

ФЕРМЕНТЫ

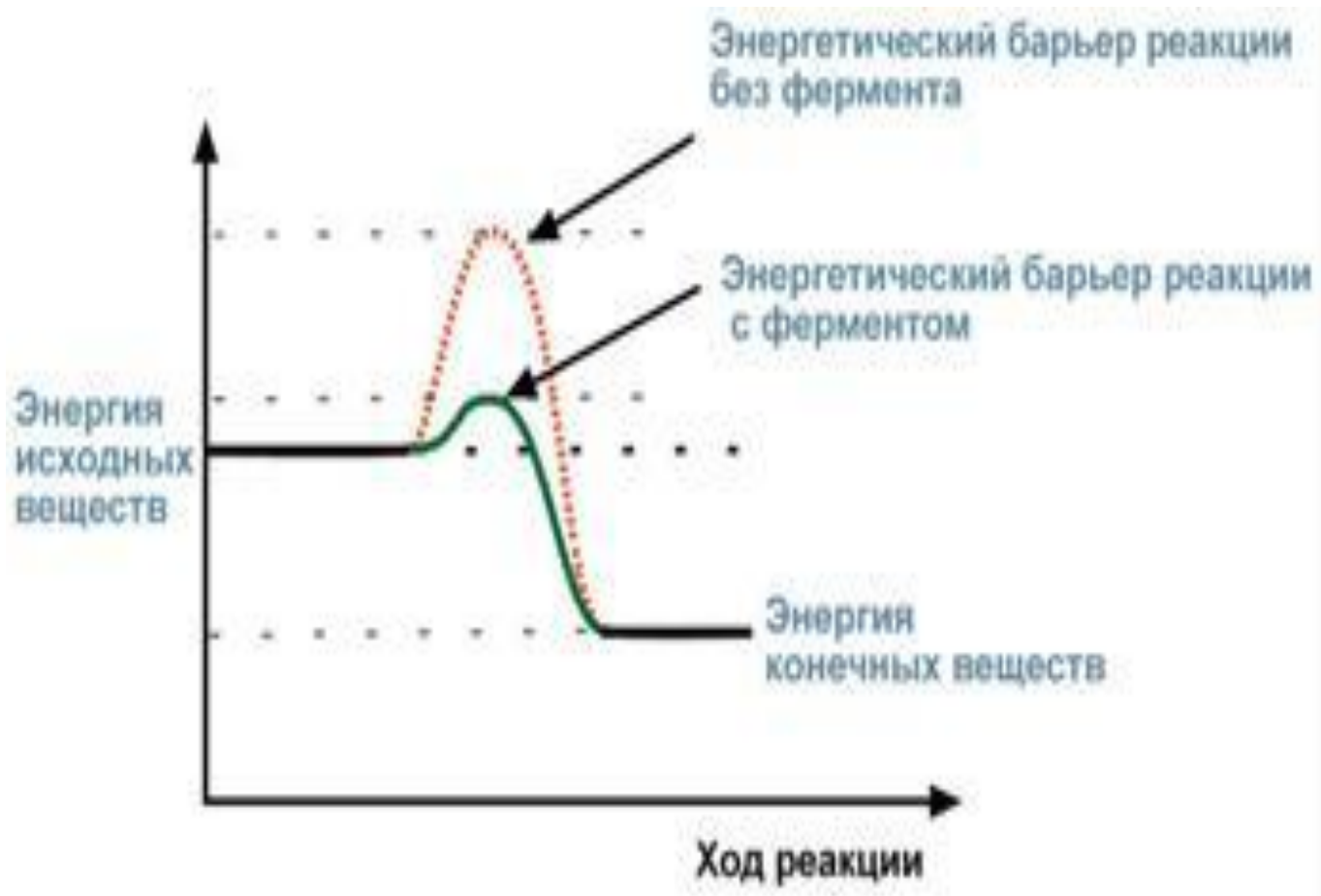


Основу всех жизненных процессов составляют тысячи химических реакций, катализируемых ферментами.

Значение ферментов точно и образно определил И.П. Павлов, назвав их "**возбудителями жизни**".
Нарушения в работе ферментов ведут к возникновению тяжелых заболеваний – фенилкетонурия, гликогенозы, галактоземия, тирозинемия или существенному снижению качества жизни – дислипотеинемии, гемофилия

Известно, что для осуществления химической реакции необходимо, чтобы реагирующие вещества имели суммарную энергию выше, чем величина, называемая **энергетическим барьером** реакции. Для характеристики величины энергетического барьера Аррениус ввел понятие **энергии активации**. **Преодоление энергии активации в химической реакции достигается либо увеличением энергии взаимодействующих молекул, например нагреванием, облучением, повышением давления, либо снижением требуемых для реакции затрат энергии (т.е. энергии активации) при помощи катализаторов.**

Величина энергии активации с ферментом и без него



По своей функции ферменты являются биологическими катализаторами.

Сущность действия ферментов, так же как неорганических катализаторов, заключается:

- **в активации молекул реагирующих веществ,**
- **в разбиении реакции на несколько стадий, энергетический барьер каждой из которых ниже такового общей реакции.**

Однако энергетически невозможные реакции ферменты катализировать не будут, они ускоряют только те реакции, которые могут идти в данных условиях.

Ферментативный катализ имеет свои особенности

Этапы катализа

В ферментативной реакции можно выделить следующие этапы:

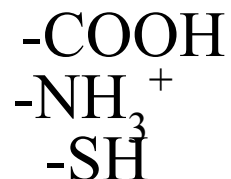


- 1. Присоединение субстрата (S) к ферменту (E) с образованием фермент-субстратного комплекса (E-S).
- 2. Преобразование фермент-субстратного комплекса в один или несколько переходных комплексов (E-X) за одну или несколько стадий.
- 3. Превращение переходного комплекса в комплекс фермент-продукт (E-P).
- 4. Отделение конечных продуктов от фермента.

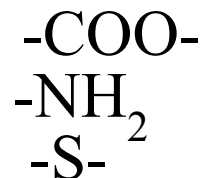
Механизмы катализа

- 1. Кислотно-основной катализ** – в активном центре фермента находятся группы специфических аминокислотных остатков, которые являются хорошими донорами или акцепторами протонов. Такие группы представляют собой мощные катализаторы многих органических реакций.

Доноры



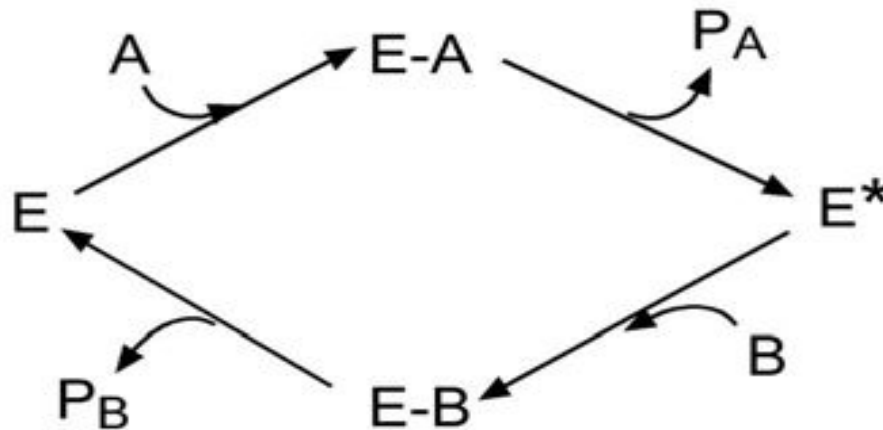
Акцепторы



2. Ковалентный катализ – ферменты реагируют со своими субстратами, образуя при помощи ковалентных связей очень нестабильные фермент-субстратные комплексы, из которых в ходе внутримолекулярных перестроек образуются продукты реакции.

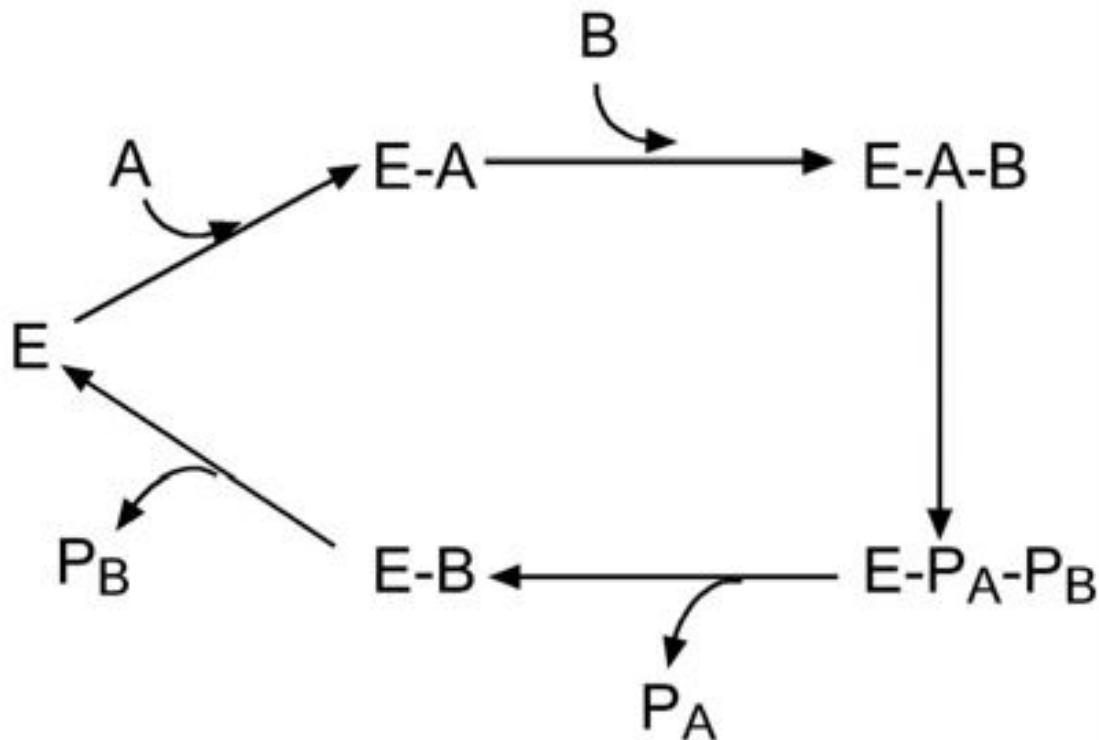
ТИПЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

1. Тип "пинг-понг" – фермент сначала взаимодействует с субстратом А, отбирая у него какие-либо химические группы и превращая его в соответствующий продукт. Затем к ферменту присоединяется субстрат В, получающий эти химические группы. Примером являются реакции переноса аминокислот на кетокислоты



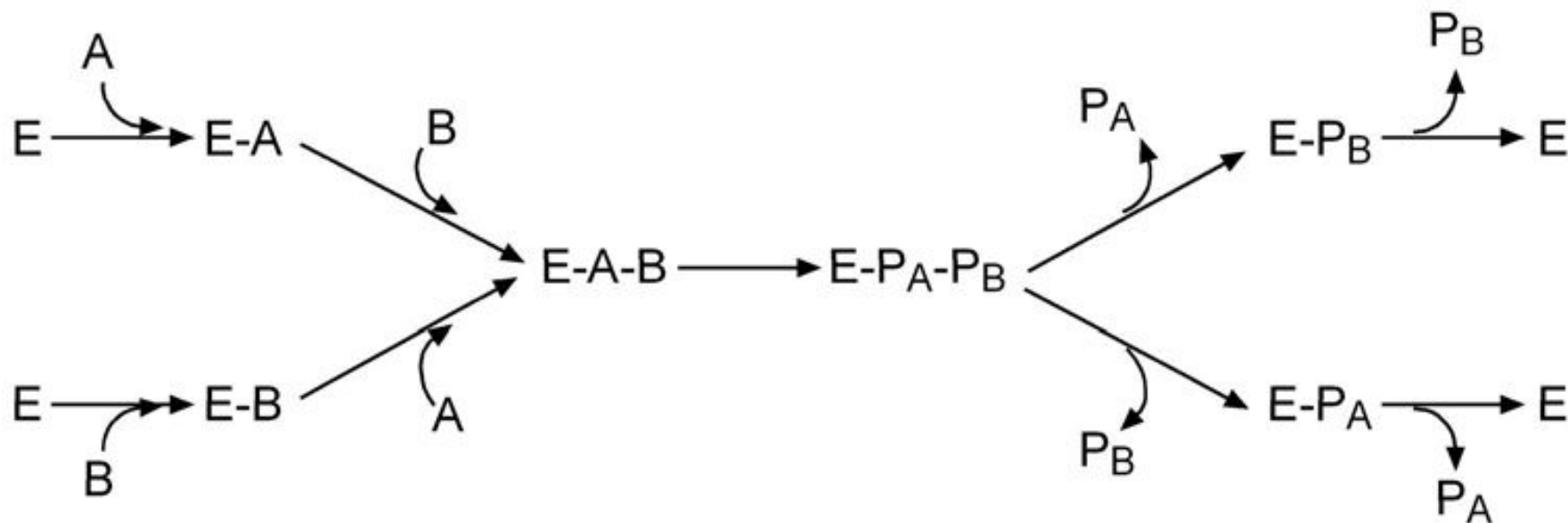
Ферментативная реакция по типу "пинг-понг"

2. Тип последовательных реакций – к ферменту последовательно присоединяются субстраты А и В, образуя "тройной комплекс", после чего осуществляется катализ. Продукты реакции также последовательно отщепляются от фермента.



Ферментативная реакция
по типу "последовательных реакций"

3. **Тип случайных взаимодействий** – субстраты А и В присоединяются к ферменту в любом порядке, неупорядоченно, и после катализа так же отщепляются.



Ферментативная реакция по типу “случайных взаимодействий”

Сходство и отличия ферментов и неорганических катализаторов

СХОДСТВА	ОТЛИЧИЯ
<p>1. Катализируют только энергетически возможные реакции.</p> <p>2. Не изменяют направления реакции.</p> <p>3. Ускоряют наступление равновесия реакции, но не сдвигают его.</p> <p>4. Не расходуются в процессе реакции.</p>	<p>1. Скорость ферментативной реакции намного выше.</p> <p>2. Высокая специфичность.</p> <p>3. Мягкие условия работы (внутриклеточные).</p> <p>4. Возможность регулирования скорости реакции.</p> <p>5. Скорость ферментативной реакции пропорциональна количеству фермента.</p>

СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Давно выяснено, что все ферменты являются белками и обладают всеми свойствами белков. Подобно белкам они делятся на **простые и сложные**.

Простые ферменты состоят только из аминокислот – например, пепсин, трипсин, лизоцим.

Сложные ферменты (холоферменты) имеют в своем составе белковую часть, состоящую из аминокислот – апофермент, и небелковую часть – кофактор.

Кофактор, в свою очередь, может называться коферментом или простетической группой. Примером могут быть сукцинатдегидрогеназа (содержит ФАД), аминотрансферазы (содержат пиридоксальфосфат), пероксидаза (содержит гем).

Для осуществления катализа необходим полноценный комплекс апобелка и кофактора, по отдельности катализ они осуществить не могут.

Как многие белки, ферменты могут быть **мономерами, т.е. состоят из одной субъединицы, и полимерами, состоящими из нескольких субъединиц.**

В составе фермента выделяют области, выполняющие различную функцию:

1. Активный центр – комбинация аминокислотных остатков (обычно 12-16), обеспечивающая непосредственное связывание с молекулой субстрата и осуществляющая катализ.

Аминокислотные радикалы в активном центре могут находиться в любом сочетании, при этом рядом располагаются аминокислоты, значительно удаленные друг от друга в линейной цепи.

У ферментов, имеющих в своем составе несколько мономеров, может быть **несколько активных центров** по числу субъединиц. Также две и более субъединицы могут формировать один активный центр.

У сложных ферментов в активном центре **обязательно** расположены **функциональные** группы **кофактора**.

В свою очередь в активном центре выделяют два участка:
- **якорный (контактный, связывающий)** – отвечает за **связывание и ориентацию субстрата** в активном центре,
- **каталитический** – непосредственно отвечает за **осуществление реакции**.





Схематичное изображение основных участков фермента

2. Аллостерический центр (allos – чужой) – центр регуляции активности фермента, который пространственно отделен от активного центра и имеется не у всех ферментов. Связывание с аллостерическим центром какой-либо молекулы (называемой активатором или ингибитором, а также эффектором, модулятором, регулятором) вызывает изменение конфигурации белка-фермента и, как следствие, скорости ферментативной реакции. В качестве такого регулятора может выступать продукт данной или одной из последующих реакций, субстрат реакции или иное вещество.

Аллостерические ферменты являются полимерными белками и их активный и регуляторный центры находятся в разных субъединицах.

ИЗОФЕРМЕНТЫ

Изоферменты – это молекулярные формы одного и того же фермента, возникшие в результате **небольших генетических различий в первичной структуре фермента**. Различные изоферменты определяют скорость и направление реакции благодаря разному сродству к субстрату.

Например, димерный фермент **креатинкиназа представлен тремя изоферментными** формами, составленными из двух типов субъединиц: М (англ. muscle – мышца) и В (англ. brain – мозг).

Креатинкиназа-1 состоит из субъединиц типа В, локализуется в головном мозге,

креатинкиназа-2 – по одной М и В субъединице активна в миокарде,

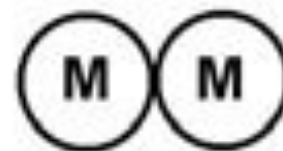
креатинкиназа-3 – две М-субъединицы, специфична для скелетной мышцы.



КК-1



КК-2



КК-3

Изоферменты креатинкиназы



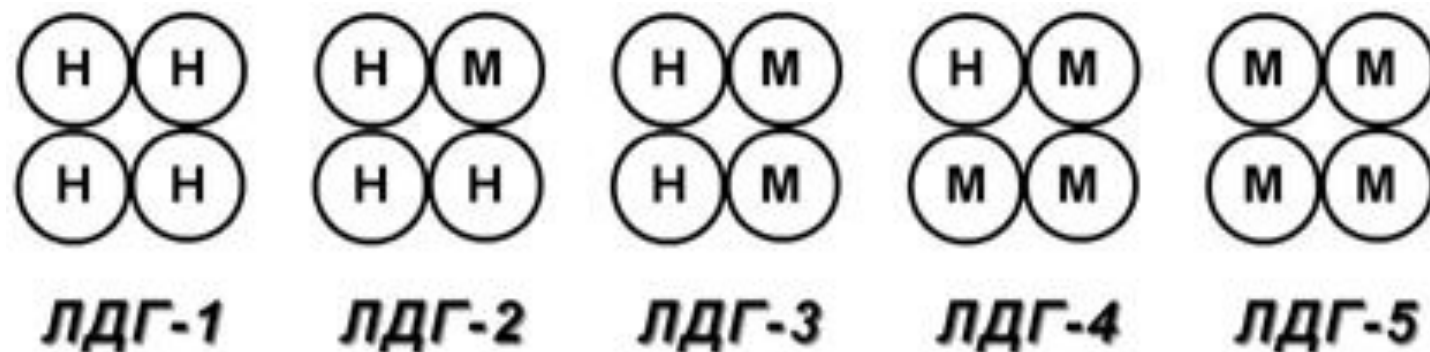
Реакция, катализируемая креатинкиназой

Также существует пять изоферментов **лактатдегидрогеназы (ЛДГ)** – фермента, участвующего в обмене глюкозы. Отличия между ними заключаются в разном соотношении субъединиц **H** (англ. heart – сердце) и **M** (англ. muscle – мышца).

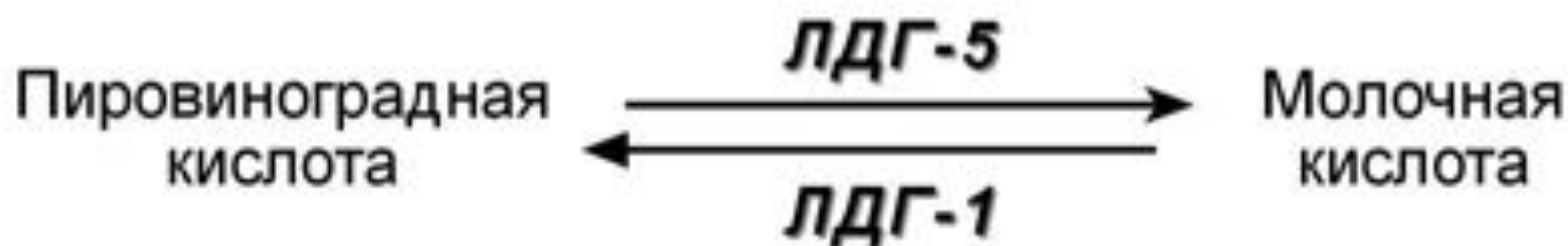
Лактатдегидрогеназы типов **1 (H4)** и **2 (H3M1)** присутствуют в тканях с **аэробным обменом** (миокард, мозг, корковый слой почек), обладают **высоким сродством к молочной кислоте (лактату)** и превращают его в пируват.

ЛДГ-4 (**H1M3**) и ЛДГ-5 (**M4**) находятся в тканях, склонных к **анаэробному обмену** (печень, скелетные мышцы, кожа, мозговой слой почек), обладают **низким сродством к лактату** и катализируют превращение пирувата в лактат.

В тканях с **промежуточным типом обмена** (селезенка, поджелудочная железа, надпочечники, лимфатические узлы) преобладает ЛДГ-3 (**H2M2**)

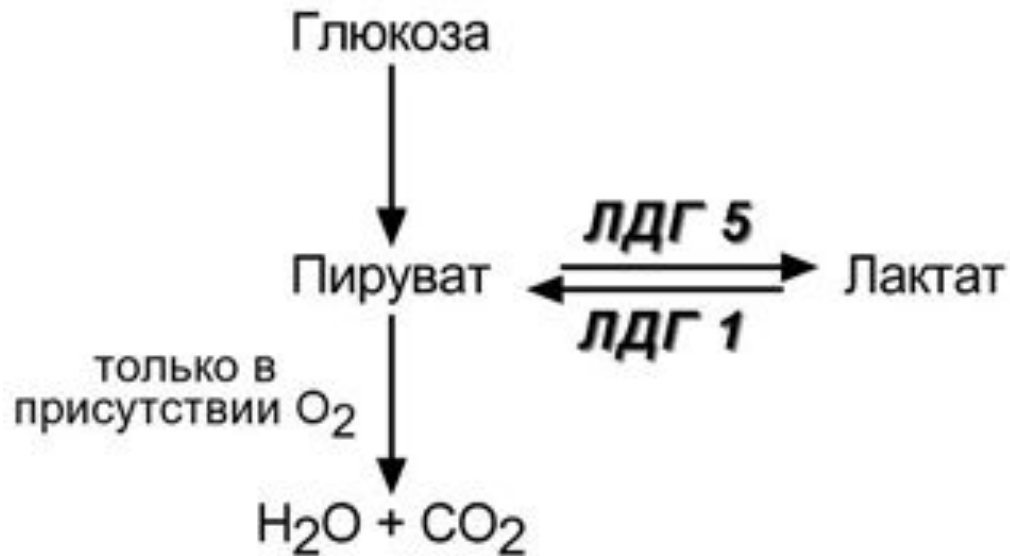


Изоферменты лактатдегидрогеназы



Отличие в действии ЛДГ-1 и ЛДГ-5

Благодаря этому различию, в скелетных мышцах, несущих ЛДГ-5, часть энергии (особенно **в бескислородных условиях**) образуется при превращении глюкозы через пируват в лактат. **Миокард не образует лактат**, зато может использовать для получения энергии молочную кислоту, захватываемую из крови, но только в аэробных условиях. Аналогично лактат используется нервной системой.



Роль изоферментов ЛДГ
в судьбе пирувата

В отсутствие кислорода пирувиноградная кислота накапливается в сердечной мышце, т.к. в воду и углекислый газ превратиться не может и, в то же время, ЛДГ-1 не позволяет ей существенно превращаться в лактат.

В результате токсичный пируват начинает повреждать внутриклеточные структуры, и сердечная клетка погибает, развивается инфаркт миокарда.

В скелетной мышце при отсутствии кислорода пируват превращается в молочную кислоту, которая быстро покидает миоцит. Мышца, хоть и не в состоянии работать долго в таких условиях, все-таки сохраняет жизнеспособность.

МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

В мультиферментном комплексе несколько ферментов (например, E1, E2, E3) прочно связаны между собой в единый комплекс и осуществляют ряд последовательных реакций, в которых продукт реакции непосредственно передается на следующий фермент и является только его субстратом. Благодаря таким комплексам значительно ускоряется скорость превращения молекул.

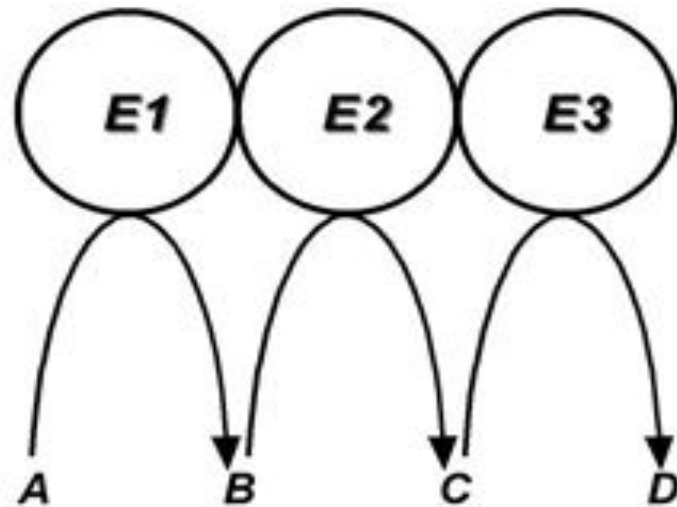


Схема работы
мультиферментного комплекса

Например,

-пируватдегидрогеназный комплекс, превращающий пируват в ацетил-S-CoA,

- α - кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, превращающий α -кетоглутарат в сукцинил-S-CoA,

-комплекс под названием "синтаза жирных кислот**" (или **пальмитатсинтаза**), синтезирующий пальмитиновую кислоту.**

Что означает выражение "активность фермента"?

Прежде чем обсуждать свойства ферментов и зависимость ферментов от каких-либо факторов необходимо определиться с понятием **активность ферментов**.

В повседневной биохимической практике практически **не оценивается количество** фермента, а только его **активность**.

Активность – более широкое понятие, чем количество. Она подразумевает в первую очередь результат реакции, а именно убыль субстрата или накопление продукта.

Естественно, при этом нельзя игнорировать время, которое проработал фермент и число молекул фермента. Но так как число молекул фермента подсчитать обычно не реально, то используют количество биологического материала, содержащего фермент (объем или массу).

Таким образом при определении активности ферментов нужно одновременно учитывать три меняющихся фактора:

-масса полученного продукта или исчезнувшего субстрата,

-время, потраченное на реакцию,

-количество биологического материала, содержащего фермент.

Основы количественного определения активности ферментов

1. **Активность фермента** выражается в **скорости** накопления продукта или скорости убыли субстрата в пересчете на **количество материала**, содержащего фермент.

$$\text{Активность фермента} = \frac{\text{Количество продукта или субстрата}}{\text{Единица времени} \times \text{Единица массы или объема пробы}}$$

В практике обычно используют:

единицы количества вещества – моль (и его производные ммоль, мкмоль), грамм (кг, мг), единицы времени – минута, час, секунда, единицы массы или объема – грамм (кг, мг), литр (мл)

.

Активно используются и другие производные – катал (моль/с), международная единица активности (МЕ, Unit) соответствует мкмоль/мин.

Таким образом, активность фермента может выражаться, например, в ммоль/с х л, г/час х л, МЕ/л, кат/мл и т.д.

Основы количественного определения активности ферментов

2. Создание **стандартных условий**, чтобы можно было сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях – оптимальная **pH** и фиксированная **температура**, например, 25°C или 37°C, соблюдение **времени** инкубации субстрата с ферментом.
3. Необходимо наличие **избытка субстрата**, чтобы работали все имеющиеся в растворе молекулы фермента.

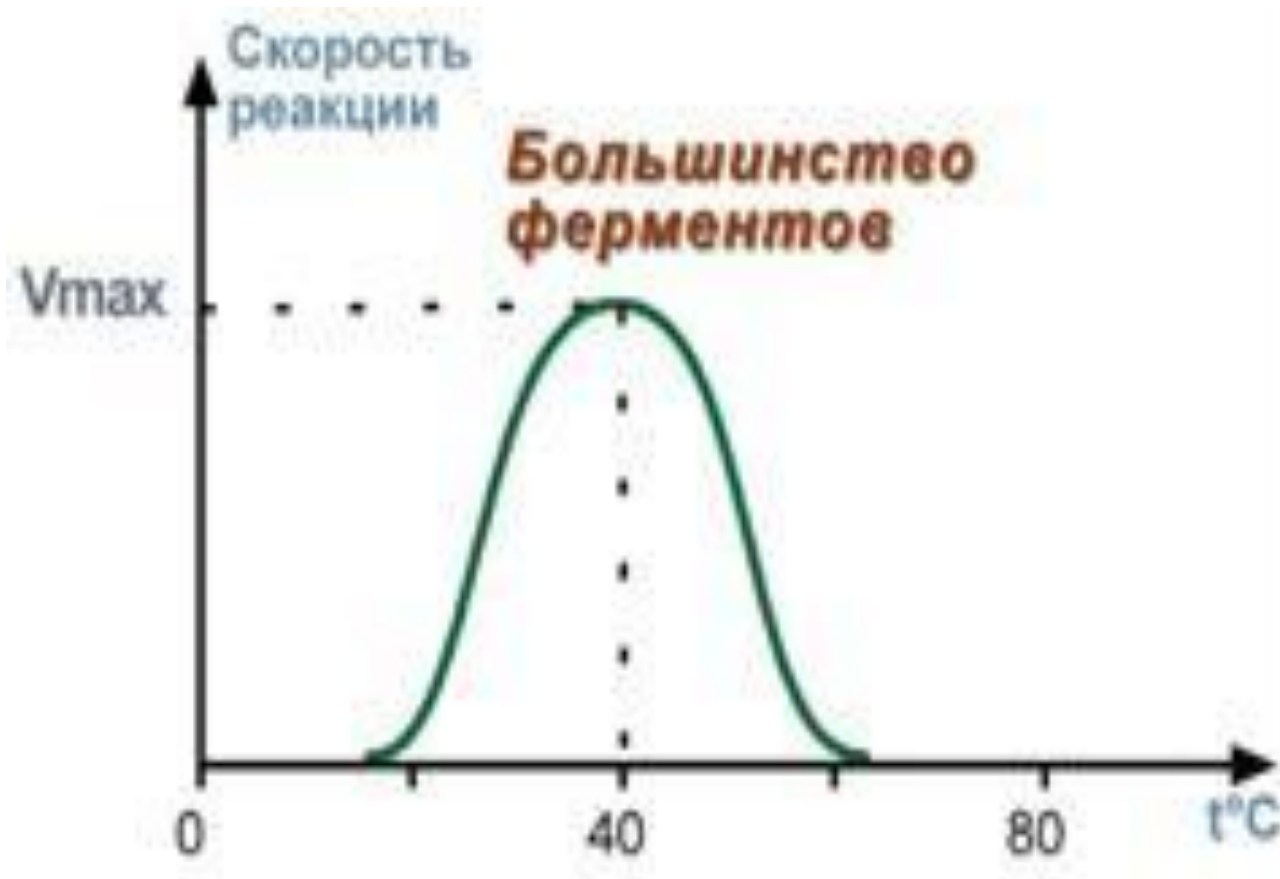
Свойства ферментов

1. Зависимость скорости реакции от температуры

Зависимость активности ферментов (скорости реакции) от температуры описывается **колоколообразной кривой** с максимумом скорости при значениях **оптимальной температуры** для данного фермента.

Закон о повышении скорости реакции в 2-4 раза при повышении температуры на 10°C справедлив и для ферментативных реакций, но только в пределах до $55-60^{\circ}\text{C}$, т.е. до температур **денатурации** белков. Наряду с этим, как исключение, имеются ферменты некоторых микроорганизмов, существующих в воде горячих источников и гейзеров.

Зависимость скорости реакции от температуры



При понижении температуры активность ферментов понижается, но не исчезает совсем.

Иллюстрацией может служить зимняя спячка некоторых животных (суслики, ежи), температура тела которых понижается до 3-5°C.

Это свойство ферментов также используется в хирургической практике при проведении операций на грудной полости, когда больного подвергают охлаждению до 22°C.

У сиамских кошек мордочка, кончики ушей, хвоста, лапок черного цвета. В этих областях температура всего на $0,5^{\circ}\text{C}$ ниже, чем в центральных областях тела. **Но это позволяет работать ферменту, образующему пигмент в волосяных луковицах. При малейшем повышении температуры фермент инактивируется.**

У зайца-беляка при понижении температуры окружающего воздуха пигментообразующий фермент кожи инактивируется, и заяц получает белую шубку.

Противовирусный белок интерферон начинает синтезироваться в клетках только при достижении температуры тела 38°C

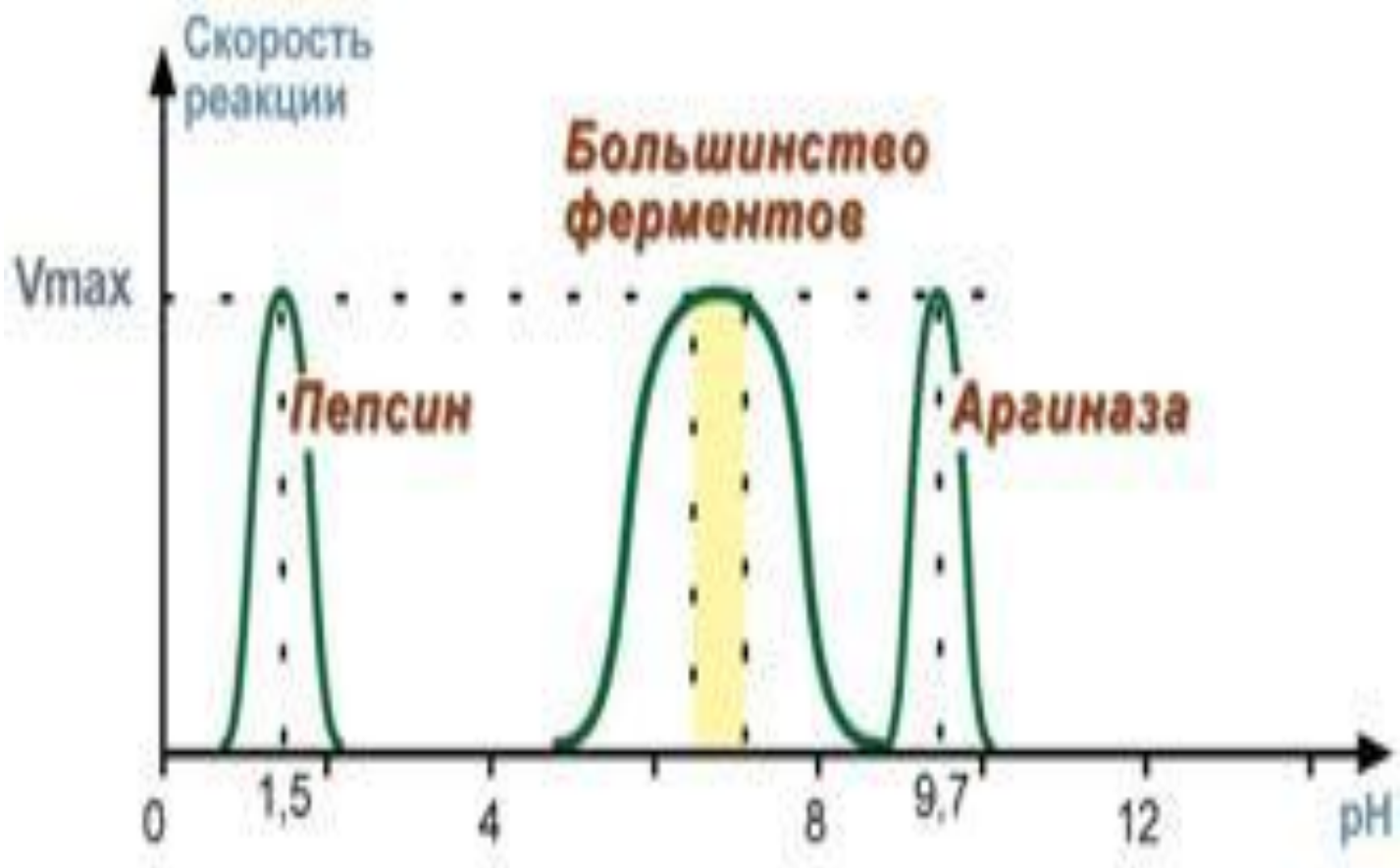
От чего зависит активность ферментов?

2. Зависимость скорости реакции от рН

Зависимость также описывается колоколообразной кривой с максимумом скорости при оптимальном для данного фермента значении рН.

Для каждого фермента существует определенный узкий интервал рН среды, который является оптимальным для проявления его высшей активности. Например, оптимальные значения рН для пепсина 1,5-2,5, трипсина 8,0-8,5, амилазы слюны 7,2, аргиназы 9,7, кислой фосфатазы 4,5-5,0, сукцинатдегидрогеназы 9,0.

Зависимость скорости реакции от величины рН



3. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

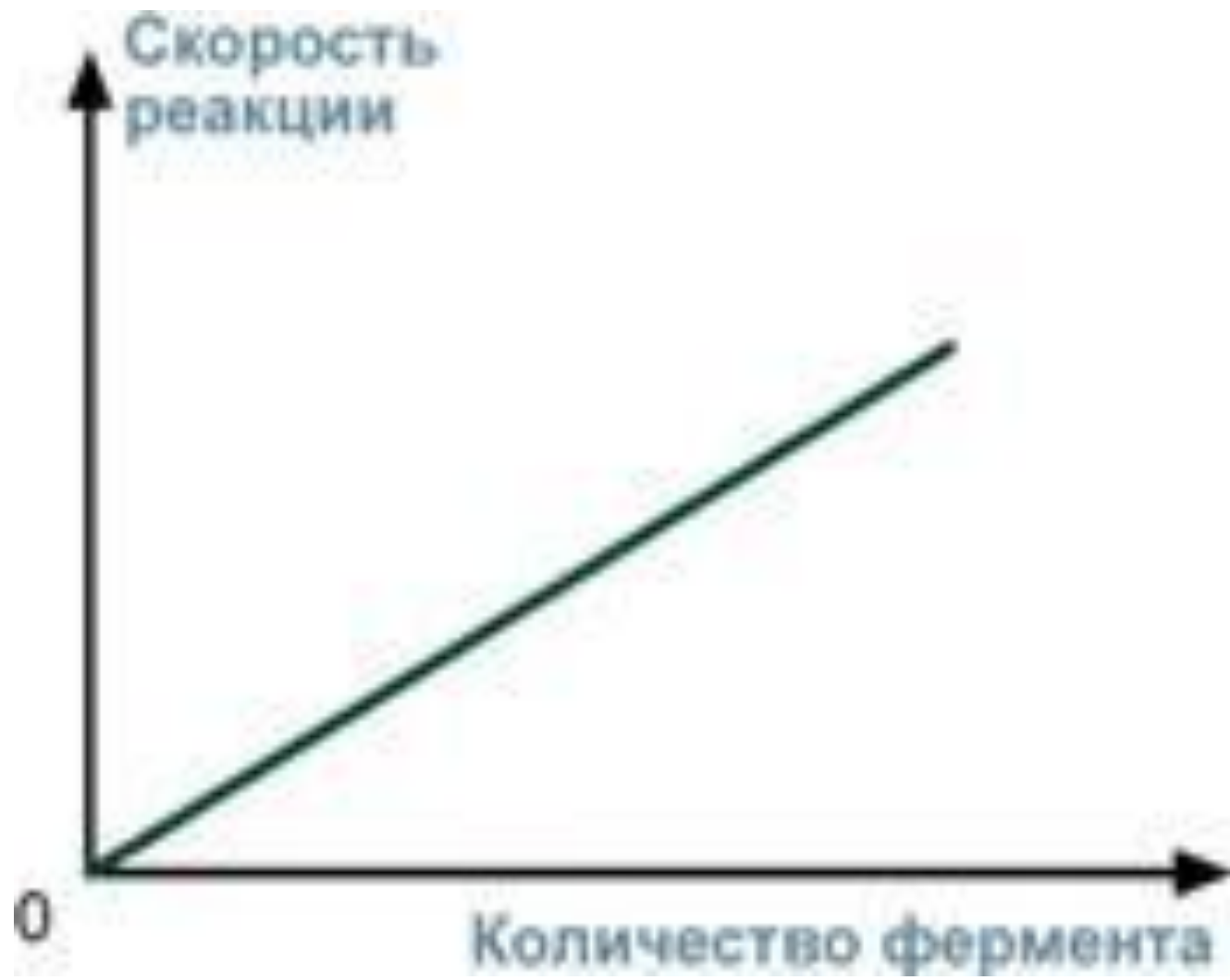
При увеличении концентрации субстрата скорость реакции **сначала возрастает соответственно подключению к реакции новых молекул фермента**, затем наблюдается **эффект насыщения**, когда все молекулы фермента взаимодействуют с молекулами субстрата.

При дальнейшем увеличении концентрации субстрата между его молекулами возникает **конкуренция за активный центр фермента** и **скорость реакции снижается**.



4. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента

При увеличении количества молекул фермента скорость реакции возрастает непрерывно и прямо пропорционально количеству фермента, т.к. большее количество молекул фермента производит большее число молекул продукта.



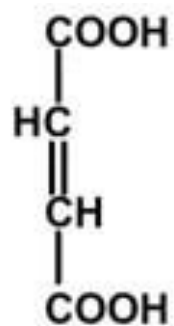
СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Специфичность основана на комплементарности структуры субстрата и активного центра фермента.

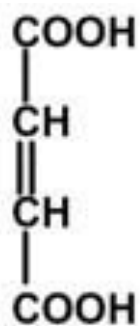
1. Стереоспецифичность – катализ только одного из стереоизомеров, например:

- специфичность к **L- или D-аминокислотам** – например, почти все ферменты человека взаимодействуют с **L-аминокислотами**,
- специфичность к **цис- и транс-изомерам**.

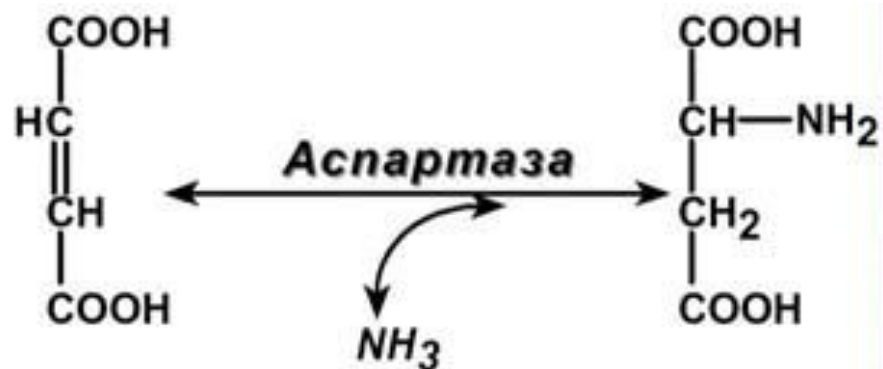
Например, аспартаза реагирует только с транс-изомером – фумаровой кислотой, но не с малеатом (цис-изомер),



Фумарат,
транс-изомер



Малеат,
цис-изомер

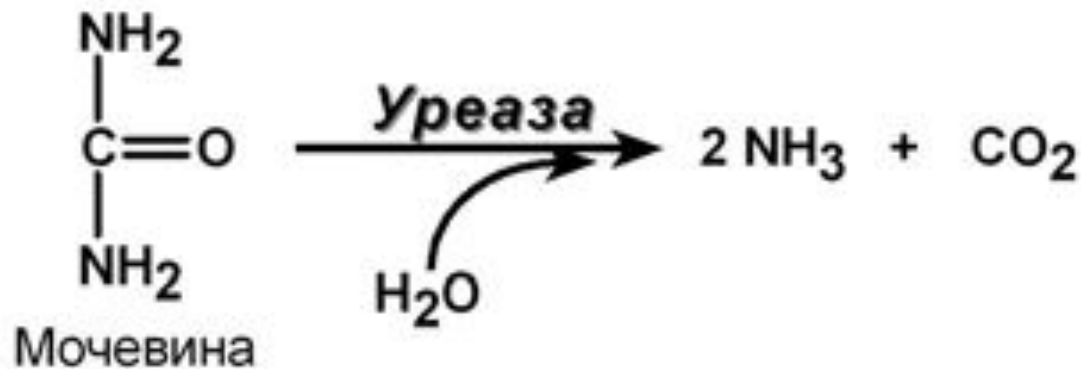


Фумарат

Аспарат

Стереоспецифичность аспартазы к транс-изомеру

2. Абсолютная специфичность – фермент производит катализ только одного вещества.
Например, расщепление мочевины уреазой.



Реакция расщепления мочевины уреазой

3. Групповая специфичность – катализ субстратов с общими структурными особенностями, т.е. при наличии определенной связи или химической группы:

- наличие пептидной связи, например,

- бактериальный фермент субтилизин специфичен к пептидной связи независимо от строения образующих ее аминокислот,

- пепсин катализирует разрыв пептидной связи, образованной аминокетонами ароматических аминокислот

- тромбин расщепляет пептидную связь только между аргинином и глицином.

- наличие ОН-группы, например,

алкогольдегидрогеназа окисляет до альдегидов одноатомные спирты (этанол, метанол, пропанол).

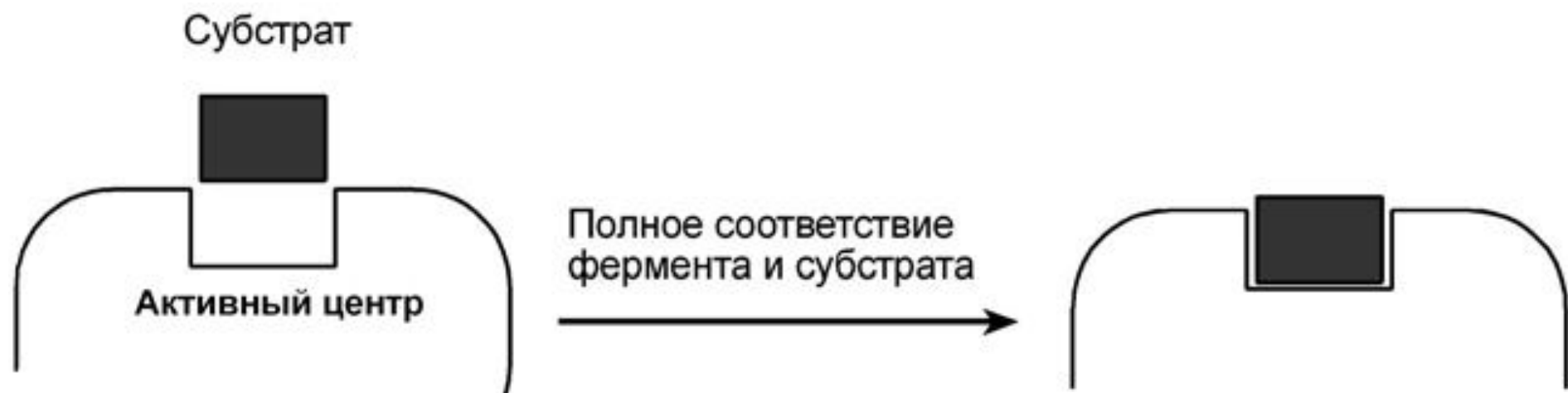
4. Относительная групповая специфичность
– превращение субстратов с некоторыми общими признаками.

Например, цитохром P450 окисляет только гидрофобные вещества, которых насчитывается около 7000.

МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ

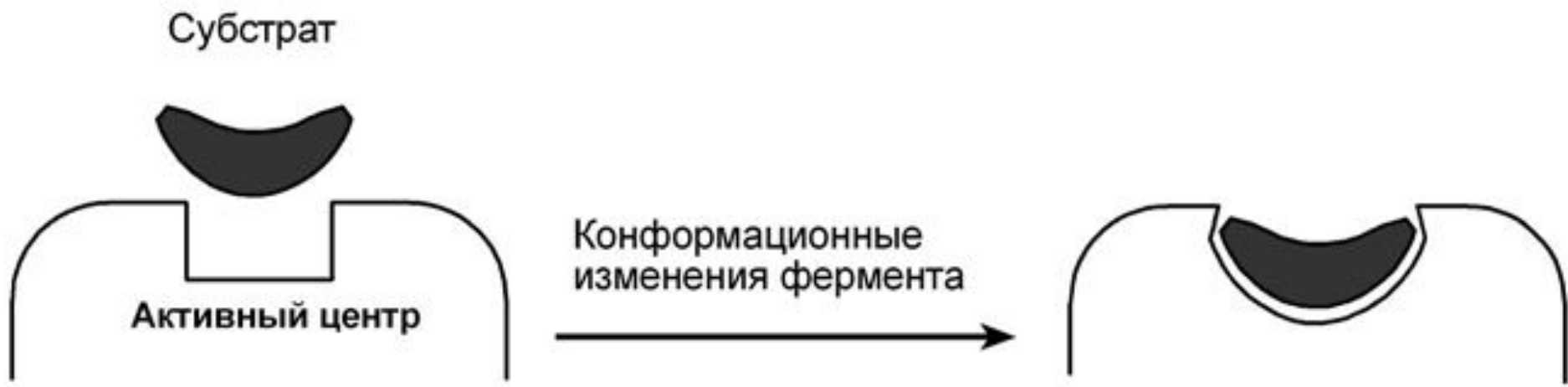
В общем виде все сводится к **комплементарному взаимодействию фермента и субстрата**. При этом функциональные группы субстрата взаимодействуют с соответствующими им функциональными группами фермента. Наличие субстратной специфичности объясняют две гипотезы:

1. **Гипотеза Фишера** (модель "жесткой матрицы", "ключ-замок") – **активный центр фермента строго соответствует конфигурации субстрата и не изменяется при его присоединении**. Эта модель хорошо объясняет абсолютную специфичность, но не групповую.



Теория Фишера – модель специфичности “ключ-замок”

2. Гипотеза Кошланда (модель "индуцированного соответствия", "рука-перчатка") – подразумевает гибкость активного центра. Присоединение субстрата к якорному участку фермента вызывает изменение конфигурации каталитического центра таким образом, чтобы его форма соответствовала форме субстрата.



Теория Кошланда – модель специфичности “рука-перчатки”

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ *IN VIVO*

Активность ферментов в клетке непостоянна во времени. Она чутко реагирует на ситуацию, в которой оказывается клетка, на факторы, воздействующие на клетку как снаружи, так и изнутри. Главная цель этой реакции – отреагировать на изменение окружающей среды, приспособить клетку к новым условиям, дать должный ответ на гормональные и иные стимулы, а в некоторых ситуациях – получить шанс выжить.

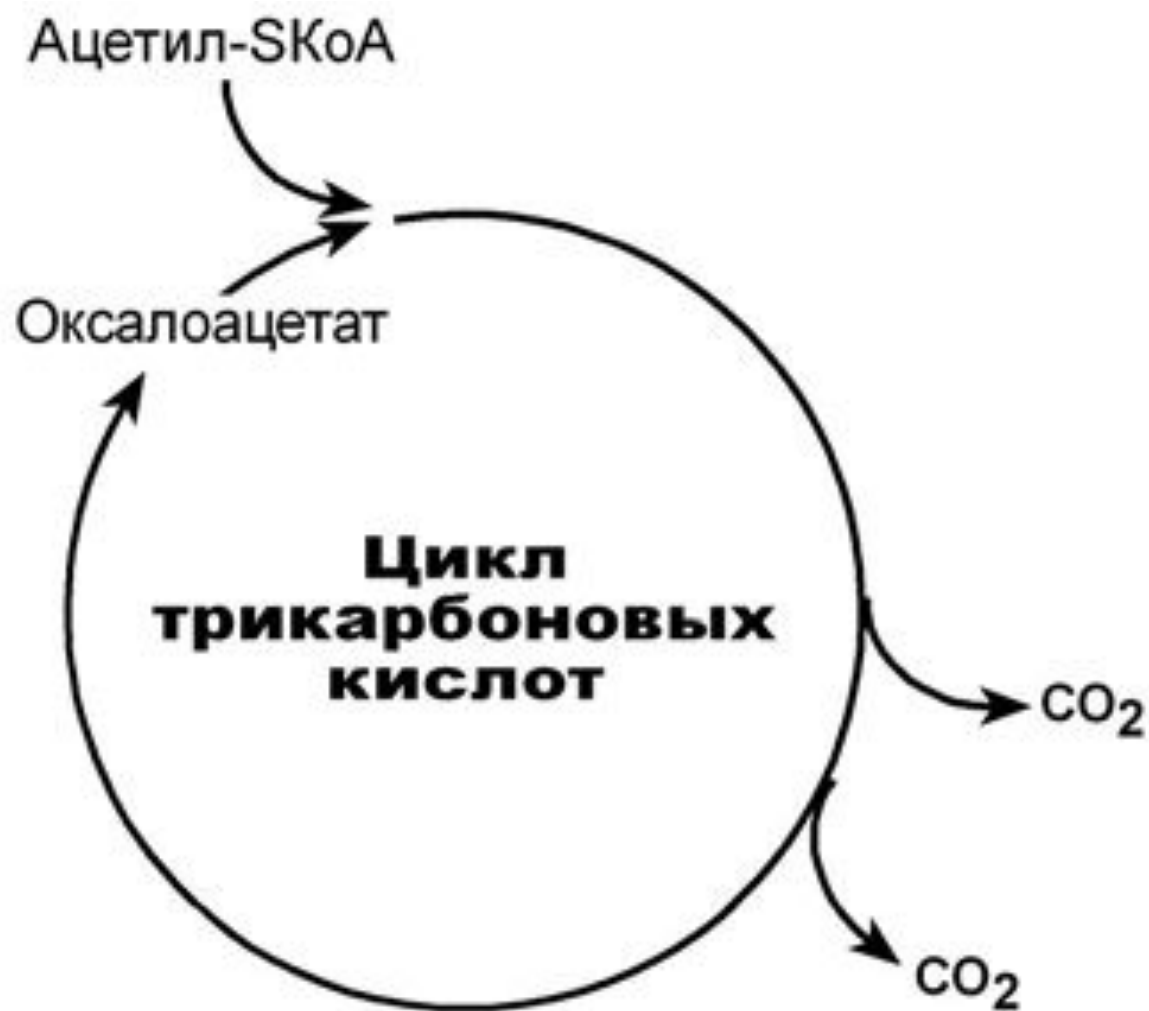
1. Компартаментализация.

Компартаментализация – это сосредоточение ферментов и их субстратов в одном компартменте (одной органелле) – в эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях, лизосомах. Например, β -окисление жирных кислот протекает в митохондриях, синтез белка – в рибосомах.

2. Доступность субстрата или кофермента.

Здесь работает **закон действия масс** – фундаментальный закон химической кинетики: при постоянной температуре скорость химической реакции пропорциональна произведению концентрации реагирующих веществ. Или упрощенно – скорость, с которой вещества реагируют друг с другом, зависит от их концентрации.

Таким образом, изменение количества хотя бы одного из субстратов прекращает или начинает реакцию. Для цикла трикарбоновых кислот таким субстратом является оксалоацетат (щавелевоуксусная кислота ЩУК).



Роль оксалоацетата в регуляции скорости ЦТК

3. Изменение количества фермента.

Изменение количества фермента может происходить в результате **увеличения или снижения его синтеза**. Изменение скорости синтеза фермента обычно зависит от количества определенных **гормонов или субстратов** реакции.

Например, **гормон кортизол** стимулирует синтез ферментов **глюконеогенеза**, что обеспечивает стабильность концентрации глюкозы в крови и устойчивость ЦНС к стрессу.

При беременности и после родов под воздействием лактотропного гормона в молочной железе активно идет синтез фермента **лактозосинтазы**.

Исчезновение пищеварительных ферментов при длительном голодании и их появление в восстановительный период (в результате изменения секреции кишечных гормонов).

Этанол стимулирует в печени синтез "своего" (обезвреживающего спирт) изофермента цитохрома P450.

4. Ограниченный (частичный) протеолиз проферментов.

Т.к. синтез некоторых ферментов осуществляется в виде более крупного предшественника (**трипсиноген, пепсиноген, прокарбоксипептидазы, факторы свертывания крови**), то при поступлении в нужное место этот фермент активируется через отщепление от него одного или нескольких пептидных фрагментов.

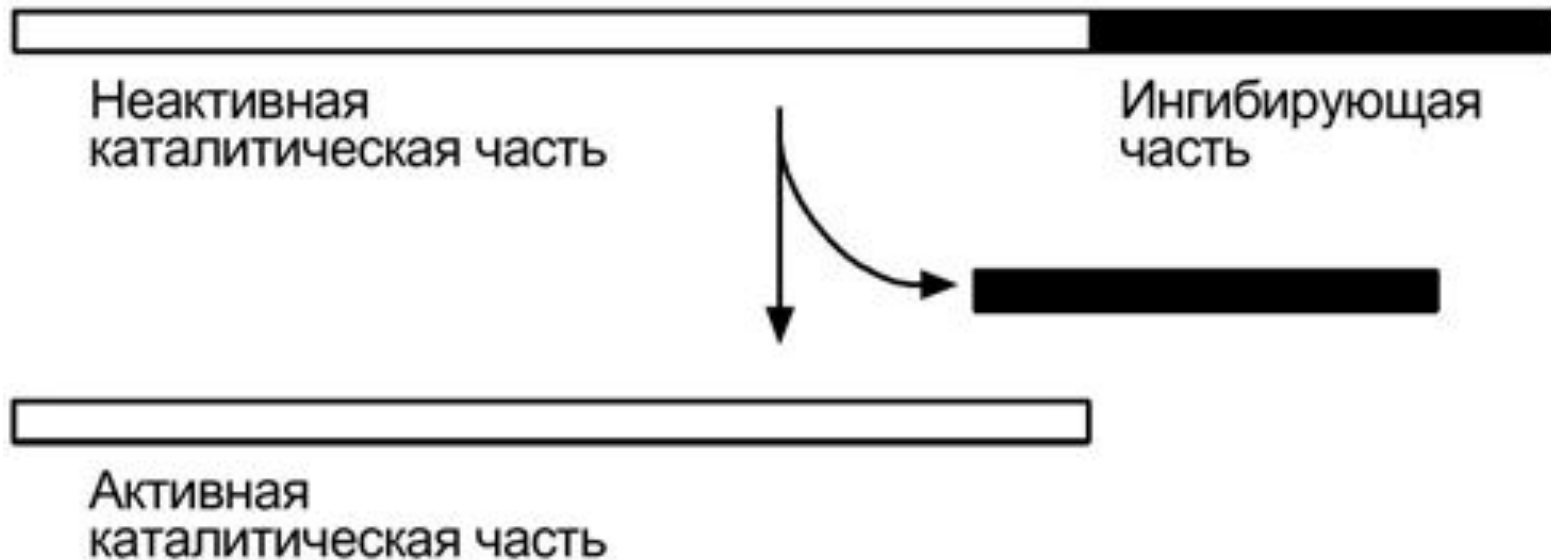


Схема активации фермента способом “ограниченного протеолиза”

Секреция ряда ферментов за пределы клетки в неактивном состоянии позволяет предохранить клетки от повреждения (пищеварительные ферменты) или сохранить белок до наступления определенного момента (протромбин, фибриноген, белки комплемента).

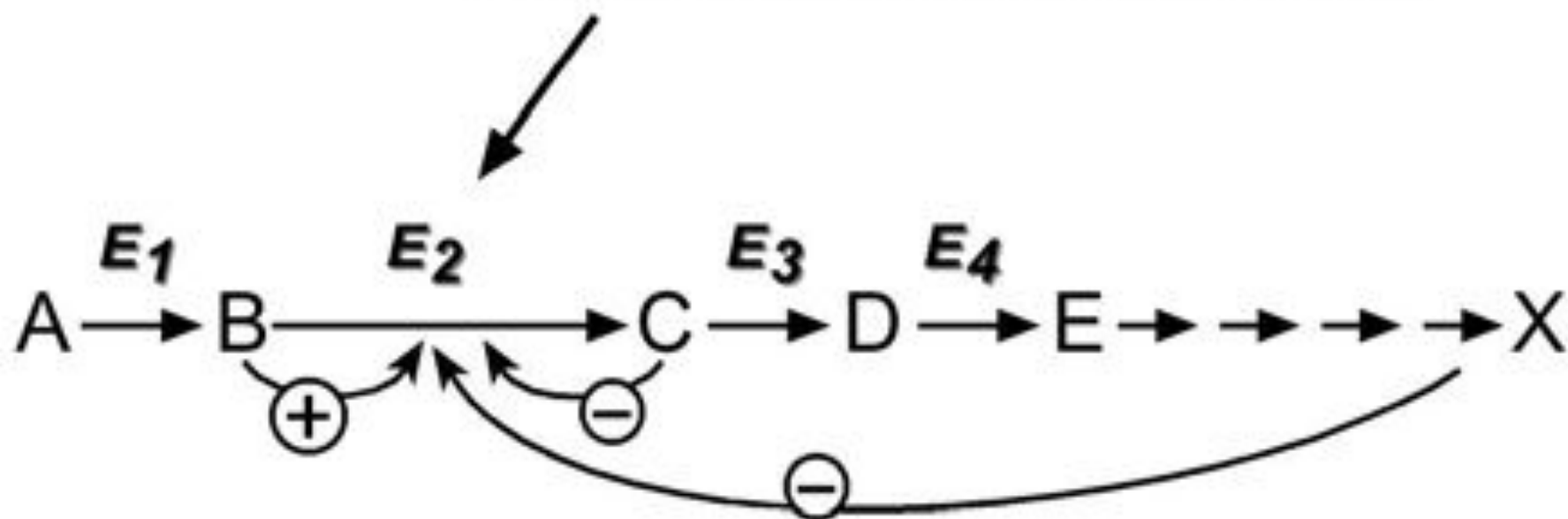
5. Аллостерическая регуляция.

Аллостерические ферменты построены из двух и более субъединиц: одни субъединицы содержат каталитический центр, другие являются регуляторными.

Присоединение эффектора к аллостерической (регуляторной) субъединице изменяет конформацию белка и активность каталитической субъединицы.

Аллостерические ферменты обычно стоят в начале метаболических путей, и от их активности зависит течение многих последующих реакций. Поэтому они часто называются **ключевыми ферментами.**

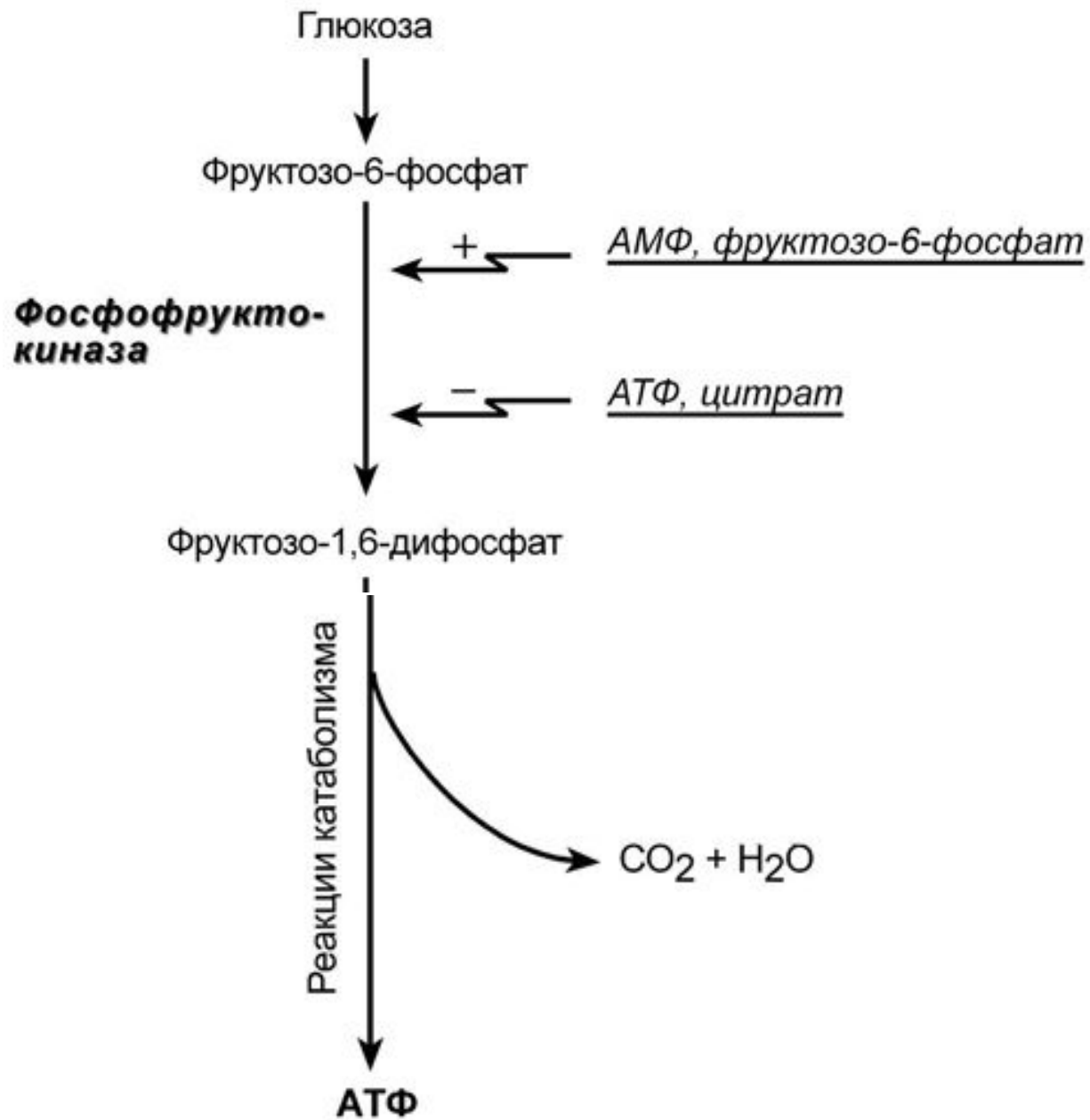
Аллостерический фермент



Общий принцип аллостерической регуляции

В качестве отрицательного регулятора может выступать конечный метаболит биохимического процесса, продукт данной реакции, т.е. работать механизм **обратной отрицательной связи**. Если регуляторами являются начальный метаболит или субстрат реакции, то говорят о прямой положительной регуляции. Также регулятором могут быть метаболиты взаимосвязанного пути.

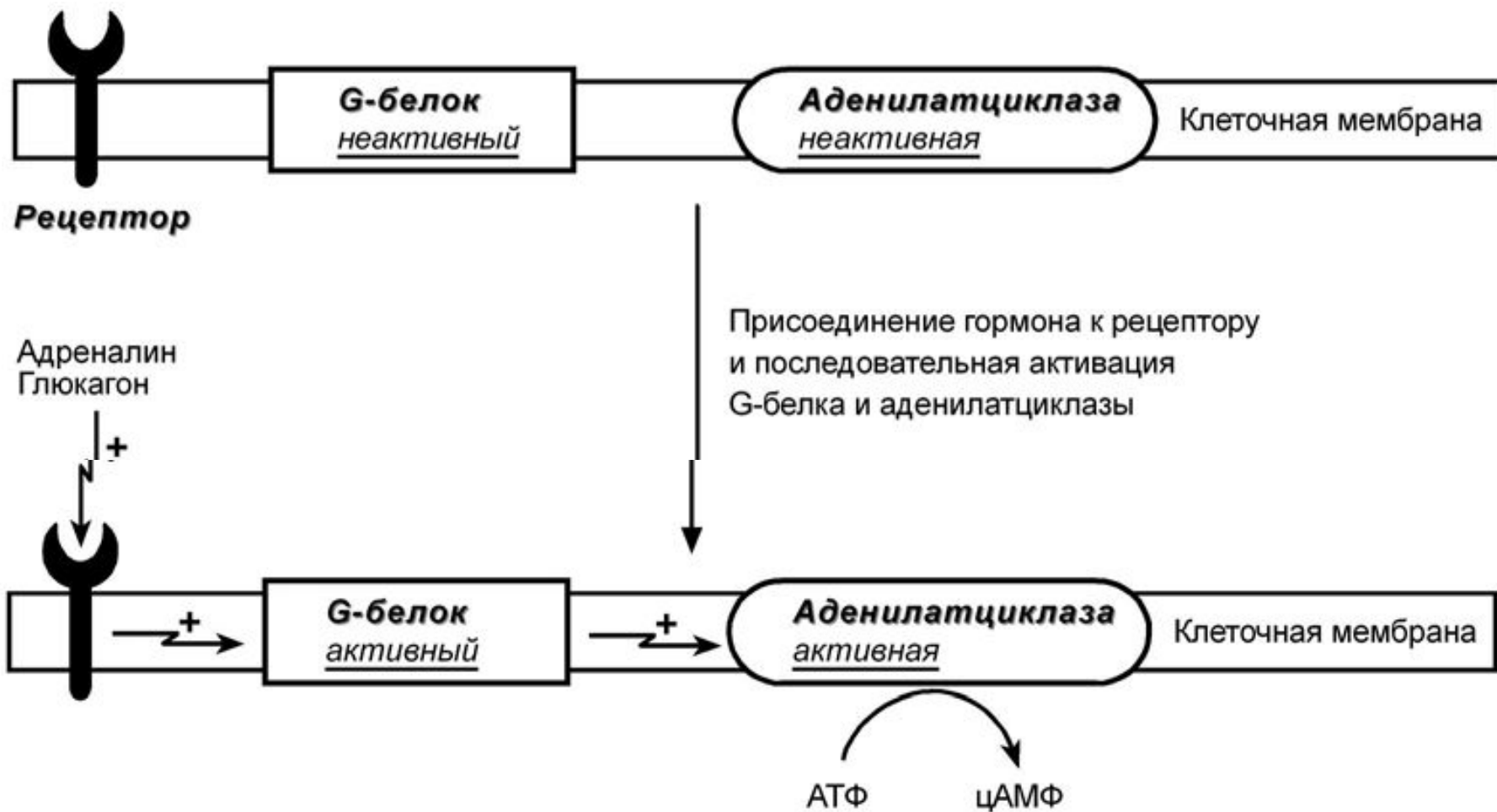
Фермент энергетического распада глюкозы, **фосфофруктокиназа**, регулируется промежуточными и конечными продуктами этого распада. При этом АТФ, лимонная кислота, фруктозо-1,6-дифосфат являются **ингибиторами**, а фруктозо-6- фосфат и АМФ – **активаторами фермента**.



Алlostерическая регуляция фосфофруктокиназы

6. Белок-белковое взаимодействие.

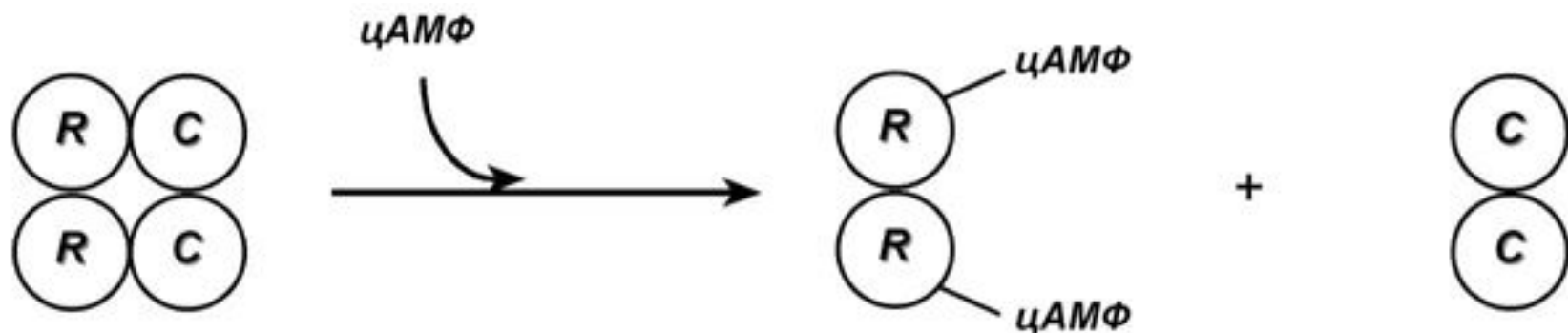
Термин белок-белковое взаимодействие обозначает ситуацию, **когда в качестве регулятора выступают не метаболиты биохимических процессов, а специфичные белки.** Влияние каких-либо факторов на эти белки изменяет их активность, и они, в свою очередь, воздействуют на нужный фермент.



Упрощенная схема активации аденилатциклазы

К примеру, мембранный фермент **аденилатциклаза** является чувствительным к воздействию мембранного **G-белка**, который сам активируется при действии на клетку некоторых гормонов (например, адреналина и глюкагона).

Другим примером белок-белкового взаимодействия может быть регуляция активности **протеинкиназы А**. **Протеинкиназа А** является тетрамерным ферментом, состоящим из 2 каталитических (С) и 2 регуляторных (R) субъединиц. **Активатором** для протеинкиназы А является **цАМФ**. Присоединение цАМФ к регуляторным субъединицам фермента вызывает их отхождение от каталитических субъединиц. Каталитические субъединицы при этом активируются.



Протеинкиназа А
неактивная

Протеинкиназа А
активная

Аллостерическая активация протеинкиназы А при помощи цАМФ

7. Ковалентная (химическая) модификация.

Ковалентная модификация заключается в обратимом присоединении или отщеплении определенной группы, благодаря чему изменяется активность фермента. Чаще всего такой группой является **фосфорная кислота, реже метильные и ацетильные группы.**

Фосфорилирование фермента происходит по остаткам серина, треонина, тирозина. Присоединение фосфорной кислоты к белку осуществляют ферменты **протеинкиназы, отщепление – протеин-фосфатазы.**

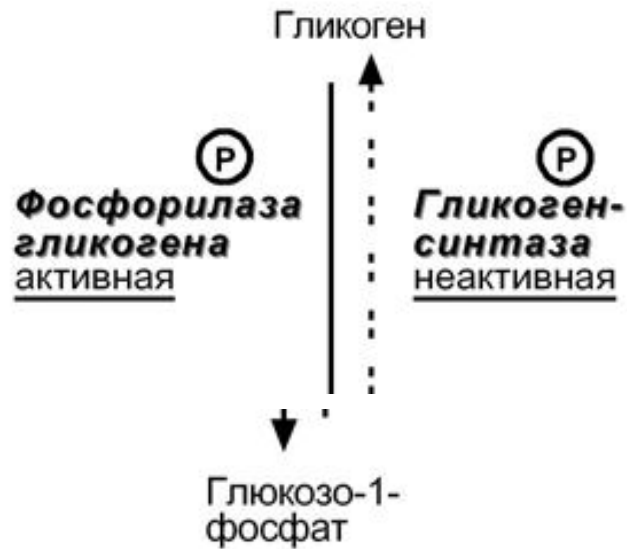


Изменение активности фермента
путем фосфорилирования-дефосфорилирования

Ферменты могут быть активны как в фосфорилированном, так и в дефосфорилированном состоянии.

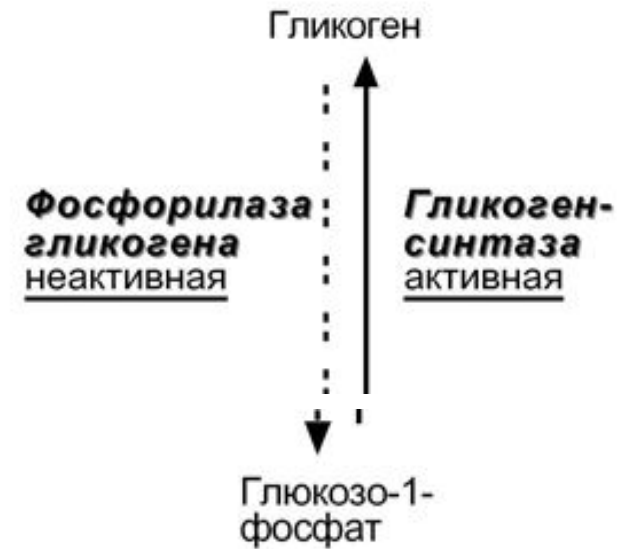
Например, ферменты **гликогенфосфоорилаза** и **гликогенсинтаза** при потребности организма в глюкозе фосфорилируются, при этом фосфоорилаза гликогена становится активной и начинает расщепление гликогена, а гликогенсинтаза неактивна. При необходимости синтеза гликогена оба фермента дефосфорилируются, **синтаза при этом становится активной, фосфоорилаза – неактивной.**

ФИЗИЧЕСКАЯ РАБОТА



При расщеплении гликогена
оба фермента фосфорилированы

ОТДЫХ



При синтезе гликогена оба
фермента дефосфорилированы

Зависимость активности ферментов обмена гликогена
от наличия в структуре фосфорной кислоты

ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

В медицине активно разрабатываются и используются соединения, изменяющие активность ферментов с целью регуляции скорости метаболических реакций и уменьшения синтеза определенных веществ в организме.

Подавление активности ферментов обычно называют ингибированием, однако это не всегда корректно.

Ингибитор – это вещество, вызывающее специфичное снижение активности фермента.

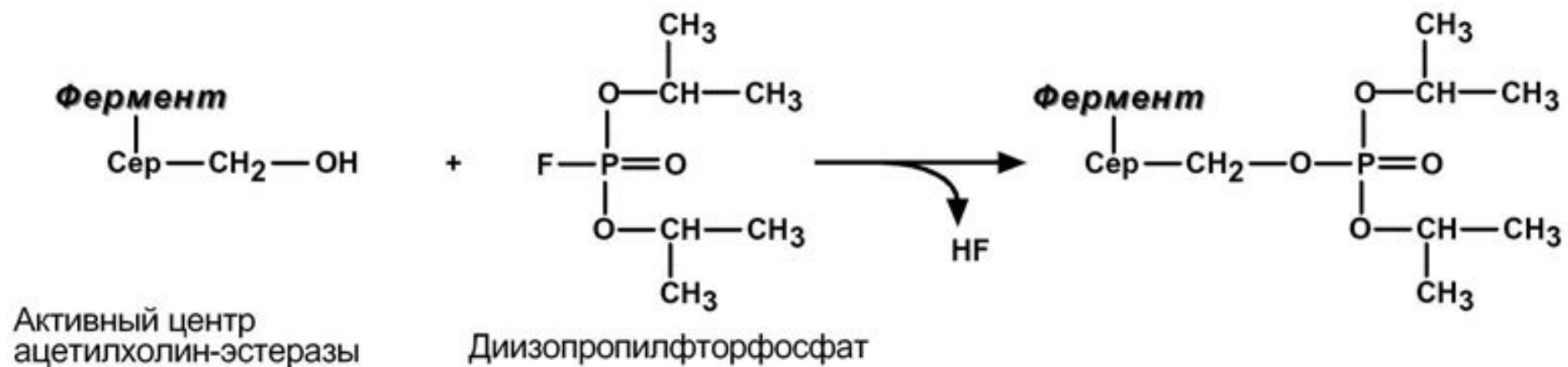
Таким образом, неорганические кислоты и тяжелые металлы ингибиторами не являются, а являются инактиваторами, т.к. снижают активность **любых ферментов, т.е. неспецифично.**

1. По прочности связывания фермента с ингибитором ингибирование бывает **обратимым и необратимым.**
2. По отношению ингибитора к активному центру фермента ингибирование делят на **конкурентное и неконкурентное.**

НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

При необратимом ингибировании происходит **связывание или разрушение функциональных групп фермента, необходимых для проявления его активности.**

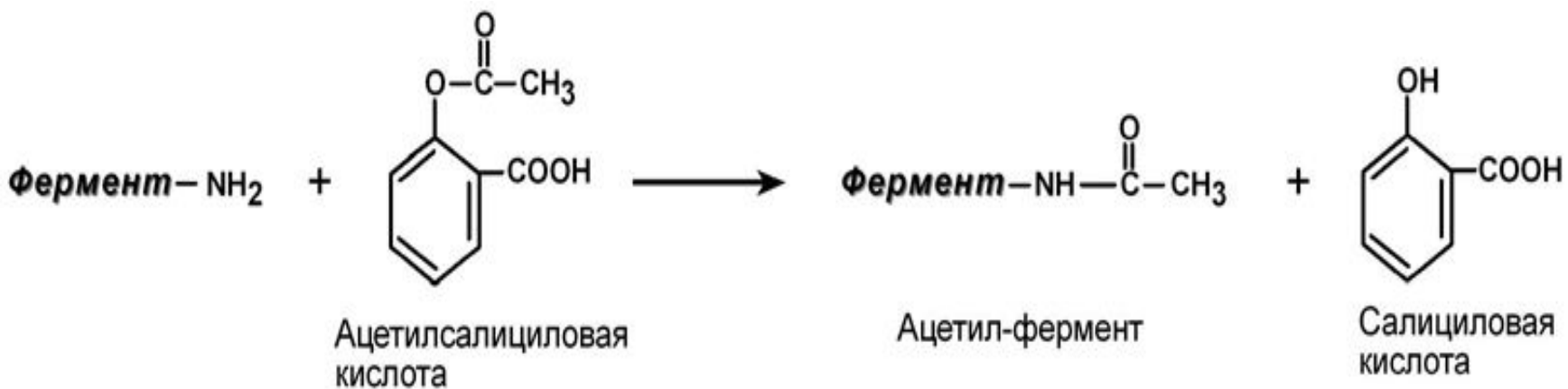
Например, вещество диизопропилфторфосфат прочно и необратимо связывается с гидроксигруппой серина в активном центре ацетилхолинэстеразы, гидролизующей ацетилхолин в нервных синапсах. Ингибирование этого фермента предотвращает распад ацетилхолина в синаптической щели, в результате чего отсутствует дальнейшая передача сигнала по нерву.



Механизм необратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы

Еще один пример связан с ингибированием ацетилсалициловой кислотой (аспирином) ключевого фермента синтеза простагландинов – циклооксигеназы.

Эта кислота входит в состав противовоспалительных средств и используется при воспалительных заболеваниях и лихорадочных состояниях. Присоединение ацетильной группы к аминогруппе в активном центре фермента вызывает инактивацию последнего и прекращение синтеза простагландинов.



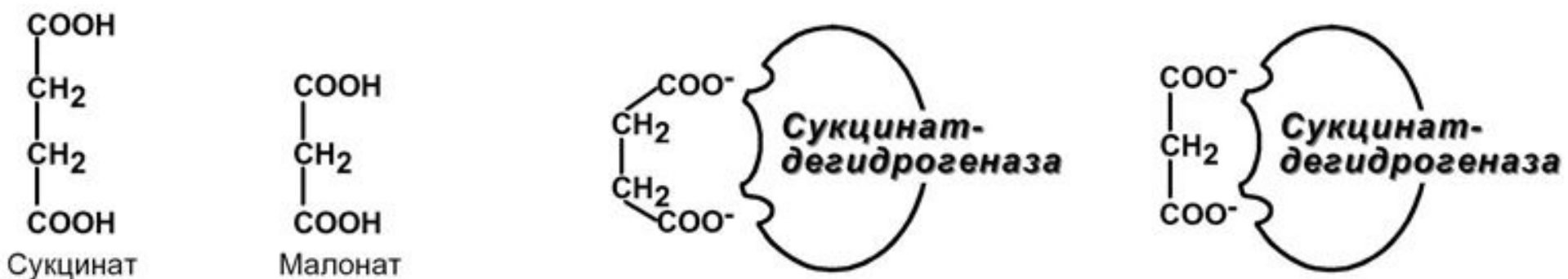
Механизм необратимого ингибирования циклооксигеназы

К О Н К У Р Е Н Т Н О Е И Н Г И Б И Р О В А Н И Е

При таком виде ингибирования ингибитор по своей структуре похож на субстрат фермента. Поэтому он соперничает с субстратом за активный центр, что приводит к уменьшению связывания субстрата с ферментом и нарушению катализа. В этом состоит особенность конкурентного ингибирования – возможность усилить или ослабить ингибирование через изменение концентрации субстрата.

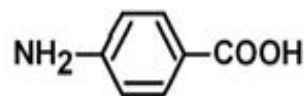
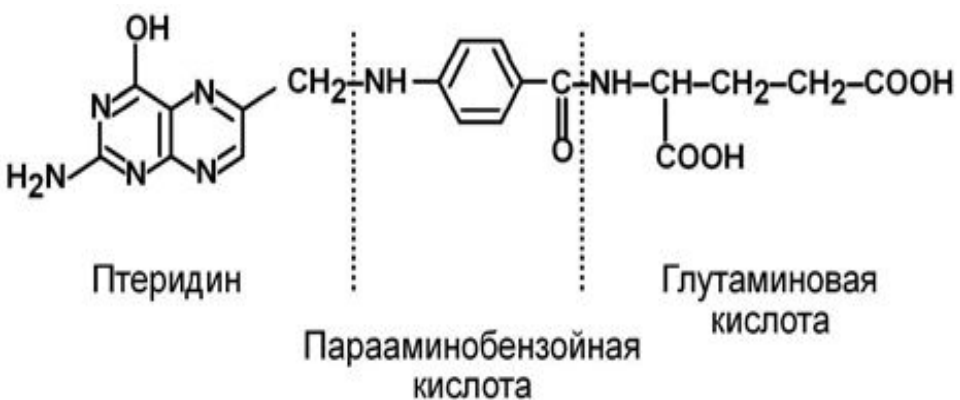
Например:

1. Конкурентное взаимодействие этанола и метанола за **активный центр алкогольдегидрогеназы.**
2. Ингибирование **сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой**, структура которой схожа со структурой субстрата этого фермента – янтарной кислоты (сукцината).

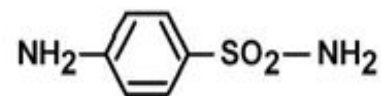


Механизм конкурентного ингибирования сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой

3. Также к конкурентным ингибиторам относят антиметаболиты или псевдосубстраты, например, антибактериальные средства **сульфаниламиды, схожие по структуре с п-аминобензойной кислотой, компонентом фолиевой кислоты.** При лечении сульфаниламидами в бактериальной клетке конкурентно нарушается использование п-аминобензойной кислоты для синтеза дигидрофолиевой кислоты, что и вызывает лечебный эффект.



Парааминобензойная кислота



Сульфаниламид

Сходство строения сульфаниламида и *p*-аминобензойной кислоты, входящей в состав фолиевой кислоты

НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

Данный вид ингибирования связан с присоединением ингибитора не в активном центре, а в другом месте молекулы. Это может быть аллостерическое ингибирование, когда активность фермента снижается естественными модуляторами (см выше), или связывание с ферментом каких-либо токсинов. Например, **синильная кислота (цианиды)** связывается с гемовым железом ферментов дыхательной цепи и блокирует клеточное дыхание.

ЭНЗИМОПАТОЛОГИИ

Энзимопатологии (энзимопатии) – состояния, связанные с патологическим изменением активности ферментов. Наиболее часто встречается снижение активности и нарушение каких-либо метаболических процессов. В результате энзимопатологии клиническое значение может иметь накопление субстрата реакции (как при фенилкетонурии) или недостаток продукта (при альбинизме) или обе особенности одновременно (гликогенозы). По характеру нарушения выделяют первичные и вторичные энзимопатии.

Первичные (наследственные) энзимопатии связаны с генетическим дефектом и наследственным снижением активности. Например, фенилкетонурия связана с дефектом фенилаланин-4-монооксигеназы, которая превращает фенилаланин в тирозин. В результате накапливаются аномальные метаболиты фенилаланина, оказывающие сильный токсический эффект .

Заболевание подагра связано с дефектом ферментов метаболизма пуриновых оснований и накоплением мочевой кислоты. Кроме указанных, распространенными первичными энзимопатиями являются галактоземия, недостаточность лактазы и сахаразы, гликогенозы, наследственные

гипереммониемия, различные липидозы

Вторичные (приобретенные) энзимопатии возникают как следствие заболеваний органов, вирусных инфекций и т.п., что приводит к нарушению синтеза фермента или условий его работы, например, гипераммониемия при заболеваниях печени, при которых ухудшается синтез мочевины и в крови накапливается аммиак. Другим примером может служить недостаточность ферментов желудочно-кишечного тракта при заболеваниях желудка, поджелудочной железы или желчного пузыря.

Недостаток витаминов и их коферментных форм также является причиной приобретенных ферментопатий.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В МЕДИЦИНЕ

Использование ферментов в медицине происходит по трем направлениям:

- энзимодиагностика,**
- энзимотерапия,**
- использование ферментов в медицинских технологиях и промышленности.**

Также активно нашло применение использование ингибиторов ферментов.

Э Н З И М О Д И А Г Н О С Т И К А

Энзимодиагностика – это исследование активности ферментов плазмы крови, мочи, слюны с целью диагностики тех или иных заболеваний. Примером может служить фермент лактатдегидрогеназа, определение его активности в плазме крови необходимо при заболеваниях сердца, печени, скелетной мускулатуры. Увеличение активности α -амилазы в плазме крови и моче наблюдается при воспалительных процессах в поджелудочной и слюнных железах. Инфаркт миокарда сопровождается увеличением активности лактатдегидрогеназы, креатинкиназы, аспартатаминотрансферазы.

ЭНЗИМОТЕРАПИЯ

Энзимотерапия – это использование ферментов в качестве лекарственных средств.

Самыми распространенными ферментативными препаратами являются **комплексы ферментов желудочно-кишечного тракта** (Фестал, Панзинорм форте, Мезим форте, Энзистал и т.п.), используемые для заместительной терапии при нарушениях переваривания веществ в желудочно-кишечном тракте. Тканевой фермент **гиалуронидаза** используется организмом для обратимого изменения проницаемости межклеточного вещества. Лекарственную форму гиалуронидазы – **лидазу** – вводят для размягчения рубцов, появления подвижности в суставах, рассасывания гематом.

Цитохром с – фермент, участвующий в процессах тканевого дыхания. Его используют при асфиксии новорожденных, астматических состояниях, сердечной недостаточности, различных видах гепатита и т.п.

Рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза входят в состав глазных капель и используются при вирусных конъюнктивитах. При нанесении на рану они разжижают гной, при ингаляциях уменьшают вязкость слизи, деполимеризуя нуклеиновые кислоты в мокроте.

Трипсин используют при бронхолегочных заболеваниях для разжижения густой и вязкой мокроты.

Фицин используется в фармацевтической промышленности в качестве добавки к зубным пастам для удаления зубного налета.

Коллагеназу применяют для ускорения отторжения некротизированных тканей, для очистки трофических язв.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЯХ

- А. Специфичность ферментов к определенным субстратам широко используется в настоящее время в лабораторной диагностике.
- **многие лабораторные методы основаны на взаимодействии добавляемого извне фермента с определяемым соединением.** В результате возникает специфичный продукт реакции, после определения содержания последнего судят о концентрации искомого вещества (глюкозооксидазный, холестеролоксидазный методы),
 - **иммуоферментные методы, основанные на образовании тройного комплекса фермент-антиген-антитело.** Определяемое вещество не является субстратом фермента, но является антигеном. Фермент может присоединять этот антиген вблизи от активного центра. Если в среде есть антиген, то при добавлении антител и формировании тройного комплекса активность фермента изменяется. Активность фермента измеряют любым способом.

Б. В промышленности ферменты используются в различных отраслях:

ГЛЮКОЗООКСИДАЗА В СОЧЕТАНИИ С КАТАЛАЗОЙ применяется для удаления кислорода из сухого молока, кофе, пива, майонезов, лимонных, апельсиновых и виноградных соков, лекарственных препаратов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТОВ

Весьма широко используются в настоящее время **ингибиторы протеаз (контрикал, гордокс)** при панкреатитах – состояниях, когда происходит активирование пищеварительных ферментов в протоках и клетках поджелудочной железы. **Ингибиторы холинэстеразы (физостигмин, прозерин)** приводят к накоплению нейромедиатора ацетилхолина в синапсах и используются при миастении, двигательных и чувствительных нарушениях при невритах, радикулитах, психогенной импотенции.

Препараты, содержащие **ингибиторы моноаминоксидазы (наком, мадопар)**, используются при снижении выработки нейромедиаторов катехоламинов в ЦНС и для лечения паркинсонизма. Подавление активности моноаминоксидазы (разрушающей катехоламины) сохраняет нормальную передачу сигналов в нервной системе.

Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (каптоприл, эналаприл и т.п.) используются как антигипертензивное средство и вызывают расширение периферических сосудов, уменьшение нагрузки на миокард, снижение артериального давления.

Аллопуринол – ингибитор ксантиноксидазы, фермента катаболизма пуринов. Используется для снижения образования мочевой кислоты и подавления развития гиперурикемии и подагры.

Ингибиторы гидроксиметилглутарил-S-КоА-редуктазы (ловастатин, флувастатин, аторвастатин) применяются для снижения синтеза холестерина при атеросклерозе, заболеваниях сердечно-сосудистой системы, дислипотеинемиях.

Ингибитор карбоангидразы (ацетазоламид) используется как мочегонное средство при лечении глаукомы, отеков, эпилепсии, алкалозах и горной болезни.

К Л А С С И Ф И К А Ц И Я Ф Е Р М Е Н Т О В

В 1961 г в Москве V Международный биохимический союз принял современную классификацию ферментов. В соответствии с этой классификацией все ферменты делятся:

- на **классы** – по типу катализируемой реакции,
- каждый класс подразделяется на **подклассы** – по природе атакуемой химической группы,
- подклассы делятся на **подподклассы** – по характеру атакуемой связи или по природе акцептора.

Выделяют 6 классов ферментов:

I класс Оксидоредуктазы

II класс Трансферазы

III класс Гидролазы

IV класс Лиазы

V класс Изомеразы

VI класс Лигазы

Каждому ферменту присвоен четырехзначный классификационный номер, включающий класс, подкласс, подподкласс и порядковый номер в подподклассе.

Например, *алкогольдегидрогеназа имеет номер КФ 1.1.1.1. – это оксидоредуктаза, действует на ОН-группу донора с НАД в качестве акцептора с первым порядковым номером в своем подподклассе; лактатдегидрогеназа – КФ 1.1.1.27, действует на ОН-группу донора с НАД в качестве акцептора с порядковым номером 27 в своем подподклассе*


X.X.X.X.

Класс

Подкласс

Подподкласс

Порядковый
номер



НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

1. Тривиальное название – название, сложившееся исторически. Например, пепсин, трипсин. Для некоторых ферментов к названию субстрата добавляется **окончание "-аза"** – уреаза, амилаза, липаза.

2. Систематическое название – согласно современной классификации. Как производное систематического названия у многих ферментов имеется одно или несколько рабочих названий.

КЛАСС ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Ферменты катализируют окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Класс насчитывает 22 подкласса. Коферментами этого класса являются **НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, убихинон, глутатион, липоевая кислота.**

Примером подклассов могут служить ферменты, действующие на СН-ОН-группу доноров, на СН-СН-группу доноров, на СН-NH₂-группу доноров, на гемсодержащие доноры

Наиболее распространены следующие рабочие названия оксидоредуктаз:

- 1. Дегидрогеназы – оксидоредуктазы, катализирующие дегидрирование субстрата с использованием в качестве акцептора водорода любых молекул, кроме кислорода.**
- 2. Если перенос водорода от молекулы донора трудно доказуем, то такие оксидоредуктазы называют редуктазами.**
- 3. Оксидазы – оксидоредуктазы, катализирующие окисление субстратов с молекулярным кислородом в качестве акцептора электронов без включения кислорода в молекулу субстрата.**

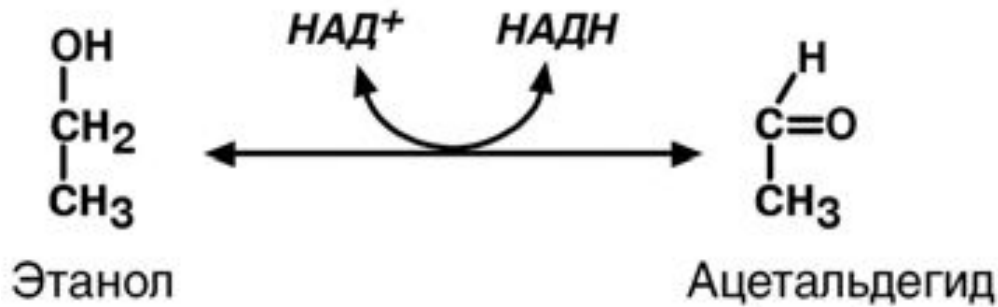
4. Монооксигеназы – оксидоредуктазы, катализирующие внедрение одного атома кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора кислорода.

5. Диоксигеназы – оксидоредуктазы, катализирующие внедрение 2 атомов кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора кислорода.

6. Пероксидазы – оксидоредуктазы, катализирующие реакции с пероксидом водорода в качестве акцептора электронов.

Систематическое название образуется:

Донор электронов : акцептор электронов – оксидоредуктаза.



Характеристика фермента

**Систематическое название Алкоголь:НАД-
оксидоредуктаза**

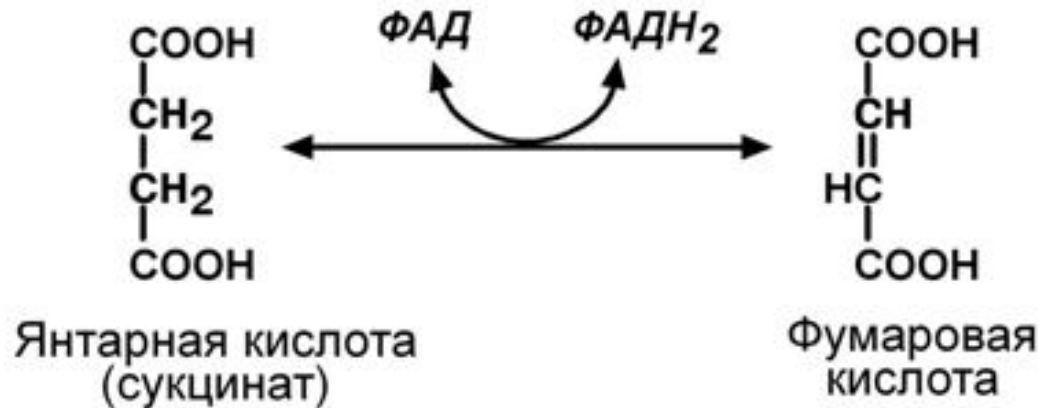
Рабочее название Алкогольдегидрогеназа

Класс 1. Оксидоредуктазы

Подкласс 1.1. Действующие на СН-ОН-группу доноров

Подподкласс 1.1.1. с НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора. Классификационный номер КФ 1.1.1.1.

Кофакторы Никотинамидадениндинуклеотид. Железо или цинк.



Характеристика фермента

Систематическое название Сукцинат:ФАД-оксидоредуктаза

Рабочее название Сукцинатдегидрогеназа

Класс 1. Оксидоредуктазы

Подкласс 1.3. Действующие на СН-СН-группу доноров

Подподкласс 1.3.99. с ФАД⁺ в качестве акцептора

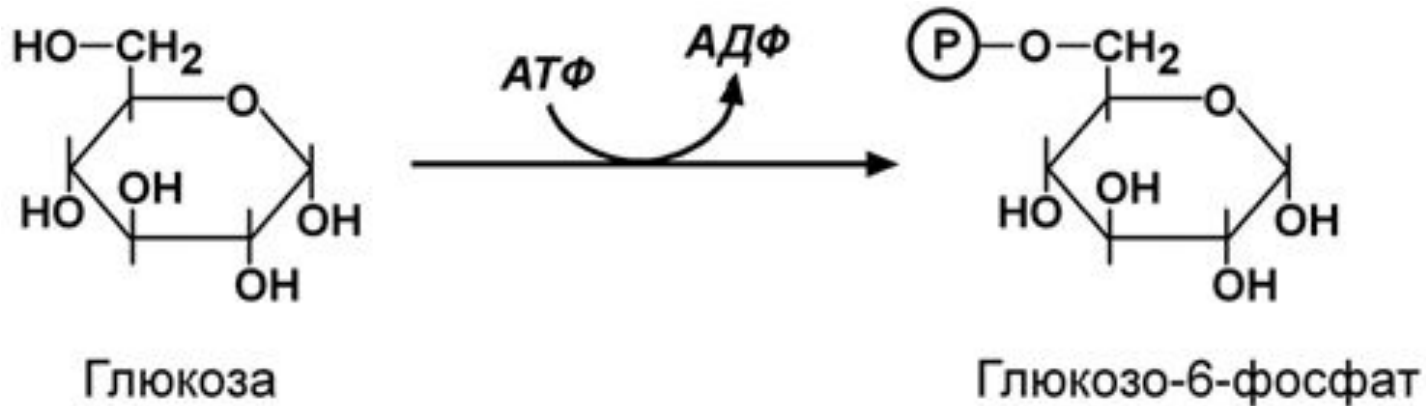
Классификационный номер КФ 1.3.99.1.

Кофактор Флавинадениндинуклеотид

II КЛАСС. ТРАНСФЕРАЗЫ

Катализируют реакции переноса различных групп от одного субстрата (донор) к другому (акцептор), участвуют в реакциях взаимопревращения различных веществ, обезвреживания природных и чужеродных соединений. Коферментами являются пиридоксальфосфат, коэнзим А, тетрагидрофолиевая кислота, метилкобаламин. Класс подразделяется на 9 подклассов в зависимости от строения переносимых ими групп. Примером подклассов являются ферменты, переносящие одноуглеродные фрагменты, альдегидные или кетоостатки, ацильные остатки, азотсодержащие группы, фосфорсодержащие группы.

Систематическое название образуется: Донор группы :
акцептор группы – переносимая группа трансфераза.



Характеристика фермента

Систематическое название АТФ:D-гексоза-6-фосфотрансфераза

Рабочее название Гексокиназа

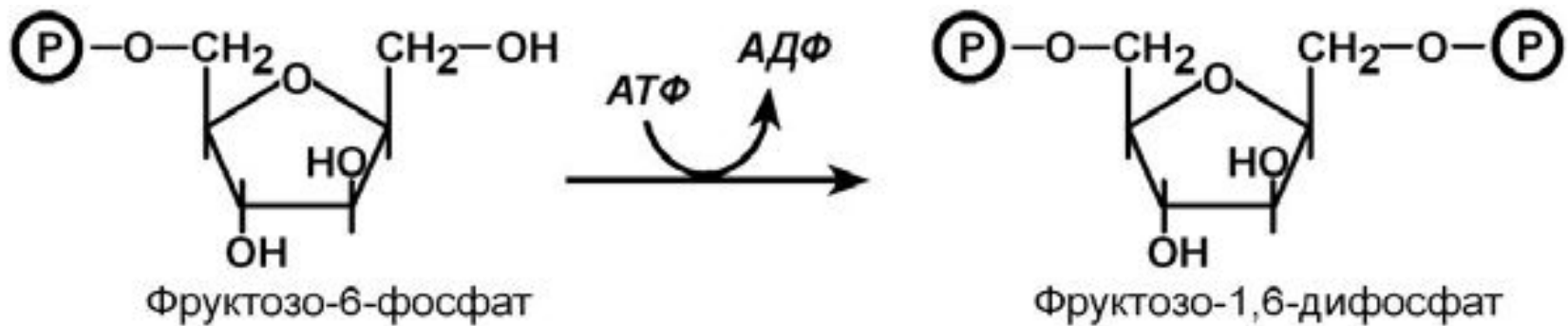
Класс 2. Трансферазы

Подкласс 2.7. Переносящие фосфорсодержащие группы

Подподкласс 2.7.1. Со спиртовой группой в качестве акцептора

Классификационный номер КФ 2.7.1.1.

Кофактор Магний



Характеристика фермента

Систематическое название АТФ:фруктозо-6-фосфат-фосфотрансфераза

Рабочее название Фосфофруктокиназа

Класс 2. Трансферазы

Подкласс 2.7. Переносящие фосфорсодержащие группы

Подподкласс 2.7.1. Со спиртовой группой в качестве акцептора

Классификационный номер КФ 2.7.1.11.

III К Л А С С . Г И Д Р О Л А З Ы

Гидролазы – ферменты, осуществляющие разрыв внутримолекулярных связей в субстрате (за исключением С-С связей) путем присоединения элементов H_2O , подразделяются на 13 подклассов. Ввиду сложности многих субстратов у ряда ферментов сохранены тривиальные названия, например, пепсин, трипсин. Коферменты отсутствуют.

Примером подклассов служат группы ферментов, действующие на сложные эфиры, на простые эфиры, на пептиды, на углерод-углеродные связи.

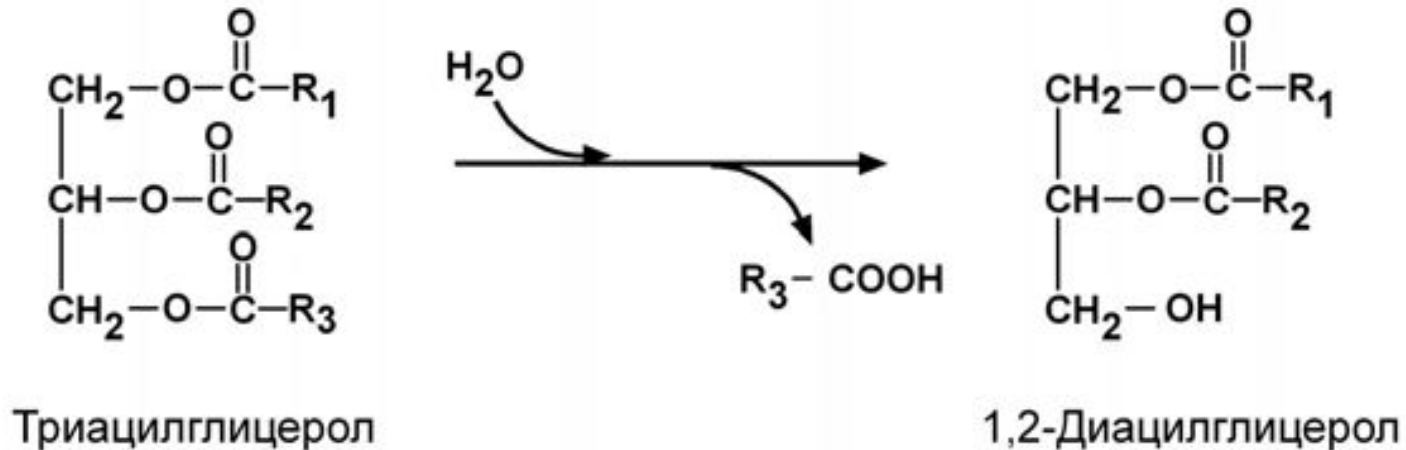
Гидролазы представлены ферментами желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин, липаза, амилаза и другие) и лизосомальными ферментами. Осуществляют распад макромолекул, образуя легко адсорбируемые мономеры.

Исторически названия гидролаз складывались из названия субстрата с окончанием "-аза" – коллагеназа, амилаза, липаза, ДНК-аза. Наиболее часто встречаются следующие рабочие названия гидролаз:

- 1. Эстеразы – гидролиз сложноэфирных связей.**
- 2. Липазы – гидролиз нейтральных жиров.**
- 3. Фосфатазы – гидролиз моноэфиров фосфорной кислоты.**
- 4. Гликозидазы – гидролизуют O- и S-гликозидные связи.**
- 5. Протеазы, пептидазы – гидролиз белков и пептидов.**
- 6. Нуклеазы – гидролиз нуклеиновых кислот.**

Систематическое название образуется:

Гидролизуемый субстрат : отделяемая группа гидролаза.



Характеристика фермента

Систематическое название Триацилглицерол:

ацилгидролаза

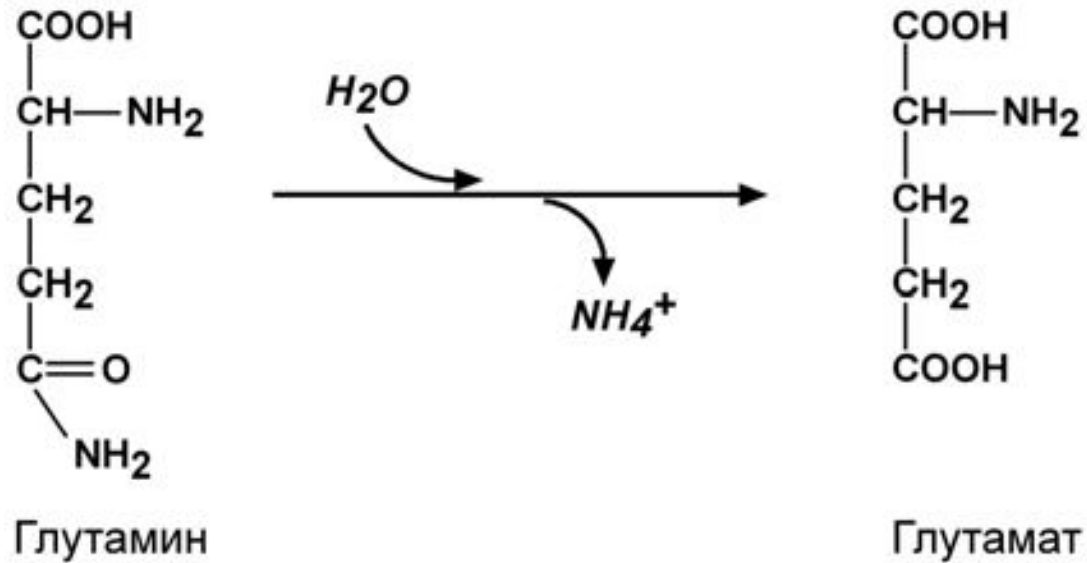
Рабочее название ТАГ-липаза

Класс 3. Гидролазы

Подкласс 3.1. Действующие на сложные эфиры

Подподкласс 3.1.1. Гидролазы карбоновых кислот

Классификационный номер КФ 3.1.1.3.



Характеристика фермента

Систематическое название L-глутамин:амидгидролаза

Рабочее название Глутаминаза

Класс 3. Гидролазы

Подкласс 3.5. Действующие на связи углерод-азот (не пептидные)

Подподкласс 3.5.1. Действующие в линейных амидах

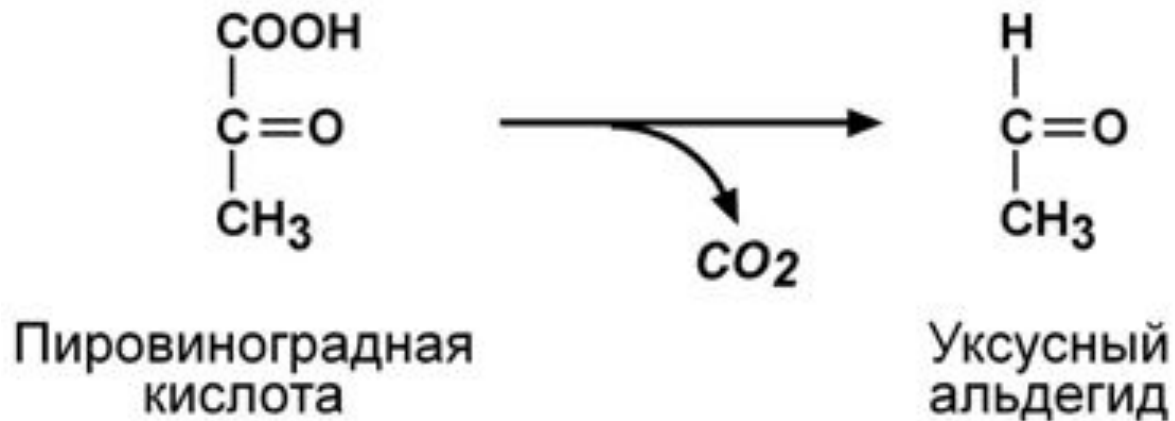
Классификационный номер КФ 3.5.1.2.

IV К Л А С С . Л И А З Ы

Лиазы – ферменты, катализирующие разрыв С-О, С-С, С-N и других связей, а также обратимые реакции отщепления различных групп негидролитическим путем. Выделяют 7 подклассов. Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту двойной связи. Лиазы являются сложными ферментами. Коферментами служат пиридоксальфосфат, тиаминдифосфат, участвует магний, кобальт. Примером подклассов являются ферменты, действующие на углерод-углеродные связи, углерод-кислородные связи, углерод-азотные связи.

Систематическое название образуется:

Расщепляемый субстрат : отделяемая группа – лиаза



Характеристика фермента

Систематическое название 2-оксокислота:карбокси-лиаза

Рабочее название Пируватдекарбоксилаза

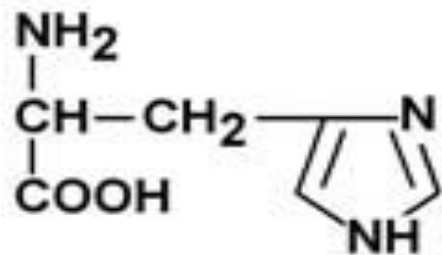
Класс 4. Лиазы

Подкласс 4.1. Углерод-углерод-лиазы

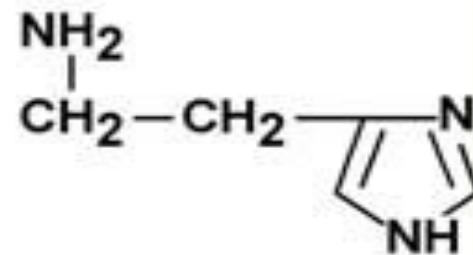
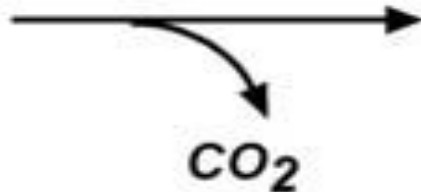
Подподкласс 4.1.1.Карбокси-лиазы

Классификационный номер КФ 4.1.1.1.

Кофермент Тиаминдифосфат



Гистидин



Гистамин

Характеристика фермента

Систематическое название Гистидин:карбокси-лиаза

Рабочее название Гистидин-декарбоксилаза

Класс 4. Лиазы

Подкласс 4.1. Углерод-кислород-лиазы

Подподкласс 4.1.1. Карбокси-лиазы

Классификационный номер КФ 4.1.1.22.

Кофермент Пиридоксальфосфат

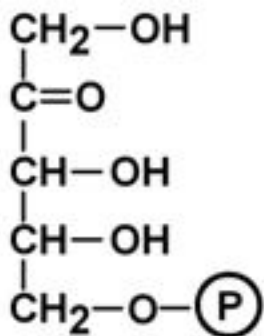
У К Л А С С . И З О М Е Р А З Ы

Изомеразы – ферменты, катализирующие изомерные превращения в пределах одной молекулы. Изомеразы – сложные ферменты. К их коферментам относятся пиридоксальфосфат, дезоксиаденозилкобаламин, глутатион, фосфаты моносахаридов (глюкозо-1,6-дифосфат) и др.

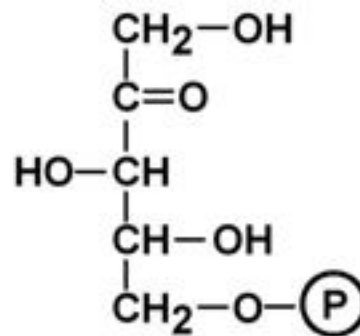
Выделяют 6 подклассов изомераз в зависимости от типа реакции. Например, в первый подкласс выделяют **рацемазы** (обратимое превращение L- и D-стереоизомеров) и **эпимеразы** (превращения D,L-изомеров, имеющих более одного центра асимметрии, например, α -D-глюкозу в β -D-глюкозу), в другие подклассы – цис-транс-изомеразы, внутримолекулярные трансферазы (**мутазы**), далее внутримолекулярные **оксидоредуктазы**.

Систематическое название образуется:

Субстрат – [] – реакция, где [] – обозначение, отражающее суть реакции, например, "номер изменяемого атома углерода", изменение "цис-транс", изменение "кето-енол", изменение "альдозо-кетозо".



Рибулозо-5-фосфат



Ксилулозо-5-фосфат

Характеристика фермента

Систематическое название D-рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза

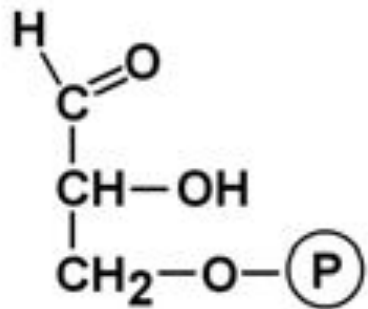
Рабочее название Рибулозофосфат-3-эпимераза

Класс 5. Изомеразы

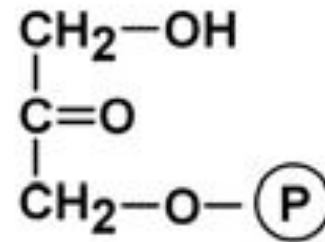
Подкласс 5.1. Рацемазы и эпимеразы

Подподкласс 5.1.3. Действующие на углеводы и их производные

Классификационный номер КФ 5.1.3.1.



Глицеральдегид-
фосфат



Дигидроксиацетон-
фосфат

Характеристика фермента

Систематическое название D-глицеральдегид-3-фосфат-альдозо-кетозо-изомеразы

Рабочее название Триозофосфат-изомеразы

Класс 5. Изомеразы

Подкласс 5.3. Внутримолекулярные оксидоредуктазы

Подподкласс 5.3.1. Катализирующие
взаимопревращения альдоз и кетоз

Классификационный номер КФ 5.3.1.1.

VI К Л А С С . Л И Г А З Ы

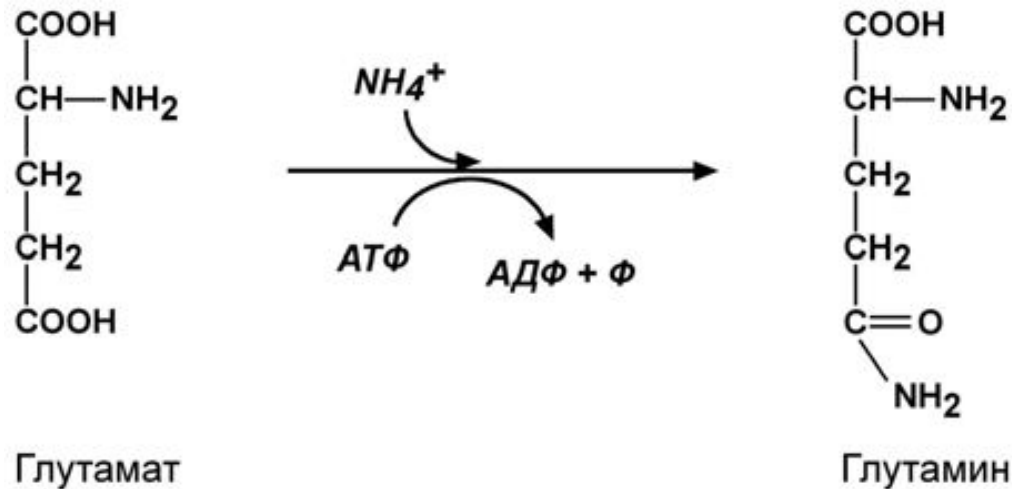
Лигазаы (синтетазаы) – ферменты, катализируюшие присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии высокоэнергетических связей АТФ (или других макроэргов).

Лигазаы – сложные ферменты. Они содержат нуклеотидные (УТФ), биотиновые (витамин Н), фолиевые коферменты. Выделяют 6 подклассов.

Примером подклассов служат группы ферментов по виду образуемой связи: углерод-кислород, углерод-сера, углерод-азот, углерод-углерод.

Систематическое название образуется:

Субстрат 1 : субстрат 2 – лигаза



Характеристика фермента

Систематическое название L-глутамат:аммиак-лигаза

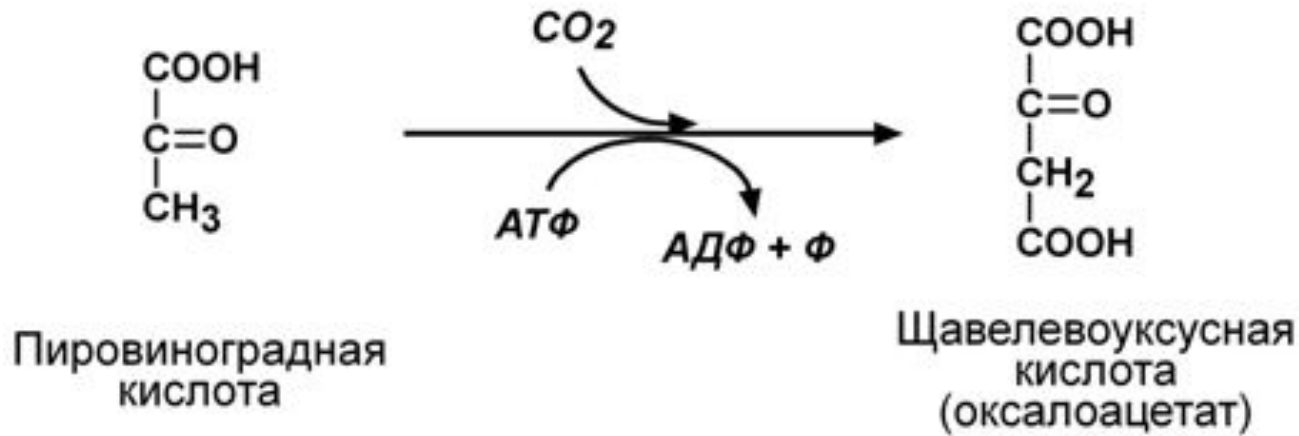
Рабочее название Глутаминсинтетаза

Класс 6. Лигаза

Подкласс 6.3. Образующие связи углерод-азот

Подподкласс 6.3.1. Амид-синтетазы

Классификационный номер КФ 6.3.1.2.



Характеристика фермента

Систематическое название Пируват:карбокси-лигаза (АДФ-образующая)

Рабочее название Пируваткарбоксилаза

Класс 6. Лигазы

Подкласс 6.4. Образующие связи углерод-углерод

Подподкласс 6.4.1. Образующие связи углерод-углерод

Классификационный номер КФ 6.4.1.1.

Кофакторы Биотин. Магний. Цинк.

