تستطيع أن تترك الأنزيم بينما الجزء المتبقي من المادة الأساس يرتبط إلى مجموعة اللايسين القريبة منه وفي هذه المرحلة يدخل الماء حيث تستبدل مجموعة الهيدروكسيل للماء أحد مجاميع الهيدروكسيل في RNA مما يحول الهستدين في الموقع 119 من الصفة الحامضية العامة إلى القاعدية العامة مما يسبب ذلك سحب البروتون بعيدا عن الماء ويمكن تشقق الأواصر ثنائية الكبريتيد عكسيا بواسطة اختزالها مع بيتا ميركابتوايثانول والذي تكون ثنائية الكبريتيد المختلط(الشكل-23) مع سلسله جانبية للسستائين وبوجود كميات كبيرة من بيتا ميركابتوايثانول، فأن ثنائي الكبريتيد المختلط يختزل لذلك يكون الناتج النهائي هو بروتين فيه يتم تحويل السستين (ثنائي الكبريتيد) كليا إلى سستائين (سلفاهيدريل).



الشكل(23) اختزال أواصر ثنائية الكبريتيد في إنزيم الرايبونيوكليز

فإن إنزيم الرايبونيوكليز بدرجة 37م وفي أس هيدروجيني 7 لا يمكن أن يختزل بواسطة ميركابتوايثانول ما لم يصبح البروتين غير مطوي جزئيا بواسطة عوامل مدنترة مثل اليوريا والكوانيدين هيدروكلورايد فالتداخلات غير التساهمية تسبب اختلال التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد لإنزيم الرايبونيوكليز وذلك مما يؤدي إلى تجنب الروابط العرضية في الإنزيم مما يصبح الشكل الحلزوني عشوائيا عند إضافة 8 مولار يوريا أو 6 مولار كوانيدين هيدروكلورايد كما يؤدي ذلك أيضا إلى فقد نشاط الإنزيم وأوضحت الدراسات بان التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد بان الإنزيم ذو تسلسل معين للأحماض الأمينية وأوضحت الدراسات أيضا وجود 105 طريقة مختلفة لثمانية وحدات من السستائين لها القدرة أن تكون أربع أواصر ثنائية الكبريتيد إلا أن واحدا منها فعال إنزيميا.

إنزيم كاربوكسي ببتيديز أ carboxypeptidase A: مـن الإنزيمـات المحللـة للبروتينات الحاويـة علـى الزنـك ويعتبر مـن الإنزيمـات الهاضـمة الـذي تحلـل أواصـر الببتيـد الطرفية الكربوكسيلية في السلاسل الببتيدية المتعددة وتمت دراسة التركيب البنـائي ثلاثـي الأبعاد للإنزيم بواسطة انكسـار الأشـعة السينية الـذي أوضحت بـان الإنـزيم يتكـون مـن سلسلة ببتيدية متعددة أحادية تحتوي 307 حامض أميني وذات شكل مرصوص وذو أبعاد 50 ×42 × 38 انكستروم، 80% من التركيب البنائي الثلاثـي هـو حلـزون -ألفا ويشـكل 18% من الصحيفة المنطوية من نوع بيتا والـذي يـربط بـه الزنـك بقـوة والـذي يعتـبر أسـاس لنشاط الإنزيم وهو يقع في شق قريب من سطح الجزيئة ويرتبط الزنك تناسقيا مـع سلسـلتين جانبيـة وبملك هستدين في الموقع 69 في جانب و 169 في الجانب الآخـر مـن الزنـك وسلسـلة جانبية تملك كلوتامين في الموقـع 72 في الموقـع الفعـال مـن الإنـزيم كمـا تـرتبط تسـاهميا إلى الزنك جزيئة ماء وهناك جيب كبير قـرب الزنـك مهـم بالنسـبة للسلسـلة الجانبيـة للحـامض الأمـيني لببتيـد المـادة الأسـاس حيـث يعـاني الإنـزيم مـن تغير في التركيـب البنـائي الشـكلي conformation عنـدما يـرتبط مـع المـادة الأسـاس ومـن المحتمـل أن يلعـب الحامضـان الامينيـان التـايروسـين والاسـبارتيك دورا مهمـا في تحفيـز الإنـزيم وعنـد اسـتبدال أو إزالـة الخارصين يتحطم نشاط الإنزيـم دون التأثير على التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد مما يدل ذلك بان للخارصين دور تحفيزي مهم وليست له أي دور تركيبي.

إنزيم حـامض الكربونيـك انهيـدريز Carbonic anhydrase: هـو الإنـزيم الذي يحفز تفاعل إضافة الماء إلى ثاني اوكسيد الكربون ويحتـوي الإنـزيم علـى الزنـك وهـو ذو وزن جزيئي 30000 وتشير الدراسات للأشعة السينية بان الإنـزيم يحتـوي اقـل مـن 32% من التركيب هو الحلزون ألفا وتقع ذرة الخارصين في وسـط الجزيئـة وفي قعـر التجويـف الكـبير مثـبط واحـد مـن السـيليفون امايـد بحيـث تجعـل مجموعـة السـلفون امايـد مجـاورة لـذرة الخارصين.

إنـزيم Lactate dehydrogenase: إنـزيم متنـاظر وهـو يوجـد في خمسـة أشـكال إلا أن هنـاك اثنـان رئيسـية أحـدهما القلـب يسـمى heart lactate dehydrogenase والآخـر في العضـلات الهيكليـة يسـمى muscle lactate

dehydrogenase الإنزيم القلبي يتألف من أربعة سلاسل أحادية متماثلة بينما الإنزيم العضلي يتكون من أربع وحدات فرعية، كل واحدة منها تكون بمفردها غير نشطة إنزيميا فالوحدات الفرعية تختلف في تركيبها من الأحماض الأمينية إلا إنها تملك نفس الوزن الجزيئي وتختلف أيضا في صفاتها المناعية، لقد أوضح التركيب البنائي الثلاثي للوحدة الثانوية في الإنزيم كليا بواسطة دراسة الأشعة السينية لحلم البلورات بالرغم من عدم توضيح التركيب البنائي الأولي بواسطة الطرق الكيمياوية وأوضحت الدراسة بأن الوحدة الثانوية تحتوي منطقتين الأولى لولبية الشكل والثانية على شكل صفحة مطوية ومضغوطة نسبيا لكي تساعد في جعل النهاية الراسية للسلسلة الببتيدية المتعددة تظهر بشكل بارز وتحتوي الوحدة الثانوية أيضا على شق عميق يتسع لجزيئه المرافق الإنزيمي NAD الذي يقع قريبا من مجموعة الثايول الأساسية في المنطقة التي تحتوي موقع نشاط الإنزيم.

4. التركيب البنائي الرباعي **Quaternary structure**: يملك الإنزيم تركيب بنائي رباعي عندما يكون بشكل أكبر أو اكثر من السلاسل الببتيدية المتعددة المرتبطة بواسطة قوى عدا الأواصر التساهمية (الأواصر الببتيدية وثنائية الكبريتيد) فأن الأواصر الذي تسبب ثبات التراكيب البنائية الرباعية هي الأواصر الهيدروجينية أو الالكتروستاتيكية المتكونة بين الأحماض الأمينية على سطح السلسلة الببتيدية المتعددة وهذا النوع من الإنزيمات يطلق عليها oligomeric enzymes ويحصل تجمع بعض جزيئات الإنزيم مع بعضها البعض الآخر وهذا التجمع يعتمد على نوع الإنزيم ونوع الشحنات على بروتينات الإنزيم والأس الهيدروجيني للبيئة الفسيولوجية للإنزيم ويمكن توضيح التركيب البنائي الرباعي في الإنزيمات التالية creatine kinase, aspartate transaminase , ATPase , aldolase,Fructose diphosphatase ,ornithine tramsaminase , lactate dehydrogenase ,catalase , aldolase , glutamine synthetase , synthetase carboxylase , fatty acid synthetase acetyl-CoA carboxylase, phosphate dehydrogenase وأوضحت تحاليل الأشعة السينية الذي تم أجراؤها على العديد من الإنزيمات التي تملك اكثر من سلسلة ببتيدية على التركيب البنائي الرباعي مثل hexokinase في الخمائر الذي يحفز تفاعلات ATP مع سكر الكلوكوز.

ATP + D-glucose ⟶ ADP + D-glucose-6-phosphate

يحدث التفاعل في جميع الكائنات الحية لأنها خطوة ضرورية في العمليات الايضية للكلوكوز فالإنزيم يملك وزن جزيئي يصل إلى 108000 ويحتوي سلسلتين ببتيديتين متعددة وتشير الدراسات للأشعة السينية بان التركيب البنائي الثلاثي للسلسلتين الببتيديتين المتعددة والتركيب البنائي الرباعي للإنزيم تكون متطابقة معا، التركيب البنائي الشكلي للإنزيم يطرأ عليه تغير في الهيئة المجسمة خلال الدورة التحفيزية، lactate dehydrogenase هو الآخر تمت دراسة تركيبة البنائي الرباعي وهو الإنزيم الذي يحفز الخطوة الأخيرة في تحويل الكلوكوز إلى لاكتيت فالإنزيم ذو وزن جزيئي 140000 ويملك أربع سلاسل ببتيدية الذي فيها التركيب البنائي الثلاثي يختلف تماما عن بروتين الهيموكلوبين، Glu synthetase من بكتريا القولون الذي يحفز تكوين الكلوتامين من الكلوتاميت الامونيا، اكثر تعقيد في التركيب البنائي الرباعي من hexokinase، حيث يتكون من 12 وحدة فرعية.

تقدير التركيب البنائي للإنزيمات

لتقدير التركيب البنائي الأولى للإنزيمات يجب أن يتم نزع المجاميع الرابطة أولا ثم أكسدة أواصر ثنائية الكبريتيد للحصول على سلاسل ببتيدية مستقيمة ثم تحطيم الأواصر الببتيدية الذي تربط الأحماض الأمينية مع بعضها بواسطة التحلل المائي فالأواصر الببتيدية ثابتة في أس هيدروجيني متعادل ويتم تحليل الإنزيمات أما بواسطة الحامض أو القاعدة ولا يفضل التحلل الإنزيمي وتتضمن الخطوة الأولى في تعين التركيب البنائي الأولى تعين تركيب البروتين وتحديد عدد أنواع السلاسل الببتيدية المختلفة في الإنزيمات وتحديد نهاية كل سلسلة ببتيدية وإيجاد عدد النهايات الحاوية على مجاميع طرفية أمينيه أو كربوكسيلية ومن المحتمل وجود نفس الحامض الأميني الطرفي في حالة الإنزيمات متعددة السلسلة وفي بعض الأحيان يكون الحامض الأميني الطرفي موجود داخل جريئة الإنزيم مما يصعب للمادة الكيماوية المستعملة من تعين النهايات الطرفية من الوصول إلية ويمكن التعرف على المجموعة الأمينية من نوع ألفا الموجودة في الحامض الأميني الطرفي الواقع في السلسلة الببتيدية باستعمال كاشف سانجر Sanger، ففي طريقة سانجر تتفاعل المجموعة

الأمينية من نوع ألفا الموجودة في الحامض الأميني الطرفي الواقع في السلسلة الببتيدية مع الكاشف DNP (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene) لتكوين مركب مشتق مع السلسلة الببتيدية يعرف N-2,4-dinitrophenyl amino acid وعند إضافة محلول 6 عياري من حامض الهيدروكلوريك بدرجة 105م لمدة 24 ساعة تتحلل جميع الأواصر الببتيدية ماعدا الآصرة المتكونة بين DNP ومجموعة الأمين من نوع ألفا الذي تقاوم التحلل الحامضي مما يحتوي ناتج التحلل على الأحماض الأمينية الحرة المكونة أصلا للسلسلة الببتيدية ماعدا الحامض الأميني الطرفي والذي يحتوي على المجموعة الأمينية الطرفية مما تكون على شكل مشتق من DNP الذي يمكن فصلة عن بقية الأحماض الأمينية الحرة بواسطة الفصل الكروماتوكرافي ومقارنته مع محلول قياسي لمشتقات DNP للأحماض الأمينية المختلفة والتعرف على الحامض الأميني الطرفي وتتفاعل المجاميع الأمينية عدا المجموعة الأمينية آلفا الموجودة في الحامض الأميني الطرفي مع كاشف سأنجر إلا انه يمكن التفريق بواسطة الكروماتوكرافي بين نواتج هذا للتفاعل وبين N-DNP amino acids ويمكن الكشف عن كميات قليلة جدا من المركب الناتج من تفاعل الأحماض الأمينية و dansyl chloride كما يمكن أيضا التعرف على الحامض الأميني الطرفي الحاوي على مجموعة كربوكسيل حرة عند معاملة الإنزيم مع sodium borohydride الذي يهاجم المجموعة الكربوكسيلية الحرة ولأجل القيام بهذا التفاعل لابد من أسترة المجاميع الكربوكسيلية مما يحول ذلك المجاميع الكربوكسيلية إلى كحولات أمينيه من نوع ألفا أما المجاميع الكربوكسيلية الأخرى الموجودة في حامض الاسبارتيك والكلوتاميك ستختزل مما ينتج كحولات أمينيه ولكنها ليست من النوع ألفا، ويمكن التفريق بينهما بواسطة الطرق الكروماتوكرافية المختلفة ومن ما ذكر أعلاه يمكن التعرف على الأحماض الأمينية الطرفية الحاوية على المجاميع الأمينية والكربوكسيلية ثم التعرف على السلاسل الببتيدية المختلفة الموجودة في جزيئة الإنزيم ويمكن تحطيم الأواصر الموجودة بين السلاسل الببتيدية بعدة طرق بينما تحطيم الأواصر الثنائية الكبريتيد باستعمال حامض البيرفورميك حيث تتأكسد كل جزيئة سستين إلى جزيئتين حامض السستائيك دون التأثير على الأواصر الببتيدية حيث يعمل حامض البيروفيك على أكسدة كل من Met,Try ولمنع حدوث ذلك يستخدم بيتا-ميركابتوايثانول لتفكيك الأواصر ثنائية الكبريتيد بالاختزال ومن ثم إضافة الكيل إلى مجاميع السلفاهيدريل لمنع إعادة تكوين -S-S- ويمكن تحطيم الأواصر الايونية من خلال تعريض

الوسط إلى أس هيدروجيني مناسب على تراكيز ملحية عالية أو باستعمال اليوريا أو هيدروكلوريد الكواندين ثم فصل السلاسل عن بعضها البعض الآخر بواسطة الكروماتوكرافيا أو الهجرة في مجال كهربائي مما يسهل ذلك من الحصول على سلاسل ببتيدية نقية ويحتوي العديد من الإنزيمات على عدد من السلاسل الببتيدية المتشابه يتصل بعضها مع البعض الآخر بواسطة أواصر لا تساهمية ويمكن التأكد منها من خلال وجود مجموعة أمينيه من نوع ألفا ومجموعة كربوكسيلية من نوع ألفا واحده فقط أو عدم إمكانية فصل أي من السلاسل الببتيدية عن بعضها البعض الآخر بعد تحطيم الأواصر غير التساهمية الذي تربط تلك السلاسل فيما بينها ويلاحظ انخفاض الوزن الجزيئي للإنزيم عند تحطيم الأواصر إلى النصف ويمكن تقدير الوزن الجزيئي للسلاسل الببتيدية باستعمال الترشيح بالهلام gel filtration والطرد المركزي عالي السرعة وبعد ذلك القيام بتحليل السلسلة الببتيدية المتعددة بصورة كاملة إلى مكوناتها من الأحماض الأمينية ثم تقدير تركيز كل حامض أميني على حدة ويستعمل كروماتوكرافيا التبادل الايوني للتقدير الكمي للأحماض الأمينية حيث يتم وضع النموذج على عمود فصل يحتوي مبادل ايوني موجب الشحنه ثم يوضع خلال عمود الفصل محلول منظم بحيث تزداد قيمة الأس الهيدروجيني وتركيز الأملاح فيه تدريجيا حيث تغادر الأحماض الأمينية ذات السلاسل الطرفية الحامضيـة أو القطبية قبل الأحماض الأمينية ذات السلاسل القاعدية أو اللاقطبية والسبب هو الألفـة النسبية الموجودة بين الشحنات الموجودة على المبادل الايوني وتلك على الأحماض الأمينية وتختار الظروف الذي تسمح بمغادرة كل حامض أميني بصورة منفصلة عن الآخر على العمود ويخلط ننهايدرين مع المحلول الغاسل لأن النهايدرين يتفاعل مع معظم الأحماض الامينية ليعطي لون ازرق – ارجواني الذي يتم امتصاصه على طول موجي 570 نانوميتر بينما يعطي البرولين لونا اصفر يمتص اللون على طول موجي 440 نانوميتر ويمكن مراقبة الألوان الناتجة بشكل مستمر على أطوال موجية قدرها 570 و440 نانوميتر فأنه بالإمكان تقدير تركيز كل حامض أميني، يجب أن يؤخذ بنظر الاعتبار طريقة التحليل المستعملة مثل استخدام تحلل حامضي باستخدام 6ع حامض الهيدروكلوريك على درجة 105م لمدة 24 ساعة يسبب تحلل السلسلة الببتيدية إلى أحماض أمينية ويسبب فقد بعض التربتوفان كما يتحلل الكلوتامين والاسبارجين إلى أحماضهما وأن قياس كمية الامونيا الناتجة يعطي دلالة على الكمية الكلية للامايدات الموجودة في بروتين الإنزيم أما في حالة استعمال تحلل قاعدي سيؤدي إلى تحلل

الامايدات عندما يستخدم 5ع هيدروكسيد الصوديوم ثم تحطيم الببتيدات المتعددة ولكن يتم الحصول على تربتوفان بدون فقد لكن يحصل فقد في الأحماض الأمينية التالية السستين، السستائين، السيرين والثريونين، لذلك يجب في حالة استعمال تحلل حامضي أو قاعدي يقدر التركيز الكلي للأحماض الأمينية الموجودة ومن خلال النتائج المستحصل عليها في تقدير الوزن الجزيئي يمكن تقدير عدد جزيئات كل حامض أميني موجود في الببتيد المتعدد ويمكن التعرف على تعاقب أو تسلسل الأحماض الأمينية في السلسلة الببتيدية بطريقة أيدامان Edman إلا أن التعرف على الحامض الأميني الطرفي الحاوي على المجموعة الأرمينية الطرفية ثم التعرف عليها باستعمال طريقة سأنجر ويستخدم في طريقة أيدامان كاشف phenylisothiocyanate الذي يتفاعل تحت الظروف القاعدية مع المجموعة الامينية من نوع ألفا الذي تعود للحامض الأميني الطرفي في السلسلة الببتيدية ومن محاسن هذه الطريقة انه عند تحويل ظرف التفاعل القاعدي إلى الجانب الحامضي قليلا فأن المركب المتكون عند تفاعل الحامض الأميني مع الكاشف سينفصل عن السلسلة الببتيدية المتعددة دون تحطيم أو تكسير بقية الأواصر الببتيدية الأخرى وبذلك يمكن التعرف على PTH amino acids ثم الحامض الأميني الطرفي الذي كان موجود أصلا في السلسلة الببتيدية بواسطة كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة أو بواسطة كروماتوكرافيا غاز- سائل بينما بقية السلسلة الببتيدية المتعددة تبقى كما هي متصلة مع بعضها وبالإمكان إعادة التجربة مرة ثانية وثالثة والتعرف على الحامض الأميني الذي يليه ويمكن التعرف على الحامض الأميني الطرفي الحاوي على المجموعة الكربوكسيلية باستخدام العوامل المختزلة أو استخدام طريقة إنزيمية باستخدام carboxypeptidase الذي يفكك الأواصر الببتيدية بصورة متعاقبة بدأ من مجموعة الكربوكسيل الطرفية، نظريا يمكن البدء من أي طرفي السلسلة الببتيدية سواء كانت الحاوية على المجموعة الأمينية أو الكربوكسيلية للتعرف على تعاقب الأحماض الأمينية في السلسلة الببتيدية المتعددة أما من الناحية العملية فأن ذلك صعبا بسبب تعقيد التركيب البنائي الأولى للسلاسل الببتيدية الطويلة حيث من الضروري تكسير السلاسل الببتيدية إلى وحدات صغيرة يسهل التعامل معها باستعمال مركبات كيماوية مثل بروميد السيانوجين أو الإنزيمات المحللة للبروتينات، فأن المركبات الكيمياوية أو الإنزيمات ستؤدي إلى تجزئة الببتيدات ثم فصلها عن بعضها البعض الآخر بواسطة كروماتوكرافيا أو الهجرة في مجال كهربائي وبالنظر لصغر تلك الأجزاء فأنه من السهل معرفة تعاقب الأحماض الأمينية بالطرق

السابقة بعد تعين التركيب البنائي الأولى الكامل للسلسلة الببتيدية يتم ترقيم الأحماض الأمينية ويبدأ الترقيم من الطرف الحاوي على المجموعة الأمينية، أن الطرق السابقة لا تستطيع تعين موقع الجسور الكبريتدية الثنائية ولذلك يجب استعمال نموذج جديد من الإنزيم ثم أجراء تحلل جزئي عن طريق تكسير بعض الأواصر الببتيدية دون إلحاق الضرر في الروابط أو الأواصر ثنائية الكبريتيد لذلك يستخدم 5ع من حامض الهيدروكلوريك أو استعمال إنزيم الببسين على أس هيدروجيني 2 ويعمل الببسين على تكسير الأواصر الببتيدية الموجودة بين العديد من الأحماض الأمينية وخاصة الأواصر الموجودة بين حامضين أرمينيين لا قطبيين أو غير محبين للماء ثم فصل الأجزاء الببتيدية الناتجة عن بعضها البعض الآخر ثم معاملة الأجزاء المعزولة بواسطة حامض البيرفورميك مما يسهل ذلك تكسير الأجزاء الحاوية على أواصر كبريتيدية إلى أجزاء اصغر كنتيجة لتأكسد S-S ثم التعرف على تعاقب الأحماض الأمينية حول كل آصرة كبريتيدية ثنائية بالرجوع إلى التركيب البنائي الأولي لجزئية بروتين الإنزيم مما يصبح من الممكن تعين مواقع هذه الأواصر في جزيئة الإنزيم الكامل.

الفصل السابع

المواقع الفعالة وتخصص الإنزيمات

المواقع الفعالة وتخصص الإنزيمات

Active sites and specificity of enzymes

الموقع الفعال: الموقع الفعال للإنزيم هو وحدات من الأحماض الأمينية في الإنزيم أو المنطقة الذي تساهم في عملية تحفيز الإنزيم والذي تربط المواد الأساس بالإنزيم والذي تكون على شكل حفرة أو التفاف لسلسلة متعددة الببتيد وهذه الأحماض الأمينية يطلق عليها المجاميع التحفيزية وتختلف الإنزيمات في تركيبها البنائي وتخصصها وطريقة التحفيز وعدد نقاط ربط الإنزيم بالمادة الأساس ولكل نقطة من نقاط الموقع الفعال وظيفة خاصة أما لربط المادة الأساس أو المساعدة في تحليلها وترتبط مواقع الربط binding sites إلى مجاميع متخصصة في المادة الأساس بحيث تتماسك جزيئتين من الإنزيم والمادة الأساس في وضع ثابت بحيث تضع المادة الأساس في الموقع الفعال للإنزيم أو في موقع قريب منه ويتألف الموقع الفعال في الإنزيم على جيب في سطح الإنزيم يرتبط مع السلسلة الجانبية للأحماض الأمينية اللازمة لربط المادة الأساس وتحفيز التفاعل الكيمياوي، carboxypeptidase الذي يتألف من سلسلة ببتيدية مفردة تحتوي على307 حامض أميني يملك ثلاث مجاميع تحفيزية أساسيه في الموقع الفعال هي الارجنين في الموقع 145 والتيروسين في الموقع 248 وحامض الكلوتاميك في الموقع270 فالموقع الفعال في synthetase glycogen يتقبل جزيئة UDP-glucose وتكون المواقع الفعالة في الإنزيمات صغيرة نسبيا ولها القدرة على ربط جزيئة واحدة أو بضع جزيئات في أن واحد، اللايزوزيم يملك موقع تحفيزي الذي يرتبط مع المادة الأساس ويملك إنزيم الكيموتربسين على جيب صغير قريب من الحامض الأميني السيرين في الموقع 195 والحامض الأميني الهستدين في الموقع 57 حيث يكون الحامض الأميني الاسبارتيك في الموقع 102 قريبا منهم، تداخل الأحماض الأمينية الثلاثة يزيد من القوة التحفيزية للإنزيم حيث يرتبط حامض الاسبارتيك في الموقع 102 بواسطة اصرة هيدروجينية إلى الهستدين في الموقع 57 ثم ارتباطه مع السيرين في الموقع 195 بواسطة اصرة هيدروجينية أيضا وهذه الأحماض الأمينية الثلاثة تلعب دوراً مهماً في تحفيز الإنزيم وكذلك يساهم الحامض الأميني الهستدين والسيرين بصورة مباشرة في تشقق الاصرة الببتيدية الحساسة للمادة الأساس عندما تكون في الشق العميق للموقع الفعال ويملك الإنزيم DNA polymerase على موقع ربط واحد له القدرة لربط أي واحد من

مركبات deoxyribonucleoside 5-triphosphate والذي يمكن أن تتنافس مع بعضها على الموقع الفعال في الإنزيم وهناك ثلاث مواقع فعالة في الإنزيم يرتبط أليها الحامض الأميني الكلوتاميك في مجموعتي كربوكسيل ومجموعة أمين واحدة حيث يقبل الإنزيم الأشكال أما D أو L من حامض الكلوتاميك كمادة أساس، ويملك إنزيم aconitase ثلاث نقاط ارتباط للإنزيم وهناك طريقة واحدة لارتباط حامض الستريك على مواقع الربط الثلاثة في الإنزيم وهناك ثلاثة مناطق ربط في lactate dehydrogenase واحد منها حول الادينوسين للمرافق الإنزيمي AMP أخر حول النيكوتين امايد نيوكلوتيد والآخر حول المادة الأساس وهناك موقع تحفيزي لإنزيم الرايبونيوكليز يقع بين الأحماض الأمينية الهستدين ذو الرقم 12 والهستدين ذو الرقم 119 وكلاهما قريبة من موقع الربط لحامض اليورديليك، يتضح مما سبق بان المنطقة التي تحتوي على مواقع الربط ومواقع التحفيز تسمى بالموقع الفعال أو المركز الفعال active center للإنزيم وهو يشغل حيزاً صغيراً من جزيئة الإنزيم ويوجد على سطح الإنزيم أو مكان قريب من السطح بحيث يسهل التصاق الإنزيم بالمادة الأساس وقد يوجد يشكل جيب أو شق أو فجوه أو حز واضح في جزيئة الإنزيم بحيث يسع هذا الحيز كل أو جزء من المادة الأساس وهو ذو تركيب بنائي ثلاثي الأبعاد لان الموقع الفعال هو جزء من السلسلة الببتيدية المتعددة، الأحماض الأمينية التي تظهر قريبة من بعضها البعض الآخر في الموقع الفعال قد تكون متباعدة في التركيب البنائي الأولي لجزيئة الإنزيم إلا أن التقارب بينهما ناتج عن الالتفاف أو الانحناء أو الانطواء الذي يحدث في جزيئة الإنزيم لتكوين التركيب البنائي الرباعي ويوجد داخل الموقع الفعال موقع الربط أو موقع التحفيز وهناك العديد من الأواصر التساهمية التي تربط المادة الأساس بالإنزيم، الأحماض الأمينية الموجودة في الموقع الفعال والتي لا تساهم بصورة مباشرة في ربط المادة الأساس أو موقع التحفيز وهذه الأحماض قد تساهم في تخصص الإنزيم ولا تتداخل أو تؤخر ربط المادة الأساس إلا إنها قد تتداخل أو تؤخر ربط مواد أخرى تكون مشابه للمادة الأساس من الناحية الكيمياوية وغالبا ما يحتوي الموقع الفعال على أحماض أمينية قطبية ولا قطبية مما تهيئ ظروف محبه وغير محبه للماء في الموقع الفعال خاصة بالإنزيم ولا توجد في إنزيم آخر لذلك تكون وظيفة الإنزيم غير مرتبطة بالترتيب في الفراغ، بل على الظروف الذي يوجد عليها الموقع.

يمكن توضيح العلاقة بين الموقع الفعال والإنزيم بما يلي:

1. يكون الموقع الفعال جزء صغير نسبيا من الحجم الكلي للإنزيم، فأن معظم الأحماض الأمينية في الإنزيم لا تكون في اتصال مع المادة الأساس فكل الإنزيمات تقريبا تتركب من اكثر من 100 حامض أميني مما تعطي كتلة كبيرة للإنزيم قطرها اكثر من 25 انكستروم.

2. الموقع الفعال يملك تركيب بنائي ثلاثي الأبعاد، الموقع الفعال ذي شكل غير محدد قد يكون شق، فجوة، غرفة ناتجة عن التواء في السلسلة الببتيدية يسبب أواصر أو تداخلات قوية فعلى سبيل المثال إنزيم اللايزوزيم يملك مجاميع مهمة في الموقع الفعال هي الأحماض الأمينية في المواقع 35 ، 52 ، 62، 63، 101 في تسلسل الأحماض الأمينية البالغة 129 حامض أميني.

3. ارتباط المادة الأساس إلى الإنزيم بواسطة قوى ضعيفة نسبيا لثوابت توازن معقدات المادة الأساس – الإنزيم تتراوح ما بين 10^{-2} إلى 10^{-8} مولار مقارنه إلى الطاقة الحرة للتداخلات الذي تتراوح ما بين –3 إلى –12 كيلو سعرة \ مول، يمكن مقارنة هذه القيم مع قوة الأواصر التساهمية الذي تكون ما بين –50 إلى –110 كيلوسعرة \ مول.

4. المواقع الفعالة هي شقوق أو صدوع في كل الإنزيمات ذات التراكيب البنائية المعروفة ويلاحظ ارتباط جزيئات المادة الأساس إلى شق أو صدع يحتوي أحماض أمينية قطبية الذي تكون أساسية لربط وتحفيز الإنزيم الصفة غير القطبية للشق تزيد من ارتباط المادة الأساس بالإنزيم بالإضافة إلى أن الشق يخلق بيئة الذي فيها بعض الأحماض الأمينية القطبية تكتسب صفات معينه وأساسية للدور التحفيزي لها.

5. تخصص الارتباط يعتمد على ترتيبات معينه في الموقع الفعال، المادة الأساس يجب أن تكون ذات شكل مناسب لتطابق الموقع الفعال في الإنزيم وقد اقترح فشر فرضية القفل والمفتاح ويقترح الباحثين أن المواقع الفعالة في بعض الإنزيمات لا تكون متينة وصلبة وان شكلها في بعض الإنزيمات محور مما يسهل ارتباط المادة الأساس لها وهناك عدة

فرضيات تتضمن اتحاد المادة الأساس بالموقع الفعال وتكوين معقد الإنزيم – المادة الأساس.

1) فرضية فشر للقفل والمفتاح: في هذه الفرضية اقترح فشر انه في التخصص الإنزيمي يتوجب وجود تراكيب بنائية مكملة واحدة للأخرى بين الإنزيم والمادة الأساس بحيث تكون المادة الأساس ذات شكل مناسب تماما للموقع الفعال في الإنزيم يشبه دخول المفتاح داخل القفل بحيث تدخل المادة الأساس بصورة مناسبة أو مطابقة في الموقع الفعال المكمل لها على الإنزيم كما يدخل المفتاح في القفل وطبقا لهذه الفرضية تبقى جميع التراكيب ثابتة خلال عملية الربط ومن عيوب هذه الفرضية هي صلابة أو عدم مرونة الموقع الفعال بالنسبة للمادة الأساس ويمكن تطبيق هذه الفرضية على عدد من الإنزيمات ذات التفاعلات الحركية البسيطة.

2) فرضية كوشلاند أو التوافق – المستحث **induced fit**: أن المادة الأساس تعمل على تغير شكل الإنزيم مما يؤثر ذلك على انتظام الأحماض الأمينية أو المجاميع الأخرى في الإنزيم في الاتجاه الصحيح لعملية ربط المادة الأساس ومجاميع التحفيز في أماكنها المخصصة عندما تتحد المادة الأساس مع الموقع الفعال للإنزيم، فأن خصوصية الإنزيم تعتمد على المجاميع الجانبية في الأحماض الأمينية في السلسلة الببتيدية للإنزيم والتي يشترك جميعها في الارتباط وبالنظر لمرونة الموقع الفعال في الإنزيم، فأن ارتباط المادة الأساس بالأنزيم ستؤدي إلى تغيرات في هيئة الإنزيم أي حصول تغيرات في التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد وذلك لان الأواصر المتكونة بين المادة الأساس وبين موقع الارتباط لها قد حلت محل الأواصر بين كل موقع من مواقع الربط والمجاميع المجاورة على جزيئة الإنزيم نفسها بالإضافة إلى ذلك أن وجود المادة الأساس في الموقع الفعال قد يطرد جزيئات الماء مما يحول الموقع الفعال إلى منطقة لا قطبية مما يؤدي ذلك إلى تغير في الشكل الرباعي للإنزيم وعلى هذا الأساس يمكن توضيح دور الأحماض الأمينية في عمليات الربط بين المادة الأساس – الإنزيم، فهي أحماض أمينية رابطة وهي الأحماض الأمينية الذي تتحد مع المادة الأساس وتسمى amino acids binding بينما الأحماض الأمينية التحفيزية catalytic amino acids وهي الأحماض الأمينية المسؤولة عن التغيرات الكيمياوية والأحماض الأمينية التركيبية structural

amino acids وهي الأحماض الأمينية الذي تحافظ على التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد للإنزيم ومن ضمنه الموقع الفعال والأحماض الأمينية غير الأساسية non-essential amino acids وهي الأحماض الأمينية الموجودة على سطح الإنزيم ولا تشارك في عملية التحفيز ويمكن تشبيه فرضية التوافق - المستحث بالقفاز الذي يغير من شكله عند دخول اليد فيه، فالقفاز يعد الموقع الفعال واليد هي المادة الأساس أي أن تركيب المادة الأساس يكون مكملا للموقع الفعال عند تكوين مركب معقد بين الإنزيم والمادة الأساس، لكن تركيب المادة الأساس لا يكون مكملا للموقع الفعال في الإنزيم الحر لذلك فان عملية ارتباط المادة الأساس مع الإنزيم تسبب حدوث تغيرات في هيئة التركيب البنائي للإنزيم أثناء عملية الارتباط يؤدي إلى حدوث توافق بين تركيبهما ، فأن فرضية التوافق - المستحث تستوجب أن يكون الموقع الفعال للإنزيم مرنا flexible ومتراخيا floppy وان تكون المادة الأساس صلبة rigid بحيث يسمح ذلك بأن يغلف أو ينطوي أو يلتف الإنزيم حول المادة الأساس وبهذه الطريقة تتقارب وتلتقي وتتطابق المواقع المحفزة للتفاعل والمجاميع المتفاعلة بين الإنزيم والمادة الأساس مع بعضها فأن آلية هذه الفرضية تساعد في الحصول على درجة عاليه من التخصص للإنزيم بينما في آلية القفل والمفتاح يكون الموقع الفعال في وضع صحيح ومستقيم بحيث يصبح من السهل للإنزيم من الوصول إلى الموقع التحفيزي فانهما تكونان في تماس مع بعضهما بينما في آلية التوافق - المستحث، فأن المكونات التحفيزية المختلفة قد تكون منفصلة بمساعدة معينه عن الإنزيم الحر مما يقلل احتمالية تصادم المجاميع المتفاعلة مع بعضها وعندما يتم التعرف على موقع الربط على الإنزيم وموقع الربط على المادة الأساس تبدأ عملية الربط بينهما مما تؤودي إلى تغيرات في هيئة التركيب البنائي للإنزيم مما يسهل ذلك دخول المادة الأساس كليا أو جزئيا إلى الموقع الفعال، ففي بعض الأحيان تعمل مواد أساس مشابه للمادة الأساس للإنزيم على حدوث تغيرات في هيئة التركيب البنائي للإنزيم مما تدخل في الموقع الفعال إلا إن المجاميع المتفاعلة والمجاميع التحفيزية في كل من المادة الأساس والإنزيم لا تتوافق مع بعضها البعض مما لا يحدث تفاعل ويطلق عليه الربط غير المنتج ومن الأمثلة هو تفاعل السكر السداسي الالديهايدي مع ATP بوجود hexokinase حيث يتم التفاعل طبقا لفرضية التوافق - المستحث وعند عدم وجود

hexokinase فان المادة الأساس ATP تتحلل ببطيء بوجود جريئة ماء في الوسط حيث أن تأثير جريئة الماء هو نفس تأثير مجموعة الهيدروكسيل الذي تعود لإنزيم hexokinase وقد تحدث تغيرات في هيئة التركيب البنائي للإنزيم مما يسرع من تحلل ATP.

3. فرضية الإجهاد strain أو تثبيت الحالة الانتقالية

transition state stabilization: بالرغم من تفسير التخصص الإنزيمي لفرضيات فشر وكوشلاند إلا انهما لم تفسر آلية التفاعل بين المادة الأساس والإنزيم وما يصاحب التفاعل من صرف كمية كبيرة من الطاقة وما يجب صرفة من الطاقة الإضافية لبدئ التفاعل وقد أشار هالدين انه إذا كانت طاقة الربط تستعمل لغرض لوي المادة الأساس لتسهيل تفاعلها، فأنه تلزم طاقة إضافية اقل لحدوث التفاعل فعلى سبيل المثال لو فرضنا أن تركيب الموقع الفعال يكون مكملا لموقع المادة الأساس ولكن الموقع الفعال لا يكون مكملا له فإذا كان تركيب الموقع الفعال للإنزيم صلبا لذلك يتوجب التواء المادة الأساس بشكل يسهل ربطها بالإنزيم مما تؤدي إلى تمددها مما يضعف الاصرة التي سيحللها الإنزيم مما يساعد ذلك في دفع التفاعل إلى الأمام وقد يفترض أن المادة الأساس ترتبط بصورة اعتيادية أي بدون التواء مع حدوث تداخلات عديدة بين الإنزيم والمادة الأساس تؤدي إلى التواء المادة الأساس وحدوث التفاعل عندما تختفي من الحالة الانتقالية مما يكون له تأثير إجمالي للإجهاد والحالة الانتقالية متشابها ومن الامثله لذلك هو تحلل الببتيدات بفعل إنزيم الكيموتربسين على حدوث التفاعلات الإنزيمية بالية استقرار الحالة الانتقالية أما إنزيم اللايزوزيم يعمل بالية الإجهاد إلا أن الآلية الحقيقية قد تكون الحالة الانتقالية.

تخصص الإنزيم Specificity: تتميز الإنزيمات بكونها متخصصة في عملها ويحدد التخصص الإنزيمي القابلية النسبية للمادة الأساس الذي ترتبط مع الإنزيم ثم القابلية النسبية للتفاعل وتكوين النواتج وتظهر الإنزيمات تخصصا كيمياويا معينا بالنسبة للمواد الأساس والمواد الناتجة من التفاعل ولا يتم التخصص الإنزيمي ما لم توجد هناك ما لا يقل عن ثلاث نقاط مختلفة التفاعل بين الإنزيم والمادة الأساس بحيث ترتبط كل مادة أساس مع الإنزيم في مواقع متخصصة لتكوين معقد بين الإنزيم والمادة الأساس بحيث يكون موقع المجاميع

المتفاعلة قريبة من بعضها البعض الآخر وقريبة من المواقع التحفيزية في الإنزيم، وهو حالة ارتباط المادة الأساس مع الأحماض الأمينية الرابطة للإنزيم لأن الإنزيم يستطيع أن يرتبط مع ويعمل على عدد محدود من المواد الأساس ذات تخصصات معينه، فالتخصص للمادة الأساس يعتمد على الأحماض الأمينية أو المجاميع الأخرى مثل الأيونات المعدنية في الموقع الفعال من الإنزيم وعلى هيئة معينه في جزيئة الإنزيم وان أهم ميزة للإنزيم هي تخصصه ونشاطه تجاه أنواع معينه فقط من المركبات بسبب الهيئة الخاصة لبروتين الإنزيم فالإنزيمات ذات درجة عالية من التخصص تجاه التفاعلات التي تحفزها وفي اختيارها للمواد المتفاعلة والذي يطلق عليها المواد الأساس للإنزيم substrate فكل إنزيم متخصص لتحفيز تفاعل كيمياوي واحد أو مجموعة من التفاعلات ذات العلاقة، حيث تكون درجة التخصص للمادة الأساس عالية وبعض الأحيان مطلقة.

تقسيم الإنزيمات حسب تخصصها تجاه المادة الأساس إلى الأنواع التالية:

1. **تخصص مطلق absolute specificity**: تعمل الإنزيمات على مادة أساس معينه وتعمل على مواد أخرى ولو كانت تشبه المادة الأساس في تركيبها ومثال ذلك يعمل إنزيم glucoskinase على نقل مجموعة فوسفيت من ATP إلى سكر الكلوكوز فقط وليس إلى أي سكر آخر ويعمل urease على اليوريا فقط و aspartase يحفز الإضافة العكسية للامونيا إلى الاصرة المزدوجة في حامض الفيوماريك لتكوين حامض الاسبارتيك ويعمل إنزيم ATPase على ATP فقط ويبدي cytochrome oxidase تخصص مطلق تجاه السايتوكروم فقط.
2. **تخصص عالي: High specificity** بعض الإنزيمات ذات تخصص عالي وهي التي تعمل على عدد محدود من المواد ذات المميزات التركيبية المشتركة مثل phosphatase الكلوي الذي يعمل على تحلل استرات مختلفة لحامض الفسفوريك وبسرع مختلفة.
3. **تخصص مجسم Stereospecificity**: يكون الإنزيم ذو تخصص مجسم تجاه المادة الأساس فالإنزيم يمكن أن يملك تخصص ضوئي optical specificity للمتناظرات الضوئية من نوع D و L فأن L-amino acid oxidase يهاجم الأحماض

الأمينيـة مـن نـوع L فقـط بينمـا D-amino acid oxidase يتفاعـل فقـط مـع المتناظرات للحامض الأميني من نوع D.

L-AA oxidase

L-amino acid ⟶ 2-keto acids + NH_3 + H_2O_2

D-AA oxidase

D-amino acid ⟶ 2-keto acid + NH_3 + H_2O_2

مـع إن الإنزيمـات تسـلك تخصـص ضـوئي، فـأن مجموعـة قليلـة منهـا مثـل racemases تحفـز التـوازن بـين المتنـاظرات D,L مثـل Alanine racemase يحفـز التفاعل التالي:

L-Alanine ⟷ D-Alanine

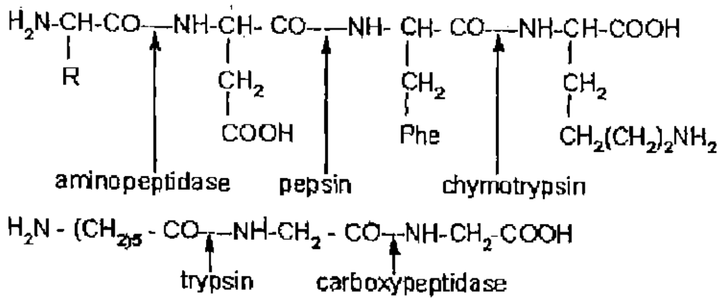
بينما تملك بعض الإنزيمات تخصصات تجاه المتناظرات الهندسية أو متنـاظرات مـن نوع Trans– Cis فعلى سبيل المثـال فـأن furanase يضـيف المـاء بسـرعة إلى الاصـرة المزدوجة للمناظر trans لحامض الفيوماريك لكـن لا يكـون فعـال كليـا تجـاه المنـاظر Cis للحامض ماليك وعندما تكون المادة الأساس على هيئة الشكلينD,L، فأن إحدى الشكلين هو الذي يكون المادة الأساس بالنسبة لإنزيم معين فعلى سـبيل المثـال، فـأن Aspartase الذي يحفز تحول الحامض الأميني L-Aspartic acid إلى حامض الفيوماريك.

L-aspartic acid + H^+ ⟷ Fumaric acid

أي أن لإنزيم aspartase تخصص نوعي مجسم كما أن حامض الفيوماريك من نوع Trans والذي له شكلا آخر مـن نـوع Cis هـو حـامض الماليـك أي أن إنـزيم aspartase يحفز حامض الفيوماريك وليست حامض الماليك إلى حـامض الاسـبارتيك أي يلاحـظ وجـود شكلان هندسـيان متشـابهان يطلـق عليهمـا المتنـاظرات الهندسـية أي أن للإنـزيم تخصـص هندسي كما إن إنزيم المالتيز يساعد في تحليل ألفـا - كلوكوسايد وليسـت بيتـا - كلوكوسـايد

ويعمل arginase على الحامض الأميني L-arginine ويعمل lactate dehydrogenase على حامض اللاكتيك من نوع L (L-lactic acid) ولا تتأثر الأشكال D و Glu dehydrogenase يعمل على L- glutamate فقط.

4. **تخصص واطئ Low specificity**: تكون بعض الإنزيمات ذات تخصص واطئ وهي الإنزيمات التي تعمل على عدد كبير جدا من المركبات التي لها مميزات تركيبية متشابه مثل pancreatic lipase الذي يحلل أعدادا كبيرة من الدهون المتعادلة ومختلفة الأنواع.
5. **تخصص المجموعة Group specificity**: تعمل بعض الإنزيمات على مجموعة معينه لعدد كبير من المواد الأساس مثل alcohol dehydrogenase الذي يعمل على أكسدة العديد من الكحولات أو hexokinase الذي يعمل على نقل مجموعة الفوسفيت من ATP إلى عدد كبير ومختلف من السكريات الحاوية على ستة ذرات من الكربون الذي يطلق عليها hexoses، بعض الإنزيمات مثل الفوسفاتيزات phosphatases الذي تشق رابطة الفسفور- الأوكسجين بينما galactosidases, glucosidases الذي تفضل كل المركبات الذي تملك رابطة كلايكوسيدية، إنزيمات carboxypeptidases تحفز التحلل المائي للببتيدات المتعددة القصيرة السلسلة عندما تهاجم الاصرة الببتيدية في نهاية السلسلة الذي تملك مجموعة كربوكسيل بينما amino peptidase من كلى الكلب يحلل الاصرة الببتيدية في نهاية السلسلة الذي تملك مجموعة أمينية حرة، xanthine oxidase الذي يحفز أكسدة عدد كبير جدا من الالديهايدات المختلفة وتحويلها إلى حوامض مقابلة وكذلك أكسدة الزانثين والهايبوزانثين من بين البيورينات و peptidase يبين نشاط esterase و proteinases مثل الببسين، التربسين والكيموتربسين تحلل الأواصر الببتيدية المتكونة من مجاميع الكربوكسيل في اللايسين والارجنين والكيموتربسين يحلل الأواصر الببتيدية المتكونة من مجاميع الكربوكسيل للأحماض الأمينية العطرية.



6. **تخصص المادة الأساس substrate specificity**: تتخصص بعض الإنزيمات على المادة الأساس الذي تتفاعل معها وتخصص المادة الأساس يعتمد على قابلية المادة الأساس للارتباط مع الإنزيم، بعض المواد الأساس تملك قابلية قوية للارتباط مع الإنزيم بينما البعض الآخر اقل وقسم منها ليست لها القابلية للارتباط مع الإنزيم وتختلف قابلية التخصص من إنزيم لآخر وتختلف الإنزيمات المحللة للبروتين في درجة تخصصها للمادة الأساس فأن إنزيمات subtilisin البكتيري الأصل لا يميز تماما طبيعة السلاسل الببتيدية المجاورة إلى الاصرة الببتيدية الذي يشققها والتربسين يكون متخصص لتشقق الأواصر الببتيدية على الجانب الكربوكسيلي من اللايسين والارجنين فقط وموقع التحلل إنزيم الثرومبين يساهم في تخثر الدم وهو اكثر تخصص من التربسين حيث أن السلسلة الجانبية عند الموقع الكربوكسيلي من الاصرة الببتيدية الحساسة يجب أن يكون الارجنين بينما الآخر يجب أن يكون الكلايسين.
7. **تخصص التفاعل Reaction specificity**: للإنزيم القدرة على اختيار التفاعل المناسب له وهي لا تغير من توازن التفاعل، بل تعجل منه حيث يحفز الإنزيم نوع واحد من مجموعة من التفاعلات الكيماوية لتحويل المادة الأساس فعلى سبيل المثال يقوم amino acid oxidase بأكسدة ونزع مجموعة الأمين التاكسدية للحامض الأميني حيث تتم عملية نزع مجموعة الكربوكسيل بوجود decarboxylase ثم نقل مجموعة الأمين بواسطة transaminase.
8. **تخصص تركيبي Structural specificity**: بعض الإنزيمات تكون متخصصة للتأثير على آصرة معينه في جزيء المادة الأساس، فإنزيم carboxypeptidase له تأثير على الرابطة الببتيدية المجاورة لمجموعة الكربوكسيل الحرة في السلسلة الببتيدية المتعددة و amino peptidase له تأثير فقط على الرابطة الببتيدية الخارجية

المجاورة لمجموعة الأمين الحرة في السلسلة الببتيدية المتعددة ويؤثر الببسين على الروابط الببتيدية الداخلية الموجودة في جزيء البروتين.

9. تخصص نسبي **Relative specificity**: تعمل الاستيريزات esterases على أنواع مختلفة من الاسترات في الدهون والفوسفولبيدات وتختلف قابليتها لتحليل الاسترات من نوع لآخر بسبب وجود رابطة كيماوية معينه فيها بالرغم من كثرة عددها فإنزيم lipase الذي ينتمي إليها متخصص في تحليل الدهون ففي هذا النوع من التخصص لا يكون الإنزيم متخصصا في التأثير على مادة معينه بل يكون متخصص في رابطة معينه في المادة الأساس الذي يعمل عليها ذلك الإنزيم.

10. تخصص المنتج **Product specificity**: بعض الإنزيمات تكون متخصصة للمنتج وخاصة في التفاعلات التي تساعد فيها الإنزيمات حيث أن بعض الإنزيمات متخصصة للعمل على نواتج التفاعلات السابقة والذي ستكون مواد أساس للإنزيمات في التفاعلات اللاحقة وهذا ما يحصل في تفاعلات العمليات الايضية للكربوهيدرات والدهون ويكون تخصص بعض الإنزيمات تحت تأثير السيطرة الفسيولوجية فعلى سبيل المثال تخليق سكر اللاكتوز في الغدد اللبنية يحتاج إلى lactose synthetase وهو الإنزيم الذي يحفز تخليق سكر اللاكتوز والمكون من وحدات فرعية تحفيزية ووحدات فرعية محورة فالوحدات الفرعية التحفيزية بمفردها لا تستطيع تخليق سكر اللاكتوز فهي تحفز ارتباط الكالاكتوز إلى البروتين الذي يحتوي سلسله كربوهيدراتية مرتبطة تساهميا، فالوحدات الفرعية المحورة تغير من تخصص الوحدات الفرعية التحفيزية لكل تربط الكالاكتوز إلى الكلوكوز لتكوين اللاكتوز فإن مستوى الوحدات الفرعية المحورة يكون تحت تأثير السيطرة الهرمونية خلال الحمل فالوحدات الفرعية المحورة تتكون في الغدد اللبنية إلا أن كميتها المتكونة تكون قليلة إلا أن وقت الولادة يحصل تغير في المستوى الهرموني مما يحصل تخليق كميات كبيرة من الوحدات الفرعية المحورة الذي ترتبط إلى الوحدات الفرعية التحفيزية لتكوين معقد إنزيم lactose synthetase الفعال الذي ينتج كميات كبيرة من سكر اللاكتوز في الحليب أي أن الهرمونات لها تأثيرات فسيولوجية تغير من تخصص الإنزيمات.

الفصل الثامن

تحفيز الإنزيمات

Catalysis of Enzymes تحفيز الانزيمات

نادرا ما تحدث التفاعلات الكيمياوية في الانظمه البيولوجية عند غياب العوامل المساعدة catalyst فالعوامل المساعدة في الانظمة البيولوجية هي الانزيمات ومن مميزات الانزيمات جميعا هي قوتها التحفيزية وتخصصها ونشاطها التحفيزي المنظم وقدرة بعضها على نقل اشكال مختلفة من الطاقة حيث تعمل الانزيمات على تعجيل التفاعلات الكيماوية بسرعة محسوسة وتكون الانزيمات ذات درجة عالية من التخصص في تحفيز التفاعلات الكيمياوية واختيار المواد المتفاعلة والذي يطلق عليها المادة الاساس وقد تحفز الانزيلات تفاعل كيمياوي واحد أو مجموعة من التفاعلات ذات العلاقة القريبة من بعضها وغالبا ما تكون الانزيمات ذات درجة من التخصص تجاه المواد الاساس، فالانزيمات المحلله للبروتينات تختلف لدرجة ما في درجة تخصصها تجاه المادة الاساس وهناك انزيمات ذات درجة عالية من التخصص فعلى سبيل المثال، فأن DNA polymerase يخلق DNA بواسطة ربط اربعة انواع من النيوكلوتيدات معا، بعض الانزيمات تخلق بشكل غير فعال والذي تنشط في الوقت والمكان المناسب فسيولوجيا فعلى سبيل المثال trypsinogen يخلق في البنكرياس بشكل غير فعال الذي يحفز عن طريق تشقق اصرة ببتيدية في الامعاء الدقيقة لتكوين الانزيم الفعال تربسين وان انشطة الانزيمات الذي تخلق وتحلل الكلايكوجين تكون منظمة بواسطة ارتباط مجموعة الفوسفوريل الى الحامض الاميني السيرين على سطح تلك الانزيمات، الانزيمات لا تستطيع ان تغير من توازن التفاعلات الكيمياوية لانها تعجل من التفاعلات بالاتجاه الامامي والعكسي بنفس العامل.

ثبات الحالة الانتقالية: في كل التفاعلات الكيمياوية، فأن الذرات المتفاعلة أو الجزيئات تمر خلال حالة الذي يكون فيها مركب وسطي في التركيب بين المواد المتفاعلة reactants والمواد الناتجة products حيث يحصل انتقال بروتون من جزيئة الماء الى ايون الكلوريد السالب.

$$H—O—H + Cl^- \longleftrightarrow H—O\delta^- \text{---} H \text{---} Cl\delta^- \longleftrightarrow HO^- + H\text{--}Cl$$

وفي التركيب الوسطي فأن البروتون المنقول يساهم بالتساوي بواسطة الايونات السالبة للهيدركسيل والكلوريد وهو المركب الانتقالي بين المواد المتفاعلة والناتجة وهو ما يعرف بالحالة الانتقالية، فالتفاعلات الكيمياوية الذي فيها المادة الاساس تتحول منتج p من خلال مركب انتقالي يشار له Ts فأن الدور التحفيزي للانزيم هو تقليل حمل الطاقة بين المادة الاساس والحالة الانتقالية من خلال تكوين معقد انزيم– مادة اساس ES وهذا المعقد يتحول الى منتوج من خلال مروره بالحالة الانتقالية Ets فأن طاقة ETs اقل من Ts، فأن الانخفاض في الطاقة يفسر تعجيل السرعة المنجزة بواسطة الانزيم وكذلك بسبب الفروقات في الطاقة S, Ts، لو فرضنا ان الانزيم E مشبع بالمادة الاساس S سيكون هناك فرق طاقة بين ES و ETs وتعجيل سرعة التفاعل بواسطة الانزيم يعني ان حمل الطاقة بين ES و ETs اقل من حمل الطاقة بين S, Ts، فالانزيمات تحفز التفاعلات بواسطة خفض طاقة التنشيط فالطاقة الحرة لتنشيط التفاعل غير المحفز ΔGu اكبر من طاقة التفاعل المحفز ΔGe، الانزيم يثبت معقد الحالة الانتقالية ETs اكثر من تثبيت معقد المادة الاساسESاي ان الانزيم يرتبط مع الحالة الانتقالية اكثر من المادة الاساس أو المنتوج مما يكون ثابت التفكك لمعقد الانزيم – المادة الاساس هو :

$$KS = [S][S] / [ES \text{ ----------------- } 1$$

وثابت التفكك المقابل لمعقد الحالة الانتقالية

$$KT = [E](Ts] / [ETs] \text{ ----------------- } 2$$

ويحتاج تحفيز الانزيم ان يكون KT< KS وطبقا لنظرية الحالة الانتقالية فأن ثوابت السرعة للتفاعلات المحفزة بالانزيم Ke وغير المحفزة Ku تظهر علاقةKT , KS بالمعادلة التالية:

$$Ke / Ku = KS / KT \text{ ------------- } 3$$

تعجيل سرعة التفاعل الانزيمي تساوي نسبة ثوابت التفكك لمعقدات الانزيم – المادة الاساس والانزيم – الحالة الانتقالية، ان تكوين وتحطيم الاواصر الكيمياوية بواسطة

الانزيمات ناتج عن تكوين معقد المادة الاساس – الانزيم حيث ترتبط المادة الاساس الى منطقة معينه في الانزيم يطلق عليها الموقع الفعال ومعظم الانزيمات لها درجة تخصص عالية تجاه المادة الاساس الذي ترتبط بها فالتخصص التحفيزي للانزيمات يعتمد بدرجة كبيرة على تخصص عملية الربط لأن السيطرة على النشاط الانزيمي يحدث في هذة المرحلة، الموقع الفعال للانزيم هي المنطقة الذي ترتبط بها المادة الاساس وتعزى الى الاحماض الامينية الذي تساهم بصورة مباشرة في عمليات تكوين وتحطيم الاواصر ويطلق على الاحماض الامكينية بالمجاميع التحفيزية catalytic groups، ان سرعة تحفيز التفاعلات الكيمياوية (v) لعدد من الانزيمات تختلف مع اختلاف تركيز المادة الاساس [S] عندما يكون تركيز الانزيم ثابت، فأن السرعة تتناسب طرديا مع تركيز المادة الاساس [S] عندما يكون [S] صغيرا، لكن عندما يكون [S] مرتفع، فأن السرعة لا تعتمد على التركيز [S] حيث ان المعقد ES هو مركب وسطي اساسي في التحفيز وعلى هذا الاساس يمكن حساب الصفات الحركية للعديد من الانزيمات أي ان الانزيم E يرتبط مع المادة الاساس S لتكوين المعقد ES مع ثابت سرعه K_1، معقد المادة الاساس له مسلكين ممكنه فهو يتفكك الى E و S مع ثابت سرعة K_2 أو يكون منتوج تفاعل P مع ثابت سرعة K_3.

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_3} E + P \text{ -------------(1)}$$

لو فرضنا بان ولا أي منتوج P يعود الى المادة الاساس الاولية، تحت هذة الظروف لو تم حجز المرحلة الاولية من التفاعل قبل ان يكون تركيز المنتوج ممكن تقديره، فأن السرعة التحفيزية تساوي تركيز المنتوج لمعقد المادة الاساس – الانزيم وثابت السرعة K_3.

$$v=K_3[ES]\text{-----------------------------}(2)$$

فلو عبرنا عن ES بكمية معلومة.

$$\text{rate of formationof ES} = K_1[S][E]\text{-------------}(3)$$

$$\text{raye of breakdown of ES} = (K_2+K_3)[ES]\text{ ---------}(4)$$

فإذا رغبنا السرعة التحفيزية تحت ظروف الحالة المستقرة، فأن تركيز المركبات الوسطية ليبقى نفسه بينما تركيز المواد البدائية والمنتوج فهي متغيرة وذلك يمكن حدوثة عندما تكون سرع تكوين وتكسير ES متساوية، فأن المعادلة (3) تساوي المعادلة (4).

$$K1[S][E] = [E][S] / (K_2+ K_3 / K_1)\text{------------}(5)$$

وبإعادة ترتيب المعادلة 5 ينتج

$$[ES] = [E][S] / (K_2+K_3/K_1)\text{------------------}(6)$$

يمكن تبسيط المعادلة 6 ويوضع ثابت جديد Km يعرف ثابت ميكليس.

$$Km=K_2 + K_3 / K_1\text{-----------------------------}(7)$$

وبالتعويض في المعادلة 6.

$$[ES] = [E][S] / Km \text{ ---------------------------}(8)$$

تركيز المادة الاساس غير المرتبطة [S] هو قريب جدا الى تركيز المادة الاساس الكلي، ذلك يعني ان تركيز الانزيم اقل من تركيز المادة الاساس، فأن تركيز الانزيم غير المرتبط [E] يساوي تركيز الانزيم الكلي Et مطروحا منه تركيز معقد ES.

$$[E] = [Et] -[ES] \text{ ------------------------}(9)$$

اذا عبرنا عن [E] في المعادلة 8 يصبح

$$[ES] = [Et] - [ES][S]/ km ----------------(10)$$

$$[ES]=[Et] x [S] / km] + 1 \div S]/km--------(11)$$

$$or\ [ES] = [Et]] \div S] / [S] + km ----------(12)$$

وعند استبدال ES في معادلة 2 ينتج

$$v=k_3[Et]\ x\ [S]\ /\ [S] + km -------------(13)$$

يصل التفاعل للسرعة القصوى Vmaxعندما تكون مواقع الانزيم مشبعة بالمادة الاساس وعندما [S] اكثر من km لذلك فأن 1= S] / [S] + km].

$$Vmax = K_3[Et] ------------------------(14)$$

وعند تعويض المعادلة 14 في المعادلة 13 تنتج معادلة ميكليس – منتن

$$v=Vmax\ \ x\ [S] / [S]+Km -------------(15)$$

تستخدم المعادلة 15 لتقدير المعلومات المعطاة في الشكل (64)، في حالة تركيز المادة الاساس منخفض وعندما [S] اقل من Km، فإن

$$V=[S]x\ \ Vmax / Km$$

فأن السرعة تتناسب طرديا مع تركيز المادة الاساس بينما في حالة تركيز مرتفع من المادة الاساس وعندما [S] اكثر من Km، فأن v=Vmax، فأن السرعة تكون في اقصاها ولا تعتمد على التركيز، فأن km تساوي تركيز المادة الاساس الذي فيه سرعة التفاعل في منتصفها من السرعة القصوى، أي ان

$$[S] = Km\ \ and\ V = \tfrac{1}{2}\ Vmax \qquad\qquad Km= \tfrac{1}{2}\ Vmax$$

تقدير Vmax,Km مع تغير في تركيز المادة الاساس، يمكن اشتقاق ثابت ميكليس km والسرعة القصوى Vmax من سرع تحفيز التفاعلات بتراكيز مختلفة من المادة الاساس، فإن الانزيم يعمل طبقا للمعادلة (1)، يمكن تحويل معادلة ميكليس – منتن الى اخرى الذي تعطي خط مستقيم وذلك عندما نأخذ مقلوب الجانبين للمعادلة (15) لتعطي

$$1/v = 1/Vmax + km/Vmax \ \ x \ \ 1/ [S] \text{--- ----}(16)$$

عند رسم مقلوب السرعة 1/ v مقابل مقلوب تركيز المادة الاساس 1/[S] ينتج خط مستقيم مع مقلوب السرعة القصوى 1/ Vmax ومنحني الانحدار km /Vmax وأهمية قيم Vmax، Km تتراوح قيم km على مدى واسع وتختلف باختلاف الانزيمات (جدول-14)، فهي تقع ما بين 10^{-1} الى 10^{-6} مولار فأن قيمةkm للانزيم تعتمد على تركيز المادة الاساس وعلى الظروف البيئية مثل درجة الحرارة والقوة الايونية لثابت ميكليس – منتن هما ان km هو تركيز المادة الاساس الذي فيها نصف الموقع الفعال ممتلئ ويمكن حساب المواقع المملوءة A في أي تركيز للمادة الاساس حيث ان

$$A=v/ Vmax = [S]/[S]+km \text{--------------}(17)$$

أو km القيمه التي لها علاقة الى ثوابت السرعة للخطوات الفردية المبينه في المعادلة (1)، ففي المعادلة (7)، فأن km تساوي K_2+K_3 /K_1 عندما تكون K_2 اكبر من K_3 ذلك يعني ان تفكك معقد ES الى E, S اكثر سرعة من تكوين E, P وتحت تلك الظروف، فإن $K_2 > K_3$.

$$Km = K_2 / K_1 \text{----------------------}(18)$$

ثابت تفكك معقد ES يساوي Kes.

$$Kes = [E][S] / [ES] = K_2/K_1 \text{-------------}(19)$$

وبمعنى اخر فان km تساوي ثابت تفكك معقد ES اذا كان K_3 اقل من K_2 فأن Km هي قياس القوة لمعقد ES وارتفاع قيمة km تشير الى ضعف الارتباط وانخفاض قيمة km تشير الى قوة الارتباط وقد تشير km الى الفة معقد الانزيم – المادة الاساس فقط عندما K_2 اكثر من K_3 لبعض الانزيمات وليست جميعها .

جدول(14) قيم ثابت ميكليس لبعض الانزيمات

Enzyme	Substrate	Km
Chymotrypsin Lysozyme B-galactosidase Threonine deaminase Carbonic anhydrase Penicilllllinase Pyruvic carboxylase Arg–TRNA- Synthetase	acetyl-tryptophan –amide hexa-N-acetyl glucosamine lactose Thr CO_2 Benzylpencillin Pyruvate HCO3- ATP Arg TRNA ATP	5 x 10-3 M 6 x 10-6 M 4 x 10-3 M 5 x 10-3 M 8 x 10-3 M 5 x 10-5M 4 x 10-4 M 1 x 10-3 M 6 x 10-5 M 3 x 10-6 M 4x 10-6 M 3 x 10-4 M

السرعة القصوى Vmax توضح رقم الانقلاب Turnover number للانزيم عندما يكون تركيز المواقع الفعاله [Et] معروف.لان

$$Vmax = K_3[Kt] \text{ -------------------(20)}$$

فعلى سبيل المثال لو كان لدينا محلول 10-6 مولار لانزيم carbonic anhydrase يحفز تكوين 0,6 مولار من حامض الكربونيك انهيدريز لكل ثانية عندما يكون مشبع كليا بالمادة الاساس حيث ان K_3=6x10+5 sec-1 اذا كان ثابت الحركية للتفاعل k_3 يسمى عدد الانقلاب وعدد الانقلاب للانزيم هو عدد التحول وهو عدد جزيئات المادة الاساس الذي تتحول الى منتوج لكل وحدة وقت عندما الانزيم يصبح مشبع كليا بالمادة الاساس وعدد التحول لانزيم كاربونيك انهيدريز هو 6000 000 sec-1 أي يحدث التحفيز في وقت يساوي k_3/1 والذي يكون 1,7 جزء من الثانية وارقام التحويل او

الانقلاب لمعظم الانزيمات للمادة الاساس تحت الظروف الفسيولوجية تقع ما بين 1 الى 10+4 لكل ثانية (جدول- 15).

جدول(15) اعداد التحول لبعض الانزيمات

الانزيم	رقم التحول
Carbonic anhydrase	6000 000
3-ketosteroid isomerase	280 000
acetyl chloine esterase	25 000
penicillinase	2 000
lactate dehydrogenase	1 000
chymotrypsin	100
DNApolymerase-I	15
Try synthetase	2
Lysozyme	0.5

اكتمال التفاعل في التحفيز الإنزيمي Kinetic perfection عندما تركيز المادة الاساس اكثر من ثابت ميكليس، فإن سرعة التحفيز تساوي K_3 والذي هو رقم الانقلاب وتحت الظروف الفسيولوجية لا تكون معظم الانزيمات مشبعة بالمادة الاساس وان نسبة تركيز المادة الاساس [S] الى K_3 تقع ما بين 0,01 و 1 وعندما [S] اقل من ثابت ميكليس، فان سرعة التفاعل الانزيمي اقل من k_3 لان معظم المواقع الفعاله لاتكون مفصولة ويمكن بيات القيمة لحركيات الانزيمات تحت تلك الظروف من المعادلة (2) و(8) لتعطي

$$v= K_3 /km \times [E][S]------------------(21)$$

وعندما [S] اقل من ثابت ميكليس، فأن تركيز الانزيم الحر [E] يساوي تقريبا التركيز الكلي للانزيم [Et].

$$v = K3 /Km \times [E][Et]----------------(22)$$

وعندما [S] اقل من ثابت ميكليس، فأن سرعة التفاعلات الانزيمية تعتمد على قيم K_3 /Km وعلى [S]، فأن نسبة K_3/Km تعتمد على قيم K_1 و K_2 و K_3 ويمكن ان نستعيض عن km.

$$K3/Km = K3K1/K2+K3 \text{-------------} (23)$$

التحديد النهائي للقيم K_3/Km توضع الى جنب K_1 الذي هي سرعة تكوين معقد ES، هذه السرعة لا تكون اسرع من انتشار الانزيم المسيطر عليه والمادة الاساس له فالانتشار يحدد قيم K_1 لذلك فهي لا تكون اكبر من القيم، 8+10 9+10 M-1 sec-1 M-1 sec-1 الذي تبلغ اكتمال حركية التفاعل وتحدد السرعة التحفيزية بواسطة السرعة الذي تحدد المادة الاساس في الوسط فاي سرعة تحفيزية اضافية تأتي من انخفاض وقت الانتشار ويطلق على ثابت Kcat برقم الانقلاب وغالبا ما يستعمل في التفاعلات الانزيمية حيث يحصل على الثابت من المعادلة

$$Vmax = Kcat [E]$$

ويمثل رقم الانقلاب اقصى عدد من جزيئات المادة الاساس التي يمكن تحويلها الى ناتج لكل جزيئة انزيم في وحدة الزمن وفي التفاعلات الكيمياوية البسيطة، فأن $K_2=Kcat$ اما للتفاعلات الكيمياوية الاكثر تعقيد، فأن Kcat تمثل العديد من ثوابت السرعة.

أهمية معادلة ميكليس – منتن: وجد ان معادلة ميكليس – منتن من الناحية العملية تنطبق على العديد من التفاعلات الكيمياوية الانزيمية والذي من خلالها يمكن تقدير السرعة القصوى Vmax وثابت ميكليس Km وعند تغير السرعة القصوى للتفاعلات الكيمياوية الانزيمية يتغير تركيز الانزيم الكلي الا ان قيمة ثابت ميكليس لا تعتمد على تركيز الانزيم وهذه تعتبر صفة تخصصية للانزيم ومن خلال دراسة التفاعلات التي تجرى داخل الخلية الحية، فأن قيمة k m هي احد العوامل التي تقرر أيا من طرق العمليات الايضية سوف تسلكها مادة ما للانزيم الاول في كل مسلك، فعلى سبيل المثال، لو درسنا مصير الكلوكوز-6- فوسفيت، الكلوكوز – 1- فوسفيت و فركتوز-6- فوسفيت لوجدنا ان هذه السكريات المفسفرة تتحول فيما بينها تلقائيا في الخلية الحية لذلك يمكن اعتبارهم وحدة واحدة يعمل عليها انزيم الفوسفوفركتوكاينيز phosphofructokinase لتوجيه الخطوة التالية في انحلال السكر glycolysis فأن قيمة km لهذا الانزيم للفركتوز-6- فوسفيت اقل كثيرا من الانزيم الاول للكلوكوز-1- فوسفيت والذي يساعد في توجيه تخليق الكلايكوجين ففي معظم التراكيز الذي يوجد أي

من السكريات السالفة الذكر في الحالة المفسفرة في الخلية الحية، فأن phosphofructokinase يكون مشبعا بصورة كاملة بالمادة الاساس وان مصير نواتج العمليات الايضية لا يعتمد على k m فقط، بل يعتمد على تركيز كل انزيم وقيمة السرعة القصوى وتأثير المواد المنشطة والمثبطة.

تنظيم الكفاءة التحفيزية للإنزيمات: المضاربة الفسيولوجية تغير مستوى نشاط الانزيم ولا توجد أي طريقة معروفه يمكن بواسطتها ملاحظة التغير في كمية الانزيم او فيما اذا كان الانزيم اكثر كفاءة أو اقل كفاءة تحفيزية، تكلمنا في فصل سابق عن نشاط الانزيم وكل التغيرات في نشاط الانزيم الذي يمكن ان تحدث بدون تغير في كمية الانزيم كمؤثرات على الكفاءة التحفيزية ويمكن السيطرة على التفاعلات الانزيمية بواسطة تغير السرعة القصوى Vmax بواسطة تغير في القابلية التحفيزية للانزيمات الفردية فالخطوة الذي فيها التغيرات في نشاط الانزيم في السرعة القصوى يسبب تغيرات كبيرة في سرعة التفاعل الاعتيادية فالانزيمات تزيد من سرعة التفاعلات الانزيمية الذي تحفز بواسطة عامل بين 8+10 و20+10 على سبيل المثال، في اس هيدروجيني 8 وبدرجة 20م يعمل انزيم urease على تعجيل سرعة تحلل اليوريا 14+10 مرة، السؤال هو كيف تجعل الانزيمات مثل تلك القوة التحفيزية ممكنه تحت ظروف متوسطة من درجة الحرارة والاس الهيدروجيني وهناك بعض العوامل الذي تعزى اليها الكفاءة التحفيزية للانزيمات هي:

1. التقريب proximity والتوجيه orientation للمادة الاساس بالنسبة للمجموعة التحفيزية.
2. الشد strain والالتواءdistortion للاصرة الحساسة بسبب التوافق – المستحث للانزيم.
3. تحفيز الحامض – القاعدة العام base catalysis– general acid.
4. التحفيز التساهمي covalent catalysis.
5. التحفيز الالكتروستاتيكي electrostatic catalysis.
6. التحفيز الانزيمي enzymatic catalysis.

التقريب Proximity والتوجيه Orientation: يحصل ارتباط الانزيم مع المادة الاساس بطريقة ما تجعل الاصرة الحساسة لا تكون قريبة فقط من المجموعة التحفيزية فحسب، بل يتم توجيهها نحو المجموعة التحفيزية مما يزيد ذلك من احتمالية ان معقد المادة الاساس –الانزيم يدخل الحالة الانتقالية، ففي هذه الحالة يتم توجية صحيح للاصرة الحساسة في جزيئة المادة الاساس مع المجموعة التحفيزية الخاصة في الانزيم وتشير الدراسات الحديثة في التفاعلات العضوية بأن تأثير التقريب Proximity والتوجيه Orientation مهم جدا في عمل الانزيم وعلى سبيل المثال فأن ايون الكربوكسيل يحفز تحليل الاسترات مائيا وسرعة تحفيز التفاعل تعتمد على تركيز مجموعة الكربوكسيل حيث تزداد الكفاءة التحفيزية لمجموعة الكربوكسيل عندما ترتبط تساهميا الى الجزيئة الحاوية رابطة استر حساسة مما يسهل ذلك من تقريب العامل المحفز وهو الانزيم والمادة الاساس من بعضها وتكون التفاعلات الكيمياوية سريعة عندما تكون المواد المتفاعلة قريبة من بعضها البعض الاخر بسبب زيادة تراكيز المواد المتفاعلة والذي يرفع من عدد الجزيئات المتصادمة بسبب زيادة سرعة التفاعلات الكيمياوية فالانزيمات تملك مواقع ارتباط خاصة للجزيئات المتفاعلة مما يحدث تفاعل الجزيئات القريبة من بعضها البعض الاخر مما يزيد ذلك من سرعة التفاعلات الكيمياوية فالانزيمات ليست فقط تجلب المادة الاساس والمجاميع التحفيزية قريبة من بعضها بل تعمل على توجيههم بطريقة مناسبة لتحفيزهم.

الشد والالتواء: الشد والالتواء أو ما يطلق عليه فرضية التوافق – المستحث الذي اوضحت كيفية ارتباط المادة الاساس مع الانزيم يسبب تغيرات في الهيئة التركيبية البنائية في جزيئة الانزيم الذي تشد من التركيب البنائي للموقع الفعال في الانزيم وكذلك تسبب التواء المادة الاساس المرتبطة مع الانزيم مما يساعد ذلك على تحويل المعقد للانزيم – المادة الاساس الى الحالة الانتقالية وهذا التغير يطلق علية التوافق – المستحث للانزيم تجاة المادة الاساس، لتغيرات في التركيب البنائي الثلاثي أو الرباعي لجزيئة الانزيم الكبيرة نسبيا تبذل جهد ميكانيكي على المادة الاساس واوضحت الدراسات للاشعة السنية لعلم البلورات مقترح الية تحفيز انزيم carboxypeptidaseA وهو ان مجموعة الهيدروكسيل للحامض الاميني التيروسين في الموقع 248 يهب بروتون الى – NH- في الاصرة الببتيدية مما يؤدي ذلك الى انفصالها ثم تهاجم مجموعة الكربوكسيل في الحامض الاميني كلوتاميك في الموقع 270

في سلسلة الببتيد المتعدد للانزيم، ذرة الكربون الكربونيلية لاصرة الببتيد كما تحصل اضافة مجموعة هيدروكسيل في خطوة لاحقة الى الحامض الاميني في الموقع 270 ومكونات الحامض من المادة الاساس وفي الية اخرى مقترحة وهو ان الحامض الاميني في الموقع 270 يحفز جزيئة ماء، فإن مجموعة الهيدروكسيل الناتجة تهاجم ذرة كربون الكربونيل لاصرة الببتيد الحساسة وفي نفس الوقت، فإن الحامض الاميني التيروسين في الموقع 248 يهب بروتون الى مجموعة – NH- للاصرة الببتيدية الحساسة مما يؤدي ذلك الى تحللها مائيا وهو ان الاصرة الببتيدية الحساسة للمادة الاساس بدلا من تكوين مركب وسطي انهيدريدي تتم اكسدتها مباشرة بالماء وان المواد الببتيدية تضاف لها مجموعة هيدروكسيل مباشرة بينما المواد الاسترية تكون انهيدريد مع الحامض الاميني الكلوتامين في الموقع 270، مجموعة الكربونيل في الاصرة الببتيدية الحساسة تتجه نحو ايون الزنك لذلك فان اصرة الكربونيل تكون مستقطبة اكثر من الاعتيادي مما تجعل ذرة كربون الكربونيل اكثر قابلية لمهاجمة nucleophilic.

تحفيز الحامض – القاعدة العام: تقريبا كل التفاعلات الانزيمية تحتاج الى درجة من التحفيز الحامضي – القاعدي وهناك نوعين من التحفيز الحامضي – القاعدي هما التحفيز الحامضي – القاعدي العام الذي فيه الحامض او القاعدة عدا OH- ,+ تعجل التفاعل والتحفيز الحامضي – القاعدي الخاص الذي فيه H+,OH- تعجل التفاعل، ففي التحفيز الحامضي او القاعدي الخاص فتركيز المحلول المنظم لايؤثر على التفاعل بينما في تحفيز الحامض – القاعدة العام فأن المحلول المنظم يهب او يتقبل بروتون في الحالة الانتقالية مما يؤثر على سرعة التفاعل الكيمياوي ويمكن القول بأن تحفيز الحامض – القاعدة العام هو تحفيز الذي فيه البروتون ينتقل في الحالة الانتقالية ويمكن توضيح التحلل المائي لمركب p-nitrophenyl acetate مع الاميدازول الذي يعمل كقاعدة عامة، فأن نقل البروتون يثبت الحالة الانتقالية والماء يكون اكثر باحث عن النواة بدون توليد تركيز عالي من ايون الهيدروكسيل او بدون تكوين جنس عالي الطاقة غير ثابت فالتحفيز الحامضي او القاعدي العام يزيد من سرعة التفاعل الكيمياوي بمقدار 10 الى 100 ضعف، المجاميع المتأينه في الانزيم على البروتين تجهز ايون الهيدروجين المنقول في الحالة الانتقالية وتكون المجاميع المتأينه اكثر فعالية من ايون الهيدروجين الذي ينقل العامل قريب من ثابت التفكك لان ثابت تفكك الهستدين قريب من 7 مما يكون الهستدين اكثر فعالية عندما يكون قاعدة او

حامض عام، يجهز الموقع الفعال للانزيم مجاميع R من الاحماض الامينية معينة الذي تكون واهبات بروتون جيدة او قابلات بروتون جيدة، بعض المجاميع القاعدية -الحامضية العامة تكون ذات قوة تحفيزية قوية لعدد من التفاعلات العضوية في الانظمة السائلة، مجاميع واهبة للبروتون.

$$-COOH\ ,\ -SH\ ,\ \ -NH_3^+$$

مجاميع قابلة للالكترون

$$-COO^-\ ,\ -NH_2\ ,\ -S^-$$

تتمكن الحوامض من تحفيز التفاعلات العضوية بأنها تهب بروتون بصورة مؤقته بينما تتمكن القواعد من ذلك بانها تاخذ بروتون بصورة مؤقتة فالقاعدة تتمكن من تحفيز تحليل الاستر لانها تجعل الحالة الانتقالية مستقرة وتتمكن ايضا من زيادة سرعة التفاعلات الكيمياوية من خلال زيادة النيوكلوفيلية للمجاميع المهاجمة فأن ايونات الهيدروكسيل تحل محل الهاليدات التي تعود الى هاليدات الالكيل بسرعة اكبر مقارنه مع جزيئات الماء المتعادلة كما تسهل الحوامض على نزع المجاميع المغادرة عندما تكون قواعد قوية، يمكن تقسيم الحامض – القاعدة للتفاعلات العضوية الى ثلاث انواع رئيسية هي:

1. تحفيز الحامض – القاعدة المعينة أو الخاصة.
2. تحفيز الحامض – القاعدة العام.
3. تحفيز الحامض – القاعدة للويس.

تحفيز الحامض- القاعدة الخاص: وهو زيادة سرعة التفاعلات الكيمياوية الذي تتناسب فقط لامع تركيز ايونات الهيدروجين والهيدروكسيل وتحفيز الحامض- القاعدة العام وهو ان زيادة سرعة التفاعل الكيمياوي تتناسب مع تركيز القواعد العامة والحوامض العامة مثل قابلات البروتون وواهبات البروتون على التوالي، تحفيز الحامض – القاعدة الخاص ذو اهمية محدودة نسبيا في التفاعلات العضوية ولا توجد هناك انزيمات معروفة تعمل على زيادة النشاط التحفيزي لايونات الهيدروجين والهيدروكسيل الحرة في الوسط بينما التحفيز

الحامضي – القاعدي العام اكثر احتمالية في عمل معظم الانزيمات لانواع مختلفة من التفاعلات الكيمياوية العضوية الذي تتعرض هذا النوع من التحفيز وهذه التفاعلات تتضمن اضافة الماء الى مجاميع الكربونيل وتحليل استرات الفوسفيت والكربوكسيل وطرد أو نزع الماء من الاصرة المزدوجة وعدد كبير من تفاعلات اعادة الترتيب وتفاعلات الاستبدال، فان جزيئات الانزيم تحتوب مجاميع وظيفية عديدة الذي لها القدرة ان تعمل كقواعد او حوامض عامه مثل مجاميع الامين، الكربوكسيل، السلفاهيدريل، الهيدروكسيل في التايروسين والاميدازول، في التفاعلات المحفزة بواسطة القاعدة- الحامض العام، فأن العامل المحفز في بعض النقاط يكون واهب او قابل البروتونات، حامض لويس هو قابل زوج الالكترونات وهو باحث الكترون وهو nucleophilic group، الايونات المعدنية مثل ايونات المغنيسيوم والمنغنيز والحديديك هي مجاميع الكتروفيلية electrophilic groups، جزيئات الانزيم تحتوي انواع مختلفة من المجاميع الالكترونيلية الواهبة للالكترون مثل مجاميع الهيدروكسيل في السيرين ومجاميع الاميدازول ومجاميع السلفاهيدريل، كل واحد منها يحتوي زوج الكتروني الذي يبحث عن النواة، المجاميع النيوكلوفيلية تتفاعل بسرعة مع المجاميع الالكتروفيلية وبالعكس، العوامل النيوكلوفيلية تحفز بعض التفاعلات الكيمياوية بسبب قابليتها لتكوين مركبات وسطية تساهمية من خلال تفاعلات الازاحة النيوكلوفيلية الذي فيها المجموعة النيوكلوفيلية في الانزيم تزيح مجموعة مستبدلة من من ذرة الكربون الحساسة للمادة الاساس لتكوين مركب تساهمي بين الانزيم وما تبقى من المادة الاساس، المعقد التساهمي للانزيم – المادة الاساس غير ثابت ويتحطم بسرعة لتكوين مواد ناتجة، هذه العملية يطلق عليها التحفيز التساهمي، مجموعة الاميدازول للهستدين تكون متغيرة كعامل محفز وهي نوية قوية جدا وهي شكل يملك بروتون وحامض عام، هذه الصفات تكون بارزه في اس هيدروجيني متعادل، في عدد من الانزيمات التحوير الكيماوي للهستدين يسبب عدم نشاط الانزيم ، هذا ما يدل على ان الهستدين هو اساسي في العملية التحفيزية.

التحفيز التساهمي: في التحفيز التساهمي، فأن بعض الانزيمات تتفاعل مع المواد الاساس لتكوين معقدات انزيم – مادة اساس غير ثابتة ومرتبطة تساهميا وتتحطم بسرعة لتكوين مواد ناتجة، في بعض التفاعلات الانزيمية، فأن الانزيم يزيح المجموعة الوظيفية R

للمادة الاساس RX لتكوين معقد EX التساهمي الذي يكون غير ثابت والذي يتحلل بسرعة لتكوين RX.

التفاعلات غير المحفز $RX + H_2O \longrightarrow ROH + HX$

التفاعلات المحفزة

$$RX + E\text{-}OH \longrightarrow ROH + EX$$

$$EX + H_2O \longrightarrow E\text{-}OH + HX$$

$$RX + H_2O \longrightarrow ROH + XH$$

للتحفيز التساهمي اليات تفاعل مختلفة تسمى احيانا التحفيز للمسلك المتبادل او المتناوب alternative pathway catalysis، ففي حالة التحفيز النيوكلوفيلي، حيث يكون العامل المحفز اكثر نيوكليوفيلية من المجاميع الاخرى المهاجمة مما يجعلة يعتمد على تكوين مركبات وسطية بسرعة كبيرة التي تتحطم بسرعة عالية لتعطي نواتج نهائية،ان العديد من الامينات الثلاثية تساعد في تحليل الاسترات، حيث تعمل العوامل التحفيزية الالكتروفيلية بسحب الالكترونات من مركز تفاعل المركب الوسطي الذي هي ساحبة للالكترون وهذا النوع من التحفيز يحدث في تفاعلات المرافقات الانزيمية مثل الثيامين بيروفوسفيت والبيريدوكسال فوسفيت،بامكان حلقة الثيازول ان تفقد بروتون لتنتج ذرة كربون سالبة الشحنه والمركب الناتج هو نيوكليوفيلي قوي يساهم في التحفيز التساهمي مع 2-keto acid decarboxylase, phosphoketolase 2-ketooxidase transketolase, حيث يتم نزع مجموعة الكربوكسيل الحقيقية بمساعدة الالكتروفيلية عندما تعمل حلقة الثيازول على سحب الالكترونات.

التحفيز الانزيمي: تعمل جميع العوامل المحفزة على خفض طاقة التنشيط او تقلل من الطاقة الحرة للتنشيط للتفاعلات التي تساهم فيها، فالطاقة الحرة تتكون من المحتويات العشوائية entropic والحرارية enthalapic لانه يحدث فقدان كبير في درجة العشوائيةentropy عند مغادرة المواد المتفاعلة الحالة العشوائية التي توجد فيها في

المحلول الحر مما تصبح جزء من الحالة الانتقالية ففي التفاعلات الانزيمية يحدث فقدان مشابه في درجة العشوائية في بعض مراحل التفاعل وخاصة مرحلة ارتباط المادة الاساس بالانزيم لتكوين المركب المعقد ويقل الفقدان نوعا ما في درجة العشوائية أي ان درجة العشوائية تزداد عند تحويل المادة الاساس الى نواتج التفاعل مما يسهل ذلك من ارتباط جزيئات المادة الاساس على سطح الانزيم بشكل متقارب الى زيادة تركيز الجزيئات مما يقلل من درجة العشوائية في التفاعلات اللاحقة عند تكوين الحالة –الانتقالية وهذا ما يطلق عليه تأثير التقارب proximation effect أو التأثير التقريبي approximation effect أو تأثير التقارب في المكان حيث يعمل الانزيم على تقريب المجاميع الفعاله مع بعضها البعض الاخر في المواد المرتبطة بحيث تاخذ المدارات الالكترونية في المجاميع الفعاله مدارها الصحيح وهذه الظاهرة اطلق عليها كوشلاند التوجية المداري orbital steering حيث يساهم العامل الحراري enthalapic factor على الحالة الانتقالية، فأن استقرارية الانزيم في الحالة الانتقالية تعتبر من اهم العوامل التي تقرر اتمام التفاعل في الاتجاه الصحيح ومن المحتمل ان تساهم عدة عمليات تحفيزية مختلفة في نفس التفاعل الانزيمي ومن طرق اختزال العامل الحراري عندما تكون اماكن مواقع الربط على الانزيم لا تتطابق تماما مع المواقع على المادة الاساس مما يؤدي ذلك الى تشتيت واضعاف الاواصر بين المادة الاساس – الانزيم كما يحدث في الحالة الانتقالية، وهذه هي فكرة هالدين – بولنك حول الاجهاد أو قد يكون المركب المعقد بين الانزيم والمادة الاساس تحت ضغط او جهد بسبب التأثيرات الداخلية في المركب المعقد بحيث لا توجد مثل تلك التاثيرات في الانزيم عندما يكون جزءا من المعقد في الحالة الانتقالية مما يدفع التفاعل بالاتجاة الامامي، ان الانحراف في جزيئة الانزيم من وضعها الطبيعي الذي يجعل المادة الاساس لا تستطيع الجلوس في الموقع الفعال للانزيم لا يؤثر على المحتوى الحراري الا انه لا يمنع من تاثير العوامل الاخرى مثل عوامل الضغط والاجهاد ويتضح مما سبق ذكرة ان الانزيمات تخلق الظروف المناسبة لتحفيز التفاعلات الانزيمية لا تمام التفاعل حيث تعمل الانزيمات على اقلال طاقة التنشيط وتعمل على توزيع صرف الطاقة على مراحل التفاعل لأن كل مرحلة من مراحل التفاعل تحتاج الى طاقة تنشيط معينة ولا يكون مصدر طاقة التنشيط هي المادة الاساس.

التحفيز الالكتروستاتيكي: يمكن جعل الحالة الانتقالية مستقرة بسبب التداخل الالكتروستاتيكي بين المجاميع ذات الشحنه للحالة الانتقالية وبين المجاميع ذات الشحنه الموجودة على العامل المحفز، لذلك يمكن جعل الشحنه الموجودة على ايون الكاربونيوم مستقرة عند تفاعلها مع الشحنه السالبه لايون الكربوكسيل وكذلك يمكن جعل الشحنه السالبه على الاوكسينون مستقرة بفعل الشحنه الموجبة للايون المعدني، حيث يزداد استقرار الحالة الانتقالية بواسطة التفاعلات الالكتروستاتيكية مع الايون المعدني.

تحفيز الايون المعدني: العديد من الانزيمات تحتاج الى الايونات المعدنية لزيادة نشاطها وعندما يرتبط الانزيم مع الايون بقوة او يحتاج الايون المعدني لادامة ثباته هذه الحالة الطبيعية يطلق عليها الانزيمي المعدني وعندما يرتبط الانزيم بقوة ضعيفة مع المعدن ولربما خلال دورة التحفيز فقط يشار له المنشط المعدني حيث يعمل الايون المعدني في كلا الحالتين بشكل تحفيز الكتروفيلي الذي يثبت كثافة الالكترون أو الشحنات السالبة الذي تتطور خلال التفاعل ومن الانزيمات المهمة في هذا المجال هو alcohol dehydrogenase في الكبد الذي يحفز نقل ايون الهيدريد من NADH الى الاسيتالديهايد لتكوين الايثانول فأن ايون الزنك في الموقع الفعال يثبت الشحنة السالبة على ذرة الاوكسجين في الاسيتالديهايد مما يؤدي الى استحداث شحنة موجبة جزئيا على ذرة كربون الكربونيل لان نقل ايون الهيدريد السالب الشحنة الى ذرة الكربون يكون ايثانول ويمكن ان تساهم الايونات المعدنية في تحفيز التفاعلات الكيمياوية من خلال تحفيز الحامض – القاعدة العام والتحفيز التساهمي وتقريب المواد المتفاعلة واستحداث الشد في الانزيم او المادة الاساس فالايونات المعدنية تشبه الحوامض للويس (الالكتروفيلية) وهي تساهم زوج الالكترونات لتكوين اشصرة سكما ويمكن اعتبار الايونات المعدنية كحوامض قوية لانها توجد في المحلول المتعادل او ممكن تكوين اصرة باي بالاضافة الى ذلك تستطيع الايونات المعدنية ان تكون صرح template ثلاثي الابعاد لتوجية المجاميع الحامضية على الانزيم او المادة الاساس، الايونات المعدنية تستطيع ان تقبل الالكترونات عن طريق اواصر سكما او باي للتنشيط الالكتروفيلي او النيوكليوفيلي (التحفيز الحامضي – القاعدي العام) وتستطيع ايضا الايونات المعدنية بواسطة وهب الالكترونات ان تنشط النيوكليوفيليات او تعمل كنيوكليووفيلي، المنطقة التناسقية للمعدن تقرب من الانزيمات والمادة الاساس معا او

تسبب التـواء اما في الانزيم او في المادة الاساس أو يمكن ان تكون قناع يمنع مـن التفـاعلات الجانبيـة، الشـحنات الموجبـة تعمـل علـى اسـتقرارية الحالـة الانتقاليـة بسـبب التجـاذب الالكتروستاتيكي وهو احد اليات التحفيز بواسطة المعادن وبغض النظر عـن حالـة الاكسـدة وعدد الشحنات التي يحملها الايون المعدني فأنه يتمكن مـن ربـط عـدد معـين مـن المجـاميع باخذ ازواجا من الالكترونات الحرة لتكوين اواصر تناسقية والتي هي احد الاواصر التساهمية الـتي تحتـوي علـى زوج مـن الالكترونـات تجهزهمـا الـذرتين اللـتين تربطهمـا الاصـرة في وضـع متخصص مما يمكن ذلك الايونـات المعدنية من المساهمه في عمل الانزيمات بطرق مختلفة تمكن الايونات المعدنية من ان تأخذ او تعطي الكترونـات لتنشـيط الالكتروفيـل او النيوكليوفيـل، ففي المحاليل المتعادلة، فأن الايونات المعدنية نفسها تعمـل الكتروفيـل او نيوكليوفيـل ممـا تحجب النيوكليوفيل لمنع حـدوث التفـاعلات الكيمـاويـة الجانبيـة غـير المرغوبـة كمـا تعمـل الايونات المعدنية ايضا على تقريب الانزيم والمادة الاساس من بعضها بسبب وجود الاواصر التناسـقيه او قـد تسـبب الايونـات المعدنيـة اجهـاد المـادة الاسـاس حيـث تعمـل الايونـات المعدنية على مسـك المجـاميع المتفاعلـة في الشـكل الثلاثـي لربعـاد وأخـيرا تعمـل الايونـات المعدنية على استقرارية التركيب البنائي الفعال للانزيم.

آلية التحفيز catalytic mechanism

تملـك الانزيمـات فعاليـة تحفيزيـة لـربط رابطـة معينـه مـع المجـاميع التحفيزيـة ففـي التفاعلات الانزيمية يحصل ارتباط المجاميع الرابطة والتحفيزية مع المادة الاسـاس بطريقـة مـا لتكوين معقد الانزيم – المركب الوسطي الذي يحتوي مستوى طاقة اقـل مـن معقـدات المـادة الاساس أو المنتوج مع الانزيم حيث تكـون طاقـة التنشـيط لتكـوين معقـد الانـزيم –المركـب الوسطي اقل من طاقة التنشيط للتفاعل في حالة غياب الانزيم.

1. الاليـة التحفيزيـة لانـزيم Serine proteases: هـي صـنف مـن الانزيمـات المحللـة للبروتين والذي تملك آلية تحفيزية مبنية على اساس الحـامض الامـيني سـيرين في الموقـع الفعال وهذه العائلة تتضـمن التربسـين، الكيموتربسـين، elastase, thrombin, subtilisin, plasmin, tissue plasminogen activator والانزيمـات الاخرى ذات العلاقـة، الانزيمـات التربسـين، الكيموتربسـين والايلاسـتيز مـن الانزيمـات

الهاضمة والذي تخلق في البنكرياس وتفرز الى القناة الهضمية بشكل غير فعال proenzymes أو zymogens حيث تتحول في القناة الهضمية الى انزيم فعال يتكون من تشقق جزء من السلسلة الببتيدية، الثرومبين انزيم حرج يلعب دوراً مهماً في تخثر الدم بينما subtilisin هو بروتيز بكتيري والبلازمين يحطم الياف الفايبرين في خثرة الدم اما tissue plasminogen activator فهو يشقق البلازمينوجين لانتاج البلازمين وبسبب قدرة الانزيم لتحفيز هدم خثرة الدم فأنه يستطيع تقليل اذى الذبحة القلبية، البروتيز أو ما يطلق عليه acetyl cholinesterase الذي هو serine esterase والذي آليته لها علاقة مع آلية Serine esterase، التربسين، الكيموتربسين والاستيز هي انزيمات هاضمة تنجز نفس التفاعل وهو تشقق السلسلة الببتيدية وذات آلية وتركيب بنائي متشابه وهي ذات تخصصات مختلفة جدا فالتربسين يشقق الببتيدات على جانب الكربونيل من الحامض الاميني القاعدي مثل الارجنين او اللايسين بتنما الكيموتربسين يشقق جاني الكربونيل للاحماض العطرية مقل الفنيل الانين والتايروسين، الايلاستيز اقل تخصص من تلك الانزيمات وهو يشقق الببتيدات على جانب الكربونيل من الاحماض الامينية المتعادلة الصغيرة وهذه الانزيمات تملك وزن جزيئي في مدى 25000 وجميعها متشابه في التسلسل، الكيموتربسين مثالي التركيب البنائي ويحتوي حلزون الفا α-helix في نهاية الطرف الكربوكسيلي من 230-245 والعديد من مناطق صفائح بيتا β-sheet ومعظم الاحماض الامينية العطرية والمحبة للدهن موجودة في داخل جزيئة البروتين ومعظم الاحماض االامينية الشحونه والمحبة للماء على السطح، هناك ثلاث احماض امينية قطبية هي الهستدين في الموقع 57 والاسبارتيك في الموقع 102 والسيرين في الموقع 195والذي تعرف catalytic triad في الموقع الفعال هذه الاحماض الامينية الثلاثة في التربسين والايلاستيز،الموقع الفعال موجود على سطح الانزيم مع جيب صغير يستفاد منه الانزيم للتعرف على الاحماض الامينية المتخصص لها، الكيموتربسين يملك جيب محاط بواسطة احماض امينية محبة للدهن وسلسلة جانبية عطرية بينما الجيب في التربسين يملك شحنه سالبة من الحامض الاميني الاسبارجين في الموقع 189 في اسفل الجيب الذي يساهم في ارتباط الاحماض الامينية الارجنين واللايسين ذات الشحنة الموجبة ويملك الايلاستيز جيب قريب من السطح الذي يرتبط به الثريونين والفالين.

2. **الالية التحفيزية للكيموتربسين:** آلية الكيموتربسين مبنية على اساس التحلل المائي للاسترات العضوية البسيطة مثل p-nitrophenylacetate واسترات المثيل لمضاهيات الاحماض الامينية مثل formyl phenyl alanine methyl esters و acetyl phenylalanine methyl ester وفي الية الكيموتربسين، فأن p-nitrophenylacetate يرتبط مع الانزيم لتكوين معقد ES الذي يليه خطوة ثانية سريعة الذي فيها تكوين مركب وسطي acyl -enzyme مع ارتباط مجموعة خلات تساهميا الى السيرين في الموقع 195 مما يحصل تحرير مجموعة نتروفنيل بشكل nitrophenolate تحصل مهاجمة جزيئة الماء على المركب الوسطي- acyl enzyme لانتاج الخلات بشكل منتوج ثانوي مما يتحررالانزيم ليرتبط الى جزيئة اخرى من بارا - نتروفنيل الخلات لانتاج nitrophenolate، انتاج الخلات هو خطوة محددة لسرعة التفاعل، الدور البيولوجي للكيموتربسين هو تحفيز التحلل المائي للبروتينات في الامعاء الدقيقة.

$$R_1\text{-}COO^- + R_2\text{-}NH_3^+ \longleftrightarrow R_1\text{-}CO\text{-}NH\text{-}R_2 + H_2O$$

Peptide acid amine

$$R_1\text{-}CO\text{-}O\text{-}R_2 + H_2O \longleftrightarrow R_1\text{-}COO^- + HO\text{-}R_2 + H^+$$

Ester acid alcohol

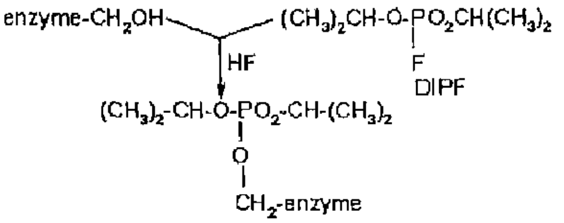
وهو لا يشقق كل الاواصر الببتيدية في نفس السرعة بالاضافة الى ذلك فهو يختار الاواصر الببتيدية على الجانب الكربوكسيلي من السلسلة الجانبية العطرية للتيروسين والتربتوفين والفنيل الانين او من المجاميع غير المحبة للماء مثل المثيونين ويحلل الكيموتربسين اواصر الاستر بالرغم من عدم اهمية هذا التفاعل من الناحية الفسيولوجية لكن اهمية تكمن في كونه ذو علاقة قريبة الى تحلل الاواصر الببتيدية ويتم تحليل الاواصر الببتيدية والاستر في مرحلتين اوهما بواسطة دراسة اليات التحلل المائي للمركب p-nitrophenyl acetate، فان تحرير بارا- نتروفينول يحتاج كمية كبيرة من الانزيم وهناك مرحلة بروز سريع اولي لبارا- نترو- فينول يلي تكوينها في مرحلة الحالة الانتقالية

البطيئة، ففي الخطوة الاولى يحصل ارتباط بار- نتروفنيل الخلات مع انزيم كيموتربسين لتكوين معقد مادة اساس – انزيم وتحرير بارا- نتروفينول يسبب تشقق رابطة الاستر للبارا- نتروفنيل الخلات الذي تعمل كمادة اساس للانزيم ويحصل ارتباط مجموعة الخلات للمادة الاساس مع الانزيم بواسطة اصرة تساهمية والذي تهاجم مجموعة الخلات بواسطة الماء لتكوين ايون الخلات مع تحريره من المعقد ES، ان مرحلة البروز السريع الاولية لانتاج بارا – نتروفينول مقابل تكوين معقد الانزيم – الخلات وهذه العملية يطلق عليها الاستله، انتاج الحالة –المستقرة البطيئة من بارا- نتروفينول مقابل التحلل المائي لمعقد انزيم الخلات لتوليد انزيم حر يطلق عليه نزع الاستله او ما يطلق عليها الخطوة الثانية وهي خطوة تحديد السرعة في التحلل المائي للاسترات بواسطة الكيموتربسين ويمكن اعادة الية الكيموتربسين حيث يحصل ارتباط تساهمي لمجموعة الخلات مع الانزيم حيث ترتبط مجموعة الخلات الى الكيموتربسين تساهميا وعندما P_1 هي الامين او الكحول في المادة الاساس و $E\text{-}P_2$ هي المادة الوسطية التساهمية بينما P_2 هي المكون الحامضي للمادة الاساس.

$$E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{\searrow P_1} E\text{-}P_2 \xrightarrow{\searrow P_2} E$$

الصفة المميزة لهذة الالية هي حدوث مركبات وسطية تساهمية، حيث نلاحظ ان المجموعة المرتبطة الى الكيموتربسين في مرحلة $E\text{-}P_2$ هي مجموعة اسيل لذلك يكون المركب الوسطي انزيم – اسيل ومجموعة الاسيل ترتبط الى الحامض الاميني السيرين على سطح الانزيم فان موقع ارتباط مجموعة الاسيل هو الاوكسجين في الحامض الاميني السيرين الذي يكون ثابت في اس هيدروجيني 3 حيث يكون موقع الحامض الاميني السيرين في الانزيم هو 195 الذي يتفاعل مع Fluoro phosphates مثل diisopropylphosphofluoridate,DIPF الذي يجعل الانزيمات المحللة للبروتين غير فعاله مثل التربسين والكيموتربسين subtilisin , thrombin, elastase ويحدث فيها التفاعل في الحامض الاميني السيرين، لذلك يطلق على هذه الانزيمات Serine proteases ومن الاحماض الامينية الاخرى المهمه في الية التحفيز للكيموتربسين هو الهستدين في الموقع 57 حيث يكون الحامض الاميني الهستدين في الموقع 57 مجاور الى

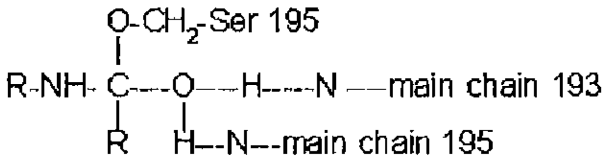
السيرين في الموقع 195 ومجموعة الكربوكسيل للحامض الاميني اسبارتيت في الموقع 102 مجاور لهما وتداخل الاحماض الامينية الثلاثه لزيادة القوة التحفيزية للكيموتربسين بحيث يرتبط الاسبارتيت في الموقع 102 بواسطة اصرة هيدروجينية الى الهستدين في الموقع 57 والذي يرتبط بواسطة اصرة هيدروجينية الى السيرين في الموقع 195 وبهذا تكون الاحماض الامينية الثلاثة ما يسمى charge relay net work.



انزيم غير فعال

وتشير نتائج دراسات الاشعة السينية بوجود جيب في الموقع الفعال لاحتواء السلاسل الطرفية العطرية وان للحامض الاميني الاسبارتيك المدفون في داخل جزيئة الانزيم يلعب دوراً مهماً في عمل كل من الهستدين في الموقع 57 والسيرين في الموقع 195 وان المادة الاساس ترتبط بالسيرين في الموقع 195 والهستدين في الموقع 75 وعندما ترتبط المادة الاساس مع الانزيم الحر تصبح القوة النيوكليوفيلية لاوكسجين السيرين في الموقع 195 عالية بسبب انتقال الشحنه السالبة من الاسبارتيت في الموقع 102 من خلال الهستدين في الموقع 57 الذي يهاجم الاوكسجين لمجموعة الكربوكسيل للانزيم الذي ترتبط مع المادة الاساس مكوناً مركباً وسطياً غير مستقر tetrahedral الذي يحتوي ذرة اوكسجين سالبة الشحنه غير ثابته ثم يزداد ثابت ذرة الاوكسجين بسبب تكوين اصرة هيدروجينية مع مجموعة-NH الذي تعود الى الحامض الاميني الكلايسين في الموقع 193 حيث تعمل مجموعة الاميدازول الذي تعود الى الحامض الاميني الهستدين في الموقع 57 كعامل تحفيزي حامضي مما يسهل ذلك تحرير الناتج الاولي للتفاعل AH تاركا اسيل الانزيم ونتيجة الهجزم النيوكليوفيلي وبسبب وجود الماء يتحرر ناتج ثاني R-COOH ويعمل الحامض كعامل تحفيز ويلعب net work دوراً مهماً في التحفيز بسبب ربط البروتون وتستقطب مجموعة الكربوكسيل المطمورة للحامض الاميني الاسبارتيت في الموقع 102 مجموعة الاميدازول للهستدين في الموقع 57 مما تزداد سعته للعمل كمكوك بروتون حيث تتقبل الحامض الاميني

الاسـبارتيت في الموقـع 102 والهسـتدين في الموقـع 57 البروتـون مـن السـيرين في الموقـع 195وخاصة من مجموعة الهيدروكسيل خلال المهاجمة النيوكليوفيلية بواسـطة الاوكسـجين الموجود على سطح المادة الاساس، يساهم الهستدين في الموقع 57 والسيرين في الموقع 195 بصورة مباشـرة في تشقق اصرة الببتيد الحساسة للمـادة الاسـاس حيـث يبـدأ التحلـل المـائي للاصـرة الببتيديـة عنـد مهاجمـة الاوكسـجين في مجموعـة الهيدروكسـيل للحـامض الامـيني السيرين في الموقع 195 على ذرة الكربون الكربونيلية في اصرة الببتيـد الحساسـة ممـا تصـبح اصرة الاوكسجين – الكربون في مجموعة الكربونيل مفـردة وذرة الاوكسـجين تكتسـب شـحنه سالبه، الذرات الارعة المرتبطة الى كربـون الكربونيـل تترتـب بشـكل tetrahydron ربـاعي السطوح وتكوين المركب الوسطي رباعي السـطوح مـن مجموعـة الامايـد يسـهل مـن تكـوين اواصر هيدروجينية بين ذرة الاوكسجين الكربوكسـيلية ذات الشـحنه السـالبة الـذي تسـمى oxyanion ومجاميع NH للسلسلة الرئيسية.



يوضح الشكل اعلاه المركـب الوسـطي ربـاعي السـطوح في تفـاعلات الاسـتله وازالـة الاستلة للكيموتربسين، الاصرة الهيدروجينية المتكونـه بواسـطة المجمـوعتين مـن NH مـن السلسله الرئيسية للانزيم تساعد على ثبات المركـب الوسـطي ممـا يحصـل نقـل بروتـون مـن السيرين في الموقـع 195 الى الهسـتدين في الموقـع 57، يسـهل نقـل البروتـون بسـبب وجـود charge relay net work الاسـبارتيت في الموقـع 102 يوجـه حلقـة الاميـدازول في الهستدين في الموقع 57 مما يعـادل الشـحنه جزئيـا علـى الحلقـة، البروتـون المخـزون بسـبب ارتباط الهستدين –الاسبارتيت يوهب الى ذرة النتروجين لاصـرة الببتيـد الحساسـة ونتيجـة لذلك يحصـل تشـقق تلـك الاصـرة فـان مكونـات الامـين تـرتبط مـع الهسـتدين في الموقـع 57 بواسطة اصرة هيدروجينية بينما مكونات الحـامض للمـادة الاسـاس تتاسـتر مـع السـيرين في الموقع 195 مما تنتهي مرحلة الاستلة للتفاعل التحللي ثم تبدأ مرحلة ازالة الاستله وتبتعد مكونات الامين للمادة الاساس عن طريق الانتشار ممـا تاخـذ جزيئـة المـاء مكانهـا في الموقـع

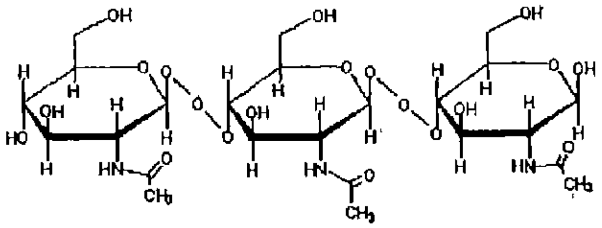
الفعال وازالة الاستلة هي عكس الاستلة مع استبدال ماء لمكونات الامين حيث يتم سحب بروتون بعيدا عن الماء مما تبقى مجموعة الهيدروكسيل الذي تهاجم ذرة الكربون الكربونيلية لمجموعة الاسيل التي ترتتبط الى السيرين في الموقع 195 مما يحصل تكوين مركب وسطي رباعي السطوح مما يجعل الهستدين في الموقع 57 يهب بروتون الى ذرة الاوكسجين في السيرين 195مما يحرر مكونات الحامض للمادة الاساس والذي يتم انتشار مكونات الحامض بعيدا بينما يصبح الانزيم جاهز لعملية تحفيز اخرى.

3. **الالية التحفيزية للتربسين:** يساعد انزيم التربسين في تحلل الاواصر الببتيدية التي تكون فيها مجموعة الكربوكسيل تعود الى الاحماض الامينية الارجنين او اللايسين الموجودة في اسفل الجيب او الفجوة غير المحبة للماء وتتشابه الية عمل التربسين لالية عمل الكيميوتربسين الا ان الفرق الرئيسي هو وجود الاسبارتيت في قعر جيب الربط للتربسين لربط لالاحماض الامينية القاعدية الارجنين واللايسين الموجودة في المادة الاساس،التربسين يملك حامض اميني السيرين في الموقع الفعال وتسلسل الاحماض الامينية حول السيرين هو نفسة في التربسين، الكيموتربسين والايلاستيز وهو Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro فالتركيب البنائي الثلاثي لتلك الانزيمات متشابه جدا ، الالية التحفيزية له تشبه الكيموتربسين لكن تختلف في التخصص بسبب التغيرات التركيبية القليلة في مواقع الربط.
4. **الالية التحفيزية للرايبونيوكليز:** يساعد الانزيم في تحلل الاصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر في الحامض النووي الرايبوزي وذلك بتحويل مجموعة الفوسفيت من الموقع الخامس الذي يعود لاحدى النيوكلوتيدات الى الموقع الثالث للنيوكلوتيد المجاور في السلسلة وتساهم الاحماض الامينية الهستدين في الموقع 12 وفي الموقع 119 في تحفيز الانزيم وهما توجدان في الموقع الفعال للانزيم حيث تكون متباينتين احدهما تعطي بروتون والاخرى تأخذ بروتون كما ان للحامض الاميني اللايسين دوراً مهماً في تحفيز الانزيم ايضا وتشير دراسات الشكل ثلاثي الابعاد للانزيم وجود هذه الاحماض الامينية الثلاثيه بصورة متقاربه مع بعضها البعض الاخر في الشق الخاص لربط المادة الاساس، الانزيم يحفز التحلل المائي لاصرة الفوسفيت استر في ذرة الكربون الخامسة في الحامض النووي الرايبوزي الذي فية مجموعة الفوسفيت ترتبط الى ذرة الكربون الثالثة من

البيرميدين نيوكلوتيد مثل السايتدين او اليوردين واستمرار عمل الانزيم يؤدي الى تكوين جزيئات أو اقســـام ماعدا القطع الطرفية تحمل مجاميع هيدروكسيلية حرة في الموقع الخامس ومجموعة فوسفيت استر في الموقع الثالث ويتم تحلل جزء من سلسلة الحامض النووي الرايبــوزي، ففي احد مقترحات الالية التحفيزية للانزيم تعمل مجاميع الاميدازول في هستدين السلسلة الجانبية كحامض — قاعدة عامة وتستعمل مجموعة الامونيوم للايسين في السلسلة الجانبية لربط المادة الاساس السلبة الشحنه في مجموعة الفوسفيت ثم تعمل مجموعة الهيدروكسيل كنواة نيوكليوفيلية والصفة النيوكليوفيليه تعود الى مجموعة الاميدازول القاعدية وفي هذة الالية التحفيزية يرتبط الحامض النووي الرايبوزي في شق الانزيم مع مجموعة البيرميدين في موقع خاص ويحجز في الموقع بواسطة اصرتين هيدروجين تتضمن الاحماض الاميسنية اللايسين والهستدين اللذان تحملان شحنه سالبة فتجذب تلك المجاميع للالكترونات حيث يوجد قرب الفسفور مجموعة هيدروكسيل تعود الى الرايبوز في المادة الاساس، مجموعة الهيدروكسيل تكون اكثر نيوكليوفيلية من خلال اصرة الهيدروجين مع الشكل القاعدي للحامض الاميني الاخر الهستدين، مجموعة الفسفور تعطي الالكتروفيلية بينما تعطي مجموعة الهيدروكسيل النيوكلوفيلية مما يساعد ذلك على تكوين اصرة بينهما حيث يتم سحب البروتون بواسطة الهستدين في الموقع 12 والذي يعمل كقاعدة عامه مما يؤدي ذلك الى تكوين 3,2- فوسفوثنائي استر حلقي الذي يملك شحنتين سالبتين مما يسهل ذلك من تكوين اصرة اوكسجين— فسفور الذي تحول البروتون في الهستدين في الموقع 119 الذي يعمل كحامض عام احد نهايتي المادة الاساس تحمل مجموعة هيدروكسيل حر في الموقع الخامس الذي تغادر الانزيم، الجزء المتبقي من المادة الاســاس لا يزال موجود بشكل 3,2- فوسفو ثنائي استر حلقي يحجز بسبب شحنته السالبه الى الحامض الاميني اللايسين المجاور، حيث يتم تكوين واعادة تركيب المركب الوسطي غير الثابت (3,2- فوسفو ثنائي استر حلقي) ويتم دخول الماء وفي هذه الحالة تحل مجموعة الهيدروكسيل للماء محل مجموعة الهيدروكسيل على جزئ الحامض النووي الرايبوزي مما يحول ذلك الهستدين في الموقع 119 من حامض عام الى قاعدة عامه مما يؤدي ذلك الى سحب بروتون من الماء ويترك مجموعة الهيدروكسيل في المركب الوسطي خماسي التكافؤ الجديد، فالهستدين في الموقع 12 الذي كان قاعدة عامه يعمل الان كحامض

عام مما يهب بروتون الى اصرة الفسفور — الاوكسجين في المركب الوسطي مما يتحول المتبقي من الحامض النووي الرايبوزي الى شكل ثابت يتفاعل مع جزيئة اخرى من الحامض النووي الرايبوزي وقد اقترح رابين Rabin واخرون عام 1962 الية تحفيز الانزيم الذي فيها يعمل الحامض الاميني الهستدين في الموقع 12 على ازالة بروتون من المادة الاساس مما ينتج عن ذلك اوكسجين نيوكليوفيلي الذي يهاجم الفوسفيت بالمقابل يعطي الحامض الاميني الهستدين في الموقع 119 بروتون الى المركب المعقد مما يحرر الناتج الاول R_2-OH حيث تحل جزيئة ماء محل R_2-OH ويساعد الحامض الاميني الاليسين في استقرارية المركب المعقد بسبب التداخلات الالكتروستاتيكية مع الشحنه السالبه للفوسفيت.

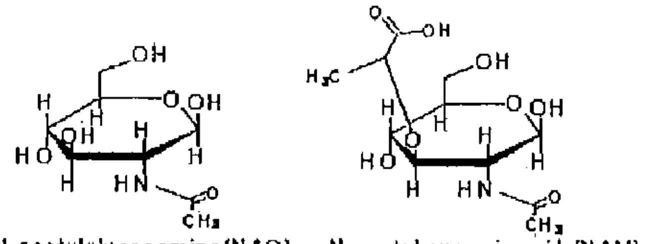
5. **الالية التحفيزية لانزيم اللايزوزيم:** هو انزيم صغير نسبيا يحصل عليه من بياض البيض ويتركب من سلسلة ببتيدية متعددة مفردة مكونه من 129 حامض اميني ويملك روابط مستعرضة بواسطة اربعة جسور ثنائية الكبريتيد المسؤولة عن قابلية الثبات للانزيم ويملك تركيب بنائي ثلاثي الابعاد 45 × 30 × 30 انكستروم ولا يملك الانزيم مجموعة رابطة ومن خلال دراسة الاشعة السينية لعلم البلورات تمكن من دراسة الالية التحفيزية للانزيم، فقد بينت معقدات tri-NAG-Lysozyme مكان الموقع الفعال فيه حيث ترتبط Tri-NAG الى الانزيم في شق على سطحة وتشغل حوالى نصف الشق حيث يرتبط بواسطة رابطة هيدروجينية وتداخلات قوى فان در فال.



Tri-N-acetyl glucosamine (Tri-NAG)

التداخلات الالكتروستاتيكية لا تحدث بسبب كون Tri-NAG فقد المجاميع الايونية اما التداخلات للاصرة الهيدروجينية بين Tri-NAG، ان مجموعة الكربوكسيل في الحامض الاميني الاسبارتيت في الموقع 101 ترتبط بواسطة اصرة هيدروجينية بين السكريات

ومعظم الاواصر الهيدروجينية تقع بين الانزيم والسكر وهناك اربع اواصر هيدروجينية، فأن NH لحلقة الاندول في الحامض الاميني التربتوفين في الموقع 62 الذي يرتبط باصرة هيدروجينية الى الاوكسجين المرتبط الى ذرة الكربون السادسة والحامض الاميني المجاور الهستدين في الموقع 63 الذي يرتبط بواسطة اصرة تساهمية الى الاوكسجين المرتبط بذرة الكربون الثالثة وهناك ثلاث اواصر هيدروجينية بين مجاميع NH,CO للسلسلة الجانبية للمركب acetamid في السكر والمجاميع CO,NH في السلسلة الرئيسية للاحماض الامينية في الموقع 107 و59 على التوالي وهناك عدد كبير من ثوابت فان در فال بين Tri-NAG والانزيم، السكر يرتبط بواسطة اتصالات قطبية مع الانزيم لكن ترتتبط مع حلقة الاندول للحامض الاميني للتربتوفيسن في الموقع 62، السكر A هو الاكثر ارتباطات مع الانزيم من بقية السكريات ويساعد انزيم اللايزوزيم في تحلل المركب المتبلور من جزيئات NAG , NAM الذي تعطي شكل ومتانة جدار الخلية البكتيرية.



N-acetylglucosamine(NAG) N-acetylmuramic acid (NAM)

يحتوي الانزيم شق يتسع لست وحدات من السكريات الامينية حيث يرتبط كل سكر اميني مع الانزيم بواسطة اواصر هيدروجينية حيث يرتبط السكرين الامينيين في الموقعين A, C مع الحامض الاميني الاسبارتيت في الموقع 101 والسكر الاميني في الموقع B مع التربتوفين في الموقع 62 والتربتوفين في الموقع 63 والسكر الاميني في الموقع F مع الاسبارجين في الموقع 37 لايمكن للمركب NAM من الارتباط مع المواقع E, C,A بسبب كبر سلسلته الطرفية مما يجعل ذلك المجال ضيقا وخلال ارتباط NAM مع الموقع D يتغير السكر السداسي الموجود في NAM من التركيب الذي يكون على شكل كرسي الى التركيب الاقل استقرارا الذي يطلق عليه نصف كرسي ويحدث التحلل بين الوحدات في الموقع D,E مما يحصل تحليل الاصرة الكلايكوسيدية بيتا(1 ← 4) بين ذرة الكربون الاولى في النهاية المختزلة للمركب NAM وذرة الكربون الرابعة للمركب NAG، الاحماض الامينية التي

تكون قريبه من الاصرة الكلايكوسيدية عبارة عن كلوتاميت في الموقع 35 والاسبارتيت في الموقع 52.

6. **الالية التحفيزية لانزيم كاربوكسي ببتيديز:** تعتبر انزيمات الكاربوكسي ببتيديزات من الانزيمات البنكرياسية الذي تحلل الاصرة الببتيدية القريبه الى الطرف الكربوكسيلي من سلسلة الببتيد المتعددة وتحرير الحامض الاميني الطرفي وهذه الانزيمات تعود الى hydrolases او peptidases، الببتيديزات تهاجم الاواصر الببتيدية الطرفية لذلك يطلق عليها exopeptidase يستعمل الحامض الاميني كلوتاميت للمجموعة النيوكليوفيلية انقل مجموعة الاسيل ويحتوي الانزيم على الزنك ويستعمل الحامض الاميني الارجنين لتثبيت الطرف الكربوكسيلي للمادة الاساس في مكانه المناسب والارجنين يوجد في الانزيمات ليحجز المادة الاساس السالبه الشحنه في مكانها وخاصة الفوسفيت احادي الاسترات، التايروسين يكون اواصر هيدروجينية مع المادة الاساس وتختلف الالية التحفيزية لهذا الانزيم عن انزيم اللايزوزيم وتعمل ذرة الزنك في الانزيم كنواة الكتروفيلية والذي ترتبط مع الاحماض الامينية الهستدين والكلوتاميت المجاورة في الانزيم مما تحفز تجاذب الانزيم لذرة الاوكسجين السالبه في مجموعة الكربونيل للمادة الاساس ووجود الصفة الموجبة لذرة الكربون الكربونيلية للمادة الاساس مما يسهل ارتباطها الى الحامض الاميني النيوكليوفيلي كما ان تشقق الاصرة الببتيدية يساعد في تكوين اصرة هيدروجينية بين مجموعة الهيدروكسيل للتيروسين ونتروجين الامايد وارتباط المادة الاساس مع الانزيم يسبب تغيرات كبيرة في التركيب البنائي للانزيم كما ان وجود الزنك وبعض المجاميع الاخرى في الانزيم تقع في الموقع الفعال الذي يستحث اعادة ترتيب الذرات في التوزيع الالكتروني للمادة الاساس مما يجعلها اكثر حساسية تجاه التحلل المائي ويتكون الانزيم من سلسلة ببتيدية متعددة مفردة تتكون من 307 حامض اميني الذي تكون ذو شكل مرصوص ذو ابعاد ثلاثية 50 × 42 × 38 انكستروم ويملك الانزيم مناطق الفا حلزون تشكل 38% وصفيحة مطوية من نوع بيتا تشكل 17%، اصرة الزنك مرتبطة بقوة والذي تكون اساسية للنشاط الانزيمي ويقع الزنك في شق قريب من سطح جزيئة الانزيم، يرتبط الزنك تناسقيا مع ثلاث احماض امينية اثنان منها الهستدين في الموقع 69 و 196 والكلوتاميت في الموقع 72 مع

وجود جزيئة ماء وهناك جيب كبير قرب ايون الزنك وارتباط المادة الاساس يستحث تغيرات تركيبية كبيرة في الموقع الفعال للانزيم ويمكن توضيح الارتباط في خمسة تداخلات هي:

1. مجموعة الكربوكسيل الطرفية ذات الشحنه السالبه في كلايسيل – تيروسين الذي تتداخل الكتروستاتيكيا مع الحامض الاميني الارجنين في الموقع 145 الموجود في السلسلة الجانبية ذات الشحنه الموجبة.
2. التايروسين في السلسلة الجانبية للمادة الاساس يرتبط الى الجيب غير القطبي في الانزيم.
3. هيدروجين مجموعة NH في الاصرة الببتيدية يرتبط تساهميا الى مجموعة الهيدروكسيل في الحامض الاميني التيروسين في الموقع 248 في السلسلة الجانبية العطرية.
4. اوكسجين الكربونيل للاصرة الببتيدية يرتبط تناسقيا الى ايون الزنك.
5. مجموعة الامين الطرفية للمادة الاساس ترتبط بواسطة اصرة من خلال اعتراض جزيئة ماء الى الحامض الاميني الكلوتاميت في الموقع 270 من السلسلة الجانبية ونتيجة لذلك فأن المجاميع التحفيزية للانزيم تعمل على التوجية الصحيح بواسطة ارتباط المادة الاساس حيث ترتبط مجموعة الكربونيل للمادة الاساس مع ايون الزنك مما يزيح ذلك جزيئة ماء وتتم ازاحة اربع جزيئات اخرى من الماء من الجيب غير القطبي عندما يرتبط بها تيروسين في السلسلة الجانبية من المادة الاساس، التغيرات في الهيئه التركيبية تسبب حركة مجموعة الهيدروكسيل الفينولية في الحامض الاميني التبروسين في الموقع 248 وهذة الحركه تسبب دوران حول اصرة كربون – كربون المفردة، مجموعة الهيدروكسيل في الحامض الاميني التيروسين في الموقع 248 يتحرك من سطح الجزيئة الى اقرب اصرة ببتيدية للمادة الاساس وهذه الحركه تقترب من تجويف الموقع الفعال واكتمال تحويلة من منطقة مملؤه بالماء الى منطقة محبة للماء وهذه التغيرات التركيبية يمكن بدئها بواسطة ارتباط الارجنين في الموقع 145 الى مجموعة الكربوكسيل الطرفية للمادة الاساس ويمكن توضيح الالية التحفيزية للانزيم وفقا لدراسات الاشعة السينية لعلم البلورات المقترحة من قبل Lipscomb، في هذا المقترح الذي يشير ان مجموعة الهيدروكسيل في الحامض الاميني التيروسين في الموقع 248 يهب بروتون الى

مجموعة NH في الاصرة الببتيدية عندما تنفصل ثم مهاجمة ذرة الكربون الكربونيلية في هذه الاصرة الببتيدية بواسطة مجموعة كربوكسيل في الحامض الاميني كلوتاميت في الموقع 270 الذي تعمل كنواة الكتروفيلية، الانهيدريد الناتج من الحامض الاميني الكلوتاميت في الموقع 270 الذي يضاف له هيدروكسيل في خطوات لاحقة، ان الحامض الاميني الكلوتاميت في الموقع 270 ينشط جزيئة ماء ومجموعة الهيدروكسيل الناتجة تهاجم ذرة الكربون الكربونيلية لاصرة الببتيد الحساسة وفي نفس الوقت فأن التيروسين في الموقع 248 يهب بروتون الى مجموعة NH في الاصرة الببتيدية الحساسة وهذه الالية تختلف عن الالية السابقة كون ان الاصرة الببتيدية الحساسة للمادة الاساس تتحلل بواسطة الماء.

7. **الالية التحفيزية لانزيم aspartate aminotransferase:** ينقل الانزيم مجموعة الامين من ذرة الكربون الاولى الى اخرى بواسطة عملية نقل المجموعة الامينية ويحصل التبادل الفعال بين الكلوتاميت والاسبارتيت بوجود انزيم يحفز التفاعل هو aspartare aminotransferase, glutamate-oxaloacetate glutamate،transferase و aspartate transaminase الانزيم يحتوي بيريدوكسال فوسفيت وهو مرافق انزيمي تحتاجه الانزيمات الذي تهاجم الاحماض الامينية الحرة وهو يثبت بواسطة سلسلة ببتيدية نتعددة من الانزيم بطريقة ما تقترب المجموعة الالديهايدية مع اللايسين الذي يتفاعل لتكوين aldimine وتحصل تغيرات تساهمية في تفاعلات نقل مجموعة الامين ويمكن توضيح الالية التحفيزية، تصتدم جزيئة الحامض الاميني اسبارتيت من نوع يساري مع الانزيم مما ترتبط معه عن طريق مجاميعة الكربوكسيلية مما تصبح مجموعة الامين قريبه من التركيب البنائي للمركب aldimine على الانزيم مما تتحول الاصرة المزدوجة من ذرة نتروجين اللايسين الى ذرة نتروجين الاسبارتيت مما يحصل تحرير مجموعة الامين في اللايسين وتكوين aldimine الاسبارتيت وذلك لتكوين aldimine بواسطة تبادل مجاميعة مع الالديمين الاولي وتحويل الاصرة المزدوجة للالديمين لتكوين ketimine وهي خطوة تحدد السرعة ويتحلل المركب لتكوين اوكزالوالخلات وبيريدوكسامين الفوسفيت ويتم تفكك اوكزالوالخلات الحرة بينما البيريدوكسامين

فوسفيت لا يزال مرتبط مع الانزيم بواسطة مجاميع اخرى على المرافق الانزيمي، فقد الرابطة التساهمية تسهل من تفكك المرافق الانزيمي وapoenzyme في هذه المرحلة ثم ترتبط جزيئة الفا – كيتوكلوتاريت مع البروتين بواسطة ارتباطات مجاميع الكربوكسيل ويتكون ketimine بين الفا كيتوكلوتاريت وبيريدوكسامين فوسفيت ثم يحصل تحويل الاصرة المزدوجة مرة اخرى لتكوين ketimine كحامض كلوتاميت مع بيريدوكسال فوسفيت، تتحول الاصرة المزدوجة للالديمين من نتروجين حامض الكلوتاميك الى اللايسين على البروتين مما تترك كلونتاميت حر الذي يتفكك ويعيد الظروف الاصلية للانزيم وبذلك يعيد الانزيم الالية من جديد مع جزيئة جديدة من الاسبارتيت أو العمل في عكس الخطوات لذلك يمكن ان تبدأ مع كلوتاميت مع اوكزالوالخلات لتصل الى اسبارتيت مع الفا كلوتاريت.

8. **الالية التحفيزية لانزيم lactate dehydrogenase**: من الانزيمات التي تحفز تفاعلات الاكسدة والاختزال والذي دائما تحتاج الى مرافق انزيمي، مجموعة رابطة او ايونات معدنية مرتبطة لنشاطة وهي تفاعلات تحتاج واهب أو قابل للالكترون وحاملات الالكترون للتوازن هي الكحولات والكيتونات او الالديهايدات وهي غالبا ما تكون نيكوتين امايد ادنين ثنائي نيوكلوتيد NAD^+ وحلقة البيريدين فيه هي جزء من الجزيئة الذي تتغير خلال تفاعلات الاكسدة والاختزال، اختزال NAD^+ يحتاج الى ايون هيدريد (بروتون مع الكترون) حيث يفقد النيوكليوتيد شحنته الموجبة في العملية ويستمر التفاعل حتى يتكون مركب وسطي وفي حالة التوازن فأن اللاكتيت والبيروفيت هي ابسط مثال لاستخدام NAD^+ وهي مركبات ناتجة عن تحلل الكلوكوز.

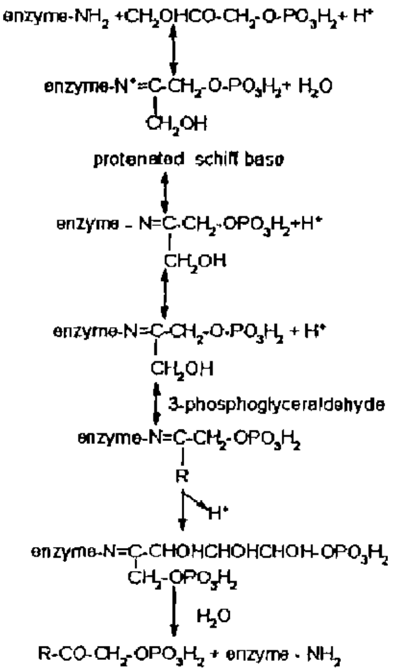
$$CH_3CHOHCOOH + NAD^+ \longleftrightarrow CH_3COCOO^- + NADH + H^+$$

NAD^+, NADH المستعملة في التفاعلات توضح فقط التغير في الشحنه حيث يحفز التفاعل بواسطة lactate dehydrogenase ويحصل خلال التفاعلات المحفزة بواسطة الانزيم اكسدة اللاكتيت او اختزال البيروفيت اعتمادا على التركيز النسبي للمواد المتفاعلة بما ان NAD^+ تستهلك خلال اكسدة اللاكتيت فهي مرافق انزيمي للانزيم، لأن نفس جزيئة NAD^+ يمكن ان تؤكسد عدة جزيئات من اللاكتيت، يستنتج من ذلك بان هناك بعض التفاعل الاضافي الذي فيه يتم تحويل NADH الى NAD^+ المؤكسد، لا ترتبط

NAD^+ بقوة الى الانزيم أو تعتبر NAD^+ المادة الاساس الثانية للانزيم ويملك الانـزيم اربـع وحدات فرعية وذو وزن جزيئي 140000 أي ان الوزن لكل وحدة فرعية حـوالي 35000 وهناك نوعان من الوحدات الفرعية تختلفان في تركيب الاحماض الامينيـة ويطلـق علـى النـوع الاول form – M الـذي يوجـد في العضـلات الهيكليـة والنـوع الثـاني form – H الـذي يوجد في القلب وينتج النوعان من الوحـدات الفرعيـة بواسـطة جينـات منفصـله، كـل وحـدة فرعية تكون غير فعاله عندما توجد بمفردها الا انها تصبح فعالـه عنـدما تتحـد مـع وحـدة فرعية اخرى من نفس النـوع أو مـن نـوع مختلـف لتكـوين الانـزيم الفعـال الـذي يحتـوي اربـع وحـدات فرعيـة واتحـاد الوحـدات الفرعيـة لا يكـون متسـاوي ممـا ينـتج عنـه تكـوين خمـس متشابهات للانزيم الذي تسمى الانزيمات المتناظرة والية الانزيم الدقيقـة غـير معروفـة الا ان العالم كابلان وآخرون اقترحوا فرضية اطلق عليها الهوائية – اللاهوائية التي يمكـن ان تـؤدي الى انتاج بيروفيت من الكربوهيدرات بواســطة انحلال السكر أو من الاحماض الامينية والذي يتحول تحت الظروف اللاهوائية الى لاكتيت بوجود الانزيم وتشير الدراسات للاشعة السينية لعلم البلورات بأن كل وحدة فرعية مبنية من منطقتين احدهما ملفوفة حول المرافق الانزيمي والاخرى تحتوي موقع ربط المادة الاسـاس وكـل مـن هـذه المنطقـتين تحتـوي شـعاع السلسـلة الجانبية لحجز المرافق الانزيمي او المادة الاسـاس في مكانها الذي تتضمن مجـاميع الكربوكسـيل للاحمـاض الامينيــة الاســبارتيت والكلوتاميــت ومجــاميع الامونيــوم للايســين ومجموعــة الهيدروكسيل من التيروسين بينما المجاميع السالبة للمادة الاساس والمرافقات الانزيمية يـتم حجزها في مكان بواسطة الحامض الاميني الارجنين في السلسلة الجانبية من الببتيد المتعـدد، المرافق الانزيمي الرابط للمنطقة نفسـها يربط منطقتين احـدهما ملفوفـه حـول جـزئ نيكـوتين امايد نيوكليوتيد من المرافق الانزيمي والاخرى حول جزي ادنين نيوكليوتيد، الالية التحفيزية للانزيم تتضمن استعمال الحامض الامـيني الهسـتدين في السلسـلة الجانبيـة كحـامض عـام او قـاعدة عامة اعتمادا على اتجاه التفاعل أي ان موقع الربط في الانـزيم يعـزى الى ثـلاث منـاطق احدهما ملفوفة حول جزيء الادينوسين من المرافق الانزيمي (مجموعةAMP) والاخرى حول جزيئ نيكوتين امايد نيوكليوتيد (مجموعة NMN) والثالثة حول المادة الاساس.

9. **الالية التحفيزية لانزيم Fructose diphosphate aldolase**: واحـد مـن التفـاعلات المهمـه في العمليـات الايضـية للكلوكـوز هـو التحويـل الـداخلي للســكر

سداسي الكربون والمركبات ثلاثية ذرات الكربون بشكل استرات الفوسفيت، هذه التفاعلات تحفز بواسطة انزيم aldolase المهم في هذا التفاعل هو تفاعل الحامض الاميني اللايسين في الانزيم للتفاعل مع السكريات الكيتونية ketoses كمادة اساس عن طريق تكوين رابطة استر فوسفيت اما لثنائي هيدروكسي الاسيتون أو الفركتوز، اللايسين يجهز مجموعة امين على ذرات الكربون مما يعمل كنواة نيوكليوتيدية لمهاجمة ذرة كربون الكربونيل للسكريات الكيتونية وترتبط المادة الاساس تساهميا بشكل قاعدة شيف اوketimine مع الانزيم بينما يعمل الهستدين كحامل بروتون لتحفيز التفاعلات التساهمية، انزيم الالدوز يحفز تكثيف هيدروكسي اسيتون فوسفيت وكلسيرالديهايد —3 — فوسفيت لتكوين فركتوز- 6,1- ثنائي الفوسفيت حيث يكون ثنائي هيدروكسي اسيتون فوسفيت مع قاعدة شيف مع الحامض الاميني اللايسين في الموقع الفعال من الانزيم وقاعدة شيف تلعب دوراً مهماً في التحفيز لأنها تحفز تكوين enolate anion في ثنائي هيدروكسي اسيتون فوسفيت حيث يضاف لها كلسيرالديهايد —3- فوسفيت لانتاج قاعدة شيف للفركتوز-6,1- ثنائي الفوسفيت.هذه القاعدة تفقد بروتون وتتحلل الى فركتوز-1، 6- ثنائي الفوسفيت مع توليد انزيم (الشكل —24).



الشكل (24) الالية التحفيزية لانزيم الالدوليز

الفصل التاسع

حركيات الإنزيمات

حركيات الإنزيمات Enzyme Kinetics

عند استعمال الانفرتيز invertase لتحليل السكروز، فان التفاعل يكون أحادي الرتبة في التراكيز المنخفضة من السكروز إلا انه يصبح صفر الرتبة في التراكيز العالية فيه وهذا النوع من التفاعلات يحدث لجميع التفاعلات الإنزيمية التي تساعد فيها الإنزيمات والتي تساهم فيها مادة أساس واحدة وكذلك التفاعلات التي تساهم فيها عدة مواد أساس بشرط ثبوت تراكيز المواد الأساس ماعدا واحدة،العلاقة بين السرعة الأولية Vo والتركيز الأولي للمادة الأساس[S] عند استعمال تركيز ثابت من الإنزيم [E] تعطي منحني hyperbolic مع أن بعض الإنزيمات لا تعطي هذا المنحني عند زيادة تركيز المادة الأساس فللوصول إلى السرعة الأولية القصوى مع زيادة تركيز المادة الأساس عند ثبوت تركيز الإنزيم هي خاصية مميزه لجميع الإنزيمات فعلى تراكيز وسطية من المادة الأساس فأن الإنزيم يتشبع جزئيا بالمادة الأساس وتكون رتبة التفاعل بين الصفر والأول.

طرق دراسة حركية التفاعلات الإنزيمية

أ. **دراسة السرعة الأولية:** تفيد دراسات السرعة الأولية في الأبحاث ذات العلاقة بحركية التفاعلات الإنزيمية لان الإنزيمات غالبا ما تكون غير مستقرة في المحلول وهي أيضا تفيد في تقدير السرعة الأولية الذي تعطي فكرة عن الأخطاء الناتجة عن فقد نشاط الإنزيم مع مرور الوقت حيث يتم رسم بياني لناتج التفاعل مع الوقت أو باستعمال جهاز يعطي قراءة مباشرة تتناسب مع تركيز الناتج والذي تمثل وحدات الامتصاص مع الوقت أو تغير سرعة التفاعل مع اختفاء المادة الأساس بمرور الزمن ويتم التقدير بدرجة حرارة واس هيدروجيني ثابتين من خلال مراقبة سير التفاعل بصورة مستمرة، فإذا كان هناك فرق في الامتصاص الضوئي بين المادة الأساس والناتج على طول موجي معين ويمكن استعمال جهاز الطيف spectrophotometer أو جهاز قياس اللون colorimeter إذا ما عرف معامل الإطفاء المولاري molar extinction coefficient للمادة الأساس مما يساعد ذلك على حساب التركيز الحقيقي للمادة الأساس من الامتصاص الضوئي.

$A = MEC \times C \times CLP$ حيث أن A هو الامتصاص و MEC هو معامل الإطفاء المولاري C هو التركيز مول \ لتر و CLP هو ممر ضوء الخلية بالسنتمتر وتعتبر دراسة تحولات NAD^+ \ NADH و NADPH\ $NADP^+$ من أفضل الأمثلة لدراسة تفاعلات الأكسدة والاختزال باستخدام جهاز الطيف وأعلى قراءة امتصاص ضوئي للصيغة المختزلة من النيوكليوتيدات تكون على 340 نانوميتر بينما الصيغة المؤكسدة لها لا تمتص الضوء على هذا الطول ألموجي مما يسهل ذلك من دراسة سير التحولات التي تحدث من خلال مراقبة التغير في الامتصاص الضوئي ويمكن تتبع التحولات باستخدام تقنيات الفلورة Fluorometric techniques والذي تكون اكثر حساسية من جهاز الطيف أو استعمال التقانات المانوميرية manomeric techniques في التفاعلات التي تحرر أو تستهلك الغازات أو يستعمل قطب الاختيار الايوني ion – selective electrode أو تستعمل الطرق الكهربائية الكيمياوية conductometry في الحالات التي لا يوجد فيها فروقات في الخواص الكهربائية بين المادة الأساس والناتج

ب. **تقانات التفاعل السريع:** تستخدم تقانات لها القدرة العالية لرصد التغيرات التي تحدث في فترات زمنية قصيرة (اقل من واحد بالألف من الثانية) حيث تتم دراسة حركية التفاعل بواسطة التغيرات الذي تحصل خلال الجزء الأول من الثانية للتفاعل يطلق عليها الحركيات الانتقالية ثم استعمال تقانات الخلط السريعة للجريان المستمر أو الجريان المتوقف حيث يتم رصد التفاعل بواسطة كاشف معين يربط في جهاز تذبذب سريع oscilloscope أو الحاسبة الإلكترونية، العامل الأساس لتحديد أي التقانات يمكن استخدامها هو الوقت اللازم لخلط الإنزيم مع المادة الأساس أو المواد الأساس، آلية حركات التفاعلات الإنزيمية تساهم فيها مواد أساس متعددة يشارك في معظم التفاعلات الإنزيمية مادتان أو اكثر من المواد الأساس حيث يحصل انتقال مجموعة من المواد الأساس الأخرى ومنها تفاعلات الأكسدة والاختزال وقد تكون آلية التفاعل متعاقبة أو متسلسلة sequential حيث ترتبط المادتان الأساسيتان بالإنزيم لتكوين مركب معقد ثلاثي قبل أن يتكون الناتج الأولي أو قد تكون آلية التفاعل الإنزيمي غير متعاقبة أو غير تعاقبية non-sequential.

1. آلية كرة المنضدة **pong bi-bi mechanism– ping**: وهي من ابسط الأمثلة على الآليات غير المتسلسلة وهي آلية pong bi-bi– ping أو ما تسمى آلية الإحلال الثنائي double displacement mechanism.

$$AX + E \longleftrightarrow E\text{-}AX \longleftrightarrow EX\text{-}A \longleftrightarrow EX + A$$

$$EX + B \longleftrightarrow EX\text{-}B \longleftrightarrow E\text{-}BX \longleftrightarrow E + BX$$

ترتبط AX أولا بالإنزيم E لتكوين المركب المعقد الثنائي EAX ويحدث بعد ذلك تنظيم على المستوى الداخلي للجزيئات مما تتكون الاصرة X – E وتتكسر الاصرة X-A ثم يغادر الناتج الأول A قبل وصول المادة الأساس الثانية ولا تتمكن B من الارتباط بالإنزيم إلا إنها ترتبط بالإنزيم المحور EX وبما انه لا يمكن وجود اكثر من مادة أساس واحدة على الإنزيم في أي وقت من الأوقات لأنه هناك موقع واحد لربط المادة الأساس بالإنزيم كما يحدث تنظيم آخر على المستوى الداخلي للجزيئات حيث تتكون الاصرة B-X وتتكسر الاصرة E-X مما يعقب ذلك تحرير الناتج الثاني B تاركا الإنزيم في حالته الأصلية وقد أوضح كيلاند آلية تعاقب الإحداث في التفاعل.

2. آلية الترتيب العشوائي **Random order mechanism**: تتمكن أي من المواد الأساس بالارتباط في الإنزيم قبل غيرها ويتمكن أي ناتج من مغادرة الإنزيم قبل غيرة وهي آلية متسلسلة أو متعاقبة ويحصل تكوين مركب معقد ثلاثي ويتكون هناك موقعان منفصلان لربط المواد الأساس بالإنزيم ولا تشترك مادتان أساسيتان بالتفاعل.
3. آلية الترتيب الإجباري **compulsory -order mechanism**: إلية الترتيب الإجباري هي آلية متعاقبة أو متسلسلة يكون ترتيب الارتباط بالإنزيم أو مغادرة الإنزيم إجباريا ويتكون مركب معقد ثلاثي في حالة ارتباط الإنزيم مع مادتين أساسيتين وتساهم الإنزيمات في الآلاف من التفاعلات الكيمياوية الايضية في الخلايا الحية فالمركبات الكيمياوية المنقولة في تلك التفاعلات هي المركبات العضوية مثل تحويل الكلوكوز إلى ثاني اوكسيد الكربون وماء مع تحرير طاقة عندما يتفاعل مع الأوكسجين خارج الخلية وهي تفاعلات باعثة للحرارة إلا إنها لا تحدث تحت الظروف الاعتيادية وتعمل الإنزيمات على تحفيز التفاعلات من خلال الإسراع منها وعند أكسدة

الكلوكوز تعمل الإنزيمات للسيطرة على تلك التفاعلات الحركية للإنزيمات مما تعجل وتسيطر على سرعة تلك التفاعلات الكيمياوية حيث تعمل بشكل متسلسل في المسالك الايضية لتحلل المكونات الغذائية مع تحرير الطاقة وتحويل تلك المركبات إلى مركبات مفيدة والذي يمكن أن تكون مولدات لعدد كبير من الجزيئات الموجودة في الخلايا الحية وهناك إنزيمات تنظيمية الذي تنظم المتطلبات الأساسية للخلايا للسيطرة على سرعة تلك التفاعلات ومن الصفات المميزة للإنزيمات هي قوة التحفيز، التخصص والتنظيم، قوة التحفيز وهي تلعب دورا مهما في تعجيل سرعة التفاعلات وهي تعتمد على الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة فعلى سبيل المثال يعمل إنزيم اليوريز على تحلل اليوريا مائيا.

$$H_2N\text{-}CO\text{-}NH_2 + 2H_2O + H^+ \xrightarrow{\text{Urease}} 2NH_4^+ + HCO_3^-$$

بدرجة حرارة 20م، يحصل ثبات التفاعلات المحفزة بواسطة الإنزيمات إلى $3x10^4$ /sec، الذي يكون $3x10^{-10}$ في التفاعلات الكيمياوية غير المحفزة حيث تكون نسبة السرعة المحفزة إلى السرعة غير المحفزة في التفاعل الكيمياوي هي 10^{14} وهذه النسبة تعرف بقوة التحفيز النسبية للإنزيم حيث تكون لإنزيم اليوريز 10^{14} وتعمل الإنزيمات على مواد معينه تعرف substratesوهي منتجات ثانوية في التفاعلات الإنزيمية وهي تكون متخصصة في عملها وهناك مواقع متخصصة على الإنزيم الذي إليها ترتبط المادة الأساس تسمى المواقع الفعالة في الإنزيم ويتم تنظيم النشاط الإنزيمي بواسطة طرق مختلفة تتراوح من السيطرة على كمية البروتين الإنزيمي المنتج بواسطة الخلية لأعلى سرعة والتداخلات العكسية للإنزيمات، المثبطات والمنشطات الايضية، الحركيات kinetics هو فرع من العلوم الذي لها علاقة مع سرع التفاعلات الكيمياوية ودراسة حركيات الإنزيمات له دور حيوي في التحفيز الكيمياوي الذي تعتمد على تقدير أقصى سرعة للتفاعلات الكيمياوية والذي لها علاقة ألفة ارتباط عالية لمادة الأساس والمثبطات ومن تحليل سرعة التفاعلات الإنزيمية تحت ظروف التفاعلات الكيمياوية المختلفة لانتاج آليات إنزيمية مختلفة والآليات الكيمياوية تدرس سرع التفاعلات الكيمياوية فلو فرضنا تحويل المادة A إلى P هذا النوع من التفاعل بسيط إلا انه في بعض

الأحيان يتحول المركب إلى مركب وسطي I و J ثم إلى الناتج P حيث أن تحويل A إلى P هو التفاعل الأساسي والذي يتم باتجاه واحد، فإذا كانت سرعة تحويل P إلى A منخفضة جدا أو أن تحويل P الذي يعبر عنه [P] كمية قليلة جدا يمكن إهمالها تحت ظروف التفاعل المعينه، فأن السرعة velocity, v أو rate للتفاعل من A إلى P هو كمية الناتج المتكون أو كمية المتفاعل المستهلك لكل وحدة وقت t مما يكون

$$v = d[p] / dt \quad or \quad v = -d[A] / dt \text{-------------}1$$

هناك علاقة رياضية بين سرعة التفاعل وتركيز المواد المتفاعلة s هو قانون السرعة

$$v = -d[A] / dt = k[A] \text{------- ------------------} 2$$

حيث أن السرعة تتناسب طرديا مع التركيز للمادة A وان k هو قيمة ثابتة أو ما يطلق عليها ثابت السرعة rate constant حيث أن k لها وحدات من الوقت وهو غالبا ما يكون sec^{-1} وان v له علاقة مع [A] حيث أن v يكون تفاعلات الرتبة الأولى first order بالنسبة إلى A حيث يطلق على عدد الجزيئات المتداخلة تلقائيا molecularity للتفاعل بينما عندما تكون التفاعلات اكثر تعقيد يحصل تفاعل مادتين A,B لانتاج مركبين هما P ,Q.

$$A + B \longrightarrow P + Q$$

لو فرضنا بأن التفاعل هو أساسي وان عدد الجزيئات المتفاعلة هو 2 وهو ما يطلق عليه bimolecular reaction، فأن سرعة التفاعل يمكن تقديرها من سرعة اختفاء إما A أو B أو سرعة ظهور P أو Q، حيث إن

$$v = -d[A] / dt = -d[B]/ dt = d[P]/dt = d[Q] / dt \text{ --------}3$$

حيث إن قانون السرعة هو

$$v = k [A] [B] \text{---------- ------------}4$$

أي أن سرعة التفاعل الكيمياوي تتناسب طرديا مع تركيز A و B والذي تتناسب طرديا مع تراكيز المواد الناتجة مما يجعل التفاعل من الرتبة الثانية second order إلا انه الرتبة الأولى مع A والرتبة الأولى مع B أي أن التفاعل الأساسي هو

$2A \rightarrow P + Q$ مما يكون قانون السرعة $v = k[A]^2$ ففي التفاعلات الكيمياوية من الدرجة الأولى، فأنه يحدث تحويل A إلى P، فأن الجزيئة A تملك طاقة ضرورية لانجاز التفاعل الذي تعرف transition state، ففي هذه الحالة فإن الاحتمالية ضعيفة جدا بأن يعاد ترتيب يصاحبه نقل A إلى P أي أن سرعة التفاعل الكيمياوي تتناسب طرديا مع التركيز للمواد المتفاعلة وهذه الطاقة الحرة تسمى طاقة التنشيط ΔG" وهي الطاقة اللازمة لرفع معدل الطاقة لمول واحد من المواد المتفاعلة بدرجة حرارة معينه الى طاقة الحالة الانتقالية وان العلاقة بين طاقة التنشيط وثابت السرعة للتفاعل هي k حسب معادلة Arrhenius.

$$k = Ae^{-\Delta G''/RT} \text{------------------------} 5$$

حيث أن A هو ثابت تفاعل معين وبطريقة أخرى

$$1/k = (1/A)\, e^{\Delta G''/RT}$$

حيث أن k يتناسب عكسيا إلى $e^{\Delta G''/RT}$ مما يسبب ذلك انخفاض طاقة التنشيط وزيادة سرعة التفاعل ويمكن تعجيل سرعة التفاعل الكيمياوي مع:

1. ارتفاع درجة الحرارة مما يزيد ذلك من معدل طاقة التنشيط للجزيئات المتفاعلة والذي تخفض من الطاقة اللازمة للوصول إلى الحالة الانتقالية وتتضاعف سرع العديد من التفاعلات الكيمياوية مع ارتفاع درجة الحرارة 10 درجات حرارية.
2. يمكن تعجيل سرع التفاعلات الكيمياوية بإضافة العوامل المحفزة الذي تخفض من طاقة التنشيط بدلا من ارتفاع معدل الطاقة للمواد المتفاعلة.

وقد اقترح Michaelis – Menten النظرية العامة لعمل الأنزيم عـام1913 مع مراعاة حركيات الإنزيم وهذه النظرية مبنية على افتراض أن الإنزيم E ومادة الأساس S المرتبط عكسيا لتكوين معقد الإنزيم – المادة الأساس.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{K_1}{\longleftrightarrow}} ES \text{ ---------------------6}$$

التفكك والارتباط يكون في حالة توازن K وهو ثابت تفكك الإنزيم: المادة الأساس، والذي يكون في حالة التوازن

$$k_{-1}[ES] = k_1[E][S] \text{--------- -------------7}$$

$$Ks = [E][S] / [ES] = k_{-1}/ k_1 \text{ ---------------8}$$

الناتج P المتكون في الخطوة الثانية عندما EES يتحول إلى E + P يحصل ما يلي

$$E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\longleftrightarrow}} ES \overset{k_2}{\longrightarrow} E+ P \text{ ---------------9}$$

حيث يكون E حـر الـذي يتـداخل مع جزيئـة أخـرى مـن S ويصـل تركيـز معقـد الإنزيم – المادة الأساس بسرعة إلى قيمة ثابتة حيث يتكون معقد ES بسرعة من E+S

$$d[ES] / dt =0 \text{ --------------------10}$$

التغير في تركيز ES مع الوقت t هـو صـفر وتعمـل الإنزيمـات علـى تعجيـل سـرعة التفاعل العكسي بالإضافة إلى التفاعلات في الاتجاه الأمامي ومن ثم استرجاع التفاعل عكسـيا لتكوين المعقد ES وان سـرعة التفاعـل العكسـي هـي $v = k_{-2}[E][P]$ السـرعة الأوليـة

للتفاعل حالا بعد تفاعل E و S عند غياب P إلا أن سرعة التفاعل العكسي قليلة جدا مما تجعل السرعة تتناسب طرديا مع P وان التركيز المولاري [P] هو صفر حيث تكون الكمية للإنزيم ثابتة.

$$\text{total enzyme } [Er] = [E] + [ES] \text{ -------------11}$$

عندما يكون [E] هو الإنزيم الحر و[ES] هو كمية الإنزيم في معقد الإنزيم – المادة الأساس ومن العادلة 9 فن سرعة تكوين المعقد ES

حيث أن $vf = k1[Er] - [ES][S]$

$$[Er] - [ES] = [E] \text{ ---------------------12}$$

ومن المعادلة 9 نجد إن سرعة اختفاء [ES] هو

$$vd = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + K_2)[ES] \text{------- -------13}$$

وفي الحالة المستقرة $d[ES] / dt = 0$ حيث إن $vf=vd$ لذلك فأن

$$k_1[Er] - [ES]\,[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \text{--------- -------14}$$

إعادة الترتيب يعطي

$$([Er] - [ES][S] / [ES] = (k_{-1} + K_2) / k_1 \text{ -------------15}$$

ثابت ميكليس Km هو نسبة ثابت $(k_{-1} + k_2)/ k_1$ هي قيمة ثابتة

$$Kw = (k_{-1} + k_2/ k_1 \text{---------------------------16}$$

لاحظ من المعادلة 15 بأن Km هو نسبة التركيزين $([Er] - [ES])$ و$[S]$ إلى واحد $([ES])$ لذلك فإن Km يملك وحدات من المولارية ومن المعادلة 15 يمكن إيجاد

$$([Er] - [ES][S] / [ES]=Km \text{------------------17}$$

والذي عند إعادة الترتيب فأن

$$[ES] = [Er][S] / Km + [S] \text{ ------------------- } 18$$

الآن أهم متغير في حركيات أي تفاعل هو سرعة تكوين المنتج.

$$v = d[P] / dt \text{ ------------------------------- } 19$$

ولهذا التفاعل فأن

$$v = k_2[ES] \text{ ------------------ } 20$$

وعند طرح [ES] من المعادلة 18 من 20 ينتج

$$v = k2[Er][S] / Km + [S] \text{ ------------ } 21$$

فأن الناتج $k_2[Er]$ ذات معنى خاص عندما [S] كمية مرتفعة فأن سرعة التفاعل v في أقصاها ولو فرضنا أن كمية [ES] تساوي التركيز الكلي للإنزيم Er وهي أقصى قيمة ممكنة ومن المعادلة 20، فأن السرعة الأولية v ثم تساوي $V = k_2[Er]$ max.حيث أن $[S]>>[Er]$.

$$V\ max = k_2[Er] \text{ --------------- } 22$$

وعند التعبير عن v تنتج ما يعرف معادلة ميكليس – منتن.

$$v = Vmax\ [S] / Km + [S] \text{ ------------------ } 23$$

والذي تنص على أن سرعة التفاعلات المحفزة بالإنزيمات vفي أي لحظة يمكن تقديرها بواسطة الثوابت Km, Vmax وتركيز المادة الأساس في أي لحظة، وعندما

$$[S] = Km\ ,\ v = Vmax / 2$$

ويمكن تعريف عملي للثابت Km بإعادة ترتيب المعادلة 23 لانتاج

Km = [S] (Vmax / v –1) ----------------------24

عندما [S] = Km ,2 / v =Vmax فأن Km يمكن تعريفه بواسطة تركيز المادة الأساس الذي يعطي سرعة تساوي نصف أقصى السرعة (جدول – 16).

العلاقة بين V max ,Km ورتب التفاعل: يمكن اشتقاق Km من Vmax /2، لذلك فان ثابتي معادلة مكلس – منتن يحصل عليها من علاقة السرعة مع تركيز الإنزيم وطبقا للمعادلة 23 يمكن الحصول على v = 0.98 Vmax[S] الذي 99Km ومن المعادلة 23 عندما Km<< [S] فأن Vmax=v يستنتج من ذلك بأن v لا يعتمد على [S] لذلك فأن التفاعل هو من رتبة صفر وعندما Km > [S] عندما v =(Vmax /Km)[S] فأن سرعة التفاعل v تتبع معادلة السرعة رتبة صفر حيث أن v= K" [A] حيث أن K" =Vmax / Km، يستنتج:

1. التفاعل يتضمن فقط مادة أساس واحدة أو أن التفاعل متعدد المادة الأساس وان التركيز فقط لمادة أساس واحدة تختلف بينما التركيز لعدد من المواد الأساس يكون ثابت.
2. التفاعل ES → E + P غير عكسي.
3. [Er] و [S]o > [Er] تبقى ثابتة.
4. كل المتغيرات الأخرى لها تأثير على سرعة التفاعل ثابت مثل درجة الحرارة، الأس الهيدروجيني، القوة الايونية.

وحدات الإنزيم: الكمية المولارية للإنزيم لا يمكن معرفتها وان الكمية يعبر عنها بالوحدة العالمية من الإنزيم وهي الكمية من الإنزيم الذي تحفز تكوين ميكرومول واحد من الناتج في دقيقة واحدة ويكون الإنزيم حساس جدا غالى العوامل مثل الأس الهيدروجيني، درجة الحرارة والقوة الايونية، ظروف التقدير ومن التعاريف الأخرى لوحدات نشاط الإنزيم هي الكاتال Katal واحد كاتال هو كمية الإنزيم الذي تحفز تحويل مول واحد من المادة الأساس إلى منتج في ثانية واحدة، واحد كاتال يساوي 6×10^7 وحدة عالمية.

جدول (16) قيم ثابت مكلس لبعض الإنزيمات

الإنزيم	المادة الأساس	ثابت مكلس
Carbonic anhydrase	CO_2	12
Chymotrypsin	N-	2.5
	benzoyltyrosinamide	5
	Acetyl-	12
	tryptophanamide	32
	N-	122
Hexokinase	formyltyrosinamide	0.15
	N-acetyltyrosinamide	1.5
Beta-galactosidase	Glycyltyrosinamide	4
Glutathione dehydrogenase	Glucose	57
	Fructose	0.12
	Lactose	2
	NH_4^+	0.025
Asparate aminotransferase	Glutamate	0.018
	α-ketoglutarate	0.9
	NAD^+	0.1
	NADH	0.04
	Asartate	4
Threonine deaminase	α –ketoglutarate	5
Arginyl –tRNA synthetase	oxaloacetate	0.003
	glutamate	0.0004
	threonine	0.3
Pyruvate carboxylase	arginine	1
	tRNA –Arg	0.4
	ATP	0.06
Penicillinase	HCO_3^-	0.05
Lysozyme	Pyruvate	0.006
	ATP	
	Benzylpenicillin	
	Hexa-N-acetyl	
	glucosamine	

عدد الانقلاب Turnover Number: هو قياس أقصى نشاط تحفيزي Kcat وهو عدد جزيئات المادة الأساس المتحولة إلى منتج لكل جزيئة إنزيم لكل وحدة وقت عندما يكون الإنزيم مشبع مع المادة الأساس وعدد الانقلاب هو نشاط جزيئي للإنزيم ولتفاعل

مكلس – منتن البسيط (معادلة –9) وتحت ظروف قياسات السرعة الأولية فأن k_2 = Kcat لتجهيز تركيز الإنزيم [Er] عندما يكون خليط التفاعل معروف فأنه يمكن تقدير Kcat من Vmax عند بدء تركيز الإنزيم [S] حيث تكون = v = Vmax k_2[Er].

$$k2 = Vmax / [Er] = Kcat \text{------------------------} 25$$

حيث أن Kcat تمثل الكفاءة الحركية للإنزيم حيث يملك إنزيم الكاتاليز أعلى انقلاب وكل جزيئة من الإنزيم تحلل 40 مليون جزيئة من الماء في الثانية الواحدة ويحتاج اللايزوزيم 2 ثانية لتشقق الاصرة الكلايكوسيدية في الكلايكان.

علاقة Kcat / Km: نسبة Km / [S] تنخفض في مدى من 0,01 إلى 1 لذلك تكون المواقع الفعالة غير مملوءة بالمادة الأساس وكما موجود في المعادلة 23.

v = Vmax [S] / Km +[SA] حيث أن Vmax = Kcat [Er] ما تعطي

$$v = Kcat [Er][S] / Km +[S] \text{----------- -----------} 26$$

وعندما Km >> [S] فأن تركيز الإنزيم الحر E يساوي [Er] لذلك فأن

$$v =(Kcat / Km)[E][S] \text{ ------------------------} 27$$

حيث أن Kcat/Km هو ثابت سرعة الرتبة الثانية الأم لتفاعل الإنزيم E والمادة الأساس S لتكوين الناتج وبما أن Km تتناسب عكسيا إلى الكفاءة الحركية للإنزيم، فإن Kcat /Km هي دليل الكفاءة التحفيزية للإنزيم بتركيز مادة أساس اقل من كمية الإشباع وعندما Kcat = Km فإن

$$Kcat / Km = K_1k_2 / (k_{-1}+ K_2) \text{-----------------} 28$$

حيث أن k_1 يجب أن يكون اكثر من أو يساوي $k_1k_2/(k_{-1}+k_2)$ حيث أن التفاعل لا يكون أسرع من السرعة الذي فيها E و S تأتي معا حيث يكون k1 يقع في الحد الأعلى

لقيمة Kcat /Km وبعبارة أخرى فان الكفاءة التحفيزية للإنزيم لا تزيد عن سرعة الانتشار المسيطر عليها عند ارتباط E و S لتكوين ES وان ثابت سرعة انتشار الماء هو 10^9 مولار، ثانية وتلك الإنزيمات تكون اكثر فعالية في التحفيز عندما نسب Kcat / Kmتصل تلك القيمة حيث تكون السرعة التحفيزية محدودة فقط بواسطة السرعة الذي فيها كمية الإنزيم فعالة والذي تسمى cataltic perfection. Km مشتقة من تلك القيمة للمـــادة الأساس [S] لتعطي v =Vmax /2، يمكن إجراء العديد من إعادة الترتيب لمعادلة مكلس – منتن لتحويلها إلى خط مستقيم وعند اخذ المقلوب للمعادلة23 ينتج

$$1/v = (Km / Vmax) (1/ [S]) + 1 / Vmax \text{ -----------29}$$

حيث ينتج $y = mx + b$ وهي معادلة الخط المستقيم حيث أن $m : y=1/v$ وهو انحدار والذي يساوي Km/ Vmax: $x = 1 / [S]$ و $b= 1/Vmax$ وعند رسم العلاقة بين 1/v و 1/[S] يعطي خط مستقيم، فأن $x = -1/Km$ وان $y=1/Vmax$ مما تعطي انحدار Km /Vmax.

مخطط Hanes – Woolf هو إعادة ترتيب آخر لمعادلة مكلس- منتن الذي تنتج خط مستقيم وعند ضرب الجانبين من معادلة 29 بواسطة [S] تعطي

$$[S]/v= [S](Km/Vmax)(1/[S])+ [S]/Vmax$$

$$= Km / Vmax + [S] / Vmax \text{-----------30}$$

$$[S] / v =(1/Vmax)[S] + Km / Vmax \text{ ----------31}$$

ومن العلاقة بين [S] /v مع [S] تعطي خط مستقيم والذي فيه الانحدار هو 1 /Vmax الذي فيه $y = Km /Vmax$ وان $x =-Km$.

تأثير الأس الهيدروجيني على النشاط الإنزيمي: تركيز الإنزيم – المادة الأساس والنشاط الإنزيمي يعتمد على الأس الهيدروجيني فالإنزيم الذي يملك سلاسل جانبية متاينه

ومجاميع ترقيعية لا يمكن تقدير التراكيب البنائية الثانوية والثلاثية فقط، بل يمكن أن تتضمن المواقع الفعالة وعندما المادة الأساس تملك مجاميع متاينه فأن واحد أو الإشكال الايونية الأخرى يمكن تداخلها مع الإنزيم وتكون الإنزيمات فعالة فقط في مدى معين من الأس الهيدروجيني ويملك أس هيدروجيني الذي فيه النشاط التحفيزي مثالي وهذه التأثيرات للأس الهيدروجيني بسبب تأثيرها على Km أو Vmax أو كلاهما (جدول –17).

$$[S]/v =(1/Vmax)[S]+ Km/ Vmax$$

جدول (17) الأس الهيدروجيني الأمثل لبعض الإنزيمات

الإنزيم	الأس الهيدروجيني	الإنزيم	الأس الهيدروجيني
الببسين	1,5	الكاتاليز	7,6
التربسين	7,7	الفيوماريز	7,8
الرايبونيوكليز	7,8	الارجنيز	9,7

تأثير درجة الحرارة على نشاط الإنزيم: تزداد سرعة التفاعلات الكيمياوية المحفزة بالإنزيمات مع زيادة درجة الحرارة وبدرجة حرارة اكثر من 50- 60م فأنه يقل نشاط الإنزيمات فان الزيادة في سرعة التفاعل الكيمياوي مع درجة الحرارة والدنترة الحرارية للتركيب البنائي للبروتينات بدرجة الحرارة العالية وتتضاعف سرعة التفاعلات الإنزيمية بمعدل كل 10 درجات والارتفاع في درجات الحرارة هو $Q_{10}=2$ حيث أن Q_{10} هي نسبة الأنشطة الإنزيمية في اثنين من الإنزيمات الذي تحفز التفاعلات الذي تملك طاقة تنشيط عالية جدا وتزداد السرعة مع زيادة درجة الحرارة بدرجة حرارة مرتفعة مما يكون الإنزيم غير فعال.

التثبيط الإنزيمي: يمكن تثبيط التفاعلات الإنزيمية بعدد من المثبطات العكسية وغير العكسية، ويمكن تقسيم المثبطات الإنزيمية بعد طرق حيث تتداخل المثبطات إما عكسيا أو لا عكسيا مع الإنزيم فالمثبطات العكسية تتداخل مع الإنزيم من خلال ارتباطات لا تساهمية أو تفاعلات تفكك بينما المثبطات اللاعكسية تسبب الثبات والتغيرات التساهمية في الإنزيم.

1- **التثبيط العكسي**: تقسم المثبطات العكسية إلى التنافسية واللا تنافسية.

أ- **التثبيط التنافسي**: تتميز المثبطات التنافسية بأنها المادة الأساس والمثبط تتنافس على موقع الارتباط على الإنزيم والذي يسمى الموقع الفعال أو موقع ارتباط المادة الأساس بينما اللاتنافسية لا يمكن إزالتها بواسطة زيادة تركيز المادة الأساس وهناك نوعين يمكن تميزها وتداخل المثبطات في نماذج حركيات الإنزيم البسيطة.

$$E + I \longleftrightarrow EI \quad \text{or} \quad I + ES \longleftrightarrow IES \text{ ----------32}$$

عندما يحصل ارتباط عكسي للمثبط مع الإنزيم أو معقد الإنزيم – المادة الأساس

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\longleftrightarrow}} ES \overset{k_2}{\longrightarrow} E + P \quad \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\longleftrightarrow}} E + I \quad EI \text{ -----33}$$

عند ارتباط المثبط عكسيا إلى الإنزيم في نفس الموقع كمادة أساس حيث يحصل ارتباط المادة الأساس وارتباط المثبط فالارتباط التنافسي يحصل تكوين معقدات ثلاثية مثل EIS حيث لا يمكن حصول ارتباط S و I وان سرعة التفاعل هي $v = k_2[ES]$ ويمكن مقارنة معادلة التفاعلات غير المثبطة مع المثبطة حيث توجد هناك علاقة بين E ,S, I كما هو مبين في المعادلات التالية:

$$v = V_{max}[S] / [S]+K_m$$

$$= V_{max}[S] / [S]+K_m(1+[I]/k1)$$

$$[ES] = k_1[E][S] / (k_2-k_1) = [E][S] / K_m \text{----------34}$$

لو فرضنا أن $E+I \longleftrightarrow EI$ يصل حالة التوازن بسرعة وان سرعة تكوين EI هي:

$vf = k3[E][I]$ وسرعة اختفاء EI فأن $vd = k\text{-}3\ [EI]$.

$k_3[E][I] = k\text{-}3[EI]$ ----------------------35

$[EI] = (k_3/ k\text{-}3)[E][I]$ ------ -------------36

يمكن تعريف k_1 بشكل $k\text{-}3/k_3$ وهو ثابت تفك الإنزيم – المثبط

$[EI] = [E][I]/ k1$-----------------------37

ومن معرفة $[Er] = [E]+ [ES] + [EI]$ نحصل

$[Er]=[E]+ [E][S] /Km + [E][I] / k1$---------------38

$[E]=k_1Km[Er]/ (k_1Km + k1[S] + Km[I])$----- ----39

وبما أن سرعة تكوين الناتج يحل عليها من $v=k2[ES]$ ومن المعادلة 34 نجد أن:

$v = k2[E][S]/ Km$--------------------------40

$v=(k_2k_1[Er][S]) / (K1Km + k_1[S] + Km[I]$---- ------41

وبما أن $Vmax = k_2[Er]$، فأن

$v = Vmax [S] / Km + [S] + Km[I] / k_1$------------42

$v = Vmax [S] / [S] + Km (1 + [I] / k1)$ ------------43

ويظهر التثبيط التنافسي ما يلي: في تركيز مثبط معين فأن السرعة تقل ومقلوب السرعة يزداد وقد تصبح $v = Vmax$ حيث لا يتأثر بواسطة المثبط لأن كل الإنزيمات تكون معقد الإنزيم – المادة الأساس حيث تقل قيمة x مع زيادة تركيز المثبط ويشار الى x بثابت ميكليس الأم apparent Km أو Km app.

ب. **التثبيط اللاتنافسي:** يتداخل مع الإنزيم ومعقد الإنزيم – المادة الأساس إلا أن تلك الحالة نادرة وقد لا يحصل ارتباط الإنزيم إلى نفس الموقع كمادة أساس ولا يمكن إزالة

التثبيط عند ارتفاع تركيز المادة الأساس وهناك نوعين من المثبطات اللاتنافسية هي النقية والخليطة، المثبطات اللاتنافسية النقية الذي يحصل فيها ارتباط المثبط بواسطة الإنزيم والذي لا يؤثر على ارتباط المادة الأساس بواسطة الإنزيم حيث يحصل ارتباط المادة الأساس والمثبط في مواقع مختلفة على الإنزيم وارتباط المثبط لا يؤثر على ارتباط المادة الأساس.

$$\begin{array}{cc} k1 & ki \end{array}$$

$$E+I \longleftrightarrow EI \longleftrightarrow ES+I \longleftrightarrow IES \text{-----------} 44$$

ويحدث التثبيط اللاتنافسي عندما $k_1=ki$ لاحظ بان Km غير متغير بواسطة المثبط حيث أن قيمة x هي نفسها مع أو بدون المثبط كما يلاحظ Vmax تقل بينما في التثبيط اللاتنافسي الخليط يتضمن ارتباط المثبط بواسطة E الذي يؤثر على ارتباط S بواسطة E أما ارتباط الموقع مع المثبط والمادة الأساس قريبة من بعضها البعض الآخر أو تحصل تغيرات الهيئة التركيبية في الإنزيم بسبب المثبط الذي يؤثر على ارتباط S وفي هذه الحالة فأن k_1 و ki الذي تكون غير متساوية وكلا من Km و Vmax الذي تتغير بواسطة وجود المثبط وان Km Vmax غير ثابت.

2- **الثبيط غير العكسي:** عند ارتباط المثبط لا عكسيا مع الإنزيم بواسطة ارتباطات تساهمية حيث تكون حركيتها تشبه التثبيط اللاتنافسي ويسبب التأثير فقد الإنزيمات الفعالة وهذا النوع من التثبيط يتميز عن التثبيط اللاتنافسي.

حركيات التفاعلات المحفزة بالإنزيمات المتضمنة اثنان أو اكثر من المواد الأساس:

فقط في الحالات البسيطة تعمل الإنزيمات على نوع واحد من المواد الأساس هي حالة غير شائعة أي أن الإنزيمات تحفز التفاعلات الذي فيها اثنان أو اكثر من المواد الأساس مثلA ,B لانتاج Q, P.

$$A + B \longrightarrow P + Q \text{--------------} 45$$

ويسمى هذا النوع bisubstrate reaction والذي تحدث في واحد من مسلكين ممكنة

1- كلا A ,B مرتبطة الى الإنزيم ويحدث التفاعل لتكوين P+Q.

$$E + A + B \longleftrightarrow AEB \longleftrightarrow PEQ \leftrightarrow E + P + Q \text{------}46$$

التفاعلات هذا النوع تعرف sequential or single –displacement reactions وهي يمكن أن تكون أحد الصنفين من التفاعلات.

أ. العشوائية **Random**: وهي إما A أو Bالذي ترتبط إلى الإنزيم أولا ثم المادة الأساس.

ب. المرتبة **ordered**: عند ارتباط المادة الأساس A السماة leading substrate الى الإنزيم أولا قبل ارتباط B وكل أصنافsingle –displacement reaction تتميز بخطيتها.

الاحتمالات الممكنة هي مادة أساس واحدة Aالذي ترتبط إلى الإنزيم وتتفاعل معه لانتاج شكل محور كيماويا من الإنزيم E^a لانتاج E وتكوين Q، التفاعلات الذي تكون مناسبة هذا النموذج تسمى ping-pong أو تفاعلات الإزاحة المزدوجة وصفه هذه الآلية هي تكوين انزيم وسطي محور E^a.

تفاعلات الإزاحة المنفردة العشوائية: في هذا النوع من تفاعل sequential كل معقدات الإنزيمات المرتبطة – المادة الأساس AE,EB,QE ,EP تتكون بسرعة وعكسيا عندما الإنزيم يضاف إلى خليط التفاعل الحاوي A,B,P,Q، التفاعلات الذي تتبع هذا النوع من العشوائية لإضافة المادة الأساس إلى الإنزيم يمكن تميزها عن التفاعلات الذي تخضع للتفاعلات المرتبة فإذا كان A لا يؤثر على ثابت الارتباط للمادة B والعكس صحيح فان الآلية نقية عشوائيا وان التفاعلات تكون خطية.

عمل إنزيم الكاينيز بالية تفاعلات الإزاحة المنفردة العشوائية: الكرياتين كاينيز هو إنزيم لنقل مجموعة الفوسفيت والذي يستعمل ATP كواهب للفوسفيت لتكوين

كرياتين فوسفيت من الكرياتين ويكون الكرياتين فوسفيت مهم لتجهيز العضلات بالطاقة ويمكن تقدير اتجاهات التفاعل بواسطة التراكيز النسبية للمركبات ATP, ADP ,Cr ,CrP وثابت التوازن للتفاعل حيث أن الإنزيم يملك موقعين لارتباط المادة الأساس أو المنتجات هو موقع adenine nucleotide حيث أن ATP أو ADP ترتبط إليه وموقع الكرياتين الذي يرتبط آلية الكرياتين والكرياتين فوسفيت، في هذه الآلية يحصل تنافس ATP,ADP للارتباط في الموقع المناسب بينما الكرياتين والفوسفوكرياتين يتنافس في موقع ارتباط الكرياتين والكرياتين فوسفيت، لا يظهر في التفاعل إنزيم محور E^a مثل $E\text{-}PO_3$ كمركب وسطي ويتميز هذا التفاعل في تكوين معقد ES بسرعة وعكسي يليه إضافة المادة الأساس الباقية.

تفاعلات الإزاحة المنفردة المرتبة: في هذه الحالة فأن leading substrate وهو A الذي يسمى obligatory/compulsory substrate يرتبط أولا ثم المادة الأساس ثانيا وهي B لا يمكن ارتباط B إلى الإنزيم الحر عند غياب A ويحدث التفاعل بين A و B بشكل معقد ثلاثي الذي يليه تحرير P,Q حيث أن Q هو ناتج عن A والذي يتحرر أخيرا.

تفاعلات الإزاحة المزدوجة (Ping –Pong): تتميز هذه التفاعلات بأن ناتج الإنزيم مع A يسمى P الذي يتحرر قبل التفاعل الإنزيمي مع المادة الأساس الثانية B مما يتول الإنزيم E إلى الإنزيم المحور E^a الذي يتفاعل مع B لتكوين الناتج الثاني Q.

الآليات التحفيزية للإزاحة المضاعفة لإنزيم aminotransferase: صنف واحد من الإنزيمات يتبع آلية Ping –Pong هو إنزيم aminotransferase الذي يسمى سابقا transaminases وهذه الإنزيمات تحفز نقل مجموعة الأمين من الحامض الأميني إلى الحامض الكيتوني من نوع ألفا لانتاج حامض أميني وحامض كيتوني جديده مطابق للهيكل الكربوني للحامض الأميني الواهب.

$$\text{Amino acid}_1 + \text{keto acid}_2 \longrightarrow \text{keto acid}_1 + \text{amino acid}_2$$

كما يلاحظ بأن الكلوتاميت والاسبارتين تتنافس مع الإنزيم E ويتنافس اوكزالوالخلات و ألفا كيتوكلوتاريت على الإنزيم المحور ففي إنزيم Glu:Asp

aminotransferase فـأن المرافـق الإنزيمي البيريدوكسال فوسفيت المرتبط إلى الإنـزيم يعمل كقابل أو واهب لمجموعة الأمين في التفاعل الإنزيمي والإنزيم غير المحور E يملك مرافق إنزيمي بشكل بيريدوكسال الديهايدي، الإنزيمات الذي تعمل على إلية Pong– Ping تحتاج إلى مرافق إنزيمي كحامل للمكونات الكيمياوية المنقولة في التفاعل.

زيادة سرعة الإنـزيم Rate enhancement of enzyme: التحويل غير الإنزيمي للمادة الأساس الى منتوج من تفاعلات الرتبة الأولى البسيطة والذي يمكن وصفها بثابت السرعة للمرتبة الأولى Ku.

$$Vu - Ku\,[S] \text{---------- ---------------} 1$$

ولما كان الإنزيم يخضع لحركيات ميكليس – منتن، فأن التفاعل من الرتبة الأولى في تركيز منخفض من المادة الأساس ورتبة صفر للمادة الأساس عندما التركيز مرتفع.S

$$Ve = Kcat\,[ET][S] / Km + [S] \text{------------ -------} 2$$

ويؤثر الإنزيم على زيادة السرعة.

$$\text{Rate enhancement} = Ve \;/\; Vu \text{------------------} 3$$

$$\text{Rate of enhancement} = Kcat \;/Ku\;(\,[E^T] / Km + [S] \text{-- ------} 4$$

واعتمادا على الحجم النسبي لقيمة Km وتركيز المادة الأساس [S] هناك احتمالين لزيادة سرعة الإنزيم هما :

1. عندما يكون تركيز المادة الأساس اكبر مقارنة إلى قيمة ثابت ميكليس Km للإنزيم فأنه يتشبع الإنزيم مع المادة الأساس وتكون حركية التفاعل من الترتبة الأولى للمادة الأساس.

$$\text{rate enhancement} = Kcat / Ku\;(\,[E^T] / [S]) \text{--- ----------} 5$$

وعندما $[E^T] / [S]$ هو جزء من المادة الأساس الكلية في معقد ES فأن زيادة السرعة بتعبير Kcat / Ku تكافئ كميات ΔGu وΔGe.

2. عندما تركيز المادة الأساس كمية قليلة مقارنة إلى Km، ليس جميع جزيئات الإنزيم ترتبط إلى المادة الأساس وان حركيات الإنزيم تكون من الرتبة الأولى في المادة الأساس.

rate enhancement = Kcat / Ku ($[E_T]$ / Km) ----------6

ومن تعريف زيادة السرعة من تعبير Kcat / KuKm فإنها تكافئ كمية ΔGu وΔGe وان Km قريبة من Ks.

rate enhancement = $[E^T]$ / K_T ------------------7

عندما K^T هي ثابت تفكك معقد ET^S ويمكن تعريف زيادة سرعة الإنزيم اعتمادا على العلاقة بين الإنزيم وتركيز المادة الأساس وحركية الإنزيم.

الفصل العاشر

التفاعلات الإنزيمية

الفصل العاشر

التفاعلات الإنزيمية

تقسيم التفاعلات الإنزيمية: يمكن تقسيم الإنزيمات إلى ستة مجاميع رئيسية اعتمادا على نوع التفاعلات التي تحفزها وهي:

1. إنزيمات الأكسدة والاختزال Oxidoreductase الذي تحفز نقل الإلكترونات.
2. الإنزيمات الناقلة Transferases وهي الإنزيمات التي تحفز تفاعلات نقل مجموعة معينه.
3. إنزيمات التحلل المائيhydrolases وهي إنزيمات تحفز نقل مجاميع وظيفية إلى الماء.
4. الإنزيمات النازعة Lyases وهي الإنزيمات التي تحفز إضافة مجاميع إلى الاصرة المزدوجة أو العكسية.
5. الإنزيمات المناظرة Isomerases وهي الإنزيمات الذي تنقل مجاميع داخل الجزيئات لانتاج أشكال متناظرة.
6. إنزيمات التخليق Ligases وهي الإنزيمات التي تحفز تكوين أواصر كربون- كربون، كربون – كبريت، كربون – أوكسجين، كربون – نتروجين بواسطة تكثيف تلك المركبات المتفاعلة.

وعليه تقسم التفاعلات الإنزيمية إلى ثلاث أنواع هي:

1. تفاعلات التناظر وهي نقل جزيئة المادة الأساس بسبب إعادة ترتيب داخلية إلى منتوج مثلA الى B.
2. تفاعلات التحلل المائي وهي تحلل المادة الأساس بسبب تفاعلها مع الماء.

$$AB + H_2O \longrightarrow AH + BOH$$

3. تفاعلات النقل ويتم نقل مجموعة بين مادتين أساسية للإنزيم.

$$AB + C \longrightarrow A + BC$$

العمل التحفيزي لجميع الإنزيمات هو تكوين معقد مع المادة الأساس، وارتباط الإنزيم مع المادة الأساس يكون عكسي.

التوازن الكيمياوي Chemical Equilibrium: طبقا لقانون فعل الكتلة، فأن سرعة التفاعل الكيماوي تتناسب مع الكتلة الفعالة للمواد المتفاعلة، فإن ثابت سرعة التفاعل الأمامي هي k_1 وسرعة التفاعل الخلفي هي k_2 ، فإن تفاعل المواد A, B ينتج C ,D.

$$A + B \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C + D$$

في حالة التوازن، فأن $k_2 = k_1$ أو

$$K = [C][D] / [A][B]$$

الإنزيم يزيد من أحد ثوابت السرعة أما الأمامية k_1 أو الخلفية k_2 مما يعجل من سرعة التفاعل في أحد الاتجاهين وتنظيم التوازن في التفاعلات الكيمياوية الحيوية بواسطة نشاط الإنزيمات الذي تحفز التفاعلات الأمامية والخلفية، ويختلف التوازن الحركي في الطاقة الحرة.

القوة الحرارية للتفاعلات الإنزيمية: التغير في الطاقة الحرة ΔG لتفاعل كيمياوي هو عبارة عن الطاقة التي تتمكن من إنجاز عمل مثل العمل الازموزي، العمل العضلي، العمل التخليقي الحيوي ومع استمرار التفاعل الكيمياوي من الحالة الأولية عندما تكون تراكيز المواد المتفاعلة والناتجة عن التفاعل بتراكيز معينه إلى حالة التوازن الكيمياوي فإذا كانت قيمة ΔG سلبه عندما يكون A ,B في تراكيز معينه.

$$A \longleftrightarrow B$$

فإن النظام الحيوي سيفقد طاقة حرة إلى البيئة المحيطة حتى يصل التفاعل إلى حالة التوازن مما يزداد تركيز B ويقل تركيز A أي أن التفاعل الكيمياوي سوف يسير في الاتجاه الأمامي أما إذا كانت قيمة ΔG موجبة عندما تكون A ,B في تراكيز معينه فأن التفاعل لا

يستمر بالاتجاه الأمامي، بل سيسير في الاتجاه الخلفي (المعاكس) مما يقل تركيز B ويزداد تركيز A حتى الوصول إلى حالة التوازن أما إذا كانت قيمة ΔG تساوي صفر، ذلك يعني أن التفاعل اصبح في حالة توازن وتكون قيمة ΔG عند أي مرحلة من مراحل التفاعل الكيمياوي المتجهة إلى الأمام تكون مساوية في المقدار ومعاكسة في العلاقة لها عندما يكون التفاعل بالاتجاه المعاكس، الطاقة الحرة القياسية لتفاعل ما هي الفرق بين الطاقة الحرة القياسية لتكوين المواد المتفاعلة وبين الطاقة الحرة القياسية لتكوين نواتج التفاعل فالطاقة الحرة القياسية للتكوين هي قياس الكمية الكلية من الطاقة الحرة التي يمتلكها المركب عند تحللة بصورة كاملة، تضاف الطاقات القياسية للتكوين مع بعضها البعض الأخر، فالطاقة اللازمة لتكوين الحالة الانتقالية من المواد المتفاعلة يطلق عليها طاقة التنشيط وتكون الحالة الانتقالية غير مستقرة وسرعان ما تتحلل النواتج النهائية أو تعود إلى المواد المتفاعلة ويمكن الحصول على قيمة طاقة التنشيط من سرعة التفاعل على درجات حرارية مختلفة.

العوامل المؤثرة على سرعة التفاعلات الكيمياوية

1. **تأثير تركيز الإنزيم:** تتناسب سرعة التفاعلات الإنزيمية طرديا مع تركيز الإنزيم الموجود في وسط التفاعل الحيوي وأن معدل سرعة التفاعلات الإنزيمية لا تتناسب طرديا دائما مع تركيز الإنزيم وذلك عندما يكون التفاعل الأمامي في حالة توازن وفي بداية التفاعل فإن تركيز المادة الأساس سينفذ كليا والسرعة الأولية تتناسب طرديا مع تركيز الإنزيم، فإن الإنزيم يرتبط مع المادة الأساس لتكوين معقد مادة أساس – إنزيم ES الذي يتحلل لتكوين ناتج P مع إنزيم حر E.

$$E + S \longrightarrow ES \longrightarrow E + P$$

تركيز الإنزيم لا يؤثر على ثابت التفاعل الإنزيمي إلا أن الأنزيم له تأثير على سرعة التفاعل وليست ثابت السرعة أي أن سرعة التفاعلات الإنزيمية تعتمد مباشرة على تركيز الإنزيم.

2. **تركيز المادة الأساس:** زيادة تركيز المادة الأساس مع ثبات العوامل الأخرى يسبب زيادة السرعة إلى أقصى قيمه لها وتزداد سرعة التفاعلات الإنزيمية مع زيادة تركيز المادة الأساس إلى الحد الذي يصبح الإنزيم مشبع بالمادة الأساس وفي تركيز من منخفض من المادة الأساس، فأن سرعة التفاعل الإنزيمي تتناسب طرديا مع تركيز المادة الأساس ومع زيادة تركيز المادة الأساس تزداد سرعة التفاعل إلى أن تصل إلى حالة لا يحصل فيها تغير أي أن السرعة قد وصلت إلى قيمة محددة، بعدها لا تعتمد السرعة على تركيز المادة الأساس وهذا ما يطلق عليه تفاعل رتبه صفر بخصوص المادة الأساس لانه عندما يكون التركيز للمادة الأساس منخفض، فإن الإنزيم يكون غير مشبع بالمادة الأساس، فأن التفاعل لا يكون في الحد الأقصى بينما عندما يكون الإنزيم مشبع بالمادة الأساس، فأن السرعة تصل الحد الأقصى لها، أن سرعة التفاعلات الإنزيمية بتركيز عالي من المادة الأساس يطلق عليها V max بينما تركيز المادة الأساس الذي فيها السرعة مساوية إلى نصف السرعة القصوى يطلق علية ثابت ميكليس ويرمز له Km وتحت ظروف معينه من الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة والقوة الايونية في محلول منظم فأن قيمة الثابت تقترب من ثابت تفكك معقد ES.

معادلة ميكليس – منتن: لو لاحظنا التفاعلات الذي تتضمن تكوين وتحطيم معقد الإنزيم – المادة الأساس.

$$E + S \longleftrightarrow ES \text{ ---------------------(1)}$$

$$ES \longleftrightarrow A + P \text{ ------------------ (2)}$$

فلو كان Et يمثل تركيز الإنزيم الكلي (مجموع الإنزيم الحر والمرتبط) و[ES] هو تركيز معقد الإنزيم – المادة الأساس، فأن تركيز الإنزيم الحر أو غير المرتبط Ef يساوي تركيز الإنزيم الكلي مطروحا منه تركيز معقد الإنزيم – المادة الأساس.

$$[Ef] = [Et] - [ES] \text{ -----------------------(3)}$$

وكان تركيز المادة الأساس بعيدا عن تركيز الإنـزيم الكلـي لـذلك فـإن كميـة المـادة الأساس المرتبطة بواسطة الإنزيم في أي وقت هـي كميـة قليلـة جـدا لـذلك تهمـل مقارنـه مـع تركيز المادة الأساس، فأن سرعة تكوين معقد الإنزيم – المادة الأساس هي Rf، فإن

$$Rf = = k_1[Et] – [ES][S] \text{------------------}(4)$$

عندما k_1 هي ثابت سرعة التفاعل (1) وسرعة تكـوين معقـد ES مـن P + E بواسطة التفاعل العكسي(2) تكون قليلة جدا لذلك يمكن إهمالهـا، وسـرعة تحطـيم المعقـد ES هي Rb.

$$Rb = k\text{-}1[ES] + k_2[ES] \text{------------------}(5)$$

الذي فيها k-1 و k_2 هي ثوابت سـرعة للتفاعـل العكسـي (1) والتفاعـل في الاتجـاه الأمامي (2) وعندما سرعة تكوين ES تساوي سرعة تحطـيم ES فـأن تركيـز ES يكـون ثابت ونظام التفاعل في حالة مستقرة وان سرعة تكوين المعقد Rf حيث أن Rf=Rb

$$K_1[Et]\text{-}[ES][S] = k\text{-}1[ES] + k_2[ES] \text{---------------}(6)$$

وعند عزل ثوابت السرعة إلى جهة اليسار من المعادلة (6) فأن

$$k[Et][S]\text{-}k_1[ES][S]= k\text{-}1 +k_2[ES]$$

وعند تغير علامة-$k_1[ES][S]$ نحصل

$$k_1[Et][S]=k_1[ES][S] + (k\text{-}1 +k_2) [ES]$$

$$[ES] = k_1[ES][S] \;/\; k_1[S]+ (k\text{-}1 + k_2)$$

يمكن تقدير السرعة الأولية v_o طبقا لنظريـة ميكلـيس – مـنتن بطريقـة مـا وربـط ثوابت السرعة إلى إنزيم واحد.

$$[ES] = [Et] [S] / [S] + (k_2\text{-}k\text{-}1) \div k_1\text{----------- } 7$$

فأن السرعة الأولية v_o يمكن تقديرها بواسطة سرعة تحطيم [ES] في التفاعل (2) ذو ثابت سرعة k_2 حيث أن $v_o = k_2[ES]$، زمن المعادلة 7 ينتج

$$v_o = k_2[Et][S] / [S] + (k_2+k\text{-}1)/k_1 \quad \text{-------------8}$$

حيث أن $k_2 + k\text{-}1 / k_1$ هي ثابت ميكليس – منتن والذي يعبر عنه km

$$v_o = Vmax\ [S] / [S] + km$$

هذه هي معادلة ميكليس – منتن لتفاعل إنزيمي ذو مادة أساس واحدة، حيث يلاحظ من العلاقة بين السرعة الأولية والسرعة القصوى وتركيز المادة الأساس الأولى أن السرعة الأولية تساوي نصف السرعة القصوى

$$Vmax / 2 = Vmax\ [S] / km + [S]$$

وعند التقسيم على Vmax ينتج

$$½ = [S] / km + [S] \quad \text{then } km + [S] = 2\ [S] \quad \text{then } km = [S]$$

وعندما السرعة الأولية تساوي بالضبط نصف السرعة القصوى فان معادلة ميكليس – منتن هي

$$v_o = Vmax\ [S] / km + [S]$$

عندما v_o = السرعة الأولية.

Vmax = السرعة القصوى.

Km= ثابت ميكليس – منتن لإنزيم ذو مادة أساس معينه تختلف قيمةkmباختلاف الإنزيم والمادة الأساس (جدول – 18).

جدول (18) ثابت مكليس لبعض الإنزيمات

Enzyme	Substrate	Km mmol
Catalase	H_2O_2	25.00
Hexokinase	ATP	0.40
	D-glucose	0.05
	D-fructose	1.50
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	9.00
Chymotrypsin	Gly –Tyr –Gly	1.80
	N-benzoyl tyrosinamide	2.50
β-galactosidase	D-lactose	4.00
Thr dehydrogenase	Thr	5.00

يلاحظ من الجدول، بأن بعض الإنزيمات مثل carbonic anhydrase catalase, تحتاج تركيز مرتفع نسبيا من المادة الأساس حتى يصل التفاعل إلى منصف السرعة القصوى بسبب تحفيز التفاعل وإنزيمات أخرى مثل hexokinase الذي يحفز نقل مجموعة الفوسفيت من ATP إلى الكلوكوز، نلاحظ يصل التفاعل منتصف السرعة القصوى في تركيز منخفض جدا من المادة الأساس، الإنزيمات الذي تملك اثنان أو اكثر من المادة الأساس مثل Asp aminotransferase, hexokinase الذي تحفز التفاعل العكسي.

$$\text{Asp} + \text{2-ketoglutarate} \longrightarrow \text{oxaloacetate} + \text{Glu}$$

تلك الإنزيمات تملك قيم km مختلفة لكل مادة أساس مثل Chymotrypsin الذي يملك قيم km مختلفة للمواد الأساس المختلفة ففي الأنظمة الخلوية فأن الإنزيمات لا تكون مشبعة بالمادة الأساس لذلك لا تكون في سرعتها القصوى وتنظيم سرعة التفاعلات الإنزيمية في الخلايا يسبب تغيرات في التركيز للمادة الأساس داخل الخلايا.

نقل معادلة مكليس – منتن: يمكن نقل معادلة مكليس – منتن جبريا إلى أشكال أخرى يمكن الاستفادة منها في رسم المعلومات التجريبية وذلك من خلال تبسيط معادلة مكليس – منتن (الشكل-79) باستخدام مقلوب كلا الجانبين من معادلة ميكليس – منتن (1) لتعطي معادلة (2).

v_o = Vmax [S] / [S]+ km-----------------1

$1/v_o$ = km + [S] / Vmax [S] ---------------2

وعند فصل المكونات على الجانب الأيمن نحصل المعادلة (3).

$1/v_o$ = km / Vmax [S] + [S] / Vma----------3

وعند تبسيط المعادلة (3) تنتج المعادلة (4).

$1/v_o$ = km / Vmax [S] + 1 / Vmax ----------4

المعادلة (4) هي معادلة لينو يفر – برك Lineweaver – Burkequation الذي تمثل خط مستقيم مع انحدار km / Vmax وذلك باستعمال تراكيز مختلفة من المادة الأساس، ولا يمكن الحصول على خط مستقيم لان شكل الرسم البياني لمعادلة مكليس – منتن يكون منحنيا في المناطق التي لا يكون فيها الإنزيم مشبعا بالمادة الأساس مما تمكن لاينويفر – برك من تبسيط معادلة ميكليس – منتن وذلك بقلب البسط مقام من معادلة مكليس لا تعطي بعض التفاعلات الإنزيمية، الخط المستقيم المميز لرسم لاينويفر – برك مما أدى ذلك إلى توجه النقد لها لان امتداد الخط المستقيم على المحور هو $1/v_o$ حتى يلامس المحور 1 / [S] لتقدير 1/ km قد يصل إلى حافة ورقة الخط الباني مما يستوجب إعادة الرسم مرة ثانية واعطاء ضوء غير صحيح ونتائج غير دقيقة عندما نستعمل تراكيز منخفضة من المادة الأساس وفي التفاعلات التي لا تنطبق عليها معادلة مكليس – منتن، فأن استعمال رسم لاينويفر – برك لا يوضح الانحراف المتوقع حصوله في استقامة الخط لذلك قام أيدي – هوفستي Hofstee – Eadie بضرب طرفي المعادلة لاينويفر – برك بالعامل v_oVmax.

$1/v_o$ x v_oVmax = km / Vmax x 1/[S] x v_oVmax + 1/Vmax x v_oVmax

then v_o = km x k_o / [S] + Vmax ---------------5

تعطي المعادلة (5) خطا مستقيما في الرسم البياني ويمكن من المعادلة اعلاه تقدير $vo = Vmax$ أما هانس فضرب طرفي المعادلة للاينويفر– برك بالعامل [S]

$$1/v_o \times [S] = km / Vmax \times 1 / [S] \times [S] + 1 / Vmax \times [S]$$

$$[S] / vo = 1/ Vmax \times [S] + km / Vmax \text{ -----------6}$$

وتعطي المعادلة (6) خطا مستقيما حيث يمكن تقدير v_o , km , Vmax.

يفضل المختصون في آلية فعل الإنزيمات أو حركيتها enzyme kinetics استخدام رسم أيدي – هوفستي بينما يفضل المختصون بالإنزيمات استخدام رسم لاينويفر – برك وفي كلتا الحالتين وللحصول على نتائج جيدة ومعتمدة عمليا ويفضل استخدام مدى واسع من تراكيز المادة الأساس وتستعمل في الوقت الحاضر الحاسبة الإلكترونية لفرز النتائج على أساسLeast-squares للمنحني المناسب وهي من الطرق السريعة والمريحة لتقدير السرعة القصوى وkm، بالنظر لصعوبة الحصول على قيم معتمدة عمليا للسرعة القصوى وثابت ميكليس – منتن، اقترح Eisenthal– Bodwen– Cornish طريقة مختلفة تعتمد على معادلة ميكليس – منتن وذلك بتقلب معادلة ميكليس – منتن على تركيز ثابت من الإنزيم يعطي

$$1/v_o = km + [S] / Vmax [S]$$

$$Vmax / v_o = km + [S] / [S] = km / [S] + 1 \text{ ---------7}$$

من خلال إيجاد قيم يمكن الحصول على خط مستقيم برسم العلاقة بين v_o ,[S] يمكن الحصول على خط مستقيم برسم العلاقة بين Vmax , km، إلا أن البعض ينتقد رسم العلاقة بين Vmax , km مع أن ذلك صحيح من الناحية الرياضية، وعندما يكون km =0 فأن $Vmax = v_o$ وعندما Vmax = 0 فان [S]- =[S]، لذلك فأنه بالإمكان الاستفادة من [S], v_o للحصول على خط مستقيم بتعليم v_o على محور [S]-Vmax ويمكن الحصول على خطوط مستقيمة متعددة الذي يجب أن تمر من خلال القيم الحقيقية لثابت ميكليس والسرعة القصوى وتحدد هذه القيم الحقيقية بتقاطع الخطوط

المستقيمة وبسبب الأخطاء التجريبية، فإن الخطوط لا تتقاطع في نفس النقطة لكنها تتقاطع في مدى معقول.

3. **درجة الحرارة**: تزداد سرعة التفاعلات الإنزيمية مع ازدياد درجة الحرارة إلى حد يقل عنده نشاط الإنزيم تسمى الدرجة الحرجة درجة حرارة الانتقال وفوق الدرجة الحرجة لنشاط الإنزيم تفقد الإنزيمات نشاطها وتقريبا كل البروتينات هيئتها التركيبية البنائية بسرعة لان درجة الحرارة تكون كافية لتحطيم بعض الأواصر وهذه الدرجة الذي تسبب تغير في الهيئة التركيبية يطلق عليها الدنترة، معظم بروتينات الإحياء المجهرية تصبح مدنترة بدرجة حرارة 10 – 15م فوق درجة حرارة الخلية في مدى معين من درجة الحرارة، فأن سرعة التفاعلات الإنزيمية تزداد مع زيادة درجة الحرارة، هناك درجة حرارة مثلى لنشاط الإنزيم إلا أن الزيادة في سرعة التفاعلات الإنزيمية تحت درجة الحرارة المثلى ناتجة عن الزيادة في الطاقة الحركية للجزيئات المتفاعلة.
4. **الأس الهيدروجيني**: الإنزيمات تحفز التفاعلات في تركيز معين من أيون الهيدروجين ليست بسبب إلية الإنزيم الذي تعتمد على المجاميع الحامضية أو القاعدية الموجودة في نسب مثلى، بل لأن الهيئة التركيبية للإنزيم تعتمد على حالة الشحنات للمجاميع الرابطة، فالتغيرات في الأس الهيدروجيني يسبب دنترة بروتينات الإنزيم مما يؤثر على الهيئة التركيبية للإنزيم، فالتغيرات المتوسطة في الأس الهيدروجيني ها تأثير على الحالة الايونية للإنزيمات وكذلك على المادة الأساس ونتيجة التأثير الايوني للمجاميع الكربوكسيلية والأمينية للبروتين سيؤثر ذلك على الموقع التحفيزي وعلى الهيئة التركيبية للإنزيم، ارتفاع أو انخفاض الأس الهيدروجيني عن القيمة المثلى لنشاط الإنزيم تسبب دنترة الإنزيمات وعدم تنشيط بروتيناتها، نفس الإنزيمات من مصادر مختلفة تبين قيم أس هيدروجيني مختلفة، الإنزيمات الفطرية والنباتية تكون فعالة في أس هيدروجيني يتراوح ما بين 4- 6,5 بينما للأنسجة الحيوانية من 6,5 – 8، الببسين يعمل في الوسط الحامضي للعصير المعوي والأس هيدروجيني الأمثل له هو 2 بينما الإنزيمات الخلوية الخارجية تملك أس هيدروجيني امثل قريب من التعادل.
5. **المنشطات Activators**: في العديد من التفاعلات الإنزيمية بالرغم من وجود الإنزيمات والمواد الأساس، فلابد من وجود مواد أخرى تحتاجها الإنزيمات للقيام

بوظيفتها الأساسية وهي الإسراع من التفاعلات الكيمياوية، بعض تلك المواد يمكن إزالتها بالتحلل الغشائي أو بواسطة تكوين معقدات الذي تجعل الإنزيمات غير فعالة، بعض العوامل المرافقة cofactors عدا المرافقات الإنزيمية الذي تأخذ جزء فعال في التفاعل هي بعض الأيونات المعدنية الموجبة أحادية أو ثنائية التكافؤ، بعض الأحيان الأيونات السالبة تكون أساسية مثل أيونات الكلوريد لنشاط إنزيم الاميليز، العوامل المختزلة مثل السستائين والكلوتاثايون تحفز الإنزيمات الحاوية مجاميع سلفاهيدريل بينما enterokinase من الأمعاء يحفز تكوين الإنزيمات المحللة للبروتين مثل التربسين الذي يشجع النقل التحفيزي للانزيمات الأولية pre-enzyme مثل trypsinogen إلىtrypsin، تلك المواد الإضافية تحتاجها الإنزيمات لتحفيزها من خلال ارتباطها مع بعض المجاميع في الإنزيم أو تنشيط المادة الأساس فأن تنشيط trypsinogen إلىtrypsin بواسطة enterokinase أو تحفيز ذاتي بواسطة التربسين نفسة، تتضمن تحلل مائي لاصرة lysyl-isoleucyl مع تحرير ببتيد سداسي وتحرير تربسين الذي يملك طرف نيتروجيني isoleucyl-valyl – glycyl، نفس التغيرات تحدث عند نقل chymotrypsinogen إلى chymotrypsin بوجود التربسين مع تحلل مائي لاصرة arginyl-isoleucyl مع تحرير اصرة ببتيدية ثانية ويحدث التنشيط لتكوين أو توفير موقع فعال الذي يسهل عمل الإنزيم، بعض الأيونات المعدنية ذات سمية عالية تجاه الإنزيمات إلا أن بعضها ذات شحنه موجبة سواء كانت أحادية أو ثنائية التكافؤ فهي أساسية لنشاط بعض الإنزيمات، التفاعلات الإنزيمية المتضمنة الفسفرة تحتاج إلى أيون المغنيسيوم وممكن أن يستبدل بواسطة أيون المنغنيز، بعض الإنزيمات الذي تفصل الببتيدات تحتاج ايونات الكوبالت والمنغنيز والزنك والمغنيسيوم ويتوقف نشاط بعض الإنزيمات بواسطة أيونات الكوبالت والنيكل والنحاسيك والزنك.

6. **المثبطات Inhibitors**: المثبطات الإنزيمية هي تلك المواد الذي تخفض من سرعة التفاعلات الإنزيمية وذلك من خلال تأثيرها إما على المرافق الإنزيمي و apoenzyme والمجموعة الرابطة أو المنشطات الموجودة في النظام الإنزيمي أو التدخل مع ارتباط المادة الأساس مع الإنزيم ومن هذه المثبطات هي:

أ. **المثبطات التي تعمل على بروتين الإنزيم:** أملاح المعادن الثقيلة مثل الفضة، الزئبق، النحاس ، الكادميوم والرصاص تعمل كمرسبات بروتينية بسبب أيونات ذات الشحنه الموجبة إلا انه بصورة عامة أن تراكيز أيونات الفضة اللازمة للتثبيط الكامل للإنزيم هي كميات اقل بكثير من المكونات اللازمة لترسيب البروتين، urease يكون غير فعال كليا ولا عكسيا بواسطة أربع ذرات من الفضة لكل جزيئة، حيث إنها تؤثر على بعض الأجزاء من الإنزيم المسؤولة عن النشاط، بعض الكواشف مثل ثلاثي كلور وحامض الخليك وفوسفو حامض التنكستيك تعمل كمواد مرسبة للبروتينالت بسبب وجود الشحنات السالبة عليها ، عوامل الأكسدة والدنترة والاستلة تعمل على المجاميع الحساسة مما تثبط نشاط الإنزيم، الإنزيمات الذي نشاطها يعتمد على السلفاهيدريل تصبح غير فعالة بواسطة النحاس والزئبق ويمكن إزالة تأثيرها المثبط بواسطة استخدام مواد متشابكة لها مثل اثيلين ثنائي أمين رباعي الخلات (EDTA) الذي يكون معقدات مع الأيونات المعدنية، بعض المواد الكيمياوية مثل iodoacetamide، N-ethyl maleimide تتفاعل لا عكسيا مع مجاميع السلفاهيدريل (الثايول) للإنزيمات، حيث يثبط iodoacetate التحلل المائي في العضلات كما يمكن أن تتفاعل مع الهستدين وبعض الأحيان مع المثيونين، تتفاعل عكسيا para-chloromercuribenzoate مع مجاميع الثايول لتكوين merccaptides، استعمالات organophosphorus مثل diisopropyl flouro phosphate الذي مختصرها DEP الذي تسبب فسفرة أو إضافة أسيل إلى المجموعة الذي ترتبط مع المادة الأساس في الموقع الفعال، مجموعة الهيروكسيل للسيرين endopeptidase ,mutase.

ب. **المثبطات التي تعمل على المجموعة الرابطة prosthetic group:** الإنزيمات ذات النشاط الذي يعتمد على وجود معقد بورفيرين – حديد مثل cytochrome oxidase ويمكن تثبيطها بواسطة أول أو كسيد الكربون، السيانيد، الازايد، كبريتيد الهيدروجين ويعمل أول أو كسيد الكربون على تثبيط مدى واسع من الإنزيمات الحاوية حديد أو نحاس لأن مركبات أول أكسيد الكربون لإنزيمات البروتين الهيمي heme protein تتفكك بالضوء، فهي صفة مهمة للتعرف على إنزيم cytochrome oxidase كما يعمل السيانيد على تثبيط إنزيم cytochrome

oxidase أيضا وxanthine oxidase، ويمكن أن يثبط نشاط الإنزيم في آليات مختلفة مثل الارتباط مع المعدن مما يعمل كعامل مختزل على الروابط ثنائية الكبريتيد أو بواسطة الارتباط مع المجاميع الالديهايدية الأساسية في المرافقات الإنزيمية أو بواسطة خفض التثبيط، العوامل المؤكسدة والمختزلة يمكن أن تثبط الإنزيمات بواسطة عملها على المجموعة الرابطة.

ج. **المثبطات التي تعمل على المرافقات الإنزيمية:** يعتبر البيريدوكسال فوسفيت مرافق إنزيمي للإنزيم amino acid decarboxylase، فأن مجموعة الالديهايد تكون حساسة لعمل كاشف الكربونيل مثل semicarbazide, hydroxylamine والسيانيد الذي يرتبط معها لتثبيط الإنزيم.

د. **المثبطات التي تعمل على المنشطات الايونية:** الفلوريد يثبط الإنزيمات المحفزة بواسطة المغنيسيوم مثل enolase والإنزيمات الأخرى مثل ATPase بواسطة ترسيب أيونات الكالسيوم الذي تكون أساسية للإنزيم، مركب diethyl dithiocarbamate يثبط الإنزيمات الحاوية نحاس بواسطة ارتباطها مع المعدن، carbonic anhydrase يثبط بواسطة زيادة أيونات الزنك حتى ولو أن الزنك أساسي للجزيئة، zymohexase يثبط بواسطة العوامل الرابطة للمعدن مثل السستائين ألفا، ألفا - ثنائي بيريديل وبيروفوسفيت ويستعيد الإنزيم نشاطه بواسطة أيون الحديدوز، أيون الكوبالت وأيون الزنك والنحاسيك، myosin ATPase يثبط بواسطة أيون الزئبقيك والفضة لكن ينشط بواسطة أيون الكالسيوم والمنغنيز، مادة Beryllium يثبط إنزيم الفوسفاتيز القلوي الذي يحتاج أيون المغنيسيوم كمنشط، سمية السيلينيوم تعزى إلى استبدال الكبريت.

هـ. **المثبطات الذي تتداخل مع ربط المادة الأساس:** يمكن خفض سرعة أكسدة السكسينات بوجود إنزيم succinate dehydrogenase بواسطة المالونيت وتزداد مع إضافة السكسنيت، يتنافس المالونيت مع السكسنيت للارتباط في الموقع الفعال من الإنزيم وعندما يوجد المالونيت بتركيز مرتفع نسبيا يمكن أن يعيق التفاعل، الزيادة الكافية في كمية السكسنيت يمكن أن تستبدل المالونيت من الإنزيم.

الفصل الحادي عشر

مجاميع بروتينات الإنزيمي

مجاميع بروتينات الإنزيم Groups of enzyme proteins

من خلال الدراسات التي أجريت على عدد كبير من الإنزيمات بالتفصيل إلا أن بعضا منها تمت دراسة التركيب البنائي ثلاثي الأبعاد بواسطة تقانات علم البلورات للأشعة السينية ومن خلال تلك الدراسات التي أجريت تم تقسيم الإنزيمات إلى ثلاث مجاميع رئيسية طبقا لطبيعة بروتينات الإنزيم وهي:

إنزيمات أحادية السلسلة الببتيدية monomeric enzymes.

إنزيمات متعددة قصيرة السلسلة الببتيدية. oligomeric enzymes

إنزيمات متعددة طويلة السلسلة multienzymes.

الإنزيمات أحادية السلسلة الببتيدية هي الإنزيمات الذي تتكون من سلسلة ببتيدية متعددة واحدة فقط الذي فيها الأحماض الأمينية المهمة في الموقع الفعال للإنزيم والذي لا يمكن تحللها إلى وحدات اصغر وهناك عدد قليل نسبيا من هذه الإنزيمات يكون معروف وجميع هذه الإنزيمات تساهم في التفاعلات التحليلية المائية (جدول – 19)

جدول (19) الإنزيمات أحادية السلسلة الببتيدية

Enzyme	Mol. Wt	Amino acid No
lysozyme	14 600	129
ribonuclease	13 700	124
papain	23 000	203
trypsin	23 800	223
carboxypeptidase	34 600	307

تحتوي هذه الإنزيمات ما بين 100- 300 حامض أميني ويتراوح الوزن الجزيئي ما بين 13000 – 35000، بعضها يكون فعال نسبيا مثل البروتيزات، فأن وجودها بشكل فعال في الخلايا بسبب تلفها لذلك فهي تخلق حيويا بصورة غير فعالة لمنع أحداث أي ضرر عام لبروتينات الخلية ويطلق عليها عندما تكون غير فعالة مولدات الإنزيمات

proenzymes أو zymogen والذي يتم نقلها خارج الخلايا إلى القناة الهضمية عند اللازم (جدول –20)، عدد من الإنزيمات الأحادية سلسلة الببتيد هي عبارة عن إنزيمات ببتيدية داخلية endopeptidases الذي تساعد في تحليل الأواصر الببتيدية الداخلية للبروتينات ومن هذه الإنزيمات:

أ. **بروتيزات السيرين Serine proteases**: وهي الإنزيمات التي تحتوي على الحامض الأميني السيرين في الموقع الفعال للإنزيم والمهم جدا في نشاط الإنزيم وتتضمن إنزيمات الكيموتربسين والتربسين والايلاستيز، 40% من التركيب البنائي هذه الإنزيمات يكون متشابه وهي تعمل باليات متشابه والأس الهيدروجيني الأمثل لها هو 8 لكن تختلف فيما بينها في التخصص.

ب. **البروتيزات الحامضية acid proteases**: وهي الإنزيمات التي تعمل في قيم منخفضة من الأس الهيدروجيني في المعدة والذي تعمل على تحلل الأواصر الببتيدية الذي تعود إلى الأحماض الأمينية الغير قطبية وهي تشمل الببسين والكيموسين (الرنين).

جدول(20) الإنزيمات ومولداتها والعوامل المساعدة لها

Active enzyme	Active enzyme	Catalyst	Proenzyme
Fragments Hexapeptide Amino acid Fragments Fragments	Pepsin Trypsin Chymotrypsin Carboxypeptidase elastase	H^+ \ pepsin enterokinase Trypsin trypsin Chymotrypsin trypsin trypsin	Pepsinogen Trypsinogen Carboxypeptidase A Procarboxypeptidase A Proelastase

ج. **إنزيمات بروتيزات الثايول thiol proteases**: وهي الإنزيمات الموجودة في النباتات والذي تتشابه في تركيبها مثل إنزيم البابايين والفيسين أو مختلفة في تركيبها والذي توجد في البكتريا مثل subtilisin الذي يختلف في التركيب البنائي الأولي والرباعي عن بروتيزات السيرين في اللبائن أو الببتيديزات الخارجية exopeptidases وهي

الإنزيمات التي تعمل على إزالة الحامض الأميني الطرفي في السلاسل الببتيدية المتعددة وهناك أنواع منها هي:

1. **carboxypeptidases** وتشمل نوعين هما: A , B

carboxypeptidase A: مصدره بنكرياس الأبقار وهو من الإنزيمات أحادية سلسلة الببتيد والذي يملك أيون الزنك في كل جزيئة والذي يعمل على تحلل الاصرة الببتيدية التي تربط الحامض الأميني غير القطبي الطرفي الحاوي على مجموعة كربوكسيل ويعمل الإنزيم التربسين على إزالة أجزاء ببتيدية من مولدة procarboxypeptidase A، بينما إنزيم carboxypeptidase B الذي له تخصص تجاه الحامض الأميني الطرفي الحاوي على مجموعة كربوكسيل.

2. هناك بعض الإنزيمات الذي تعمل على مواد أساس مختلفة مثل الرايبونيوكليز واللايزوزيم.

الكيموتربسينChymotrypsin: يخلق إنزيم الكيموتربسين في البنكرياس على شكل زايموجين يسمى كيموتربسينوجين chymotrypsinogen أو كيموتربسين أولي pre-chymotrypsin الذي هو عبارة عن سلسلة ببتيدية متعددة أحادية تحتوي على 245 حامض أميني فيها خمس أواصر ثنائية الكبريتيد داخلية وعندما يصل الزايموين إلى الأمعاء حيث تكون هناك حاجة للإنزيمات المحللة للبروتين لهضم الأغذية الحاوية على بروتين حيث يقوم إنزيم التربسين بمهاجمة الكيموتربسينوجين مما يسبب ذلك تحلل الاصرة الببتيدية بين الارجنين في الموقع 15 والايزوليوسين في الموقع في الرقم 16 في السلسلة مكونا chymotrypsin-II وهذه الجزيئة تملك نشاط إنزيمي كامل الذي تنزع منها جزيئة ثنائية الببتيد من الموقع 14 و15 بفعل جزيئة أخرى من chymotrypsin-II مما ينتج كاما – كيموتربسين حيث يعمل الكيموتربسين على كاما – كيموتربسين لنزع جزيئة ببتيد ثنائي من الموقع 147 و148 لتعطي ألفا – كيموتربسين ويملك ألفا – كيموتربسين ثلاث سلاسل ببتيدية متعددة مرتبطة بواسطة أواصر ثنائية الكبريتيد لذلك لا يقال عنه بأنه من الإنزيمات الأحادية السلسلة الببتيدية إلا

انه صنف لان جزيئة الكيموتربسينوجين كانت أحادية السلسلة الببتيدية للكيموتربسين، جيب أو فجوة كبيرة غير محبة للماء التي تربط السلاسل الطرفية للفينيل الأنين والتربتوفين والتيروسين ومن ثم تحلل الأواصر الببتيدية في الجهة الكربونيلية هذه الأحماض الأمينية ويعتبر الكيموتربسين من الإنزيمات الهاضمة الذي تحلل البروتينات في الأمعاء الدقيقة، يملك ثلاث روابط عرضية من أواصر ثنائية الكبريتيد، يوجد بشكل غير فعال إلا انه يتحول إلى الشكل الفعال كليا عندما يحصل تشقق الاصرة الببتيدية التي تربط بين الحامض الأميني 15 (الارجنين) والحامض الأميني 16(الايزوليوسين) بواسطة التربسين لتكوين chymotrypsin الذي يحصل له تشقق إضافي مما يتحول الشكل إلى الشكل ألفا ويتكون الشكل الفعال من ثلاث سلاسل ببتيدية متعددة ترتبط بواسطة اثنان من الأواصر ثنائية الكبريتيد للسلسلة الداخلية وثلاثية من أواصر ثنائية الكبريتيد للسلسلة الخارجية.

التربسين Trypsin: يعتبر من أحد البروتيزات المهمة الموجودة في البنكرياس وهو من الإنزيمات الهاضمة والذي يعتبر من الببتيديزات الداخلية وقد تمت دراسته بشكل مفصل مقارنه مع بقية البروتيزات الأخرى وذلك لان له تخصص محدود تجاه بعض الأواصر الببتيدية المعينة أو فأنه يتكون في القناة الهضمية من صيغته غير الفعالة trypsinogen أو أنه يحلل المواد البروتينية في الجسم يتم تحويل التربسينوجين إلى التربسين عن طريق تحويل اصرة ببتيدية واحدة تقع بين الحامض الأميني اللايسين في الموقع 6 والحامض الأميني الليوسين في الموقع 7.

Val – Asp-Asp-Asp-Asp –Lys –Ile – Val –

1 2 3 4 5 6 7 8

↓ enteropeptidase

Val – Asp-Asp-Asp-Asp- Lys + Ile – Val-

1 2 3 4 5 6 1 2

Trypsin

مما تنفصل سلسله ببتيدية تحتوي على ست أحماض أمينية وتحرير تربسين فعال الذي تكون نهايته الطرفية هي الايزوليوسين ويساعد أيون الكالسيوم في تحويل التربسينوجين إلى تربسين وزنه الجزيئي يتراوح ما بين 23800 – 24000 ويكون ثابت على قيمة أس هيدروجيني اقل من 6 وذو أس هيدروجيني امثل هو 3 وهو متخصص تجاه بعض الأواصر الببتيدية المحددة فهو يحلل الأواصر التي تربط مجموعة الكربوكسيل للحامض الأميني القاعدي اللايسين والارجنين إلى المجموعة الأمينية لأي حامض أميني آخر مما ينتج ببتيدات ذات وزن جزيئي عالي نوعا ما عند تحلل البروتينات مما تكون مجموعة الكربوكسيل الطرفية لهذه الببتيدات أما تعود إلى اللايسين أو الارجنين وهو يحلل الاسترات بصورة أسرع من تحلله للامايدات المرادفة أما في حالات أخرى فهو يحلل بعض الاسترات بصورة أوطأ من بعض الامايدات المرادفة، في التربسين يحل حامض الاسبارتيك محل السيرين في اسفل الجيب أو الفجوة غير المحبة للماء مما يخفض التربسين في تحليل الأواصر الببتيدية المجاورة للأحماض الأمينية القاعدية مثل اللايسين والارجنين، يعتبر التربسين من الإنزيمات أحادية السلسلة الببتيديه المتعددة، يفتقر التربسينوجين إلى 9 أحماض أمينية في النهاية الطرفية الحاوية على المجموعة الأمينية عند المقارنة مع الكيموتربسين، لذلك لا يتمكن التربسينوجين من تكوين ما يعادل المكافئ لاصرة كبريتية ثنائية واحدة لكل 122 حامض أميني، أن فعل التربسين في الأمعاء هو نزع ببتيد سداسي من النهاية الطرفية الحاوية على المجموعة الأمينية للتربسينوجين لتكوين تربسين فعال الذي يكافئ chymotrypsin II وله نفس الحامض الأميني في النهاية الحاوية على المجموعة الأمينية.

ايلاستيز Elastease: يشبه التربسين والكيموتربسين في كثير من الصفات، فهو يفرز بواسطة البنكرياس بشكل غير فعال عندما يتم بواسطة تشقق الاصرة الببتيدية المنفردة، الجيب لا يكون طويل بسبب استبدال جزيئتين من الكلايسين في الكيموتربسين بواسطة جزيئتين من الفالين والثريونين وبما أن السلسلة الطرفية لكل من الفالين والثريونين تكون كبيرة بحيث تسد الجيب أو الفجوة بمقدار ما مما يسبب ذلك تخصص هذا الإنزيم بتحليل الأحماض الأمينية ذات السلسلة الطرفية اللا قطبية الصغيرة مثل الالنين Ala ويعتبر ايلاستيز من الإنزيمات ذات السلسلة الببتيدية الأحادية.

Subtilisin: إنزيم بكتيري يعود إلى إنزيمات السيرين بروتيز Ser-protease تسلسل الأحماض الأمينية له تختلف عن الكيموتربسين وهو يحتوي اصرة واحدة من ثنائي الكبريتيد، تسلسل الأحماض الأمينية حول السيرين في الموقع الفعال للإنزيم البكتيري هـي Gly –Thr-Ser-Met-Ala-Ser بينما للكيموتربسين هي

Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro يشقق الرايبونيوكليز إلى ببتيد S قصير وبروتين S الطويل مع فقد النشاط الإنزيمي له حيث يكون تسلسل الأحماض الأمينية في الرايبونيوكليز 124 حيث يحصل التشقق ما بين الحامض الأميني في الموقع 20 و 21 ويعتبر من الإنزيمات الببتيدية الداخلية endopeptidase وذات سلسلة ببتيدية متعددة أحادية.

البابايين **Papain**: من إنزيمات الببتيدات الداخلية endopeptidases والذي تعود إلى بروتيزات الثايول thiol proteases وهو من الإنزيمات المحللة للبروتينات وهو ذات وزن جزيئي 2300 ينشط بالعوامل المختزلة ويثبط بواسطة العوامل المؤكسدة بسبب اختزال مجاميع ثنائية الكبريتيد الموجودة في الموقع الفعال للإنزيم، الأس الهيدروجيني الأمثل له هو 7 في البيض و 5 عند تحلل الجيلاتين وهو يحتوي على الحامض الأميني السستائين في الموقع الفعال الذي يلعب دورا يضاهي السيرين في الموقع 195 في الكيموتربسين، كما يشقق بروتينات المناعة إلى ثلاثة أجزاء فعاله ذو وزن جزيئي 50 كيلو دالتون، ويحتوي شق عميق يحتوي الموقع الفعال.

الفيسين **Ficin**: إنزيم نباتي يعود إلى إنزيمات بروتيزات الثايول ومصدره التين وهو يشبه البابايين حيث ينشط عمله بوجود مركبات الثايول ويفقد فعاليته بوجود المواد المؤثرة على مجاميع السلفاهيدريل ويعتبر من الإنزيمات أحادية السلسلة الببتيدية.

الببسين **Pepsin**: يعتبر الببسين من الإنزيمات أحادية السلسلة الببتيدية التي يعود إلى البروتيزات الحامضية والذي يلعب دورا مهما في هضم البروتينات وهو يعمل في قيم أس هيدروجيني منخفضة في المعدة ويعمل على تحليل الأواصر الببتيدية التي تعود إلى الأحماض الأمينية غير القطبية ويمكن الحصول عليه من الببسينوجين غير الفعال بفعل

الحامض الموجود في المعدة أو بفعل جزيئات ببسين أخر، يوجد الببسينوجين في الأغشية المخاطية لمعدة الإنسان والأبقار وهو ذو وزن جزيئي42000 والذي يتحول إلى ما لا يقل عن خمسة ببتيدات بالإضافة إلى الببسين ويقدر الوزن الجزيئي للببسين في حدود 35000 ولا يحلل الاسترات أو الامايدات التي تعود إلى الأحماض الأمينية من نوع ألفا وله تخصص نوعي واسع فهو يحلل الببتيدات، الكلوتامين، السستين والسستائين.

الكيموسين Chymosin (Rennin): يعتبر من الإنزيمات ذات السلسلة الببتيدية المتعددة الأحادية وهو من الإنزيمات المحللة للبروتينات والذي يعمل على تخثر الحليب في صناعة الجبن،الصيغة غير الفعالة له هي prorennin الذي يتحول إلى رنين بسرعة في قيم أس هيدروجيني 3 ووزن جزيئي يقدر 40000.

الإنزيمات متعددة السلسلة الببتيدية Oligomeric enzymes

وهي تتضمن البروتينات مع وزن جزيئي من 35000 إلى اكثر من عدة ملايين وتتألف من عدد من الوحدات الببتيدية المتعددة لتكوين إنزيمات فعاله تحفيزيا وهي تتكون من اثنين أو اكثر من السلاسل الببتيدية المتعددة والذي ترتبط فيما بينها بواسطة أواصر غير تساهمية ولا تشترك الأواصر الببتيديية في ربط السلاسل الببتيديه المتعددة فيما بينها ويطلق على سلسلة الببتيد المكونة للبروتينات بالوحدة الفرعية حيث تتكون الإنزيمات من عدد كبير من الوحدات الفرعية وقد تكون الوحدات الفرعية متشابه أو مختلفة عن بعضها البعض الآخر، فالوحدات الفرعية المشابه protomer وتتكون جميع الإنزيمات المشتركة في عملية انحلال السكر glycolysis أما من وحدتين فرعيتين أو أربع وحدات فرعية هي متصلة فيما بينها في الحالة الطبيعية وتنفصل عن بعضها البعض الآخر أثناء عملية فصل هذه الإنزيمات وتخلق بصيغتها الفعالة وينظم نشاطها بواسطة feed back inhibition وتستطيع تنظيم نشاطها وتملك مواقع ربط مختلفة للمادة الأساس على جزيئة الإنزيم، فعلى سبيل المثال فأن pyruvate kinase الموجود في العضلات هو عبارة عن إنزيم يتكون من أربع وحدات فرعية tetramer وهو يحتاج إلى أيون موجب ثنائي الشحنه مثل أيون المنغنيز والمغنيسيوم الذي ترتبط بمنطقة الموقع الفعال ويتكون enolase من وحدتين فرعيتينdimer والذي تحتاج إلى ايونين من أيونات المغنيسيوم

لجعل المركب dimer فعال وبحاجة إلى ايونين من أيونات المغنيسيوم لكل موقع فعال عند ارتباط المادة الأساس بالإنزيـــم، alcohol dehydrogenase مـن كبـد الحصـان هـو عبارة عن إنزيم ثنائي الوحدات الفرعية dimer الذي يتكـون مـن وحـدتين فـرعيتين همـا موقع لربط المرافق الإنزيمي NAD^+ ولا يوجد أي أيونات معدنيـة مرتبطـة بـالإنزيم، ارتبـاط المرافق الإنزيمي بالإنزيم يسبب تغيرات تركيبيـة في الإنزيم، وفيما يلي أمثلـة حـول الإنزيمـات متعددة السلسلة الببتيدية المتعددة:

أ. **lactate dehydrogenase**: يؤكسـد حـامض اللاكتيـك إلى حـامض البيروفيـك بواسـطة نقـل أيـون الهيـدروجين والإلكترونـات مـن اللاكتيـت إلى المرافـق الإنزيمـي NAD^+الذي يختزل إلى NADH وهو يحفز التفاعل العكسي لاختـزال البيروفيـت إلى لاكتســيت وهنــاك خمســة أنــواع مــن المتنــاظرات للإنزيـــم هـــي lactate dehydrogenase-I_1 LDH-I_1 أو H_4 الذي ينتشر بكميات مرتفعة في الأنسجة الهوائيـة مثـل العضـلات القلبيـة، LDH-I_5 أو H_4 في الكبـد والعضـلات الهيكليـة، LDH-I_2 أو H_3M و LDH-I_3 أو H_2M_2 في الدماغ و LDH-I_2 و LDH-I_1 في الكلى وكريات الدم الحمـراء، توجـد المتنـاظرات الإنزيميـة الخمسـة في المصـل الاعتيـادي ويقدر نشـاط إنزيم المصل serum lactate dehydrogenase مـا بين 200 – 680 وحدة\مل مصل، الوحدة هي قياس انخفاض الكثافة الضوئية لمحلول الاختبـار في 5 دقائق بسبب التفاعـل الإنزيمي ويعتـبر الإنزيـم مـن الإنـزيمات متعـددة السلسـلة الببتيدية، لكل وحدة فرعيــة من الوحدات المكونة للإنزيم نفس الوظيفة.

$$CH_3CHOHCOO^- + NAD^+ \longleftrightarrow CH_3COCOO^- + NADH + H^+$$

يتكون الإنـزيم مـن أربـع وحـدات فرعيـة ذو وزن جزيئـي 140000 أي أن الـوزن الجزيئي لكل وحدة فرعية 35000 وهناك نوعان من الوحـدات الفرعيـة تختلفـان في تركيـب الأحمـاض الأمينيـة يطـلـق علـى النـوع الأول الشـكل M الـذي يكثـر وجـودة في العضـلات المرتبطة في الهيكل العظمي وفي الأنسجة اللا هوائية بينما النوع الثاني يطلق عليه الشكل H الذي يكثر وجوده في القلب، تكون الوحـدات الفرعية المنفردة غير فعاله والذي تصبح فعالـه عندما تتحد مـع وحـدات فرعيـة أخـرى مــن نفـس النـوع protomer أو مـن نـوع مختلـف

لتكوين الإنزيم الفعال الحاوي على أربعة وحدات فرعية والمتناظرات الإنزيمية الخمسة تلعب دوراً فسيولوجياً مختلفاً لأنها تساهم في التفاعل بخصوصية مختلفة بالرغم من أن أيا منها يساهم في نفس التفاعل وتختلف الأشكال الخمسة من الإنزيم في سلوك الانتقال في مجال الهجرة الكهربائية والفروقات في تركيب الأحماض الأمينية والصفات التحفيزية والتفاعلات المناعية والتغير في الحرارة، يمكن إنتاج بيروفيت من الكربوهيدرات بواسطة والخلال السكر أو من الأحماض الأمينية، يتحول البيروفيت إلى لاكتيت تحت الظروف اللاهوائية بوجود الإنزيم إلا انه تحت الظروف الهوائية يدخل البيروفيت إلى دورة حامض الستريك.

ب. **إنزيم تخليق اللاكتوز Lactose synthetase**: يعتبر الإنزيم الموجود في الغدد اللبنية من الأمثلة على الإنزيمات المتعددة السلسلة الببتيدية Oligomeric الذي تتمكن فيها الوحدات الفرعية غير الوظيفية من تحوير سلوك الوحده الفرعية الوظيفية وهو يتكون من وحدات فرعية تحفيزية مع وحدات فرعية محورة، الوحدات الفرعية التحفيزية تدعى galactosyl transferase الذي يكون فعال إنزيميا في نقل الكالاكتوز من UDP-galactose إلى N-acetyl glucosamine لتكوين N-acetyl lactosamine ويتغير تخصص الوحدة الفرعية التحفيزية عند ارتباط ألفا لاكتالبيومين وهو الوحدة الفرعية المحورة، فالمعقد الناتج عنها هو lactose synthetase الذي ينقل الكالاكتوز إلى الكلوكوز بدلا من نقلها إلى N-acetyl glucosamine لانتاج سكر اللاكتوز، يوجد galactosyl transferase في معظم الأنسجة والذي يساهم في تخليق الكربوهيدرات في البروتينات السكرية، بينما إنزيم lactose synthetase الموجود فقط في الغدد اللبنية، خلال الحمل يخلق galactosyl transferase ويخزن في الغدد اللبنية ويتكون إنزيم تخليق اللاكتوز في الغدد اللبنية ويفرز في الحليب خلال فترة الحمل وعندما يكون مستوى ألفا لاكتالبيومين منخفض يخلق الإنزيم إلا انه وضع الرضيع يقل تخليق هرمون البرولاكتين مما يحفز ذلك إنتاج ألفا لاكتالبيومين في الغدة اللبنية مما يصاحب ذلك تكوين إنزيم تخليق سكر اللاكتوز من galactosyl transferase المخزون في الغدة اللبنية.

ج. إنزيم تخليق التريبتوفين Try synthetase: يعتبر من الإنزيمات متعددة السلسلة الببتيدية المكون من وحدتين فرعيتين ذو وظائف مختلفة، كل وحدة فرعية ذو وزن جزيئي 29000 من نوع ألفا ووحدة فرعية من نوع α_2 ذو وزن جزيئي 90000 والذي تتحلل بوجود 4 مول يوريا لتعطي وحدتين فرعيتين من نوع بيتا ولكل واحدة منها موقع لربط المرافق الإنزيمي بيريدوكسال فوسفيت حيث تتمكن الوحدتين الفرعيتين من نوع ألفا لإنجاز التفاعل التالي:

$$\text{Indole –3-glycerol phosphate} \longleftrightarrow \text{indole + glyceradehyde}$$

بينما تتمكن الوحدة الفرعية من النوع $\hat{a}_2$ من إنجاز التفاعل الآتي:

$$\text{Indole + L-Serine} \longleftrightarrow \text{L-tryptophan}$$

يتضح من مما سبق بان الوحدات الفرعية المختلفة لإنزيم تخليق التربتوفين لها القدرة في إنجاز نصفي التفاعل الكلي كلا على حدة إلا أن سرعة التفاعل المنجز عندما يكون الإنزيم لجميع وحداته الفرعية كوحدة كاملة غير مجزأة إلى أنصاف فالمركب الوسطي (الاندول) يمر من الموقع الفعال للوحدة الفرعية من نوع ألفا إلى الموقع الفعال للوحدة الفرعية من نوع بيتا ويعتقد بان هذه المواقع تكون قريبة من بعضها البعض بحيث تساعد على زيادة الكفاءة الكلية للكبد.

إنزيمات متعددة طويلة السلسلة

معقدات الإنزيم المتعدد Multienzyme cxomplexes: تتألف معقدات الإنزيم المتعدد من إنزيمات مختلفة مرتبة في تسلسل وعمل على المادة الأساس الأولية وهي الإنزيمات الموجودة في جزيئة نقل الإلكترون في المايتوكوندريا وهي مجموعة من الإنزيمات الذي تعمل معا في سلاسل متعاقبة أو متسلسلة الذي فيها ناتج الإنزيم الأول يصبح مادة أساس للذي يليه وهكذا وهناك ثلاث مستويات من التعقيد في التنظيم الجزيئي لأنظمة الإنزيم المتعدد ففي نظام الإنزيم المتعدد البسيط، فأن الإنزيمات الفردية الموجودة في المحلول في السايتوبلازم لا يعتمد على الكيانات الجزيئية، فلو فرضنا انه لا يوجد هناك ارتباط

فيزياوي مع بعضها البعض الآخر في أي وقت خلال عملها، فأن الجزيئات الصغيرة من المادة الأساس تأخذ طريقها من جزيئة إنزيم إلى الأخرى بسرعة عالية عن طريق الانتشار، بعض الأنظمة للإنزيم المتعدد اكثر تنظيم من الأخرى، لذلك فأن الإنزيمات الفردية ترتبط فيزياويا ووظيفيا معا بشكل معقدات إنزيمية مثل نظام تخليق الأحماض الأمينية، فأن fatty acid synthetase system في الخمائر الذي يحفز تخليق الأحماض الدهنية من المولدات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة فهو يتالف من سبع أنواع مختلفة من الإنزيمات المرتبة بشكل مجاميع مرتبطة بقوة وهذا المعقد لا يمكن أن يتفكك بسهولة إلى جزيئات إنزيمية منفصلة فالجزيئات المنفصلة تكون غير فعاله في نظام تخليق الأحماض الدهنية، فأن المواد الوسطية لا تغادر المعقد، كل إنزيم منفرد له قيمة ثابت ميكليس – منتن منفصلة وله عوامل مرافقة منفصلة.

1. **Pyruvate dehydrogenase**: يعتبر الإنزيم الموجود في البكتريا والخلايا الحيوانية من الأمثلة حول معقدات الإنزيم المتعدد وهو نظام بتكون من إنزيمات منفصلة بدلا من إنزيم واحد والذي يتكون من 60 سلسلة ببتيدية متعددة وله وزن جزيئي بحدود 4600000 وهو يساعد في دخول البيروفيت إلى دورة حامض الستريك، ويتكون النظام الأنزيمي من الإنزيمات التالية:

   1-pyruvate decarboxylase –dehydrogenase E_1.

   2-dihydrolipoamide –transacetylase.

   dihydreolipoamide - reductase(E_3).

هذا الإنزيم يحفز أكسدة حامض البيروفيك إلى الخلات النشطة وثاني اوكسيد الكربون، آلية التفاعل حيث يتم نزع مجموعة الكربوكسيل التاكسدية الذي يتضمن ستة عوامل مرافقة هي Mg^{+2} ,CoA, NAD^+ ,Lipoic acid, FAD وثيامين بيروفوسفيت.

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + CoASH + NAD^+$$

$$\updownarrow$$

$$CH_3COS\text{-}CoA + NADH + CO_2 + H^+$$

التفاعل الكلي يحدث في ثلاث تفاعلات تحفز بواسطة ثلاث إنزيمات منفصلة يطلق عليها معقد الإنزيم المتعدد ففي التفاعل الأول يتم نزع مجموعة الكربوكسيل من حامض البيروفيك لتكوين ثاني اوكسيد الكربون ومعقد اسيتول للثيامين بيروفوسفيت الذي يرتبط بقوة إلى واحد من الإنزيمات الثلاثة ويتم نقل مجموعة الاسيتول إلى حامض الليبويك المتأكسد بوجود dihydrolipoyl transacetylase، نتيجة التفاعلات السابقة يتكون ثايو استر ذات طاقة عالية من حامض الليبويك المختزل وتكوين وحدة ثنائية الكربون في مستوى أكسدة حامض الخليك بدلا من اسيتالديهايد، في التفاعل الثالث مجموعة الخلات يتم نقلها إلى المرافق الإنزيمي لتكوين الخلات النشطة الذي يتحرر من الإنزيم بشكل حر، حامض الليبويك المختزل للإنزيم dihydrolipoyl dehydrogenase تعاد أكسدته إلى ليبويل حلقي بواسطة الإنزيم الثالث من المعقد dihydrolipoyl dehydrogenase الذي يحتوي FAD ويتم التفاعل باكملة بحيث تكون المادة الأساس مرتبطة بالإنزيم إما بصورة مباشرة أو من خلال العوامل المرافقة TPP وLipoate يتحد TPP مع E_1 بينما تكون السلسلة الطرفية للحامض الليبويك مرتبطة بواسطة اصرة امايد إلى الحامض الأميني اللايسين الذي تعود للإنزيم E_2، لذلك فأن العامل المرافق يكون lipoamide بدلا من lipoate ويحتوي الإنزيم E_3 على FAD وتوجد الإنزيمات الثلاثة بشكل معقد بسبب وجود القوى الايونية ويمكن فصلها في الوسط القاعدي، حيث يمكن فصل E_1 عن E_2, E_3 بينما في المحيط المتعادل وعلى تراكيز عالية من اليوريا ينفصل E_2 عن E_3، خلط الوحدات الفرعية مع بعضها في محيط متعادل وعند عدم وجود اليوريا، فأنه يحصل تماسك الإنزيمات الثلاثة ولا يتحد E_1 و E_3 معا عند غياب E_2.

2. **معقد إنزيم تخليق الأحماض الدهنية fatty acid synthetase complex:**

معقد إنزيم تخليق الأحماض الدهنية يساهم في تحويل الخلات النشطة والمالونيل النشط إلى حامض البالمتيك وهو يوجد في الخلايا الحيوانية والخمائر أما في النباتات والبكتريا

هذه الإنزيمات تكون معزولة كليا ويتالف من نوعين من السلاسل البتيدية المتعددة الوحدة الفرعية A تحتوي على بروتين ناقل للأسيل acyl carrier protein وهو ketoacyl reductase بينما الوحدة الفرعية B تحتوي hydroxy acyl malonyl transacylase, acetyl transacylase,enoyl reductase ذات أوزان جزيئيه ويساهم الإنزيم في تخليق الأحماض الدهنية طويلة السلسلة من الخلات النشطة والمالونيت النشط في سايتوسول الكبد والغدد اللبنية والأنسجة الدهنية.

3. معقد إنزيم ألفا - كيتوكلوتاريت النازع للهيدروجين: يتألف الإنزيم ketoglutarate dehydrogenase system من المكونات الإنزيمية التالية:

أ. ketoglutarate decarboxylase المرتبط مع TPP حيث يرتبط حامض ألفا - كيتوكلوتاريت إلى المجموعة الرابطة لتكوين ketoglutarate carboxypropyl-TPP-decarboxylase عن طريق نزع مجموعة كربوكسيل من 2-ketoglutarate.

ب. يتم نقل مجموعة carboxypropyl-hydroxy بشكل مجموعة سكسنيل إلى حامض ألفا ليبويك المرتبط مع dihydrolipoyl transsuccinylase.

ج. إعادة أكسدة مجموعة dihydrolipoyl إلى ألفا - ليبويل عن طريق نقل المكافئات المختزلة إلى FAD المرتبط مع dihydrolipoyl dehydrogenase من النظام الإنزيمي حيث تحصل إعادة أكسدة $FADH_2$ بواسطة NAD^+ لتكوين $NADH_2$ الذي تعاد أكسدته إلى NAD^+ بواسطة السلسلة التنفسية مما يؤدي ذلك لانتاج أواصر فوسفيت ذات طاقة عالية بوجود ketoglutarate dehydrogenase.

تحوير تخصص الإنزيم المعقد: يتم تحوير تخصص الإنزيم المتعدد بواسطة بروتين معين غير إنزيمي، حيث إن إنزيم تخليق اللاكتوز lactose synthetase في الغدد اللبنية يحفز تخليق سكر اللاكتوز.

$$\text{UDP-galactose} + \text{glucose} \longleftrightarrow \text{UDP} + \text{lactose}$$

يمكن عزل مكونات إنزيم تخليق سكر اللاكتوز المعزول من الحليب إلى نوعين من البروتينات هما A,B ولا واحد من المكونات البروتينية يحفز التفاعل المؤدي إلى تكوين سكر اللاكتوز إلا إن البروتين B هو ألفا-لاكتالبيومين وهو بروتين موجود فقط في الغدة اللبنية ولا يوجد في أي مكان آخر بينما البروتين A يوجد على نطاق واسع في الأنسجة الحيوانية لذلك يخلق اللاكتوز فقط في الأنسجة الحيوانية (الغدد اللبنية) لان تلك الأنسجة هي الوحيدة الذي يوجد فيها ألفا لاكتالبيومين، دور البروتين غير الإنزيمي متخصص للنشاط التحفيزي للإنزيم المتعدد.

أهمية الإنزيمات المتعددة: تسلك الإنزيمات المتعددة صفات مهمة في التفاعلات الايضية هي:

1. تجمع سلاسل ببتيدية معينة لتكوين إنزيمات متعددة يحافظ على الهيئة التركيبية المعينة للإنزيم، كما أن تفكك العديد من الإنزيمات المتعددة إلى الوحدات الفرعية يؤدي إلى فقد كامل لنشاط الإنزيم.
2. ارتباط العديد من الوحدات الفرعية يؤدي إلى إنتاج الموقع الفعال الحاوي الأحماض الأمينية.
3. ارتباط اثنان من الوحدات الفرعية مع نشاط إنزيمي مختلف ينتج تفاعلات إنزيمية متكاملة.
4. ارتباط البروتينات غير الإنزيمية مع البروتين التحفيزي مثل ألفا-لاكتالبيومين مع البروتين A.
5. تعمل الوحدات الفرعية في العديد من الأنظمة الإنزيمية كناقلات معينه للمادة الأساس، فان الوحدات الفرعية في إنزيم CoA carboxylase– acetyl في بكتريا القولون تكون النشاط الإنزيمي الكلي، فالإنزيم مكون من اثنان من البروتينات الفعالة
6. تعمل الإنزيمات في تفاعلات متسلسلة لتكوين المنتوج.
7. عدد من الإنزيمات المتعددة هي إنزيمات منظمة مع مواقع تنظيمية ومواقع تحفيزية.

الفصل الثاني عشر

تثبيط النشاط الإنزيمي

تثبيط النشاط الإنزيمي Inhibition of enzyme activity

يمكن تثبيط معظم الإنزيمات بواسطة بعض العوامل الكيمياوية الذي لها القدرة أن ترتبط مع بعض الإنزيمات في مناطق معينه على سطح الإنزيمات أو المادة الأساس مما تعيق من نشاطها الإنزيمي وهي لا تعمل كمادة أساس للإنزيم ويطلق على المواد الذي تثبط نشاط الإنزيم بالمثبط inhibitor وهي المواد الذي تعمل على إبطاء سرعة التفاعل الإنزيمي بالرغم من أن بعض المثبطات تعمل على المادة الأساس أو على العامل المرافق cofactor، وقد تشبه المثبطات للمادة الأساس أو تختلف عنها ويختلف تأثير المثبطات باختلاف نوعها لأن بعضها له تأثير على المادة الأساس نفسها والبعض الآخر يتحد مع الموقع الفعال active site على سطح الإنزيم مما يقلل من ميل الإنزيم تجاه المادة الأساس بينما بعضها الآخر على التفاعلات من خلال ارتباط المثبط مع مواقع الربط binding site أو مواقع التحفيز catalytic site على سطح الإنزيم مما يؤثر على معدل سرعة تحول المادة الأساس – الإنزيم إلى نواتج نهائية للتفاعل وتؤثر المثبطات على أحد المناطق التالية في الإنزيم أو المادة الأساس.

1. الموقع الفعال على سطح الإنزيم.
2. الجزء البروتيني من الإنزيم apoprotein.
3. المرافق الإنزيمي coenzyme.
4. موقع الربط binding site.
5. موقع التحفيز على سطح الإنزيم.
6. تخصص المادة الأساس للإنزيم.
7. المجموعة الرابطةprosthetic group.
8. آلية النشاط التحفيزي
9. طبيعة المجاميع الوظيفية في الموقع الفعال للإنزيم.
10. مساهمة بعض المجاميع الوظيفية في المحافظة على الهيئة التركيبية الخاصة بالإنزيم.

تصنيف مثبطات الإنزيمات

يمكن تصنيف مثبطات الإنزيم إلى:

1. التثبيط العكسي reversible inhibition.
2. التثبيط اللا عكسي irreversible inhibition الذي يتضمن التنافسي، اللاتنافسي، غير التنافسي، مختلط، جزيئي، منظم، سيني sigmoid، الناتج النهائي feed back، المادة الأساس، تساهمي.

التثبيط اللا عكسي Irreversible inhibition: التثبيط اللا عكسي يتضمن تحطيم أو تحوير واحد أو اكثر من المجاميع الوظيفية للإنزيمات الذي تكون أساسية في النشاط التحفيزي أو يتضمن تكوين اصرة تساهمية فالمادة المثبطة ترتبط تساهميا مع الإنزيم والذي ترتبط به بقوة مما يكون تفككها من الإنزيم بطيء جدا حيث يرتبط المثبط اللاعكسي بالموقع الفعال للإنزيم بواسطة تفاعل لا عكسي.

$$E + I \longrightarrow EI$$

يمكن فصل المثبط عن الإنزيم بسبب تحطيم الاصرة التساهمية بين الإنزيم والمثبط، وقد يمنع المثبط ارتباط المادة الأساس بالإنزيم أو عن طريق تحطيم بعض المكونات في الموقع الفعال مما تقلل من نشاط الإنزيم ويستفاد من التثبيط اللاعكسي في أجراء الدراسات على الموقع الفعال للإنزيم وقد يرتبط المثبط اللاعكسي مع الأحماض الأمينية في الموقع الفعال للإنزيم لذلك يمكن الاستفادة منه للتعرف على الأحماض الأمينية في الموقع الفعال ويمكن تقليل نشاط الإنزيمات بواسطة أنواع مختلفة من سموم الإنزيمات مثل iodoacetamide وأيونات المعادن الثقيلة مثل الفضة والزئبقيك والعوامل المؤكسدة وتلك المثبطات لا تتشابه تركيبيا مع المادة الأساس وان أي زيادة في تركيز المادة الأساس لا يؤثر على التثبيط، فأن وجود واحد أو اكثر من المواد الأساس أو المنتجات يمكن أن يحمي الإنزيم تجاه التثبيط ويرتبط المثبط مع الحامض الأميني للإنزيم بواسطة اصرة تساهمية بحيث يصعب فصل المثبط عن الإنزيم بواسطة التخفيف أو الفصل الغشائي dialysis ومن الأمثلة على المثبطات غير التنافسية اللا عكسية هي السيانيد، diisopropyl

iodoacetamide fluorophosphate(DIFP) والعناصر الثقيلة مثل الرصاص والزئبق والفضة فالمركب DIFP يثبط إنزيم cholinesterase فأنه يرتبط مع مجموعة الهيدروكسيل لوحدات الحامض الأميني السيرين في الإنزيم مما يشوه الموقع الفعال للإنزيم مما يفقد نشاطه الإنزيمي كناقل لنبضات الأعصاب ويسمى DIFP غاز العصب الذي يسبب شلل الجهاز العصبي وأن iodsoacetamide يثبط لا عكسيا النشاط الإنزيمي بواسطة تحوير السستائين والسلاسـل الجانبية الأخرى مثل الاميدازول في الهستدين.

$$E\text{-}CH_2SH + I\text{-}CH_2CONH_2 \longleftrightarrow E\text{-}CH_2\text{-}S\text{-}CH_2CONH_2 + HI$$

فأن مجاميع الهيدروكسيل في السيرين ومجموعة الثايول في السستائين ومجموعة الاميدازول في الهستدين تساهم في النشاط التحفيزي لأصناف مختلفة من الإنزيمات وأن التركيز الأولي للمثبط[Io] سيقلل من تركيز الإنزيم الفعال من [Eo] إلى [Eo]-[Io] في حالة عدم وجود المثبط بكميات كبيرة جدافلو أضيفت المادة الأساس إلى وسط التفاعل بعد إتمام التفاعـل بين الإنزيم والمثبط ويمكن الحصول على نظام تنطبق علية معادلة ميكليس – منتن حيث ينتج:

1. قيمة km ثابت مكيليس ثابتة لان الزيادة في تركيز المادة الأساس لا يؤثر على انخفاض نشاط الإنزيم بواسطة المثبط.
2. الألفة بين الإنزيم والمادة الأساس ثابتة.
3. لا يمكن التغلب على التثبيط عند زيادة تركيز المادة الأساس.

عند عدم وجود مثبط $V_{max}= K_{cat}\,[E_o]$ وعند وجود مثبط $V_{max} = K_{cat}[E_o]-[I_o]$

التثبيط العكسي reversible inhibition: يتميز التثبيط العكسي بالتوازن السريع بين المثبط والمادة الأساس وهو يتضمن:

1. التثبيط العكسي التنافسي competitive reversible inhibition.
2. التثبيط العكسي اللا تنافسي non-competitive reversible inhibition.

3. التثبيط العكسي غير التنافسي uncompetitive reversible inhibition.
4. التثبيط بالناتج النهائي feedback inhibition.
5. التثبيط الجزيئي partial inhibition.
6. التثبيط المختلط mixed inhibition.
7. التثبيط بفعل المادة الأساس substrate inhibition.
8. التثبيط المنظم allosteric inhibition.
9. التثبيط السيني sigmoid inhibition.

التثبيط العكسي التنافسي: يحدث التثبيط التنافسي عندما يتنافس المثبط مع المادة الأساس على الاتحاد مع الموقع الفعال للإنزيم مما يخفض ذلك نشاطه التحفيزي ويكون تأثير التثبيط عكسي وهذا النوع من التنافس يعتمد على تركيز المثبط، تركيز المادة الأساس، الألفة النسبية بين المثبط والمادة الأساس ويعمل المثبط على منع ارتباط المادة الأساس إلى الموقع الفعال للإنزيم مما يقلل ذلك من سرعة تحفيز التفاعل الإنزيمي من خلال اختزال جزيئات الإنزيم الذي ترتبط إلى المادة الأساس ويحدث التنافس في موقع ارتباط المادة الأساس أي الموقع التحفيزي عندما يكون التركيب الكيمياوي للمادة الأساس يضاهي المثبط ومماثلة في التركيب البنائي مما يكون معقد الإنزيم المثبط [EI] بدلا من معقد المادة الأساس – الإنزيم [ES] عند وجودهما في نفس الوسط، لأن الموقع الفعال يصبح غير مناسب لاستقبال المادة الأساس أو أن المادة الأساس عندما تصل الموقع الفعال لا يحصل هناك اتحاد أو تفاعل ويعمل succinic dehydrogenase على أكسدة حامض السكسنيك إلى حامض الفيوماريك، فلو زدنا تركيز حامض الماليك الذي يكون قريبا في تركيبة إلى حامض الفيوماريك، فأن نشاط الإنزيم ينخفض ويمكن عكس حالة التثبيط عند زيادة تركيز حامض السكسنيك ودرجة التثبيط لها علاقة بتركيز أما حامض السكسنيك أو المالونيك وتركيز المادة الأساس والألفة بين حامض المالونيك وحامض السكسنيك في الوسط كما يمكن ملاحظة التثبيط التنافسي في تكوين 3,2- ثنائي فوسفو كلسيريت من 3,1- ثنائي فوسفوكلسيريت بوجود إنزيم diphosphoglycerate mutase.

CH_2-COOH	COOH
|	|
CH_2-COOH	CH_2-COOH
Succinic acid	malonic acid

ويمكن تثبيط التفاعل عند استخدام تركيز منخفض من 3,2- ثنائي فوسفو كلسيريت والسبب في المنافسة هو تماثل التركيب البنائي لهم.

O=C-O-PO_3H_2	O=C-O^-
|	|
H-C-OH	H-C-O-P-O^-
|	|
CH_2-O-PO_3H_2	CH_2-O-PO_3H_2
1,3-diphosphoglyceric acid	2,3-diphosphoglyceric acid

يمكن استعمال المثبط التنافسي لتوضيح طرق العمليات الايضية من خلال تراكم المركبات الايضية الوسطية فعلى سبيل المثال استعمل العالم كريبس الفعل التثبيطي للمالونيت لدراسة دورة حامض الستريك والذي يعتبر succinate dehydrogenase أحد الإنزيمات المشاركة فيها كما انه بالإمكان استعمال المثبطات التنافسية في الطب والزراعة كأدوية علاجية أو في المواد القاتلة للحشرات أو في مكافحة الأدغال لمنع نمو الإحياء المجهرية غير المرغوب بها فعلى سبيل المثال استعمل السلفوناميد sulfonamide على نطاق واسع في الطب الذي يعتبر مثبط تنافسي للإنزيمات البكتيرية المشاركة في تخليق حامض الفوليك من بارا- امينو حامض البنزويك لذلك يستخدم للحد من نمو البكتريا كما يستفاد من دراسة المثبطات التنافسية في معرفة العوامل التي تتحكم بارتباط المادة الأساس بالموقع الفعال للإنزيم أو في التفاعلات التي تساهم فيها مادتين أساسيتين للإنزيم أو لتوضيح آلية التفاعل لتنظيم العمليات الايضية داخل الخلية الحية ولا تتبدل السرعة القصوى في التثبيط التنافسي إلا أن قيمة ثابت ميكليس – منتن الظاهرية سوف تزداد بسبب التثبيط.

التثبيط العكسي اللا تنافسي: في هذا النوع من التثبيط، فإن المثبط يرتبط في موقع على الإنزيم بدلا من موقع ارتباط المادة الأساس أو يمكن أن يرتبط مع الإنزيم الحر لتكوين معقد الإنزيم – المادة الأساس [ES] أو يرتبط مع معقد الإنزيم – المادة الأساس لتكوين معقد [ESI]، حيث تكون الأشكال EI, ESI غير فعاله.

$$E + I \longleftrightarrow EI$$

$$ES + I \longleftrightarrow ESI$$

يؤدي التثبيط اللا تنافسي إلى تغير في الهيئة التركيبية للإنزيم وهو يحدث طبيعيا من المركبات الوسطية الايضية الذي تستطيع أن ترتبط عكسيا مع مواقع معينة على بعض الإنزيمات المنظمة مما يؤدي ذلك إلى تغير في نشاط مواقعها التحفيزية فعلى سبيل المثال يحصل تثبيط نشاط إنزيم L-Thr dehydratase بواسطة الحامض الأميني L- Ile وانخفاض تركيز الثريونين يؤدي إلى زيادة نشاط الإنزيم حيث أن ارتباط Ile إلى الموقع المنظم من الإنزيم يكون لا تساهمي وعكسي، المثبطات اللا تنافسية العكسية تقلل من السرعة القصوى للتفاعل ولا يؤثر على ثابت ميكليس وهناك حالات واضحة إلا إنها قليلة من التثبيط اللا تنافسي العكسي للتفاعلات الإنزيمية التي تساهم فيها مادة أساس واحدة، فأن أيون الهيدروجين من الأمثلة لهذا النوع من التنافس حيث يثبط عمل الكيموتربسين مع زيادة تركيز أيون الهيدروجين لان الموقع الفعال في الإنزيم هو قابل بروتون كما تعتبر أيونات العناصر المعدنية الثقيلة والجزيئات العضوية التي ترتبط مع مجموعة السلفاهيدريل التي تعود إلى السستين من الأمثلة المناسبة للمثبطات اللا تنافسية العكسية كما تعتبر مجاميع السيانيد من هذا النوع من المثبطات لارتباطها بالأيونات المعدنية في الإنزيمات المعدنية مما يسبب ذلك تحطيم نشاط الإنزيم وان الخواص السمية لبعض المركبات مثل أول اوكسيد الكربون والسيانيد وكبريتيد الهيدروجين وأيونات العناصر المعدنية الثقيلة سببها هو الدور المثبط لها ولا يحصل تغير في ثابت ميكليس – منتن، بل يحصل تغير في السرعة القصوى ويلاحظ من الشكل أعلاه انخفاض السرعة القصوى للنشاط الإنزيمي وثبوت قيمة ثابت ميكليس – منتن لان الزيادة في تركيز المادة الأساس لا يؤثر على تثبيط الإنزيم ولا يتأثر التثبيط مع زيادة تركيز المادة الأساس وثبات الألفة بين الإنزيم والمادة الأساس

للإنزيم، فعلى سبيل المثال، فأن أيونات المعادن الثقيلة مثل الفضة والرصاص والزئبق لها القدرة على تثبيط إنزيمات السلفاهيدريل مثل triose phosphate dehydrogenase papain بسبب ارتباطها مع مجاميع السلفاهيدريل للإنزيم، السيانيد أيضا له القدرة على تثبيط بعض الإنزيمات بواسطة التفاعل مع الأيونات المعدنية في المجموعة الرابطة مثل cytochrome oxidase catalase كما أن EDTA يثبط الإنزيمات المعتمدة على أيونات المغنيسيوم مثل إنزيم enolase وكذلك تثبيط triose phosphate dehydrogenase بواسطة الزرنيخ ويمكن التفريق بين التثبيط العكسي التنافسي واللاتنافسي لأن التثبيط التنافسي يعتمد على تركيز المادة الأساس وتركيز المادة المثبطة وقيمة km للمركب المعقد بين الإنزيم والمادة الأساس والمركب المعقد بين الإنزيم مع المادة المثبطة ويحدث التنافس بسبب التنافس بين المادة الأساس والمادة المثبطة على موقع الربط أو الموقع الفعال للإنزيم وذلك يعني وجود تشابه بين تركيب المادة الأساس وتركيب المادة المثبطة ويمكن التغلب على التثبيط التنافسي مع زيادة تركيز المادة الأساس ومن الأمثلة عليه هو تثبيط إنزيم السكسنيك النازع للهيدروجين بواسطة حامض المالونيك بسبب التشابه الموجود بين تركيبة وتركيب المادة الطبيعية التي يحللها الإنزيم وهو حامض السكسنيك ويمكن التغلب عليه بزيادة حامض السكسنيك بينما في التثبيط العكسي اللا تنافسي، فأن المثبط والمادة الأساس ترتبط في أن واحد إلى الإنزيم، المثبط يؤثر على ارتباط المادة الأساس ورقم الانقلاب للإنزيم، أن القياسات لسرع التحفيز بتراكيز مختلفة من المادة الأساس والمثبط تساعد على التمييز بين التثبيط التنافسي واللا تنافسي، قياسات سرع التحفيز بتراكيز مختلفة من المادة الأساس والمثبطات تستخدم للتميز بين التثبيط التنافسي واللا تنافسي، ففي التثبيط التنافسي يكون الجزء المحصور للرسم (1/v) مقلوب السرعة مقابل مقلوب تركيز المادة الأساس ([S]/1) هو نفسة في وجود أو عدم وجود المثبط مع أن الانحدار يكون مختلف أي أن السرعة القصوى لا تتغير بالتثبيط التنافسي، لأن المادة الأساس والمثبط تتنافس على نفس الموقع، ففي تركيز عالي للمادة الأساس، فأن المواقع الفعالة تكون مملوءة بالمادة الأساس والإنزيم يكون فعال كليا، الزيادة في انحدار رسم (v /1) مقلوب السرعة مقابل مقلوب تركيز المادة الأساس يشير إلى قوة ربط المثبط التنافسي، ففي حالة المثبط التنافسي، فأن المعادلة (1) كما في رقم (2).

$$1/v=1/Vmax + km/Vmax \times 1/[S]\text{------------ --}1$$

$$1/v = 1/Vmax + km/Vmax (1+[I]/[k_1]) (1/[S])\text{---- -}2$$

حيث أن [I] هو تركيز المثبط و k_1 هو ثابت تفكك معقد الإنزيم – المثبط [EI].

$$E + I \longleftrightarrow EI$$

$$K_1 = [E][I] / [EI]\text{------------ }3$$

بعبارة أخرى فان انحدار الرسم يزداد بواسطة العامل $1+ k/$ [I] بوجود المثبط التنافسي، فلو اعتبرنا الإنزيم مع ثابت ميكليس– منتن هو 10^{-4} مولار ففي حالة غياب المثبط، فأن $v = Vmax$ عندما $[S]=10^{-4}$ M أما بوجود $2 M x10^{-3}$ من المثبط التنافسي يكون الارتباط إلى الإنزيم مع ثابت تفكك لمعقد EI هو 10^{-3} M فان ثابت ميكليس الظاهري سيكون 3×10^{-3} M أي أن $v = Vmax/4$، المثبطات اللا تنافسية فأن السرعة القصوى تقل لذلك يكون الجزء المحصور على المحور Y في حالة زيادة مما يجعل (الانحدار= km/Vmax) يزداد بنفس العامل بينما ثابت ميكليس – منتن لا يتأثر بواسطة هذا النوع من التثبيط لا يمكن إزالة التثبيط اللا تنافسي بواسطة الزيادة في تركيز المادة الأساس فيمكن إيجاد السرعة القصوى عند وجود مثبط لا تنافسي من المعادلة (4).

$$Vmax = Vmax / 1+ [I] / k_1\text{-----------------}4$$

مقلوب تركيز المادة الأساس بوجود أو غياب مقابل مقلوب تركيز المادة الأساس بوجود أو المثبط اللا تنافسي.

التثبيط العكسي غير التنافسي: يرتبط المثبط فقط بالمعقد بين الإنزيم والمادة الأساس ولا يرتبط مع الإنزيم الحر مما يؤدي الارتباط بين المادة الأساس والإنزيم إلى حصول تغير في الهيئة التركيبية للإنزيم أو أن المثبط يمكن أن يرتبط مع الإنزيم المرتبط مع المادة الأساس، ففي كلتا الحالتين لا يتنافس المثبط مع المادة الأساس على نفس الموقع ولا يمكن التغلب عليه عند زيادة تركيز المادة الأساس وتتغير قيمة كل من ثابت ميكليس والسرعة

القصوى، نادرا ما يحدث التثبيط غير التنافسي في التفاعل الإنزيمي الذي تساهم فيه المادة الأساس الواحدة فعلى سبيل المثال فأن التثبيط في التفاعل الإنزيمي الذي يساهم فيه إنزيم aryl sulphatase بوجود الهيدرازين وبما أن الإنزيم لا يرتبط مع المثبط إلا انه يربط المثبط مع معقد ES لمنع التفاعل الإنزيمي من إنتاج المنتوج الاعتيادي، انحدار مقلوب الرسم يبقى ثابت مع زيادة تركيز المثبط وهذا النوع من التثبيط غير الاعتيادي مع المادة الأساس المفردة إلا أن هذا التثبيط لا يحدث عند وجود مادتين أساسية للإنزيم ويعتبر المثبط اللاتنافسي جزءا من المثبط غير التنافسي العكسي إذ كلاهما يحتويان على معقد EIS والرسم البياني للاينويفر – برك بوجود المثبط غير التنافسي وغيابه

التثبيط العكسي المرتد Feedback inhibition: يسمى هذا النوع من التثبيط product inhibition– end وهو التثبيط الذي يلعب دوراً حيوياً في تنظيم العمليات الايضية في خلايا الكائنات الحية حيث يعمل الناتج النهائي كمثبط منظم لفعالية أحد الإنزيمات في سلسلة التفاعل في انحلال السكر glycolysis أو تخليق الأحماض الأمينية وهو ذلك المثبط الذي يرتبط مع الإنزيم في موقع غير موقع الارتباط مع المادة الأساس مما يؤدي إلى حدوث تغيرات تركيبية في جريئة الإنزيم مما يغير في خواص الارتباط مما يؤثر ذلك على ربط المادة الأساس أو يؤثر على خواص وسرعة التفاعل الإنزيمي الذي يليه، مثلا يثبط Thr-dehydratase بواسطة Ile عند تخليقه، وهو أحد الإنزيمات الذي تساهم في تخليق الأنسولين نفسه، وقد وجد بان المركبات الوسطية في العمليات الايضية الذي يطلق عليها المنظمات regulators أو المؤثرات effectors أو المعدلات Modulators أو المحورات modifiers، فأن تراكيب لا تشبه تركيب المادة الأساس لذلك ترتبط في مواقع مفصله عن المادة الأساس مما تؤثر على ارتباط المادة الأساس مما يجعل رسم ميكيليس – منتن ذا شكل حرف S، أن سرعة التفاعل لا تتأثر بالتراكيز الأخرى من المادة الأساس، فالسرعة القصوى لا تتغير وفي معظم الحالات لا تتوافق معادلة ميكليس – منتن مع التثبيط المنظم كما لا يمكن الحصول على خط مستقيم في رسم لاينويفر – برك، معظم الإنزيمات التي تثبط بفعل المثبط للناتج النهائي تتكون من عدة وحدات فرعية، لذلك فأن التثبيط يمكن أن يحدث نتيجة تداخلات بين الوحدات الفرعية فأنه يحدث فقد للسيطرة المنظمة وليست النشاط التحفيزي لبعض الإنزيمات بسبب فصل الوحدات الفرعية المكونة للإنزيم عن

بعضها البعض الآخر، لذلك يمكن تقسيم الإنزيمات الخاضعة للسيطرة المنظمة إلى إما المجموعة k-series أو المجموعة v-series، إنزيمات المجموعة k-series هي تلك الإنزيمات المنظمة الذي تتغير صفاتها الارتباطية للمادة الأساس بوجود المحور إلا أن ذلك لا يؤثر في السرعة القصوى للتفاعل الإنزيمي ولا يوجد لثابت ميكليس معنى حقيقي للإنزيم المنظم ففي هذه الحالة يستخدم مصطلح 0,5 S وهو عبارة عن التركيز اللازم للحصول على 50 % من تشبع الإنزيم ويختلف تركيز المادة الأساس اللازم لنصف تشبع الإنزيم باختلاف تركيز المحور، فالمادة الأساس ترتبط بالشكل R للإنزيم وليست الشكل T مما تعطي منحني ذي شكل حرف S وعند زيادة قيمة التعادل أو ثابت التنظيم L في المثبطات المنظمة يحصل انخفاض أو نقصان التشبع الجزئي للإنزيم بالمادة الأساس على تراكيز منخفضة أو معتدلة من المادة الأساس مما تقل قيمة السرعة الأولية للتفاعل بالمقابل تعمل المنشطات المنظمة على زيادة طبيعة منحني التفاعل لربط المادة الأساس وفي كلتا الحالتين تعتمد درجة التأثير المنظم على تركيز المحور مع ثبوت قيمة السرعة القصوى أما الإنزيمات للمجموعة v-series فهي عبارة عن تلك الإنزيمات التي تؤدي إلى تغير السرعة القصوى عند وجود المحور وبالمقابل لا تتغير قيمة ثابت ميكليس الظاهرية أو ما يطلق عليها S للمادة الأساس ويكون رسم ميكليس – منتن لربط المادة الأساس على تراكيز ثابتة من المحور ذي شكل متوازي إلا أن منحني الربط المحور نفسة ذو شكل حرف(S)sigmoidal أي انه يتم تثبيط نشاط الإنزيمات في المسالك الايضية بواسطة الناتج النهائي لذلك المسلك فلو تم تخليق D من A بواسطة سلسلة من الإنزيمات منE_1 إلى E_3، ففي تركيز مرتفع من D يثبط تحويل A إلى B وذلك بسبب قدرة الناتج النهائي D للارتباط مع E1 وتثبيط عمله ففي هذه الحالة يطلق على D مؤثر تنظيمي سالب negative allosteric effector أو مثبط الناتج النهائي feed back inhibitor للإنزيم E_1، فأن تثبيط الناتج النهائي للإنزيم E1 بواسطة D ينظم تخليق D حيث أن D يرتبط إلى الإنزيم الحساس في الموقع التنظيمي بعيد عن الموقع التحفيزي بالإنزيمات من نوع v-series باستعمال تركيز ثابت من الإنزيم والمحور وحركيات التثبيط التنظيمي ممكن أن يكون تنافسي، لا تنافسي أو تنافسي جزئي غير مزدوج ومختلط، المثبطات التنظيمية إن الناتج النهائي تستخدم الجزيئات الصغيرة قبل الجزيئات الكبيرة مثل الأحماض الأمينية قبل البروتينات والأحماض النووية قبل البروتينات النووية ومن أنواع التثبيط هي:

تثبيط تنظيمي تراكمي cumulative feed back inhibition.

تثبيط تنظيمي منسجم أو متكافئconcerted or multivalent inhibition.

تثبيط تنظيمي تعاوني cooperative feed back inhibition.

يمكن تثبيط نشاط aspartokinase عند وجود زيادة من الأحماض الأمينية مثل Thr, Ile, Met Lys كل على حدة ولكن يصبح الإنزيم يحتاج إلى تأثير منسجم لمثبطات متعددة لذلك يطلق عليه تثبيط تنظيمي منسجم أو متعدد التكافؤ، ويمكن تثبيط نشاط الإنزيم الذي يحفز التفاعل الأول من تخليق البيورين phosphoribosyl pyrophosphate amide transferase بواسطة نويات بيورينية متعددة ويمكن السيطرة على الإنزيم amide transferase بواسطة ADP, AMP.

التثبيط بفعل المادة الأساس substrate inhibition: تتميز التفاعلات الإنزيمية بأن السرعة للتفاعل الإنزيمي تزداد مع زيادة تركيز المادة الأساس أي عند استعمال تركيز معين من الإنزيم إلى أن تصل إلى السرعة القصوى ولكن عندما يزداد تركيز المادة الأساس إلى تركيز أعلى من التركيز الذي يعطي السرعة القصوى، فأن السرعة القصوى تبدأ بالانخفاض لان التراكيز العالية جدا من المادة الأساس تؤدي إلى تثبيط نفسها بدلا من تحويلها إلى ناتج نهائي ويمكن توضيح التأثير المثبط للمادة الأساس باستعمال تراكيز عالية منها على إنزيم السكسنيت النازع للهيدروجين succinate dehydrogenase حيث ترتبط المجموعتين الكربوكسيليتين للإنزيم مع المادة الأساس عند وجودها بتركيز مرتفع مما قد يحصل ارتباط جزيئتين من المادة الأساس بنفس جزيئة الإنزيم فلا يحصل تفاعل من دون تحلل إحدى جزيئتي المادة الأساس من الإنزيم ويحصل التثبيط بفعل المادة الأساس عندما ترتبط جزيئة واحدة من المادة الأساس إلى موقع على الإنزيم وترتبط جزيئة أخرى من المادة الأساس إلى موقع منفصل على الإنزيم مما يحصل تكوين معقد ذو طريق مسدود حيث تعمل الجزيئة الثانية من المادة الأساس كمثبط.

الفصل الثالث عشر

إنزيمات الهضم

إنزيمات الهضم Enzymes of Digestion

لا يمكن الاستفادة من المواد الغذائية التي نتناولها يوميا ما لم يتم هضمها إلى جزيئات صغيرة ذات أوزان جزئية صغيرة قابله للامتصاص فالتغيرات الكيماوية التي تحدث في عملية الهضم تتم عن طريق الإنزيمات المحللة للبروتينات والدهون والكربوهيدرات في القناة الهضمية يطلق عليها إنزيمات الهضم والتي تحدث بدأ من الفم.

1. **الهضم في تجويف الفم:** يحتوي تجويف الفم على اللعاب الذي يفرز بواسطة ثلاث أزواج من الغدد اللعابية ويحتوي اللعاب على إنزيم هضم النشأ آلاميليز amylase أو ما يسمى البتيالين ptyalin الذي يعمل على هضم النشأ في الإنسان والذي لا يوجد في الأبقار والحصان والقرود وهو يحول النشأ إلى سكر مالتوز ولا يحدث تحول النشأ كليا في الفم لقصر الفترة الزمنية لبقاء الغذاء في الفم لذلك يكتمل هضم النشأ والكلايكوجين بواسطة الاميليز البنكرياسي فالفا اميليز يحلل الرابطة الكلايكوسيدية في الموقع ألفا (1 ← 4) في العمق العشوائي داخل جريئة السكر المتعدد مثل النشأ والكلايكوجين والدكسترين لانتاج المالتوز والكلوكوز والسكريات الثلاثية إلا أن الإنزيم لا يحلل الرابطة الكلايكوسيدية من النوع ألفا (1← 4) المجاورة إلى روابط ألفا(1 ← 6) في النقاط الفرعية لسلسلة السكريات المتعددة، ولا يحصل هضم الدكسترينات المحدودة من ألفا الحاوية سلاسل فرعية ذو 8 وحدات من سكر الكلوكوز، جزيء الاميلوز من النشأ يتحلل كليا إلى مالتوز، maltotriose وكلوكوز، فالاميلوز خالي من ألفا (1← 6) الرابطة الكلايكوسيدية من نوع ألفا (1← 6) فأن إنزيم ألفا – اميليز لا يستطيع هضم السيليلوز الذي يحتوي رابطة كلايكوسيدية من نوع بيتا (1← 4) كما يحتوي اللعاب إنزيم لايزوزيم المحلل للبكتريا والذي يحلل الروابط الكلايكوسيدية بين N-acetylmuramic acid و N-acetyl-D-glucosamine في جزيئات peptidoglycan في جدار الخلايا البكتيرية مما يعمل على تحطيم البكتريا الكروية Cocci والعصوية Bacilli.
2. **الهضم في المعدة:** تفرز المعدة العصارة المعدية gastric juice من الخلايا الرئيسية والخلايا الجدارية المكونة للغشاء المخاطي للمعدة والذي تحتوي على الإنزيمات المحللة

للبروتين مثل الببسين والرنين والجيلاتينيز gelatinaser والإنزيم المحلل للبكتريا اللايزوزيم والإنزيم المحلل للدهن lipase المعدي، العصير المعدي للإنسان يحتوي ببسين من نوع، I ,II III وليست الرنين الذي لا يوجد في العصير المعدي للمعدة الرابعة للعجول الكبيرة مع أن العجول الرضيعة تفرز الرنين، يفرز الرنين والببسين بشكل غير فعال والذي تحفز في lumen المعدي.

أ. **إنزيم الببسين:** ينتج إنزيم الببسين من الخلايا الرئيسية لغشاء المعدة بشكل غير فعال الذي يطلق عليه pepsinogen الذي يتحول إلى الشكل الفعال pepsin بفعل حامض الهيدروكلوريك أو الببسين نفسة الذي يتحلل في المعدة إلى ببسين فعال ذو وزن جزيئي 34500

$$\text{Pepsinogen+HCl+pepsin} \downarrow \text{Pepsin + pepsin inhibitor + small peptide}$$

وببتيد غير فعال يسمى مثبط الببسين ذو وزن جزيئي 3242 مع خمسة ببتيدات صغيرة غير فعالة، يكون الإنزيم فعال في أس هيدروجيني 1,6 و 2,5 ويختلف الأس الهيدروجيني مع اختلاف المادة الأساس له وزيادة الأس الهيدروجيني في المعدة إلى 5 يحطم إنزيم الببسين ويعمل إنزيم الببسين على تحليل الأواصر الببتيدية بين الأحماض الأمينية من النوع اليساري L في داخل جزيئة البروتين لانتاج بروتيوزات proteoses وببتونات peptones وهو فعال على الاصرة الببتيدية الذي تربط مجموعة الكربوكسيل في الأحماض الأمينية العطرية مثل Phe, Tyr,Try مع مجموعة الأمين إما في الأحماض الأمينية ثنائية مجموعة الكربوكسيل مثل Asp Glu أو الأحماض الأمينية العطرية كما يستطيع الببسين أن يحلل الأواصر الببتيدية الذي ترتبط إلى مجاميع الكربوكسيل للأحماض الأمينية مثل Met, Leu كما يستطيع تحليل الكيزين المفسفر الذائب في الحليب لانتاج بارا- كيزين وبروتيوز يشبه بروتين الشرش حيث يترسب بارا- كيزين بشكل بارا- كيزينات الكالسيوم،

لذلك يستطيع الببسين من تخثر الحليب، حيث يتم هضم بارا - كيزين بواسطة الببسين إلى ببتونات.

ب. **إنزيم الرنين:** يفرز من الخلايا الرئيسية للمعدة ويعمل على تخثر الحليب لمنعة من المرور خلال القناة الهضمية مما يسهل ذلك من هدم بروتيناته من قبل الببسين الذي يعمل على تحطيم الأواصر الببتيدية وهو يفرز أيضا بشكل غير فعال هو prorennin الذي ينشط بواسطة حامض الهيدروكلوريك في rumen لتكوين إنزيم الرنين الفعال ذو الوزن الجزيئي 40000 ثم فصل ببتيد غير فعال خلال التنشيط وهو يعمل في أس هيدروجيني4 وهو يشبه الببسين في تخصصه والذي يحلل الأواصر الببتيدية المرتبطة مع الأحماض الأمينية العطرية اليسارية مما يحول كيزين الحليب إلى بارا- كيزين الذي يترسب بواسطة أيون الكالسيوم مما يسبب ذلك تخثر الحليب.

ج. **إنزيم gastriosin:** يفرز هذا الإنزيم في العصير المعوي للإنسان بشكل غير فعال وبعد التنشيط يعمل بشكل proteinase في الوسط الحامضي للمعدة ذو أس هيدروجيني من 3 – 4.

د. **إنزيم gelatinasae:** يحلل هذا الإنزيم الجيلاتين في الوسط الحامضي لتكوين ببتيدات متعددة.

هـ. **إنزيم اللايزوزيم:** يعمل هذا الإنزيم على تحطيم البكتريا الكروية والعصوية بواسطة تحليل الروابط الكلايكوسيدية في الكربوهيدرات لجدران الخلايا البكتيرية.

و. **إنزيم اللايبيز المعدي:** يوجد الإنزيم في معدة الإنسان وهو يعمل على تحلل ثلاثي أسيل كلسيرول إلى أحادي وثنائي أسيل كلسيرول ثم إلى كلسيرول وأحماض دهنية حرة وهو يحلل ثلاثي أسيل كلسيرول ذو السلاسل الدهنية القصيرة والمتوسطة والذي يكون مصدرها الحليب وبعد التحليل تصبح جاهزة للامتصاص.

3. **الهضم في الأمعاء:** عندما تتحول محتويات المعدة على شكل مستحلب كثيف متجانس يعرف الكيموس ينتقل إلى الاثني عشري فتنصب عليه عصارتا البنكرياس pancreatic juice والصفراء bile juice مما تحوله من المحيط الحامضي إلى المحيط

المتعادل المائل قليلا للقاعدية والتعادل ضروري لإنزيمات البنكرياس والأمعاء الذي تؤدي وظيفتها بأعلى فعاليتها.

أولا:- العصير البنكرياسي: من مكوناته الرئيسية هي الإنزيمات التي تفرز بواسطة الخلايا البنكرياسية وهي:

1. الإنزيمات المحللة للبروتينات مثل التربسين، الكيموتربسين، كاربوكسي ببتيديز، ايلاستيز وكولاجينيز.
2. الإنزيمات المحللة للدهون مثل phospholipase, steapsin ,cholesterol esterase.
3. الإنزيمات الهاضمة للأحماض النووية مثل deoxyribonuclease , ribonuclease.
4. الإنزيمات المحللة للكربوهيدرات مثل ألفا اميليز amylase أو ما يسمى amylopsin.

1) **إنزيم التربسين:** يفرز بشكل غير فعال هو تربسينوجين الذي يتحول إلى الشكل الفعال وهو التربسين بواسطة إزاحة ببتيد سداسي من النهاية الأمينية لجزيئه التربسينوجين بفعل entrokinase الذي يفرز من الغشاء المخاطي للأمعاء الدقيقة ويعمل الإنزيم على تحليل الأواصر الببتيدية لخليط الببتيدات الصغيرة في الأمعاء الدقيقة والذي تتضمن مجاميع كاربونيك لكل من Lys, Arg وقد يحصل تحويل الإنزيم غير الفعال إلى الإنزيم الفعال بواسطة التربسين نفسة في أس هيدروجيني 7.9 ويساعد أيون الكالسيوم في التحفيز حيث يعود التربسين إلى مجموعة Ser protease الذي يملك سيرين في الموقع الفعال للإنزيم ويعمل الإنزيم في الوسط القلوي وذو ثابت ميكليس منخفض وذو نشاط تحليلي للبروتينات.

1. يحلل البروتينات الأساسية والبروتيوزات والببتونات إلى ببتيدات متعددة وثلاثية وثنائية عن طريق فصل الأواصر الببتيدية المرتبطة مع مجاميع الكربونيل في الأحماض الأمينية الأساسية مثل Arg, Lys.

2. تعمل على تخثر الدم بواسطة تحليل الفيبرنيوجين إلى فيبرين.
3. يعمل على تحليل الاصرة الببتيدية المتكونة بواسطة مجموعة الكربونيل للحامض الأميني Lys في التربسينوجين مما يحوله إلى تربسين وببتيد سداسي.
4. يعمل على تحليل الاصرة الببتيدية المرتبطة إلى مجموعة كربونيل في الحامض الأميني Arg في الكيموتربسينوجين مما يحوله إلى chymotrypsin فعال.
5. يعمل على تنشيط مولد الايلاستيز pro-elastase مما يحوله إلى elastase بواسطة تحليل الاصرة الببتيدية (الشكل –92)، عملة على الكيزين ضعيف مقارنة مع الكيموتربسين ولا يستطيع تحليل الاصرة الببتيدية المرتبطة إلى البرولين.

2) **إنزيم الكيموتربسين:** وهو يفرز بشكل غير فعال هو الكيموتربسينوجين الذي يتحول إلى شكل فعال هو كيموتربسين بواسطة التربسين أو كليا بواسطة الكيموتربسين نفسة خلال التنشيط مما يحصل تحرير ببتيدات ثنائية غير فعالة بمرحلتين أي معقد سيرين – ارجنين أو معقد ثريونين – اسبارجين مما ينتج ألفا كيموتربسين الذي يحلل الأواصر الببتيدية المرتبطة مع مجاميع الكربونيل للأحماض الأمينية العطرية مثل Try, Tyr أو Phe، كما يستطيع مهاجمة الأواصر الببتيدية المرتبطة مع Met His, Leu, Asn، كما يحلل الكيموتربسين بروتينات الحليب وخاصة الكيزينات إلى بارا- كيزين وبروتيوز يعرف بروتين الشرش، الأس الهيدروجيني الأمثل له هو 7.8، هناك ثلاثة أنواع غير فعالة من الكيموتربسينوجين هي A, B, C الذي توجد في العصير البنكرياسي للفقريات، يكون ثابت ميكليس – منتن له مرتفع وليس له القدرة على تخثر الدم، وهو يعود إلى Ser proteases حيث يحتوي على سيرين في الموقع الفعال.

3) **إنزيم carboxy peptidases:** يفرز الإنزيم بشكل غير فعال هو procarboxypeptidase مما يتحول إلى الشكل الفعال بوجود إنزيم التربسين، فأن carboxy peptidase A يفرز بشكل غير فعال هو procarboxypeptidase A الذي يملك ثلاث وحدات فرعية الذي يتحلل إلى وحدتين فرعيتين ثم إلى proteinase، كلاهما تحفز بواسطة التربسين، فأن التربسين و proteinase المتكون من الوحدتين الفرعيتين تتغير إلى وحدة فرعية

واحـــدة مــــن procarboxy peptidase ثـــم إلى الإنـــزيم الفعـــال carboxypeptidase A الذي هو exopeptidase والذي لا تستطيع أن تعمـل علـى الأواصـر الببتيديـة في داخـل جزيئـة الـبروتين فهـو يحلـل الأواصـر الببتيـدية الطرفية المرتبطة إلى الأحماض الأمينية الطرفية الذي تحمل مجموعة كربوكسيل حرة مثل Phe, Tyr Tryوهو يعمل على تحريـر الأحمـاض الأمينيـة الطرفيـة بشـكل حـر ممـا يقصر السلسلة الببتيدية بمعدل حامض أميني واحـد بينمـا carboxypeptidase هـو أحـد الإنزيمـات البنكرياسـية الـذي يعـود إلى exopeptidase الـذي يشـبه carboxypeptidase A ماعـدا أن الشـكل B يحلـل الأواصـر الببتيديـة الطرفيـة المرتبطة إلى الأحماض الأمينية الطرفية القاعدية مثل Lys, Arg الذي تحمـل مجـاميع كربوكسيل حرة من نوع ألفا وكلاهما غير فعاله في تحليـل الببتيـدات الثنائيـة وهـي ذو أس هيدروجيني امثل هو 7,5.

4) إنزيم **Elastase**: يعتبر إنزيم ايلاستيز من Ser protease الذي يفرز بشكل غير فعال هو proelastase الذي يتحلل بواسطة التربسين لانتاج الشكل الفعال ويعمـل على الأواصر الببتيدية المرتبطـة إلى مجـاميع الكربونيـل في الأحمـاض الأمينيـة الاليفاتيـة المتعادلة ويعمل على هضم أليافـ الأنسجة الصفراء والبيضاء لانتاج الببتيدات.

5) إنزيم**amylopsin**: وهو ما يسمى amylase البنكرياس وهـو ألفـا – اميليـز مـع أس هيدروجيني امثل هو 7,1 وهو يشبه اميليز اللعاب فهو يحتـاج إلى أيـون الكلوريـد لنشاطه وهو يحلل الروابط الكلايكوسـيدية من نوع ألفا الـذي يقـع في داخـل السلسـلة الببتيدية المتعددة إلا انه يبعده عن الروابط الكلايكوسـيدية من نوع ألفا(1← 6) في النشـأ والكلايكـوجين والدكسـترينات فهـو لا يسـتطيع أن يعمـل علـى الـروابط الكلايكوسيدية من نوع ألفـا (1← 6) والفـا (1←4) المجـاورة إلـى ألفـا(1←6) وروابط بيتـا (1← 4)، النـاتج النهـائي لعمـل الإنـزيم يشـبه عمـل ألفـا اميليـز مثـل المالتوز، الكلوكـوز، maltotriose من الدكسترينات والاميلوز الناتجة عن النشـأ أو الكلوكوز، المالتـوز وmaltotriose والدكسترينات المحددة من نوع ألفا الناتجـة عـن الكلايكوجين والاميلوبكتين وهـذا الإنزيم لا يحلل السكريات الثنائية ولا السيليلوز.

6) إنزيم **steapsin**: وهو مـا يسمى إنزيم اللايبيز البنكرياسي ذو أس هيدروجيني امثل هو 6 والذي يطلق عليه esterase، تساعد أملاح الصـفراء علـى ارتبـاط الإنـزيم مـع

جـزيئتين مـن البروتينـات الصــغيرة الـذي تسـمى co-lipase ذو وزن جزيئـي 10000 في الأمعـاء، إن ارتبـاط lipase مـع co-lipase يزيـد مـن نشـاط إنـزيم اللايبيز في الأس الهيدروجيني للأمعاء وكذلك يحمي الإنزيم من تأثيرات التثبيط لاملاح الصفراء، يمكن أن تعمل إنزيمات lipases الذائبة في الماء على سطح حبيبات الدهن غير الذائبة في الماء وتساعد أملاح الصفراء في نشاط اللايبيز بواسطة استحلاب الدهون إلى قطيرات دقيقة مما تزيد المساحة السطحية لتلك القطيرات، يحلل الإنزيم روابط الاستر الأولية بين الأحماض الدهنية ومجاميع الكحول الأولية في الموقع الثاني أو بيتا من الكلسيرول، يهضم كذلك الكلسيريدات الثلاثية إلى حامض دهني و 2,1- ثنائي الكلسيريد(ألفا-، بيتا - ثنائي الكلسيريد) وتحليل الكلسيريدات الثنائية إلى حامض دهني و 2- أحادي الكلسيريد أو بيتا - أحادي الكلسيريد، يوجد أيون الكالسيوم في الأمعاء، فأن الأحماض الدهنية الحرة تترسب بشكل صابون الكالسيوم غير الذائب مما يثبط ذلك عمل إنزيم اللايبيز، فالكالسيوم يسهل من عمل الإنزيم.

7) إنـزيم **Phosphorylase A**: وهـو مـا يطلـق عليـه lecithinase الـذي يفـرز بشكل غير فعال الذي يتحول إلى الشكل الفعال بواسطة تحلل الاصرة الببتيدية بمساعدة التربسين وبوجود أملاح الصفراء وأيون الكالسيوم، فأن الفوسفولايبيز الفعال يحلل رابطة الاستر بين الحامض الدهني ومجموعة الكحول الثانوية في الموقع الثاني من الكلسيرول في الفوسفولبيدات مما يحرر حامض دهني ويعطي لايزوفوسفولبيد مثل تكوين لايزوليسثين من اللسثين.

8) إنزيم **Cholesterol esterase**: يحتاج الإنزيم إلى أملاح الصفراء لتحفيزة وهو يعمل على تحليل رابطة الاستر التي تربط الكولسترول مع الحامض الدهني مما يحرر الكولسترول وانتاج أحماض دهنية حرة أو رابطة الاستر في Vitamin A esters لتحرير فيتامين A أو استرات الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة أو رابطة الاستر في الكلسيريدات الأحادية في الموقع الثاني من الكلسيرول لانتاج أحماض دهنية حرة وكلسيرول.

9) إنزيمات **nucleases**: في الأس الهيدروجيني المتعادل وبوجود أيون المغنيسيوم أو المنغنيز، فأن deoxy ribonuclease-I في العصير البنكرياسي له القدرة أن يحلل روابط الفوسفيت ثنائية الاستر بين البيورين والبيريميدين نيوكليوتيدات في

DNA لتحرير deoxy ribonucleoside-5‾-phosphate, oligodeoxyribonucleotides الذي تتضمن سايتوسين – سايتوسين ثنائي نيوكلوتيد وسايتوسين – أدنين ثنائي نيوكلوتيد مع مجاميع فوسفيت حرة في الموقع الخامس وهذا الإنزيم في البنكرياس البقري من نوع الإنزيمات متعددة السلسلة الببتيدية ذات وزن جزيئي 61500 وهذا النوع يسمى type a وهو endonuclease a الذي يحفز تشقق فقط روابط C-3‾-P الذي تقع داخل سلسلة الحامض النووي مما يؤدي ذلك إلى تكوين مجموعة فوسفيت حرة في الموقع الخامس في سكر الرايبوز، إنزيم الرايبونيوكليز البنكرياسي الذي يعود إلى الإنزيمات أحادية السلسلة الببتيدية ذو الوزن الجزيئي 13700 يتركب من 124 حامض أميني هو من نوع endonuclease b أو type b الذي يحلل الروابط C-5‾-P في عمق سلسلة RNA حيث أن نفس مجموعة الفوسفيت ترتبط إلى ذرة الكربون الثالثة من جزيئة البيرميديين نيوكليوتيد الذي يعمل على RNA لانتاج oligoribonucleotides، تملك مجاميع الفوسفيت في ذرة الكربون الثالثة بشكل حر، الرايبونيوكليز البنكرياسي لا يستطيع تحليل رابطة C-5‾-P في DNA,RNA، أي إن الرايبونيوكليز ومختصرة RNAase يهاجم الحامض النووي الرايبوزي مكونا رايبونيوكليوتيدات بينما الرايبونيوكليز منزوع الأوكسجين DNAase يهاجم الحامض النووي الرايبوزي منزوع الأوكسجين منتجا رايبونيوكليوتيدات منزوعة الأوكسجين.

ثانيا: العصير المعوي Intestinal juice: يفرز خليط من العصير بواسطة تجويف غدة ليبركوهن Leiberkuhn – برونير Brunner في مناطق مختلفة من الأمعاء الدقيقة والذي يحتوي على الإنزيمات المحللة للبروتين enterokinase (endopeptidase) , dipeptidases , tripeptidases , aminopeptidases , prolidase والإنزيمات المحللة للكربوهيدرات مثل maltase, lactase sucrase, isomaltase amylase, والإنزيمات المحللة للدهون esterases مثل lipase, phosohatase lysolecithinase, lecithinase والإنزيمات الهاضمة للأحماض النووية مثل nucleotidase, polynucleotidase, nucleosidase وبعض

الإنزيمات الأخرى مثل maltase,sucrase, nucleosidases الذي تبقى داخل الخلايا الطلائية في المخاط المعوي، قلوية العصير المعوي بسبب البيكربونات، ومن أهم تلك الإنزيمات هي:

1. إنزيم **enterokinase**: يوجد enterokinase أو ما يسمى enteropeptidase في غشاء الخلايا الطلائية لمخاط الاثني عشري والذي يفرز في الاثني عشري وهو يحلل الاصرة الببتيدية المرتبطة إلى الحامض الأميني Lys في إنزيم التربسينوجين البنكرياسي مما يفصل ببتيد سداسي غير فعال من نهاية الطرف النيتروجيني له مع إنتاج تربسين فعال ويساهم الكالسيوم الأيون في تنشيط الإنزيم كما تساعد أيضا أملاح الصفراء بواسطة تحرير الإنزيم من غشاء الخلايا الطلائية في المخاط المعوي.
2. إنزيمات **aminopeptidases**: هذه الإنزيمات تحلل الاصرة الببتيدية الطرفية المرتبطة إلى الحامض الأميني النهائي الذي يحمل مجموعة أمينية حرة من نوع ألفا، حيث يفصل الحامض الأميني النهائي من النهاية الطرفية النتروجينية للببتيد مما يحول الببتيد خطوة إلى ببتيد ثلاثي، Leu- aminopeptidase يحلل الاصرة الببتيدية الطرفية النتروجينية إلى حامض أميني L- Leu كحامض أميني نهائي بوجود أيونات المغنيسيوم والزنك أو المنغنيز لتساعد في تكوين معقد تناسقي للمادة الأساس – الإنزيم فأن للإنزيم القدرة أن يحلل الأواصر الببتيدية المرتبطة مع الأحماض الأمينية الطرفية النتروجينية لكن ليست الأواصر الببتيدية المرتبطة مع البرولين وهذا الإنزيم لا يحلل الببتيدات الثنائية.
3. إنزيم**prolidase**: وهو إنزيم من نوع exopeptidase الذي يحلل الاصرة الببتيدية الطرفية المرتبطة إلى البرولين كحامض أميني نهائي مما يساعد على تحرير البرولين وهو أيضا يحلل ببتيدات البرولين في الكولاجين.
4. الببتيديزات الثنائية والثلاثية**di- and tripeptidases**: هذه الإنزيمات تحلل الببتيدات إما على غشاء microvillus للخلايا الطلائية المعوية أو في داخل تلك الخلايا بعد امتصاص الببتيد، tripeptidase ينتج ببتيد ثنائي وحامض أميني حر من الببتيد الثلاثي بينما dipeptidases تحول الببتيد الثلاثي إلى جزيئتين من

الأحماض الأمينية، ثنائي الببتيد glycyl-glycine الذي يحتاج أيونات المنغنيز، الكوبالت أو الزنك كعامل مرافق ليحلل الببتيد الثنائي إلى جزيئتين من الكلايسين

5. **إنزيمات تحلل الكربوهيدرات carbohydrates**: وتشمل الاميليز الذي يحلل الروابط الكلايكوسيدية من نوع ألفا (1⟵ 4) في السكريات المتعددة والسكريات المتعددة قصيرة السلسلة polysaccharides, oligosaccharides مما تحرر كلوكوز حر مع اختزال سلسلة الكربوهيدرات ثم Isomaltase الذي يحلل الروابط الكلايكوسيدية في الموقع ألفا (1⟵ 6) ثم تحرير دكسترين محدد من نوع ألفا في نقاط التفرع وانتاج مالتوز وسكر الكلوكوز الحر، المالتيز الذي يحلل الرابطة الكلايكوسيدية من نوع ألفا (1⟵ 4) بين جزيئات ألفا – الكلوكوز في المالتوز مما يحرر جزيئين من ألفا – كلوكوز وهناك خمسة أنواع من إنزيم المالتيز في الخلايا الطلائية المعوية أحدهما هو malatase V والذي يعمل كإنزيمisomalatase بالإضافة إلى ذلك يعمل على المالتوز، sucrase أو ما يطلق عليه fructofuranosidase الذي يحلل السكروز إلى نسب جزئية متساوية من الكلوكوز والفركتوز، نشاط السكريز بسبب اثنين من إنزيمات المالتيز هي maltase III, maltase IV، اللاكتيز أو ما يطلق عليه إنزيم β-galactosidase الذي يحلل الرابطة الكلايكوسيدية من نوع بيتا (1⟵4) بين الكالاكتوز والكلوكوز في سكر اللاكتوز مما يؤدي ذلك إلى تحريرها ويمكن وجود ثلاث أنواع من بيتا – كالاكتوسيديزات في الخلايا المخاطية المعوية وهناك عدد من الإنزيمات المحللة للكربوهيدرات والذي تساهم في نقل السكريات الثنائية إلى الخلايا أو تحليلها خلال أو بعد الامتصاص، عمل إنزيم سكر اللاكتيز أبطأ من السكريز والمالتيز.

6. **إنزيم اللايبيز المعوي**: عمل إنزيم اللايبيز المعوي يشبه عمل Steapsin، الكلسيريد الأحادي 2-monoglycerides المنتج بواسطة فعل إنزيم اللايبيز لا يمكن تحليله بواسطة اللايبيزات فهو أما يمتص أو يتحول إلى 1- monoglycerides أو α-monoglycerides بواسطة isomerases ومن ثم يتحلل بواسطة lipases إلى أحماض دهنية وكلسيرول، اللايبيز المعوي يوجد داخل الخلايا المعوية لذلك يعمل على تحليلها عندما تمتص بشكل ألفا، لبأ حليب الأم يحتوي إنزيم اللايبيز الذي يصل إلى أمعاء الطفل الرضيع بدون أي تغير في صفاته

الفيزياوية والكيمياوية بواسطة حموضة العصير المعدي، في الأمعاء يعمل الإنزيم على تحليل كميات من دهن الحليب بوجود أملاح الصفراء.

7. **إنزيمات الفوسفاتيزات phosphatases**: وهي الإنزيمات التي تعود إلى الاستيريزات مثل الفوسفاتيز القاعدي للخلية المخاطية والذي يحلل استرات الفوسفاتيز العضوية مثل كلوكوز – 6- فوسفيت مع تحرير فوسفيت عضوية وإنزيم نيوكلوتيد الفوسفاتيزات الذي تحلل الروابط الاستيرية في النيوكليوتيدات لانتاج نيوكلوسيدات وفوسفيت غير عضوي، الفوسفاتيديل كولينيز أو ما يسمى lecithinase المعوي الذي يحلل الفوسفاتيديل كولين (lecithine) وتحرير أحماض دهنية حرة، وبعض الاستيريزات الذي تحلل كلسريل فوسفورريل كولين بفعل lecithinase علاً اللايزوليسيثين.

8. **النيوكليوتيزات nucleotidases والنيوكليوسيديزات nucleosidases**: يتم تحليل الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئي المنخفض والنيوكليوتيدات المتعددة بواسطة phosphodiesterases أو polynucleotidases الذي هي exonucleases والذي تعمل على تحليل الأواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر الذي ترتبط إلى النيوكلوسيدات الطرفية لسلسلة النيوكلوتيدية لانتاج نيوكلوتيدات أحادية الذي يتم تحليلها بواسطةnucleotidases أو nucleotide phosphatases إلى فوسفيت غير عضوي ونيوكلوسيدات، يمكن امتصاص النيوكلوسيدات عندما تتحلل إلى بيورينات وبيريميدينات وسكر خماسي فوسفاتي في الخلايا المخاطية المعوية بوجود nucleoside phosphorylases nucleosidases) وفوسفيت غير عضوي ومن المحتمل أن تعمل اثنان من إنزيمات مختلفة من phosphorylases nucleoside على البيورين والبيريميدين نيوكلوسيدات على التوالي.

الفصل الرابع عشر

إنزيمات
الأكسدة
البيولوجية

إنزيمات الأكسدة البيولوجية Biological oxidation enzymes

يطلق على جميع الإنزيمات الذي تشارك في العمليات التاكسدية في الخلايا الحية إنزيمات الأكسدة والاختزال oxidoreductase ويصاحب تلك التفاعلات تحرير طاقة حيث تكون الطاقة المتحررة بشكل حرارة وبما أن الأنظمة البيولوجية هي أساسا انظمة حرارية لذلك لا يمكن الاستفادة من الحرارة الناتجة للقيام بالعمليات الايضية التي تحتاج إلى طاقة والوسط الأساس للطاقة العالية في الخلية الحية هو ادينوسين ثلاثي الفوسفيت ATP وبما أن الأكسدة تعرف كيماويا بفقدان الإلكترونات في حين أن الاختزال هو كسب الإلكترونات لذلك فأن عملية الأكسدة تصاحبها دائما عملية اختزال كمستقبل للالكترونات حيث تساهم الإنزيمات بدور المنشط أو الوسيط في التفاعلات التي تحدث في الخلية الحية لذلك يمكن تقسيم الإنزيمات التي تساهم في عمليات الأكسدة والاختزال في الخلايا الحية إلى خمسة مجاميع رئيسية هي:

أولا: الاوكسيديزات Oxidases: هي الإنزيمات التي تحفز إزالة الهيدروجين من المادة الأساس وذلك باستعمال الأوكسجين فقط كمستقبل للهيدروجين وهذه الإنزيمات تحتوي نحاس وبعضها يحتوي على الحديد أيضا، تعمل على أكسدة المادة الأساس بواسطة نقل أيون الهيدروجين من المادة الأساس إلى الأوكسجين الجزيئي لانتاج الماء ما عدا monoamine oxidase, Uricase الذي تكون بيرو كسيد الهيدروجين حيث يتم استلام الإلكترون من المادة الأساس بواسطة الأيون المعدني في الإنزيم ويهبة إلى جزيئة الأوكسجين مما يليه ارتباط أيون الهيدروجين مع الأوكسجين الجزيئي لتكوين الماء ومن الأمثلة هي cytochrome oxidase, ascorbate oxidase ,urate oxidase .phenolase , monoamine oxidase

1. **-Cytochrome oxidase:** هو بروتين دموي ينتشر على نطاق واسع في الأنسجة الحيوانية والنباتية وهو يكون المركب الطرفي في سلسلة الحوامل التنفسية الموجودة في المايتوكوندريا المسؤولة عن انتقال الإلكترونات الناتجة عن أكسدة المادة الأساس بواسطة dehydrogenases إلى المستقبل النهائي والذي هو الأوكسجين، يمكن تسمم هذا الإنزيم بواسطة أول اوكسيد الكربون في الظلام فقط وكذلك التسمم

بواسطة السيانيد وكبريتيد الهيدروجين، هـذا الإنزيم يشبه إنزيم التنفس الذي يعرف cytochrome a_3 وكـل جزيئـة مـن cytochrome a و cytochrome a_3 تحتوي على مجموعتين من الهيم وتتذبذب ذرة الحديد بين الحديـدوز والحديـديك خـلال عمليات الأكسدة والاختزال كما يمكن وجود ذرتين من النحاس كل واحـدة تـرتبط مـع وحـدة هـيم والسـايتوكروم الـذي يـرتبط إلى أول اوكسـيد الكربـون يطلـق عليـه cytochrome a_3.

2. الفينوليزات phenolases: هـذه الإنزيمات تشـمل Tyrosinase, catechol oxidase, poly phenol oxidase وهي من الإنزيمات الحاوية على النحاس وهي متخصصة لأكثر من نوع واحـد مـن التفاعلات ولها القدرة أن تحول الفينولات الأحاديـة والفينـولات الثنائيـة إلى كوينيونـات quinones وهنـاك إنزيمـات أخـرى حاويـة علـى النحاس هي laccase الذي يحول بارا- هيدروكوينيون إلى بارا- كوينيون وهو ينتشر على نطاق واسع في الأنسجة الحيوانية والنباتيـة، إنـزيم ascorbic acid oxidase الـذي يوجـد فقـط في النباتـات كمـا يمكـن وجـود النحـاس في عـدد آخـر مـن الإنزيمـات هـــو uricase الـذي يحفـز أكسـدة حـامض اليوريـك إلى الالنتـوين allantoin و monoamine oxidase الـذي يؤكسـد الابنفـرين والـتيرامين في المايتوكونـدريا ويعمل أيضا إلى تحطيم catecholamine في السايتوسول.

ثانيا: إنزيمات النازعة للهيدروجين الهوائية aerobic dehydrogenases:

وهي الإنزيمات التي تحفز إزالة الهيدروجين من المادة الأساس ولكن تتميز عـن الاوكسـيديزات بأنهـا تسـتعمل أمـا أوكسـجين أو مـادة أسـاس صـناعية مثـل المثـيلين الأزرق كمسـتقبل للهيدروجين وهي تنتج بيروكسيد الهيدروجين كنـاتج نهـائي بـدلا مـن المـاء وهـي بروتينـات فلافينية تحتوي FMN و FAD والذي تختلف في الفتها تجاه الإنزيمات بعضـها يـرتبط بقـوة مع المجموعة الرابطة والبعض الآخر ارتباطها ضعيف وعدد من هـذه الإنزيمـات يحتـوي علـى معادن تكون أساسية لوظيفة الإنزيم، الحلقة isoalloxazine في الجزء الفلافـيني للإنـزيم تختزل عندما تستلم إلكترونات وأيون الهيدروجين (بروتون) من المـادة الأسـاس الـذي تتـم أكسدتها ثم إعادة أكسدة المجموعة الرابطة الفلافينيـة عنـدما تهـب هيـدروجين ايونـي إلى جزيئة الأوكسجين لتكوين بيروكسيد الهيدروجين كناتج نهائي وهذه الإنزيمات يمكن أن تهب

أيونات هيدروجين إلى بعض المواد الأساس الصناعية المستقبلة للإلكترونات مثل المثيلين الأزرق (MB)، الإنزيمات التي تعود إلى هذه المجموعة هي: glucose oxidase, D-amino acid xanthine dehydrogenase , oxidase ,D-amino acid ،aldehyde dehydrogenase,glucose oxidase dehydrogenase, بعض تلك الإنزيمات مثل xanthine oxidase يحتوي على الحديد والموليبيدم في مجموعتها الرابطة، هذه المعادن تلعب دورا مهما في تبادل الإلكترونات بواسطة مجموعة الفلافين.

أ. إنزيم **Amino acid dehydrogenases**: وهو ما يسمى D-amino acid oxidase وهو إنزيم مرتبط مع FAD ويوجد في الكبد والكلى وهو يحفز تفاعلات نزع مجموعة الأمين التاكسدية للأشكال (-D) غير الطبيعية من الأحماض الأمينية مثل الكلايسين و D-lactate و L-proline وهو إنزيم لا يكون متخصص كليا للأحماض الأمينية من نوع D بينما L-amino acid dehydrogenase أو ما يسمى L-amino acid oxidase الذي يرتبط مع FMN الذي يوجد في الكلى مع تخصص عام لنزع مجموعة الأمين التاكسدية للأحماض الأمينية من نوع يساري الذي تحدث طبيعيا وهو غير فعال للكلايسين والأحماض الأمينية الحاوية كبريت ذو التناظر L.

ب. إنزيم **xanthine dehydrogenase**: وهو ما يطلق عليه xanthine oxidase الذي يوجد على نطاق واسع في الحليب والأمعاء الدقيقة والكلى والكبد وهو يحتوي موليبيدم ويلعب دورا مهما في تحويل القواعد البيورينية إلى حامض اليوريك والذي يكون مهم وخاصة في كبد وكلى الطيور التي تفرز حامض اليوريك كناتج نهائي نتروجيني أساسي ليس فقط لايض البيورينات فحسب، بل وكذلك لايض البروتيـن والأحماض الأمينية، xanthine dehydrogenase هو بروتين فلافيني معدني يحتوي FAD, Mo, S, Fe غير هيمي يعمل على نقل أيون الهيدروجين من الهايبوزانثين إلى الزانثين ثم إلى NAD^+ وكذلك يحفز أكسدة الالديهايدات.

ج. إنزيم **aldehyde dehydrogenase**: وهو ما يطلق عليه aldehyde oxidase وهو إنزيم مرتبط مع FAD وهو يوجد في الكبد للبائن وهو بروتين

فلافيني معدني يحتوي موليبدنم وحديد غير هيمي (لا دموي) ويعمل على الالديهايدات والمواد الأساس الحلقية النتروجين غير المتجانسة.

د. إنزيم glucose oxidase: وهو يعتبر من الإنزيمات المهمة في حساب الكلوكوز وهو مرتبط مع FAD ويحضر من الفطريات وهو ذو وزن جزيئي 154000 وكل الإنزيمات التي تعود إلى الإنزيمات النازعة للهيدروجين الهوائية تحتوي على جزيئتين من الفلافين نيوكليوتيد لكل مول واحد وتحتوي البروتينات الفلافينية المعدنية على عدد ثابت من ذرات الفلز في الجزيئة الواحدة وهي المولبيدنم: حديد بنسبة 2:8، آلية الأكسدة والاختزال لهذه الإنزيمات تكون معقدة حيث تختلف آلية العمل لكل إنزيم مع احتمال وجود الجذور الحرة وان إمكانية اختزال حلقة الايزواللوكسازين على مرحلتين مرورا بالجذر الحر (شبيه الكوينيون) كمادة وسطية.

ثالثا: الإنزيمات النازعة للهيدروجين اللا هوائية: وهي إنزيمات تحفز إزالة الهيدروجين من المادة الأساس إلا إنها ليست لها القدرة لاستخدام الأوكسجين كمستقبل للهيدروجين وهو يشمل عدد كبير من الإنزيمات والذي لها وظيفتين أساسية هي:

أ. نقل الهيدروجين من المادة الأساس إلى الأخرى في تفاعلات الأكسدة والاختزال المزدوجة الذي لا تتضمن السلسلة التنفسية وهي إنزيمات متخصصة للمادة الأساس لكن غالبا ما تستفاد من نفس المرافق الإنزيمي أو حامل الهيدروجين.

ب. نقل الإلكترون من المادة الأساس إلى الأوكسجين.

وتقسم هذه الإنزيمات حسب المرافقات الإنزيمية إلى:

1. **إنزيمات نازعة للهيدروجين الذي تعتمد على** NAD^+, $NADP^+$: وهناك عدد كبير من الإنزيمات النازعة للهيدروجين والذي ترتبط إلى نيكوتين امايد أدنين ثنائي نيوكليوتيد DNA أو إلى نيكوتين امايد أدنين ثنائي نيوكليوتيد فوسفيت $NADP^+$ كمرافقات إنزيمية والذي تختزل بواسطة مادة أساس معينه للإنزيم والذي تعاد أكسدتها بواسطة مستقبل إلكترون مناسب والذي ممكن أن يكون تفككها حر وعكسي من بروتين الإنزيم، النيكوتين امايد نيوكليوتيدات تخلق من

النياسين ومن المعروف وجود تخصص مجسم حول الموقع الرابع من النيكوتين امايد عندما تختزل بواسطة المادة الأساس AH_2 حيث يتم نزع ذرة هيدروجين واحدة من المادة الأساس كنوية هيدروجين مع اثنين من الإلكترونات ويتم نقل البروتون (H^-) إلى الموقع الرابع، حيث تتصل في الموقع أما A أو B طبقا للتخصص أما الهيدروجين المتبقي من الزوج الهيدروجيني المنزوع من المادة الأساس يبقى حرا بشكل هيدروجين، يمكن القول بان الإنزيم النازع للهيدروجين المرتبط مع NAD^+ يحفز تفاعلات الأكسدة والاختزال في المسالك التاكسدية في العمليات الايضية وخاصة في الخلال السكر أو في دورة حامض الستريك أو في السلسلة التنفسية في المايتوكوندريا بينما الإنزيمات النازعة للهيدروجين المرتبطة مع $NADP^+$ فهي توجد في التخليق الاختزالي في مسالك خارج المايتوكوندريا في تخليق الأحماض الدهنية وتخليق الستيرويدات وكذلك توجد كمرافقات إنزيمية للإنزيمات النازعة للهيدروجين الذي تحوله إلى السكر السداسي أحادي الفوسفيت، بعض الإنزيمات المعتمدة على المرافق الإنزيمي النيكوتين امايد تحتوي زنك كما هو الحال أيضا في الإنزيم النازع للهيدروجين الكحولي في الكبد وإنزيم لكسيرالديهايد -3 – فوسفيت النازع للهيدروجين في العضلات الهيكلية، إلا أن أيون الزنك لا يلعب أي دور في عمليتي الأكسدة والاختزال.

2. **الإنزيمات النازعة للهيدروجين المعتمدة على FAD, FMN**: ترتبط المجاميع الفلافينية مع الإنزيمات بطريقة تشبه الإنزيمات النازعة للهيدروجين الهوائية والذي ترتبط بقوة اكبر إلى apoprotein في المرافق الإنزيمي نيكوتين امايد، معظم الإنزيمات النازعة للهيدروجين اللاهوائية المعتمدة على FAD,FMN لها علاقة بنقل الإلكترونات في أو إلى السلسلة التنفسية، يعتبر NADH-dehydrogenase هو أحد أفراد السلسلة التنفسية والذي يعمل كناقل أو حامل للإلكترونات بين NADH والمركبات الأكثر موجبة الكترونيا، بعض الإنزيمات النازعة للهيدروجين مثل acyl-CoA dehydrogenase,succinate dehydrogenase glycerol-3-phosphate dehydrogenase في المايتوكوندريا الذي تقوم بنقل أيون الهيدروجين مباشرة من المادة الأساس إلى السلسلة التنفسية والدور الآخر للإنزيمات النازعة للهيدروجين تعتمد على الفلافين هو نزع الهيدروجين من اللايبويت المختزل والذي هو المادة الوسطية في نزع مجموعة الكربوكسيل التاكسدية

للبيروفيت والفا - كيتوكلوتاريت حيث يعمل FAD كحامل للهيدروجين من اللايبويت المختزل إلى NAD^+ بسبب جهد الأكسدة والاختزال المتخصص فالبروتين الفلافيني الناقل للالكترون هو ناقل وسيط للإلكترونات بين acyl-CoAdehydrogenase والسلسلة التنفسية.

3. السايتوكرومات **cytochromes**: تصنف السايتوكرومات كإنزيمات نازعة للهيدروجين اللاهوائية ماعدا السايتوكروم اوكسيديز والذي يمكن التعرف عليها ودراستها عندما توجد بشكل مختزل من أطياف الامتصاص الخاصة بها والذي تختفي عند الأكسدة وتساهم السايتوكرومات في السلسلة التنفسية بنقل الإلكترونات من البروتينات الفلافينية في طرف إلى إنزيم السايتوكروم اوكسيديز في الطرف الآخر وتعتبر السايتوكرومات بروتينات دموية تحتوي الحديد الذي تنتقل بين الحديدوز والحديديك خلال الأكسدة والاختزال وتم التعرف على عدد من السايتوكرومات الموجودة في السلسلة التنفسية منها سايتوكروم a_3,a,c,c_1,b(سايتوكروم اوكسيديز) ومن بين تلك السايتوكرومات، فإن السايتوكروم c هو الوحيد الذي يكون ذائب واوضحت دراسة التركيب البنائي بأن مجموعة الحديد البورفينية ترتبط مع apoprotein بواسطة جسرين من الايثر الكبريتي المشتق من تكثيف السستائيين في البروتين مع مجاميع الفنيل في الهيم بالإضافة إلى السلسلة التنفسية، فأن السايتوكرومات توجد في مواقع أخرى مثل الشبكة الاندوبلازمية (السايتوكروم p-450 , b_5) والخلايا النباتية والبكتريا والخمائر.

رابعا: الهيدروبيروكسيديزات **Hydroperoxidases**: وهي الإنزيمات التي تستخدم بيروكسيد الهيدروجين كمادة أساس وتشمل نوعين من الإنزيمات هي البيروكسيديزات peroxidases الذي توجد في الحليب والنباتات والكاتاليز catalase الذي يوجد في النباتات والحيوانات:

1. البيروكسيديزات: المجموعة المرافقة لهذه الإنزيمات هي البرتوهيم protoheme وهي لا ترتبط بقوة مع الجزء البروتيني في التفاعلات الإنزيمية المحفزة بواسطة البيروكسيديزات وهي تعمل كمستقبلات للإلكترونات مثل الاسكوربيك

والكوينيونات والسايتوكروم c والتفاعل المحفز بواسطة هذه الإنزيمات هو تفاعل معقد يمكن كتابته كالآتي:

$$AH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxidase}} 2H_2O + A$$

وهذا الإنزيم يكون معقدات بروتين – بورفرين – حديد والذي تساهم في نقل الإلكترون وأكسدة الأنسجة ومن أنواع إنزيمات البيروكسيديزات هي lactoperoxidase, verdoperoxidase glutathione peroxidase وتساهم البيروكسيديزات في تحلل بيروكسيد الهيدروجين بدلا من الأوكسجين الجزيئي وهي تأكسد dihydrophenols بوجود بيروكسيد الهيدروجين لتكوين كوينيون وماء ويعمل thyroid peroxidase على أكسدة الايوديد غير العضوي في خلايا الدرقية إلى أيودين فعال وهو يستخدم الايودين الفعال إلى ايوديت في بعض التيروسين وبعض المستدين في البروتينات الكربوهيدراتية وهو يساهم أيضا في تخليق الهرمونات الدرقية ويحتوي glutathione peroxidase على أيون السيلينيوم كمجموعة رابطة وهو يحفز تحطيم بيروكسيد الهيدروجين وهيدروبيروكسيديزات اللبيدات بواسطة كلوتاثايون المختزل مما يحمي لبيدات الغلاف وهيموكلوبين الدم تجاه الأكسدة بواسطة البيروكسيدات ويمنع التحطيم التاكسدي للهيموكلوبين بواسطة اختزال بيروكسيد الهيدروجين وبيروكسيدات الأحماض الدهنية مع تحفيز أكسدة الكلوتاثايون المختزل (GSG) مما يتحول إلى كلوتاثايون مؤكسد(GSSG).

$$2GSG + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

ويتم اختزال بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء بوجود الإنزيم.

$$H_2O + GSG \xrightarrow{\text{glutathione peroxidase}} 2H_2O + GSSG$$

2. الكاتايز: هو بروتين دموي يحتوي 4 مجاميع هيم ويملك نشاط إنزيم البيروكسيديز وله القدرة على استعمال جزيئة واحدة من بيروكسيد الهيدروجين كمادة أساس تهب الإلكترون وجزيئة أخرى كعامل مؤكسد أو مستقبل للإلكترون.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

يوجد في الدم وفي الكبد ويقوم بوظيفة إتلاف بيروكسيد الهيدروجين المتكون بفعل الإنزيمات النازعة للهيدروجين الهوائية، الجسيمات الدقيقة microbodies أو ما تسمى peroxisomes تكون غنية بإنزيم الكاتاليز مما يدل ذلك على احتمال وجود فائدة حيوية من وجود الإنزيمات المنتجة لبيروكسيد الهيدروجين مع إنزيم محطم له كما تعتبر أنظمة انتقال الإلكترونات في المايتوكوندريا والميكروسوم من المصادر الأخرى لبيروكسيد الهيدروجين بالإضافة إلى إنزيمات الأجسام الدقيقة.

خامسا: الاوكسجسينيزاتOxygenases: وهي الإنزيمات التي تحفز النقل المباشر ودمج الأوكسجين إلى المادة الأساس، والذي لها علاقة مع تخليق أو تحطيم أنواع مختلفة من المركبات الوسطية للعمليات الحياتية ويتم دمج الأوكسجين إلى المادة الأساس في خطوتين هما:

1. ربط الأوكسجين إلى الإنزيم في الموقع الفعال.
2. يحصل اختزال المكان الذي حصل فيه ربط الأوكسجين أو نقل الأوكسجين إلى المادة الأساس.

وهي تؤكسد المواد الأساسية بواسطة دمج الأوكسجين أليها وهي تستخدم في تقدير كميات قليلة نسبيا من الأوكسجين في الجسم الناتجة عن الأكسدة الهدمية أو البنائية ولا علاقة بإنتاج الطاقة للجسم ويتم دمج ذرة الأوكسجين مباشرة إلى المادة الأساس لتكوين مجموعة هيدروكسيل أو كربو كسيل جديدة وهي الإنزيمات المتخصصة في التفاعلات التاكسدية والذي تستهلك كميات قليلة من الأوكسجين المتناول بواسطة الخلايا وتعتبر

مهمة للأحياء المجهرية، وظيفة هذه الإنزيمات هي تشقق الحلقات العطرية أو الجناح الحلقي فعلى سبيل المثال فأن homogentisic acid oxygenase يحدث تشقق حلقة البنزين في حامض الهوموجينيتيسيك بواسطة الدمج المباشر للأوكسجين ويهاجم الأوكسجين الاصرة المزدوجة في حلقة البنزين في حامض الهوموجينتيسيك بواسطة إنزيم homogentisic acid oxygenase

ويمكن تقسيم هذه الإنزيمات إلى نوعين ثانويين هما :

1. **الاوكسجينيزات الأحادية monooxygenases**: وهذه الإنزيمات يطلق عليها mixed function oxidases أو hydroxylases وهي الإنزيمات الذي تحفز دمج ذرة واحدة فقط من جزيئة الأوكسجين إلى المادة الأساس بينما تختزل ذرة الأوكسجين الأخرى إلى ماء وواهب إلكترون إضافي أو مادة أساس مرافقة تكون أساسية هذه التفاعلات.

$$AH + O_2 + ZH_2 \longrightarrow A\text{-}OH + H_2O + Z$$

وقد تمكن هيا يشي عام 1968 من تقسيم هذه الإنزيمات الأحادية إلى مجاميع فرعية طبقا لطبيعة المادة الأساس الواهبة للإلكترون وهناك العديد من الإنزيمات التي تساهم في تخليق الستيرويدات أو تحويلها وهذه الإنزيمات تستفاد من NADPH كمادة أساس مرافقة وتوجد هذه الإنزيمات في ميكروسومات الشبكة الاندوبلازمية في الكبد وفي المايتوكوندريا وفي ميكروسومات الشبكة الاندوبلازمية للغدد الادرينالية وهي تلعب دوراً مهماً في ايض العديد من الأدوية وذلك بواسطة إضافة مجموعة الهيدروكسيل إليها ومنها إنزيمات السايتوكروم P-450 في المايكروسومات والذي توجد في ميكروسومات الكبد مع السايتوكروم p-450 وسايتوكروم b_5، فأن كلا من NADH,NDPH الذي تهب أيونات هيدروجين لاختزال تلك السايتوكرومات والذي تتم أكسدتها بواسطة المادة الأساس في سلسلة من التفاعلات الإنزيمية الذي تعرف بدورة إنزيم hydroxylase.

$$Drug\text{-}H + O_2 + 2Fe^{+2} + 2H^{+} \longrightarrow Drug\text{-}OH + H_2O + 2Fe^{+3}$$

ومـن الأدويـة الـتي يـتم هـدمها بواسـطة تلـك النظـام هـي: benzpyrene, aminopyrine aniline, morphine, benzphetamine وان عـدد مـن العقاقيـر مثـل phenol barbitol لها القدرة لتحفيز تكوين الإنزيمات الميكروسومية والسايتوكروم p-450 وأنظمة monooxygenase المايتوكوندرية توجد في القشرة الادرينالية والخصى والمبيض والمشيمة والذي لها علاقة بالتخليق الحيوي للهرمونات الستيرويدية من الكولسترول أي تسبب إضافة هيدروكسيل إلى ذرة الكربون 22 و20 في السلسلة الجانبية وفي الموقع بيتا- 11و 18، النظام الكلوي يحفز إضافة هيدروكسيل في الموقع ألفا-1 و24 من 25-هيدروكسي كولي كالسي فيرول والكبد يحفز إضافة هيدروكسيل في الموقع 26 في التخليق الحيوي لأحماض الصفراء ويتكون نظام monooxygenase من 3 مركبات تقع على الجانب الداخلي من غشاء المايتوكوندريا الداخلي والمركبات هي بروتين فلافيني، FAD Fe_2S_2 وبروتين وسايتوكروم p-450.

2. إنزيمات الاوكسجينيزات الثنائية dioxygenases: وهي تشمل oxygen transferases أو oxygenases الحقيقية وهي الإنزيمات الذي تحفز دمج ذرتي الأوكسجين الجزيئية إلى المادة الأساس الحاوية على الحديد كمجموعة رابطة homogentisate dioxygenase, 3-hydroxy anthranilate dioxygenase الموجودة في الكبد مثل L-Try dioxygenase or Try-pyrrolase في الكبد الذي تستخدم الهيم وتعمل carotene dioxygenase, homogentisate oxidase Try-2,3-dioxygenase إلى دمج ذرتي الأوكسجين الجزيئي إلى المادة الأساس مما تؤدي إلى تكوين مجموعة هيدروكسيل في المادة الأساس والذي تعاني من تشقق للسلسلة الجزيئية بين ذرات الكربون الحاملة لمجاميع الهيدروكسيل ومن الأمثلة لهذه الإنزيمات هو pyrocatechase الذي يساهم في فتح حلقة الكاتيكول عندما تتفاعل مع الأوكسجين حيث تدخل ذرات الأوكسجين في مجاميع الكربوكسيل الناتجة بعد تفكك الكاتيكول ويعمل إنزيم dioxygenase على أكسدة p-hydroxy phenyl pyruvate الناتج عن هدم التايروسين حيث يضيف الإنزيم ذرتي أوكسجين لتكوين هوموجينيسيك والذي هو الآخر يتأكسد إلى maleoyl acetoacetate حيث يضيف الإنزيم ذرتي أوكسجين لتكوين وإضافة مجموعة هيدروكسيل إلى التركيب الحلقي.

الفصل الخامس عشر

الإنزيمات المنظمة

الإنزيمات المنظمة

الإنزيمات المنظمة regulator or allosteric enzymes هي تلك الإنزيمات الذي يمكنها تعديل أو تحوير نشاطها في الموقع التحفيزي بواسطة المؤثرات المنظمة أو المعدلات المنظمة في الموقع المنظم allosteric site أي أن النشاط التحفيزي لبعض الإنزيمات المنظمة تكون معدلة modulated أو مؤثرة effector منخفضة الوزن الجزيئي والذي تملك تركيب بنائي أو لا تملك تركيب بنائي يشبه التركيب البنائي للمواد الأساس أو المرافقات الإنزيمية للإنزيمات ذات العلاقة وهي الإنزيمات التي لا تخضع لحركية ميكليس – منتن وهي تشمل عدد من الإنزيمات المهمة الذي غالبا ما تكون من الإنزيمات متعددة السلسلة الببتيدية والذي تكون منحني بشكل حرف S والذي تحفز التفاعل في نقطة التفرع في المسلك الايضي والذي يمكنها أن تسمى الإنزيمات المحددة الخطوة pace maker والذي يمكن أن تنظم التفاعل بواسطة المثبطات والذي فيها الإنزيم الأول من سلسلة التفاعلات المتعاقبة في العمليات الايضية يثبط بواسطة الناتج النهائيfeed back من سلسلة التفاعلات، فالمواد العرضية من العمليات الايضية في سلسلة التفاعلات الإنزيمية يطلق عليها المعدلmodulator أو المؤثر effector فالإنزيم المنظم هو أول إنزيم من تسلسل الإنزيمات المتعددة multienzymes فالإنزيم المنظم هو ابسط تنوع من نظام الإنزيم المنظم الذي يكون فيه الأنزيم المنظم هو أحادي التكافؤ monovalent الذي يحتوي على جزيئة معدلة واحدة فقط (الشكل –99) الذي فيه تثبيط الناتج النهائي من الحامض الأميني الثريونين من نوع L وهو L-Thr deaminase، فالإنزيم الأول E_1 في التسلسل يثبط بواسطة الايزوليوسين وهو الناتج النهائي للتفاعلات المتسلسلة بواسطة الإنزيمات E_2 , E_3 , E_4 , E_5 الذي تحفز التفاعلات الوسطية، وقد تكون الإنزيمات المنظمة متعددة التكافؤ والذي تستجيب إلى اكثر من جزيئة محورة أو معدله، فالإنزيمات المنظمة يمكن أن تملك معدل موجب معين الذي يكون مادة أساس للإنزيم المنظم، بعض الإنزيمات المنظمة تملك واحد أو اكثر من المعدلات الموجبة أو واحد أو اكثر من المعدلات السالبة في أن واحد، كل منها يرتبط الى موقع معين على الإنزيم، فالإنزيمات المنظمة تحفز التفاعلات غير العكسية تحت الظروف الخلوية الخارجية وتسمى الخطوة الأولى في تسلسل تفاعلات الإنزيم المتعددcommitted stop، وتتألف الإنزيمات الذي تتعرض إلى تثبيط منظم من

العديد من الوحدات الفرعية الذي تتداخل مع بعضها البعض الآخر مما تؤثر على معدل سرعة التفاعلات الإنزيمية في عمليات الهدم أو البناء ويحدث التثبيط المنظم عندما المثبط هو جزيئة صغيرة لا علاقة لها كيمياويا إلى المادة الأساس والذي ترتبط مع بروتين الإنزيم في موقع يختلف عن موقع المادة الأساس، بعض الارتباطات تغير من الهيئة التركيبية للبروتين مما يجعل موقعة الفعال اكثر صعوبة تجاه المادة الأساس لربط نفسها مع المادة الأساس، ارتباط بعض الجزيئات الصغيرة الذي بعضها هو نيوكليوتيدات تحور من عمل الإنزيم مما تسيطر بشكل سريع وفعال على النشاط الإنزيمي في الخطوات الأولى من تسلسل التفاعلات في العمليات الايضية، فإن تلك الجزيئات الصغيرة الذي لها تأثير على السلوك التحفيزي للإنزيم أطلق عليها effectors أو modulators وتتميز الإنزيمات المنظمة عن غيرها من الإنزيمات الاعتيادية بالصفات التالية:

1. يتكون الإنزيم المنظم من عدد كبير من الوحدات الفرعية لذلك تكون من الإنزيمات متعددة السلسلة الببتيدية، بعض الإنزيمات يحتوي على مواقع تحفيزية أو مواقع منظمة regulatory sites.
2. الإنزيمات المنظمة ذات وزن جزيئي عالي.
3. يتأثر نشاط الإنزيمات المنظمة بتركيز المادة الأساس، فإن زيادة تركيز المادة الأساس قليلا يعقبها زيادة كبيرة في السرعة الى أن تصل السرعة القصوى، فالتأثير الإيجابي للمادة الأساس في نشاط الإنزيم يطلق علية تعاون موجب positive cooperativity وعندما لا تؤدي الى السرعة القصوى، فأن التعاون سلبي negative cooperativity.
4. تتأثر المواقع المنظمة في الإنزيمات بواسطة المؤثرات أو المعدلات لأنها عندما تحفز الإنزيم يطلق عليها المعدلات أو المؤثرات الإيجابية positive effectors or modulators أو قد تثبط الإنزيم مما يطلق عليها negative effectors or modulators، ففي كلتا الحالتين يحدث تغير في الهيئة التركيبية conformation للإنزيم.
5. الإنزيمات للمنظمة المعزولة والمعدلة بالتقانات الكيمياوية والفيزياوية تكون غير حساسة تجاه مؤثراتها المنظمة بدون تغير نشاطها التحفيزي وهي تعاني من دنترة في

طبيعة موقعها المنظم عند معاملتها مع اليوريا والزئبقيات والأشعة السينية والإنزيمات المحللة للبروتينات والقوة الايونية أو الأس الهيدروجيني.

6. تحمي المؤثرات والمعدلات نشاط الإنزيم المنظم موقع التحفيز من الدنترة تحت ظروف لا تستطيع عندها المادة الأساس من حماية الموقع مما يدل ذلك على أن هناك موقع منظم ثاني في مكان ما على الإنزيم.
7. يرتبط مؤثر أو معدل الإنزيم والمادة الأساس مع الأنزيم المنظم بشكل مستقل عن الآخر.
8. وجود موقع ارتباط المؤثر أو المعدل المنظم على وحدة ثانوية مختلفة عن موقع التحفيز.
9. هناك صنفين من الإنزيمات المنظمة هما سلسلة K وسلسلة V، الإنزيمات المنظمة من السلسلةK هي الذي تكون حركية إشباع مادتها الأساس تنافسية مع ارتفاع قيمة ثابت ميكليس – منتن بدون أي تأثير على السرعة القصوى بينما الإنزيمات المنظمة للسلسلة V فهي تلك الإنزيمات التي عند وجود المثبط المنظم تقل سرعتها القصوى دون التأثير على قيمة ثابت ميكليس – منتن الظاهرية.
10. تعمل المؤثرات أو المعدلات المنظمة على تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التحفيز التساهمي لبعض الحوامض الأمينية على سطح الإنزيم، فالتنظيم التساهمي يضعف أو يقوى مؤثرات أو معدلات الإنزيمات المنظمة مما يقوي أو يبطل التأثيرات التنظيمية المنظمة.
11. كل الإنزيمات المنظمة هي إنزيمات متعددة السلاسل الببتيدية والذي تملك اثنين أو اكثر من الوحدات الفرعية المتميزة، فأن Asp transferase الذي يتحلل بسرعة الى وحدتين فرعيتين كبيرتين، أحدهما تحمل الموقع التحفيزي والأخرى تحمل الموقع المنظم، الوحدة الفرعية الأولى تملك حركيات ميكليس – منتن بدلا من حركيات Sigmoidal والذي لا تتأثر بواسطة CTP بينما الوحدة الثانية لا تملك نشاط تحفيزي إلا إنها ترتبط بقوة مع CTP.
12. التحوير الكيمياوي للإنزيم المنظم بواسطة الارتباطات التساهمية لمجاميع معينة الى الإنزيم المنظم تؤدي الى تغيرات في التراكيب البنائية الأولية والثلاثية للإنزيمات (جدول 20–).

13. يلعب التثبيط المنظم دور حيوي في تنظيم العمليات الايضية الهدمية والبنائية، حيث يعمل الناتج النهائي كمثبط منظم لنشاط أحد الإنزيمات في سلسلة التفاعل، حيث يرتبط المثبط بالإنزيم في موقع غير موقع الارتباط للمادة الأساس إلا أن التثبيط المنظم يستعمل في الحالات التي يؤثر فيها المثبط مما يؤدي الى حصول تغيرات تركيبية في الإنزيم مما يغير من خواص الارتباط مما يؤثر ذلك على ارتباط المادة الأساس أو خواص التفاعلات اللاحقة.

جدول (20) الإنزيمات المنظمة بالتحوير الكيمياوي

الإنزيم	المصدر	آلية التحوير	التغيرات
كلايكوجين فوسفرريليز	اللبائن، الفطريات	الفسفرة	زيادة
		نزع الفسفرة	نقصان
فوسفوريليز ب كاينيز	اللبائن	الفسفرة	زيادة
		نزع الفسفرة	نقصان
كلايكوجين ساينثتيز	اللبائن، الفطريات	فسفرة	نقصان
		نزع الفسفرة	زيادة
بيروفيت ديهايدروجينيز	اللبائن	الفسفرة	نقصان
		نزع الفسفرة	زيادة
كلوتامين ساينثتيز	بكتريا القولون	إضافة ادنيل	نقصان
		نزع ادنيل	زيادة

14. تعمل معظم معدلات أو مؤثرات الإنزيمات المنظمة على تغير درجة تخصص Sigmoidal لرسم ميكليس – منتن، حيث يزداد تأثيرها على استمرار التدفق الايضي عندما يكون تركيز المادة الأساس منخفض أو معتدل ويقل التأثير عندما التركيز مرتفع للمادة الأساس.

15. كل الإنزيمات المنظمة تملك مواقع تحفيزية الذي تعمل على ربط المادة الأساس ونقلها إلا إنها تملك كذلك واحد أو اكثر من المواقع المنظمة لربط النواتج الوسطية الذي يطلق عليها المؤثرات أو المعدلات وكل موقع تحفيزي يكون متخصص لمادة أساس واحدة والموقع المنظم متخصص لمعدل أو محور أو مؤثر.

16 جزيئات الإنزيم المنظم اكبر واكثر تعقيد من الإنزيمات البسيطة الأخرى.

17 بعض الإنزيمات المنظمة تملك اثنان أو اكثر من المعدلات ذات التأثير المعاكس والذي تحفز واحد أو اكثر من المثبطات.

18 .لا تخضع حركيات الانزيمات الى معادلة ميكلس – منتن وان العلاقة بين v و[S] كون sigmoid أو منحنى S=shaped بدلا من rectangular hyperbolas بعض المنحنيات تقترح رتبة ثانية أو علاقة عالية بين v و[S] حيث أن v يتناسب كرديا مع [S] حيث أن $n > 1$، حيث يحصل ارتباط مادة أساس الى جزيئة البروتين مما تجعلها أساس لجزيئة المادة الأساس الإضافية للارتباط الى نفس جزيئة البروتين، فالمادة المرتبطة هي cooperative.

19 .تثبيط الانزيمات المنظمة بواسطة المثبطات المرتدة لا يتطابق الى أي من المثبطات الاعتيادية وتحمل المثبطات المرتدة F تشابه تركيبي قليل الى A وتعمل المادة الأساس للإنزيم المنظم F في موقع الارتباط المميز عن موقع ارتباط المادة الأساس وتأثير هذا المثبط يسمى التثبيط المنظم.

20 .الانزيمات المنظمة مثل enzyme I تنظم بواسطة التنشيط، بعض المؤثرات مثل F لها تأثير سالب على نشاط الإنزيم وهناك مؤثرات أخرى لها تأثير موجب على نشاط الإنزيم.

21 .تملك الانزيمات المنظمة هيئه تركيبية محدودة الجزيئات oligomeric والذي تتركب من اكثر من سلسلة ببتيدية واحدة واكثر من موقع ارتباط للمادة الأساس لكل جزيئة انزيم.

22 .تداخل الانزيمات المنظمة مع المؤثرات يغير من توزيع احتمالات التركيبية أو توفر التداخلات للوحدات الفرعية مع الإنزيم مما يؤثر ذلك على نشاط الإنزيم بسبب التغيرات التركيبية الذي تحدث في البروتين عندما يرتبط نواتج ايض المؤثرات.

تصنيف الإنزيمات المنظمة

هناك ثلاث أصناف من الإنزيمات المنظمة هي:

1. Homotropic enzymes.

2. Heterotropic enzymes.
3. Homotropic-heterotropic enzymes.

الإنزيمات غير المتجانسة heterotropic enzymes: الإنزيمات المنظمة المدارية عديمة التجانس هي تحفيز أو تثبيط بواسطة مؤثرات أو معدلات طبيعية معينه عدا المواد الأساس مثل الليوسين كناتج نهائي هدم الثريونين وهي الإنزيمات الذي لا تمتلك فقط موقع ارتباط أو تحفيز للمادة الأساس، بل الموقع الثاني الذي يعتقد بأنه ينفصل فيزياويا من الموقع التحفيزي الذي به يرتبط المعدل، فأن Thr-deaminase الذي يملك موقع واحد متخصص للمادة الأساس L-Threonine وموقع آخر متخصص للمعدل الذي هوL-isoleucine ويمكن تثبيط تلك الإنزيمات بواسطة المعدلات وهي غالبا ما تكون جزيئات عدا المواد الأساس وتأثيرات تلك الإنزيمات غير متجانسةheterotropic effect يشير إلى التداخلات بين المواد الرابطة للإنزيم المختلفة ligands حيث يكون تأثير المنشط أو المثبط على الارتباط مع المادة الأساس لأن التداخل يحدث بين أنواع مختلفة من الجزيئات وتأثير تلك الإنزيمات أما موجب أو سالب ونتيجة لوجود اكثر من موقع ارتباط واحد للمؤثر أو المعدل على الانزيم فهناك احتمالية تداخل بين مواقع الارتباط خلال عملية الربط يطلق عليها الارتباط التعاوني cooperativity الذي يكون موجب عندما يؤدي ارتباط جزيئة واحدة من المادة الأساس أو المعدلات والمؤثرات إلى زيادة ألفة بروتين الإنزيم إلى جزيئات أخرى من نفس المادة الأساس أو المعدل أو المؤثر أو جزيئات أخرى تختلف عن المادة الأساس أو المؤثر أو العدل ويحدث ارتباط تعاوني مداري غير متجانسheterotropic cooperativity عندما يؤثر ربط جزيئة واحدة من المادة الأساس أو المؤثر أو المعدل أو الرابط على ارتباط جزيئات أخرى من المادة الأساس المختلفة أو مادة رابطة مختلفة مع الإنزيم وقد يكون له تأثيرات تعاونية موجبة أو سالبة ويعتبر التثبيط المنظم مثال لذلك negative heterotropic cooperativity ويعتبر التنشيط المنظم مثالا لذلك positive heterotropic cooperativity ولتقليل تأثير عدم التجانس يمكن تفاعل عدة مواد أساس.

الإنزيمات المتجانسة homotropic enzymes: في الإنزيمات المدارية المتجانسة، فأن جريئة المادة الأساس ليست مادة أساس فقط، بل هي المعدلات الذي تعجل

النشاط التحفيزي والذي تعتمد على التركيز وهي أنزيمات تحتوي واحد أو اكثر من مواقع الارتباط للمادة الأساس والذي على الأقل واحد منها يكون موقع تحفيزي ومعظم الإنزيمات المنظمة تملك منحني لا يخضع لمعادلة ميكليس – منتن وهي تستجيب لارتفاع تركيز المادة الأساس لانتاج زيادة في ألفة الإنزيم للمادة الأساس بدون تغير في السرعة القصوى وتملك مواقع ارتباط مختلفة عن المادة الأساس والذي تكون بشكل تعاوني وإن ارتباط جزيئة واحدة من المادة الأساس تزيد من ارتباط جزيئة المادة الأساس بالتعاقب ويكون ذات تأثير على التداخلات المنظمة بين المواد الرابطة المتماثلة (أيونات أو جزيئات مرتبطة) فالارتباط التعاوني للمادة الأساس إلى الإنزيم من نوع homotropic effects والذي يمكن أن يكون تعاوني موجب أو سالب ويحدث homotropic cooperativity عندما يؤثر ربط جزيئة واحدة من المادة الأساس أو المادة الرابطة الأخرى ligand على ارتباط الجزيئات اللاحقة من نفس المادة الأساس فالإنزيم المتكون من وحدتين فرعيتين في حالة positive homotropic cooperativity الذي يملك موقعان متشابهان لربط ligand وعند ارتباطه بأحد الموقعين، فإن ذلك يؤدي إلى زيادة ألفة الإنزيم للرابط ligand في الموقع الآخر وعندما يؤدي ارتباط الجزيئة الأولى من ligand إلى زيادة ألفة الإنزيم للرابط ligand، فأنه سيؤدي إلى زيادة سرعة الخطوة الثانية من عملية الارتباط مقارنه بالحالة التي لا يوجد فيها تفاعل موقع الارتباط مما يكون نوع التعاون موجب أما الحالات التي يكون فيها التعاون سالب يحصل إبطاء الخطوة الثانية لعملية الارتباط مقارنه بالحالة التي لا توجد فيها تفاعل بين موقع الارتباط، ففي حالة التعاون الموجب يكون الشكل sigmoidal أما في حالة التعاون السالب فإن الشكل لا يكون sigmoidal, hyperbolic.

نماذج الإنزيمات المنظمة Models of allosteric enzymes

1. نموذج R و T: اقترح Monod ,Wyman & Changeus نموذج نظرية النقل المنظم المبني على أساس الملاحظات حول الجزيئات المحدودة للبروتينات المنظمة حيث اقترحوا كون البروتينات المنظمة تستطيع الوجود على هيئتين تركيبيتين على الاقل هما relaxed,R و Taut,T أي أن كل الوحدات الفرعية تملك نفس الهيئة التركيبية إما R أو T وعند غياب الرابط ligand توجد هناك حالتين من البروتينات المنظمة.

$To \leftrightarrow Ro$, فأن ثابت التوازن يعبر عنه $L:L = To / Ro$ حيث أن L تكون كبيرة وان كمية البروتين في الهيئة التركيبية T اكبر من كميتها في R ولو فرضنا ان $L=10^4$ ألفة الحالتين للمادة الأساس S تتميز بواسطة بثوابت تفكك K_R,K_T والنموذج المقترح هو $K_T > K_R$ فأن ألفة Ro للمادة الأساس S اكبر من ألفة To للمادة الأساس S فإذا كان $K_R/K_R = 0$ فأن K_T اكبر من K_R حيث يرتبط S فقط الى R وعندما يضاف S الى المحلول للبروتين المنظم عند توازن الهيئة التركيبية فأن تركيز Ro النسبي قليل فإن S سيرتبط فقط الى Ro مما يكون R_1 تم اقتراح عدة نماذج للإنزيمات المنظمة لتفسير سلوكها فإن حدوث أي طفرة وراثية قد تؤدي الى تكوين الشكل بحرف S حيث تؤدي تلك النماذج إلى تغيرات في ثابت ميكليس – منتن والسرعة القصوى الناتجة عن التغيرات في الهيئات التركيبية في موقع التحفيز الناتج عن ارتباط المؤثر المنظم في الموقع المنظم فالإنزيمات ذات السلسلة k لها تأثير أولى مما يحصل تغير شكلي قد يضعف من الأواصر بين المادة الأساس والأجزاء الأخرى الذي ترتبها معها أما الإنزيمات المنظمة ذي السلسلة v فإنها تؤدي إلى تبديل ترتيب الأجزاء المحفزه مما يخفض من السرعة القصوى.

2. **النموذج المنسجم والتراكمي cumulative and concreted model**: تثبيط الناتج النهائي المنسجم أو التراكمي يكون فعال عندما اثنان أو اكثر من نواتج التفاعل النهائية موجودة في الوسط حيث إن الإنزيم يكون غير حساس إلى الناتج النهائي المنفرد لكنه يصبح فعال عندما يكون هناك اكثر من اثنان من النواتج النهائية في الانسجام لتثبيط الإنزيم، ففي التثبيط للناتج النهائي المنسجم concreted feed back لها تأثير مسيطر ثانوي على الإنزيم حيث أن المادة الناتجة النهائية X تثبط الإنزيم d وان الناتج النهائي لا يثبط الإنزيم e فالزيادة في إنتاج X يثبط فقط إنتاجه من خلال السيطرة على الانزيم d بينما يستمر الإنزيم a الذي يكون حساس للتثبيط فقط بوجود X,Y، وابسط مثال لها هو تثبيط Asp-kinase بواسطة ارتباط الثريونين واللايسين معا إلا أن أيا منهما بشكل منفرد لا يثبط الإنزيم، التماثل يكون أساس في النموذج المنسجم لتداخل الوحدات الفرعية في الإنزيمات متعددة السلاسل الببتيدية وهو يختلف عن تداخلات homotropic الموجبة في النموذج المنسجم، ففي الخطوة الأولى من A إلى B تثبط فقط عندما يكون مستوى Y,Z موجودة في آن

واحد، فالمستوى المرتفع إما من النـاتج وحـدة لا يثـبط التفاعـل مـن A إلى B، وان لا يثبط C إلى D, Z يثبط C إلى F.

بينما في حالـة تثبيـط النـاتج النهـائي التراكمـي، فـإن التفاعـل مـن A إلى B يثـبط جزئيا بواسطة كل من النواتج النهائيـة Z,Y وكـل نـاتج نهـائي يعمـل بشـكل مسـتقل عـن الآخر في عملية التثبيط، ففي تركيز مرتفع من الناتج النهائي Y يقل معدل تفاعل A إلى B من 100 إلى 60\ثانية وZ فقط يقل بوجود تركيز مرتفع من Y,Z الـذي يكـون 24 ثانيـة ($0.6x\ 0.4\ x\ 100\ sec^{-1}$) وكما موضح سابقا، فإن الإنزيمات المنظمة تتركب مـن اثنـان من الوحدات الفرعية المتماثلة، كل واحدة منها تملك موقـع فعـال واحـد والوحـدة الفرعيـة يمكن وجودها إما بهيئتين تركيبية هما R T، الحالة R تكون مسـترخية relaxed وذات ألفة عالية تجاه المادة الأسـاس في حـين الحالـة T متـوترة tensed وذات ألفـة منخفضـة تجـاه المادة الأساس، تستعمل تلك الأشكال لوصف التركيب البنائي الرباعي البديل للهيموكلوبين والذي يحصل فيها تحويل داخلي، ففي هذا النموذج كلا الوحـــدات الفرعية يجب أن تكون في نفس حالة الهيئة التركيبية مما يحصل تثبيط منسجم مما يسمح ذلك بتكوين TT, RR، إلا أن RT لا يحصل تكوينها، عند غياب المادة الأسـاس يحصـل تكـوين Ro To وان L هـو معدل تركيزها، فإن

$$Ro \longleftrightarrow To \text{ ---------------(1)}$$

$$L \longleftrightarrow To / Ro \text{-----------(2)}$$

ولتبسيط المعادلات، نفرض أن المادة الأساس لا ترتبط إلى الحالة T، فـإن الحالـة R مـن المركـب ثنـائي الوحـدات dimer لـه القابليـة للارتبـاط مع واحـد أو اثـنين مـن المـواد الأساس الذي يشير هما R_1,R_2 على التوالي.

$$Ro + S \longleftrightarrow R_1 \text{---------3}$$

$$R_1 + S \longleftrightarrow R_2 \text{-----------4}$$

$$Kr = 2[Ro][S] / [R1] = [R1][S] / 2[R2] \text{----- 5}$$

حيث أن Kr هو ثابت التفكك الميكروسكوبي هو نفسه لارتباط المادة الأساس الأولى والثانية إلى الشكل R من الإنزيم ثنائي الوحدات dimeric enzyme، يجب أن يؤخذ بنظر الاعتبار العامل في المعادلة (5) بان المادة الأساس يجب أن ترتبط إلى الموقعين فيRo لتكوين R_1 وبنفس الوقت فإن المادة الأساس يجب أن تتحرر من الموقعين في R_2 لتكوين R_1، عندما يكون التفاعل في حالة تشبع جزئي الذي نرمز له Y، فإن جزءا من المواقع الفعالة ترتبط مع المادة الأساس للإنزيم، فإن التشبع الجزئي يمكن التعبير عنه بالمعادلة التالية:

$$Y=\text{occupied site/ total sites}=[R_1]+ 2[R_2]/2([To]+[Ro]+[R_1]+[R_2]) \text{ -- -----6}$$

من الاستعاضة بالمعادلة (1) في المعادلة (5) والمعادلة (6)، فإن التشبع الجزئي يساوي

$$Y = ([S]/[Kr])=([S] / Kr)\ 1+[S]/Kr/L+(1+[S]/Kr)^2\text{------7}$$

فلو وجدنا العلاقة البيانية للمعادلة (7) عندما $Kr =10^{-5}$ M و $L =10^{-4}$ ورسم العلاقة بين Y مقابل [S] يحصل على منحني من نوع sigmoidal بدلا من hyperbolic ومن ناحية أخرى، فإن ارتباط المادة الأساس يكون تعاوني وعندما يكون رقم الانقلاب لكل موقع فعال هو نفسة للمعقدات ES في R_1, R_2، فان أيجاد العلاقة بين سرعة التفاعل مقابل تركيز المادة الأساس يكون sigmoidal لان

$$v =Y\ V_{max}\text{--------------------------------8}$$

وعند غياب المادة الأساس، فإن كل جزيئات الإنزيم بشكل T وهناك جزيئة واحدة فقط بشكل R من مجموع $1X10^{+4}$ جزيئات بشكل T، إضافة المادة الأساس يحول توازن الهيئة التركيبية في اتجاه الشكلR لأن المادة الأساس ترتبط فقط إلى الشكل R وعند ارتباط المادة الأساس إلى موقع واحد، فإن الموقع الآخر على نفس جزيئة الإنزيم، يجب أن يكون بشكل R وطبقا لافتراض النموذج المنسجم، فإن الانتقال من الشكل T إلى الشكل R أو بالعكس يكون منسجم، حيث تزداد نسبة جزيئة الإنزيم بشكل R باستمرار مع إضافة كمية اكبر من المادة الأساس والارتباط للمادة الأساس يكون تعاوني وعندما يكون الموقع الفعال مشبع كل جزيئات الإنزيم بشكل R، تأثيرات المثبطات والمنشطات المنظمة يمكن

حسابها بسهولة، فالمثبط المنظم يرتبط تفاضليا إلى الشكل T في حين أن المنشطات المنظمة ترتبط تفاضليا إلى الشكل R، يعمل المثبط المنظم إلى تحويل داخلي بين R,T بحيث يحصل توازن في الهيئة التركيبية تجاه T بينما المنشطات المنظمة تحوها إلى (R=T)، وهذه التأثيرات يعبر عنها كميا بواسطة التغير في ثابت التوازن المنظم (L) الذي يكون متغير في المعادلة (7)، المثبط المنظم يزيد قيمة L في حين المثبط المنظم يقلل من قيمة L، تلك التأثيرات توضح العلاقة البيانية بين Y و[S] لقيم L (10^3) بوجود المنشط و10^4 بعدم وجود منشط ومثبط و10^5 بوجود مثبط، التشبع الجزئي Y في قيم [S] يقل بوجود المثبط ويزداد بوجود المنشط.

3- **النموذج التعاقبي Sequential model**: يمكن حساب التداخلات المنظمة بواسطة النموذج المتعاقب الذي يفترض أن وجود حالتين من الهيئة التركيبية فقط هما T,R لأي وحدة فرعية كما أن ارتباط المادة الأساس يغير من شكل الوحدة الفرعية الذي يرتبط إليها بينما لا يحصل تغير الهيئة التركيبية للوحدات الفرعية الأخرى في جزيئة الإنزيم ثم التغير في الهيئة التركيبية بسبب ارتباط المادة الأساس في وحدة فرعية واحدة يزيد أو يقلل من ألفة ارتباط المادة الأساس للوحدة الفرعية الأخرى في نفس جزيئة الإنزيم، النموذج المتعاقب يوضح ارتباط الإنزيم المنظم، حيث يحصل ارتباط تعاوني عندما تكون ألفة RT للمادة الأساس اكبر من TT، ويختلف النموذج المتعاقب عن النموذج المنسجم في عدة طرق:

أ. التوازن بين الأشكال R,T في غياب المادة الأساس لا يمكن أن تعترض كالسابق حيث يكون انتقال الهيئة التركيبية من T إلى R محفز بواسطة ارتباط المادة الأساس.

ب. التغير في الهيئة التركيبية من T إلى R في الوحدات الفرعية المختلفة من جريئة الإنزيم يكون تعاقبي وليست منسجم، الشكل RT يكون سائد في النموذج التعاقبي ولا يوجد في النموذج المنسجم، الخطوة الأولى من التفاعل A إلى B لا تثبط بصورة مباشرة بواسطة Y,Z، فإن النواتج النهائية Z,Y تثبط التفاعلات المؤدية بعيدا عن نقاط التفرع، فالناتج النهائي لا يثبط التفاعل من C إلى D والناتج النهائي Z يثبط التفاعل من C إلى F والتركيز المرتفع من C يثبط التفاعل من A إلى B،

التفاعل الأول يثبط فقط عندما النواتج النهائية من Y.Z، توجد بتراكيز مرتفعة، الناتج النهائي التعاقبي ينظم تخليق الأحماض الأمينية العطرية في بكتريا Bacillus subtilis، الخطوات المتشعبة الأولية في تخليق Try, Phe,Tyr، يمكن تثبيطها بواسطة ناتج نهائي مختص، عند وجود الأحماض الأمينية الثلاثة بتركيز عالي يحصل تجمع chorismate, prephenate، تلك المركبات الوسطية تثبط الخطوة الأولى في المسلك الكلي مما يؤدي ذلك إلى تكثيف فوسفواينول بيروفيت واريثروز-4- فوسفيت، الإنزيم a لا ينظم بواسطة أي من النواتج النهائية للمسلك المتفرع، فالناتج X يثبط الإنزيم d الذي يحول D إلى X والناتج النهائي Y يثبط الإنزيم e الذي يحول D إلى Y، عندما يتجمع D يسبب تثبيط الإنزيم a، يمكن ملاحظة ذلك في التخليق الحيوي للأحماض الأمينية العطرية في العديد من البكتريا وفي تنظيم التخليق الحيوي للأحماض الأمينية Thr,Ile في Rhodopseudomonas spheroides، يمكن السيطرة على تخليق الأحماض الأمينية من خلال التثبيط المنظم للتفاعل الأول في تسلسل التخليق الحيوي بواسطة الناتج النهائي، حيث يكون التفاعل الأولى غير عكسي الذي يحفز بواسطة الإنزيم المنظم، فالخطوة الأولي في التفاعل المتسلسل يمكن تثبيطها بواسطة الناتج النهائي للتفاعل وهو الايزوليوسين أي يمكن ملاحظة التنظيم المنظم لتخليق الايزوليوسين من الثريونين، فإن Thr dehydratase يثبط بواسطة الايزوليوسين وهو الناتج النهائي الذي يكون عكسي عندما يقل تركيز الايزوليوسين يزداد نشاط الإنزيم في الخلية حيث أن الايزوليوسين لا يمكن له الارتباط في موقع المادة الأساس، بل يرتبط إلى موقع معين آخر على جزيئة الإنزيم يسمى الموقع المنظم، ارتباط الايزوليوسين إلى الموقع المنظم من الإنزيم يكون عكسي وغير تساهمي ويعتبر Thr hydratase أحد الإنزيمات المنظمة الذي لها تفاعل عكسي وغير تساهمي مع الجزيئة المعدلة أو المؤثرة.

المؤثرات غير المتجانسة Heterotropic effectors: تستجيب الأنظمة البسيطة للمؤثرات السالبة والموجبة ومن المؤثرات الذي تؤثر على ارتباط مع الأشياء الأخرى عدا نفسها يعبر عنه مؤثرات غير متجانسة وهي الذي تحفز ارتباط المادة الأساس S وهو ما

يعبر عنه مؤثرات غير متجانسة موجبة positive heterotropic effectors أو المنشطات المنظمة allosteric activators، والمؤثرات الذي تقلل من ارتباط المادة الأساس هي مؤثرات غير متجانسة سالبة negative heterotropic effectors أو المثبطات المنظمة allosteric inhibitors، المثبطات المرتدة feed back inhibitors تناسب هذا الصنف وإذا كان البروتين مركب من وحدتين فرعيتين فإن كل منها يملك اثنان من مواقع الارتباط أحدهما للمادة الأساس S والآخر الذي يرتبط إليه المؤثرات المنظمة وهو ما يطلق عليه الموقع المنظم allosteric site، فلو ارتبط S فقط الى R conformer لوجدنا بأن المؤثر غير المتجانس الموجب A يرتبط الى الموقع المنظم فقط عندما البروتين في هيئة R وان المؤثر المنظم السالب I يرتبط في الموقع المنظم فقط عندما البروتين في هيئة T، وعند الارتباط في الموقع المنظم تحصل منافسة A,I مع بعضها البعض الآخر.

المؤثرات الموجبة Positive effectors: عندما يرتبط A الى Ro لتكوين جنس جديد $R_{1(A)}$ فإن التركيز النسبي Ro يقل وان تحويل To الى Ro يكون نسبيا للحصول على التوازن حيث تحصل زيادة في عدد R conformer بوجود A مما يعني ذلك توفر مواقع ارتباط كثيرة للمادة الأساس.

المؤثرات السالبة negative effectors: بوجود I الذي يرتبط فقط الى T سيؤدي ذلك الى زيادة في عدد T conformer والانخفاض في [Ro] يعني ان يكون اقل للمادة الأساس S أو A للارتباط لان وجود I يرفع من قيمة L.

انظمة K و V: تسمى النماذج المنظمة K-system لأن تركيز المادة الأساس يعطي نصف أقصى السرعة ½Vmax وهو ما يعرف $K_{0.5}$ مما يحصل تغير في الاستجابة للمؤثرات وان قيمة Vmax هي قيمة ثابتة في هذا النظام وعند ثبوت $K_{0.5}$ فأن قيمة Vmax تتغير تبعا لاستجابة المؤثر وهو ما يطلق عليه V system والذي فيه تكون العلاقة بين v وS من نوع hyperbolic بدلا من sigmoid فأن المؤثرات غير المتجانسة الموجبة A تنشط بواسطة ارتفاع قيمة Vmax بينما المؤثرات غير المتجانسة السالبة I تزداد وان لا A ولا I لها تأثير على قيمة $K_{0.5}$ وهذه الحالة ترتفع عندما R و T تملك نفس

الألفة للمادة الأساس S إلا إنها تختلف في قابليتها التحفيزية والفتها تجاه A وI وتستطيع A وI من تحويل توزيع T/R نسبيا، فأن acetyl –CoA carboxylase يحفز حذف خطوة في مسالك تخليق الحامض الدهني ويختلف الدور الحيوي للأنظمة لأنها تعمل افضل تحت ظروف فسيولوجية مختلفة فإن النظام K يتكيف للظروف الذي فيها تركيز المادة الأساس محدود السرعة عندما [S] يساوي $K_{0}.5$ ومن ناحية أخرى عندما تكون الظروف الفسيولوجية لتركيز المادة الأساس مشبعة للإنزيم المنظم فإن الإنزيم يطابق النظام V.

الأليات المختلفة لتثبيط الإنزيمات المنظمة

يمكن توضيح آلية الإنزيمات المنظمة مثل phosphorylase Asp transcarbamoylase , phosphofructokinase , ribonucleotide reductase, Glutaminesynthetase Thr-dehydroatase, isocitratedehydrogenase , phosphorylase b kinase glycogen phosphorylase , glycogen synthetase ,pyruvate dehydrogenase CoA carboxylase–, fatty acid synthetase , acetyl aspartokinase. glycogen phosphorylase هو الإنزيم الذي يحفز نزع مجموعة الكلايكوسيل التعاقبية من الطرف غير المختزل من الكلايكوجين وذلك عن طريق تشقق الرابطة الكلايكوسيدية بين ذرة الكربون الأولى من وحدة الكلوكوز وذرة الكربون الرابعة في الوحدة الذي تليها لتحرير كلوكوز – 1- فوسفيت من جريئة الكلايكوجين، هناك شكلين هما glycogen phosphorylase a , glycogen phosphorylase b الذي تلعب دوراً مهماً في آلية التحفيز والسيطرة في الإنزيم الأساسي في العمليات الايضية ويتكون الكلايكوجين من 841 حامض أميني من الوحدات الفرعية الأحادية السلسلة الببتيدية المكونة من ثلاث مناطق تركيبية هي منطقة الطرف الأميني وتتضمن 310 وحدة من الأحماض الأمينية ومنطقة ارتباط الكلايكوجين وتتألف من 160 وحدة من الأحماض الأمينية ومنطقة الطرف الكربوكسيلي وتتألف من 371 وحدة من الأحماض الأمينية، الموقع التحفيزي للإنزيم يقع في شق عميق يتكون بواسطة وحدات من الأحماض الأمينية من كل من المناطق الثلاثة ويعتبر البيريدوكسال فوسفيت أساسي في نشاط الإنزيم الذي يرتبط قريب من موقع الكلوكوز-1- فوسفيت، فإن المجموعة الالديهايدية في البيريدوكسال فوسفيت تكون قاعدة شيف المرتبطة مع الحامض الأميني اللايسين في سلسلة منطقة الطرف

الكربوكسيلي حيث تساهم مجموعة الفوسفيت في البيريدوكسال فوسفيت في التحفيز حيث يحتوي إنزيم الفوسفوريليز على موقع ارتباط الكلايكوجين الذي يمكن مميزة عن الموقع التحفيزي الذي يبعد حوالي 30 انكستروم عن الموقع التحفيزي، موقع ارتباط الكلايكوجين مهم لارتباط الإنزيم مع جزيئة الكلايكوجين، الفاصل الكبير بين موقع ارتباط الكلايكوجين والموقع التحفيزي يجعل الإنزيم قادر على فسفرة عدد كبير من الأحماض الأمينية الطرفية بدون تفكك أو إعادة ارتباط بعد كل عملية تحفيز ويحتوي إنزيم الفوسفوريليز على الأقل موقعين للسيطرة المنظمة، فإن الكلوكوز والنيوكليوسيدات الذي هي مثبطات منظمة لإنزيم فوسفوريليز a في الكبد ترتبط قريب من الموقع التحفيزي بينما AMP كمنشطات منظمة لإنزيم فوسفوريليز b ترتبط إلى الموقع القريب من التداخل بين الوحدات الفرعية وبعيد عن الموقع التحفيزي وموقع ارتباط الكلايكوجين، السيرين في الموقع 41 يلعب دورا مهما في عملية الفسفرة وذلك لتحويل الفوسفوريليز b إلى a حيث تكون مجموعة الفوسفوريل اصرة هيدروجينية إلى السلسلة الجانبية من الحامض الأميني الارجنين في الموقع 69 حيث تحصل تغيرات في الهيئة التركيبية في التركيب البنائي للإنزيم مما يؤدي ذلك إلى تحوير الموقع التحفيزي في الإنزيم بالإضافة إلى ذلك يحصل تحوير كيمياوي للإنزيم المنظم لعملية التخليق الحيوي للكلايكوجين بواسطة الارتباط التساهمي لمجموعات معينه إلى الإنزيم المنظم مما تحدث تغيرات في التركيب البنائي الأولي للإنزيم بالإضافة إلى التركيب البنائي الثلاثي، والتحوير يحدث في إضافة أو نزع مجاميع معينه تتضمن مجاميع الفوسفوريل، الشكل الفعال لإنزيم الكلايكوجين فوسفوريليز هو الشكل المفسفر a بينما الشكل غير الفعال هو b، الشكل المفسفر هو إنزيم منظم، يمكن توضيح تفاعلات الإنزيم في الكبد الذي يمكن أن تتأثر بواسطة epinephrine، فأن AMP الحلقي المتولد بواسطة adenyl cyclase يحفز phosphorylase kinase الذي يسبب فسفرة الكلايكوجين فوسفوريليز b غير الفعال إلى الشكل الفعال a الذي يحفز تحويل الكلايكوجين إلى كلوكوز-1- فوسفيت في حين أن الابنفرين يعمل على تحطيم الكلايكوجين ويثبط تخليق الكلايكوجين من UDP-glucose مما يؤدي إلى تحويل الكلايكوجبين الكبد إلى كلوكوز في الدم، يمكن تحويل كلوكوز-1- فوسفيت إلى حامض لاكتيك في العضلات أو كلوكوز حر في الكبد وتحطيم الكلايكوجين في العضلات الهيكلية وفي الكبد يكون منظم بواسطة التباينات في نسبة الأشكال الفعالة وغير الفعالة للإنزيم الذي تختلف في التركيب البنائي الرباعي حيث

تطرأ تغيرات في التركيب البنائي للموقع التحفيزي للإنـزيم مـع تغيرات في النشـاط التحفيـزي والتنظيم التساهمي للإنزيم يحدث بسبب الفسفرة وإزالة الفسفرة في الحامض الأميني السيرين في الإنزيـم، وهناك نوع آخر من التعديل التساهمي يحدث بواسطة إضافة مجموعـة المثـيل إلى الأحمـاض الأمينيـة أو ارتبـاط مجموعـة adenylate، ويـتم تنظـيم نشـاط الإنـزيم بواسـطة التحوير التساهمي حيـث تـتم فسـفرة الحـامض الأمـيني السـيرين في كـل وحـدة فرعيـة مـن الإنزيم المنظم مما يُتحول إنزيم glycogen phosphorylae b غير الفعال بوجود إنزيم phosphorylase kinase إلى الشـكل الفعـال a الـذي يحفـز مجموعـة الهيدروكسـيل في الحامض الأميني السيرين بواسطة ATP.

انزيم **Phosphorylase**: يوجد إنزيم الفوسـفوريليز في العضـلات الهيكليـة في شـكلين تتحـول داخليـا فيمـا بينهـا همـا الفوسـفوريليز الفعـال أو الشـكل a (phosphorylase a) والفوسفوريليز غير الفعال أو الشـكل phosphorylase b

HO-Ser-phosphorylase b

$$\downarrow \ ATP \rightarrow ADP, H^+$$

H_2O_3-P-O-Ser-phosphorylase a

وهو إنزيم ثنائي الوحدات dimer يتحول الشكل الفعال b إلى الشـكل a بواسـطة الفسفرة للمجموعة الهيدروكسيلية في الحامض الأميني السيرين للإنـزيم في الموقـع 14 في كـل وحـدة فرعيـة مـن الإنـزيم، يحصـل تحـوير تسـاهمي للإنـزيم غـير الفعـال بواسـطة phosphorylase kinase بينما يتم تحويل الشكل الفعال إلى شكل غير فعال بواسـطة إنزيم phosphorylase phosphatase الذي يحلل مجموعـة الفوسـفوريل المرتبطـة إلى السيرين في الموقع 14، يكون الفوسفوريليـز b للعضلات فعال فقط بوجود تركيز عالي من AMP حيـث تـرتبط AMP إلى الموقـع الـرابط للنيوكلوتيـد ممـا يسـبب تغـير في الهيئـة التركيبيـة لإنـزيم فوسـفوريليز b.ATP يعمـل كمـؤثر مـنظم سـالب بسـبب المنافسـة مـع AMP، يمكن تثبيط الفوسفوريليز b بواسطة الكلوكوز- 6- فوسفيت بسبب ارتباطه مع

الموقع الآخر في الإنزيم وتحت الظروف الفسيولوجية، فإن الفوسفوريليز b يكون غير فعال بسبب التأثير المثبط للادينوسين ثلاثي الفوسفيت والكلوكوز- 6- فوسفيت بينما يكون الفوسفوريليز a فعال كليا، بغض النظر عن مستويات AMP,ATP والكلوكوز- 6- فوسفيت، يمكن تقدير نسبة الإنزيم الفعال بواسطة معدل سرعة عملية الفسفرة أو إزالتها، في بقية العضلات، فإن تقريبا كل الإنزيمات تكون بشكل غير فعال b-form، زيادة مستوى الابتنفرين والتحفيز الكهربائي للعضلات ناتج عن تكوين الشكل الفعال a ويمكن السيطرة على النشاط التحفيزي لإنزيم الفوسفوريليز في العضلات الهيكلية لأن الإنزيم يستطيع أن يتكثف تحفيزيا إلى الهيئة التركيبية الغير فعالة (T) أو الهيئة التركيبية الفعالة (R) حيث أن الشكلين تكونان في حالة توازن لإنزيم الفوسفوريليز a (R=T) الذي يكون بعيد عن الجانب من الحالة المرنة الفعالة (R) بينما الفوسفوريليز b يكون تقريبا في حالة غير فعالة ما لم يرتفع مستوىAMP ويخفض مستوىATP والكلوكوز- 6- فوسفيت، يحفز الإنزيم إزالة الكلوكوز من سلسلة الكلايكوجين المستقيمة حتى تصل إلى أربع وحدات من التفرع، يوجد الإنزيم بشكلين ذكرت سابقا والذي تلعب دورا مهما في ايض الكربوهيدرات، فالإنزيم الفعال a في عضلات الأرنب يتكون من أربع وحدات tetramer مكونه من أربع سلاسل ببتيدية متماثلة كل سلسلة تحتوي سيرين الذي تتم استرة مجموعته الهيدروكسيلية مع فوسفيت بينما ترتبط المجموعة الأمينية الحرة للحامض الأميني اللايسين مع بيريدوكسال فوسفيت لتكوين قاعدة شيف، إزالة تلك المجاميع من الإنزيم ناتج عن عدم نشاط الإنزيم، يمكن إزالة مجاميع الفوسفيت بالتحليل المائي للإنزيم بوجود إنزيم الفوسفوريليز فوسفاتيز الموجود في العضلات.

$$\text{phosphorylase a} \xrightarrow[\text{phosphatase}]{\text{phosphorylase}} \text{phosphorylase b} + 4H_2O$$

يتم تحرير 4 مولات من الفوسفيت غير العضوي وتكوين جزيئين من إنزيم فوسفوريليز b ثنائي الوحدات dimer، يمكن تحويله إلى الشكل الفعال بواسطة ATP بوجود phosphorylase b kinase.

phosphorylase b kinase

2phosphorylase b +4ATP———►phosphorylase a + 4ADP

إن عملية التحويل الداخلي للأشكال من a إلى b وبالعكس تلعب دورا مهما في تنظيم هدم الكربوهيدرات في الأنسجة.

Aspartate transcarbamoylase(ATCase): تختفي الصفات المنظمة للإنزيم عندما يعامل مع مركب زئبقي مثل بارا- هيدروكسي ميركيوربنزويت p-hydroxy mercuri benzoate، ارتباط المادة الأساس غير تعاوني والإنزيم المحور يملك نشاط إنزيمي كامل وفقد الصفات المنظمة مع بقاء النشاط الإنزيمي يطلق عليه إزالة الحساسية desensitization فإزالة حساسية الإنزيم بالمركبات الزئبقية يصاحبه تفكك الإنزيم إلى نوعين من الوحدات الفرعية، يمكن فصلها بواسطة كروماتوكرافيا التبادل الايوني بسبب اختلافها في الشحنات أو الحجم، الجزي الكبير من الوحدات الفرعية يعرف بالوحدة الفرعية التحفيزية الفعال تحفيزيا الذي لا يتأثر نشاطها بواسطة ATP,CTP بينما الوحدات الفرعية الصغيرة يطلق عليها الوحدة الفرعية المنظمة الذي تكون خالية من النشاط التحفيزي إلا إنها تحتوي على مجاميع ارتباط معينه للمركباتCTP,ATP، الوحدات الفرعية التحفيزية تتألف من ثلاث سلاسل ببتيدية متعددة في حين الوحدة الفرعية المنظمة تتألف من سلسلتين ببتيدية متعددة، الوحدات الفرعية التحفيزية والمنظمة ترتبط عند خلطهما معا والمعقد الناتج يملك نفس التركيب البنائي للإنزيم الطبيعي وهو يملك نفس المنظمة للإنزيم الطبيعي، الصفات المنظمة للإنزيم ATCase توضح أن ارتباط مجموعة الفوسفيت كاربامويل والاسبارتيت تكون تعاونيا كما مبين من العلاقة بين سرعة التفاعل والمادة الأساس الاسبارتيت فإن CTP يثبط نشاط الإنزيم بسبب انخفاض الفته تجاه المادة الأساس بدون التأثير على السرعة القصوى وان مدى التثبيط يعتمد علىCTP الذي يصل إلى90% ويعتمد على تركيز المادة الأساس بينما ATP ينشط الإنزيم والفة الإنزيم للمادة الأساس تزداد مع زيادة ATP في حين لا تتأثر السرعة القصوى للتفاعل وارتباط ATP,CTP إلى الموقع المنظم من الإنزيم هو تنافسي، المستوى المرتفع من ATP يزيح CTP من الإنزيم لذلك لا يمكن بيان تأثير المثبط، تكون الأهمية

البيولوجية لتنشيط الإنزيم بواسطة ATP مضاعفة لأنها تساعد على توازن سرع تكوين البيورين والبيريميدين نيوكليوتيدات الذي يحتاجها لتخليق الأحماض النووية وتنشيط الإنزيم بواسطةATP بسبب توفرها كمادة أساس لبعض تفاعلات التخليق الحيوي للبيريميدين نيوكليوتيد مثل تخليق كاربامويل فوسفيت فسفرة UMP إلى UTP، ATCase يحفز الخطوة الأولية لتخليق الكاربامويل اسبارتيت carbamoyl Aspartate ويتكون الإنزيم من 12 سلسلة ببتيدية مرتبة إلى وحدات فرعية منظمه وتحفيزية، تنظيم سرعة تخليق البيريميدين نيوكليوتيد تحدث بواسطة ATCase الذي يحفز التفاعل الأول في تفاعلات الاسبارتيت مع كاربامويل فوسفيت الذي يثبط بواسطة الناتج النهائي للتفاعلات المتسلسلة وهوCTP، تتألف جزيئة الإنزيم من 6 وحدات فرعية تحفيزية و6 وحدات فرعية منظمه، الوحدات الفرعية التحفيزية ترتبط إلى جزيئات المواد الأساس بينما الوحدات الفرعية المنظمة ترتبط إلى المثبطات المنظمة مثلCTP، عندما الوحدات الفرعية المنظمة فارغة، فإن الإنزيم يكون في أقصى نشاطه وعند تجمعCTP، فأنه يرتبط مع الوحدات الفرعية المنظمة مما يسبب تغير في الهيئة التركيبية للإنزيم وهذه التغيرات تحوله إلى الوحدات الفرعية التحفيزية والذي تتحول إلى الهيئة التركيبية غير الفعالة، وجود ATP يمنع حدوث التغيرات المحفزة بواسطةCTP.

Phosphofructokinase (PFKase): يعتبر واحد من الإنزيمات المهمة في السيطرة على عملية انحلال السكر وهو إنزيم رباعي الوحدات الذي يثبط بواسطة تركيز مرتفع منATP الذي تخفض ألفة الإنزيم تجاه الفركتوز- 6- فوسفيت كمادة أساس، التركيز العالي من ATP يحول منحني الارتباط من hyperbolic لسكر الفركتوز-6- فوسفيت إلى منحني Sigmoidal، التأثير المنظم ناتج عن ارتباط ATP إلى الموقع المنظم الخاص الذي يمكن تميزه عن الموقع التحفيزي، العمل المثبط للمركب ATP يمكن عكسه بواسطة AMP ويزداد نشاط الإنزيم عندما تقل نسبة ATP على AMP ويمكن تحضير انحلال السكر عندما تقل شحنة الطاقة للخلية ويمكن تثبيط الإنزيم بواسطة السترات وهي من المركبات الوسطية في دورة حامض الستريك فأنه يزيد من التأثير المثبط للمركب ATP وهو الذي يساعد في فسفرة الفركتوز-6- فوسفيت إلى فركتوز 2,1- ثنائي فوسفيت في تفاعلات انحلال السكر الذي يحتاج إلى أيون المغنيسيوم الذي يحفز نقل مجموعة الفوسفيت

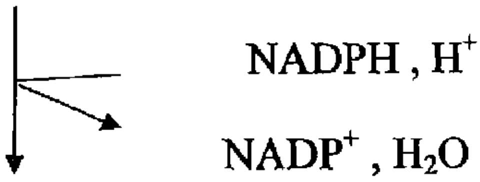
من ATP إلى فركتوز-6- فوسفيت في الموقع الأول وتفاعلاته اللا عكسية تحت الظروف الفسيولوجية للخلية، وهو من الإنزيمات المنظمة المهمة في انحلال السكر، يعجل نشاطك بواسطة ATP، ففي العضلات الهيكلية يمكن تنظيم سرعة التفاعلات المحفزة بواسطة الإنزيم بواسطة السيطرة على تراكيز المادة الأساس مثل ATP والفركتوز -6- فوسفيت ومنتجاته مثل ADP والفركتوز-6,1- ثنائي الفوسفيت الذي تعمل كمنظمات إنزيمية وكذلك تكون مهمة كمعدلات منظمه مثل AMP والسترات وأيون المغنيسيوم وبعض المركبات الوسطية الأخرى في الأنسجة العضلية (جدول-21) بينما تنظيم الإنزيم يتضمن التداخلات المعقدة للعوامل التالية مثل السترات و ATP الذي تكون معدلات منظمه مهمة و AMP والفركتوز-6,1- ثنائي فوسفيت من اكثر المعدلات التحفيزية الفعالة.

جدول(21) بعض المحفزات والمثبطات المنظمة لإنزيم الفوسفوفركتوكاينيز

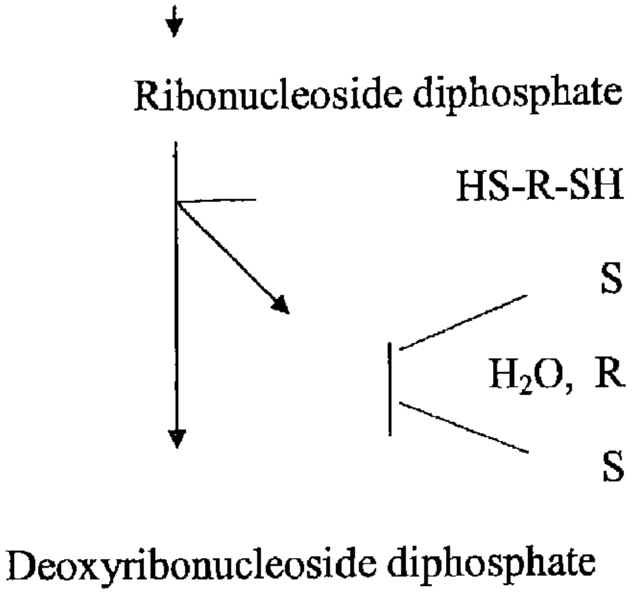
المثبط	المنشط
ATP Citrate Mg^{+2} Ca^{+2}	AMP ADP Phosphate K+

Ribonucleoside reductase (RRase): يسمى ribonucleoside diphosphatase أو ribonucleoside diphosphate reductase الذي يلعب دورا مهما في تخليق deoxy ribonucleotides وهي مولدات DNA الناتجة عن اختزال الرايبونيوكليوتيدات حيث يتم استبدال مجموعة الهيدروكسيل على سكر الرايبوز بواسطة الهيدروجين.

ribonucleoside diphosphate



Deoxyribonucleoside diphosphate



المادة الأساس في هذا التفاعل هي الرايبونيوكليوسيد ثنائي الفوسفيت في بكتريا القولون واللبائن وينتقل الإلكترون من NADPH إلى المادة الأساس من خلال سلسلة من مجاميع السلفاهيدريل في حالة بكتريا القولون ويساعد الإنزيم في تحفيز المرحلة الأخيرة من التفاعل ويتألف الإنزيم من وحدتين فرعية هما B_1,B_2 وكلاهما ثنائية الوحدات dimer B_1 تحتوي مجاميع ارتباط للمادة الأساس ribonucleosides والمؤثرات المنظمة بالإضافة إلى ذلك تحتوي على مجاميع سلفاهيدريل الذي تعمل كواهبات إلكترونية وسطية في اختزال وحدة الرايبوز بينما الوحدة الفرعية B_2 فهي بروتين – كبريت – حديد تساهم في التحفيز بواسطة تكوين جذور حرة غير اعتيادية على الحلقة العطرية للحامض الأميني التيروسين، الوحدات الفرعية B_2,B_1 معا تكون المواقع الفعالة في الإنزيم، ففي بكتريا القولون ومن المحتمل في اللبائن، فإن البيورين والبيرميدين نيوكليوسيد ثنائي الفوسفيت مثل CDP ,GDP,ADP يتم اختزالها في ذرة الكربون الثانية من سكر الرايبوز بواسطة RRase لتكوين رايبونيوكليوسيد منزوع الأوكسجين ثنائي الفوسفيت، تحت الظروف الفسيولوجية للإنزيم، فإن thioredoxin (بروتين فلافيني – سلفاهيدريل – حديد) يهب أيون الهيدروجين وإلكترونات لاختزال الرايبونيوكليوسيد ثنائي الفوسفيت إلى deoxy ribonucleoside diphosphate حيث يتم اختزال thioredoxin إلى الشكل الأصلي بواسطة NADPH والبروتين الفلافيني المسمى thioredoxin reductase.

Isocitrate dehydrogenase: يعتبر من الإنزيمات المهمة لانه أول إنزيم في دورة حامض الستريك الذي يكون غير عكسي له تأثيرات منظمة حيث يمكن تنشيطة بواسطة ADP الذي يخفض من قيمة ثابت ميكليس تجاه الايزوستريت، نقص ADP دلالة إلى الحاجة إلى الفوسفيت ذات الطاقة العالية ويثبط بواسطة NADH في الموقع المنظم أي انخفاض في الفسفرة التاكسدية يؤدي إلى تجمع NADH عندما NADH مرتفعة، فإن NAD^+ يجب أن تكون منخفضة وتحتاج إلى NAD^+ كمادة أساس للتفاعل وترتبط NADH مع الموقع المنظم لخفض نشاط الإنزيم وأي عامل يسيطر على isocitrate dehydrogenase يؤدي إلى السيطرة على citrate synthetase لان التغيرات في تركيز الايزوستريت يصاحبها تغير في تركيز السترات ويعمل الإنزيم على نزع الهيدروجين من الايزوستريت لتكوين اوكزالوسكسنيت الذي يرتبط مع الإنزيم وهناك نوعين من الإنزيم أحدهما مرتبط مع NAD^+ والآخر مرتبط مع $NADP^+$ والذي يوجد في المايتوكوندريا، الإنزيم المرتبط مع NAD^+ يحفز أكسدة الايزوسترات في دورة حامض الستريك بينما المرتبط مع $NADP^+$ له علاقة في التفاعلات التخليقية الحيوية للدورة، فأن الإنزيم المرتبط مع NAD^+ هو إنزيم منظم الذي يحتاج إلى ADP كمنشط خاص له وعند غياب ADP يقل نشاط الإنزيم، الإنزيم المرتبط مع NAD^+ بواسطة ATP, NADH الذي تثبط نشاط الإنزيم وهي اكثر منافسة مع NAD^+.

Aspartate kinase: الثريونين هو الناتج النهائي في تحويل حامض الاسبارتيك إلى الثريونين الذي يكون معدل مثبط للإنزيم الأول Asp kinase مما يمنع تحويل حامض الاسبارتيك إلى بيتا – اسبارتيل فوسفيت.

الفصل السادس عشر

الإنزيمات في المستحضرات البيولوجية

الإنزيمات في المستحضرات البيولوجية

1. **اختيار المستحضر:** لا يوجد مستحضر مثالي لدراسة خواص الإنزيم والية التفاعلات دون حدوث تعقيدات بسبب وجود الإنزيات المختلفة والتفاعلات المختلفة مما يؤدي ذلك إلى فقدان التنظيم الخلوي إلا أن عزل الإنزيم من البيئة الخلوية الطبيعية قد يؤثر على الخواص الأصلية للإنزيم مما يصعب التعرف على الدور الفسيولوجي له ولا جل الحصول على الخواص والصورة الكاملة للإنزيم لابد من عزل الإنزيم وتنقيته وحفظة من المستخلص على درجة حرارة اقل من 4 م للإقلال من التحلل الذاتي للخلايا مما يفقد نشاطه الإنزيمي ومن ثم دراسة الخواص الإنزيمية عندما يكون موجودا في مستحضرات بيولوجية ذات تراكيب خلوية محافظة على حالتها الأصلية وتختلف الحالة الأصلية للإنزيات حسب طبيعة مصدرها فأن دراسة الإنزيات في الأحياء المجهرية المتكونة من خلية واحدة اسهل واقل تعقيد من دراسة الإنزيات في النباتات والحيوانات لأن دراسة الإنزيات في الأنسجة الحيوانية والنباتية تتطلب دراسة المعلومات الوافية حول العمليات الحياتية وتتطلب دراسة الإنزيات أجراء تقانات تقطيع الأنسجة للمحافظة على بنية الأنسجة حيث يتم تقطيع الأنسجة إلى شرائح رقيقة باستعمال آلة حادة مثل microtome وهي اله تعطي شرائح بسمك ثابت بحيث يكون سمك الشريحة 0,5 ملم، نقص السمك يسبب تلف كمية كبيرة من الخلايا وزيادة السمك يسبب حدوث مشاكل لها علاقة بنفاذية الخلايا وتحقن الشريحة في وسط مناسب ذو درجة حرارة مثلى مسيطر عليها واس هيدروجيني مناسب وهناك تقنية مناسبة لتجنب تلف الخلايا باستعمال الرش وذلك بوضع النسيج في بيئة سائلة مزودة بكمية كافية من الأوكسجين لتستطيع الخلايا أن تقوم بوظائفها الخلوية أثناء الدراسة ويمكن التغلب على المشاكل والصعوبات الناجمة عن عدم ملامسة الخلايا المختلفة في النسيج للوسط الذي توجد فيه بصورة متساوية وذلك بتحضير النسيج المغزول ومعاملته بواسطةcollagenase أو أي إنزيم محلل للبروتين وذلك لتثبيت الخلايا عن بعضها البعض الآخر وان يكون النسيج في وسط معتدل لتحافظ معظم الخلايا المعزولة على خواصها الأصلية مما تتمكن الخلايا منع حدوث تلف البروتين الموجود على سطح الخلايا ونتيجة توفر الظروف المناسبة، فإن الخلايا المعزولة تتمكن من

النمو والانقسام مما يزداد عددها ولكن المشكلة التي تواجه العينات هب بقائها لفترة طويلة مما يؤدي ذلك إلى تلوثها بواسطة الأحياء المجهرية، كما أن بعض الخلايا قد تفقد وظائفها الدقيقة بمرور الوقت ويمكن تجنيس النسيج في وسط ذو 0,25 مول سكروز لتثبيت الخلايا وتحرير محتوياتها دون تلف العضيات المتخصصة في الخلية أو من الممكن الحصول على نظام خالي من الخلايا عند خلط العضيات المتخصصة للخلية المعزولة مع السايتوبلازم وتختلف طرق تجنيس الأنسجة حسب مصدرها فغالبا ما يتم تجنيس الأنسجة الطرية عن طريق دفع النسيج خلال فتحة ضيقة قطرها 0,3 ملم باستخدام جهاز Ten Broeck أو جهاز Potter-Elvehjam بينما يستخدم خلاط Waring في حالة الأنسجة الليفية الذي مصدرها القلب أو الأنسجة النباتية ذات الجدار الخلوي الصلب لأن الشفرات في تلك الخلاطات تعمل على تشتيت الخلايا بشكل متجانس ومن عيوبها أن تشتيت العضيات الخلوية المتخصصة وتتعرض المستحضرات الخالية من الخلايا في الأحياء المجهرية إلى ذبذبات صوتية عالية مما تؤدي إلى تلف غشاء الخلية، أن دراسة الإنزيمات والعمليات الايضية تتطلب استعمال مستحضرات خالية من الخلايا وبالرغم من كل ذلك، فإن النتائج المستحصل عليها تختلف نوعا ما عن الإنزيمات النقية وذلك لأنها قد تعطي قيم مختلفة لثابت ميكليس – منتن والإنزيمات التي يحصل عليها بالطريقة تشترك بفقدها التركيب الخلوي الأصلي ولا تعطي تمثل دقيق لما يحصل في الكائن الحي ولأجل الحصول على نتائج جيدة لابد من اتخاذ الإجراءات المناسبة مع الحذر الشديد.

2. **تقدير الإنزيمات:** الغرض من تقدير نشاط الإنزيم هو التعرف على كمية الإنزيم ذو الصفات المعلومة الموجودة في مجنس النسيج أو في سائل ما أو في مستحضر نقي جزئيا وتستخدم أنواع مختلفة من القياسات الحركية السريرية والصناعية والتجريبية ومن أهم الاختبارات السريرية هي تقدير الإنزيمات في الدم لأن الظروف الذي تسبب تلف أنسجة معينه ناتج عن تحرير كميات كبيرة من الإنزيمات إلا أن تركيز الإنزيمات يقدر في عينات الأنسجة أو في الخلايا المزروعة وخاصة في حالة التشخيصات الوراثية الشاذة لا تزال من الناحية العملية تستخدم تحاليل رياضية لحركيات التقديرات الروتينية والذي تتضمن حضن عينه واحدة تحت ظروف ثابتة لتقليل تأثير تغيرات المادة الأساس والناتج عندما يكون الإنزيم في حالة نشاط واستخدام تركيز عالي من المادة الأساس،

فعلى سبيل المثال لو بدأ التفاعل بتركيز مادة أساس هو 10 ثابت ميكليس وسمح ليست أكثر من 0,1 من الكمية أن تتحول إلى ناتج، فأن سرعة التفاعل الإنزيمي تقل حوالي 1% خلال التقدير عندما لا يتأثر الناتج، فأن المادة الأساس تقل من 10 إلى 9 ثابت ميكليس والسرعة الأولية من0,91 إلى 0,90 من السرعة القصوى ونصف كمية الإنزيم في العينه يكون 1% من نصف كمية المنتوج في وقت معين تحت نفس الظروف أي أن كمية الناتج تتناسب طرديا مع كمية الإنزيم في العينه لذلك يجب أن تكون هناك طرق تحليلية حساسة لناتج التفاعل أو اخذ خطوات لإزالة الناتج المتكون بأسرع ما يمكن لذلك من المفضل عند تقدير الإنزيم إضافة زيادة من إنزيم آخر لتحفيز التفاعل الإضافي لناتج التفاعل أو إضافة بعض الكواشف الذي تتفاعل اختياريا مع الناتج وتحوله إلى مركب آخر زمن الممكن استخدام الإنزيم لتحليل تركيز المركبات في العينه حتى عندما لا يوجد هناك توازن.

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^{+} \longrightarrow \text{lactate} + \text{NAD}^{+}$$

نلاحظ بأن NADH تملك peak absorption للضوء في طول موجي 340 نانوميتر بينما لا يحدث ذلك في NAD^{+} لذلك فأن التفاعل لا يمكن تتبعة عند انخفاض الامتصاص للضوء في هذا الطول الموجي والتغير في الامتصاصية يمكن تتبعة خلال فترات زمنية لتقدير الإنزيم أو زيادة الإنزيم يمكن أضافتها إلى عينه مجهولة وتتبع التفاعل حتى الاكتمال لقياس كمية البيروفيت في العينه التفاعل لا يمكن أن يستخدم لتقدير اللا كتيت لان التوازن لا يكون لصالح تكوين البيروفيت، إلا أن التقدير يصبح ممكن عندما يضاف الهيدرازين في خليط التفاعل لإزالة البيروفيت مما يجعل التوازن الكلي لصالح أكسدة اللاكتيت ولما كانت التغيرات الحاصلة بسبب التحلل الذاتي والحنترة تزداد مع مرور وقت الخزن لذلك يجب أجراء التقديرات على الفعالية للإنزيمات بأسرع وقت ممكن وإذا لم يتم التحلل يجب حفظ العينه بدرجات حرارية منخفضة جدا –60م للحد من فقدان نشاط الإنزيم إلا أن تجميد النسيج قد يزيد من تشقق الخلايا.

التقدير الكمي لنشاط الإنزيم: يمكن تقدير نشاط الإنزيم في محلول معين أو مستخلص الأنسجة ولا جل تقدير نشاط الإنزيم من الضروري معرفة:

1. معادلة التفاعل المحفز.
2. الطريقة التحليلية لتقدير اختفاء المادة الأساس أو ظهور نواتج التفاعل.
3. هل الإنزيم يحتاج إلى عوامل مرافقة مثل الأيونات المعدنية أو المرافقات الإنزيمية
4. اعتماد نشاط الإنزيم على تركيز المادة الأساس مثل ثابت ميكليس – منتن للمادة الأساس.
5. الأس الهيدروجيني الأمثل للتفاعل الإنزيمي.
6. درجة الحرارة الذي يكون فيها الإنزيم ثابت ويملك أعلى نشاط.

أي في أي أس هيدروجيني امثل وفي أي تركيز للمادة الأساس أو في أي درجة حرارة مناسبة لنشاط الإنزيم والذي غالبا ما تكون بين 25 إلى 38م مع تركيز مادة أساس قريب من التشبع، تحت تلك الظروف، فأن سرعة التفاعل الأولية تتناسب مع تركيز الإنزيم حيث تكون سرعة التفاعل الأولية هي رتبة – صفر (zero-order) للمادة الأساس أما في الحالات التي يحتاج فيها الإنزيم إلى عوامل مرافقة مثل الأيونات المعدنية والمرافقات الإنزيمية فأن العوامل المرافقة يجب أن تضاف في تركيز يؤدي إلى الإشباع لذلك يكون تركيز الإنزيم هو عامل تحديد السرعة rate-limiting factor في النظام أي تركيز عال من المادة الأساس وتركيز واطئ من ناتج التفاعل مع درجة مناسبة من الحرارة والآس الهيدروجيني، إن قياس سرعة تكوين ناتج التفاعل اكثر دقة من قياس اختفاء المادة الأساس لأن المادة الأساس موجودة بتركيز مرتفع نسبيا للحفاظ على الرتبة – صفر ويقاس ناتج التفاعل بطرق طيفية كيمياوية معينه والطرق الطيفية اكثر فائدة لأنها تعطي قياسات مستمرة للتفاعل وقد عرفت المنظمة العالمية للكيمياء وحدة واحدة من نشاط الإنزيم بأنها تلك الكمية الذي تسبب تحويل واحد ميكرومول من المادة الأساس لكل دقيقة بدرجة 25 م تحت الظروف المثلي للقياس، فالنشاط النوعي هو عدد الوحدات الإنزيمية لكل مليغرام من البروتين والنشاط النوعي هو قياس نقاوة الإنزيم الذي يزداد خلال التنقية للإنزيم ويصبح في الحد الأقصى ويكون ثابت عندما يكون الإنزيم بحالة نقية، عدد الانقلاب أو التحول للإنزيم هو العدد من جزيئات المادة الأســـاس المتحولة لكل وحدة وقت بواسطة إنزيم منفرد أو بواسطة موقع فعال منفرد عندما الإنزيم يكون في حالة عامل تحديد السرعة (جدول-22) ويعتبر carbonic anhydrase من الإنزيمات المهمة الموجودة بتركيز مرتفع في

كريات الدم الحمراء وهو من اكثر الإنزيمات فعالية مع رقم تحول 36000000 لكل دقيقة لكل جزيئة إنزيم وهو يحفز إضافة الماء إلى ثاني اوكسيد الكربون لتكوين حامض الكربونيك والذي تعتبر خطوة مهمة في نقل ثاني اوكسيد الكربون من الأنسجة إلى الرئة حيث يتم تحريره وبواسطة تطبيق طرق التقدير الكمية لمعرفة نشاط الإنزيم في أجزاء البروتينات المعزولة بواسطة طرق مختلفة مثل مجال الهجرة الكهربائية.

جدول(22) أرقام التحويل في بعض الإنزيمات

الإنزيم	الانقلاب
Carebonic anhydrase	36000000
Beta –amylase	1100000
Beta –galactosidase	12500
Phosphoglucomutase	1240
Succinate dehydrogenase	1150
Δ^3-ketosteroid isomerase	17100000
Acetyl chloinesterase	150000
Penicilinase	120000
Chymotropsin	6000
DNA polymerase	900
Try-synthetase	120

وتستخدم بعض الأحيان وحدة بودانسكي Bodansky واحدة من نشاط الإنزيم للفوسفاتيز هي كمية الإنزيم المحفز لتكوين ملغم واحد من الفسفور على شكل فوسفيت غير عضوي في 100مل من المصل خلال ساعة واحدة تحت ظروف معينه من الحامضية ودرجة الحرارة ويمكن الاستفادة من امتصاص الضوء عند طول موجي 330 نانوميتر عند استعمال المرافقات الإنزيمية NADPH, NADH وليست NAD^+,$NADP^+$ حيث عند تغير NADH إلى NAD^+ وبالعكس تتغير الكثافة الضوئية عند طول موجي 340 نانوميتر حيث يتناسب معدل تغير الكثافة الضوئية تحت ظروف معينه طرديا مع نشاط الإنزيم لذلك يمكن تعريف وحدة الإنزيم لأي إنزيم نازع للهيدروجين بالتغيير الحاصل في الكثافة الضوئية بمقدار 0,001 عند طول موجي 340 نانوميتر خلال دقيقة واحدة.

3. **تقدير حركية النشاط التحفيزي:** تتعامل حركية الإنزيم مع سرعة التفاعلات الإنزيمية لقياس كمية ونشاط الإنزيم ويستفاد من قياس سرعة التفاعلات الإنزيمية في المختبر لتعين حركية النشاط التحفيزي للإنزيمات للاستعمالات النظرية والعملية ولتقدير تركيز الإنزيم في عينه مجهولة ويتم ذلك من خلال قياس ثابت ميكليس والسرعة القصوى للإنزيمات بسهولة بواسطة جعل القياسات تحت ظروف معينه من درجة حرارة وحموضة وذلك للحصول على تكوين اقل ما يمكن من ناتج التفاعل أدنى تغير في تركيز المادة الأساس خلال التفاعل وناتج التفاعل يحصل علية لكل وحدة وقت يقدر السرعة الأولية للتفاعل والسرعة هي معدل التفاعل الإنزيمي بعد الحالة المستقرة الذي يصل لها التفاعل، لكن قبل حصول الانخفاض بسبب تغيرات في ناتج التفاعل وتركيز المادة الأساس، الوقت اللازم لوصول الحالة المستقرة هو اقل من لو تم أجراء عدد من التقديرات للسرعة الأولية في تراكيز مختلفة من المادة الأساس ويمكن تحليل نتائج الدراسة في طريقتين هما من خلال التحاليل الجبرية وملاحظة التغيرات في تراكيز الناتج بالإضافة إلى التغيرات في تراكيز المادة الأساس بينما الطريقة الثانية هي طريقة بيانية والذي تتضمن تحويل واعادة ترتيب لمعادلة ميكليس – منتن.

$$1/v = km + S / Vmax \ \ x\ S = km / Vmax \ \ x\ 1/S + 1/Vmax$$

عندما يكون التغير هو 1/S/1 ,v سنحصل على معادلة خطية بسيطة من نوع Y=ax + b الذي يمكن حلها بواسطة تحليل linear regression أو بواسطة تحليل بياني حيث أن مقلوب السرعة الأولية هو رسم كوظيفة لمقلوب تركيز المادة الأساس عندما حركيات ثابت ميكليس توصف التفاعل، فأن النتيجة ستكون خط مستقيم ويختلف النشاط النوعي specific activity عن النشاط التحفيزي catalytic activity أو رقم التحول لإنزيم ما بعدد التحول K cat لكل مول إنزيم وبإمكان الفحوصات الإنزيمية المبينة على تقديرات النشاط التحفيزي، أن التفريق بين الصيغ الفعالة وغير الفعالة للإنزيمات لان تلك الفحوصات لا تكشف عن الصيغ غير الفعالة إلا أن هذه الطرق لا تفرق بين الإنزيمات المتناظرة مما تجعل نشاط الإنزيم المقاس هو عبارة عن مجموع نشاطات الصيغ الفعالة جميعا، يستنتج من ذلك فان التقديرات الحركية تعطي مؤشرا على التركيز النسبي لإنزيم ما في المستحضر.

4. التقديرات الحركية المزدوجة **coupled kinetic assays**: يمكن قياس التغيرات التي تحصل في تفاعل إنزيمي معين عندما يتم الربط مع تفاعل آخر يسهل عندة قياس التغيرات الحاصلة فعلى سبيل المثال يقوم Ala transferase بالمساعدة في تفاعل Ala مع 2-oxyglutarate.

$$\text{L- Ala} + \text{2-oxyglutarate} \longleftrightarrow \text{L-Glu} + \text{pyruvate}$$

المواد المتفاعلة أو المواد الناتجة لا تعطي أي لون ولا تمتص الأشعة فوق البنفسجية إلا انه بالإمكان متابعة التفاعل باستخدام جهاز الطيف عندما يربط مع تفاعل ثاني عندما يستعمل البيروفيت الناتج من التفاعل الأول كمادة أساس للإنزيم lactate dehydrogenase.

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^{+} \longleftrightarrow \text{lactate} + \text{NAD}^{+}$$

حيث يمتص NADH الضوء على طول موجي 340 نانوميتر وبذلك يمكن تتبع سير التفاعل ومراقبته على هذا الطول الموجي حيث يكون التفاعل الثاني كمؤشر لسرعة التفاعل الأول.

فعلى سبيل المثال التفاعل التالي:

$$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C$$

حيث أن الإنزيم الأول E_1 يساعد في التفاعل الأولى وان الإنزيم الثاني E_2 يساعد في التفاعل الكاشف، في الوقت صفر، فأن $t = 0$ حيث يكون تركيز كل من المادة B والمادة C يساوي صفر ويكون تركيز A كمية ثابتة وغير محدودة فعندما تكون هناك مواد أساس أو عوامل مرافقة لإنزيمات E_1، E_2 مثل NADH كمادة أساس مرافقة وكان الإنزيم الثاني هو lactate dehydrogenase وعندما تكون تلك المواد في بداية التفاعل عند تراكيز ثابتة وغير محددة وخلال استمرار سير التفاعل، فأن تركيز البيروفيت (B) الذي فيه E_2

هو lactate dehydrogenase سيزداد تركيز البيروفيت الأصلي الذي كان صفرا، فأن سرعة التغير في تركيز البيروفيت [B] هي $d[B]/dt = v_1 - v_2$ حيث أن v_1 = سرعة التفاعل الأولي وv_2 = سرعة تفاعل الكاشف وعندما يكون الإنزيم الذي يساهم في التفاعل هو واحد فإن v_1 تصل إلى قيمة ثابتة في الحال عند التفاعل وتبقى لبضع دقائق في حين ستكون قيمة v_2 الأولية صفرا لان تركيز البيروفيت [B] في البداية كان صفرا حيث تزداد قيمة v_2 كلما ازداد تركيز [B] طبقا لمعادلة ميكليس- منتن

$$v_2 = V^B max\ [B] / [B]K^Bm$$

وبما أن $Vbmax, k^Bm$ لها علاقة بالتفاعل الذي يساهم في الإنزيم الكاشف E_2 لبضع دقائق وبعد أن تصل v_1 إلى قيمة ثابتة.

$$d[B] / dt = v_1 - V^B max\ [B] / [B] + K^Bm$$

ففي الأنظمة المزدوجة يجب أن يصل تركيز B إلى قيمة ثابتة وبسرعة عالية للوصول إلى الحالة المستقرة في النظام بالسرعة الممكنة لفترة قصيرة تكفي للوصول إلى الحالة المستقرة حيث أن V^Bmax تتناسب طرديا مع تركيز الإنزيم الثاني، لذلك كلما كان تركيزE_2 عاليا كلما سهل ذلك من الحصول على الحالة المستقرة للنظام في وقت سريع أي أن $v_1=v_2$ أما إذا كانت كمية E_2 قليلة جدا بحيث تصبح V^Bmax اقل منv_1 وففي هذه الحالة لا يمكن الوصول إلى الحالة المستقرة على الإطلاق مما يترتب على ذلك استمرارية زيادة قيمة تركيزB عند ذلك لا تصل قيمة v_2 إلى قيمةv_1 على الإطلاق مما يتوجب ذلك إضافة كمية كافية من الإنزيم الكاشف إلى نظام التفاعل المزدوج لضمان مرور اقل وقت ممكن قبل الوصول إلى الحالة المستقرة لكي تكون سرعة التفاعل الكاشف تتفق تقريبا مع سرعة التفاعل الأول، يجب أن يراعى الأس الهيدروجيني في التفاعل المزدوج بحيث تصبح جميع الإنزيمات نشطة على أس هيدروجيني الذي يجري فيه التفاعل وقد تحدث مشاكل عندما يكون المدى للأس الهيدروجيني ضيق لعمل الإنزيمات، ففي المثال التالي لتحويل السكروز إلى ماء والأوكسجين تساهم ثلاث إنزيمات والذي يكون اكثر تعقيد من التفاعل المزدوج، فأنه بالإمكان قياس نشاط إنزيم الانفرتيز بوجود كميات غير محددة من السكروز والأوكسجين والكلوكوز اوكسيديز والبيروكسيديز، فالانفرتيز فعال على أس هيدروجيني في حدود 5

والكلوكوز اوكسيديز في حدود 7-8 والبيروكسيديز فعال في حدود 10 ففي هذه الحالة من الصعب ربط فعالية الإنزيمات الثلاثة وقياسها على قيمة واحدة للأس الهيدروجيني إلا انه بالإمكان كل من الكلوكوز اوكسيديز والبيروكسيديز فعالة في حدود 8.5 حيث يمكن الاستفادة من ذلك في التفاعل المزدوج لقياس نشاط تحفيز إنزيم كلوكوز اوكسيديز.

invertase

sucrose ⟶ fructose + glucose

↓ ← O, glucose oxidase → gluconolactone

H_2O_2

↓ ← Chromogen , Peroxidase → Dye

$H_2O + \frac{1}{2}O_2$

5. **تقدير المناعة الإشعاعية للإنزيمات:** المادة المستخدمة في هذا النوع من التقدير تستخدم مادة هي جين مضاد antigen لها جسم مضاد متخصص antibody حيث يملك موقع متخصص للجين المضاد والجين المضاد يجب أن يكون نقي ومعلم بمادة مشعة حيث يتم خلط العينه الحاوية على الإنزيم المراد تقديرها مع جسم مضاد بوجود كمية قليلة من الجين المضاد المعلم بالمشع ويترك التفاعل إلى أن يصل إلى حالة التوازن.

antigen + antibody ⟷ antigen –antibody

antigen^{+} + antibody ⟷ antigen^{+} -antibody

يتم فصل الجسم المضاد مع الجين المضاد المرتبط به من الجين المضاد الحر وتقدير نسبة توزيع مادة العنصر المشع بين الجين المضاد الحر والمرتبط، الجين المضاد المعلم يتنافس مع الجين المضاد في العينه على موقع الارتباط الموجود على الجسم المضاد فكلما كان تركيز الجين المضاد مرتفع في العينه كلما كانت كمية الجين المضاد المشع المرتبط مع الجسم المضاد اقل مما يسهل ذلك من تقدير تركيز الجين المضاد في النموذج عندما يكون محتوى الجين المضاد المعلم حر وتحضر الأجسام المضادة للإنزيمات على هيئة مصل مضاد من خلال تحصين الأرانب مع الإنزيمات المرغوبة فعلى سبيل المثال يحتوي دم الأرنب المحصن على ألفا- اميليز البنكرياسي على كمية كافية من الأجسام المضادة بعد أسابيع قليلة من حقن الإنزيم في اسفل قدم الأرنب إلا أن من الصعوبات في هذا المجال هي صعوبة الحصول على عينات نقية من الإنزيم المشع المعلم ومن الصعوبات الأخرى هي الجين المضاد هو مادة بروتينية مثل الجسم المضاد فمن الصعب فصل الجين المضاد الحر من المركب المعقد بين الجين المضاد للجسم المضاد مقارنه مع الجين المضاد الموجود بكمية قليلة ويمكن معالجة ذلك بربط الجسم المضاد بسطح غير ذائب أو العمل على إدخال تفاعلات إضافية بين الجين المضاد- الجسم المضاد، لذلك عند استعمال مصل مضاد antiserum من الأرنب يتم ترسيب المركب المعقد بين الجين المضاد- الجسم المضاد مع كلوبيولين مضاد للماعز، لذا يختلف كثيرا الموقع الذي يرتبط في الإنزيم مع الجسم المضاد على الموقع الفعال للإنزيم ويمكن الكشف عن وجود الصيغ غير الفعالة للإنزيمات الأولية بواسطة تقدير المناعة الشعاعية عندما يحتوي على القسم التركيبي الذي يمكن التعرف علية بواسطة الجسم المضاد وهذه الطريقة تكون متخصصة للإنزيمات المتناظرة ولإنزيم واحد فقط وهذه الطريقة حساسة جدا فهي تقدر حساسية 1000 مرة اكثر من الطرق الأخرى.

6. **التقسيم الخلوي الثانوي للإنزيمات:** النماذج الايضية للخلايا حقيقية النواة eucartotic cells تتأثر بوجود التقسيمات، الخلال لسكر، مسلك فوسفيت السكر الخماسي وتخليق الأحماض الدهنية تحدث في السايتوسول بينما أكسدة الأحماض الدهنية ودورة حامض الستريك والفسفرة التاكسدية تتم في المايتوكوندريا، بعض العمليات مثل تخليق السكر من مصادر غير كربوهيدراتية وتخليق اليوريا تعتمد على التفاعلات التي تحدث في كلا التقسيمات، مصير بعض الجزيئات يعتمد على فيما إذا

كانت تقع في السايتوسول أو في المايتوزكوندريا وكذلك مرورها خلال غشاء المايتوكوندريا الداخلي الذي يجب أن يكون المرور منظم، فعلى سبيل المثال يحصل تحليل سريع للأحماض الدهنية المنقولة إلى المايتوكوندريا بالمقارنة مع الأحماض الدهنية في السايتوسول الذي تتم استرتها أو نقلها ويتم نقل الأحماض الدهنية طويلة السلسلة إلى حشوة المايتوكوندريا بشكل استرات كارنتين مما يسهل ذلك من حملها ومرورها خلال الغشاء المايتوكونديري الداخلي، أن موقع الإنزيمات في دورة حامض الستريك أما في الغشاء الداخلي أو في الحشوة الداخلية، حيث ترتبط بدورة حامض الستريك عدد كبير من المرافقات الإنزيمية مثل NAD^+ ,FAD , TPP ,lipoic acid ,CoA-SH والعوامل المرافقة مثل GDP, ADP, Mg^{+2} يمكن فصلها بسهولة ويمكن دراسة تقسيم الإنزيمات بإحدى الطريقتين هما:

أ. **كيمياء أنسجة الإنزيمات enzyme histochemistry**: يمكن الكشف عن الموقع الخلوي للعديد من الإنزيمات بواسطة المجهر حيث يتم تجميد النسيج بدرجة -20م ثم الحصول على شرائح باستعمال أجهزة تقطيع cryoatat، يجب أن يكون النسيج صلب للحصول على شرائح رقيقة قطرها 10 ميكروميتر كلما كانت اقل يقل فقدان نشاط الإنزيم ويتم تثبيت الشرائح بواسطة الفورمالديهايد لمنع حدوث انتشار البروتينات كما يساعد الفورمالديهايد في أحداث ربط – تقاطعي بين المجاميع الأمينية في السلسلة الطرفية للبروتينات وتحتفظ معظم الإنزيمات ببعض من نشاطها بعد المعاملة السابقة إلا أن قسما منها يفقد نشاطه التحفيزي الذي يكشف عنها بدون تثبيت وفي كلتا الحالتين يعامل مقطع النسيج مع محلول منظم لخليط ملون يحتوي على المادة الأساس للإنزيم المرغوبة دراسته وتحتاج عملية التلوين تحويل المادة الأساس إلى ناتج مناسب يفضل أن يكون الناتج غير متحرك بعد تكوينه لمنع انتشاره بعيدا عن موقع الإنزيم، فعلى سبيل المثال يحتوي محلول المادة الأساس لطريقة ملح الرصاص لتقدير نشاط الإنزيم acid phosphatase على بيتا – كلسيروفوسفيت وأيونات الرصاص لتكوين فوسفيت الرصاص في محلول منظم ذو أس هيدروجيني 5.5 يعمل إنزيم الفوسفاتيز الحامضي الموجود في النسيج على تحليل كلسيروفوسفيت.

$$\text{glycerophosphate} \longrightarrow \text{glycerate} + \text{Pi}$$

حيث يتفاعل الفوسفيت المتحرر مع أيونات الرصاص لتكوين فوسفيت الرصاص غير الذائبة مما يتحول إلى مركب غير ذائب باستعمال محلول كبريتيد الأمونيوم.

$$PbPO_4 + (NH_4)_2S \longrightarrow PBS$$

يمكن ملاحظة تكوين راسب اسود من كبريتيد الرصاص حيث يظهر الفوسفاتيز الحامضي العديد من الصبغات التي يمكن ملاحظتها بوضوح بواسطة المجهر الضوئي والذي لا يمكن استخدام المجهر الإلكتروني لأن المكونات من الذرات لتلك الصبغات لا يكون اكثر عتمه للحزمه الإلكترونية من الذرات الموجودة في النسيج وتتمكن الذرات ذات الوزن الذري العالي من العناصر المعدنية الثقيلة من تشتيت حزمه الإلكترونات بكمية كافية مما يؤدي ذلك إلى أن يجعل موقع تلك الذرات أكثر عتمه من النسيج ويمكن الاستفادة من طريقة ملح الرصاص في فحوصات المجهر الإلكتروني لان فوسفيت الرصاص معتم للإلكترونات مما تترسب في المناطق التي يوجد فيها إنزيم الفوسفاتيز الحامضي ولا يستفاد من المجهر الإلكتروني في تحويل فوسفيت الرصاص إلى كبريتيد الرصاص لان كليهما تسببان نفس العتمة للإلكترونات، الشرائح الذي تستعمل في المجهر الإلكتروني يجب إن تكون رقيقة جدا بحدود 80 نانوميتر لذلك تكون المقاطع التي يتم تحضيرها وتلوينها كما ذكر سابقا يجب إزالة الماء منها عن طريق إحلال الكحول محل الماء.

ب. **الطرد المركزي**: يمكن فصل المكونات الخلوية بالطرد المركزي لمجنس النسيج بسبب اختلاف المكونات الخلوية في خواصها التركيبية وخلال عملية الطرد المركزي، فأن جميع الدقائق ذات حجم وكثافة معينين تصل إلى قطر أنبوبة الطرد المركزي بوقت يعتمد على مجال الطرد المركزي، فالدقائق الأكثر كثافة ستصل إلى قعر الأنبوبة ويستعمل الطرد المركزي التفاضلي differential centrifugation لفصل المكونات الخلوية الثانوية عن بعضها البعض الآخر حيث يحضر مجنس النسيج في وسط ذو كثافة منخفضة جدا حوالي 0,25 مول سكروز ويعرض للطرد المركزي على مراحل متعددة بحيث تتم زيادة المجال للطرد المركزي في كل مرحلة لاحقة ثم يتوقف الطرد المركزي في نهاية مرحلة ترسيب الكريه التي تحتوي على دقائق ذات خواص ترسيبية متشابه ويمكن توضيح بسيط لتقسيم مجنس كبد الفأرحيث تترسب الدقائق الثقيلة أسرع من الخفيفة حيث يحصل توزيع متجانس للدقائق في المجنس فأن كل كرية pellet

تكون ملوثة بالدقائق الخفيفة ويمكن التغلب على هذه المشكلة بإعادة تعليق كل كرية في وسط جديد واعادة عملية الطرد المركزي ومن الصعوبات التي تواجه الطرد المركزي هي أن جميع الدقائق المترسبة تنتشر إلى الوراء باتجاه المناطق الأقل كثافة عند استعمال مجال الطرد المركزي المنخفض والصعوبة الأخرى هي أن بعض الدقائق مثل المايتوكوندريا واللايزوسومات تظهر صفات ترسيبية متشابه لان أحجامها تكون متقاربة من بعضها البعض الآخر بالرغم من اختلاف كثافتهما، بعض الأحيان يستخدم وسط غير متجانس في تقانات الطرد المركزي يطلق عليها الطرد المركزي متدرج الكثافة density gradient centrifugation ويمكن التغلب على المشاكل باستعمال طريقة الخطوة خطوة step-wise أو طريقة غير المستمرة discontinus حيث يوضع محلول فوق الآخر في أنبوب الطرد المركزي، فعلى سبيل المثال لو وضع المجنس أو أعيد تعليق الكريه في محلول 0,25 مول سكروز ويضع فوق محلول نقي ذو 0,5 مول سكروز ويتم تعرضة للطرد المركزي، فأن الكريه المتكونة لا تكون ملوثة بالدقائق الخفيفة لعدم وجود دقائق في قعر الأنبوبة ويمكن الحصول على افضل فصل باستعمال الطرد المركزي المتدرج الكثافة المستمر باستعمال معلم متدرج maker– gradient ويستعمل السكروز كمذاب، يستخدم الطرد المركزي ذو الكثافة المتدرجة لفصل المجاميع المختلفة للدقائق إلى مناطق على طول أنبوبة الكثافة المتدرجة بدلا من تكوين كرية في قعر الأنبوبة يستعمل دوار المنطقة centrifuge zonal rotar بدلا من أنبوبة الطرد المركزي البسيط الذي يطلق على الدوار اسم دوار اندرسون الذي هو عبارة عن قمع يحتوي على vanes and ducts بحيث يمكن إدخال المحلول السكري المسبق تدريج الكثافة فيه ثم يوضع النموذج على السطح العلوي للمحلول ذو الكثافة الأقل حيث تزداد الكثافة باتجاه الأسفل وتبدأ عملية الطرد المركزي ثم يتم سحب الوسط الذي يجمع بشكل أجزاء تكون محافظة على تدريج الكثافة الأصلية وبذلك يمكن تحرير الإنزيمات الموجودة في المكونات الخلوية الثانوية المحاطة بغشاء داخل المايتوكوندريا باستعمال الطرد المركزي، يمكن وجود الإنزيم في أحد الأجزاء بسبب ظروف التجنيس والفصل أو وجود الإنزيم في جزء ما بدون أن يظهر أي نشاط تحفيزي لفقد العوامل المرافقة والتغيرات في التنظيم التركيبي أو الهيئة التركيبية أثناء التحضير وبينت دراسات التقسيم الخلوي الثانوي وجود الإنزيمات الخلوية والتي تشمل إنزيمات النواة الحقيقية على إنزيمات التكرار والاستنساخ للأحماض النووية والإنزيمات التي تساهم في تجهيز الطاقة مثل إنزيمات انحلال السكر ودورة حامض الستريك وتحتوي المايتوكوندريا على إنزيمات دورة حامض الستريك وإنزيمات أكسدة

الأحماض الدهنية وإنزيمات تخليق البروتين حيث يتم انتقال أيون الهيدروجين الناتج عن دورة حامض الستريك إلى السلسلة التنفسية الذي تستعمل في إنتاج ادينوسين ثلاثي الفوسفيت بالفسفرة التاكسدية كما توجد المكونات المسؤولة عن دورة حامض الستريك والفسفرة التاكسدية متحدة مع الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا ويحتوي غشاء ثايلاكويد في الكلوروبلاست النباتي على مكونات لها القدرة على استهلاك الطاقة الضوئية لتوليد ATP وNADPH ويحتوي الكلوروبلاست على الإنزيمات التي تستخدم ATP,NADPH لتحويل ثاني اوكسيد الكربون إلى سكريات سداسية الديهايدية في عملية التخليق الضوئي في الظلام بالإضافة إلى إنزيمات تخليق البروتينات والأحماض النووية وتكون الشبكة الاندوبلازمية موقع تخليق الفوسفولبيدات واستطالة الأحماض الدهنية بينما تحتوي اللايزوسومات على الإنزيمات المحللة الأساسية ذو أس هيدروجيني حامضي وهذه الإنزيمات هي بروتينات كربوهيدراتية حيث يحتوي الغشاء المحيط باللايزوسومات على ATPase NADH-dehydrogenase ويحتوي سايتوبلازم الخلية على إنزيمات انحلال السكر وتخليق الأحماض الدهنية وتنشيط الأحماض الأمينية ويحتوي غشاء البلازما على ATPase الذي يعتمد نشاطه التحفيزي على أيونات الصوديوم والبوتاسيوم كما يعمل الإنزيم على نقل أيونات الصوديوم إلى خارج الخلية والتي يتم تبادلها بأيونات البوتاسيوم مما يحافظ على تراكيز عالية من أيونات البوتاسيوم داخل الخلية وتراكيز عالية من أيونات الصوديوم خارج الخلية كما يرتبط البلازما مع adenylate cyclase الحلقي من ATP والذي ينشط بفعل هرمون الأدرينالين ولا تحتوي الخلايا الحقيقية على أغشية تغلف المكونات الداخلية لذلك تكون العمليات التي تساعد فيها الإنزيمات مرتبطة مع غشاء البلازما وهي عكس الخلايا البدائية التي تحتوي على أغشية متخصصة مع غشاء البلازما وهي عكس الخلايا البدائية التي تحتوي على أغشية متخصصة تغلف المكونات الداخلية للخلية، ففي الخلايا الحقيقية تكون الإنزيمات المسؤولة عن تخليق الفوسفولبيدات وإنزيمات السلسلة التنفسية مرتبطة مع غشاء البلازما.

الفصل السابع عشر

فصل وتنقية الإنزيمات

فصل وتنقية الإنزيمات Isolation and purification

هناك اختلافات رئيسية في طرق فصل وتنقية الإنزيمات فمن الممكن أجراء العمليات المختلفة لفصل الإنزيم وتنقيته مختبريا أو تجاريا بسرعة وبسهولة باستعمال الطرد المركزي لفصل الخلايا والصوتية العالية لتحطيم الخلايا والتبخير بواسطة الضغط الخلل والفصل الغشائي والترسيب بواسطة الأملاح أو المذيبات العضوية ومواد الادمصاص المختلفة والفصل اعتمادا على الوزن الجزيئي والتبادل الايوني والتجفيد للأغراض المختبرية والذي يصعب استعمالها في الإنتاج على النطاق التجاري لعدم توفر الأجهزة اللازمة بسبب صعوبة تصنيعها أو ارتفاع أثمانها بالإضافة إلى ذلك تحتاج إلى وقت كبير لأجراء عمليات الإنتاج ويتم ذلك من الحصول على سوائل أو مجنسات الإنزيم الخام من التخمرات الميكروبيولوجية الذي يتم عندها فصل المواد الخلوية والمواد الأخرى غير الذائبة في مستحضرات الإنزيم بواسطة الطرد المركزي أو الترشيح وتستعمل مواد معينة تساعد في الإسراع من الترشيح كما يستعمل الفصل الغشائي لإزالة الأملاح والمواد الأخرى ذات الوزن الجزيئي المنخفض من الإنزيم وتستعمل طرق التبخير تحت الضغط العادي وعلى درجات حرارية منخفضة لتركيز الإنزيم ومن افضل الطرق لفصل وتنقية الإنزيم على الترسيب والادمصاص حيث يتم الترسيب على درجات حرارية منخفضة لتجنب الدنترة للإنزيم مما يفقد نشاطه التحفيزي وتستعمل المذيبات العضوية والأملاح مثل الكحول، الأسيتون وكبريتات الأمونيوم في عمليات الفصل وتستخدم أيضا الطرق الكروماتوكرافية لفصل وتنقية الإنزيمات حيث تستعمل في كروماتوكرافيا الادمصاص أعمدة فصل صغيرة ومواد ممدصة مختلفة واستعمال الطرق الكروماتوكرافية للتبادل الايوني الموجب والسالب ومن اكثر المبادلات الايونية هو السيليلوز، DEAE لفصل وتنقية الإنزيمات كما يستخدم السيفاديكس ذو قياسات مختلفة لفصل الإنزيمات طبقا لوزنها الجزيئي وبالإمكان استعمال طرق فصل وتنقية مختلفة من حيث الأس الهيدروجيني والقوة الايونية للمحلول من إنزيم لاخر ولا زالت المحاولات جارية لتطوير طرق مختلفة لانتاج إنزيمات على درجة عالية من النقاوة والنشاط التحفيزي ويمكن توضيح طرق فصل وتنقية الإنزيمات.

أولاً- طرق فصل الأنزيمات Separation techniques: جميع الدراسات ذات العلاقة بالمسالك الايضية واليات تنظيم الإنزيمات وعلم حركية الإنزيمات والعوامل المرافقة والمواقع الفعالة والتحفيزية والية عمل الإنزيمات ودراسة التركيب البنائي لها تعتمد على فصل وتنقية الإنزيمات وذلك لأنها تحتاج إلى إنزيمات على درجة عالية من النقاوة وتتضمن عملية تنقية الإنزيمات على فصل الإنزيمات أولا من مصادرها البيولوجية أي من مستخلصات الخلايا الكاملة الحاوية على مكونات أخرى فعلى سبيل المثال يمكن فصل الجزيئات الصغيرة بواسطة الفصل الغشائي بينما الأحماض النووية بواسطة الادمصاص على الفحم النباتي بينما فصل الإنزيمات من محاليلها المجنسة الحاوية مئات البروتينات المتشابه كيماوياً وفيزياوياً وهناك تقانات عديدة لفصل الإنزيمات وهي تشمل الترسيب بواسطة تراكيز مختلفة من الأملاح مثل كبريتات الأمونيوم أو الصوديوم، المذيبات العضوية مثل الأسيتون والكحول الاثيلي والدنترة التفاضلية، الطرد المركزي التفاضلي، الترحيل في المجال الكهربائي، الطرق الكروماتوكرافية، التبلور إلا أن التطورات الحديثة قدمت أساليب فصل متطورة وفعاله لفصل الإنزيمات بواسطة طرق الفصل الميكانيكية التي يمكن من خلالها عزل طور واحد فيزياويا عن الآخر والذي يسبقها تكوين طور ثم انتقال المكونات ما بين الطورين ثم تنقية الإنزيمات عن المكونات المتداخلة الأخرى في المجنس.

1. **فصل الإنزيمات بالترسيب:** يعتبر الاختلاف في قابلية الذوبان بين الإنزيمات والمواد الأخرى الموجودة في المجنس الخلوي الأساس في عملية الفصل بالترسيب اعتمادا على حاصل الإذابة الذي يعطي فكرة واضحة حول إمكانية حصول ترسيب للإنزيمات بواسطة كبريتات الأمونيوم أو الصوديوم وعند إضافة كبريتات الأمونيوم أو الصوديوم تؤدي إلى ترسيب الإنزيمات بسبب طبيعتها البروتينية وسبب الترسيب هو تعادل شحنات جزيئات البروتين الإنزيمي مع الشحنات التي تحملها أيونات تلك المركبات المتأينه مما يؤدي ذلك إلى تجمع الإنزيمات مما يسهل ذلك من فصلها وعزلها عن مكونات المجنس الخلوي.
2. **فصل الإنزيمات بالاستخلاص:** قبل أجراء عملية الاستخلاص، يجب التعرف على موقع الإنزيم داخل الخلية فيما إذا كان حرا أو مرتبطا بغشاء ما من خلال أجراء فحوصات

مزدوجة على مجنسات النسيج أو المستحضرات الإنزيمية ثم تحديد طريقة الاستخلاص المناسبة إذا كان الإنزيم حرا أو مرتبطا.

أ. **استخلاص الإنزيمات الذائبة:** تختلف طرق استخلاص الإنزيمات الذائبة مع اختلاف نوع ومصدر الإنزيم حيث يجنس مصدر الإنزيم باستعمال خلاط باستعمال الأسيتون البارد ثم يجفف من الأسيتون للحصول على مسحوق ثم يعامل بالكلوروفيل في حالة الأنسجة النباتية والأوراق بينما في حالة الجذور الليفية تطحن في هاون باستعمال الرمل أو الزجاج المسحوق مما يسبب تشقق الأعضاء الداخلية للخلية أما الخلايا الحيوانية أو الأحياء المجهرية يتم تجفيفها وتمزيقها ميكانيكيا إلا أن التجفيف يزيد من نفاذية الخلية مما يسهل من استخلاص الإنزيمات الذائبة ويتم تجفيف الخلايا لعدة أيام على درجة 30م هوائيا أو تجفيف تحت تفريغ لمدة يوم واحد أو اكثر أو تجفيف الخلايا وتجميدها بعملية التجفيد (تجفيف بالتجميد) وتعتمد طريقة الاستخلاص على نوع الخلية وعلى الموقع الخلوي الثانوي للإنزيم وخواص الإنزيم مثل الثبات تحت ظروف الاستخلاص.

ب. **استخلاص الإنزيمات المرتبطة بالغشاء:** لا يمكن استخلاص الإنزيمات المرتبطة بغشاء البلازما أو الأغشية المغلفة للأعضاء الداخلية بالطرق التي تؤدي إلى تمزيق وتشقق الأنسجة والخلايا المختلفة إلا أن بعض الإنزيمات مرتبط بقوة مع الغشاء بينما البعض الآخر يكون ضعيفا لذلك لا توجد طريقة عامه لاستخلاصها، يتكون الغشاء الخلوي من اللبيدات، البروتينات والإنزيمات حيث تحتوي اللبيدات على مناطق محبة للماء وأخرى غير محبة للماء، الأخرى الرئيسية من لبيدات الغشاء هي الفوسفولبيدات والكلايكولبيدات وتحتوي الأغشية في الخلايا الحقيقية على الستيرولات وتكون البروتينات الطرفية مرتبطة بسطح الغشاء بينما يكون جزء داخل داخليا كليا أو جزئيا في طبقة اللبيدات أي أن السلاسل الببتيدية المتعددة الغنية بالأحماض الأمينية غير القطبية تقع داخل الأغشية مما تكون أواصر غير محبة للماء مع اللبيدات وبينما الأجزاء الأخرى المتجهة نحو الخارج تصبح بتماس مع الماء، فأن اللبيدات والبروتينات تتحرك جانبيا حول الغشاء وصعوبة تحركها بالاتجاه المستعرض من سطح الغشاء إلى الغشاء الآخر فالبروتينات الطرفية ترتبط بواسطة

اصرة هيدروجينية أو الكتروستاتيكية مع الجهات القطبية للدهن أو مع البروتينات الداخلية مما يسهل ذلك من تحللها عندما تعامل مع محلول ذو قوة ايونية عالية مثل 1 مول كلوريد الصوديوم أو بواسطة التجميد وقابلية الذوبان ويمكن استخلاص الإنزيمات الداخلية بواسطة تكسير الأواصر المحبة للماء بين الببتيد وبروتين الإنزيم ويجب أن يتم الاستخلاص دون فقد نشاط الإنزيم وقد يستعمل التحلل الذاتي المسيطر علية لتحرير الإنزيمات من الأغشية ويحصل تكسير بعض التداخلات بين اللبيد والبروتين خلال تكوين مساحيق الأسيتون لذلك يمكن استخلاص الإنزيم من تلك المساحيق أو قد يستعمل إنزيم متخصص لتكسير التداخلات بين اللبيدات والبروتين مثل استعمال إنزيمات الفوسفولايبيزات ولايبيز الكلسيرول ثلاثي الأسيل لاستخلاص إنزيم الفوسفاتيز القاعدي أو استعمال المنظفات الطبيعية مثل deoxy cholate لتمزيق الأغشية واستخلاص اللايبوبروتين إلى الوسط المائي على شكل جسيمات ويستعمل المنظف sodium dodecyl phosphate (SDS) الذي يكون من المنظفات المهمة في دراسة الأغشية لان له القدرة على تحطيم الارتباطات الموجودة بين البروتين –اللبيد أو البروتين – البروتين أو استخلاص إنزيم الزانثين اوكسيديز من بروتينات الحليب المجفف بواسطة مستخلص الايثر ويعتبر البيوتانول الطبيعي من اكثر المذيبات العضوية استعمالا في استخلاص الإنزيمات من الأغشية تحت ظروف مختلفة أو استخلاص الفوسفاتيز القاعدي على قيم بين 5 –6 من الأس الهيدروجيني واستخلاص gamma-glutamethyl transferase على قيم أس هيدروجيني من 6 –7 ويوريت اوكسيديز على قيمة 10، إنزيمات كلوتاميت النازع للهيدروجين dehydrogenase acid and alkaline phosphatases من مجنس كبد الأبقار الذي تكون ذائبة في 19% ايثانول على قيمه أس هيدروجيني 8,5 وقوة ايونية 0,02% إلا أن catalase, peroxidase, D-amino acid oxidase لا تذوب تحت تلك الظروف فحسب، بل تذوب في قيمه أس هيدروجيني 5,8 وبعدم وجود الايثانول على قوة ايونية 0,15 والإنزيمات المحللة للبروتينات proteases لا تذوب تحت تلك الظروف فحسب، بل يمكن إذابتها عند رفع الأس

الهيدروجيني في المحيط الثاني إلى 5,8 وعدم وجود الايثانول وقوة ايونية 0,15 إلى 7,5.

3. **الفصل بواسطة الترشيح الهلامي gel filtration**: يتم فصل الإنزيمات على أساس الحجم للجزيئات حيث يتم استخدام عمود يتكون من جزيئات متعددة polymer من كربوهيدرات مائية غير ذائبة بشكل حبيبات ذات قطر 0,1 ملم ويستعمل sephadex في التحضيرات التجارية للإنزيمات، فأن الجزيئات الإنزيمية الصغيرة تدخل الحبيبات بينما الكبيرة لا تتمكن من ذلك حيث يتم توزيع الجزيئات الصغيرة في المحلول السائل داخل الحبيبات وبينها الجزيئات الكبيرة تقع فقط في المحلول بين الحبيبات، الجزيئات الإنزيمية الكبيرة تجرى بسرعة خلال العمود وتخرج أولا بسبب صغر حجم تلك الجزيئات ويتم جريان الجزيئات طبقا للجاذبية خلال العمود وذلك بسبب اختلاف حجم جزيئات الإنزيم أي اختلاف الوزن الجزيئي لها لذلك يطلق على الطريقة أيضا كروماتوكرافيا النخل الجزيئي مما تختلف في قابليتها لاختراق المسامات المائية بين داخل جزيئات السيفادكس، فالجزيئات الصغيرة ذات كفاءة عالية لاختراق المسامات وستنزل بسرعة بطيئة خلال العمود، يمكن قياس السرعة النسبية لمرور الجزيئات بواسطة قياس تركيز الإنزيم في الأجزاء القليلة المفصولة باستعمال قياس امتصاص الضوء بطول موجي معين ويمكن توضيح فصل إنزيمات proleae, RNAase في مستخلص البنكرياس وباستعمال sephadex G-75 وتستخدم هذه الطريقة لتقدير الوزن الجزيئي للإنزيمات باستخدام أنواع مختلفة من sephadex لتحفيز عمود الفصل ويستخدم sephadsex G-25 للأوزان الجزيئية من 3500–4500 و sephadex G-75 للأوزان الجزيئية من 40000 – 50000 و sephadex G-50 للاوزان الجزيئية من 8000 – 10000 و sephadex G-100 للاوزان الجزيئية العالية.

4. **فصل الإنزيمات بالترحيل في المجال الكهربائي electrophoresis**: يمكن فصل الإنزيمات عن بعضها البعض الآخر بواسطة الترحيل في مجال كهربائي اعتمادا على علاقة وعدد الشحنات الكهربائية على مجاميع R للأحماض الأمينية المكونة للإنزيمات وخاصة في المجاميع الأمينية والكربوكسيلية الطرفية وتحدد ذلك نقطة التعادل

الكهربائـي isoelectric point الذي تحدد من العدد النسبي لمجاميع R الحامضية والقاعدية في الإنزيـم في أس هيدروجيني معين أي أن نقطة التعـادل الكهربـائي هـي اقـل مـن واحـد للبسـين و 5 لليـوريز و 11 اللايـزوزيم أو فصـل الإنزيمـات في خلـيط مجـنس اعتمادا علـى سرعــة انتقاهـا المختلفـة في المجـال الكهربـائي في أس هيـدروجيني معـين والانتقال في المجـال الكهربـائي للإنزيمـات يعتمـد علـى نسـب سـرعة الترحـال في المجـال الكهربائي إلى قوة المجـال الكهربـائي $u = v / E$ حيـث أن u هـي الانتقـال في المجـال الكهربائي، v هي سـرعة الانتقـال في المجـال الكهربـائي E هـي قـوة المجـال الكهربـائي، هناك نوعان من هذه التقنية هي:

أ. **الانتقال في المجال الكهربائي الحر free electrophoresis**: وهي ما يطلق عليها أيضا moving boundary electrophoresis، يتكون المحلول المـنظم مـن خليط الإنزيم الذي يوضع في خلية بشكل حرف U والعمود الحاوي محلول مـنظم نقـي يوضع فوق محلول الإنزيـــم ثـم يمـرر تيـار كهربـائي بدرجـة حـرارة ثابتـة بحيـث يـتم اختيار الأس الهيدروجيني المناسب لفصـل تلـك الإنزيمـات الموجـودة في المحلـول ويـتم انتقال الإنزيمات مـن المحلول إلى المنطقـة الخاليـة مـن الإنـزيم أمـا للإمـام أو علـى الحـد boundary، يتغير معامل انكسار المحلول بشكل حاد في منطقة الحد لان جزيئات الإنزيمات تملك معامل انكسار يختلف عن المحلول المنظم النقـي ومن قياسـات الـتغير في معامل الانكسـار علـى طول الخلية الذي تم قياسها بواسطة تقنية ضوئية يتم تحديد اتجاه السرعة النسبية لانتقال كل إنزيم وكـل مـنحني في النمـوذج يقابـل موقـع حركـة الحد لإنزيم معين ويمكن تقدير الحركـة في المجـال الكهربـائي في قـيم مختلفـة مـن الأس الهيدروجيني ومنحني التسحيح للإنزيم هو قياس تقريبي للحركـة في المجـال الكهربـائي كنتيجة للأس الهيدروجيني، يمكن أن تستعمل هذه الطريقة في التحليل الكمـي لخلـيط معقد من الإنزيمات وفي منطقة نقطة التعادل الكهربائي بشكل شريط حاد.

ومن مساؤى استخدام هذه الطريقة هي:

- بطيء وتحتاج كمية كبيرة من عينه الإنزيمات.
- تحتاج نظام معقد وغالي.

- حركة الإنزيم بطيئة جدا.
- تتأثر حركة الإنزيم بالاضطرابات الاهتزازية.

ب. **الانتقال في المجال الكهربائي المنطقي zone electrophoresis**: يستعمل على نطاق واسع في مجال الكيمياء الحياتية مقارنة مع النظام الحر بسبب بساطته واكثر قوة فصل من السابق ويتم تطبيق العينه على مواقع على وسط ساند أما أن يكون هلام النشأ أو شرائط من ورق الترشيح أو اكريلامايد متعدد هلامي polyacrylamide gel مبلل بالماء وذو مسامات الذي تمنع الاضطرابات الاهتزازية ولا يحتاج إلى نظام ضوئي للكشف عن الحد الحر بين الإنزيم والمحلول المنظم النقي فأنه يمكن تحديد موقع الإنزيم على الهلام والكشف عنه كميا بالاختبارات اللونية ومن محاسن هذه الطريقة بأنه يمكن التحكم بطول عمود الهلام والظروف الأخرى لسماح لعملية الانتقال بسهولة أن تستمر حتى يتم فصل الإنزيم في منطقة منفصلة وهناك عدة أنواع من هذه الطريقة هي: disk electrophoresis, paper electrophoresis, starch gel electrophoresis polyacrylamide gel electrophoresis , SDS-gel electrophoresis.

1. **الانتقال في مجال كهربائي ورقي paper electrophoresis**: تستخدم ورقة الترشيح في هذا النوع من طرق الفصل الذي يرسم خط بواسطة القلم عموديا على طول الورقة ثم تطبق العينه على مواقع مؤشرة على الخط وتقارن العينات مع عينه مقارنه قياسية تبلل الورقة في المحلول المنظم لحد مناسب فوق العينات ويغمس طرفي الورقة في وعائين منفصلين من نفس المحلول المنظم وعند مرور التيار الكهربائي يعمل الوسط الساند (الورقة) جسرا بين الوعائيين فالعينات تنتقل باتجاه القطبين والذي يحدد الحركة هي الشحنه وبعد أن يتم الانتقال تجفف الورقة ويمكن تحديد مواقع الإنزيمات المفصولة بواسطة كاشف معين.
2. **الانتقال في المجال لكهربائي الهلامي gel electrophoresis**: يستخدم هلام النشأ بدلا من الورقة لفصل الإنزيمات حيث يتم فصل عينات ذات حجم معين من المحلول الحاوي على الإنزيم.

3. الانتقال في المجال الكهربائي هلام الاكريلامايد المتعدد polyacrylamide gel electrophoresis: نوع من الانتقال في المجال الكهربائي المنطقي والذي يتم فيه الفصل بكفاءة عالية لأن الإنزيمات تتحرك بسرع مختلفة اعتمادا على الشحنه والحجم وهي طريقة بسيطة وسريعة وحساسة ويكون هلام صلب بدرجة حرارة الغرفة وقت التشغيل قصير وتدرج فولتية عالية ويفضل تشغيل التجربة في غرفة مبردة ويستعمل SDS-gel electrophoresis لفصل الأنزيمات متعددة السلسلة والتعرف على الوزن الجزيئي للوحدات الفرعية للسلاسل الببتيدية للإنزيمات.
4. بؤرة تساوي الشحنه أو منطقة نقطة التعادل isoelectricfocusing: من احدث الطرق الحساسة لفصل الإنزيمات في مجال الهجرة الكهربائية اعتمادا على الأس الهيدروجيني للإنزيم باستخدام مادة الامفولين ويعتمد الفصل على الشحنه حيث تنتقل الإنزيمات في منطقة نقطة التعادل الكهربائي لها تحت تأثير المجال الكهربائي حيث يثبت البروتين الإنزيمي في منطقة نقطة التعادل الكهربائي بشكل شريط حاد.
5. فصل الإنزيمات بواسطة الكروماتوكرافيا Chromatography: هي عمليات فصل خليط الإنزيمات بواسطة تفاوت الانتقال خلال وسط مسامي تحت تأثير الطور المتحرك حيث يتم توزيع الإنزيمات ومكونات مجنس الأنسجة بين الطور المتحرك mobile phase والطور الساكن stationary phase ويتم توزيع المكونات حسب الفتها ويمكن تطبيق هذه التقنية على كميات من العينات تقع بحدود ملغرامات إلى غرامات وقد تصل الكميات إلى ملغرامات كما هو الحال في الكروماتوكرافيا، وهناك كروماتوكرافيا الامدصاص، كروماتوكرافيا التقسيم، كروماتوكرافيا الورقة كروماتوكرافيا التبادل الايوني، كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة، كروماتوكرافيا الترشيح بالهلام كروماتوكرافيا الغازي وكروماتوكرافيا الإنجاز العالي وتهدف جميع الطرق الكروماتوكرافية إلى فصل مادتين أو اكثر ويتم الفصل بواسطة توزيع المكونات بين طور ساكن أخر متحرك حيث يمسك أحد المادتين بالطور الساكن بشدة اكثر من الآخر الذي بدورة يميل للانتقال مع الطور المتحرك بسرعة والذي يمكن تحديد حركتها من خلال استخدام صبغة معينه الذي تظهر في مناطق محددة، ويمكن ملاحظة حركتها بسهولة.

أ. **كروماتوكرافيا الادمصاص adsorption chromatography**: الطور الساكن فيه هو ألا لومينا alumina أو سليكا الهلام silica gel بينما يكون الطور التحرك سائل أو غاز ويتم الفصل عندما تكون مكونات الخليط حاوية واحدة، له القابلية للادمصاص بالطور الساكن اكثر من المتحرك حيث يلتصق أحد الإنزيمات على السطح لذلك تستخدم دقائق ذات حجوم صغيرة تحصل منافسة على موقع الادمصاص حيث يتم توزيع مكونات الخليط حسب معامل التوزيع(م) بين الطورين حيث أن م = كمية المذاب في الطور الساكن\كمية المذاب في الطور المتحرك ويعتمد الفصل على درجة الحرارة وتركيز المكونات الكلية المراد فصلها وقد تكون العلاقة خطية عندما يتأثر معامل التوزيع بتركيز المحلول المدروس ومواد أخرى في المحلول المجنس أو الإنزيمي أو تكون العلاقة غير خطية وذلك عندما يكون للبقع نصف جبهة أمامية محددة بوضوح مع ذلك باتجاه المصدر الرئيسي أو نصف جبهة خلفية محددة بوضوح مع ذنب باتجاه جهة المذيب حيث يكون منحني التوزيع عند درجة حرارة ثابتة محدب أو مقعر أو يحدث أن يكون منحني التوزيع يتطابق تقريبا مع الإحداثي السيني أو يحصل تطابق منحني التوزيع مع الإحداثي الصادي ولا يتحرك المركب من الناحية العملية فأن المركب يتحرك قريبا من المذيب والادمصاصية تتناسب مع معامل التوزيع، لذلك فأن الظروف التي عندها يمكن انجاز فصل مناسب عندما يكون معامل التوزيع قريب من الواحد.

ب. **كروماتوكرافيا التجزئة partition chromatography**: يكون الطور الساكن سائل وغالبا ما يكون الماء الذي يثبت على ساند صلب مسامي حامل مثل لسيليلوز أما الطور المتحرك هو غاز أو خليط سائل وغالبا ما يكون اكثر من مذيب ويكون مشبع بالطور الساكن مما يتكون من طورين غير ممتزجين ويحصل فصل مكونات المجنس عندما يمتص أحدهما اكثر قوة من الأخر ولا يؤدي الساند دورا فعالا في عملية الفصل الكروماتوكرافي التجزيئي وعملية الفصل تتضمن انتقال مكونات الخليط بين طورين سائلين أحدهما ساكن والآخر متحرك ويتركب من أنبوبة زجاجية مثبته في قاعدتها سداد مسامي وفي نهايته صمام قطع الذي يملأ العمود الزجاجي بخليط من مادة سائلة – صلبه بينما يحتوي الطور الثاني المواد المراد فصلها والذي يسمح لها بالجريان ببطيء إلى اسفل العمود وبعد أن تتم عملية الفصل يلاحظ تجمع المواد على

العمـود بشكل حزم وبعد أن تتم عملية الفصل يلاحظ تجمع المواد على العمود بشكل حزم طبقا إلى درجـة قابلية ذوبانها في الطور الساكن.

ج. كروماتوكرافيا الورقـة paper chromatography: تسـتخدم أوراق الترشـيح وتمـان رقـم (1) للإغـراض العمليـة العامـة ووتمـان رقـم (2) لـنفس الغـرض بينمـا تسـتخدم رقـم (3) ووتمـان رقـم 3MM في الأغـراض التجاريـة التحضـيرية حيـث يستخدم الكروماتوكرافيا الورقي في فصل العينـات السـائلة حيـث تسـتخدم أوراق ذو حجم معين ويتـم ذلك يرسم خط بواسطة قلم الرصـاص يـوازي أحـد حافاتهـا وعلـى بعد 2سم منها ويثبت على الخـط عـدد مـن العلامـات الصـغيرة علـى شـكل حـرف x وبمسافات متسـاوية عـن بعضـها وبعـدد يسـاوي عـدد العينـات المسـتخدمة وينقط المحلول السائل من كل عينه على موقع محدد بواسطة أنبوب شعري أو يستخدم عـروة بلاتينيـة الـذي تمتـاز عـن الأنبـوب الشـعري بإمكانيـة اسـتخدامها عنـد غسـلها وتسخينها بواسـطة لهب مصباح بنزين بعد كل عملية فصل، على أن لا يتجـاوز قطـر البقعة عن 5ملم، لأن كبر البقعة يسبب صعوبة الفصل،3 الذي يتم تجفيفها بواسـطة مجفف الشعر ثم يتم تظهيرهـا علـى طبيعـة المـادة المـراد فصـلها عنـدما يمـرر خلالهـا مذيب واختيار المذيب يعتمد على طبيعـة المـادة ويسـتعمل مـذيب الـتظهير بشـكل خليط فعلى سبيل المثال يسـتخدم البيوتـانول مشـبع بالمـاء ويـتم الـتظهير باسـتخدام مذيب واحد كمـاء ويـتم الـتظهير إمـا بحـركة المـذيب بالانتقـال في الاتجـاه العلـوي مـن الورقة وفي هذه الحالة يسمى كروماتوكرافيا الورقة الصاعـد أو نحو الأسـفل مـن الورقـة ويسمى كروماتوكرافيا الورقة النازلة ففي النازلة يوضع مذيب التظهير النازل في حوض زجاجـي داخل حـوض الكروماتوكرافيـا ثم تعليـق الورقـة في المـذيب ويغطـى الحـوض بأحكام ثم تثبت الورقة بواسطة قضيب زجـاجي وتعتـبر الورقـة فـوق قضـيب زجـاجي آخر أعلى بقلـيل من حافـة القناة لمنع سحب المذيب بطريقـة السـيفون أمـا الصـاعدة يوضع مذيب التظهير في قعـــر الحـوض وتعلـق الورقـة في داخلـة بواســطة الـه معينـه حيث تغمس الورقة داخل المـذيب الموجـود في قعـر الحـوض ثـم غلـق الحـوض بأحكـام وعند وصول المذيب إلى مسافة معينه ترفع الورقة من الحـوض وتؤشر مقدمـة المـذيب ثـم تجفيـف الورقـة في غرفـة تسـرب الـدخان بواسـطة المركبـات علـى الورقـة وفي بعـض الأحيان تتجاوز فيها مقدمة المذيب نهاية الورقـة ويتم حساب Rs.

Rs = المسافة التي تقطعها العينه \ المسافة التي تقطعها المادة القياسية

ويمكن فصل مخاليط معقدة بواسطة كروماتوكرافيا الورقة ذو الاتجاهين حيث تفصل بطريقة الاتجاه الواحد ولفصل المركبات المتداخلة بشكل أدق يستخدم مذيب آخر عند زاوية قائمة بالنسبة إلى المذيب الأول حيث تستخدم ورقة ترشيح مربعة ويطلق محلول الاختبار قرب إحدى زوايا الورقة ثم يجرى الفصل الصاعد والنازل وبعد ذلك تجفف وتدار بزاوية 90 وبعد التظهير الثاني تجفف وتعين المواد المفصولة بواسطة كاشف انتقائي لتشخيص المركبات على الورقة الكروماتوكرافية باتجاهين بمقارنه مواقع المركبات مع المركبات القياسية.

د. **كروماتوكرافيا التبادل الايوني Ion exchange chromatography:** يستخدم فيه مشتقات سليلوزية لها القدرة على تبادل الأيونات مما يحصل فصل تبادل ايوني ومن المواد المستخدمة هي مثيل كربو كسيل السيليلوز وسترات وفوسفات السليلوز من تبادل أيونات موجبة أو اثيل الأمين وثنائي اثيل أمين و اثيل السليلوز لتبادل أيونات سالبة ويتم استخدام محلول يحتوي أيونات تزيح تلك الأيونات التي تعود للمواد المرغوب فصلها.

ه. **كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة thin layer chromatography:** يكون الطور الساكن هو طبقة رقيقة من مادة ناعمة ومثبته على صفيحة من الزجاج أو الألمنيوم أو شريحة بلاستيكية، ويستخدم الومنيا alumina وهلام السليكا ومسحوق السيليلوز، حيث يحفز بشكل طبقة رقيقة على سطح الصفيحة المناسبة ثم تجفيفها في فرن عند\ درجة 15 ام لفترة زمنية مناسبة ثم رش الصفيحة بواسطة حامض الكبريتيك ثم تسخينها لغرض تفحم المركبات وتكوين بقع سوداء، يمكن قشط البقع عن الصحيفة باستخدام آلة قشط ثم استخلاصها من المسحوق لغرض التقدير الكمي، وتستخدم لفصل مواد بيولوجية متشابه.

و. **كروماتوكرافيا الترشيح gel filtration chromatography:** يتم فصل المواد اعتمادا على اختلاف حجمها باستخدام وسط معين للتنافذ هو السيفادكس وهو سكر متعدد مثل الدكسترين المكون من ست جزيئات كلوكوز حيث يكون

بشكل حبيبات تحتوي على عدد كبير من مجاميع الهيدروكسيل مما تجعلها ذو ألفة كبيرة نحو الماء حيث تنتفخ الحبيبات بالماء أو محاليل الكتروليتية لاعطاء جسيمات مسامية نصف شفافة حيث تضاف عينه الخليط المرغوب فصله إلى النهاية العليا للعمود الذي يحتوي السيفادكس ثم غسل حبيبات الهلام بالماء ومحلول منظم.فالمواد التي تكون حجوم جزيئاتها اكبر من الثقوب لحبيبات الهلام المنتفخة لا تتمكن من اختراق جسيمات الهلام، لذلك يتم انتقاها مع الطور السائل خارج جسيمات الهلام مما تخرج من نهاية عمود الفصل أما الجزيئات التي حجمها صغير تتغلغل وتنفذ خلال حبيبات الهلام بنسب مختلفة اعتمادا على شكلها وحجمها مما تتوزع بين السائل داخل جسيمات الهلام وخارجة وكلما صغر حجم الجزيئات يتوفر ها نسبة مئوية اكبر من السائل داخل جسيمات الهلام وعلى هذا الأساس يتم الفصل على أساس الوزن الجزيئي ويستخدم كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي لفصل البروتينات والببتيدات والإنزيمات.

6. **الفصل بالطرد المركزي:** يمكن فصل الإنزيمات الذي تقع في عضيات متخصصة أو حجيرات معينة في الخلايا حقيقية النواة بواسطة الطرد المركزي التفاضلي differential centrifugation حيث يتم تجنس الأنسجة النباتية أو الحيوانية في محلول سكري 0,25 مولارى سكروز مما يؤدي التجنيس إلى تحطيم الغشاء البلازمي دون التأثير على العضيات الداخلية ويتم تحطيم الغشاء الخلوي بسبب قوى الشد الناتجة عن حركة المجنس للإمام والخلف ببطيء ثم نزع الأنسجة الرابطة واجزاء الأوعية الدموية من خلال تصفية المجنس بواسطة منخل من المعدن غير قابل للصدأ وتختلف العضيات الخلوية الثانوية مثل النوية والمايتوكوندريا في حجمها ووزنها النوعي والذي يتم ترسيبها بسرع مختلفة لأن الطرد المركزي يتم بسرع مختلفة مما يسهل ذلك من فصلها عن المجنس ومن ثم يتم فصل الإنزيمات الذي بتم اختبارها ويتم فصل إنزيم اللايزوزيم المايتوكونديري بسرعة g5000 ولفترة 10 دقيقة واللايزوزيم الميكروسومي بسرعة g57000 لمدة 60 دقيقة ويتم الفصل بدرجة 4م، فالإنزيمات التي تحول الكلوكوز إلى لاكتيت تقع في السايتوسول وهو الجزء السائل من السايتوبلازم الخلوي والإنزيمات لدورة حامض الستريك تقع في

المايتوكوندريا وكذلك الحال بالنسبة لإنزيمات نقل اللاكترون والذي لها علاقة بتحويل الطاقة التاكسدية مثل ATP وبهذا يمكن فصل الإنزيمات بالطرد المركزي التفاضلي.

7. فصل الإنزيمات بالدنترة: يمكن تحطيم الأواصر أو الروابط أو التداخلات الضعيفة المسؤولة عن المحافظة على التراكيب البنائية الثانوية والثلاثية والرباعية للإنزيمات عند تحطيمها بواسطة أنواع مختلفة من المركبات مما يؤدي ذلك إلى فقد نشاطها الإنزيمي أو التحفيزي وذلك لان الدنترة تسبب تفكك السلاسل المتعددة للإنزيمات مع تغير في الهيئة التركيبية للإنزيم، إنزيم الرايبونيوكليز يمكن دنترته بواسطة اليوريا الذي تسبب تفكك التداخلات غير التساهمية مما يفقد الروابط العرضية لثنائي الكبريتيد مما يجعل الهيئة التركيبية حلزوني عشوائي في 8 مولار ويوريا أو 6 مولار كواندين — حامض الهيدروكلوريك ومعاملة الإنزيم بواسطة بيتا - ميركابتوايثانول في 8 مولار يوريا تسبب فقد النشاط الإنزيمي بسبب دنترة الإنزيم ولكن يمكن إعادة نشاط الإنزيم عند نزع اليوريا أو البيتا ميركابتو ايثانول بواسطة الفصل الغشائي والأكسدة التلقائية، كما أن تسخين محلول الإنزيم يسبب فقد نشاطه مع مرور الوقت، الفقد ناتج عن عدم التواء أو انطواء الإنزيم الطبيعي إلى هيئة حلزونية عشوائية، فأن تعريض hexokinase بدرجة 45 م تسبب فقد 50% من نشاط الإنزيم خلال 12 دقيقة وعند الحضن بدرجة 45 م بوجود تركيز مرتفع جدا من المادة الأساس مثل الكلوكوز، فأنه يفقد فقط 3% من نشاطه التحفيزي أي أن الدنترة الحرارية للإنزيم يمكن إعاقتها بوجود مادة أساس، وبما أن الإنزيمات تختلف في درجة حرارة دنترتها وطبيعة العوامل المدنترة يمكن فصلها تفاضليا ومن ثم إعادة تنشيطها عند الاستعمال.

ثانيا: تنقية الإنزيمات purification of enzymes: تعتمد تنقية الإنزيمات على طريقة فصلها من مصادرها الخلوية وموقعها ضمن الخلايا داخليا أو خارجيا وقد ذكرنا سابقا كيفية استخلاص النسيج الخلوي الثانوي بواسطة الطرد المركزي التفاضلي وتكون مستخلصات الإنزيمات حاوية على العديد من الشوائب مثل الأملاح والأحماض النووية والمواد السكرية فلا بد من التخلص من تلك المواد بطرق مختلفة لتنقية

الإنزيمات باستعمال تقانات مختلفة مثل الترشيح الهلامي وكروماتوكرافيا التجزئة والانتقال في مجال الهجرة الكهربائية والتبادل الايوني والألفة والترسيب ومنطقة نقطة التعادل الكهربائي والانتقال في المجال الكهربائي المنطقي والدنترة والترسيب التجزيئي ومن الطرق المستخدمة في تنقية الإنزيمات هي:

1. **طرق التنقية التمهيدية preliminary purification methods**: يمكن فصل الإنزيمات من التقسيم الخلوي الثانوي عندما تكون ذائبة حيث يتم ترسيب الأحماض النووية بواسطة الستربتومايسين أو البروتامين أو كلوريد المغنيسيوم أو كلوريد المنغنيز حيث يتم التخلص من كل الرواسب ومخلفات الخلايا بالطرد المركزي ويتم نزع السكريات المتعددة بسرع عالية أو تحليل السكريات المتعددة إلى وحدات صغيرة باستعمال إنزيم ألفا- اميليز أو تحليل الأحماض النووية بواسطة النيوكليزات ثم ترسيب الإنزيم من المحلول الحاوي سكريات أحادية وقصيرة السلسلة ونتوكليوتيدات وأحماض أمينية حرة والبروتينات الذائبة في المحلول أو يمكن ترسيب الإنزيم بواسطة تغير الأس الهيدروجيني أو الترسيب بالأملاح أو الترسيب بالمذيبات العضوية وفي هذه الحالة يمكن الحصول على إنزيم على درجة ليست عالية النقاوة لان الإنزيم في هذه المرحلة لا يزال حاوي على بعض البروتينات بسبب تداخل قابليات ذوبانها مع الإنزيمات، ويمكن التخلص من تلك البروتينات وذلك برفع درجة حرارة المحلول إلى درجة حرارة معينه لعدة دقائق بحيث لا تسبب تلك الدرجة الحرارية دنترة الإنزيم مما يحصل دنترة البروتينات وترسيبها وبذلك يمكن تسهيل تنقيتها.
2. **طرق تنقية الإنزيمات النهائية**: لزيادة نقاوة الإنزيم لابد من استخدام أحد الطرق التالية:

أ. **الترشيح الهلامي gel filtration**: أو ما يسمى النخل الجزيئي molecular – sieve chromatography التقانات المهمة في تنقية الإنزيمات وتقسيمها حسب وزنها الجزيئي والتنقية تعتمد على نوع الهلام المستخدم حيث يملأ العمود بالهلام المنتفخ والذي يفصل الإنزيمات على أساس وزنها الجزيئي حيث تمر الإنزيمات ذات الوزن الجزيئي المرتفع والغير قادرة من دخول فتحات ومسامات الهلام بسرعة خلال عمود الفصل أما الإنزيمات ذات الوزن الجزيئي المنخفض فتكون بطيئة السرعة خلال العمود ومن أهم أنواع الهلام المستخدم هو السيفادكس وهو عبارة عن دكستران

مرتبط تقاطعيا أو استخدام هلام حيوي Biogel وهو من مشتقات السكريات المتعددة وطريقة الفصل لا تعتمد على درجة الأس الهيدروجيني أو القوة الايونية، بل تعتمد على الوزن الجزيئي للإنزيمات أو يستعمل سيفاروز seahorse وهو اكاروز مرتبط تقاطعيا وتصنف تلك المواد طبقا لحجم الفتحات التي توجد فيها وحجم الجزيئة للإنزيم الذي لها القدرة أن تدخل المسامات الموجودة في الهلام ويستخدم محلول فصل ذو قوة ايونية 20 ملي مول.

ب. **كروماتوكرافيا التجزئة:** يمكن تنقية إنزيم الرايبونيوكليز بواسطة عمود فصل يحتوي مادة أد مصاص باستعمال نظام ذي طورين يحتوي على كبريتات الأمونيوم و ethyl cellulose وماء ويتم خلط الطور العضوي مع المادة الممدصة لتكوين طور ثابت ثم توضع العينه الحاوية على إنزيم على الجزء العلوي لعمود الفصل ثم نزول العينه مع محلول الفصل وهو الطور المائي حيث يتم فصل المكونات المختلفة أثناء النزول من عمود الفصل طبقا لقابلية الذوبان النسبي في الطورين السائلين.

ت. **الهجرة في المجال الكهربائي:** وهي طريقة تستعمل لفصل كميات قليلة من المادة باستعمال مسند خامل حيث يمرر التيار الكهربائي على النموذج المطبق وتعتمد سرعة واتجاه الهجرة للإنزيم في المجال الكهربائي على صافي الشحنه التي يحملها الإنزيم وعلى الأس الهيدروجيني وعلى الوزن الجزيئي للإنزيم وبما أن جزيئة الإنزيم تحتوي على سحنه معينة، فأن الإنزيم سينتقل باتجاه القطب ذو الشحنه المعاكسة ويمكن استخدام zone electrophoresis , paper electrophoresis .polyacrylamide gel electrophoresis

ث. **كروماتوكرافيا التبادل الأيون:** يستعمل كروماتوكرافيا التبادل الايوني في تبادل الشحنات الموجبة باستعمال بولي ستايرين الحاوي على مجاميع هيدروكسيل لتنقية الإنزيمات ذات الوزن الجزيئي المنخفض مثل اللايزوزيم والرايبونيوكليز أو يمكن استعمال السليلوز مثل diethylaminoethyl (DEAE) cellulose وهو مبادل للشحنات السالبة carboxy methyl (CM)-cellulose الذي هي مبادلات للشحنات الموجبة ويتم إنزال الإنزيم باستخدام محلول الفصل أم بتغير تركيز الملح أو تغير الأس الهيدروجيني فكلما ازداد تركيز الملح كلما سهل إحلال الإنزيم بواسطة أيون على المبادل الايوني (الموجب الشحنه) محل المبادل الايوني السالب

الشحنه أو تغير الأس الهيدروجيني ضمن حدود ضيقة مما تغادر الإنزيمات عمود الفصل عندما تصل نقطة التعادل الكهربائي لها لان الإنزيم لا يحمل أي شحنه على نقطة التعادل الكهربائي مما يسهل ذلك من فصلها عن عمود الفصل بسهولة.

ج. **كروماتوكرافيا الألفة affinity chromatography**: يملأ عمود الفصل بمادة خاملة مثل الاكاروز Agarose المرتبط بها رابط للإنزيم والمادة الرابطة للإنزيم ligand ذات تركيب يشبه المادة الأساس للإنزيم حيث ترتبط المادة الرابطة للإنزيم مع المادة الخاملة بواسطة أواصر تساهمية لها القدرة بالارتباط مع الإنزيم والذي تتطلب وجود مادة هيدروكربونية تسمى spacer arm بين المادة الرابطة للإنزيم والمادة الخاملة أي ترتبط مع المادة الرابطة في نقطة لا تؤثر على ارتباط الإنزيم مع المادة الرابطة له ويوضع خليط الإنزيم على الجزء العلوي من عمود الفصل حيث تعمل المادة الرابطة على مسك الإنزيم بينما يسمح لبقية المواد بالمرور خلال عمود الفصل بحرية تامة ثم يحرر الإنزيم من عمود الفصل بواسطة محلول منظم خاص على أس هيدروجيني بسبب تغير خواص الإنزيم مما يتحرر من المادة الرابطة مما يمر الإنزيم خلال العمود للحصول على إنزيم عالي النقاوة ويكون الإنزيم مخفف الذي يمكن تركيزة أو إزالة الماء منه كليا بالتجفيد.

ح. **الترسيب**: يمكن ترسيب الإنزيم بإضافة محلول مشبع من كبريتات الأمونيوم مما يسبب سهولة فصل الإنزيم بالطرد المركزي أو ترسيب الإنزيم بواسطة أما الأسيتون البارد أو الايثانول الذي تسبب انخفاض قطبية المحلول لأنه تقل قابلية الذوبان مما تترسب ويحصل الترسيب بسبب الصفات الايونية للإنزيم لان خفض الأس الهيدروجيني إلى قريب من نقطة التعادل الكهربائي يصبح صافي الشحنه صفر مما تقل قابلية الذوبان مما يسهل ذلك من ترسيب الإنزيم.

التأكد من نقاوة الإنزيم: يجب التأكد من نقاوة الإنزيم عن طريق الكشف عن نشاطه بعد كل خطوة من خطوات التنقية السابقة وكذلك تقدير النشاط النوعي للإنزيم في كل جزء منفصول من خلال فحص حركية النشاط التحفيزي للإنزيم للتفريق بين الصيغ الفعالة وغير الفعالة للإنزيم لتعطي فكرة عن التركيز النسبي له، لكي نتمكن من معرفة الجزء الذي يحتوي على نشاط تحفيزي ثم تقدير درجة نقاوته، لا يحصل تغير في النشاط

الكلي للإنزيم بسبب خطوات التنقية وجمع النشاطات الإنزيمية في الأجزاء المختلفة ستعطي النشاط الكلي للإنزيم ويجب أن يكون النشاط النوعي للإنزيم في الأجزاء المخلوطة اكثر مما هي عليه في المستحضر قبل التنقية فالزيادة في النشاط النوعي تشير إلى زيادة نقاوة الإنزيم ويكون النشاط النوعي للإنزيم بعد كل خطوة تنقية اكبر من الخطوة التي سبقتها لحين الوصول إلى النقاوة الكلية عندما يكون النشاط النوعي في قيمة محدودة ولكن في بعض الأحيان يكون ثبات نشاط الإنزيم قبل وبعد كل خطوة تنقية لا يعني لن الإنزيم نقيا بصورة كاملة لأن البروتينات الملوثة توجد بنفس النسبة في الأجزاء المفصولة الحاوية على الإنزيم كما أن التبلور لا يعتبر أساس ودليل قاطع حول نقاوة الإنزيم لذلك لا بد من استخدام مقاييس أخرى للدلالة على نقاوة الإنزيم وهي:

أ. **قابلية الذوبان:** تعطي قابلية الذوبان دليل على وجود اكثر من إنزيم واحد في المحلول، ويمكن دراسة العلاقة بين الكمية للإنزيم المنقى المضاف إلى حجم معين من المحلول المنظم، فإذا كان هناك إنزيم واحد فقط، فأن العلاقة ستكون مستقيمة على التراكيز المنخفضة وتستمر العلاقة المستقيمة حتى يتشبع المحلول، عندما لا تذوب كميات إضافية مهما كانت الكميات المضافة الذي يبين العلاقة بين كمية الإنزيم المذاب والإنزيم المضاف حيث يحصل تغير فجائي في استقامة الخط مما يدل إلى تشبع المحلول، أن وجود اكثر من إنزيم في المحلول، فأن قابلية الذوبان لكل واحد منهم تختلف عن الآخر مما يسبب ذلك انحراف في استقامة الخط كلما يصل إنزيم منهما إلى درجة الإشباع، ففي حالة وجود انحراف واحد يشير إلى نقاوة الإنزيم بينما يدل وجود اكثر من انحراف واحد إلى وجود اكثر من إنزيم.

ب. **الطرد المركزي فائق السرعة ultrahigh speed centrifugation:** يستعمل الطرد المركزي فائق السرعة على نطاق واسع في تقدير نقاوة المستحضرات الإنزيمية، حيث يتم ترسيب الإنزيمات المتشابه والحاوية على مجاميع موزعة بشكل عشوائي في خلية جهاز الطرد المركزي تحت تأثير قوة الطرد المركزي لتعطي حدا واضحا بين الوسط الخالي من البروتين والوسط الحاوي على الإنزيم (بروتين) الذي يستطيع ان يعكس الضوء الساقط عليه عند الاختبار من خلال نافذة مثبته على جهاز لقياس معامل الانكسار في كل قمة منحني باستعمال جهاز Schieren optical لرصد حركة الحد

باستمرار الترسيب بسبب دوران الجهاز، فإذا كان الإنزيم نقيا يمكن ملاحظة حد واحد فقط ووجود اكثر من حد يدل على وجود تلوث أو اكثر من إنزيم في المحلول، حيث يتم الطرد المركزي على سرعة 55000 دورة في الدقيقة أو 500000 x g.

ج. **الهجرة في المجال الكهربائي الهلامي gel electrophoresis**: تستخدم الهجرة في المجال الكهربائي في فصل مخاليط الإنزيمات والبروتينات وتستخدم أيضا للتأكد من نقاوة المستحضر الإنزيمي ويستخدمdiscontinuous disc electrophoresis على نطاق واسع في هذا المجال حيث توضع الأقطاب الكهربائية في خزانين منفصلين تحتويان على محلول منظم ويتصل الخزانين فيما بينهما بواسطة أنابيب زجاجية عمودية تحتوي على الوسط الداعم وهو هلام متعدد الاكريلامايد وبسبب الفروقات في الأس الهيدروجيني لتركيز العينه إلى تكوين شريط حاد مما يحصل الفصل بسبب الانتقال في المجال الكهربائي، بعد اكتمال الهجرة في المجال الكهربائي يتم نزع الهلام وتلوينه وإزالة الصبغات الزائدة بعملية الغسل ويلاحظ وجود شريط واحد أو اكثر محدد المعالم.

د. **منطقة نقطة التعادل الكهربائي Isoelectric focusing**: يستخدم zone boundary electrophoresis مع استخدام امفولايت حيث تعمل تدريج للأس الهيدروجيني بين القطبين عند ربط التيار الكهربائي مما يهاجر الامفولايت في المجال الكهربائي إلى أن يصل إلى نقطة التعادل الكهربائي العائدة له ويبقى مستقرا فيها لان صافي الشحنه التي يحملها يكون صفرا، بعد ذلك يوضع النموذج وتستعمل عملية الهجرة وقد تستغرق العملية عدة أيام حتى يصل الإنزيم إلى نقطة التعادل العائدة له حيث يتم تثبيت الإنزيم في مناطق محددة وواضحة جدا.

الفصل الثامن عشر

آليات وتقينات التحليل الإنزيمي

آليات وتقانات التحليل الإنزيمي

يمكن رصد التفاعلات الإنزيمية بواسطة العديد من الآليات والتقانات ومن أكثرها استخداما هو السبيكتروفوتوميتري والسبيكتروفلوروميتري والطرق الالكتروكيمياوية والطرق الشعاعية الكيمياوية وهي تقانات حساسة إلا إنها لا تسمح برصد سرعة التفاعلات المستمرة وتشمل الطرق الآلية (الأوتوماتيكية) الكاملة للتحليل الإنزيمية على طرق الوقت الثابت باستعمال الأجهزة القائمة بذاتها أو أجهزة الجريان المستمر أو التركيز الثابت أو طرق الرصد المستمر الذي تتضمن استعمال أجهزة تحليل لرصد سرعة التفاعلات الإنزيمية والطرد المركزي السريع الذي يمكن ربطها بواسطة الحاسبة اللاكترونية للحصول على نتائج جاهزة.

تقانات الكشف للإنزيمات: هناك العديد من طرق الكشف المختلفة الذي تستعمل في التحليل الإنزيمي والذي تعتمد إما على الطريقة الحركية أو طريقة نقطة النهاية لدراسة خواص الإنزيم حيث يمكن ربط الجهاز الذي يكشف عن التغيرات الحاصلة في التفاعل الإنزيمي في جهاز تسجيل لكتابة سير التفاعلات الإنزيمية دون الحاجة إلى مراقبة الجهاز وبالإمكان استعمال إنزيم غير متحرك الذي يمكن الاستفادة منه بعد انتهاء التفاعل ومن الطرق المستخدمة للكشف عن الإنزيمات هي:

1. **مقياس ضغط السوائل والغازات والأبخرة Manometry:** مقياس ضغط السوائل والغازات والأبخرة من التقانات المهمة لدراسة المركبات الوسطية للعمليات الهدمية في الأنسجة الحيوانية والنباتية حيث يتم تقطيع الأنسجة الحيوانية والنباتية إلى شرائح صغيرة للحصول على مستحضرات إنزيمية تحتوي على الأوكسجين مع دخول وخروج المركبات الوسطية الايضية إلى الخلايا من الوسط المعلق السائل حيث يمكن حضن الأنسجة المعلقة في وسط ايضي معين لدراسة تحويلة إلى ناتج نهائي الذي يمكن أن يتجمع في الوسط مثل تحويل الكلوكوز إلى حامض اللاكتيك بواسطة الأنسجة الحيوانية الحاوية lactate dehydrogenase ويمكن قياس معدل تركيز الأوكسجين المستهلك بواسطة الأنسجة مع الانخفاض في الضغط الجزئي للأوكسجين الذي يمكن قياسه بواسطة جهاز manometry وهذا الجهاز مهم جدا في تفاعلات

دورة حامض الستريك في العضلات ويمكن تتبع سير التفاعل بواسطة هذا الجهاز إذا كانت المادة الأساس أو نواتج التفاعل في التفاعل الإنزيمي هي مادة غازية والذي يكون الجهاز محكم الغلق بالنسبة للهواء والذي يتكون من وعاء مرتبط بالجهاز حيث توضع العينه والمادة الكاشفة في موقعين مختلفين ويخلطان معا في الوقت صفر ويستمر التفاعل حيث يقدر استهلاك المادة الأساس أو يقدر الناتج أي تحرير الغاز من ملاحظة جريان السائل في أنبوب الجهاز حيث يتحرك السائل الموجود في الجهاز باتجاه أم يقترب أو يبتعد عن الوعاء الذي يجري فيه التفاعل مما يصبح السائل في ذراعي الجهاز في مستوى غير متساوي مما يؤدي ذلك إلى حصول تغيرات في الضغط مما يؤثر على القياسات التي تجري على سير التفاعل وهناك أنواع مختلفة منه فهي أما ثابتة الحجم الذي فيه يرتبط الجهاز في خزان ويمكن التخلص من الحجم الزائد بفتح صنبور موجود وبذلك يمكن إضافة أو سحب السائل حسب الحاجة من الجهاز، ويمكن التحكم بكمية السائل قبل اخذ القراءات بحيث يكون مستوى السائل في الذراع القريبة من وعاء التفاعل المثبت على نقطة معينه ويعطي الفرق بين مستوى السائل في الذراعين مؤشرا على الضغط الموجود في إناء التفاعل ويحصل تغير في الضغط تبعا لاستهلاك أو تحرير الغاز من قبل التفاعل وبذلك يمكن تتبع سير التفاعل في جهاز الضغط الثابت وتستعمل هذه الطرق لدراسة التفاعل المستهلك للغاز أي الذي يساعد فيه إنزيم كلوكوز اوكسيديز ولمادة الأساس هي أوكسجين أو تتبع إنتاج غاز ثاني اوكسيد الكربون في تفاعلات decarboxylase أو يستعمل في التفاعلات المنتجة للأحماض الذي تتضمن اختزال NAD^+ إلى $NADH, H^+$ عند إضافة بيكربونات إلى خليط التفاعل ومن ثم قياس ثاني اوكسيد الكربون المتحرر.

2. **جهاز السبيكتروفوتوميتري Spectrophotometer**: يسمى هذا الجهاز أيضا جهاز قياس الطيف الضوئي وهو تتقنيه مهمة في التفاعلات الكيموحيوية، فالمواد الملونة تمتص بعض الأطوال الموجية من الضوء الذي إما أن يعكس أو يسمح بمرور الضوء، فالمواد الأساس الذي لا تكون ملونه تملك صفة امتصاص بعض الأطوال الموجية في الضوء المرئي، فالطول الموجي الذي يحدث فيه أقصى امتصاص لطاقة الضوء (الجدول 22-).

جدول (28) قيم امتصاص طاقة الضوء لبعض المركبات المهمة

الطول الموجي	المركب	الطول الموجي	المركب
260	Nucleotides	210 ,280	Protein
325	Vitamin A	240	Pyrimidine
340	NADPH	250	Pyridine
663	Chlorophyll a	440	Caroteinoids
649	Chlorophyll b	2105-2150	Acetylene
440,366	FAD	260	ATP

وتستخدم مواد أساس غير مفلورة وهي استرات الكحولات أو الأمينات عالية الفلورة ويمكن الكشف عن نشاط triacylglycerol lipase أو استعمال فلورسين ثنائي الخلات كمادة أساس لإنزيم esterase أو تستعمل مشتقات 4-methyl amply pheron العالية الفلورة للكشف عن نشاط esterases, phosphatases, glycosidases, sulphatases وتتم فلورة التيروسين والتربتوفين على طول موجي 330 – 350 نانوميتر وهما توجدان في الإنزيمات لذلك يستعمل قياس الطيف الضوئي في التحاليل الإنزيمية للكشف عن المواد الأساس الذي تبعث الضوء في المنطقة المرئية ومن المشاكل والصعوبات التي تواجه هذه التقنية هي الانطفاءquenching والذي فيها تنتقل الطاقة الزائدة التي تمتلكها الجزيئات المتهيجة بسبب امتصاصها الفوتون إلى جزيئة أخرى بدلا من انتقالها إلى فوتون آخر، عندما تمر حزمة الضوء خلال محلول المادة الأساس ينعكس جزء من الإشعاع بسبب جدار الوعاء والمحلول وجزء منه يمتص بواسطة المحلول بينما الباقي يعبر خلال المحلول فأن انعكاس وامتصاص وعبور الضوء يعتمد على بعض الأساسيات وطبقا لقانون بوكر أو لامبرت وهي عندما تمر حزمه الضوء الأحادية اللون خلال وسط متجانس، فأن كل طبقة من الوسط تقلل كثافة الضوء بثابت معين.

$$Kd = \log_e Io/I \text{-----------------------------} (1)$$

$$Or \quad I - Ioe^{-kd} \text{-----------------------------} (2)$$

حيث أن I هي كثافة الضوء العابر أو الساقط و Io هي كثافة الضوء الخارج أو النافذ بينما k هي كمية ثابتة و d هي سمك الوسط الماص في السنتيمتر، يقل الضوء الساقط

مع زيادة سمك الوسط الماص وطبقا لقانون بير عندما تكون المادة الماصة في حالة غازية أو مذابة في مذيب شفاف فأن الامتصاص يتناسب مع جزيئات المادة الماصة في ممر الضوء أي أن:

log e Io/I =kc ------------------------------(3)

or I =- Io e^{-kc} --------------------------(4)

عندما c هي تركيز المادة في الغرام لكل لتر وعند ربط المعادلتين (1) و(3) ينتج

log e Io/I = kcd ----------------------------(5)

حيث أن log eIo/I هو لوغاريتم مقلوب الضوء الساقط الذي يطلق عليه الامتصاص أو إطفاءextinction الوسط والذي يرمز له A أي الامتصاصAbsorbance أو E للانطفاء Extinction لذلك يمكن كتابة المعادلة (5) كالآتي:

A = kcd ------------------------------(6)

وهي تعبير رياضي لقانون لامبرت – بير أو بوكر – بير وطبقا هذا القانون، فأن الامتصاص للوسط المتجانس هو ناتج الامتصاصية (k) absorptivity وطول الممر الضوئي وتركيز الوسط وتعتمد الامتصاصية (k) على طبيعة المادة الأساس وثباتها تجاه المواد الأخرى، فإذا كان d يساوي واحد سنتيميتر و c يعبر عنها غم مول\لتر فإنها ثابتة ويعبر عنها معامل انطفاء جزيئي molecular extinction coefficient وهي (E%1 cm) ومعامل الانطفاء للمركبNADH في 340 نانوميتر هو $6.22x\ 10^{6}$ سم^{2}\مول، وقيمة k ثابتة لمادة معينه و d أيضا ثابتة لكل جهاز، فأن الامتصاص يتناسب طرديا مع تركيز المادة والعلاقة تكون خطية بين الامتصاص والتركيز، أن التداخلات للجزيئات في المحلول والارتباطات بين المذاب والمذيب لها تأثير على الامتصاص، تطبق المعادلة (6) على الضوء المرئي من 400 – 700 نانوميتر أو الأشعة فوق البنفسجية من 200 – 400 نانوميتر وفي الطرق التي تحسب فيها السرعة الأولية للتفاعل يفضل زيادة الامتصاص الضوئي وملاحظة الوقت لأن التفاعل يتم على الجزء الحساس من الامتصاص الضوئي أي خلال المرحلة الأولى من التفاعل ويمكن تتبع تفاعلات $NAD, NADP^{+}$

كمرافقات إنزيمية وهناك العديد من الأجهزة المتوفرة حاليا لقياس الامتصاص والذي تتكون من الأجزاء التالية هي المصدر الضوئي، وحدة الضوء الأحادي، كاشف الضوء العابر، مقياس العبور، الشق الطولي والخلية للعينه، حيث أن مصدر الضوء هو مصباح هب تنكستن في المنطقة المرئية والذي أطوالها الموجية من 340 إلى 900 نانوميتر أو القريبة من الحمراء والقريبة من الأشعة فوق البنفسجية بينما مصباح الهيدروجين يستعمل في المنطقة للأشعة فوق البنفسجية من 200 إلى 360 نانوميتر والضوء يمر خلال مرآة تسديد قبل دورة إلى وحدة الضوء الأحادي الذي تسمح بمرور مدى معين من الأطوال الموجية التي تسقط على خلية ضوئية مما تكون ضوء أحادي عندما يمر الضوء خلال منشور محزز بدلا من المرشحات الملونة أو قد يستعمل موشور زجاجي موحد اللون لانتقاء ضوء وحيد اللون ويكون الموشور دوار حيث يرشح خلال شق ضيق slit حيث يعمل الموشور إلى تشتيت الضوء إلى حزم ضوئية مختلفة حيث تمر الحزمه الضوئية من خلال الشق الضيق لتمر خلال المحلول للمادة الأساس أو المرافق الإنزيمي الذي يقع بين أنبوب الخلية cuvettes ذات طول معين وسمك معين لمرور الضوء بكميات متساوية سمك جدارها واحد ملم وقطرها الداخلي واحد سنتيمتر ثم يمر الضوء العابر من خلال كاشف لغرض قياس الضوء والذي يكون حساس جدا للضوء والذي يرتبط مع مقياس للقراءة الذي يقرأ الكمية المضبوطة من الضوء المار خلال العينه.

3. **السبيكتروفلوريمتري spectroflurimetry**: بعض المركبات تكون مشعة fluorescent عندما تمتص ضوء على طول موجي معين ومن ثم تعكس الضوء على طول موجي أطول فعند التراكيز المنخفضة، فأن شدة الإشعاع fluorescence(I_f) له علاقة طردية مع الضوء الساقط (Io).

$$I_f = 2.3 \times Io \times e \times c \times I \times q$$

حيث أن e هي مكافئ الانطفاء الجزيئي، c هي التركيز المولي، I هي طول الممر الضوئي، q هي كفاءة الكونتم أي عدد الكونتا المشعة مقسمه على الضوء الساقط لتلافي الكشف عن الضوء العابر ويعتبر اكثر حساسية من السبيكتروفوتوميتري وتختلف تأثيرات الإشعاع مع اختلاف درجة الحرارة، لذلك من الضروري جدا المحافظة على درجة الحرارة

ثابتة عند القراءة وتظهر NADH و NADP خاصة الفلورة حيث تمتص الضوء على طول موجي 340 نانوميتر وتعكسه على طول موجي 460 نانوميتر لذلك يمكن تتبع سير التفاعل الإنزيمي الذي يشارك فيه تلك المرافقات الإنزيمية، أن إضافة L-Serine إلى الإنزيم يؤدي إلى زيادة ملحوظة في إشعاع مجموعة البيريدوكسال فوسفيت وإضافة الاندول كمادة أساس ثابتة يخفض من كفاءة الإشعاع إلى مستوى اقل من الإنزيم نفسة وذلك بسبب تكوين معقد الإنزيم – السيرين أو معقد إنزيم – سيرين – اندول.

4. **الطرق الكيمياوية الكهربائية electrochemical methods**: استعملت طرق كيمياوية – كهربائية في التحاليل الإنزيمية حيث تستعمل تقنية مقياس القوى الكهربائية المحركة potentiometer الذي يولد جهد كهربائي يعتمد على تراكيز وصفات المواد الموجودة في عينه الفحص ويلاحظ التغير في الجهد مع استمرار التفاعل كمقياس لسرعة التفاعل وقد استخدم فرق الجهد لإنزيم الكلوكوز اوكسيديز وذلك من خلال تفاعل D-glucose مع الأوكسجين لانتاج بيروكسيديز الهيدروجين الذي يعمل على أكسدة الايوديد بوجود المولبيدنم كعامل مساعد.

$$D\text{-glucose} + O_2 \longrightarrow H_2O_2 + \text{gluconnolactone}$$

$$H_2O_2 + 2\,I^- + 2H^+ \longrightarrow I_2 + 2H_2O$$

حيث يتم وضع أحد الأقطاب البلاتينية في خليط التفاعل والقطب الآخر في المحلول القياسي الحاوي على تركيز ثابت من الايوديد ثم يوصل المحلولان ببعضهما من خلال فتحه صغيرة جدا دون أن يمتزج المحلولان ببعضهما فالوقت اللازم لتغير الفولتية بمقدار معين يتناسب عكسيا مع سرعة التفاعل الأولي فالجهد الحاصل نتيجة انتقال الإلكترونات بين القطب والمحلول لا يمكن قياسه ما لم يتم ربط الخلية مع محلول قياسي ذات جهد معلوم أو استعمال أقطاب منتخبه الأيون حيث بالإمكان ربط أو عمل علاقة بين الجهد الناتج وبين تركيز مادة معينة وذلك باستخدام قطب زجاجي الذي يستعمل في جهاز قياس الأس الهيدروجيني حيث يوجد قطب داخلي مكون من سلك فضة مغطى بواسطة كلوريد الفضة ويغمس في محلول يحتوي على حامض الهيدروكلوريك ذو أس هيدروجيني معلوم حيث تنفصل مكونات القطب عن محلول العينه بواسطة زجاج رقيق مما يتولد جهد يعتمد على فرق

الأس الهيدروجيني على جانبي الزجاج ويمكن قياس جهد نصف الخلية عند ربط القطب الداخلي إلى القطب الخارجي المسمى reference أي قطب كالوميل ونكمل الدورة بواسطة جسر ملحي مما يتكون جهد ثابت في كل طرف وممكن تتبع سير التفاعلات الإنزيمية من قياس تغيرات الأس الهيدروجيني ومن هذه الطريقة أن نشاط الإنزيم يتغير مع تغيرات الأس الهيدروجيني، لذلك استخدم طريقة افضل هي pH-stat الذي يتكون من جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH-meter مرتبط مع سحاحة تعمل بواسطة محرك السحاحة عندما يعود الأس الهيدروجيني بطريقة ما بحيث يتوقف محرك السحاحة عندما يعود الأس الهيدروجيني للخليط إلى الأس الهيدروجيني الأصلي الذي بدأ فيه التفاعل ومع استمرار التفاعل يحصل تغير في الأس الهيدروجيني للخليط حيث يبدأ محرك السحاحة بالعمل حيث يضاف الحامض أو القاعدة من السحاحة مع تحريك مستمر مما يتغير الأس الهيدروجيني إلى القمة الأصلية، نلاحظ التغيرات في الأس الهيدروجيني بواسطة مسجل أوتوماتيكي يسجل الكمية المضافة من السحاحة في الوقت الذي يستغرقه التفاعل، أن الأس الهيدروجيني لخليط التفاعل يبقى ثابتا خلال التجربة وتعتبر كمية الحامض أو القاعدة المضافة مؤشرا على سرعة التفاعل أو ممكن استعمال polarography أو voltammetry حيث تزداد الفولتية بين قطبين مغمورين في محلول العينه ويعتمد التيار المار في محلول العينه في أي وقت من الأوقات على تركيب محلول العينه نفسة وعندما تمر فولتية بين القطبين فان التيار يعتمد على التوصيل الكهربائي للمحلول وهو عبارة عن مجموع ما تساهم به كل الأيونات الموجودة في التفاعلات الإنزيمية مما يحصل تغير في عدد نوعية الشحنات عندما تتحول المواد إلى نواتج حيث يتم تتبع سير التفاعل من تقدير التغير في التوصيل الكهربائي مع مرور الوقت.

5. **جهاز قياس السعرات الحرارية الدقيقة microcalorimetry**: يمكن تقدير كمية الطاقة المتحررة بواسطة أكسدة المادة الأساس للإنزيم في التحليل الإنزيمي في عينه معلومة الوزن باستعمال bomb calorimeter وقياس الكمية الكلية من الحرارة المنتجة وقيمة السعرات الحرارية المنتجة من المادة الأساس يمكن تقديرها بواسطة مقياس السعرات الحرارية وتزداد أهمية التحليل الإنزيمي في معظم التفاعلات حيث يزداد أو يقل المحتوى الحراري enthalpy، $\Delta H=P\Delta V-\Delta E$ حيث أن ΔE تمثل الزيادة في الطاقة الذاتية intrinsic energy و H تمثل الزيادة في المحتوى الحراري

enthalpy و $P\Delta V$ يمثل العمل المنجز في وسط التفاعل الإنزيمي عند زيادة حجم التفاعلΔV عند ضغط ثابت P وبدرجة حرارة ثابتة ويعرف التغير في المحتوى الحراري بأنه كمية الحرارة التي تمتص أثناء التفاعل الإنزيمي والذي يمكن تقديرها بواسطة جهاز قياس السعرات الحرارية ويجرى التفاعل في الجهاز تحت ظروف مسيطر عليها حيث يمكن ملاحظة التغيرات في درجة الحرارة، ويمكن تقدير كمية كلوكوز الدم بواسطة التفاعل الذي يساعد فيه hexokinase في محلول منظم Tris وعلى قيمة أس هيدروجيني 8.

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \downarrow \text{glucose-6-phosphate} + \text{ADP} + H^+ \quad \Delta H = -28\,\text{kj mol}^-$$

$$\text{Tris} + H^+ \longrightarrow \text{Tris-}H^+$$

يستعمل جهاز قياس السعرات الحرارية في تقييم العمليات الايضية التاكسدية.

6. **طرق الإشعاع الكيمياوية:** استعمال المواد الأساس المعلمة بالنظائر المشعة أهمية كبيرة في التحاليل الإنزيمية، ومن النظائر المشعة المستعملة هو الهيدروجين –3 (تريتيوم)، كربون –14 ، فسفور-32، يود-131 ، كبريت-35، التقانات الإشعاعية مبنية على أساس الصفات لبعض العناصر المشعة وهي تبعث إشعاعات من نوع بيتا(الكترونات) حلال تحللها وتدعى بالنظائر المشعة، ذرات بعض النظائر المشعة تبعث جزيئات ألفا المكونة من اثنان من البروتونات واثنان من النيوترونات المرتبطة معا بينما النظائر الأخرى تبعث جزيئات بيتا الذي هي إلكترونات، بعضها تبعث جزيئات كاما المتعادلة الذي تكون كهر ومغناطيسية فالعناصر المشعة الذي تبعث جزيئات ألفا وبيتا تفقد باستمرار الكتروناتها وبروتوناتها وبسبب هذه العملية، فإن العناصر تكون في عملية تحلل تلقائي ولا يعتمد معدل انحلال العنصر المشع على الظروف البيئية الخارجية، فالوقت الذي خلاله نصف وزن العينه المعلومة يتحلل يطلق علية فترة نصف العمر فأن فترة نصف العمر ونوع الجزيئات المشعة

المنبعث بواسطة بعض النظائر المحفزة والطبيعية، ينتهي التفاعل الإنزيمي بعد مرور وقت معين من بدء التفاعل ثم يتم فصل المادة الأساس من ناتج التفاعل بواسطة كروماتوكرافيا الهجرة في المجال الكهربائي ثم تقدير تركيز ناتج التفاعل بصورة غير مباشرة لقياس النشاط الإشعاعي، وبالإمكان الكشف عن أشعة بيتا ذات طاقة عالية التي يبعثها الفسفور- 32 واليود -131 باستعمال عداد جيجر - مولر أما التي تبعث أشعة بيتا ذات طاقة منخفضة باستعمال هيدروجين -3 وكربون-14 وكبريت- 32 الذي يكشف عنها بواسطة عداد الإشعاع السائل liquid scintillation counting حيث يتم تفلور بعض المذيبات العضوية عندما ترتبط بها أشعة بيتا مما يؤدي انبعاث ضوء على طول موجي قصير جدا ثم تحويله إلى ضوء ذي طول موجي أطول بسبب الفلورة لواحد أو اكثر من المواد المفلورة ثم الكشف عنها ومثال ذلك هو التفاعل الذي يساهم فيه الكولين استيريز حيث يمكن إزالة المادة الأساس غير المتفاعلة بواسطة التبادل الايوني ثم تقدير النشاط الإشعاعي في الجزء الحاوي على حامض الخليك وتعتبر من الطرق الحساسة جدا إلا إنها ذات تأثيرات جانبية بسبب الأضرار الصحية عند التعامل مع النظائر المشعة وتستعمل عدة تقانات لفهم آلية العملية.

أ. Tracer technique: في هذه التقنية، فأن العنصر المشع يعرف يعرف Tracer أو المعلم حيث تتم تغذية الأحياء المجهرية بواسطة العنصر المشع المخلوط مع العنصر الاعتيادي حيث يتم ايض الكلوكوز الحاوي كربون-14 الذي يسبب الكلوكوز الحاوي كربون -12 فأن ذلك يؤدي إلى قتل الأحياء المجهرية ثم تحليل النواتج المختلفة لتحليل وجود النشاط الإشعاعي باستعمال عداد حساس لقياس ذلك ومن معرفة النشاط الإشعاعي في النواتج المختلفة يمكن معرفة معدل وتسلسل التفاعلات الإنزيمية في عمليات التخليق وتستعمل هذه التقنية في تقدير مسلك من المسالك الايضية المختلفة في الحيوانات والنباتات ويمكن تقدير الأوكسجين المتحرر خلال عملية التركيب الضوئي من الماء وليست من ثاني اوكسيد الكربون، كما تستخدم في تقدير نفاذية الخلايا والعضيات الخلوية.

ب. عداد جيجر – مولر Muller counter – Geiger: مبني على أساس الصفات المتأينة من الأشعة الفعالة حيث توضع المادة الأساس الحاوية نظير مشع في أنبوب العينات الذي يوضع في ماسك معين قريب إلى شباك ميكا mica window، الانبعاثات المشعة من العينه تسبب تأين جزيئات الغاز (بخار الكحول – اركون) والذي يسبب جزيئات التيار الذي يمكن تكبيرة والاستفادة منه في تسجيل الإشعاعات.

7. الاستقطاب polarimetry: بسبب التخصص المجسم للإنزيمات ، فإنها تهاجم صيغة واحدة للمادة الأساس فهو قد يكون أو لا يكون فعالا من الناحية الضوئية وحتى ولو كانت المادة الأساس فعالة ضوئيا فأن النشاط الضوئي لها يختلف عن النشاط الضوئي للناتج فهناك العديد من التفاعلات الإنزيمية الذي يساعد فيها racemases على تغير النشاط الضوئي أو الانحراف الضوئي وتتناسب زاوية تدوير الضوء المستقطب المار خلال محلول يحتوي على مادة فعالة ضوئيا الذي تتناسب طرديا مع طول الممر الضوئي ومع تركيز المادة والانحراف النوعي فعلى سبيل المثال يتفاعل اللاكتيت مع المولبيدم لتكوين مركب معقد ذو انحراف نوعي عالي ويمكن تحويل اللاكتيت إلى بيروفيت بوجود lactate dehydrogenase، ويمكن توضيح الضوء الاعتيادي الذي يبعث أشعة في كل الاتجاهات فالانحراف الضوئي بدرجة حرارة معينه وطول موجي معين يمكن ملاحظته من المعادل التالية:

$$A^{o} - [\alpha]^{t}_{\ddot{e}} \text{ x } CI$$

حيث ان A^{o} هي الانحراف الملاحظ بالدرجات و $[\alpha]^{t}_{\ddot{e}}$ هو الانحراف النوعي للمادة بدرجة حرارة معينه t وبطول موجي ë و c هو تركيز المادة في المحلول (غم\ لتر) I هي طول المسلك الضوئي خلال المحاليل بالديسمترات، أي أن:

$$[\alpha]^{t}_{\ddot{e}} = A^{o} / CI$$

الانحراف النوعي هو الانحراف بالدرجات لمحلول يحتوي غرام واحد من المادة في 10 سم (1 دسم) أنبوب مستقطب ويستعمل جهاز الاستقطاب في دراسة التفاعلات الإنزيمية حيث فيها المادة الأساس وناتج التفاعلات تملك انحرافات نوعية مختلفة.

آليات التحليل الإنزيمي: يمكن ربط معظم الكواشف المستخدمة لرصد سير التفاعل الإنزيمي بواسطة مسجل أوتوماتيكي للكشف عن التغيرات التي تحصل في التفاعل الإنزيمي بواسطة مسجل recorder إلا أن ذلك يتطلب آليات لخلط مكونات المواد المتفاعلة مع بعضها البعض الآخر ففي حالة استخدام اليد لوضع خليط التفاعل في الجهاز تسمى هذه الأجهزة بالأجهزة شبه الأوتوماتيكية ولكن عندما يتم أجراء التحليل بشكل متعاقب وفي آن واحد بدون الحاجة لاستعمال اليد إلا في تحضير العينه ووضعها في الجهاز أحيانا حساب النتائج فأن تلك الطرق يطلق عليها الطرق الأوتوماتيكية الكاملة ويستخدم في الوقت الحاضر الحاسبات الإلكترونية لأجراء الحسابات المختبرية واعطاء نتائج التحليل بشكل أوتوماتيكي وتعطي معظم التقانات الأوتوماتيكية التي تستخدم في التحاليل الإنزيمية نتائج مبنية على أساس تقدير السرعة الأولية للتفاعل الإنزيمي وذلك من خلال رصد التفاعلات الإنزيمية من بداية التفاعل حتى نهايته والذي تعطي نتائج ذو سير تفاعل بشكل مستقيم خلال الفترة التي يستغرقها التفاعل وعندما تتوفر الظروف المناسبة لأجراء التجربة ومعظم التفاعلات الإنزيمية تصل بسرعة إلى طور حالة الاستقرار المستقيمة وتبقى على هذه الحالة لعدة دقائق قبل أن تهبط سرعة التفاعل الإنزيمي إلا ان التفاعلات التي يساهم فيها creatine kinase فترة تأخير طويلة قد تكون دقيقة واحدة أو اكثر قبل الوصول إلى الحالة المستقرة مقارنه مع التفاعلات الأخرى التي لا تستغرق للوصول إلى حالة الاستقرار اكثر من ثواني وتعتمد فترة الطور المستقيم على التراكز النسبية للإنزيم والمادة الأساس ويمكن تسجيل التغيرات التي تحصل في أوقات ثابتة أو تراكيز ثابتة أو الرصد المستمر.

1. **طرق الوقت الثابت:** يتم تسجيل التغيرات التي تحصل أثناء التفاعلات الكيماوية في قراءات الامتصاص الضوئي على فترات زمنية ثابتة للحصول على خط مستقيم حيث أن التغيرات تتناسب طرديا مع السرعة الأولية ويمكن أن تتم في أجهزة discrete قائمة بنفسها الذي تقوم بخلط كل عينه مع المواد الكيمياوية بواسطة سحاحة

أوتوماتيكية ومن ثم تنتقل النتيجة إلى كاشف على فترات مناسبة وعند الانتهاء من فحص العينة وبقية العينات الأخرى يتم تغير برنامج الجهاز مع تغير المواد الكيمياوية في خزانات الجهاز وهناك طريقة الجريان المستمر حيث يضخ المحلول خلال أنبوب على سرعة جريان ثابتة للمواد الكيمياوية وباستمرار خلال الأنبوب وعلى فترات زمنية منتظمة حيث يضخ النموذج المرغوب للفحص أوتوماتيكيا ليخلط مع المحاليل الكيمياوية ويتم ذلك بخلطها في ملفات بدرجات حرارية ثابتة مما يحصل اختلاط متجانس مع المحاليل الكيمياوية الخاصة بها وخلال فترة زمنية محددة يتم خلط المواد ثم ضخ هواء خلال الأنبوب مع خليط العينه والمواد الكيمياوية مما يؤدي ذلك إلى تكوين فقاعات هوائية تعمل على تقسيم خليط التفاعل إلى أجزاء لا يتعدى طول أي منها بضع سنتيمترات لمنع اختلاط محاليل العينات المختلفة فعلى سبيل المثال، يقدر تركيز الناتج للتفاعل الإنزيمي الأولي بواسطة تفاعل كاشف indicator، ففي تحليل إنزيم الفوسفاتيز القاعدي الذي يساهم فيه فوسفات فنيل ثنائي الصوديوم كمادة أساس فأنه سينتج فينول الذي يمكن تحليله بعد انتهاء التفاعل الإنزيمي الأولي بسبب طبيعة الكاشف reagent- الدليل indicator حيث يمكن تفاعل الفينول الناتج مع كاشف فولن Folin reagent ثم تقدير الامتصاص الضوئي على طول موجي 680 نانوميتر، حيث يتفاعل الكاشف مع الأحماض الأمينية الفينولية مثل الحامض الأميني التيروسين الذي يوجد في إنزيم الفوسفاتيز القاعدي لذلك يجب إزالة الإنزيم قبل استعمال الكاشف ويمكن استخدام ذلك في طريقة الجريان المستمر بوضع dialyzer الذي يسمح لمرور الفينول فقط ولا يسمح بمرور الإنزيم في مجرى الكاشف – الدليل حيث يتفاعل الفينول مع 4-امينوانتي بيرين 4-aminoantipyrine الذي يكون حساسا للأحماض الفينولية حيث يعمل antipyrine على إيقاف التفاعل الأولي وبدء تفاعل الكاشف ثم يقدر الامتصاص الضوئي على طول موجي 520 نانوميتر ويمكن ضبط الطريقة بوضع المحاليل القياسية للفينول ذات التراكيز المعلومة بين العينات للحصول على نتائج مرضية وقت تحضين التفاعل الإنزيمي هو وقت الجريان من الأنابيب الحلزونية للخلط إلى حمام تسخين العينه ويستغرق 10 دقائق أي أن التفاعل قد يتعدى الطور المستقيم لذلك من الضروري جدا استعمال محلول قياسي من إنزيم الفوسفاتيز

القاعدي ذو نشاط معلوم وكذلك يمكن رصد التفاعل الذي يساهم فيه glucose oxidase وذلك عن طريق ربط التفاعل مع صبغة وفي طريقة أخرى يمكن أن يستعمل فيها إنزيم ككاشف في تقدير الكلوكوز باستعمال peroxidase أو كلوكوز اوكسيديز حيث يوضع dialyzer في نقطة قبل اختلاط العينه مع الإنزيم.

2. **طرق التركيز الثابت:** يمكن استعمال طريقة أوتوماتيكية تعتمد على فرق الجهد لنظام كلوكوز اوكسيديز باستعمال ناتج التفاعل وهو بيروكسيد الهيدروجين لأكسدة الايوديد ويحدث التفاعل بوجود المولبيدم كعامل مساعد.

$$\text{D-glucose} + O_2 \longrightarrow H_2O_2 + \text{gluconolactone}$$

$$H_2O_2 + 2I^- + 2H^+ \longrightarrow I_2 + 2H_2O$$

يتم تركيب الخلية بوضع أحد الأقطاب البلاتينية في خليط التفاعل بينما القطب الآخر في المحلول القياسي المحتوي على تركيز ثابت من الايوديد ويوصل المحلولان ببعضهما خلال فتحة صغيرة جدا تمنع امتزاجهما معا وتغير الفولتية عند القطبين عند تكوين اليود من الايوديد، فالوقت اللازم لتغير الفولتية بمقدار معين يتناسب عكسيا مع سرعة التفاعل الأولي.

3. **طريقة الرصد المستمر continous monitoring:** تستعمل هذه الطرق لتحليل 40 عينه في الساعة الواحدة حيث تسجل النتائج كل 3 ثواني بعد خلط العينه وللتخلص من طور التأخير يتم تأخير وقت اخذ القراءة الأولى حيث يمكن ملاحظة الطور المستقيم خلال 15 -20 ثانية، فأن الجهاز يأخذ قراءات كافية قبل ذلك حيث تمر في الحساسية الإلكترونية لحساب الانحدار أو الميلان ثم إعطاء تقديرات إحصائية حول النتائج ثم يتم التخلص من العينه وتحقن عينه جديدة يمكن استعمال محلل سريع للتحاليل الإنزيمية حيث يمكن تحليل 15- 20 عينه في آن واحد في cuvvette يوضع أفقيا في جهاز الطرد،عند بدء عملية الطرد المركزي يخلط الإنزيم مع المحاليل الكيمياوية في الخلية ثم يبدأ التفاعل وتتعرض العينه إلى كاشف هو جهاز السبيكتروفوتومتيري الذي يكون مرتبط مع الحاسبة الإلكترونية لتسجيل نتائج كل عينه وبالإمكان تحليل 200 عينه في الساعة الواحدة.

الفصل التاسع عشر

تطبيقات الإنزيمات

تطبيقات الإنزيمات Applications

أولا: التطبيقات التشخيصية للإنزيمات Diagnostic applications:

للفحوصات الإنزيمية في بلازما الدم أهمية كبيرة في تشخيص العديد من الأمراض التي تحصل نتيجة للتغيرات الحاصلة في الأنسجة والخلايا لأن الإنزيمات هي المسؤول المباشر عن التغيرات الكيمياوية الحيوية لأن إنزيمات الأنسجة المريضة والتالفة تتسرب من تلك الأنسجة إلى السائل الخلوي الخارجي مثل الدم عند زيادة نفاذية تلك الأنسجة ويوجد لكل إنزيم في البلازما تركيز طبيعي وثابت في الحالات غير المرضية مما يكون الإنزيم أقصى نشاطه التحفيزي فإذا أصيبت الخلايا لنسيج ما بأي مرض بحيث يؤدي إلى تحليل الأغشية الخلوية فأن محتويات تلك الخلايا ستتسرب إلى مجرى الدم وبالتالي يزداد تركيز الإنزيمات في البلازما وتساعد الاختبارات السريرية للكشف عن التراكيز العالية للإنزيمات أو مشابهات الإنزيمات في البلازما لتشخيص الأمراض في الخلايا المختلفة لان كل نوع من الخلايا يكون متخصصا في احتوائه على إنزيمات معينة ونشاط بعض الإنزيمات في مصل الشخص المريض تساعد في تشخيص المرض اعتمادا على:

أ. الأنسجة أو الأعضاء المتأثرة بالمرض.

ب. الإنزيمات أو مشابهتها الموجودة في تراكيز أعلى في الأنسجة المصابة من الأعضاء والأنسجة الطبيعية.

ج. شدة تلف الأنسجة والأعضاء يؤدي إلى زيادة نفاذيتها.

د. أقصى نفاذية ومدتها.

ه. معدل تثبيط أو عدم نشاط الإنزيمات وإفرازها.

كل عضو أو نسيج يملك الإنزيمات الكاملة لحفظ السلامة والوظيفة الفردية حيث توجد الإنزيمات بصورة رئيسية في داخل الخلايا والسوائل الخلوية الخارجية مثل الإدرار والصفراء، بلازما الدم وسائل النخاع الشوكي الذي يحتوي كميات قليلة جدا من الإنزيمات ونتيجة الاصابه ببعض الإمراض يحصل تغير في كمية الإنزيمات اكثر أو اقل تخصص من الأعضاء المصابة وهذا التغير ينعكس على مستوى الإنزيم في مصل الدم مما يؤدي ذلك إلى تغيرات مرضية تميزها عن المرض الناتج عن غياب جيني للإنزيم لذلك من الضروري جدا

قياس كمية الإنزيمات في تلك الخلايا والعضيات ولقياس نشاط الإنزيمات فأن كمية معلومة من المصل، الدم أو أي مادة يتم اختبارها تحتوي إنزيم مخلوط بتركيز معين مع المادة الأساس أو العوامل المرافقة أو المحاليل المنظمة محفوظة لفترة زمنية بدرجة حرارة ثابتة واس هيدروجيني معين ففي نهاية الفترة الزمنية يتم قياس كمية المادة الأساس غير المستهلكة أو كمية الناتج أو التغير في الصفات للكثافة الضوئية الناتجة عن التفاعلات الإنزيمية وهناك عدد من مشابهات الإنزيمية يمكن تميزها عن بعضها البعض الآخر بواسطة صفات عدم النشاط الحراري والتثبيط بواسطة مثبطات معينه أو الحركة في المجال الكهربائي لذلك يكون قياس نشاط الإنزيم ذا أهمية كبيرة في الاختبارات السريريه بسبب إفراز إنزيمات البلازما الوظيفية الفعالة في الدورة الدموية بواسطة الكبد مما يؤدي وظائف فسيولوجية في البلازما مثل pseudocholinesterase، اللايبيز والإنزيمات المستخدمة في تخثر الدم حيث تكون كميتها في البلازما بتراكيز عالية طبيعيا واكثر من مثيلاتها في الأنسجة أما إنزيمات البلازما غير الوظيفية الذي قد تكون كمادة أساس ومرافق إنزيمي غير موجود في البلازما فان كميتها الاعتيادية في البلازما منخفض إلى حد مليون مرة اقل من الإنزيمات الموجودة في الأنسجة لذلك فأن غالبا ما يكون قياس الإنزيمات غير الوظيفية في البلازما ذات أهمية وفائدة تشخيصية فالإنزيمات غير الوظيفية يمكن تميزها عن إنزيمات افرازات الغدد الخارجية exocrine وإنزيمات داخل الخلايا الحقيقية ومن إنزيمات الغدد الخارجية هو الاميليز البنكرياسي والفوسفاتيز الحامضي البروستاتي الذي تنتقل بسهولة إلى البلازما بينما تكون إنزيمات داخل الخلايا الحقيقية هي الآلة العامة للخلية لأنها ترتبط بقوة إلى عناصر معينه في الخلية وهي غير موجودة في الدورة الدموية فأن المستويات المنخفضة من الإنزيمات غير الوظيفية الموجودة طبيعيا في البلازما ناتجة ظاهريا عن تحطيم مستمر للخلايا لكريات الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء فعند موت تلك الخلايا، تدخل الإنزيمات الذائبة إلى الدورة الدموية فأن زيادة مستوى الإنزيمات في البلازما يشير إلى النخر الخلوي فأن التمارين الرياضية العنيفة ينتج عنها تحرير كميات قليلة من الإنزيمات العضلية وذلك بسبب موقعها داخل الخلية وقابلية نفاذ الأغشية النووية وقابلية ذوبان الإنزيمات في السائل خارج الخلايا ومعدل دوران السائل خارج الخلية ووعائية المنطقة المجروحة ووجود أو غياب الحاجز الالتهابي ومعدل تحطيم أو الإبراز للإنزيمات وهناك عدد كبير من الإنزيمات الذي يكون نقصها أو زيادتها عن الحد الطبيعي سببا في حدوث بعض الأمراض السريريه فأن

الكثير من الإمراض مثل أمراض القلب والكبد والقرح والجروح المعدية وعسر الهضم وسوء التغذية والكساح واليرقان الانسدادي والتهابات البنكرياس والبروستات والكلى وفقر الدم والإمراض السرطانية المختلفة يمكن معالجتها بواسطة الإنزيمات أو مشابهتها ومن أهم الاستعمالات التطبيقية للإنزيمات في الطب هي فحص إنزيمات البلازما ويمكن أيجاز بعض استعمالات الإنزيمات في التشخيص السريري كما يأتي:

1. **إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في المصل serum alkaline phosphatase**: يوجد الإنزيم بكميات مرتفعة في العظام والأمعاء الدقيقة والكبد والكلى والمشيمة وفي مصل الدم وبعدة أشكال وهي تحلل استرات الفوسفيت العضوية لتحرير فوسفيت غير عضوي حتى في الأس الهيدروجيني للمصل في 7,4 مع ذلك فأن الأس الهيدروجيني الأمثل له هو 9 ويقدر نشاط الإنزيم في المصل للشباب ما بين 1,5 – 4 وحدات بودانسكي لكل 100 مل وكل وحدة بودانسكي هي تحرير 1 ملغم من الفسفور غير العضوي لكل 100 مل مصل خلال حضن المصل مع بيتا – كليسيروفوسفيت لمدة ساعة بدرجة 37 م واس هيدروجيني 8,6 فالمعدل العالي لترسيب الكالسيوم في العظام النامية ينعكس إلى نشاط مرتفع من إنزيم الفوسفاتيز القاعدي وهو 12,5 وحدة بودانسكي لكل 100 مل في مصل الأطفال ويزداد نشاط الإنزيم في المصل الكلي ما بين 10 – 20 مرة في حالة الكساح ولين العظام و hyperparathyroidism، ورم مكونات العظم osteogenic sacroma بسبب ارتفاع مشابه الفوسفاتيز القاعدي L-Ala –resistant, isozymeTARI القادم من العظم ويحدث بعض الارتفاع في نشاط إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في الإسهال الدهني steatorrhoea المرتبط مع أضرار العظام، في حالة hypophosphatasia يقل نشاط إنزيم الفوسفاتيز القاعدي المرتبط مع انخفاض تكلس العظام ,يرتفع نشاط الإنزيم في حالة أمراض الكبد مثل اليرقان الانسدادي obstructive jaundice والتهاب الكبد الفيروسي الحاد acute viral hepatitis بسبب زيادة إنتاج مناظر الإنزيم TARI في الكبد ويحدث ارتفاع في مستوى الإنزيم الموجود في البلازما في حالة مرض باجيت Pagets ومرض السرطان الانتقالي metastatic carcinoma وعجز

القلب الاحتقاني بسبب تضرر الكبد وسرطان البروستات prostatic carcinoma، لذلك يستخدم الإنزيم في تشخيص أمراض العظام والكبد.

2. **إنزيم الفوسفاتيز الحامضي في المصل serum acid phosphatase**: مناظرات إنزيم الفوسفاتيز الحامضي تحلل الفوسفيت العضوي لتحرير فوسفيت غير عضوي حتى في الأس الهيدروجيني للمصل مع أن الأس الهيدروجيني الأمثل لها هو 5 ويحتوي المصل الطبيعي على كميات قليلة فقط من إنزيمات الفوسفاتيز الحامضي تبلغ من صفر إلى 1,1 وحدة Shinwara لكل 100 مل وكل وحدة تماثل 1 ملغم فوسفيت غير عضوي متحرر من بيتا – كلسيروفوسفيت عند الحضن للمصل لمدة ساعة واس هيدروجيني 5 فالإنزيمات المتناظرة مصدرها الأنسجة في الحالات الطبيعية مثل العظام، الكبد، الكلى، البنكرياس والطحال ويمكن عدم تنشيط متناظرات الإنزيم بواسطة الفورمالديهايد، التارتارات والايثانول إلا أن متناظرات كريات الدم الحمراء لا تنشط بواسطة الفورمالديهايد أو الايثانول ولا التارتارات فالبروستات وسائل البروستات في الشباب غني في المتناظرات الإنزيمية المقاومة للفورمالديهايد وغير الثابت تجاه الايثانول والتارتارات ويزداد تركيز المتناظرات المتغيرة تجاه التارتارات في المصل حتى لغاية 10 مرات في حالة سرطان البروستات مع metastasis مما يؤدي ذلك إلى زيادة نشاط الإنزيم في المصل بينما ينخفض محتوى المشابهات المقاومة للايثانول فالزيادة الكمية والتغيرات في متناظرات الإنزيم لها أهمية تشخيصية في سرطان البروستات ويمكن أن يقل النشاط الكلي للمناظر المتغير مع السترات في المصل عند المعالجة مع العقاقير التالية estrogen, orchidectomy، في حالة أمراض خلل العمليات الايضية الحيوية مثل التهاب العظم ostedis وفي سرطان الثدي breast carcinoma وقد تحصل زيادة قليلة في إنزيم الفوسفاتيز الحامضي بسبب ارتفاع محتوى المتناظرات المتغيرة تجاه الايثانول والفورمالديهايد مع أن المتناظرات المتغيرة تجاه التارتارات لا تتغير في الأمراض غير البروستاتية ويستفاد من قياس مستوى الفوسفاتيز الحامضي في الإدرار عند حصول خلل في الأنسجة الإدارية ويزداد نشاط الإنزيم في الحالات المرضية للمصابين بالسرطان المعدي.

3. **إنزيم اللاكتيت النازع للهيدروجين serumlactate dehydrogenase, LDH**: يعمل الإنزيم على أكسدة حامض اللاكتيك إلى حامض البيروفيك بواسطة

نقل أيون الهيدروجين والإلكترونات من اللاكتيت إلى المرافق الإنزيمي NAD^+ الذي يختزل آنيا إلى NADH وهو يحفز أيضا التفاعل العكسي لاختزال البيروفيت إلى لاكتيت وهناك خمسة متناظرات للإنزيم إلا أن المناظر H_4 أو ما يطلق عليه أيضا $LDH\text{-}I_1$ هو الأكثر شيوعا من الناحية الكمية في الأنسجة الهوائية مثل العضلات القلبية وM_4 أو ما يطلق عليه$LDH\text{-}I_5$ في الكبد والعضلات الهيكلية وH_3M أو ما يطلق عليه أيضا $LDH\text{-}I_2$ وH_2M_2 أو ما يطلق عليه $LDH\text{-}I_3$ في الدماغ $LDH\text{-}I_2$,$LDH\text{-}I_1$ في الكلى وكريات الدم الحمراء، فالمتناظرات الخمسة كذلك توجد في المصل الطبيعي والذي تشكل النشاط الكلي للإنزيم في المصل بحدود 200 – 680 لكل مل مصل فالوحدة هي قياس الانخفاض في الكثافة الضوئية لمحلول الاختبار في 5 دقائق بسبب التفاعل الإنزيمي ويحصل تغير في نشاط الإنزيم ومتناظراته في مصل الشخص المريض بسبب زيادة بعض المتناظرات في الأنسجة المصابة فعلى سبيل المثال يرتفع المناظر $LDH\text{-}I_1$ في الجلطة القلبيةmyocardial infraction بينما يزداد المناظر LDH-I وفي حالة أمراض الكبد مثل التهاب الكبد الفيروسي المعدي infective viral hepatitis وفي الحالة المتقدمة في سوء تغذية العضلات لذلك يتأثر الإنزيم بأمراض الكبد والقلب وسرطان الدم leukemia أو ما يطلق عليه ابيضاض الدم الحاد المزمن في الحمى الراجعة relapse والأحشاء العضلي القلبي والسرطان العام والأورام المخية cerebral tumors والتهابات السحايا meningitis وتكون القيم في حالة الأورام 10 مرات تقريبا أو اكثر من الطبيعي أما في التهاب السحايا تصل القيمة إلى 50 مرة أو اكثر من الطبيعي ولكن ليس في المرضى الذين يشكون اليرقان حيث يكون مستوى الإنزيم طبيعي عند الأشخاص المصابين بأمراض معدية مزمنة والحمى الحادة وكذلك في حالات فقر الدم والاحتشاء الرئوي pulmonary infraction والمرض الورمي المتمركز localized neoplastic وعمليات المرض المزمن لذلك يستفاد من قياس نشاط الإنزيم في تشخيص العديد من الأمراض.

4. **إنزيمglutamate serum– SGOT(oxaloacetate transaminase):**

هذا الإنزيم ينقل مجموعة الآمين من حامض الكلوتاميك إلى الاوكزالو حامض الخليك لتحويل حامض الكلوتاميك إلى ألفا– كيتو كلوتاريت وتحويل اوكزالوالخلات إلى حامض

الأميني الاسبارتيك وكذلك يحفز التفاعل العكسي هما ويقدر نشاط الإنزيم في المصل الطبيعي 8-40 وحدة لكل مل والوحدة هي قياس الانخفاض في الكثافة الضوئية لمحلول الاختبار لكل دقيقة بسبب التفاعل الإنزيمي ومصدر الإنزيم في المصل هو القلب والكبد والعضلات الهيكلية الذي تكون غنية، متناظرات الإنزيم المرتبة تنازليا ويرتفع محتوى الإنزيم من 5- 30 مرة لفترة قصيرة خلال وبعد الجلطة القلبية والمتناظر السايتوبلازمي للإنزيم يوجد في المصل اقل أضرار قلبية ولكن المتناظرات المايتوكونديريه ترتفع في المصل مما تسبب نخر قلبي شديد myocardial necrosis وكذلك يرتفع في حالة عجز القلب الاحتقاني والتهاب غلاف القلب الحاد acute pericarditis وبعض أمراض الكبد مثل التهاب الكبد المعدي ويمكن أن تحدث كميات قليلة من الإنزيم في حالات سوء التغذية للعضلات العصبية والرضوض والجراحة العضلية فأن قياس نشاط الإنزيم يعزز تشخيص الاحتشاء العضلي القلبي.

5. إنزيم **SGPT– serum glutamate (pyruvate transaminase):**
هذا الإنزيم ينقل مجموعة الأمين من حامض الكلوتاميك إلى حامض البيروفيك لتحويلهما إلى ألفا- كيتوكلوتاريت والألنين على التوالي وكذلك يحفز التفاعل العكسي ويقدر نشاط الإنزيم من 9-30 وحدة لكل مللتر من المصل الطبيعي والوحدة تقيس الانخفاض النوعي في الكثافة الضوئية لمحلول الاختبار بسبب التفاعل الإنزيمي ومصدر الإنزيم هو الكبد بصورة رئيسية الذي يحلل كمية عالية من الإنزيم بينما العضلات القلبية فهي ذات محتوى منخفض نسبيا وفي حالة الإمراض الكبدية مثل التهاب الكبد المعدي والتهاب الكبد التسممي واليرقان الانسدادي.

6. إنزيم **serum cholinesterase**: يأتي الإنزيم الكاذب إلى المصل من الكبد والذي يحلل acetyl choline, succinyl choline, butyryl choline, benzoyl choline بسرع متشابه تقريبا ويقل نشاط الإنزيم في المصل بسبب استبداله بواسطة شكل اقل فعالية نتيجة اضطرابات ايضية في الجين ويقل نشاط الإنزيم بواسطة العديد من الاضطرابات الكبدية ونقص التغذية والقرح و cachexia والسل tuberculosis والتسمم الدموي البولي uremia وحتى المعالجة مع مخففات التوتر العضلي muscle relaxants مثل سكسنيل كولين كلورايد تؤدي إلى خفض محتوى الإنزيم في المصل ويمكن إثبات جرعة مخفف التوتر العضلي خلال

anesthesia لنشاط الإنزيم، choline esterase الحقيقي في الدماغ وكريات الدم الحمراء تحلل acetyl choline أسرع من سكسنيل كولين واسترات الكولين الأخرى ويقل محتوى الكولين استيريز الحقيقي true choline esterase والكاذب pseudocholine esterase في الدم في حالة التسمم بالكابامين والمبيدات الفوسفاتية العضوية حيث ينخفض مستوى الإنزيم في المرضى الذين يعانون من مرض سوء التغذية malnutrition وامراض الكبد والأمراض الموهنة المزمنة chronic deblitating والأمراض المعدية الحادة acute infectious وامراض فقر الدم بينما يرتفع محتواه في حالة المرض الكلوي nephrotic syndrome، يكون محتوى الإنزيم في خلايا الدم الحمراء النقية أعلى نسبيا من خلايا الدم الناضجة لذلك فأن قياس نشاط الإنزيم في خلايا الدم الحمراء في الدم المحيطي يمكن أن يستخدم كدليل لقياس نشاط الإنزيم في تكوين الدم hemato poietic.

7. إنزيم **serum amylase**: وهو الإنزيم المحلل للنشأ في العصير البنكرياسي والذي يدخل الدم من البنكرياس وهو ذو نشاط يتراوح اعتياديا ما بين 60 و180 وحدة سوموجي Somogyi unit لكل 100 مل من المصل وكل وحدة تحرر 1 ملغم من السكر المختزل (الكلوكوز) من النشأ عند الحضن مع المصل لمدة نصف ساعة بدرجة 37م أما في حالة وحدات Wohlgemuth، فأن نشاط الإنزيم يتراوح ما بين 3 – 10وحدات لكل 1 مللتر من المصل وكل وحدة تقابل تحليل 1 ملغم من النشا عند الحضن مع المصل لمدة 30 دقيقة بدرجة 37م ويزداد تركيز الإنزيم في الدم مما يؤدي ذلك من زيادة نشاطه في حالة التهاب البنكرياس الحاد acute pancreatitis وتحطيم النسيج الموضعي (نخر) للنسيج البنكرياسي أو انسداد الأوعية البنكرياسية ولا يمكن ملاحظة ارتفاع تركيز الإنزيم في المراحل الأخيرة من التهاب البنكرياس الحاد. ويستخدم إنزيم الاميليز في المصل لتشخيص مرض التهاب البنكرياس الحاد وزيادة كمية الإنزيم في المصل ناتجة عن بعض أمراض البنكرياس خاصة في حالة التهاب البنكرياس الحاد لان لإنزيم ألفا – اميليز البنكرياسي صفه خاصة هي صغر وزنه الجزيئي بحيث يستطيع المرور خلال الكلى ويفرز مع الإدرار في الحالة macromylasaemia حيث يكون الإنزيم مركب معقد مع بروتينات المناعة الذي

لا يمكن افرازه في هذه الحالة من خلال الكلى مما يؤدي ذلك إلى زيادة محتواه من الدم وقد يزداد محتوى الإنزيم.

8. **إنزيم اللايبيز في المصل serum lipase**: يفرز في العصير البنكرياسي ويدخل إلى الدم من البنكرياس ويتراوح نشاطه في الحالات الطبيعية ما بين 0,1 –1,5 وحدة لكل ملليتر من المصل، كل وحدة من نشاط إنزيم اللايبيز تقابل 1 مل من 0,05ع من هيدروكسيد الصوديوم المستعمل في معادلة الأحماض الدهنية المتحررة بواسطة تحلل زيت الزيتون عندما يحضن مع المصل بدرجة 37م لمدة 24 ساعة ويزداد نشاط الإنزيم خلال التهاب البنكرياس الحاد وانسداد الأوعية البنكرياسية فالارتفاع في نشاط الإنزيم في المصل يثبت لفترة أطول في التهاب البنكرياس الحاد وهو يحدث أيضا في حالة التهاب البنكرياس المزمن إلا انه لا يحدث في حالة التهاب الزائدة الدودية appendicitis الحاد ويرتفع محتوى الإنزيم في حالة مرض البنكرياس والسرطان البنكرياسي pancreatic carcinoma بينما ينخفض في حالة مرض الكبد ونقص فيتامين A ومرض السكري.

9. **التربسين**: يحصل ارتفاع مستواه في البلازما خلال مرض البنكرياس الحاد مما يسبب تغيرات في قابلية تخثر الدم وارتفاع محتواه يعتبر دليل لمرض البنكرياس الذي يعطي نتائج اكثر حساسية ودقة مقارنة مع إنزيم الاميليز واللايبيز ويستخدم الإنزيم في معالجة مرض Thrombophlebitis الحاد.

10. **إنزيم oxidase**: يظهر كلوبيولين المصل الذي يحتوي على النحاس نشاط oxidase نحو عدد من المركبات الأمينية مثل الابنفرين epinephrine وهيدروكسي ابنفرين 5-hydroxyepinephrine وهيدروكسي تربيامين -5 hydroxytryptamine وثنائي هيدروكسي فنيل الأنين مما يؤدي ذلك إلى ارتفاع نسبة ceruloplasmin في البلازما بسبب نشاط oxidase في حالات التشمع cirrhosis، التهاب الكبد والإصابات البكتيرية كما يعطي انخفاض السيروبلازمين كدليل للإصابة بمرض ولسن Wilson disease أو ما يطلق عليه تكنس الكبد العدسي hepatolenticular degradation.

11. **إنزيم كرياتين فوسفوكاينيز creatine phosphokinase**: يوجد الإنزيم بصورة رئيسية في الكبد والعضلات الإرادية وفي الدماغ وهو يملك ثلاث متناظرات ويوجد في

الأنسجة العصبية والغدة الدرقية والكلى والأمعاء بالنسبة للمناظر BB بينما المناظر MB فهو يوجد في عضلات القلب والحجاب الحاجز ولا يوجد في العضلات الإرادية أما المناظر MM فهو يوجد في عضلات القلب والعضلات الإرادية حيث أن MB يكون فعال في المصل مما يؤثر ذلك على حدوث الجلطة القلبية بينما يوجد MM بتراكيز عالية في حالة تلف خلايا العضلات الإرادية مما يسبب ذلك زيادة aldolase في البلازما فإن قياس نشاط الإنزيم في المصل له أهمية في تشخيص الاضطرابات المؤثرة على العضلات الهيكلية والقلبية ودراسة العوامل المتأثرة باضمحـــلال التضخم العضلي الزائف pseudohyper trophic muscular dystrophy ولا تحتوي الأنسجة غير العضلية ماعدا الدماغ على نسب مرتفعة من الإنزيم ولا يحصل ارتفاع للإنزيم في حالة الفشل الاحتقاني وهـــو يعطي فكرة حول تقدير احتشاء مشتبه به بوجود العجز القلبي ويرتفع محتوى الإنزيم عندما يكـون إنزيم ناقل للامين في حالة طبيعية فأن قياس نشاط الإنزيم يعتبر طريقة مفيدة لقياس إنزيـــم كلوناميت، اوكزالوالخلات الناقل لمجموعة الأمين في تعين الاحتشاء العضلي القلبي.

12. إنزيم Tyrosinase: وهو الإنزيم الذي يحفز تحويل الحامض الأميني التايروسين إلى صبغة الميلانين melanin فان نقص هذا الإنزيم يسبب بياض الشعر.

الخلل الولادي والإنزيمات

الخلل الولادي inborn errors أو ما يطلق عليه الخلل الوراثي genetic errors وهو فقد في نشاط بعض الإنزيمات نتيجة لطفرة وراثية، وهي حالات مرضية نادرة الحدوث وهي حالات حادة في حالة حدوثها وقد تؤدي إلى تخلف عقلي وقد تؤدي إلى الوفاة وهي اضطرابات أو اختلالات في العمليات الايضية الذي تؤدي إلى تجمع أو تراكم المركبات الوسطية الايضية في البلازما والإدرار والذي تكون مواد أساس تعمل عليها الإنزيمات ففي حالة عدم توفر الإنزيمات للعمل عليها يحصل تسربها بكميات كبيرة نسبيا إلى البلازما والإدرار ويمكن الكشف عن حالات الخلل من ملاحظة تاريخ العائلة للزوجين من خلال أجراء الفحوصات ما قبل الولادة pre- natal على خلايا السائل المخاطي الذي يحصل علية من الجلد وتنتقل الأمراض قبل الولادة بواسطة أسلوب وراثي يطلـــق عليه

وهي أن لكل شخص معين جين معين لتخليق الإنزيم على كل autosomal recessive زوج من الكروموسومات أحدهما يأتي من الأب والآخر من الام فإذا كان الأسلوب الوراثي متنحيا فأن ذلك يعني أن الفرد المريض قد ورث كلا الجنينين غير الطبيعيين من الأبوين فالفرد المريض يطلق عليه homozygous ويقدر نشاط الإنزيم غير الطبيعي عندة حوالي 10% من النشاط الكلي الطبيعي بينما يكون عند الأبوين heterozygous جنينين أحدهما طبيعي والآخر غير طبيعي ويتمكن الأبوين من تخليق الموقع الفعال للإنزيم من الجين الطبيعي ويكون نشاط الإنزيم هو حوالي50% من النشاط الطبيعي

ففي معظم أنواع الخلل الوراثي يكون الإنزيم على هيئة تركيبية متغيرة بسبب الطفرة الوراثية، ويعالج الخلل الوراثي بالإقلال من تناول المواد التي لا يمكن هضمها بطريقة طبيعية لمنع تركيزها داخل الخلايا وتستمر المعالجة طوال عمر الشخص المريض وهناك طريقة معالجة طويلة الأمد لامراض الخلل الوراثي والذي تتضمن زراعة نسيج أو عضو داخل الجسم ويمكن ملاحظة العديد من الحالات في الخلل الولادي وعلاقتها بالإنزيمات.

أولا: العيوب الوراثية للبيدات (مرض اللبيدات) lipidoses: هناك بعض الاختلالات أو الاضطرابات أو العيوب الوراثية الناتجة عن نقص وراثي في بعض الإنزيمات المسؤولة عن العمليات الايضية الهدمية والبنائية للبيدات مما يؤدي ذلك إلى تجمع المركبات الوسطية في أنسجة الجسم مما يؤدي ذلك إلى ظهور بعض الأمراض الولادية أو الوراثية.

1. **مرض نيمان – بك Niemann - Pick disease**: مرض وراثي ناتج عن نقص في sphingomyelinase المسؤول عن تحلل السفنجوميلين إلى سيراميد وفوسفوكولين مما يؤدي ذلك إلى تجمع السفنجوميلينات في الدماغ والكبد والطحال والذي تسبب تخلف عقلي وتوسع الكبد والوفاة في وقت مبكر.
2. **مرض تاي – ساج Tay-Sachs disease**: عيب وراثي ناتج عن نقص في hexosaminidase مما يؤدي ذلك إلى تجمع GM_2 ganglioside في الدماغ والطحال مما يسبب تخلف عقلي، عشو ونزع النخاعين demyelination والخلال المخ cerebral degeneration.

3. **مرض كوجر Gaucher disease**: مرض وراثي ناتج عن نقص في glycocerebroside glucosidase مما يحصل تجمع السيروبروسيدات أي زيادة محتوى السيربروسيدات الغنية بالكلوكوز ويؤدي ذلك إلى توسع الكبد والطحال مع تآكل العظام الطويلة وتخلف عقلي في الأطفال الرضع وفقد المعادن من العظام وتورم الطحال فقد الإنزيم يسبب عيب في التحلل المائي للكلوكوسيراميد الذي يحدث في الكانكليوسيدات والكلوبوسيدات globosides.
4. **مرض فابري Fabry disease**: مرض وراثي ناتج عن نقص أو غياب ceramide trihexosidase مما يؤدي إلى تجمع السيراميد ثلاثي هيكسوسيدات في الكلى والأمعاء واللمف مما يسبب فشل كلوي، ومن عيوبه الرؤية ولا يسبب تخلف عقلي مع طفح جلدي.
5. **مرض فاربر disease Farber**: مرض وراثي ناتج عن نقص أو عجز وراثي في ceramidase الذي يؤدي ذلك إلى تجمع السيرمايدات في الدماغ مما يؤدي ذلك إلى تخلف عقلي والتهابات جلدية وتشوة العظام وابيضاض الشعر والتهاب الجلد dermatitis.
6. **مرض كراب Krabbe disease**: مرض وراثي ناتج عن نقص galactocerebrosidase الذي يسبب تجمع الكالاكتوسيربروسيدات في الكبد مما يسبب نزع النخاعين وفشل في تطور الدماغ وتخلف عقلي.
7. **داء الكانكليوسيدات generalized gangliosidosis**: مرض وراثي ناتج عن نقص GM_1-α-galactosidase مما يسبب تجمع GM_1-ganglioside والذي تؤدي إلى حدوث تخلف عقلي وتوسع الكبد وتشوة الهيكل العظمي.
8. **داء الفركتوز Fucosidosis**: مرض وراث ناتج عن نقص α-fructosidase الذي يؤدي إلى تجمع H-isoantigen مما يؤدي إلى تخلف عقلي والخلال المخ وسمك الجلد وتشنج spasticity.
9. **داء لبيدات السيرمايدات ceramide lactoside lipidosis**: مرض وراثي ناتج عن نقص β-galactosidase أو ما يسمى ceramide lactosidase مما يؤدي ذلك إلى تجمع السيرامايد لا كتوسيد في الدماغ والكبد والطحال مما يسبب ذلك تلف الدماغ وتضخم الكبد والطحال.

10 مرض ساندوف -جاكويز Jatkewitz– Sandhoff: ناتج عن نقص إنزيم hexosaminidase A and B مما يؤدي ذلك إلى مرض وراثي يسبب نقص ceramide lactosidase مما يسبب تراكم لاكتوسيل سيرامايدات في الكلى والكبد والدماغ مما يسبب انحلال الدماغ وتضخم الكبد.

11 مرض تراكم الكبريتيدات في الدماغ **metachromatic leucodystrophy**: خلل أو اضطراب ناتج عن نقص sulfatidase مما يسبب تراكم الكبريتيدات في المادة البيضاء ونزع النخاعين وفشل نمو العظام واضطرابات تنفسية في الأطفال.

12 مرض نورم **Norum**: مرض وراثي ناتج عن نقص في lecithin-cholesterol acyl transferase الذي يمنع استرة الكولسترول والذي يتميز بارتفاع في الفوسفاتيديل كولين والكولستيرول الحر مع انخفاض مستوى استرات الكولسترول واللايزوليسيثين والفا- لايبوبروتين في البلازما.

13 ارتفاع مستوى الكولسترول في الدم العائلي **Familial hyper cholesterolemia**: مرض وراثي عائلي ناتج عن خلل في ايض الكولسترول ويتميز بزيادة تخليق الكولسترول وارتفاع مستوى الكولسترول في الدم بسبب نقص في إنزيم HMG-CoA reductase بسبب ارتفاع مستوى الكولسترول في الدم.

14 ارتفاع وانخفاض الكلوكوز في الدم **Hyperglycemia, hypoglycemia**: Hyperglycemia هو ارتفاع مستوى الكلوكوز في الدم بينما hypoglycemia هو انخفاض مستوى الكلوكوز في الدم وتظهر حالة الارتفاع في حالة البول السكري بينما تظهر حالة الانخفاض في حالة الصيام وارتفاع مستوى الأنسولين.

15 مرض رفسوم **Refsum**: مرض وراثي ناتج عن خلل في phytanate oxidase أو ما يطلق عليه phytanic acid hydroxylase مما يسبب ذلك عدم أكسدة الفاتانات مما ترتفع نسبتها في الدم والأنسجة

ثانيا: أمراض خزن الكلايكوجين والإنزيمات: حالة مرضية عامة تصف مجموعة من العيوب أو الاضطرابات أو الاختلالات الوراثية المتميزة بخزن كمية أو نوعية من الكلايكوجين تختلف عن كميتها في الأنسجة في الحالات الطبيعية وهناك أنواع مختلفة من أمراض خزن الكلايكوجين وهي:

1. النوع الأول: كلايكوجينوسز Type I glycogenosis: وهو ما يطلق عليه مرض فون جيرك Von Gierke وهو مرض خزن الكلايكوجين الوراثي وهو أحد أمراض الكلايكوجين الناتجة عن طفرة وراثية بسبب نقص glucose-6-phosphatase ويتميز بعدم انحلال الكلايكوجين glycogenolysis مما يحصل ارتفاع مستوى الكلايكوجين في خلايا الكبد والكلى وانخفاض مستوى الكلايسين في الدم ويعاني المصابون بهذا المرض بارتفاع مستوى الأجسام الكيتونية ketosis وارتفاع مستوى اللبيدات في الدم hyper lipemia مع ارتفاع مستوى حامض اليوريك في الدم وفشل الكبد في تخليق وتكوين الكلوكوز مما يمنع إنتاج اللاكتيت
2. النوع الثاني: كلايكوجينوسز glycogenosis: وهو ما يطلق عليه مرض بومب pompe وهو يتميز بغياب أو نقص $\alpha(1 \rightarrow 4)$glucosidase في جميع الانسجة مما يؤدي إلى تراكم الكلايكوجين في اللايزوسومات ويطلق على الانزيم acid maltase الذي يؤدي إلى الوفاة بسبب فشل تنفس القلب.
3. النوع الثالث: كلايكوجينوسز glycogenosis: وهو ما يطلق عليه مرض كوري Cori أو الدكستيرين المحدد limit dextrinosis أو مرض فورب Forbe disease وهو يتميز بغياب انزيم إزالة التفرع amylo-1,6-glucosidase مما يؤدي ذلك إلى تجمع السكريات المتعددة من نوع الدكسترين المحدد وهي حالة مرضية تحدث في جميع الانسجة.
4. النوع الرابع: كلايكوجينوسز TypeIV: وهو اميلوبيكتينوسز amylopectinosis أو مرض أند رسون Andersen disease ويتميز بغياب إنزيم التفرع ألفا (1← 4) أو ألفا(1← 6) مما يؤدي ذلك إلى تجمع السكريات المتعددة ذات نقاط التفرع القليلة جدا.
5. النوع الخامس: كلايكوحينوسز Type V glycogenosis: وهو مرض مك اردل Mc Ardle disease وهو ناتج عن نقص myophosphorylaaaase والأشخاص المصابين به لا يتحملون التمارين الرياضية العنيفة مما يؤدي ذلك إلى انخفاض مستوى اللاكتات والذي يسبب صعوبة تقديرها بعد التمارين الرياضية، وارتفاع مستوى الكلايكوجين في العضلات الهيكلية الذي تصل نسبتها من 2,5 – 4,1% ويحدث ارتفاع في مستوى السكر في الدم بعد تناول كلوكاكون glucogon أو

ابينفرين epinephrine مما يدل ذلك على ان انزيم الفوسفوريليز الكبدي ذو نشاط طبيعي ويصاحب الحالة المرضية ارتفاع myoglobin في الإدرار وهو ما يطلق عليه myglobinuria وهي حالة تحدث في العضلات بسبب غياب الانزيم فيها.

6. النوع السادس: كلايكوجينوسز **Type VI glycogenosis**: وهو مرض هير Her disease وهو مرض ناتج عن طفرة وراثية بسبب نقص glycogen phosphorylase مما يؤدي إلى فشل انحلال الكلايكوجين glycogenolysis مما يسبب ارتفاع الكلايكوجين في الكبد وانخفاض مستوى الكلسيرول في الدم وزيادة الاجسام الكيتونية ketosis الذي تحدث ففي الكبد.
7. النوع السابع: كلايكوجينوسز **Type VII glycogenosis**: وهو مرض تاوري Tauri وهو مرض وراثي ناتج عن نقص phosphfructokinase في العضلات الهيكلية ويتميز بانخفاض انحلال السكر glycolysis وارتفاع مستوى الكلايكوجين في العضلات ولا يتأثر الانزيم في الكبد.
8. النوع الثامن: كلايكوجينوسز **Type VIII glycogenosis**: وهي حالة مرضية وراثية ناتجة عن نقص phosphorylase kinase في الكبد والدماغ وفشل glycogen phosphorylase في الكبد وارتفاع مستوى الكلايكوجين في الكبد ومستوى الكلسيرول في الدم.
9. النوع التاسع: كلايكوجينوسز **Type IX glycogenosis**: وهو مرض وراثي يتميز بانخفاض مستوى الكلايكوجين في الكبد بسبب طفرة وراثية في glycogen synthetase في الكبد أو نقص phosphorylase kinase في الانسجة الأخرى عدا العضلية.
10. النوع العاشر: كلايكوجينوسز **Type X glycogenosis**: وهي حالة مرضية ناتجة عن عيب في انزيم protein kinase والذي يحدث في الكبد والعضلات.
11. الإدمان على الكحولات السكرية **alcoholism**: وهو خلل وراثي ناتج عن نقص alcohol dehydrogenase الذي يسبب أكسدة الكحول إلى الديهايد مما يؤدي إلى تجمع الدهن في الكبد وارتفاع مستوى اللبيدات في الدم hyperlipidemia وتليف الكبد cirrhosis وانخفاض في أكسدة الأحماض الدهنية وانخفاض في نشاط دورة حامض الستريك.

ثالثا: الاختلالات الوراثية في الهضم والامتصاص

1. **وجود السكريات الثنائية في الإدرار:** وجود disacchariduria خلل وراثي ناتج عن نقص lactase, maltase sucrase في العصير المعوى مما يسبب فشل في تحلل السكريات الثنائية في القناة الهضمية مما يسبب ذلك تخمرها في الأمعاء مما يؤدي ذلك إلى الإسهال والم في البطن وامتصاصها بشكل غير مهضوم وإفرازها في الإدرار.
2. **عجز انزيم اللايبيز:** خلل خلقي جنيني في افراز steapsin مما يؤدي إلى فشل هضم الدهون وإفراز الدهون غير الممتصة مع الفضلات.
3. **وجود اللاكتوز في الإدرار:** وجود lactosuria ناتج إما عن خلل وراثي في lactase في الخلايا المعوية للاطفال الرضع أو انخفاض تدريجي في نشاط اللاكتيز في أمعاء الأطفال مما يسبب فشل هضم اللاكتوز مع حساسية اللاكتوز في الغذاء، التخمر المعوي للاكتوز غير المهضوم يسبب ألم في البطن وإسهال وامتصاص اللاكتوز غير المهضوم يزيد من افراز اللاكتوز في الإدرار.
4. **حساسية انزيم السكريز sucrase:** عيب أو نقص أو عجز وراثي لإنزيم sucrase isomaltase في الخلايا المعوية مما تفشل في هضم السكروز وامتصاص السكروز غير المهضوم مما يزيد مستوى السكروز في الادرار sucrosuria وإسهال.
5. **وجود الكالاكتوز في الدمgalactosemia:** مرض ناتج عن نقص وراثي في انزيم phosphogalactose uridyl transferase وهو عدم قدرة الأطفال على تمثيل الكالاكتوز مما يرتفع مستوى الكالاكتوز في البلازما ومستوى galactose-1- phosphate في الخلايا الحمراء والدماغ والجهاز العصبي المركزي مما يعيق النمو وتلف الكبد وعتمة عدسات العين وإفراز الكالاكتوز في الادرار.
6. **وجود الكلوكوز في الادرار glucosuria:** خلل وراثي ناتج عن ظهور الكلوكوز في الادرار عندما يرتفع مستوى السكر في الكلى عن الحد الطبيعي وتظهر في حالة مرض السكري diabetes mellitus وكبر حجم الغدة النخامية وذلك نتيجة خلل وراثي في hexokinase أو glucokinase الذي تنظم امتصاص الكلوكوز في الانسجة خارج الكبد.

7. **مرض هيورلر Hurler disease**: مرض هيورلر أو ما يطلق عليه gargoylism ناتج عن نقص وراثي في iduronidase مما يحصل تجمع كبريتات الديرماتين والكيراتين في جهاز كولجي واللايزوزوم لخلايا الانسجة الرابطة والكبدية مما يؤدي ذلك إلى تخلف عقلي وشذوذ في الهيكل العظمي وارتفاع مستوى السكريات المتعددة المخاطية في الكلى.
8. **مرض هيونتر hunter disease**: مرض ناتج عن عجز وراثي في iduronate sulfate مما يسبب ذلك تجمع كبريتات الكيراتين والديرماتين في الكبد والأنسجة الرابطة مما يؤدي ذلك إلى تخلف عقلي وتشوة العظام.
9. **مرض لامي Lamy – Maroteaux**: يتميز بارتفاع مستوى كبريتات الديرماتين في الأنسجة وفشل النمو وشذوذ الهيكل العظمي بسبب عجز وراثي في N- acetyl galactosamine sulfatase.
10. **وجود السكريات الخماسية في الإدرار pentosuria**: مرض وراثي نادر الحدوث ناتج عن ارتفاع مستوى الزايلولوز في الإدرار بسبب غياب انزيم اختزال الزايلولوز إلى زايلتول.

رابعا: الاختلالات الوراثية للأحماض الأمينية والبروتينات

1. **مرض جلدي Albinism**: مرض جلدي عدا البرص ناتج عن تأثير tyrosine مما يسبب فقد صبغة الشعر والجلد وقزحية العين وشبكية العين retina ومشيمة العين choroid والأورام القاتمة melanomes وهي حالة مرضية ناتجة عن فقد الميلانين melanin بسبب نقص وراثي في انزيمtyrosinase أو tyrosine --3- monooxygenase، فأن عدد من التفاعلات التي تتضمن التخليق الحيوي للميلانين تحصل طفرة في عدد من الجينات تؤدي إلى خلل أو عيب ايضي في التخليق الحيوي للميلانين يؤدي إلى أعراض سريرية تتميز بانخفاض مستوى الميلانين يطلق عليه hypomelanosis وهناك أنواع مختلفة من Albinism هي:

- albinism oculoculaneous انخفاض مستوى صبغة الميلانين في العين والجلد.

- tyrosinase-negative albinism و هي الفقد الكلي لصبغة الرؤية
- tyrosinase-positive albinism تملك بعض صبغات الرؤية لون الشعر يتراوح بين الاصفر المبيض الى الدباغي الخفيف
- ocular albinism يحدث بسبب الخلل الوراثي autosomal recessive و x-linked trait.
- oculocutaneous albinoidism وهو خلل وراثي بسبب autosomal recessive.

2. **وجود القلويات في الإدرار Alkaptanuria**: خلل وراثي ناتج عن نقص homogenetisate oxidase الذي يسبب ارتفاع محتوى homogenetisate في الإدرار واسوداد الإدرار عندما يتعرض للأوكسجين وشذوذ تلوين الأنسجة الرابطة والتهاب المفاصل arthritis بسبب تجمع homogentisate وافرازه في الإدرار وسبب اسوداد الإدرار هو أكسدة مادة homogentisate.
3. **وجود الفنيل كيتون في الإدرار phenylketonuria**: وهي حالة مرضية وراثية ناتجة عن غيابphenyl alanine hydroxylase وهو ناتج عن ظهور فنيل بيروفيت، خلات الفنيل وخلات الهيدروكسي فنيل في الإدرار والدم والذي تؤدي الى تخلف عقلي فالخلل الوراثي الذي يحصل في ايض الحامض الأميني فنيل الانين له تأثير لانتاج خلات ولاكتيت الفنيل مما يقلل وزن الدماغ لدى الأشخاص المصابين وتأثير النخاعين مما ينعكس ذلك على نشاطها وفعاليتها بسبب نقص الإنزيم أو مرافقة tetra hydrobioptren ولا يمكن تحويل الفنيل الانين الى تيروسين مما يؤدي ذلك الى تجمع الفنيل الانين في كل سوائل الجسم ونتيجة الخلل يحصل تحويل الفنيل الانين الى بيروفيت الفنيل مما يرتفع مستوى الفنيل كيتون في الإدرار، خلات الفنيل ولاكتيت الفنيل وخلات ألفا هيدروكسي فنيل تكون اصرة امايد مع مجموعة الكربوكسيل لخلات الفنيل لانتاج مركب phenyl acetyl glutamine، في هذة الحالة المرضية تثبط الخطوة الأولى في تكوين صبغة الميلانين بسبب ارتفاع مستوى الفنيل الانين مما يقلل تكوين الميلانين.

4. **وجود التيروسين في الدم Tyrosinosis أو Tyrosinemia I**: خلل وراثي ناتج عن غياب أو نقص para-hydroxy phenyl pyruvate hydroxylase مما يسبب ذلك ارتفاع مستوى التيروسين في البلازما وارتفاع مستوى بارا هيدروكسي فنيل بيروفيت في الإدرار وتضخم الكبد والطحال، تليف الكبد cirrhosis وعيوب الانيبيبات الكلوية وهو عيب ايضي في fumaryl acetoacetate hydrolase ومن المحتمل في maleyl acetoacetate hydroxylase وكلا الشكلين الحادة والمزمنه من tyrosinosis معروفة ففي الحالة الحادة تسبب الإسهال للاطفال وتقيء ورائحة تشبه اللهانه وفشل كلوي بينما في الحالة المزمنه فهي تشبه الحالة السابقة إلا أن أعراضها متوسطة وتؤدي الى الوفاة بعمر 10 سنوات، ارتفاع مستوى التيروسين في البلازما الى 6 – 12 ملغم\ 100 مل كما يحصل ارتفاع المثيونين
5. **مرض ريجنر – هانهارت Hanhart- Richner**: خلل وراثي ناتج عن غياب أو نقص نشاط Tyr- transaminase مما يرفع من مستوى التيروسين في الدم والإدرار بمقدار 40 5 ملغم\100 مل والذي تحد التهابات في العين والجلد وتخلف عقلي واضطرابات في التوازن ويرفع مستوى ألفا –هيدروكسي فنيل بيروفيت، بارا هيدروكسي فنيل لاكتيت وبارا هيدروكسي فنيل الخلات و N-acetyl tyrosine التيرامين.
6. **وجود الهستدين في الدم Histidinemia**: خلل وراثي ناتج عن نقص أو غياب Histidase مما يسبب ارتفاع مستوى الهستدين، اميدازول بيروفيت واميدازول لاكتيت في الدم والإدرار مما يعيق النطق لدى الأطفال.
7. **Cytothiouria**: خلل أو عيب وراثي بسبب غياب أو نقص cytothionine lyase بسبب زيادة في مستوى cystathionine في الإدرار والذي يؤدي الى تخلف عقلي وخلل في الجهاز العصبي.
8. **Homocystinuria**: عيب وراثي ناتج عن غياب أو نقص cystathionine synthase الذي يسبب ارتفاع مستوى المثيونين في البلازما وافراز الهوموسستين في الإدرار مما يؤدي الى ترقق العظام osteoporosis وجلطة دموية في الاوعية thrombosis وتخلف عقلي.

9. **Xanthurenic aciduria**: مـرض وراثـي نـاتج عـن غيـاب أو نقـص kynureninase مما يسبب إفراز الزانثوريينيك في الإدرار.

10. وجود الهيدروكسي برولين في الدم **hydroxyprolinemia**: مرض وراثي ناتج عن غياب hydroxy proline oxidase الذي يسبب ارتفاع مستوى الهيدروكسي برولين في البلازما والإدرار مما يؤدي ذلك الى تخلف عقلي.

11. **Prolinemia I**: مرض وراثي ناتج عن الإنزيمات المؤكسدة للبرولين والذي تسبب ارتفاع مستوى البرولين والهيدروكسي برولين في الدم والإدرار مما يؤدي ذلك الى تخلف عقلي.

12. **Hyperlysinemia**: مـرض وراثـي نـاتج عـن غيـاب saccharopine dehydrogenase مما يرفع مستوى اللايسين في البلازما.

13. **Hyper oxaluria**: عيـب او خلـل وراثـي نـاتج عـن غيـاب glycine transaminase او انزيم تحويل الكلايسين الى فورميك مما يؤدي ذلك الى ارتفاع مستوى الاوكزالات في الإدرار وترسيبها في الكلى مع طراوة الأنسجة وفشل الكلى وارتفاع الضغط.

14. **Hyper valinemia**: خلل وراثي يسبب غياب valine transaminase مما يرتفع مستوى الفالين في البلازما وفشل النمو وتقيؤ وشدة تقلص العضلات أو جنون اندفاعي hyper kinesia.

15. **Maple syrup urine disease**: خلل وراثي ناتج عن غياب keto acid decarboxylase الذي تسبب فشل هدم الأحماض الكيتونية من نوع ألفا ذات السلسلة المتفرعة من الفالين والليوسين والايزوليوسين وارتفاع تلك الأحماض الأمينية والكيتونيـة مـن نـوع ألفـا في الـدم والإدرار وتثبـط ketoglutarate dehydrogenase, L-glutamate dehydrogenase وتلف الدماغ وتخلف عقلي واضطراب الحركة وفشل التنفس وتقيؤ.

16. **Isovaleric aciduria**: خلل وراثي ناتج عن غياب isovaleryl CoA dehydrogenase الذي يرفع مستوى الايزوفاليريت في العرق والبلازما والإدرار ويؤدي الى تخلف عقلي وتقيؤ وارتفاع الحموضة والغيبوبة coma

17. **Sulfituria**: خلل وراثي ناتج عن غياب او نقص انزيم sulfite oxidase.

18. **Argininosuccinic aciduria**: عيب او خلل وراثي يتميز بارتفاع مستوى حامض argininosuccinic في الدم وسائل النخاع الشوكي cerebrospinal والادرار وهو ناتج عن غياب argininosuccinase وعند ارتفاع مستوى argininosuccinic acid في الدم argininosuccinemia فأنه يحدث بسبب غياب الانزيم في الدماغ والكبد والكلى والخلايا الحمراء erythrocytes.

19. **hyperargininemia**: عيب او خلل وراثي في تخليق اليوريا والذي يتميز بارتفاع مستوى الارجنين في الدم وسائل النخاع الشوكي وارتفاع مستوى الخلايا الحمراء بسبب غياب او خلل في arginase وارتفاع مستوى اللايسين والسستين في الإدرار lysine-cystinuria ومن المحتمل حصول منافسة بواسطة الارجنين مع اللايسين والسستين لاعادة امتصاصها في الانيبيبات الكلوية وذلك بسبب تناول أغذية منخفضة البروتين ناتجة عن انخفاض في مستوى الامونيا في البلازما.

20. **citrullinemia**: خلل وراثي نادر ناتج عن إفراز كميات كبيرة من السيتروكين (1-2 غم\100 مل) في الإدرار والبلازما وسائل النخاع الشوكي بسبب الغياب الكامل لإنزيم argininosuccinate synthase مما يؤدي ذلك الى زيادة مستوى النتروجين في تلك الأعضاء.

21. **α-aminoisobutyric aciduri**: ارتفاع مستوى β-aminoisobutyric acid في الإدرار وارتفاع مستوى كريات الدم البيضاء في الدم leukemia وأورام مرضية وارتفاع DNA وهو مرض وراثي هدم البيريميدينات بسبب الخلل الوراثي في transaminase الذي يحول β-aminoisobutyrate الى methylmalonic acid semialdehyde.

22. **Hyper ammonimia Type I**: خلل وراثي في دورة اليوريا ناتج عن نقص في انزيم carbamoyl phosphate synthetase في المايتوكوندريا مما يؤدي ذلك الى ارتفاع مستوى الامونيا في الدم والادرار مع تقيؤ وتخلف عقلي وارتعاش Tremor واختلاج ataxia ونوم عميق lethargy.

23. **hyper ammonemia type II**: مرض وراثي نادر بسبب عجز L-ornithine transcarbamoylase ومن اعراضه ارتفاع مستوى الامونيا في الدم والادرار وكذلك ارتفاع مستوى الكلوتامين وظهور أعراض التسمم بالامونيا.

خامسا: الاختلالات الهرمونية والإنزيمات: adrenal hyperplasia الكميات غير الكافية من الإنزيمات الستيرويدية ناتجة عن نقص في النواتج النهائية وتجمع المركبات الوسطية وانتاج الستيرويدات من مسالك ثانوية مع خلل في إنتاج cortisol مع زيادة إنتاج هرمون ACTH وتضخم الغدة الكظرية والذي يطلق عليه تضخم الغدة الكظرية الخلفي congeritial adrenal hyperplasia وهناك نوعين من الحالة المرضية أحدهما سببه نقص 21-hydroxylase بشكل اكثر من 90% من حالات تضخم الغدة الكظرية الخلفي وبينما يشكل نقص انزيم 11β-hydroxylase 10% من تلك الحالة وهناك حالات أخرى يسببها نقص 3β-hydroxysteroid dehydrogenase, cholesterol desmolase 17α-18-dehydrogenase، فأن نقص 18-dehydrogenase و18-hydroxyase يؤثر فقط على التخليق الحيوي للالدوستيرون aldosterone ولا يؤثر على تضخم الأنسجة.

سادسا: الخلل الوراثي في الصبغات

1. **unconjugated hyperbilirubinemia**: ناتج عن زيادة مستوي البيلروبين في الدم (1ملغم/100مل) ويمكن أن يكون بسبب إنتاج كميات كبيرة من البيلروبين في الكبد اكثر من الحالة الطبيعية مما يؤدي ذلك الى فشل الكبد في إفراز تلك المادة مما يؤدي ذلك أيضا الى تجمع البيلروبين في الدم وعندما يصل الى حد معين ينتقل الى الأنسجة مما يصبح لونها اصفر، هذه الحالة يطلق عليها اليرقان jaundice أو icterus وهناك نوع غير مرتبط ناتج عن تحليل الدم homolysis بسبب انخفاض مستوى UDP-glncuronyl transferase مما يقلل تخليق المادة الأساس للأنزيم وهي حامض UDP-glucuronic مما يزيد من محتوى البيلربين غير المرتبط ومن أشكال اليرقان هو Crigler-Najjar syndrome,Type I congenital Non hemolyyic jaundice وهو خلل وراثي نادر الحدوث في الإنسان وهو ناتج عن عيب في الايض الأولى للبيليروبين المرتبط ويتميز بيرقان خلقي ناتج عن غيابUDP-glucuronyl transferase في الأنسجة الكبدية وهو من الأمراض التي تصيب الأطفال حديثي الولادة (15 شهرا) وهناك نوع ثاني Type II أو

Crigler- Najjar syndrome وهو أيضا خلل وراثي نادر الحدوث ناتج عن عيب في البيلروبين والذي فيه لا يزيد مستوى البيلروبين عن 20 ملغم\100 مل ناتج عن عيب وراثي يتضمن UDP-glucuronyl transferase الكبدي بينما مرض Gilbert ناتج عن عيب في تنظيف الكبد من البيلروبين نتيجة عيب في استهلاك البيلروبين بواسطة الخلايا الكبدية وهو ناتج عن انخفاض مستوى bilirubin - UDP-glucuronyl transferase.

2. **Conjugated hyperbilirubinemia**: يفرز البيلروبين المرتبط مع الإدرار وهناك عدة حالات من اليرقان إلا إنها غير أنزيمية.
3. **صناعة الكلى**: قد تكون الإنزيمات غير المتحركة أحد مكونات الكلى الصناعية التي تستعمل لإزالة اليوريا من الجسم حيث تدخل اليوريا الى جهاز الكلى الاصطناعية من الدم بواسطة عملية الفصل الغشائي ومن ثم تتحول الى CO_2 و NH_4^+ بفعل Urease غير المتحرك ومن ثم نزع أيون الأمونيوم السام بالمبادلات الايونية أو يضاف الى الكلوتاميت بفعل glutamate dehydrogenase.
4. **المستحضرات الصيدلانية**: للإنزيمات أهمية كبيرة في الصناعات الصيدلانية لتحويل بنزيل بنسلين الى amino penicillinic acid (6-APA–6)، حيث يساعد في ذلك penicillin amidase البكتيري تحت ظروف قاعدية معتدلة، حيث طورت العديد من الطرق التجارية لتركيب APA 6 حيويا والذي تتضمن استعمال بكتريا القولون غير المتحركة في هلام من polyacrylamide أما الانزيم فانه يمسك في ألياف خلات السيليلوز وتوجد هناك مشتقات عديدة من APA6 منها alpha methyl benzyl penicillin.
5. **الإنزيمات كمواد كاشفة في الكيمياء السريرية**: يتم الكشف عن D-glucose في الدم والسوائل الفسيولوجية الأخرى بواسطة استعمال glucose oxidase المتخصص لسكر ألفا كلوكوز ويستعمل الانزيم للكشف عن مستوى السكر في الإدرار باستعمال شريط فحص test-strip مما يدل اللون الأزرق على وجود السكر في الإدرار ويستخدم هذا الاختبار لتشخيص مرض السكرى ويستعمل أيضا انزيم hexokinase للكشف عن D-glucose إلا انه يحتاج الى D-hexose كمادة

أســاس كمــا يمكــن الكشــف عــن اللاكتيــت والبيروفيــت في الــدم بواســطة dehydrogenase كما يستخدم Urease للكشف عن اليوريا في الدم.

6. **تشخيص الأمراض:** للإنزيمات علاقة وثيقة بالحالات المرضية المختلفة وهناك الكثير من الحالات المرضية التي يمكن معالجتها بواسطة الإنزيمات وعلى سبيل المثال فأن tyrosinase مسؤول عن تحويل حامض التيروسين الى صبغة الميلانين كما أن نقص الانزيم يسبب بياض الشعر لأن لون الشعر الأبيض هو عبارة عن نقص حاصل في تكوين الصبغة كما أن lactate dehydrogenase يتأثر بأمراض الكبد والقلب وفي سرطان الدم و alkaline phosphatase يزداد في حالة مرض الكساح وإنزيم الفوسفاتيز الحامضي يتأثر هو الآخر بمرض سرطان الدم leukemia أما العصير المعوي يستعمل في معالجة أمراض القرح Ulcer المختلفة كما يستعمل العصير البنكرياسي في معالجة الجروح المعدية بينما مرض عسر الهضم Dyspepsia يعالج بواسطة papain,pepsin اما papain يستعمل في معالجة قرح السل Tuberculosis ulcer ويستعمل انزيم الفوسفاتيز القاعدي لتشخيص أمراض العظام ومرض اليرقان الانسدادي كما أن انزيم الاميليز في مصل الدم يستعمل لتشخيص مرض التهاب البنكرياس الحاد،كما يستفاد من الإنزيمات الناقله لمجموعة الأمين في كثير من الإمراض المختلفة كأمراض القلب والكبد ويمكن الاستفادة من قياس lactate dehydrogenase في الإدرار للحصول على معلومات وافية للتميز بين الوروم الخبيث من الورم السليم في الجهاز البولي ويستفاد من نشاط الفوسفاتيز الحامضي عند حصول خلل في الأنسجة البولية كما يزداد نشاط الانزيم في حالة المرضى المصابين بالسرطان المعدي.

7. **الدراسات التركيبية:** إن من أهم فوائد الإنزيمات هي قدرة تخصصها وعلى سبيل المثال تختلف الإنزيمات المحللة للدهن المأخوذة من مصادر مختلفة في مواقع مهاجمتها للكلسيريدات الثلاثية والفوسفولبيدات وتعتبر الإنزيمات المحللة للدهون ذات أهمية كبيرة في دراسة التركيب البنائي للبيدات حيث يختفي لايبيز البنكرياس في مهاجمة الموقعين الأول والثالث في الكلسيريدات الثلاثية مما ينتج عن ذلك كلسيريد أحادي يكون فيه الحامض الدهني مرتبط بالموقع الثاني وهناك إنزيمات لايبيز ذات درجة تخصص بين الأحماض الدهنية المختلفة في درجة تشبعها وتستعمل الإنزيمات المحللة

للبروتينات للتعرف على تعاقب الأحماض الأمينية في البروتينات وإذ أن تحلل البروتينات بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتينات ومن خلال التعرف على طيف تلك الأجزاء يمكن تحديدها ويستعمل التربسين في الدراسات التركيبية للبروتينات نظرا لدرجة تخصص الانزيم العالية تجاه بعض الأواصر الببتيدية وتستعمل إنزيمات أخرى مثل الببسين والكيموتربسين لهذا الغرض، كما يمكن الاستفادة من التحلل الإنزيمي في التعرف على الأواصر التساهمية التي تشارك في ربط البروتينات مع المجاميع الرابطة او المرافقات الإنزيمية أو المثبطات أو المنشطات او المؤثرات او المحورات او المعدلات.

ثانيا: التطبيقات الصناعية للإنزيمات Industrial applications

تستعمل الإنزيمات على نطاق واسع في الصناعة حيث يعطي نشاط بعض الإنزيمات دلاله على كفاءة المعاملات الحرارية المستعملة في الصناعات الغذائية فعلى سبيل المثال يفقد انزيم الفوسفاتيز القاعدي نشاطه على درجة حرارة البسترة وتقدر درجة التلوث البكتيري للأغذية بالكشف عن الإنزيمات الميكروبيولوجية فالحليب يحتوي على كميات قليلة من الريدكتيز إلا أن الحليب الملوث بالبكتريا يحتوي على كمية اكبر من الحليب غير الملوث ويمكن الاستفادة من الفحص الإنزيمي للتعرف على صلاحية استخدام المحاصيل الزراعية المخزونة كغذاء حيث يزداد محتوى ألفا- اميليز في البذور المنبتة تحت ظروف فيها نسبة الرطوبة عالية كما يزداد محتوى الإنزيمات المحللة للبروتينات مما يتحلل محتوى البذور من النشأ والبروتين كما تستعمل الإنزيمات في تشخيص بعض الإمراض النباتية حيث يزداد نشاط انزيم الكلوكوز- 6- فوسفيت النازع للهيدروجين في الموقع المصاب فيما إذا كانت الإصابة ميكانيكية او مرضية ولا تزداد فعالية انزيم الكلوكوز فوسفيت ايزوميريز مما يدل على تحويلة تحلل الكلوكوز من الخلال السكر عن طريق السكر الخماسي وتستعمل الفحوصات الإنزيمية في بحوث التفاعلات اللونية البنية التي تحصل في النباتات حيث تتأكسد الفينولات الى كوينونات مما تؤدي الى تكوين صبغة الميلانين ويستعمل الامفرتيز لتقدير كمية السكروز ويستعمل الماليت النازع للهيدروجين لتقدير تركيز حامض الماليك في صناعة النبيذ كما يمكن الحصول على الكلسيرول كاينيز تجاريا من بعض أنواع الأحياء المجهرية أي أن للأنزيمات استعمالات صناعية مختلفة أثناء عملية التصنيع والخزن والكشف

عن مدى تلوث الأغذية بالأحياء المجهرية ويمكن توضيح الاستعمالات الصناعية المختلفة للإنزيمات كلا على حدة:

1. **صناعة الألبان:** يحتوي الحليب على عدد كبير من الإنزيمات بصورة طبيعية ويختلف تركيزها باختلاف مصدر الحليب ومحتواها مرتفع في اللبا مقارنه مع الحليب الخام والذي تفقد بعض الإنزيمات جزءاً من نشاطها عند البسترة بينما لا يتحطم الجزء الآخر منها على درجة حرارة التعقيم للحليب من 115م لمدة 15 دقيقة الى 120م لمدة 10 دقيقة ومن أهم الإنزيمات الموجودة في الحليب هو ألفا-اميليز، كاتاليز، لايبيز، بيروكسيديز، فوسفاتيز حامضي وقاعدي، زانثين اوكسيديز، ريديكتيز، بروتيزات ولانزيم اللايبيز موقع متميز بين إنزيمات الحليب الأخرى المستخدمه في صناعة الجبن ويعمل التجنيس والتحريك والتغيرات في المعاملات الحرارية على تغير نشاطه التحفيزي، فأن وجود أو عدم وجود بعض الإنزيمات يعتبر دليل على جودة الحليب ومشتقاته، فلإنزيم الفوسفاتيز أهمية في الكشف عن كفاءة عملية البسترة لان الانزيم يحرر الفينول كما إن وجود الإنزيمات المسؤولة عن الأكسدة والاختزال في الحليب ومنتجاته أهمية كبيرة في تطور الطعم المتأكسد ومن الأمثلة هو انزيم اللاكتوبيروكسيديز الذي يكون ثابتا تحت ظروف البسترة وxanthine oxidase الذي يؤكسد الزانثين والهايبوزانثين الى حامض اليوريك مما يحرر بيروكسيد الهيدروجين ويعمل انزيم الكاتاليز على تحليل بيروكسيد الهيدروجين الذي يستخدم كوسيلة لحفظ الحليب بسبب الحد من نمو وعدد البكتريا في الحليب كما اقترح استعمال بيروكسيد الهيدروجين – كاتاليز في حفظ الحليب كبديل للبسترة ثم استخدم اللاكتوبيروكسيديز\ثايوسيانات البوتاسيوم \ بيروكسيد الهيدروجين كوسيلة لحفظ عينات الحليب ومؤخرا تمكن جندل عام 1996 من استخدام نظام جديد لحفظ عينات الحليب كطريقة بديلة عن الطرق الأخرى للحفظ في ظروف لا تتوفر فيها وسائل التبريد والأجهزة اللازمه لتبريد عينات الحليب باستخدام نظام اللاكتوبيروكسيديز\مستخلص البصل أو الثوم\الايثانول لحفظ عينات الحليب الخام، حيث كانت الطريقة فعالة لإيقاف نمو وتكاثر الأحياء المجهرية في الحليب ويمكن زيادة فعالية انزيم الرنين والبروتيزات الأخرى المستخدمه في صناعة الألبان بإضافة أملاح الكالسيوم مما تقصر من وقت تجبن الحليب بالرنين، ويعمل الرنين محلل

لبروتينات الحليب فأنه يحلل الأواصر الببتيدية في الكيزين وخاصة كابا -كيزين كما تستعمل إنزيمات من مصادر بكتيرية لتجبن الحليب بسبب التقاليد الدينية لبعض الدول كالهند مثل إنزيمات Streblus aspers, ficus carica إلا أن استعمالات البروتيزات في صناعة الاجبان أنتجت اجبان مرة الطعم والذي تختفي عند الخزن لفترة طويلة كما استخدمت بروتيزات ميكروبيولوجية من M.pusillus,M.hemoris كما استخدمت مستحضرات الببسين التجارية ويتم إنتاج حامض البيوتريك في الاجبان الإيطالية بروفولون وورمانو خلال فترة الإنضاج باستعمال انزيمات مختلفة لانتاج نكهة مرغوبة في الجبن الإيطالي وتتميز إنزيمات اللايبيزات lipases المستخلصة الخالية من الخلايا الماخوذة منA.niger, P. rqueforti المستخدمة في صناعة الاجبان المنضجة بالعفن ذات نشاط تحليلي للدهن اكثر من فعالية الإنزيمات المحللة للبروتينات بأنها أنتجت نسبة مرتفعة من الأحماض الدهنية الحرة وللإنزيمات decarboxylases, deaminases, transaminases, aminases دوراً مهماً في صناعة الجبن لأنها تعمل على إنتاج أحماض أمينية مختلفة وأحماض كيتونية والديهايدات وامونيا أي أن للإنزيمات المحللة للدهن والبروتينات دوراً مهماً في تحديد نكهة منتجات الألبان المنضجة واستعمل انزيم اللاكتيز في صناعة الايس كريم لتحلل سكر اللاكتوز الذي يسبب قوام رملي للايس كريم sandiness ولزيادة حلاوة الايس كريم نتيجة تحلل اللاكتوز الى كلوكوز وكالاكتوز كما أن تحلل سكر اللاكتوز في مركزات الحليب المجمدة ومركزات الشرش يزيد من ثباتها ويمنع تكوين بلورات.

2. **منتجات الفواكه والخضراوات:** تستعمل الإنزيمات على نطاق تجاري واسع في تحلل لب الثمار في ترويق العصائر وتلعب الإنزيمات البكتينية دوراً مهماً في التفاعلات المؤدية الى ترويق عصائر الفاكهة حيث تعمل إنزيمات على ترويق عصير العنب وتستعمل الإنزيمات البكتينية عل نطاق تجاري في إنتاج عصير التفاح وعصير العنب وتستعمل الإنزيمات البكتينية على تسهيل استخلاص العصير وترويقة وعزل الراسب الزغبي وترشيحه ولغرض المحافظة على تنضيب ثابت في العصير المنتج من التفاح ويمكن إنتاج مركزات عصير التفاح الرائق بواسطة الإنزيمات.

3. **اللحوم والأسماك:** تستعمل الإنزيمات في تطرية اللحوم من الأبقار وليست الدجاج لأنها تطبخ على درجات حرارية عالية مما تجعل استعمال الإنزيمات غير ضروري للتطرية وتستخدم الإنزيمات لتطرية اللحوم لتحسين نوعيتها وتحسين قابلية القطع والغرض من تعتيق اللحوم هو فسح المجال إمام البروتيزات لتحليل ألياف العضلات البروتينية مما تزيد من محتوى النتروجين الحر الناتج من المواد البروتينية غير النتروجينية ويساعد في تحلل البروتينات داخل ألياف العضلات إنزيمات كاثبسينات Cathepsins الموجودة في الأنسجة الحيوانية ذات الفعالية العالية تجاه البروتيزات مثل الطحال كما تعمل جميع البروتيزات على تطرية اللحوم ماعدا الببسين والرنين وتستعمل تراكيز قليلة جدا وتعمل إنزيمات الفيسين والبابايين على تحليل بروتين العضلات كما تعملان على تحليل كميات كبيرة من الكولاجين والايلاستين وتستعمل البروتيزات على نطاق واسع لانتاج سوائل السمك المركزة وهو أحد النواتج العرضية المستحصل عليها في صناعات الأسماك وتحضير صلصة السمك باستعمال بروتيز الفطر.
4. **صناعة الحلوى:** يستعمل الانفرتيز في صناعة الحلوى للحصول على قوام نصف صلب او قوام سائل للسكر وتساهم الأحماض الدهنية الحرة في تحسين نكهة الشيكولاته المصنعه من الحليب والحلوى والزبد الذي تكون ناتجة عن نشاط إنزيمات esterases.
5. **مواد النكهة Flavours:** تلعب الإنزيمات دوراً مهماً في إنتاج مركبات النكهة مثل الاستيريزات والبروتيزات والأنظمة الإنزيمية مثل اينوسين أحادي الفوسفيت وكوانوسين أحادي الفوسفيت ودور إنزيمات phosphodiesterases في تحويل RNA الى المركبات ذات نكهة قوية.
6. **صناعة الأغذية:** يستعمل انزيم الكلوكوز اوكسيديز تجاريا في الصناعات الغذائية لإزالة كميات قليلة جدا من الكلوكوز الموجود في المادة الغذائية ولإزالة الأوكسجين منها كما أن هناك العديد من الإنزيمات الذي تساعد على أكسدة السكريات الأحادية مثل البنتوزات والهكسوزات حيث يعمل الكالاكتوز اوكسيديز على أكسدة ذرة الكربون السادسة في الكالاكتوز كما يعمل انزيم الكاتاليز على تحليل بيروكسيد الهيدروجين الى أوكسجين ويستعمل الكاتاليز في مجالات الصناعات الغذائية لإزالة الكميات الزائدة من بيروكسيد الهيدروجين عندما يستعمل كمادة حافظة كما

يستعمل الكاتاليز لتحرير كميات محددة من الأوكسجين في التخمرات الهوائية او لتجهيز الأوكسجين عند التخمر الهوائي لخميرة الخبز.

ثالثا: تطبيقات الإنزيمات ككواشف تحليلية: تستخدم الإنزيمات كمواد او كواشف تحليلية في العديد من التفاعلات الكيمياوية بسبب تخصصها الدقيق، حيث تكون تلك الطرق حساسة جدا حيث يتم تقدير تركيز المادة الأساس، المرافق الإنزيمي، المنشطات ومثبطات الانزيم فأساس التحلل الإنزيمي بالطرق الحركية هو إن السرعة الأولية للتفاعل تعتمد فقط على المادة المحللة سواء كانت انزيم أو مادة أساس أو مرافق إنزيمي أو منشط أو مثبط بشرط ثبوت العوامل الأخرى بينما تشمل طرق نقطة النهاية على قياس تركيز الناتج او الناتج المرافق وتستعمل فقط لتحليل المادة الأساس وتشمل طريقة التحليل على ازدواج أو ربط التفاعل الأولى مع التفاعل الكاشف وتستعمل الإنزيمات كبديل للنظائر المشعة، المعلمات makers في تحاليل المناعة في تقدير البروتينات ويساعد كل انزيم في تفاعل معين الذي يكون متخصصا في تحويل المادة الأساس الى ناتج معين لذلك يمكن اعتبار الإنزيمات كمواد أو كواشف تحليلية وتستعمل لتقدير كمية معينه من مادة قد توجد بتراكيز منخفضة جدا في خليط من المواد ذات تركيب كيمياوي مشابه كما تتصف التفاعلات الإنزيمية بأنها تتم تحت ظروف معتدلة نسبيا لذلك تستعمل الإنزيمات لتحليل بعض المواد التي تكون غير مستقرة على القيم المتطرفة من الأس الهيدروجيني أو درجات حرارية عالية فالإنزيمات غير مستقرة لذلك تكون لها نشاطات مختلفة عند عدم حفظها على درجة حرارة منخفضة وتكون الإنزيمات باهضة الكلفة لذلك يصعب استعمالها ومن الصعب أيضا الحصول عليها ويفضل استعمالها بشكل مقنن للإقلال من التبذير في استعمالها هو استعمال إنزيمات غير متحركة الذي يمكن استعادة الإنزيمات بعد الانتهاء من التجربة واستعمالها مرة ثانية الذي تكون اكثر استقرارا مما لو استعملت حرة في المحلول ومن طرق التحليل الكيمياوي هي:

1. **طرق نقطة النهاية end point:** يطلق عليها طرق التغير الكلي أو طرق التوازن أي السماح للتفاعل بالوصول الى نقطة التعادل ثم تقدير كمية ناتج التفاعل على أن يكون التفاعل قريبا جدا من الاكتمال أي تكون معظم المواد الأساس للإنزيم قد

تحولت الى ناتج نهائي، ولا تؤثر المنشطات والمثبطات على حالة التوازن إلا إنها تؤثر على السرعة للوصول الى حالة التوازن، ويجب أن يتم التحليل تحت ظروف معينه مثل استعمال تركيز عالي من الانزيم لضمان الوصول بسرعة الى التوازن، وان يستعمل تركيز منخفض من المادة الأساس بحيث يكون التفاعل أحادي الرتبة وتوفر العوامل المرافقة بكميات كبيرة بحيث لا تؤثر في تحديد التفاعل ولا تغير من خواصة للتفاعل أحادي الرتبة ولا توجد نواتج نهائية في بداية التفاعل فأنه تعتمد تراكيز النواتج في حالة التوازن على التراكيز الأولية للمادة الأساس لذلك يمكن قياس أحد التراكيز النهائية للنواتج على 340 نانوميتر، يمكن أجراء تجارب مقارنه مناسبة لحساب التركيز الأولى للمادة الأساس عندما يصل التفاعل الى الاكتمال.

2. **طرق المناعة:** يمكن تقدير تركيز الانزيم بطريقة المناعة حيث يستعمل لتحل محل النظائر المشعة كمواد معلمه حيث لا تشكل ضررا على الصحة ويمكن استعمال أي انزيم شرط أن تكون طرق فحصة حساسة ومناسبة وهناك نوعين من الطرق المناعية الإنزيمية تستعمل بوضع علامة على عينه نقية من الجين المضاد يربطها مع الانزيم ويعلم الجين المضاد بالنظير المشع بطريقة ما لا تؤثر على نشاط الانزيم المعلم بالجين المضاد مع العينه الحاوية كمية غير معلومة من الجين المضاد مما يتنافس الجين المضاد الحر والجين المضاد المعلم بالأنزيم على ربط الجسم المضاد وبعد الوصول الى حالة التوازن ثم تفصل الأجزاء المرتبطة بالجسم المضاد من البقية وممكن استعمال الأجسام المضادة غير المتحركة الذي ترتبط مع الأجسام المضادة ومن ثم يتم تقدير نشاط الانزيم في جزء واحد أو في كلا الجزئين ثم حساب تركيز الجين المضاد في العينه كلما كان الجين المضاد اكثر في العينه كلما كان نشاط الانزيم اكبر للجزء الحر من الجين المضاد بعد الوصول الى حالة التوازن، والإنزيمات المعلمة هي البيروكسيديز والفوسفاتيز القاعدي وبيتا- كالاكتوسايديز.

3. **الطرق الحركية:** تشمل معظم التحاليل الإنزيمية على الطرق الحركية حيث تقدر السرعة الأولية للتفاعل على درجة الحرارة والأس الهيدروجيني ثابتين وتستعمل لحساب تركيز المواد طرق التحليل الإنزيمية والمواد الأساس والمنشطات والمثبطات وتتناسب السرعة الأولية طرديا مع تركيز الانزيم عند ثبوت بقية العوامل الأخرى حيث يثبت تركيز جميع المواد التي لها تأثير على سرعة التفاعل عدا المادة المراد تحليلها الذي يمكن تقدير

تركيزها من سرعة التفاعل وتوضح معادلة ميكليس – منتن العلاقة بين تركيز المادة الأساس والسرعة الأولية.

$$v_o = V\ max[S] / [S]+km = K_2[E][S] / [S] + km$$

عندما يكون تركيز الانزيم [S] ثابت وعند عدم وجود مثبطات وعند استعمال تراكيز ثابته من أي منشط ومواد أساس إضافية، فإن العلاقة بين السرعة الاولية v_o وتركيز المادة الأساس الأولي [S] من نوع hyperbolic ومن احسن طرق التحليل هي التي تعطي العلاقة المستقيمه بين تركيز المادة الأساس والسرعة الاولية وعند التراكيز المنخفضة من المادة الأساس، فإن العلاقة مستقيمة بين السرعة الأولية وتركيز المادة الأساس لان ثابت ميكليس اكبر من تركيز المادة الأساس عندما تكون $v_o = k_2[E][S] /km$ ويجب أن تكون قيم ثابت ميكليس من الصفر الى 0,1.

يمكن استعمال نفس الطريقة للمرافقات الأنزيمية التي تعمل كمواد أساس مرافقة وكذلك تقدير المنشطات بنفس الطريقة حيث تعمل المنشطات على زيادة التأثير المساعد للإنزيم وتتمكن بعض الإنزيمات من العمل الى حد ما عند عدم وجود المنشطات بينما لا تتمكن إنزيمات أخرى من العمل مطلقا وهناك علاقة طردية بين السرعة الاولية وتركيز المنشط عند المديات المنخفضة من تركيز المنشط بحيث يبقى تركيز الانزيم والمادة الأساس ثابت بينما عندما تكون التلراكيز العالية من المنشط فالإنزيم يصبح منشطا بشكل كامل وتصل السرعة القصوى الى أعلاها وبالإمكان تقدير المثبطات الإنزيمية بطريقة حساسة وهناك أنواع مختلفة من المثبطات، فالمثبطات اللاعكسية هي التي تسبب 100% تثبيط عند وجودها بتركيز مرتفع اما المثبطات العكسية فلا تسبب الى تثبيط كامل وقد تثبط 50% من نشاط الانزيم وتعمل العديد من الأيونات المعدنية على تثبيط الإنزيمات لذلك لا يمكن استعمال التحاليل الإنزيمية لتقدير أحد هذة المثبطات عند وجود أيونات معدنية تثبط عمل الانزيم.

رابعا: تطبيقات التقانات الحياتية للإنزيمات: التقانات الحياتية هي عملية الاستفادة من العمليات الناتجة عن استعمال علوم الكيمياء الحياتية والميكروبيولوجية والهندسة

الوراثية في الإنتاج لتحسين نوعيته وحالته الغذائية وذلك من خلال تطبيق تلك التقانات باستعمال الإنزيمات إلا أن استخلاص الإنزيمات يشكل مشاكل تقنية واقتصادية وربما ميكروبيولوجية لذلك اتجه العلماء حول استعمال الإحياء المجهرية كمصدر للإنزيمات لذلك انتج عدد كبير من الإنزيمات ومشابهتها من المصادر الحيوانية والنباتية مع إجراء طفرات وراثية لانتاج تلك الإنزيمات، فقد أمكن استخدام البلازميدات الذي تساعد في تخليق كميات إضافية من انزيم بيتا – كالاكتوسايديز وانزيم في بكتريا القولون كما يمكن الحصول على انزيم بروتيز من فطر وتكون معظم الإنزيمات التجارية مصدرها التخمر الميكروبيولوجي وهي إنزيمات محللة للبروتينات والدهون ويمكن الاستفادة من التقانات الحياتية في إنتاج الإنزيمات غير المتحركة وهي الإنزيمات الذي ترتبط أو تغلف بمادة داعمة غير ذائبة هي الحامل أو الناقل او الانزيم الذي تكون جزيئاته مرتبطة بشكل متقاطع مع بعضها البعض الآخر دون أن تفقد نشاطها الإنزيمي حيث يتم مزج المحلول الإنزيمي مع الحامل بدون حصول تغير في نشاط الانزيم حيث تتكون أواصر ضعيفة بين الانزيم والحامل وهي أواصر هيدروجينية وأواصر فان در فال الذي ليست لها تأثير على نشاط الانزيم ومن اسهل الطرق هي استرجاع تلك الأواصر من الحامل عند تغير الأس الهيدروجيني والقوة الايونية أو تركيز المادة الأساس وتعمل الأواصر الايونية على الربط بين الانزيم والحامل بينما تعمل الأواصر التساهمية على ارتباط شبه دائم بين الانزيم والحامل الذي تتكون تحت ظروف معتدلة دون التأثير على نشاط الانزيم وان يبقى الموقع الفعال حرا من الارتباطات التساهمية لذا يلجأ الى حماية الموقع الفعال للإنزيم بواسطة المادة الأساس أو مادة مشابه لها خلال عملية الربط، المجاميع الإنزيمية التي تساهم في الأواصر التساهمية هي المجاميع الأمينية من نوع ألفا وابسيلون لكن ذلك لا يمنع من مشاركة مجاميع أخرى من المساهمة مثل مجاميع السلفاهيدريل والهيدروكسيل والاميدازول والمجاميع الكربوكسيلية الحرة حيث تعمل معظم الطرق على الازدواج للمجاميع الفينولية والاميدازول والمجاميع الأمينية الحرة الموجودة على الانزيم مع ديازونيوم على الحامل وقد استعمل ربط الالبيومين الى بارا-امينوبنزيل سيليلوز لتكوين جين مضاد غير متحرك وبالإمكان تكوين اصرة ببتيدية بين المجموعة الأمينية الحرة للإنزيم ومجموعة الكربوكسيل على الحامل، يمكن الحصول على الانزيم غير المتحرك بعملية الالكله للمجاميع الفينولية أو السلفاهيدريل أو المجاميع الأمينية بواسطة المجاميع المتفاعلة على الحامل مثل استعمال البروموسيل السيليلوز لربط العديد من الإنزيمات أو استعمال بروميد

السيانوجين الذي ينشط مجاميع الهيدروكسيل للسكريات المتعددة أو بالإمكان ربط الانزيم بالحامل بواسطة رابطة ثنائية الكبريتيد بين مجموعة السلفاهيدريل على الانزيم وبين مجموعة مشابه على الحامل كما تتمكن العديد من المواد الحاملة مثل السيليلوز والزجاج والنايلون من أن تعمل على تشابك الانزيم عندما يعامل مع أملاح ناقلة مثل التيتانيوم والفانديوم والكلوريدات مما تكون اصرة معدنية قوية بين الأوكسجين الذي يعود لمجموعة الهيدروكسيل للحامل وبين ذرات النتروجين للإنزيم، ويمكن تغليف الانزيم بواسطة اكريلامايد وتعتمد درجة الربط التقاطعي وحجم المسامات داخل الهلام على نسبة الاكريلامايد ومادة Bis الموجدة في بداية التفاعل الا انه مسؤول عن الربط التقاطعي عند وجود الانزيم في المحلول في بداية التفاعل مما يغلف الانزيم عند تكوين الهلام ويمكن أن يغلف الانزيم داخل غشاء شبه نفاذ بطريقة البلمرة الصناعية حيث يضاف المحلول المائي الحاوي على الانزيم الى محلول عضوي لا يمتزج بالماء مما يكون مستحلب ثم إضافة محلول عضوي لا يمتزج بالماء الى المحلول السابق وتخلط جيدا أو بالإمكان تكوين غلاف رقيق من النايلون عندما يكون المركب ذو السلسلة الأحادية محب للماء هو 6,1-هكسوميثيلين ثنائي الأمين والمركب ذو السلسلة الاحادية غير المحبة للماء والمذيب العضوي خليطا من الهكسين الحلقي والكلوروفورم أو تحفيز الإنزيمات غير المتحركة على شكل دقائق اما أن ترتبط بالهلام او تغلف داخل الحامل الذي يعمل كغشاء محيط بالإنزيمات اما بالنسبة للإنزيمات الموجودة داخل الخلايا يتم ربطها بالكامل بدلا من إجراء عملية الاستخلاص لها وتختلف صفات الانزيم غير المتحرك عن صفات نفس الانزيم الحر في المحلول حسب الطريقة المستعملة لجعل الانزيم غير المتحرك وعلى طبيعة الحامل غير الذائب ويقل نشاط الانزيم غير المتحرك عند استعمال طريقة كيمياوية مما يؤدي ذلك الى حدوث دنترة الانزيم وتحدث تغيرات صفات الانزيم عند حدوث تغيرات تركيبية في الموقع الفعال للإنزيم بسبب التداخلات الفزيو كيمياوية بين الانزيم والحامل مما يؤثر الحامل على صفات التفاعل الذي يساعد فيه الانزيم وذلك من خلال منع حرية نفاذ المادة الأساس الى جميع جزيئات الانزيم او بسبب تكوين تداخلات الكتروستاتيكية مع المادة الأساس او الناتج ويمكن الاستفادة من تغير صفات الانزيم غير المتحرك في ربط التفاعل الإنزيمي بتفاعل إنزيمي آخر بسبب عدم توافق الأس الهيدروجيني، لنشاط الانزيمين بالإمكان جعل الإنزيمين غير المتحركين بطريقة تضمن تداخل الاس الهيدروجيني مع الاس الهيدروجيني.

المصطلحات

تفسير بعض التعابير

Absolute specificity: تخصص مطلق وهو قابلية الانزيم على تحفيز تفاعل واحد خاص عندما يعمل على مادة واحدة أو مادتين من المواد الاساس.

Absorbance: الامتصاص وهو مقياس الضوء الممتص من قبل المحلول والذي يعادل لوغاريتم Io الى I حيث تمثل Io شدة الضوء الساقط وتمثل I شدة الضوء العابر ويطلق عليها الكثافة الضوئية $A = Log\ Io/I$.

Absorption: الامتصاص وهو انتقال نواتج الهضم من الامعاء الدقيقة الى الدم.

Acetyl choline esterase اسيتل كولين استيريز وهو الانزيم الذي يحلل الاستيل كولين الى كولين وخلات.

Acetyl-CoA: استيل المرافق الانزيمي A وهو الشكل المؤستل من المرافق الانزيمي A.

Acetyl-CoA carboxylase: اسيتل المرافق الانزيمي A كاربوكسيليز وهو الانزيم الذي يحفز اضافة كربوكسيل الى خلات المرافق الانزيمي A لتكوين مالونيل المرافق الانزيمي A.

ACP-Acyl transferase: انزيم بروتين حامل الاسيل ترانزفيريز وهو الانزيم الذي يحفز نقل مجموعة الخلات من خلات المرافق الانزيمي A الى البروتين حامل الخلات ACP او Acyl carrier protein.

ACP-malonyl transferase: انزيم بروتين حامل الاسيل – مالونيل ترانزفيريز وهو الانزيم الذي يحفز نقل مجموعة المالونيل من المالونيل للمرافق الانزيمي A الى البروتين ناقل الاسيل.

Active acetaldehyde: الاسيتالديهايد النشط وهو معقد الاسيتالديهايد مع الثيامين بيروفوسفيت.

Active carbon dioxide: ثاني اوكسيد الكربون النشط وهو معقد ثاني اوكسيد الكربون مع البايوتين.

Active acetyl: الخلات النشطة وهي مشتقة من الخلات مع المرافق الانزيمي A او الخلات مع حامض اللايبويك.

Active acyl: الاسيل النشط هو معقد الاسيل مع المرافق الانزيمي A او الاسيل مع حامض اللايبويك.

Active site: الموقع الفعال وهو تلك المنطقة من سطح الانزيم الذي يتركز فيها النشاط البيولوجي للانيم والذي يرتبط فيها الانزيم مع المادة الاساس مما تؤدي الى تكوين معقد الانزيم – المادة الاساس.

Acyl-CoA dehydrogenase: انزيم اسيل –المرافق الانزيمي A النازع للهيدروجين Acyl-CoA dehydrogenase وهو الانزيم الذي يحفز اختزال اسيل الحامض الدهني –المرافق الانزيمي A لتكوين مشتقات غير مشبعة من نوع الفا وبيتا .

Acyl-CoA synthetase: اسيل – المرافق الانزيمي A ساينثتيز Acyl-CoA synthetase وهو الانزيم الذي يحفز تحويل الاحماض الدهنية الى اسيل الحامض الدهني – المرافق الانزيمي A.

Adenosine diphosphate: ادينوسين ثنائي الفوسفيت (ADP) وهو ادنين نيوكليوتيد يحتوي مجموعة بيروفوسفيت.

Adenosyl homocysteinase: انزيم ادينوسيل هوموسستائينيز وهو الانزيم الذي يحلل S-adenosyl homocysteine الى هوموسستائين.

S-adenosyl methionine decarboxylase: ادينوسيل مثيونين ديكاربوكسيليز وهو الانزيم الذي يحول S-adenosyl methionine الى الامين المقابل عن طريق نزع مجموعة الكربوكسيل.

Adenylate cyclase: ادينيليت سايكليز وهو الانزيم الذي يكون ادينوسين احادي الفوسفيت الحلقي cAMP من الادينوسين ثلاثي الفوسفيت ATP.

Affinity: الفة او ميل وهي قابلية الانزيم للاتحاد مع المادة الاساس.

Affinity labeling: علامة الالفة وهي خطة عمل لتعيين الموقع الفعال في الانزيم.

Alanine transaminase: الانين ترانزامينيز وهو الانزيم الذي يحفز نقل مجموعة الامين بيت الانين والفا كيتوكلوتاريت.

Alcohol dehydrogenase: انزيم الكحول النازع للهيدروجين وهو الانزيم الذي يحفز اختزال الاسيتالديهايد الى ايثانول.

Allantoinase: الانتوينيز وهو الانزيم الذي يحفز تحليل حامض الالنتونيك الى يوريا في يعض الاسماك.

Allosterism: اللوستيرزم وهي العملية الذي بواسطتها يتغير نشاط الانزيم بسبب التغيرات التركيبية نتيجة ارتباط المحور.

Allosteric enzymes: الانزيمات المنظمه وهى الانزيمات الذي تملك نشاط تحفيزي والمعدلة بواسطة ارتباط لا تساهمي لنواتج هدم معينه في موقع اخر عدا الموقع التحفيزي.

Allosteric site: الموقع المنظم وهو موقع متخصص على سطح الانزيم المنظم الذي اليه يرتبط المعدل او المؤثر.

Amino phosphoribosyl transferase: امينو فوسفورايبوسيل ترانزفيريز وهو الانزيم الذي يحفز تكوين فوسفورايبوسيل امين.

Amino acid decarboxylase: انزيم الحامض الاميني النازع لمجموعة الامين وهو الانزيم الذي يسبب نزع مجموعة الكربوكسيل من الاحماض الامينية لتكوين امينات متقابلة.

Amino acid oxidase: انزيم اوكسيديز الحامض الاميني وهو الانزيم الفلافيني الذي يؤكسد الاحماض الامينية الى مشتقات الفا كربونيل.

Amino transferase انزيم امينو ترانزفيريز وهو الانزيم الذي يحفز نقل مجاميع الامين من مركب وسطي الى اخر والذي يسمى transaminase.

Aminolevulinate dehydratase: انزيم سكما امينو ليفيونيت النازع للهيدروجين وهو الانزيم الذي يحفز تكوين بورفوبيلينوجين من سكما امينو ليفيونيت.

Amino propyl transferase: امينو بروبيل ترانزفيريز وهو الانزيم الذي يكون سبيرميدين بواسطة نقل مجموعة $-NH_2-(CH_2)_3$ الى بتريسين.

Amylases: الاميليزات وهي الانزيمات (الفا ، بيتا) الذي تحلل الروابط الكلايكوسيدية للنشأ.

Anaplerotic reaction: تفاعل سد العجز او النقص وهو تفاعل انزيمي يعمل على سد النقص بواسطة مركبات وسطية في دورة حامض الستريك.

Apoprotein: ابوبروتين وهو بروتين او الجزء البروتيني من الانزيم الذي يحتاج الى عامل مرافق لتنشيطة.

Arginase: انزيم الارجنيز وهو الانزيم الذي يحلل الارجنين الى اورنثين ويوريا .

Argininosuccinate lyase: ارجينينوسكسـنيت انـزيم اللاييـز وهـو الانزيم الذي يحفز تحليل ارجنينوسكسنيت الى ارجنين وفيوماريت.

Argininosuccinate synthetase: ارجينينوسكسنيت ساينثتيز وهو الانزيم الذي يحفز تكوين ارجينينوسكسنيت.

Aromatic amino acid decarboxylase: وهـو الانـزيم الـذي ينـزع مجموعة كربوكسيل من دوبا لتكوين دوبامين.

Asparginase: وهو الانزيم الذي يحلل الاسبارجين الى اسبارتيت.

Asparagine synthetase: وهـو الانـزيم الـذي يكـون اسـبارجين مـن الاسبارتيت.

Aspartate transaminase: وهو الانزيم الذي يحفز نقل مجموعـة الامـين بين الاسبارتيت والفا كيتوكلوتاريت.

ATPase: انزيم ادينوسـين ثلاثـي الفوسـفاتيز وهـو الانـزيم الـذي يحلـل ATP (الادينوسين ثلاثي الفوسفيت) الى ADP (ادينوسين ثنائي الفوسفيت) وفوسفيت والـذي غالبا ما يكون مزدوج الى بعض العمليات اللازمه للطاقة.

ATP synthetase: انزيم ادينوسين ثلاثي الفوسفيت ساينثتيز وهو الانـزيم الذي يكون aTP من ADP وفوسفيت خلال الفسفرة التاكسدية في غشاء المايتوكونـدريا الداخلي.

ATP-citrate lyase: وهـو الانـزيم الـذي يحـول السـترت الى خـلات نشـطة واكزالوالخلات.

Carbamoyl phosphate synthetase: هو الانزيم الذي يحفز تكوين كاربامويل فوسفيت.

Carbonic anhydrase: هو الانزيم الذي يحفز تكوين حامض الكربونيك من ثاني اوكسيد الكربون المذاب.

Carnitine acyl transferase: وهو الانزيم الذي يحفز ارتباط الكارنتين والاحماض الدهنية النشطة.

Catalytic site: موقع التحفيز وهو الموقع على سطح الانزيم والذي يتضمن اتحاد الانزيم مع المادة الاساس ليساهم في عملية التحفيز.

Catalase: انزيم الكاتاليز وهو الانزيم الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء واوكسجين.

Cellulases: السيليليزات وهي الانزيمات الذي تحلل السيليلوز.

Ceramide choline phosphotransferase: وهو الانزيم الذي يحفز تكوين السفنجوميلين من السيرامايد و CDP-Choline.

Choline kinase: كولين كاينيز وهو الانزيم الذي يحفز فسفرة الكولين بواسطة ATP لتكوين فوسفوكولين.

Chymotrypsin: الكيموتربسين وهو انزيم يحلل البروتين وهو يتكون في البنكرياس.

Citric synthetase: وهو الانزيم الذي يحفز ارتباط الخلات النشطة مع حامض اوكزالوالخلات.

Coenzyme: المرافق الانزيمي وهو عامل مرافق عضوي الذي يساهم في التفاعلات الانزيمية مع المادة الاساس وتحتاجه بعض الانزيمات وهي مشتقة من الفيتامين حامض البانتونيك.

Cofactor: عامل مرافق وهو جزيئة ثانية الذي تكون اساسية لنشاط الانزيم.

Competitive inhibition: تثبيط تنافسي وهو نوع من التثبيط الانزيمي الذي يتضمن ارتفاع قيمة ثابت ميكليس – منتن دون تغير في السرعة القصوى ويمكن ابطالة بزيادة تركيز المادة الاساس.

Constitutive enzymes: الانزيمات التاسيسية وهي انزيمات المسالك الايضية المركزية وهي غالبا ما توجد في الخلايا الاعتيادية.

Coordinate induction: استحثاث تناسقي وهو استحثاث مجموعة من الانزيمات ذات العلاقة مع مستحث منفرد.

Crossove point: نقطة العبور وهي النقطة الذي فيها يسبب التثبيط تراكم المركبات الوسطية مع انخفاض تركيز المواد الناتجة والذي تحدث في الانزيمات المتعددة.

Creatine kinase: وهو الانزيم الذي يحفز توليط ادينوسين ثلاثي الفوسفيت الى ادينوسين ثنائي الفوسفيت بواسطة فوسفوكرياتين.

Cystathionine -γ- lyase: وهو الانزيم الذي يحلل السستاثايونين لتكوين السستائين والفا – كيتوكلوتاريت.

Cystathionine synthase: وهو الانزيم الذي يكثف الهوموسستائين مع السيرين لتكوين السستاثايونين.

Cysteine dioxygenase: وهو محتويات الخلية ماعدا المنطقة النووية.

Decarboxylase: انزيم ازالة الكربوكسيل وهو الانزيم الذي ينزع او يزيل مجموعة الكربوكسيل من الاحماض الامينية من نوع الفا لتكوين الامينات.

Dehydrogenase: انزيم ازالة او نزع الهيدروجين وهو الانزيم المحفز لازالة ازواج من ذرات الهيدروجين.

Deoxyribonuclease: انزيم ازالة او نزع الاوكسجين من الرايبونيوكليوتيد وهو الانزيم الذي يحلل اواصر الفوسفو ثنائية الاستر في دنا DNA.

Diacylglycerol acyl transferase: وهو الانزيم الذي يحفز تكوين الكلسيريد من ثنائي الكلسيريد واسيل الحامض الدهني -المرافق الانزيمي A.

Digestion: الهضم وهو عملية التحلل الانزيمي للمواد الغذائية الرئيسية في الجهاز الهضمي لتكوين مكونات عمليات البناء.

Dihydroorotase: هو الانزيم الذي يغلق الحلقة لحامض ureidosuccinic acid لتكوين حامض ثنائي هيدرواوروتيك.

Dhydroacetone phosphate acyl transferase: وهو الانزيم الذي يحفز نقل مجموعة اسيل الحامض الدهني من اسيل الحامض الدهني – المرافق الانزيمي الى ثنائي هيدرواسيتون فوسفيت.

Dimethyl allyl transferase: وهو الانزيم الذي يحفز تكوين جيرانيل بيروفوسفيت من ارتباط ايزوبنتيل وثنائي مثيل اليل بيروفوسفيت.

Effector (Modulator): المؤثر او المعدل وهو مادة حيوية الذي عند ارتباطها الى الموقع المنظم من الانزيم المنظم تغير من صفاته الحركية مثل السرعة القصوى وثابت ميكليس – منتن وهو يكون اما مثبط او منشط.

Endonuclease: انزيم النيوكليز الداخلي وهو الانزيم الذب له القابلية لتحليل اواصر فوسفاتية ثنائية الاستر في الحامض النووي عدا الاواصر الطرفية.

Enoyl-ACP reductase: وهو الانزيم الذي يختزل الكروتونيل -ACP الى بيوتيل- ACP.

Enzyme: الانزيم هو بروتين مع قابلية تحفيزية او بروتين متخصص لتحفيز تفاعل ايضي خاص.

Ethanolamine kinase: هو الانزيم الذي يحفز فسفرة الايثانول امين لتكوين فوسفوايثانول امين.

Epimerase: انزيم الابيميريز هو الانزيم القادر على التحويل الداخلي العكسي لاثنان من المركبات الابيميرية.

Exonuclease: انزيم النيوكليز الخارجي وهو الانزيم الذي يحلل فقط اصرة الفوسفيت ثنائية الاستر في الحامض النووي.

Familial goiter: تضخم الغدة الكظرية الاسري وهو مرض وراثي ناتج عن نقص انزيم ايودوتايروسين النازع للهيدروجين الذي يدخل اليود الى التايروسين داخل الغدة الدرقية.

Fatty acid synthetase: انزيم تخليق الاحماض الدهنية وهو الانزيم الذي يحفز التخليق الحيوي للاحماض الدهنية.

(FAD) Flavin adenine dinucleotide: هو مرافق انزيمي لبعض انزيمات الاكسدة والاختزال الذي يحتوي رايبوفلافين.

Feed back inhibition: تثبيط استرجاعي وهو يثبط الانزيم المنظم بواسطة الناتج النهائي لسلسلة من التفاعلات الانزيمية.

Feed back control: مسيطر التغذية المرتدة او الاسترجاعية وهو الية منظمه الذي فيها يتم تحوير عمل الانزيم بواسطة ناتج التفاعل الانزيمي المتسلسل.

Flavin linked dehydrogenases: انزيمات نازعه للهيدروجين مرتبط بالفلافين وهي انزيمات تحتاج الى المرافق الانزيمي الرايبوفلافين FMN, FAD.

Flavin mononucleotide (FMN): فلافين احادي النيوكلوتيد وهو رايبوفلافين فوسفيت وهو مرافق انزيمي لبعض انزيمات الاكسدة والاختزال.

FMN adenyl transferase: ادنيل فلافين احادي النيوكليوتيد ترانزفيريز وهو الانزيم الذي يكون FAD من FMN, ATP.

Fructokinase: الفركتوكاينيز وهو الانزيم الذي يحفز فسفرة الفركتوز.

Fructose diphosphatase: هو الانزيم الذي يحلل الفركتوز-6,1- ثنائي الفوسفيت الى فركتوز- 6- فوسفيت.

Fructose diphosphate aldolase: انزيم الدوليز فركتوز ثنائي الفوسفيت وهو الانزيم الذي يشقق الفركتوز- 6,1- ثنائي الفوسفيت الى كلسيرالديهايد -3 – فوسفيت وثنائي هيدروكسي اسيتون فوسفيت.

Fumarase: انزيم الفيوماريز هو الانزيم الذي يحول الفيوماريت الى ماليت في دورة حامض الستريك.

Galactokinase: انزيم الكالاكتوكاينيز وهو الانزيم الذي يحفز فسفرة الكالاكتوز لتكوين كلوكوز- 1- فوسفيت.

Galactosyl transferase: كالاكتوسيل ترانزفيريز وهو احد مكونات انزيم تخليق اللاكتوز المسمى lactose synthetase.

Glucokinase: كلوكوكاينيز وهو الانزيم الذي يحفز فسفرة الكلوكوز.

Glucose-6-phosphate isomerase: وهو الانزيم الذي يحفز التحويل الداخلي لسكر الكلوكوز –6 –فوسفيت الى فركتوز- 6- فوسفيت.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase: وهو الانزيم الذي يحفز اكسدة الكلوكوز – 6- فوسفيت الى 6- فوسفوكلوكونيت.

Glutamate dehydrogenase: وهو الانزيم الذي يحول الكلوتاميت الى الفا كيتوكلوتاريت.

Glutamate kinase and dehydrogenase: وهي الانزيمات الذي تختزل الكلوتاميت الى كاما -كلوتاميت شبيه الالديهايد.

Glutamate synthetase: وهو الانزيم الذي يحول الكلوتامين الى كلوتاميت.

Glutaminase: وهو الانزيم الذي يحلل الكلوتامين الى كلوتاميت.

Glutamine synthetase: وهو الانزيم الذي يكون كلوتامين من الكلوتاميت.

Glutamyl cysteine synthetase: وهو الانزيم الذي يحفز تكثيف الكلوتاميت مع السستائيين.

Glutathionine synthetase: وهو الانزيم الذي يحفز ارتباط كاما- كلوتاميل سستائين مع الكلايسين لتكوين كلوتاثايون.

Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase: وهو الانزيم الذي يحفز تحويل كلسيرالديهايد –3- فوسفيت الى 3- فوسفوكلسيرول فوسفيت.

Glycerol kinase: وهـو الانـزيم الـذي يسـبب فسـفرة الكلسـيرول الى كلسيرول-3- فوسفيت.

Glycerol –3-phosphate dehydrogenase: وهو الانزيم الذي يحفز الاختـزال بواسـطة NAD للكلسـيرول -3 – فوسـفيت الى ثنـائي هيدروكسـي اسـيتون فوسفيت.

Glycine amidino transferase: وهو الانزيم الذي يحفز نقـل مجموعـة الكواندين من الارجنين الى الكلايسين.

Glycine synthetase: وهو الانزيم الذي يحفز تخليق الكلايسـين مـن ثـاني اوكسيد الكربون والامونيا و N^5,N^{10}-methylene FH_4.

Glycogen phosphorylase: وهو الانزيم الذي يحفز انحلال الكلايكوجين فوسفيت.

Heme synthetase: وهـو الانـزيم الـذي يحفـز تكـوين الهيموكلـوبين مـن مكوناته.

Hexokinase: وهـو الانـزيم الـذي يحفـز فسـفرة سـكر الهكسـوز بواسـطة ادينوسين ثلاثي الفوسفيت.

Heterotropic enzymes: وهي انزيمات منظمه تحتاج معدلات عـدا المـادة الاساس.

Homotropic enzymes: وهي الانزيمات المنظمه الـذي تسـتفاد مـن المـادة الاساس كمعدل او مؤثر.

Holoenzyme: الانـزيم الكامـل وهـو الانـزيم المـرتبط مـع العامـل المرافـق والمنشط.

Hydrolytic enzymes: الانزيمات المحللة مائيا وهي ماتسمى الهيدروليزات مثل البيبسين والتربسين.

Inducer: المستحث وهي الجزيئة الذي ترتبط مع الانزيم ولا تنشط الكابح.

Induced or inducible enzymes: الانزيمات المستحثة وهي الانزيمات الذي لا يمكن تخليقها بواسطة الخلايا ما لم يتوفر لها مادة اساس او مركبات لها علاقة بها.

Induced - fit: توافق مستحث وهي تغير في شكل الانزيم ليطابق التركيب البنائي للمادة الاساس.

Invertase: انزيم الانفرتيز وهو الانزيم الذي يحفز التحلل المائي للسكروز الى كلوكوز وفركتوز.

Irreversible inhibition: تثبيط لاعكسي وهو تثبيط نشاط الانزيم بسبب تفاعلة مع جزيئات صغيرة.

Isocitrate lyase: انزيم ايزوستريت وهو الانزيم الذي يشقق الايزوستريت لتكوين سكسنيت وكلايكوكسيليت.

Isomerase: انزيم مناظر وهو الانزيم الذي يحفز نقل المركب الى مناظر موقعي.

Isozymes: الانزيمات المناظرة وهي ما يطلق عليها isoenzymes وهي اشكال متعددة من الانزيم الذي تختلف عن بعضها البعض الاخر في الفتها تجاه المادة الاساس ونشاطها الاقصى وفي صفاتها المنظمة.

Kinase: انزيم الكاينيز وهو الانزيم الذي يحفز فسفرة الجزيئة المستقبله بواسطة اديتوسين ثلاثي الفوسفيت.

Kinetics: الحركيات وهي العوامل الذي تزيد من سرعة التفاعلات الانزيمية.

Km: ثابت ميكليس وهو قيمه تركيز المادة الاساس عند نصف السرعة القصوى للانزيم.

Lactate dehydrogenase: وهو الانزيم الذي يسبب تحويل داخلي للاكتيت والبيروفيت

Lactose synthetase: وهو الانزيم الذي يخلق اللاكتوز من الكلوكوز واليوريدين ثنائي الفوسفيت.

Latent enzyme: الانزيم الكامن وهو الانزيم الذي يوجد بشكل غير فعال والذي يتحول الى شكل فعال عند ادخال بعض التعديلات علية.

Lipases: اللايبيزات وهي الانزيمات الذي تحلل استرات الاحماض الدهنية.

Lipoamide dehydrogenase: وهو احد مكونات pyruvate dehydrogenase الذي يعيد اكسدة ثنائي هيدروليبويك الى حامض الليبويك.

Lipoate acetyl transferase: وهو الانزيم الذي يكون احد مكونات انزيم بيروفيت النازع للهيدروجين الذي يحفز تحويل الاسيتالديهايد الفعال الى خلات نشطة.

Lysozyme: اللايزوزيم وهو الانزيم الذي له القابلية لتحليل السكريات المتعددة الاموجودة في جدران خلايا البكتريا.

Malate dehydrogenase: وهو الانزيم الذي يحفز اكسدة الماليت الى اوكزالوالخلات.

Malate synthetase: وهو الانزيم الذي يحفز ارتباط كلايوكسليت وخلات نشطة لتكوين ماليت.

Maleic enzyme: انزيم الماليك وهو الانزيم الذي يحفز اضافة الكربوكسيل الى بيروفيت لتكوين ماليت.

Metallo enzyme: وهو الانزيم الذي فية ذرة العنصر تكون مركب اساسي في الموقع الفعال.

Methionine adenosyl transferase: وهو الانزيم الذي يحفز تكوين S-adenosyl methionine من المثيونين ووالادينوسين ثلاثي الفوسفيت.

Methyl malonyl –CoA mutase: وهو الانزيم الذي يحول مثيل مالونيل –المرافق الانزيمي A الى سكسنيل – المرافق الانزيمي A.

Methyl malonyl –CoA racemase: وهو الانزيم الذي يحول المناظر المجسم للمثيل مالونيل – المرافق الانزيمي أ الى خليط من اثنان من المتناظرات المجسمه.

Methyl transferase: وهو الانزيم الذي يحفز نقل مجموعة المثيل من S-adenosyl methionine الى المستقبل.

Mevalonate kinase: وهو الانزيم الذي يحفز فسفرة الميفالونيت الى 5- احادي الفوسفيت.

Mutase: وهو الانزيم الذي يحفز نقل مجموعة الفوسفيت بين موقعين على نفس الجزيئة.

Multienzyme complex: وهي سلسلة من الانزيمات الذي تشترك في مسلك من التفاعلات ذات العلاقة.

NADH-dehydrogenase: وهو انزيم نازع للهيدروجين يعتمد على NADH وهو انزيم فلافوبروتيني يعيد اكسدة NADH المنتج في دورة حامض الستريك.

Negative cooperativity: تعاونية سلبية وهي حالة عندما تتحد المادة المثبطة في الموقع المنظم للانزيم مما تقلل من الفة المادة الاساس للموقع الفعال في نفس الجزيئة مما يجعل التعاون سلبي.

Non competitive inhibition: تثبيط لا تنافسي وهو نوع من انواع المثبطات الانزيمية من دون تنافس بين المادة الاساس والمادة المثبطة على الموقع الفعال.

Nuclease: وهو انزيم له القابلية على تحليل اواصر الفوسفيت ثنائية الاستر الموجودة في النيوكليوتيدات او الاحماض النووية.

Oligosaccharidases: وهي انزيمات السكريات المتعددة قصيرة السلسله والذي تحلل السكريات الثنائية الى سكريات احادية.

Ornithine carbamoyl transferase: وهو الانزيم الذي يحفز تكوين السترولين.

Ornithine decarboxylase: وهو الانزيم الذي ينزع مجموعة الكربوكسيل من الاورنثين وتحويلة الى Putrescine.

Orotate phosphoribosyl transferase: وهو الانزيم الذي يحفز تكوين اوروتيدين –5 – فوسفيت.

Oxygenase: وهو الانزيم الذي يحفز التفاعل الذي فيه الاوكسجين ينتقل الى المستقبل.

Pancreatic juice: العصير البنكرياسي وهو عصارة هضمية تفرز من البنكرياس الى الامعاء الدقيقة وتحتوي انزيمات محللة بشكل زايموجين وانزيمات نيوكليز ولايبيز.

Pancreatic ribonuclease: وهو الانزيم الذي يحفز تحلل RNA مكونا نيوكليوتيدات احادية واخرى متعددة قصيرة.

Peptidase: وهو الانزيم الذي يحللالاصرة الببتيدية.

Pepsinogen: وهو الانزيم غير الفعال الذي يولد البيبسين وهو الشكل الفعال.

Peroxidase: وهو الانزيم الذي يحتوي هيم والذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين.

Phenylalanine – 4-monooxygenase: وهو الانزيم الذي يحول الفنيل الانين الى تيروسين.

Phosphocholine transferase: وهو الانزيم الذي يحفز تكوين الفوسفاتيديل كولين من CDP- كولين وكلسيريد ثنائي.

Phosphorylase a: وهو الشكل الفعال المكون من اربعة سلاسل متعددة الببتيد والذي يربط الفوسفيت الى السيرين والذي يحفز تحويل الكلايكوجين الى كلوكوز- 1- فوسفيت.

Phosphorylase b: وهو الشكل غير الفعال الموجود في العضلات والمكون من سلسلتين من متعدد الببتيد.

Phosphorylase kinase: وهو الانزيم الذي يحفز فسفرة انزيم فوسفوريليز ب بواسطة ادينوسين ثلاثي الفوسفيت وتحويله الى الشكل الفعال.

Phosphoglucomutase: وهو الانزيم الذي يحفز التحويل الداخلي للكلوكوز- 1 - فوسفيت وكلوكوز – 6- فوسفيت.

Phosphorylase phosphatase: وهو الانزيم ايحفز تحليل فوسفيت السيرين في الفوسفوريليز أ وتحويله الى الشكل ب.

Prosthetic group: المجموعة الرابطة وهي جزء غير بروتيني قد يكون عضوي او ايون معدني مرتبط مع بروتين الانزيم بصورة محكمه لايمكن فصله بواسطة العزل الغشائي.

Proteolytic enzyme: الانزيم المحلل للبروتين وهو انزيم له القدرة على تحليل البروتينات والببتيدات.

Protomer: البروتومير هي وحدة فرعية من الانزيم المنظم.

Pyruvate carboxylase: وهو انزيم بايوتيني يضيف مجموعة كربوكسيل الى البيروفيت لتكوين اوكزالوالخلات.

Pyruvate dehydrogenase: وهو انزيم يحفز تحويل البيروفيت الى اسيتالديهايد.

Pyruvate kinase: وهو انزيم يحفز فسفرة الادينوسين ثنائي الفوسفيت بواسطة فوسفواينول بيروفيت الى بيروفيت وادينوسين ثلاثي الفوسفيت.

Regulatory enzyme: انزيم منظم وهو انزيم متعدد السلسلة الببتيدية الذي له القابلية على تغير الشكل الهندسي عندما يتحد مع مادة حيوية مؤثر فية.

Regulatory site: الموقع المنظم وهو الموقع الموجود في السلسلة متعددة الببتيد للانزيم والمكون من احماض امينية تتحد مع العامل المؤثر.

Regulatory subunit: الوحدة الفرعية المنظمه وهي سلسله ببتيدية متعددة للانزيم الذي يتحد مع العامل المؤثر وليس المادة الاساس مما يعدل الانزيم ايجابيا في حالة المنشط وسلبيا في حالة المثبط.

Ribonuclease: وهو الانزيم الذي له القدرة على تحليل بعض الروابط للمركبات الوسطية في الحامض النووي الرايبوزي.

Specific activity: النشاط النوعي وهو عد الميكرومولات من المادة الاساس المنقوله بواسطة مستحضر انزيمي لكل دقيقة لكل ملغم بروتين بدرجة 25م.

Substrate: المادة الاساس للانزيم وهي مركب معين يعمل عليه الانزيم.

Succinate dehydrogenase: وهو الانزيم الذي يحفز اكسدة السكسنيت الى فيوماريت.

Sucrose phosphatase: وهو الانزيم الذي يحلل السكروز- 6- فوسفيت الى سكروز.

Substrate level phosphorylation: الفسفرة عند مستوى المادة الاساس وهي فسفرة الادينوسين ثنائي الفوسفيت او بعض النيوكليوسيد – 5- فوسفيت ونزع الهيدروجين من المادة الاساس الذي لا تعتمد على سلسلة نقل الالكترون.

Terminal transferase: وهو الانزيم الذي له القدرة على اضافة نيوكليوتيد الى السلسله للحامض النووي الرايبوزي منزوع الاوكسجين.

Transaminases: وهي الانزيمات الذي تحفز نقل المجموعة الامينية من الحامض الاميني الى الحامض الكيتوني من نوع الفا.

Thioesterase: وهو الانزيم الذي يحفز تشقق اسيل الحامض الدهني – الاسيل الناقل للبروتين لتكوين حامض دهني حر.

Thiolase: هو الانزيم الذي يحفز تفاعلات المرافق الانزيمي أ في مشتقات الكيتو من نوع الفا.

Thioredoxin: الثايوريدوكسين وهو الانزيم الذي له علاقة بتكوين الرايبونيوكليوتيد منزوع الاوكسجين.

Thioredoxin reductase: وهو الانزيم الذي يحفز تحويل الثايوريدوكسين لتكوين اثنان من السلفاهيدريل.

Transaldolase: وهو الانزيم الذي يحفز نقل ثلاث ذرات كربون من سيدوهبتيولوز -7- فوسفيت الى كلسيرالديهايد -3- فوسفيت لتكوين فركتوز-6- فوسفيت.

Transketolase: وهو الانزيم الذي يحفز نقل ذرتي كربون من زايليولوز -5- فوسفيت الى رايبوز-5-فوسفيت لتكوين سيدوهبتيولوز -7- فوسفيت.

Triose -phosphate isomerase: وهو الانزيم الذي يحفز التحويل الداخلي لثنائي هيدروكسي اسيتون فوسفيت وكلسيرالديهايد -3 - فوسفيت.

Trypsin: وهو الانزيم المتكون في البنكرياس والذي يحفز تحليل الاواصر الببتيدية المتضمنه الاحماض الامينية الاساسية.

Tyrosine hydroxylase: وهو الانزيم الذي يحول التيروسين الى دوبا.

Ubiquinone: وهو مرافق انزيمي يعرف CoQ وهو مهم في عمليات الاكسدة والاختزال والتركيب البنائي المكون من مشتقات كوينون مع سلاسل جانبية هيدروكربونية غير مشبعة.

Urate oxidase: وهو الانزيم الذي يحفز اكسدة حامض اليوريك الى الالنتوين.

Vmax: السرعة القصوى للتفاعل الانزيمي.

Xanthine oxidase: وهو الانزيم الذي يحفز اكسدة الزانثين الى حامض اليوريك.

Zymogen: وهو مولد غير فعال للانزيم.

المراجع

1. Abeles ,R. ;Frey,P. & Jencks ,W.(1992) Biochemistry , Boston :Jones & Bartlett.
2. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J. et al (1989) Molecular Biology of the Cell .2nd ed. New York,Garland Press.
3. Atkinson, D.E. (1977) Cellular Energy metabolism and its regulation, New York, Academic press.
4. Akiyama, S.K. & Hammes, G.G. (1980) Elementary steps in the reaction mechanism of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *E.coli* :Kinetics of actylation & deacetylation . *Biochem.,19*:4208- 4213.
5. Akiyama, S.K. & Hammes,G.G. (1981) Elementary steps in the reaction mechanism of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *E.coli* :Kinetics of flavin reduction . Biochem. ,20:1491-1497.
6. Abeles,R.H. & Alston,T.A. (1990) Enzyme inhibition by fluoro compounds.*The J.* Biol. Chem., 265: 16705-16708.
7. Bell, J.E. & Bell, E.T (1988) Protreins &Enzymes. EnglewoodCliffs, NJ. Prentice –Hall.
8. Bennett , M. J.(1994).The enzymes of mitochondrial fatty acid oxidation *Clic. Chim. Acta .226*:211-224.
9. Boyer, P.D. (1970) The enzymes, 3rd ed., New York, Academic press.
10. Boyer, P.D. (1970) The enzymes, Vol. 6, New York, Academic press.
11. Boyer, P.D. (1970) The enzymes, Vol. II, New York, academic press.
12. Boyer, P.D. (1972) The enzymes, 3rd ed. Vols. 5-9, New York: academic press.
13. Boyer, P.D. (1972) The enzymes, Vol. 7,New York, Academic press

14.Boyer, P.D. (1974) The enzymes, Vol. 10,New York, Academic press
15.Boyer ,P.D. (1976) The enzymes ,Vol.13,New York ,Academic press
16.Boyer, P.D.(1983)The enzymes, 3rd ed.,Vol.16.New York , Academic press.
17.Boyer, P.D. (1983) The enzymes, 4rd ed., Vol.16.New York, Academic press.
18.Browner, M.F. & Fletterick, R.J. (1992) Phosphorylase: A biological
19.Transducer. Trends in Biochemical Sciences, 17: 66-71.
20.Chang, S.I & Hammes, G.G. (1990) Structure & mechanism of action of a multifunctional enzyme :fatty acid synthase. *Accounts of Chem. Res.23:369.*
21.Conn, E.E. and Stumpf ,P.K.(1972).Outlines of biochemistry .3rd Ed., John Wiley and Sons, INC.
22.Conn, E.E. and Stempf, (1983). Outlines of Biochemistry.4th Ed.John Wiley Estrin Ltd., New Delhi, India.
23.Cooper, T.G. (1977) The Tools of Biochemistry, New York, Wiley –Interscience, Chapt.3.
24.Das, D. (1984). Biochemistry. Academic Publishers، Calcutta, India
25.Dixon, M. et al (1979) Enzymes, 3rd edn. New York, academic press.
26.Feersht ,A.(1985) Enzyme structure & Mechanism ,2nd edn.,Rerading , PA.
27.Garrett,R.H. & Grisham,C.M.(1999(Biochemistry ,2nd ed. , Saunders, College Publishing.New York.
28.Gray, C.J. (1971) Enzyme –catalyzed reactions. New York.
29.Halpern, J. (1985) Mechanisms of coenzyme B12-dependent rearrangements *Sacience, 227*:869-875.
30.Hanson, R.W. & Reshef, L.(1997) Regulation of phosphoenolpyruvate

31.Hudson, R.C. and Daniel, R.M.(1993) L-glutamate dehydrogenases distribution, Properties and mechanism .Comparative *Biochem:106*:B:767.
32.IUBMBNC (1992) International Union of Biochemistry & Molecular Biology
33.Nomenclature Committee, Enzyme Nomenclature, New York.
34.Johnson, I.N. (1992) glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors . *FASEB J.*, *6*: 2274-2282.
35.Kim,R.H. et al (1989) Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis . *The FASEB J.* : *3*:2250-2256.
36.Knowles,J. & Albery,W.(1977) Perfection in enzyme catalysis .The energetics of triose phosphate isomerase . *Accounts of Chem. Research. 10*:105-111.
37.Lehninger, A.L. (1972). Biochemistry. Worth Publishers ،INC. , New York.
38.Lehninger, A.L (1984) .Principles of Biochemistry Publishers,INC،.NewYork.
39.Lodish, H. et al (1995) molecular cell biology, 3rd ed. Pp1-1341, Sci. Amer. Books, New York.
40.Marsh,E.N. (1995)A radical approach to enzyme catalysis. *Bio Essay* ,17:431.
41.Martin, D.W.; Mayes ،P.A.; Redwell, V.W. and Granner, D .R. (1985) .
42.Harper 's Reviews of biochemistry .20th ED. Lange Medical McGilverey, R.W. and Goldstein, M.D. (1979) . Biochemistry :A Functional
43.Approach,2nd Ed.,W.B.Sannders Co., London, PP.253.
44.Murray, R.K. ; Mayes, P.A.: Granner, D.K. an Rodwall, V.W. (1993)

45.Harper's Biochemistry .22nd Ed. Appleton and Lange, California, USA, PP.58.
46.Newsholme,E. and Leech ,A.R. (1983) Biochemistry for the medical Sciences
47.New York: John Wiley &Sons.
48.Page, M.I. & Williams, A. (1987) Enzyme mechanisms, , Royal Soc. of London
49.Rao, K.A. (1980). Textbook of Biochemistry. Prentice–Hill, India.
50.Reed,I .(1974) Multienzyme complexes. *Accounts of chem., 7:40.*
51.Saier, M.J.(1987) enzymes in metabolic pathway :New York :Harper & Row.
52.Scriver,C.R. et al (1995) The metabolic and Molecular bases of
53.Inherited disease, 7th ed., New York, McGraw-Hill.
54.Silverman, R.B. (1988) Mechanism –based enzyme Inactivation: chemistry &
55.Enzymology. Vol. 1 & II, Boca Raton.
56.Srere, P.A. (1987). Complexes of sequential metabolic enzymes. Annual review of biochem., 56: 89-124.
57.Stacey,G. ;Burris ,R.H. and Evans,H.J. (1992) Biolo. Nitrogen fixation New York, Chapman and Hall.
58.Steiner, R.F. and Pomerantz, S. (1981). The Chemistry of living systems .D .Van Nostrand Co., New York، and PP.100.
59.Stryer, L.(1986) .Biochemistry.2nd Ed. CBS Publishers and Distributors New Delhi, India.PP.103.
60.Taylor ,S.S. et al (1993) A template for the protein kinase family .Trends in *Biochemical Saciences :18* : 84-89

الفهرس

الموضوع	الصفحة
المقدمة	5

الفصل الأول

تعريف الانزيمات

العامل المرافق	11
صفات الإنزيمات	13
1. طبيعة البروتين	13
2. معقد المادة الأساس – الأنزيم	13
3. التخصص	16
4. المرافقات الإنزيمية	17
5. تأثير تركيز المادة الأساس	18
6. تأثير تركيز الإنزيم	20
7. تأثيرات ناتج أو نواتج التفاعل	21
8. الأس الهيدروجيني	21
9. تأثيرات درجة الحرارة	22
10. تنشيط الإنزيم بواسطة الأيونات المعدنية	23
11. تنشيط تساهمي غير عكسي	24
12. التثبيط العكسي	24
13. تثبيط تساهمي غير عكسي	27
14. التحوير المنظم	27
15. التحوير التخصصي	29
16. الحث والكبح	30
17. الوزن الجزيئي	32
18. التأين	32
19. الترسيب	32
20. الأكسدة	32
21. الإشعاع	32
التوزيع الخلوي الداخلي للإنزيمات	33

الموضوع	الصفحة
الطبيعة الفيزيوكيمياوية للإنزيمات	34
بعض الظواهر الجزيئية للإنزيمات	35
1. الإنزيمات كعوامل مرافقة	35
أ- المجاميع الرابطة prosthetic groups	35
ب- المرافقات الإنزيمية coenzymes	35
ج- المنشطات المعدنية	35
2. الإنزيمات كبروتينات	36
3. الإنزيمات كعوامل محفزة	37
الإنزيمات المتناظرة	37

الفصل الثاني

النشاط الإنزيمي

العوامل المؤثرة على النشاط الإنزيمي	44
1. تركيز المادة الأساس	44
2. الأس الهيدروجيني	44
3. تركيز الإنزيم	44
4. الأيونات المعدنية	44
5. درجة الحرارة	45
6. جهد الأكسدة والاختزال	45
7. مثبطات الإنزيم	45
8. نشاط الإنزيم	46
تنظيم نشاط الإنزيم	46
1. التنظيم بواسطة تركيز المادة الأساس	47
2. التنظيم بواسطة المُعدلات أو المؤثرات	49
3. التنظيم بواسطة الفسفرة	50
4. تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التحوير التساهمي	51
5. تنظيم نشاط الإنزيمات بواسطة التحلل المائي للبروتينات	53
6. التنظيم بواسطة الأيونات المعدنية	54
7. تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة معقدات الجزيئات الكبيرة	54

الموضوع	الصفحة
8. تنظيم نشاط الإنزيم بالتثبيط التنافسي العكسي	54
9. تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التثبيط اللا تنافسي	58
10. تنظيم الإنزيم بواسطة التثبيط غير التنافسي	59
11. تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التداخلات التعاونية	59
12. تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التحوير الكيمياوي	61
13. تنظيم نشاط الإنزيم بواسطة التغير في الأس الهيدروجيني	62
السيطرة على النشاط الإنزيمي	62
الزايموجينات	63
الإنزيمات المحللة للبروتين في القناة الهضمية	63
تخثر الدم	64
اللايزوزيمات	65
البروتينات المحورة	66
الفصل الثالث	
تسمية وتصنيف وترقيم الإنزيمات	
تسمية الإنزيمات	69
تصنيف الإنزيمات	70
ترقيم الإنزيمات	70
أولا: الصنف الأول: إنزيمات الأكسدة والاختزال	72
ثانيا: الصنف الثاني: إنزيمات النقل	74
ثالثا: الصنف الثالث: إنزيمات التحلل المائي	74
رابعا: الصنف الرابع: الإنزيمات النازعة	76
خامسا: الصنف الخامس: إنزيمات التناظر	76
سادسا: الصنف السادس: الإنزيمات الرابطة	77
الفصل الرابع	
المرافقات الإنزيمية	
العوامل المرافقة	82
تقسيم المرافقات الإنزيمية	83
دور المرافقات الإنزيمية في الايض وحالات نقص الفيتامينات	83

الموضوع	الصفحة
التركيب البنائي والية عمل المرافقات الإنزيمية	85
أولا : المرافق الإنزيمي Thiamin pyrophosphate	85
ثانيا: المرافقات الإنزيميةFAD, FMN	91
ثالثا: المرافقات الإنزيمية NAD+, NADH, NADP+, NADPH	96
رابعا : المرافق الإنزيمي A أو CoA	106
خامسا : المرافق الإنزيمي بيريدوكسال فوسفيت	111
سادسا : المرافق الإنزيمي البيوتين	116
سابعا : مرافقات حامض الفوليك	120
ثامنا : المرافق الإنزيمي حامض الليبوييك	124
تاسعا: المرافق الإنزيمي كوباميد	125
عاشرا: المرافق الإنزيمي اديتوسين ثلاثي الفوسفيت	127
إحدى عشر: المرافق الإنزيمي Q	130
الفصل الخامس	
المعادن في الإنزيمات	
تقسيم الإنزيمات حسب وجود المعادن	136
1. الإنزيمات المعدنية	136
2. الإنزيمات المحفزة بواسطة المعادن	136
الأيونات المعدنية كعوامل مرافقة	137
إنزيمات البروتين الفلافينية	139
وظيفة الأيونات المعدنية في الإنزيمات	140
1. الحديد	140
2. النحاس	141
3. الزنك	141
4. المنغنيز	142
5. الكوبالت	142
6. السيلينيوم	143
7. الموليبدنم	143
8. بعض العناصر النادرة الأخرى	144
دور الأيونات في تكوين معقدات العناصر الثلاثية	144

الموضوع	الصفحة
أ- معقدات جسر -الإنزيم	144
ب- معقدات جسر – المادة الأساس	145
ج- معقدات جسر – المعدن	145
ارتباط المعدن	146
دور الأيونات المعدنية في تحفيز الإنزيات	146
1. تحفيز الحامض – القاعدة العام	146
2. التحفيز التساهمي	147
3. تقارب المواد المتفاعلة	147
4. استحداث الشد في الإنزيم أو المادة الأساس	147
تنشيط الإنزيات بواسطة الأيونات المعدنية	147
1. التنشيط بواسطة الأيونات المعدنية الموجبة القلوية أحادية الشحنة	147
2. تنشيط الإنزيات بواسطة الأيونات الموجبة القلوية ثنائية الشحنه	148
3. تنشيط الإنزيات بواسطة انتقال الأيونات المعدنية النادرة	150
الفصل السادس	
التركيب البنائي للإنزيمات	
الأواصر المسؤولة عن التركيب البنائي	155
1. الأواصر الببتيدية	156
2. أواصر ثنائية الكبريتيد	157
3. الأواصر الهيدروجينية	158
4. الأواصر الالكتروستاتيكية	160
5. الأواصر غير المحبة للماء	161
6. التداخلات الايونية	161
7. قوى فان در فال	162
مستويات التركيب البنائي	162
1. التركيب البنائي الأولي	162
2. التركيب البنائي الثانوي	164
أ-الحلزون ألفا ل-helix	164
ب-الصفيحة المطوية من نوع بيتا	164
3. التركيب الثلاثي	165

الموضوع	الصفحة
إنزيم اللايزوزيم	165
الرايبونيوكليز	167
إنزيم كاربوكسي ببتيديز أ carboxypeptidase A	169
إنزيم حامض الكربونيك انهيدريز Carbonic anhydrase	169
إنزيم Lactate dehydrogenase	169
4. التركيب البنائي الرباعي	170
تقدير التركيب البنائي للإنزيمات	171

الفصل السابع

المواقع الفعالة وتخصص الإنزيمات

الموقع الفعال	179
1. فرضية فشر للقفل والمفتاح	182
2. فرضية كوشلاند أو التوافق -المستحث	182
3. فرضية الإجهاد أو تثبيت الحالة الانتقالية	184
تخصص الإنزيم	184
تقسيم حسب التخصص	185
1. تخصص مطلق	185
2. تخصص عالي	185
3. تخصص مجسم	185
4. تخصص واطئ	187
5. تخصص المجموعة	187
6. تخصص المادة الأساس	188
7. تخصص التفاعل	188
8. تخصص تركيبي	188
9. تخصص نسبي	189
10. تخصص المنتوج	189

الفصل الثامن

تحفيز الإنزيمات

ثبات الحالة الانتقالية	193

الموضوع	الصفحة
أهمية معادلة ميكليس – منتن	201
تنظيم الكفاءة التحفيزية للإنزيمات	202
التقريب والتوجيه	203
الشد والالتواء	203
تحفيز الحامض – القاعدة العام	204
تحفيز الحامض- القاعدة الخاص	205
التحفيز التساهمي	206
التحفيز الانزيمي	207
التحفيز الالكتروستاتيكي	209
تحفيز الايون المعدني	209
الية التحفيز	210
1. الالية التحفيزية لانزيم Serine proteases	210
2. الالية التحفيزية للكيموتربسين	212
3. الالية التحفيزية للتربسين	216
4. الالية التحفيزية للرايبونيوكليز	216
5. الالية التحفيزية لانزيم اللايزوزيم	218
6. الالية التحفيزية لانزيم كاربوكسي ببتيديز	220
7. الالية التحفيزية لانزيم aspartate aminotransferase	222
8. الالية التحفيزية لانزيم lactate dehydrogenase	223
9. الالية التحفيزية لانزيم Fructose diphosphate aldolase	224
الفصل التاسع	
حركيات الإنزيمات	
طرق دراسة حركية التفاعلات الإنزيمية	229
أ – دراسة السرعة الأولية	229
ب- تقانات التفاعل السريع	230
1. آلية كرة المنضدة	231
2. آلية الترتيب العشوائي	231
3. آلية الترتيب الإجباري	231
العلاقة بين Km،V max ورتب التفاعل	238

الموضوع	الصفحة
وحدات الإنزيم	238
عدد الانقلاب Turnover Number	239
علاقة Kcat / Km	240
تأثير الأس الهيدروجيني على النشاط الإنزيمي	241
تأثير درجة الحرارة على نشاط الإنزيم	242
التبيط الإنزيمي	242
1. التثبيط العكسي	243
أ-التثبيط التنافسي	243
ب-التثبيط اللا تنافسي	244
2. الثبيط غير العكسي	245
حركيات التفاعلات المحفزة بالإنزيمات	245
أ-العشوائية Random	246
ب-المرتبة ordered	246
تفاعلات الإزاحة المنفردة العشوائية	246
عمل انزيم الكاينيز بالية تفاعلات الإزاحة المنفردة العشوائية	246
تفاعلات الإزاحة المنفردة المرتبة	247
تفاعلات الإزاحة المزدوجة (Pong— Ping)	247
الآليات التحفيزية للإزاحة المضاعفة لإنزيم aminotransferase	247
زيادة سرعة الإنزيم	248

الفصل العاشر
التفاعلات الإنزيمات

تقسيم التفاعلات الإنزيمية	254
التوازن الكيمياوي	255
القوة الحرارية للتفاعلات الإنزيمية	255
العوامل المؤثرة على سرعة التفاعلات الكيمياوية	256
1. تأثير تركيز الإنزيم	256
2. تركيز المادة الأساس	257
معادلة ميكليس — منتن	257
نقل معادلة مكليس -- منتن	260

الموضوع	الصفحة
3. درجة الحرارة	263
4. الأس الهيدروجيني	263
5. المنشطات	263
6. المثبطات	264
أ- المثبطات التي تعمل على بروتين الإنزيم	265
ب- المثبطات التي تعمل على المجموعة الرابطة	265
ج- المثبطات التي تعمل على المرافقات الإنزيمية	266
د- المثبطات التي تعمل على المنشطات الايونية	266
هـ - المثبطات الذي تتداخل مع ربط المادة الأساس	266
الفصل الحادي عشر	
مجاميع بروتينات الإنزيم	
1. إنزيمات أحادية السلسلة الببتيدية	269
أ- بروتيزات السيرين	270
ب- البروتيزات الحامضية	270
ج- إنزيمات بروتيزات الثايول	270
الكيموتربسين	271
التربسين	272
ايلاستيز	273
Subtilisin	274
البابايين	274
الفيسين	274
الببسين	274
الكيموسين	275
2. إنزيمات متعددة قصيرة السلسلة الببتيدية	275
أ- dehydrogenase lactate	276
ب-إنزيم تخليق اللاكتوز	277
ج-إنزيم تخليق التربتوفين	278
3. إنزيمات متعددة طويلة السلسلة	278
معقدات الإنزيم المتعدد	278

الموضوع	الصفحة

1. Pyruvate dehydrogenase	279
2. معقد إنزيم تخليق الأحماض الدهنية	280
3. معقد إنزيم ألفا- كيتوكلوتاريت النازع للهيدروجين	281
تحوير تخصص الإنزيم المعقد	281
أهمية الإنزيمات المتعددة	282
الفصل الثاني عشر	
تثبيط النشاط الإنزيمي	
تصنيف مثبطات الإنزيمات	286
التثبيط اللا عكسي	286
التثبيط العكسي	287
1. التثبيط العكسي التنافسي	288
2. التثبيط العكسي اللا تنافسي	290
3. التثبيط العكسي غير التنافسي	292
4. التثبيط العكسي المرتد	293
5. التثبيط بفعل المادة الأساس	295
الفصل الثالث عشر	
إنزيمات الهضم	
1. الهضم في تجويف الفم	299
2. الهضم في المعدة	299
أ-إنزيم الببسين	300
ب- إنزيم الرنين	301
ج- إنزيم gastriosin	301
د- إنزيم gelatinasae	301
هـ- إنزيم اللايزوزيم	301
و- إنزيم اللايبيز المعدي	301
3. الهضم في الأمعاء	301
أولا:-العصير البنكرياسي	302
1. إنزيم التربسين	302

الموضوع	الصفحة

2. إنزيم الكيموتربسين	303
3. إنزيم carboxy peptidases	303
4. إنزيم Elastase	304
5. إنزيم amylopsin	304
6. إنزيم steapsin	304
7. إنزيم Phosphorylase A	305
8. إنزيم Cholesterol esterase	305
9. إنزيمات nucleases	305
ثانيا: العصير المعوي	306
1. إنزيم enterokinase	307
2. إنزيمات aminopeptidases	307
3. إنزيم prolidase	307
4. البيتيديزات الثنائية والثلاثية	307
5. إنزيمات تحلل الكربوهيدرات	308
6. إنزيم اللايبيز المعوي	308
7. إنزيمات الفوسفاتيزات	309
8. النيوكليوتيزات والنيوكليوسيديزات	309
الفصل الرابع عشر	
إنزيمات الأكسدة البيولوجية	
أولا: الاوكسيديزات	313
1. Cytochrome oxidase	313
2. الفينوليزات	314
ثانيا: إنزيمات النازعة للهيدروجين الهوائية	314
أ-إنزيم Amino acid dehydrogenases	315
ب-إنزيم xanthine dehydrogenase	315
ج-إنزيم aldehyde dehydrogenase	315
د-إنزيم glucose oxidase	316
ثالثا: الإنزيمات النازعة للهيدروجين اللا هوائية	316

الموضوع	الصفحة
1. إنزيمات نازعة للهيدروجين الذي تعتمد على NAD^+ , $NADP^+$	316
2. الإنزيمات النازعة للهيدروجين المعتمدة على FAD , FMN	317
3. السايتوكرومات	318
رابعا : الهيدروبيروكسيديزات	318
1. البيروكسيديزات	318
2. الكاتايز	320
خامسا : الاوكسجسينيزات	320
1. الاوكسجينيزات الأحادية	321
2. إنزيمات الاوكسجينيزات الثنائية	322
الفصل الخامس عشر	
الإنزيمات المنظمة	
صفات الانزيمات المنظمة	326
تصنيف الإنزيمات المنظمة	329
الإنزيمات غير المتجانسة	330
الإنزيمات المتجانسة	330
نماذج الإنزيمات المنظمة	331
1. نموذج R و T	331
2. النموذج المنسجم والتراكمي	332
3. النموذج التعاقبي	335
المؤثرات غير المتجانسة	336
المؤثرات الموجبة	337
المؤثرات السالبة	337
انظمة K و V	337
الآليات المختلفة لتثبيط الإنزيمات المنظمة	338
انزيم Phosphorylase	340
Aspartate transcarbamoylase,ATCase	342
Phosphofructokinase ,PFKase	343
Ribonucleoside reductase,Rrase	344
Isocitrate dehydrogenase	346
Aspartate kinase	346

الفصل السادس عشر

الإنزيمات في المستحضرات البيولوجية

1. اختيار المستحضر	349
2. تقدير الإنزيمات	350
التقدير الكمي لنشاط الإنزيم	351
3. تقدير حركية النشاط التحفيزي	354
4. التقديرات الحركية المزدوجة	355
5. تقدير المناعة الإشعاعية للإنزيمات	357
6. التقسيم الخلوي الثانوي للإنزيمات	358
أ- كيمياء أنسجة الإنزيمات	359
ب-الطرد المركزي	360

الفصل السابع عشر

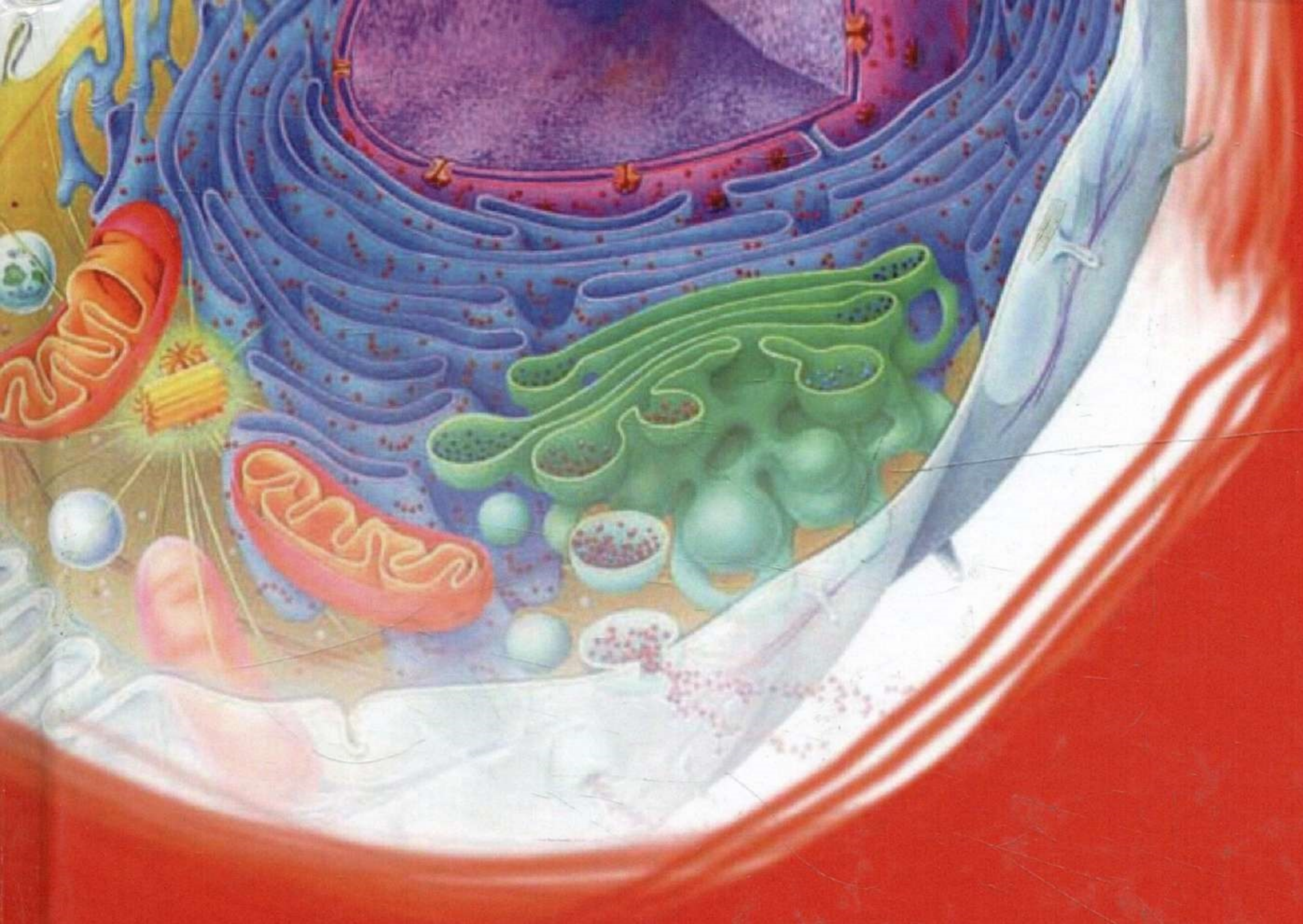
فصل وتنقية الإنزيمات

اولاً – طرق فصل الأنزيمات	366
1. فصل الإنزيمات بالترسيب	366
2. فصل الإنزيمات بالاستخلاص	366
أ- استخلاص الإنزيمات الذائبة	367
ب-استخلاص الإنزيمات المرتبطة بالغشاء	367
3. الفصل بواسطة الترشيح الهلامي	369
4. فصل الإنزيمات بالترحيل في المجال الكهربائي	369
أ-الانتقال في المجال الكهربائي الحر	370
ب-الانتقال في المجال الكهربائي المنطقي	371
1. الانتقال في مجال كهربائي ورقي	371
2. الانتقال في المجال لكهربائي الهلامي	371
3. الانتقال في المجال الكهربائي هلام الأكريلامايد المتعدد	372
4. بؤرة تساوي الشحنه أو منطقة نقطة التعادل	372
5. فصل الإنزيمات بواسطة الكروماتوكرافيا	372
أ- كروماتوكرافيا الادمصاص	373

الموضوع	الصفحة
ب- كروماتوكرافيا التجزئة	373
ج- كروماتوكرافيا الورقة	374
د- كروماتوكرافيا التبادل الايوني	375
هـ- كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة	375
و- كروماتوكرافيا الترشيح	375
6. الفصل بالطرد المركزي	376
7. فصل الإنزيمات بالدنترة	377
ثانيا: تنقية الإنزيمات	377
1. طرق التنقية التمهيدية	378
2. طرق تنقية الإنزيمات النهائية	378
1. الترشيح الهلامي	378
2. كروماتوكرافيا التجزئة	379
3. الهجرة في المجال الكهربائي	379
4. كروماتوكرافيا التبادل الأيوني	379
5. كروماتوكرافيا الألفة	380
الترسيب	380
التأكد من نقاوة الإنزيم	380
أ- قابلية الذوبان	381
ب-الطرد المركزي فائق السرعة	381
ج- الهجرة في المجال الكهربائي الهلامي	382
د- منطقة نقطة التعادل الكهربائي	382
الفصل الثامن عشر	
آليات وتقانات التحليل الإنزيمي	
تقانات الكشف للإنزيمات	385
1. مقياس ضغط السوائل والغازات والأبخرة	385
2. جهاز السبيكتروفوتوميتري	386
3. السبيكتروفلوريميتري	389
4. الطرق الكيمياوية الكهربائية	390
5. جهاز قياس السعرات الحرارية الدقيقة	391

الموضوع	الصفحة
6. طرق الإشعاع الكيمياوية	392
أ - Tracer technique	393
ب-عداد جيجر – مولر	394
7. الاستقطاب	394
آليات التحليل الإنزيمي	395
1. طرق الوقت الثابت	395
2. طرق التركيز الثابت	397
3. طريقة الرصد المستمر	397
الفصل التاسع عشر	
تطبيقات الإنزيمات	
أولا: التطبيقات التشخيصية للإنزيمات	401
1. إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في المصل	403
2. إنزيم الفوسفاتيز الحامضي في المصل	404
3. إنزيم اللاكتيت النازع للهيدروجين	404
4. إنزيم SGOT	405
5. إنزيم SGPT	406
6. إنزيم serum cholinesterase	406
7. إنزيم serum amylase	407
8. إنزيم اللايبيز في المصل	408
9. التربسين	408
10. إنزيم oxidase	408
11. إنزيم كرياتين فوسفوكاينيز	408
12. إنزيم Tyrosinase	409
الخلل الولادي والإنزيمات	409
أولا: العيوب الوراثية للبيدات	410
ثانيا: أمراض خزن الكلايكوجين والإنزيمات	412
ثالثا: الاختلالات الوراثية في الهضم والامتصاص	415
رابعا: الاختلالات الوراثية للأحماض الأمينية والبروتينات	416
خامسا: الاختلالات الهرمونية والإنزيمات	421

الموضوع	الصفحة
سادسا: الخلل الوراثي في الصبغات	421
ثانيا: التطبيقات الصناعية للإنزيمات	424
1. صناعة الألبان	425
2. منتجات الفواكه والخضراوات	426
3. اللحوم والأسماك	427
4. صناعة الحلوى	427
5. مواد النكهة	427
6. صناعة الأغذية	427
ثالثا: التطبيقات التحليلية للإنزيمات	428
1. طرق نقطة النهاية	428
2. طرق المناعة	429
3. الطرق الحركية	429
رابعا: تطبيقات التقانات الحياتية للإنزيمات	430
تفسير المصطلحات	433
المراجع	453
المحتويات	457



كيمياء الانزيمات

دار البداية ناشرون وموزعون
عمان - وسط البلد
هاتف: 96264640679+ تلفاكس: 96264640579+
info.daralbedayah@yahoo.com
خبراء الكتاب الأكاديمي

دار ال
عمان - و
تل
oo.com
متخصصون بإنتاج الكتاب الجامعي