

Ферменты. ИСТОРИЯ

- **Ван Гельмонт**, 17 век. Изучение спиртового брожения. (fermentum – брожение(лат))
- **Реомюр, Спалланцани** – изучение химического процесса растворения мяса в желудке хищных птиц.
- **Шванн**, 1836 г. – обнаружение пепсина в желудочном соке
- **Кирхгофф**, 1836 г.-в присутствии солода обнаружил превращение крахмала в сахар
- **Пайен, Персо**, 1837г. – выделяют фермент из солода .
- **Берцеллиус**, 1837 г.- сравнивает ферменты с неорганическими катализаторами

Ферменты. История.

- **Манассеина** в споре с **Бюхнером** доказывает, что ферменты могут работать как в клетке, так и вне ее
- **Фишер, 1894 г.** - первая гипотеза о специфичности действия ферментов («ключ – замок»)
- **Павлов** ферменты могут быть в активном и неактивном состоянии (энзимогены)
- **Михаэлис, Ментен, 1913 г.** – кинетика ферментативного катализа
- **Самнер, 1926 г.** – выделение уреазы в кристаллическом виде и изучение ее белковой природы
- **Виланд и др. 1957 г.** – вводят понятие изоферментов
- **Филипс, 1960 г.** – расшифрована трехмерная структура лизоцима (рентгеноструктурный анализ)

Ферменты

- Практически **все реакции в клетке идут при участии ферментов.**
- Ферменты – **катализаторы белковой природы.**
- Ферменты – **простые или сложные** белки (содержат простетическую группу, неорганической или органической природы).
- **Простые:** пепсин, трипсин, фосфатазы, РНК-аза, уреаза, лизоцим
- **Сложные:** фосфотрансфераза (Mg, Mn), цитохромы (гем), аминотрансферазы (пиридоксальфосфат).
- **Простетические группы** могут играть роль **кофакторов (коферментов)** или выполнять другие функции.
- Чаще всего ферменты являются **олигомерными** белками (**четвертичной природы**).

Сходство и различие с неорганическими катализаторами

- **Ферменты –как и неорганические катализаторы** : выходят из реакции в неизмененном виде, катализируют только энергетически-возможные реакции, количество их мало по сравнению с субстратами и продуктами.
- **Ферменты –как белковые катализаторы**: имеют высокую молярную массу, подвергаются денатурации, работают в физиологических условиях, обладают высокой каталитической активностью, специфичностью, являются регулируемыми, зависят от условий среды.

Субстратная специфичность ферментов

- **Абсолютная** (фермент катализирует реакцию только с одним субстратом): аргиназа, уреаза, ДНК-полимераза, аденилатциклаза
- **Относительная или групповая** (катализируют реакцию с группой субстратов, с одним типом связи: протеиназы, фосфатазы, липазы. (однако и у них есть определенная **сайт-специфичность**))
- **Стереоспецифичность** – фермент «узнает» стереоизомеры субстратов (L- и D-аминокислоты, α – и β -сахара).



Ферменты

- **Конститутивные** (синтезируются постоянно): ферменты гликолиза, окисления жирных кислот ит.д.
- **Адаптивные**, индуцибельные (синтезируются в определенных ситуациях, способствуют адаптации метаболизма клетки к условиям среды): аминотрансферазы, ферменты глюконеогенеза, микросомальные оксидазы и трансферазы.

Организация и структурированность ферментов

- **Ферменты экскретируемые** (работают во внешней среде, вне клеток): гидролазы пищеварительного тракта
- **Ферменты секретируемые** (работают вне клеток, во внутренней среде организма - в крови, например): липопротеинлипаза, церулоплазмин, антитрипсин.
- **Ферменты клеточного метаболизма** (органоспецифичные): гексокиназа, фосфорилаза, гликогенсинтетаза, аминотрансферазы и т.д.

Ферменты клеточного метаболизма

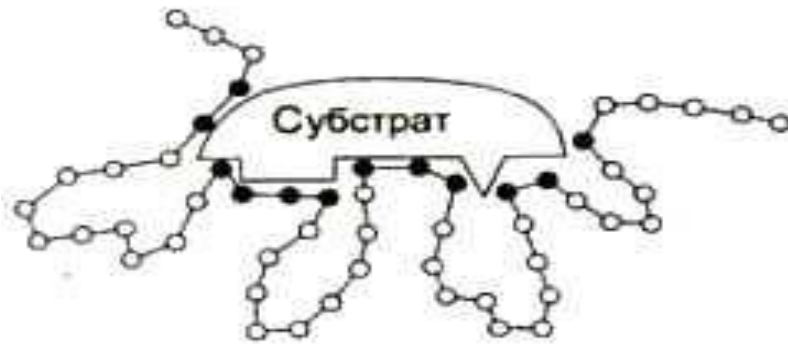
- **Растворимые** (в цитозоле, матриксе лизосом, митохондриях): фосфофруктокиназа, кислая фосфатаза, малатдегидрогеназа)
- **«Структурированные»**, ассоциированные с мембранными структурами: нуклеотидаза, сукцинатдегидрогеназа, АТФ-синтаза, цитохромоксидаза
- **Образующие мультиферментные комплексы** (синтетаза жирных кислот, ПВК-дегидрогеназа).

СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

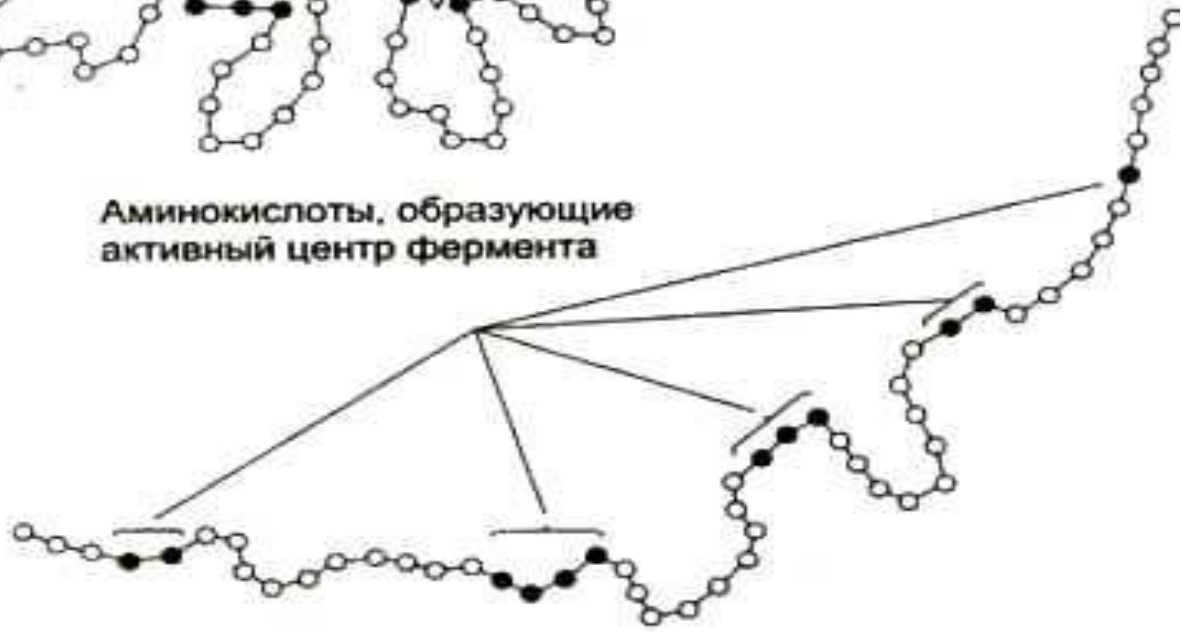
- **Активный центр** (субстратный + каталитический участки)
- Аллостерические ферменты имеют еще **регуляторный центр**
- Активный центр состоит из **каталитического** и **субстратного участков**.

СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

- **Каталитический центр** «отвечает» за **механизм катализа**, большие группы ферментов могут иметь одинаковое строение каталитического центра (**НАД-зависимые дегидрогеназы, сериновые протеиназы**).
- **Субстратный (якорный)** участок и вся пространственная конформация ферментного белка обуславливает **средство к субстрату**.



Аминокислоты, образующие активный центр фермента



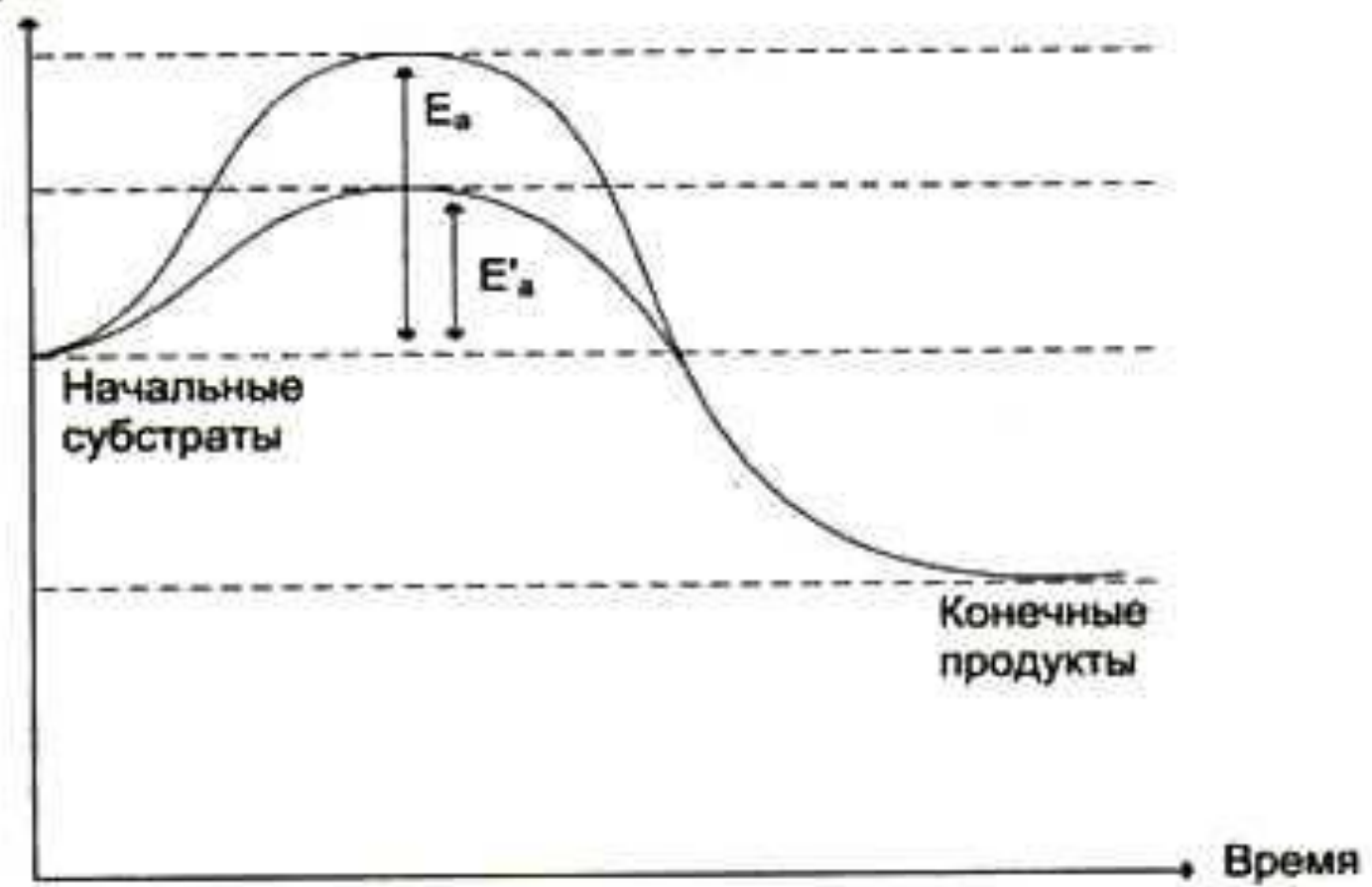
КАТАЛИТИЧЕСКИЙ УЧАСТОК ФЕРМЕНТОВ

- **Каталитический** центр простых ферментов состоит из **реакционноспособных аминокислот**: серин, треонин (ОН), аргинин (гуанидин), аспартат, глутамат (СООН), цистеин (SH). **В первичной структуре могут находиться на расстоянии друг от друга.**
- **Сложные ферменты** содержат небелковые включения: неорганические: **катионы Me**; органические: **гемовые группировки, производные витаминов.**

Как работают ферменты?

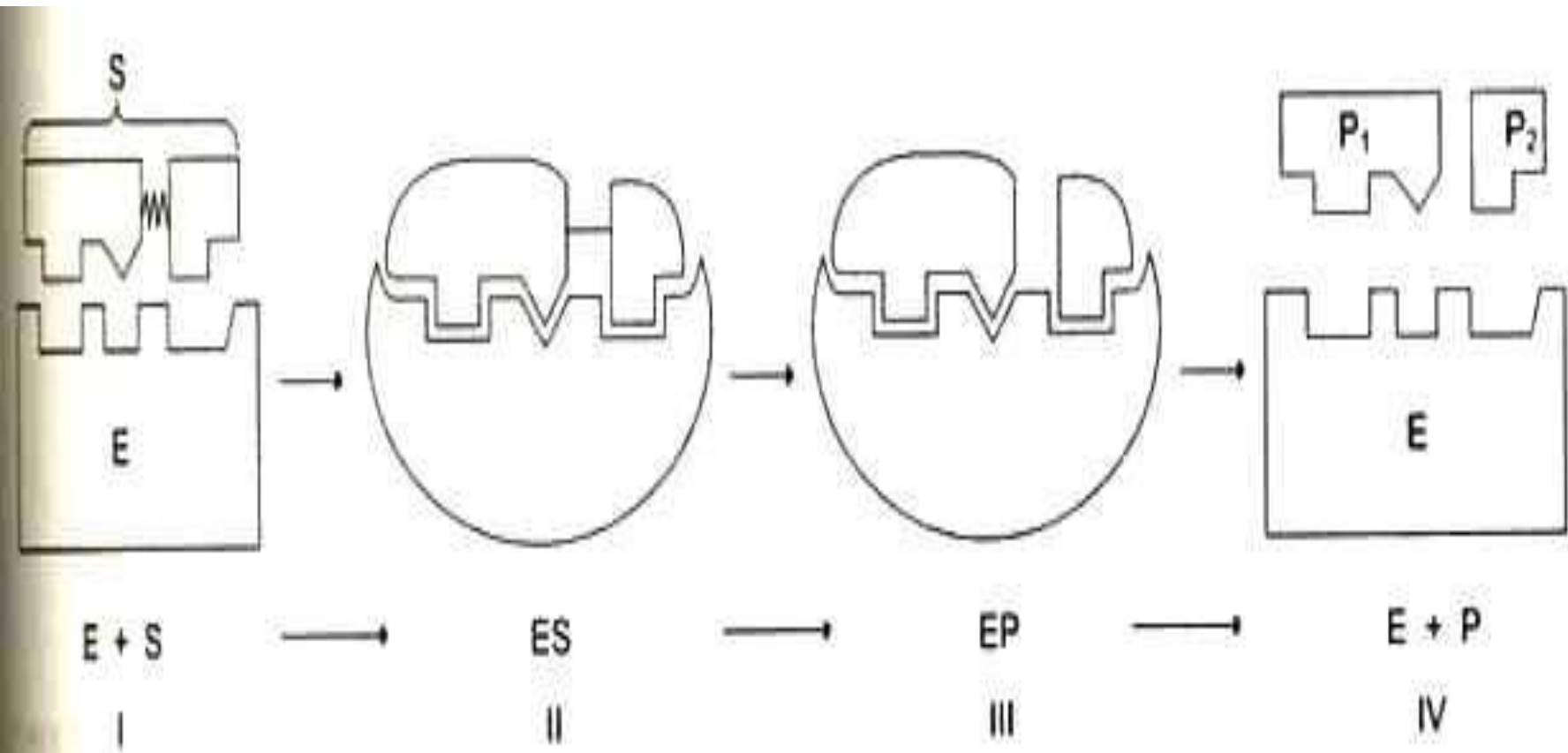
- **Снижают энергию активации** молекул субстрата. Скорость реакции пропорциональна количеству молекул, свободная энергия которых равна или больше энергии переходного состояния.
- **$S + E \rightleftharpoons SE \rightleftharpoons E^*S^* \rightleftharpoons E + P$**
- В момент образования **субстрат-ферментного** комплекса обе его части подвергаются изменению.

Свободная энергия



E_a - энергия активации некатализируемой реакции

E'_a - энергия активации катализируемой ферментами реакции



Механизмы катализа (гипотезы)

- **Э.Фишер, 1890г.** – гипотеза «шаблона», (ключ-замок). Объясняет только абсолютную специфичность ферментов.
- **Кошланд** – гипотеза **индуцированной подгонки** (соответствия). Субстрат индуцирует активную конформацию фермента.
- **Эйлер** - гипотеза «дыбы». Фермент, связывая субстрат, создает его «вынужденную», более реакционноспособную конформацию.
- **Адсорбционная (мультиплетная)** гипотеза. Фермент обеспечивает ориентировку в пространстве и во времени двух или более субстратов и каталитически активных групп.

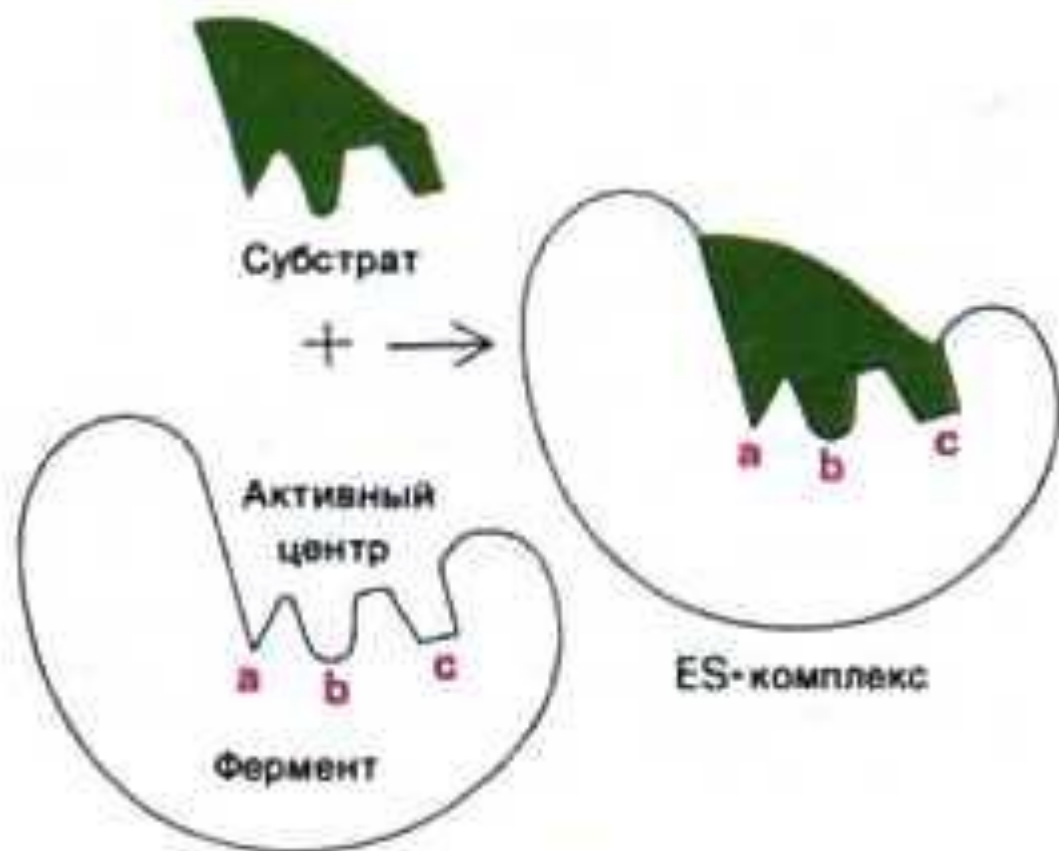


Рис. 6.10. Взаимодействие субстратов с ферментами согласно модели ключ-замок. Активный центр фермента сам по себе комплементарен по форме субстрату.

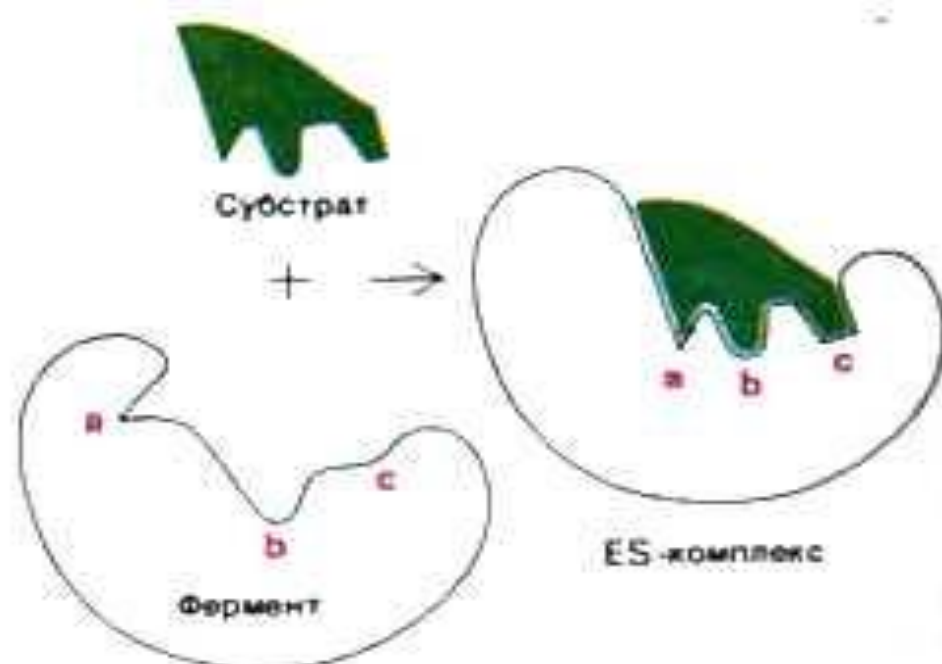


Рис. 6.11. Взаимодействие субстратов с ферментами согласно модели индуцированного соответствия. При связывании субстрата происходит изменение формы фермента. Активный центр фермента только после присоединения субстрата становится комплементарным ему по фор-

Химизм катализа

- **Кислотно-основной**: молекулы ферментов в активном центре содержат функциональные группы, служащие донорами или акцепторами протонов и электронов. (т.е. «кислотами» и «основаниями»)
- **Ковалентный**: в активном центре фермент связывает субстрат ковалентной связью, образуя нестабильный комплекс, быстрее вступающий в реакцию.

Законы ферментативной кинетики.

Первые попытки.

Первые попытки описания законов ферментативной кинетики были сделаны Брауном и Анри (период 1892-1903гг.). Эти работы не достигли цели. В тот период еще не была осознана принципиальная важность измерения начальной скорости ферментативной реакции, что позволяло пренебрегать скоростью обратной реакции, которая оказывает все больший вклад на более поздних стадиях реакции. Еще не был известен способ представления кислотности среды (pH), что не позволяло *in vitro* точно воспроизводить pH-оптимум. В итоге, уравнение, которое было предложено Анри, не позволяло удовлетворительно описать все эмпирически полученные данные.

Работа Л.Михаэлис и М.Ментен



Leonor Michaelis
1875-1949



Maud Leonora
Menten
1879-1960

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

- L.Michaelis, M.Menten, 1913г.



- $[E]$ мала и постоянна, ей пренебрегают, $[P]$ на первых этапах реакции мала и реакция идет в сторону образования продукта и пропорциональна $[S]$. Далее, при увеличении $[S]$, скорость реакции имеет бесконечно малое увеличение (плато на графике).
- **Фермент полностью «насыщен» субстратом** и скорость реакции пропорциональна $[ES]$ и определяется скоростью распада этого комплекса.



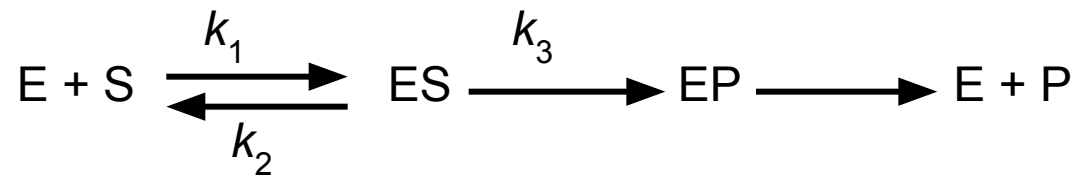
- 6.12. График зависимости скорости реакции V от концентрации субстрата $[S]$ для фермента подчиняющегося кинетике Михаэлиса – Ментен (V_{\max} – максимальная скорость, K_M – константа Михаэлиса).

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

- Л. Михаэлис и М. Ментен решают уравнение относительно $[ES]$, когда реакция находится в стационарном состоянии и скорости образования и распада ES равны.
- Уравнение Михаэлиса и Ментен отражает количественное соотношение начальной скорости V_0 , V_{max} и $[S]$.
- K_m – равна $[S]$, при которой $V = \frac{1}{2} V_{max}$
- K_m отражает сродство фермента к субстрату. Чем выше K_m , тем ниже сродство.

В 1913 году Л. Михаэлис и М. Ментен вывели уравнение кинетики ферментативной реакции (уравнение Михаэлис - Ментен)

Исходные положения теории Михаэлиса и Ментен:



Первая стадия ферментативной реакции (с константами k_1 и k_2) – равновесный процесс, следовательно:

V образования комплекса ES = V диссоциации комплекса ES

Константа диссоциации комплекса ES, $K_s = k_2 / k_1$

Стадия реакции ES \rightarrow EP (с константой k_3) определяет скорость процесса в целом.

Судьба комплекса ES принципиальна, поскольку V всего процесса будет пропорциональна [ES].

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

$$[ES] = \frac{[E][S]}{[S] + (k_3 + k_2) / k_1}$$

$$\frac{k_3 + k_2}{k_1} = K_m$$

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m}$$

$$V \text{ образования комплекса } ES = k_1[E][S]$$

$$V \text{ диссоциации комплекса } ES = k_2 + k_3 [ES]$$

$$k_1[E][S] = k_2 + k_3 [ES] \text{ отсюда:}$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3) / k_1}$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M \text{ - константа Михаэлиса, размерность } \text{моль}^* \text{ л}^{-1}$$

Уравнение Михаэлис – Ментен:

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

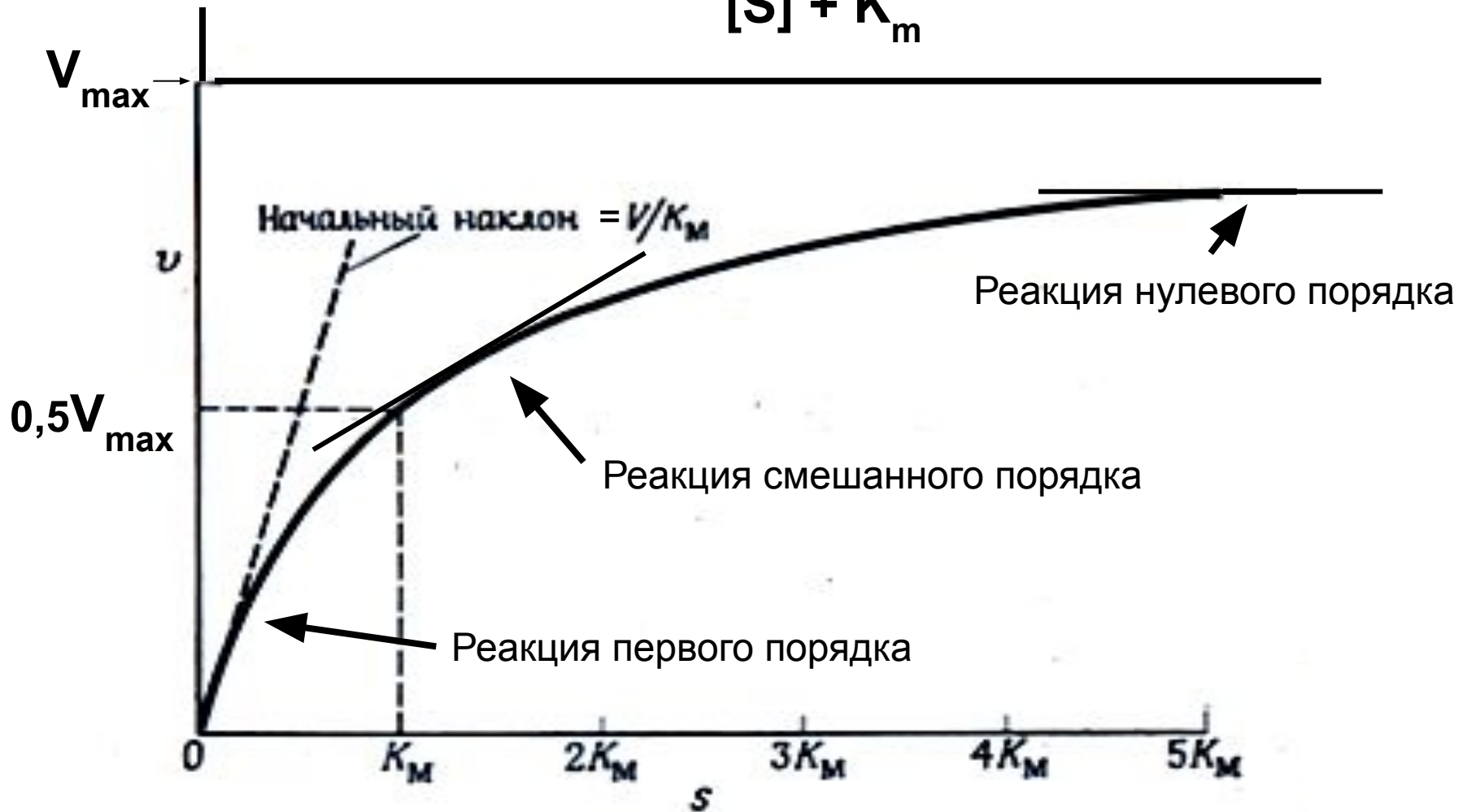
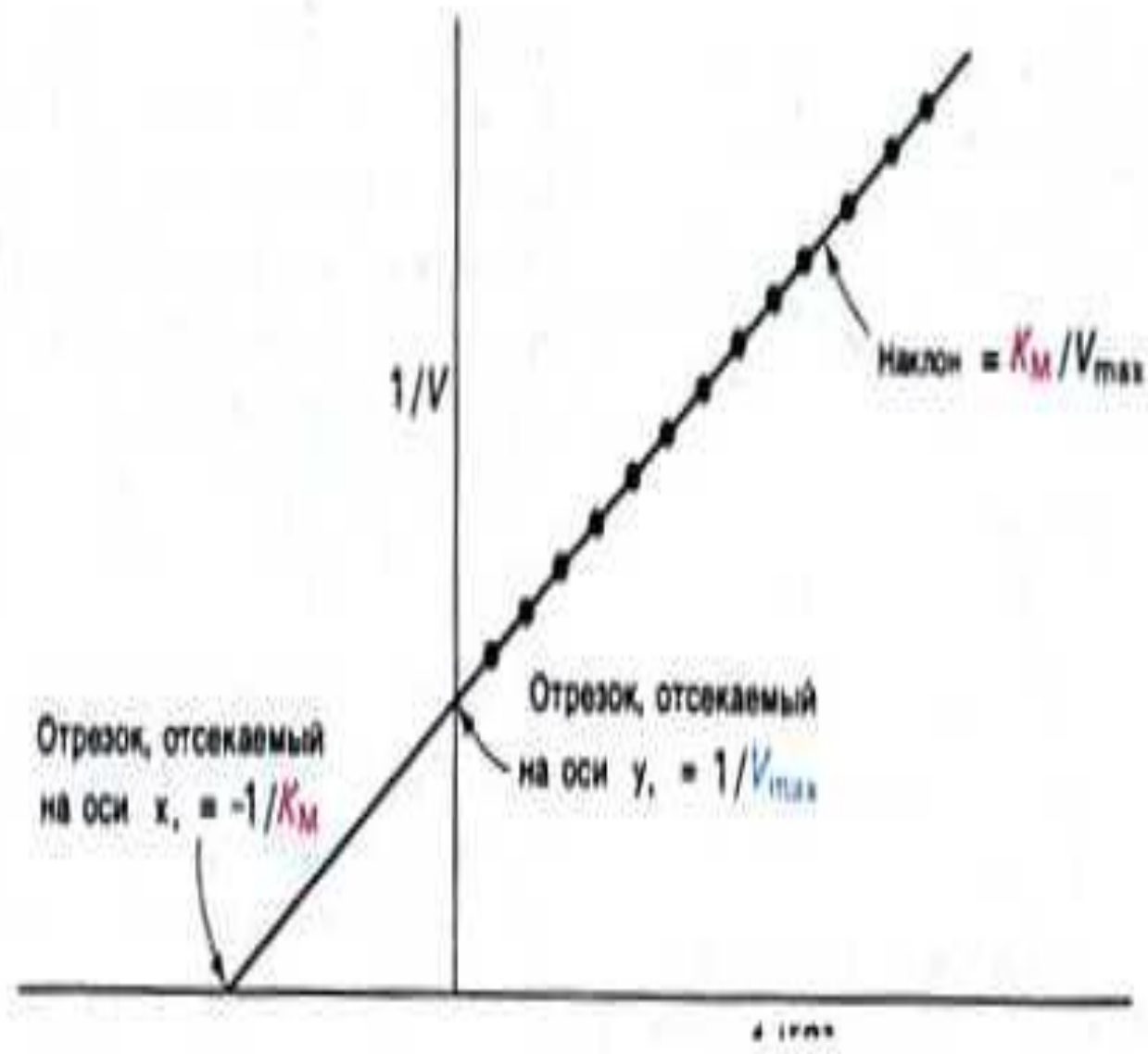


График Михаэлис – Ментен представляет собой **гиперболическую кривую**.

Практика показала, что *in vitro* даже при $[S] = 10K_m$, наблюдаемая скорость реакции составляет 0,92 от максимальной. Это затрудняет точное определение величины V_{max} и K_m с помощью графика Михаэлис – Ментен.



Для чего необходимо знать величины

$$K_m \text{ и } V_{max}$$

K_m

- Зависит от T°
- если фермент проявляет относительную субстратную специфичность, для каждого субстрата существует свое значение K_m .
- Не зависит от концентрации фермента.
- Знание K_m , позволяет корректно оценить активность фермента (дефицит субстрата не позволит снизить активность).
- K_m – мера сродства субстрата к ферменту, мера прочности связывания субстрата с активным центром фермента. Чем выше сродство, тем меньше величина K_m .

V_{max}

- Зависит от концентрации фермента: чем больше фермента, тем выше скорость.
- V_{max} – отражает важную характеристику фермента:
число оборотов фермента.

Число оборотов фермента – количество молекул преобразованного субстрата на 1 молекулу фермента за единицу времени (при условии полного насыщения фермента субстратом).

Большинство ферментов имеют число оборотов около $1 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$.

**Абсолютный рекорд принадлежит карбоангидразе:
 $6 \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$**

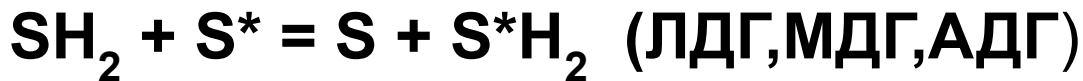
Классификация ферментов

- ЮВМВ ввел международную классификацию ферментов . **Шифр каждого фермента состоит из 4 цифр:**
- 1. **Класс** фермента (тип катализируемой реакции)
- 2. **Подкласс** – природа связи в субстрате
- 3. **Под-подкласс** – природа субстрата или к-либо другой признак
- 4. **№ фермента**
- Кислая фосфатаза (КФ: 3.1.3.2)
- Катепсин Д (КФ: 3.4.23.5)
- Алкоголь:НАД – оксидоредуктаза (КФ: 1.1.2.34)

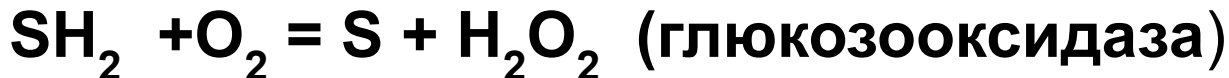
Классификация ферментов.

1.ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

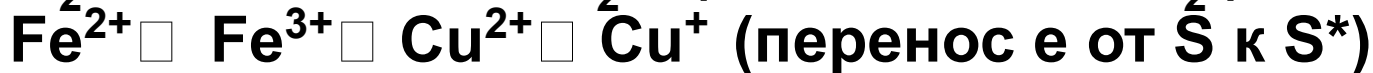
- 1.1 **Дегидрогеназы**



- 1.2 **Оксидазы**



- 1.3 **Цитохромы**



- 1.4 **Пероксидаза, каталаза)**



- 1.5 **Оксигеназы**



Классификация ферментов

2.ТРАНСФЕРАЗЫ

- 2.1. Аминотрансферазы
- 2.2. Фосфотрансферазы
- 2.3. Метилтрансферазы
- 2.4. Глюкуронилтрансферазы
- 2.5. Сульфотрансферазы
- 2.7. РНК- и ДНК- полимеразы

Классификация ферментов

3. ГИДРОЛАЗЫ

- 3.1. Эстеразы
- 3.2. Гликозидазы
- 3.3. Пептидазы
- 3.4. Тиолазы
- 3.5. Рибонуклеазы
- 3.6. Амидазы
- 3.7. Дезаминазы

Классификация ферментов

4. ЛИАЗЫ

- Отщепление каких-либо групп негидролитическим и неокислительным путем или присоединение групп (чаще всего воды) к субстрату по двойным связям; расщепление С-С связей:
- альдолазы, декарбоксилазы, гидратазы, дегидратазы.

Классификация ферментов

5. ИЗОМЕРАЗЫ

- Внутримолекулярные превращения:
внутримолекулярный перенос групп;
перенос связей.

Изомеразы,

Мутазы,

Рацемазы.

Классификация ферментов

6. ЛИГАЗЫ (СИНТЕТАЗЫ)

- Соединение 2-х молекул с использованием энергии гидролиза макроэргической связи АТФ (синтетаза, лигаза). Если источник энергии – в связях самого субстрата – синтаза.
- Карбоксилазы,
- Амино-тРНК-синтетазы,
- ДНК- лигазы

Определение активности ферментов

- **Содержание (количество) фермента определить невозможно. Определяют **активность фермента = скорость реакции.**** Для этого необходимо:
- Знать общую стехиометрию реакции.
- Создать **оптимальные условия** для работы фермента.
- Знать **K_m для субстрата**, чтобы подобрать **оптимальное соотношение S и E.**
- Иметь надежную аналитическую методику для определения $[S]$, $[P]$, или параметров SE – комплекса.

Единицы ферментативной активности

- **Общая активность** : количество молей субстрата (или продукта) за единицу времени. (моль/час, ммоль/мин, мкмоль/сек).
- **Удельная активность:** активность фермента, рассчитанная на массу ткани, литр жидкости, клетку, грамм общего белка.

Единицы ферментативной активности

- **1МЕ** соответствует количеству фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин
- **1 катал (кат)** соответствует количеству фермента, катализирующего превращение 1 моля субстрата за 1 сек
- **1 кат = 1 моль S/c** = 60 мольS/мин =
- 60×10^6 мкмоль/мин = 6×10^7 МЕ
- **1МЕ = 1 мкмоль/мин = 16,7 нкат.**

Регуляция активности ферментов

- **Скорость ферментативных реакций** (активность ферментов) зависит от:
 - **[E], [S], [P]**
 - условий среды (**pH, t⁰, P** и.др.)
 - наличия **кофакторов, активаторов или ингибиторов**

Регуляция активности ферментов

- **Количество фермента находится под генетическим контролем**, определяется скоростью синтеза и распада ферментных молекул.
- Конститутивные и адаптивные ферменты.
- **Синтез адаптивных ферментов индуцируется** самими субстратами или гормонами (стероиды, тиреоиды).
- **Каталитическая активность уже существующих молекул** изменяется под влиянием условий среды, активаторов и ингибиторов разного механизма действия.

- .

Регуляция активности ферментов

- Зависимость от pH среды – специфическое свойство биокатализаторов. Каждый фермент имеет **opt значение pH среды**, когда при соответствующей степени ионизации функциональных групп он имеет **наиболее функционально активную конформацию**.

Регуляция активности ферментов

- **Зависимость активности ферментов от t^0 среды** подчиняется законам термодинамики. Для ферментов коэффициент $Q_{10} = 1,7 - 2,0$.
- **При повышении температуры увеличивается подвижность молекул, V реакции возрастает, пока не наступает тепловая денатурация.**
- **Тепловое движение внутри молекулы, изменение связей и конформации объясняет наличие индивидуальной оптимальной температуры для активности фермента.**
- **Термолабильность белков очень различна, хотя большинство денатурируют при температуре 40 - 60°C.**

Регуляция активности ферментов

- **Зависимость скорости реакции от [S]** различна для «Михаэлисовских» ферментов и аллостерических.
- Для всех ферментов характерно **состояние «насыщения»** активных центров субстратом [ES].
- **Соотношение [s] и [E] должно быть оптимальным**, [S] не должна лимитировать скорость реакции, но:
- **Избыток субстрата** может не только не увеличивать скорость реакции, но даже **подавлять ее**.

Регуляция активности ферментов

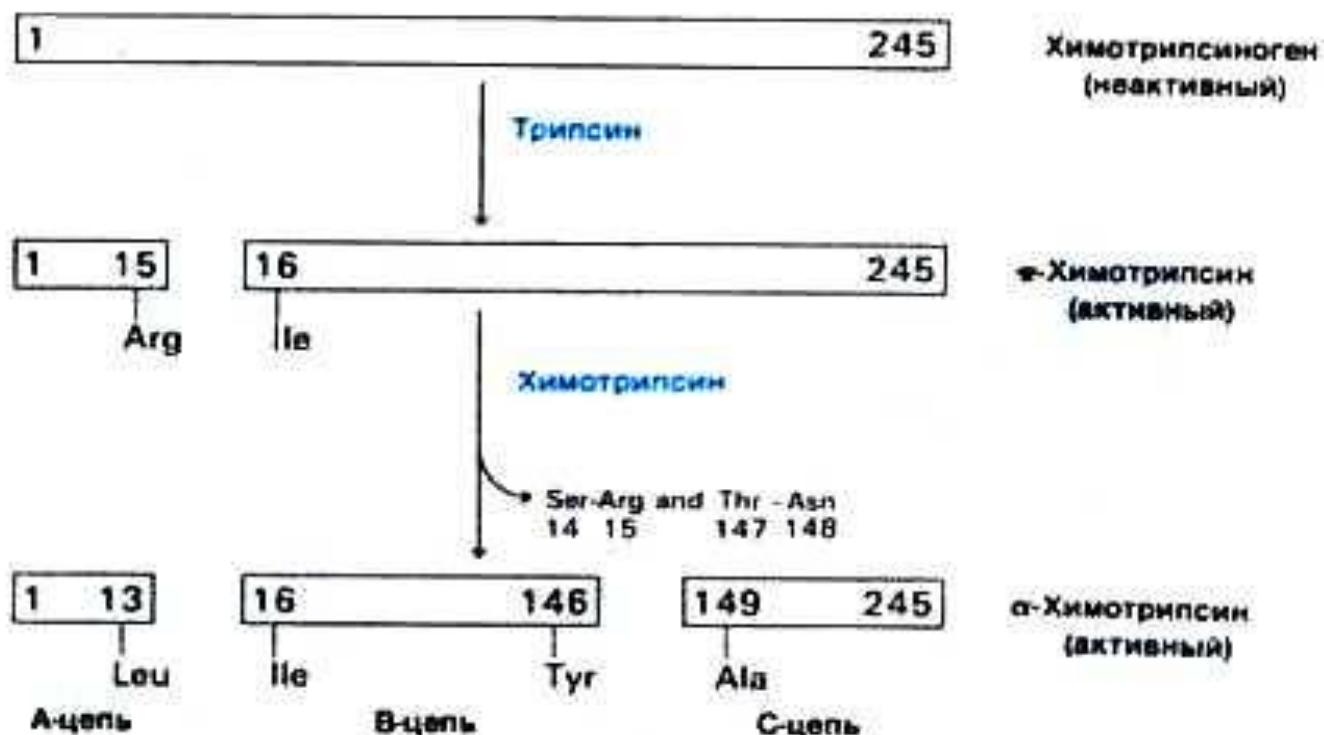
- **Зависимость скорости реакции от [P]:**
- На начальных этапах реакции, когда [P] мала, равновесие реакции сдвинуто вправо.
- Часто, когда P накапливается достаточно, он становится ингибитором активности фермента (ретро-ингибирование).

Регуляция активности ферментов

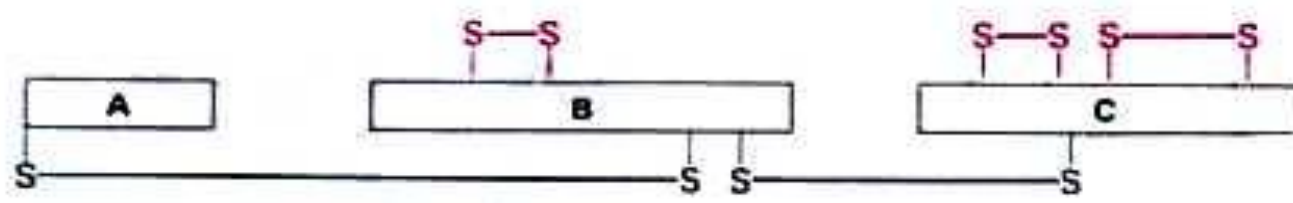
- Профермент – активный фермент:
- **Лимитированный протеолиз**
- **Ковалентная модификация**
(фосфорилирование, ацетилирование, аденилирование и т.д.)
- **Белок – белковые взаимодействия**

Регуляция активности ферментов

- **Лимитированный (ограниченный) протеолиз:**
- **Профермент** синтезируется в виде крупной молекулы –предшественника
- Подвергается **гидролизу специфическими ферментами**, «разрезающими» пептид, удаляющими N- или C-концевые пептиды или внутренние участки.
- **Возникает новая пространственная структура**, меняются взаимодействия между радикалами, формируется активный центр фермента.
- Химотрипсиноген \square химотрипсин

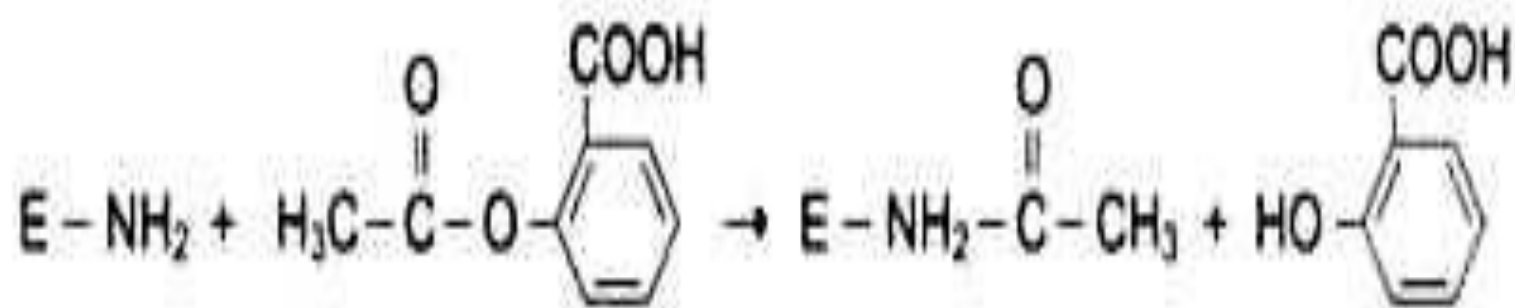


Активация химотрипсиногена.



Регуляция активности ферментов

- Ковалентная модификация:
- $E - OH \rightleftharpoons E - O-PO_3$ (протеинфосфотрансфераза фосфорилирует ферментный белок по OH группам серина или треонина, переносит $H_2PO_3^{2-}$ с АТФ)
- $E - PO_3 + H_2O \rightleftharpoons E - OH$ (фосфатаза гидролизует фосфорный эфир), фермент возвращается в исходное состояние
- **Фосфорилирование может приводить как к активации, так и инактивации ферментов**
- Гликогенфосфорилаза и гликоген синтетаза реагируют на эту модификацию противоположно, как и многие другие ферменты.



Циклоокси-
геназа

Аспирин

Ацетилированный
фермент

Салициловая
кислота

Регуляция активности ферментов

- Белок –белковые взаимодействия:
- Ассоциация – диссоциация белковых субъединиц:
- G – белковый комплекс (β γ α субъединицы);
- фосфопротеинкиназа (2R и 2 C субъединицы).

Регуляция активности ферментов

- **Действие активаторов и ингибиторов:**
- **Ингибиторы по прочности связывания с ферментом м.б. необратимыми** (комплекс с ингибитором практически не диссоциирует) и **обратимыми** (активность фермента м.б. восстановлена после удаления ингибитора или снижения его концентрации)

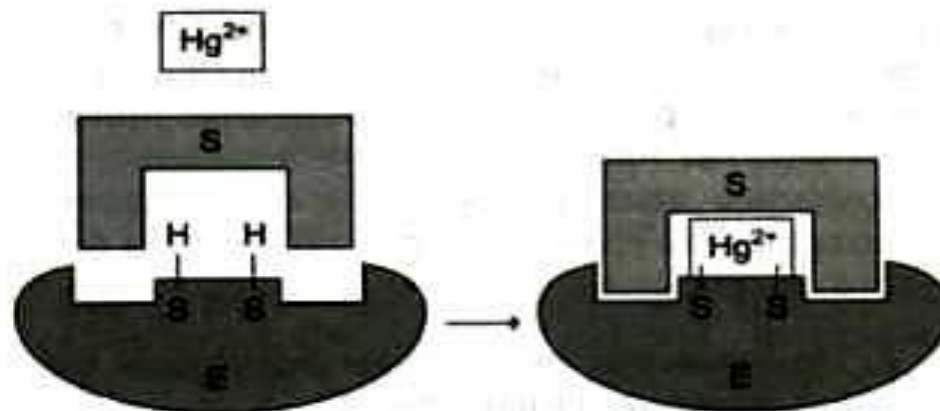


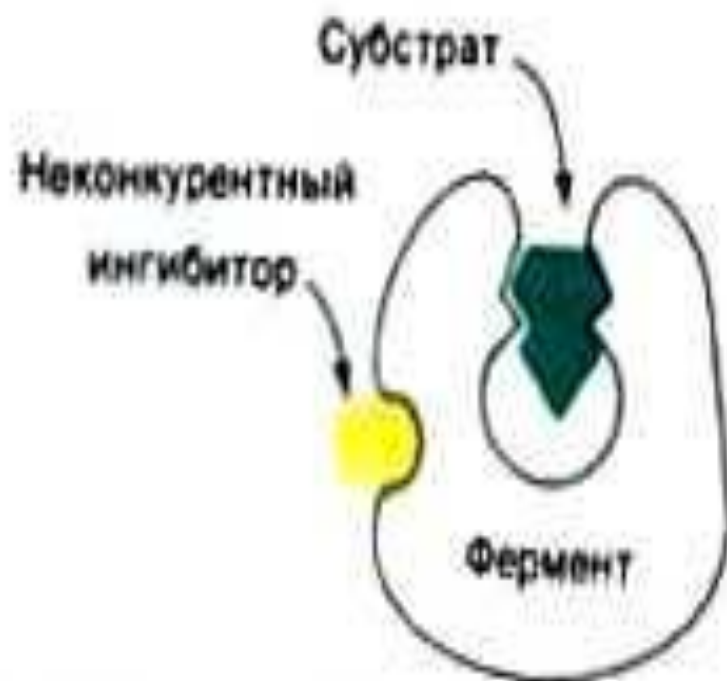
Рис. 2-26. Механизм действия ионов ртути как необратимого ингибитора. Ионы ртути в малых концентрациях блокируют сульфгидрильные группы активного центра, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции.



Рис. 2-27. Ингибирование активности химотрипсина с помощью диизопропилфторфосфата.

Регуляция активности ферментов

- Ингибиторы **по механизму действия:**
- **Конкурентные** (ингибитор- структурный аналог субстрата, связывается в активном центре фермента)
- **Неконкурентные** (ингибитор связывается не в активном центре, сродство к субстрату сохраняется)
- **Бесконкурентные** (ингибитор связывается с фермент – субстратным комплексом)



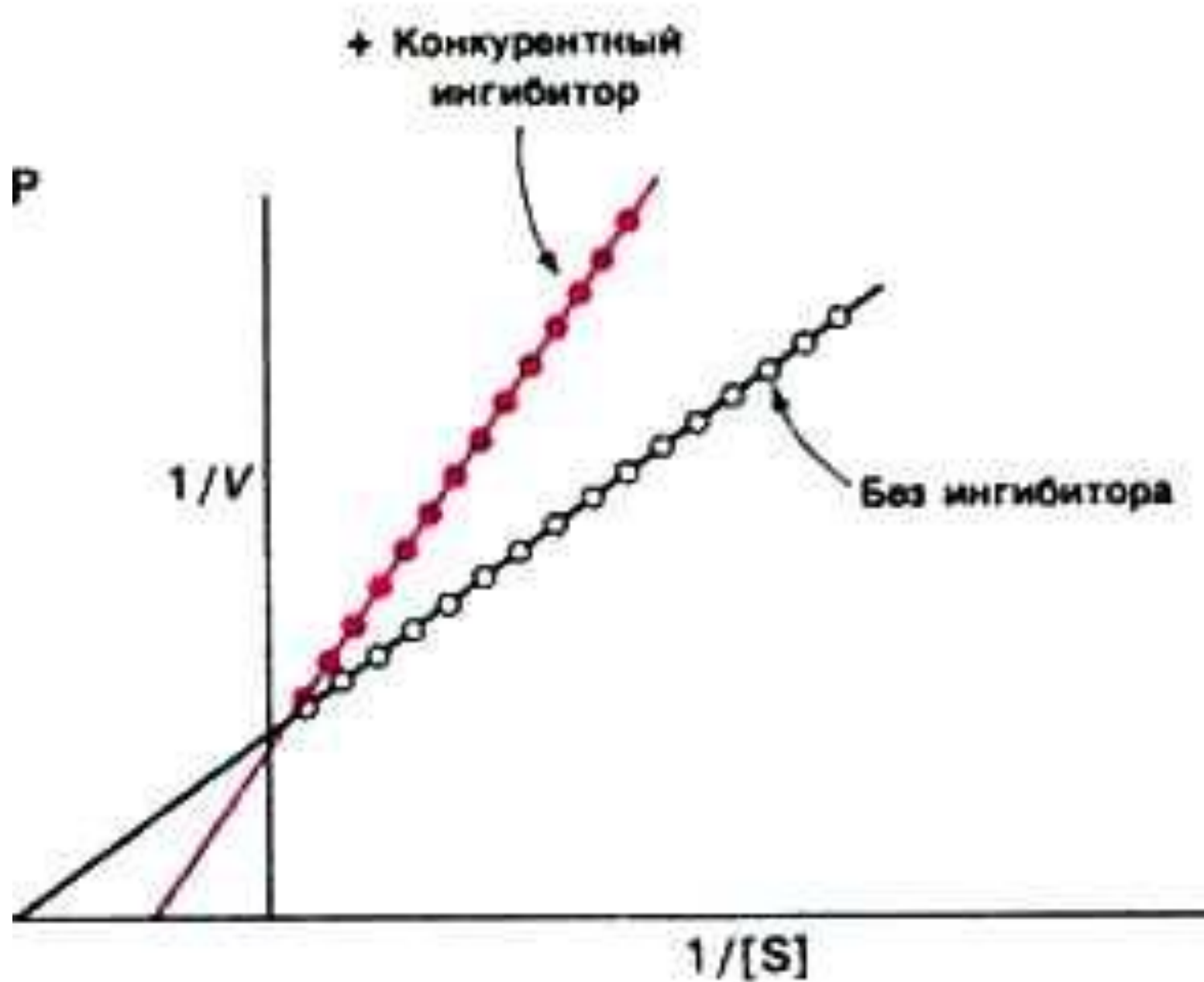
1. Различия

В. А. Давыдов

11

Конкурентное и неконкурентное ингибирование активности ферментов

- Кинетика конкурентного и неконкурентного ингибирования различна:
- Конкурентный ингибитор **снижает сродство фермента** для истинного субстрата, K_m возрастает до величины **$(1 + [i]/K_i) \times K_m$** ,
- **V_{max} м.б. восстановлена** при снижении $[i]$ или увеличении $[S]$.



Конкурентное и неконкурентное ингибирование активности ферментов

- Неконкурентный ингибитор **снижает** скорость реакции до величины $V_{max} / (1 + [i] / K_i)$. K_i – константа диссоциации ES комплекса.
- **Скорость реакции не м. б. восстановлена увеличением [S].**

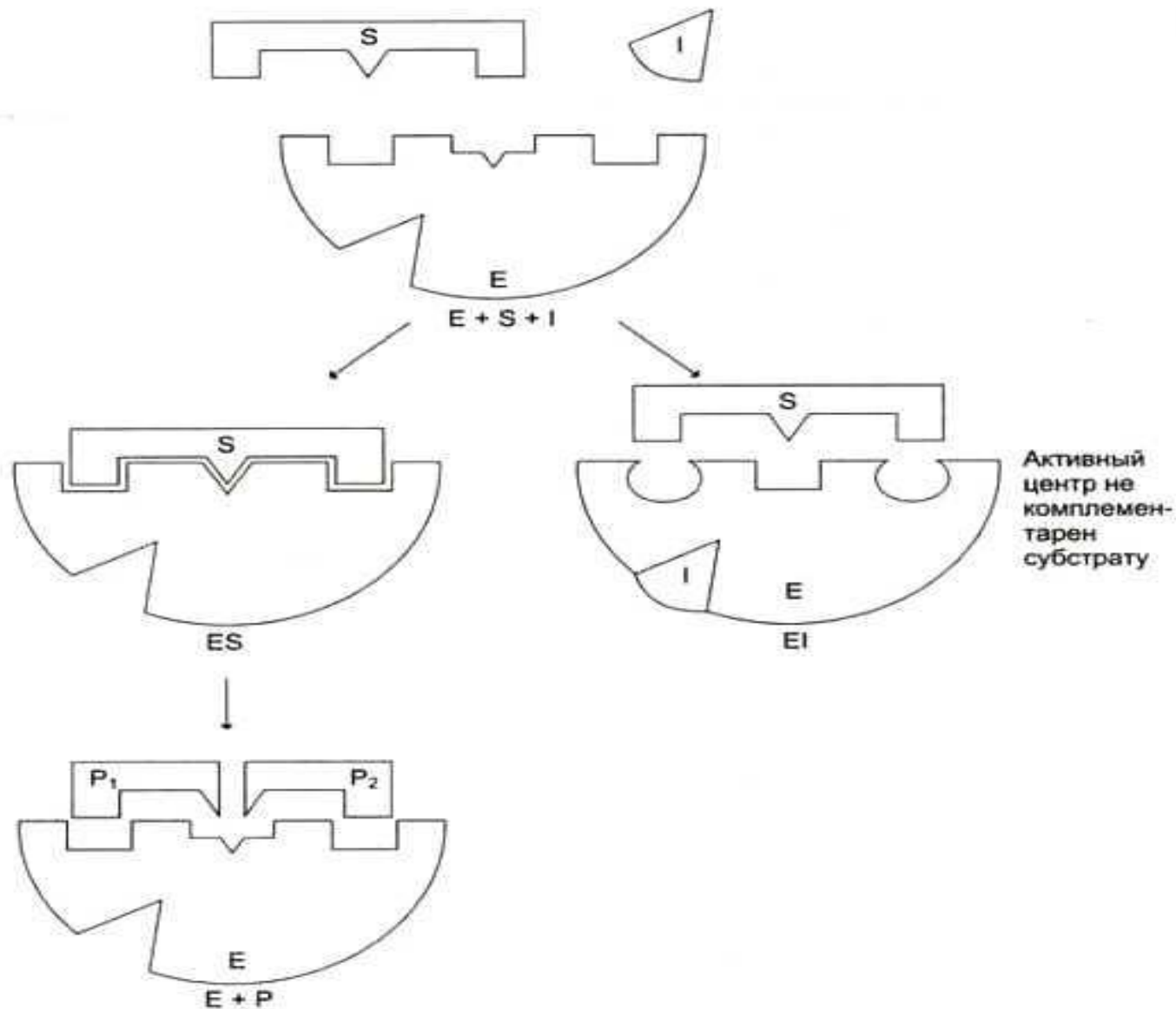


Рис. 2-24. Схема неконкурентного ингибирования активности фермента.



Изоферменты – молекулярные формы ферментов

- Разные молекулярные формы одного фермента (катализируют **одну и ту же реакцию**) **в разных метаболических условиях**.
- **Различаются** по массе, заряду, чувствительности к условиям среды, сродству к субстратам.
- **Осуществляют тонкую генетическую регуляцию метаболизма в разных тканях, клетках, органеллах клеток, клеток разного возраста и разной степени дифференцировки**.
- **ЛДГ** (5 изоформ), **КФК** (3 изоформы), **гексокиназа** (5 изоформ); **S- и P- типы** α -амилазы; **МДГ** цитоплазматическая и митохондриальная.

Компартментализация

- Важный момент регуляции скорости метаболических путей в эукариотической клетке.
- Участие мембран заключается и в **интеграции** и в **разграничении** различных процессов. (примеры)
- Состояние субклеточных мембран определяет **скорость доставки** из одного компартмента в другой метаболитов, **продуктов и субстратов реакции** (примеры).
- **Состояние мембран влияет на активность интегрированных в них ферментов.**

Алlostерические ферменты

- **«ИНЫЕ»! Не подчиняются кинетике Михаэлиса – Ментен.**
- Кроме каталитического центра имеют еще один, другой – **регуляторный, для нековалентного обратимого связывания эффекторов.**
- Чаще всего – это олигомерные белки. Каталитический и регуляторные центры м. б. в одной или разных субъединицах.
- Кооперативный эффект.

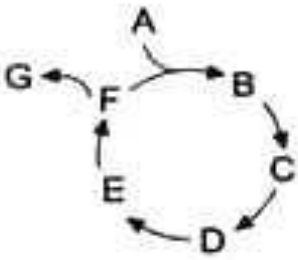
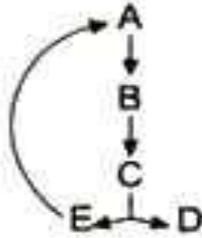
Аллостерические ферменты

- Эффекторами чаще всего служат метаболиты данного ферментативного процесса. **Неспецифическими регуляторами часто служат нуклеотиды: NAD, FAD, АТР, АDР.**
- Чаще всего исходные продукты служат (+) эффекторами, продукты – (-) эффекторами.
- Субстраты могут быть одновременно и эффекторами (гомотропный тип регуляции), в каталитическом центре он подвергается превращениям, в другом – является регулятором (НАД⁺ –НАДН).



Аллостерические ферменты

- Как правило, аллостерические ферменты катализируют ключевые (лимитирующие скорость) реакции метаболических путей.
- Аллостерические ферменты катализируют начальные этапы или находятся в местах разветвления метаболических путей.

Схема	Название	Пример
$A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$	Линейный	Гликолиз
$A \rightarrow B \rightarrow C \begin{cases} \rightarrow D \rightarrow E \\ \rightarrow F \rightarrow G \end{cases}$	Разветвлённый	Синтез нуклеотидов
	Циклический	Цикл трикарбоновых кислот
		Синтез мочевины
	Спиральный	β -окисление жирных кислот

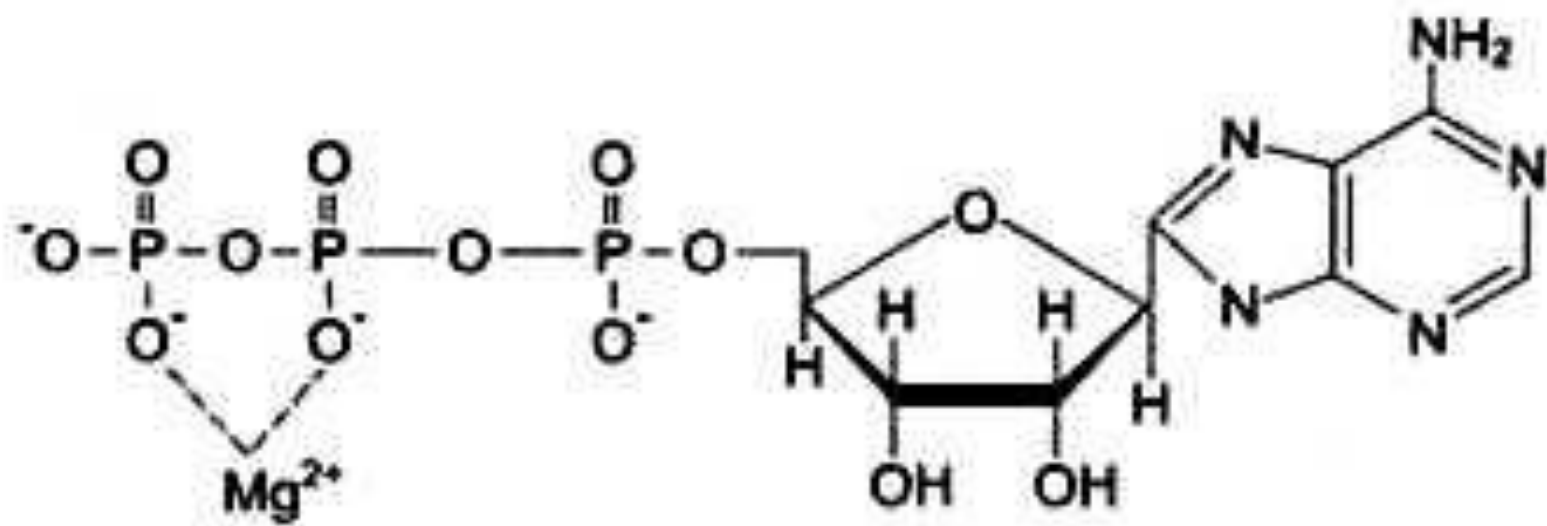
Кофакторы и коферменты

Холофермент = кофермент (кофактор) +
+ апофермент.

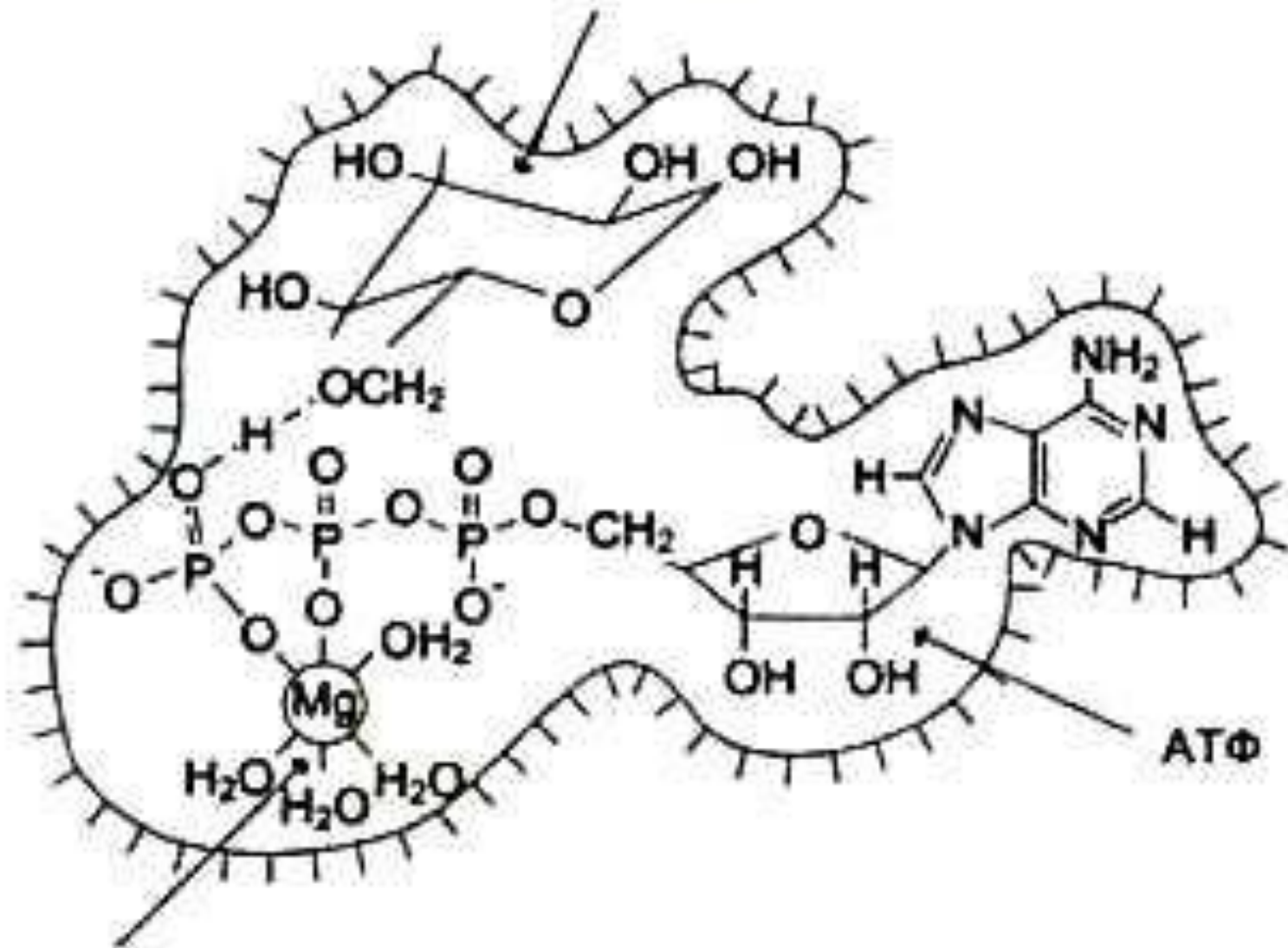
Кoferменты (кофакторы) –
низкомолекулярные, термостабильные
простетические группы ферментных
белков.

Кофакторы) (неорганической природы)

- **Ионы металлов:**
- Стабилизируют субстрат (E – S – Me), Mg^{2+} - АТФ.
- Стабилизируют активный центр фермента (E–Me–S), металлоэнзимы.
- Стабилизируют пространственную (третичную или четвертичную) структуру ферментов. Zn^{2+} - АДГ
- Участвуют в катализе (по электрофильному механизму), Me с переменной валентностью.
- Участвуют в окислительно-восстановительных реакциях (перенос электронов, гидроксילирование)
- Регулируют активность ферментов (Ca^{2+} - протеинкиназа С).



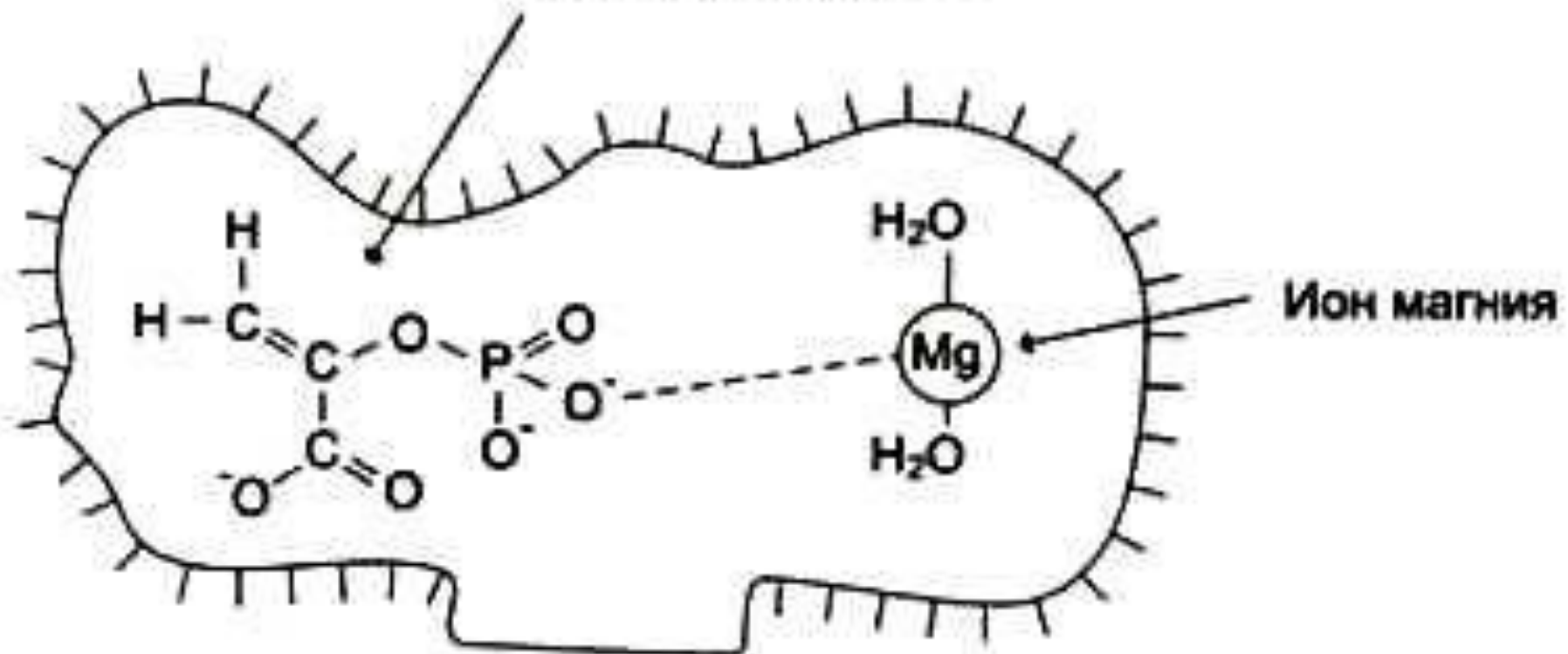
Глюкоза



Гидратированный
ион магния

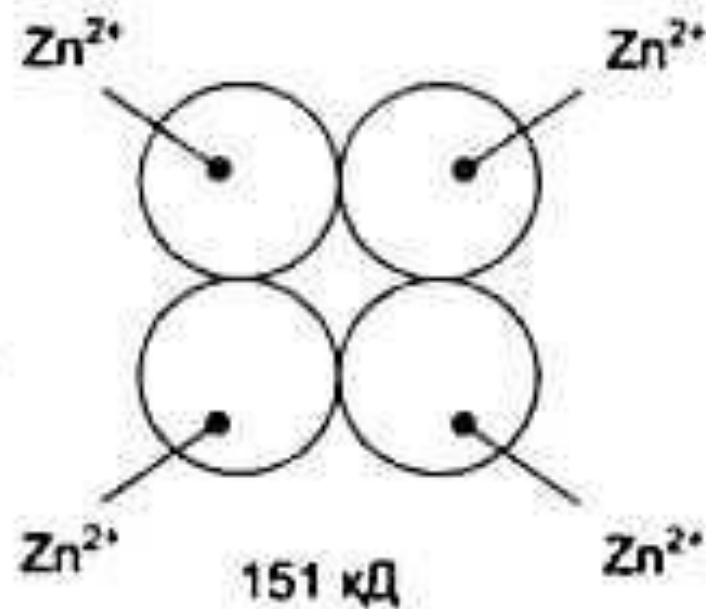
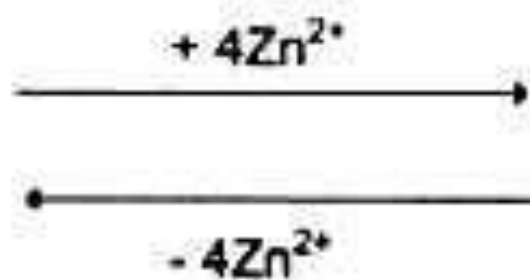
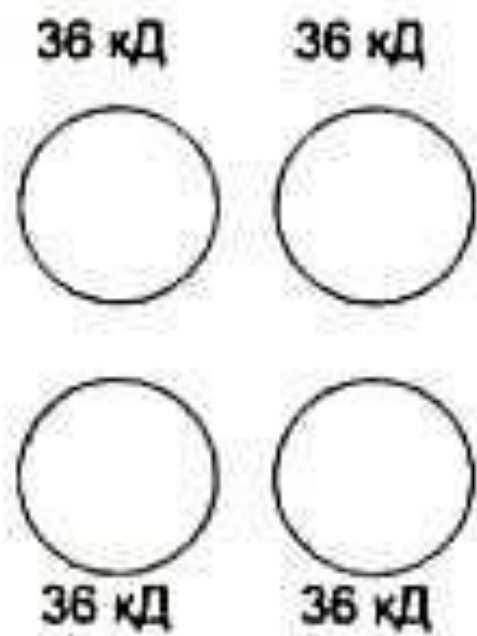
ATФ

Фосфоенолпируват



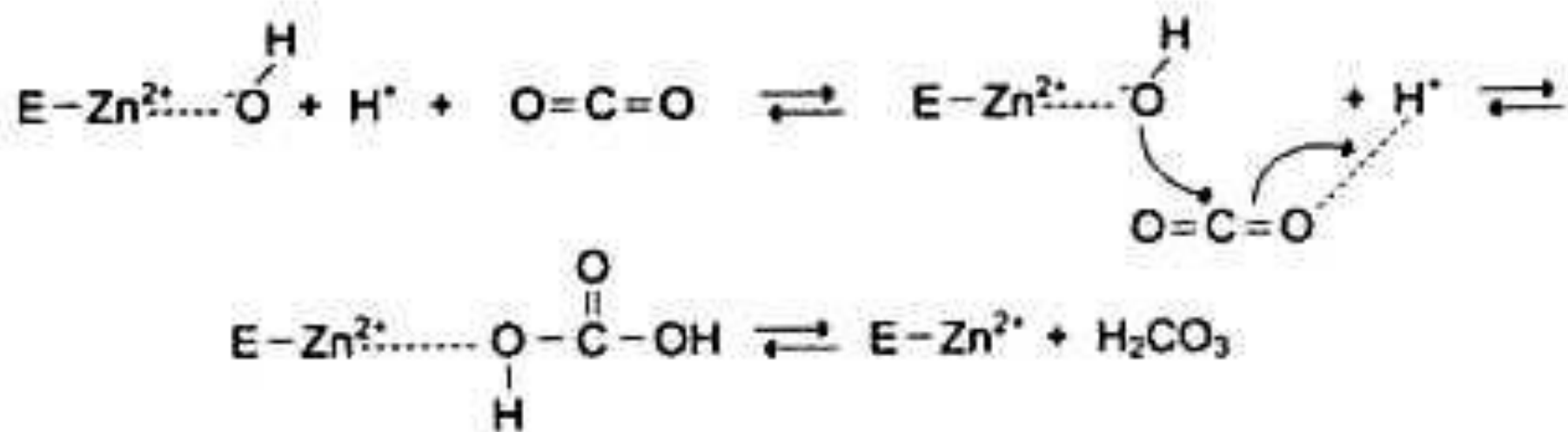
Ион магния

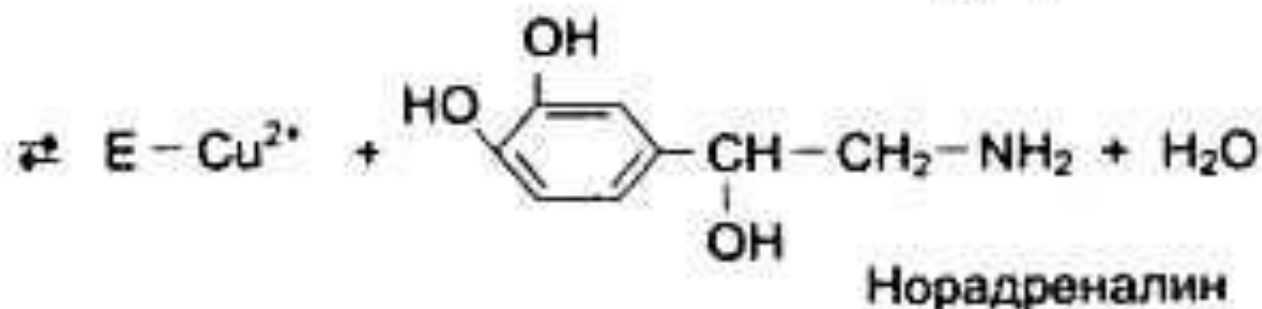
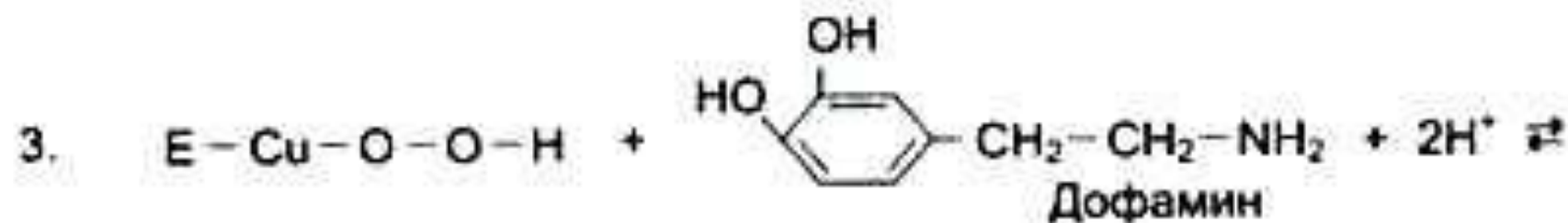
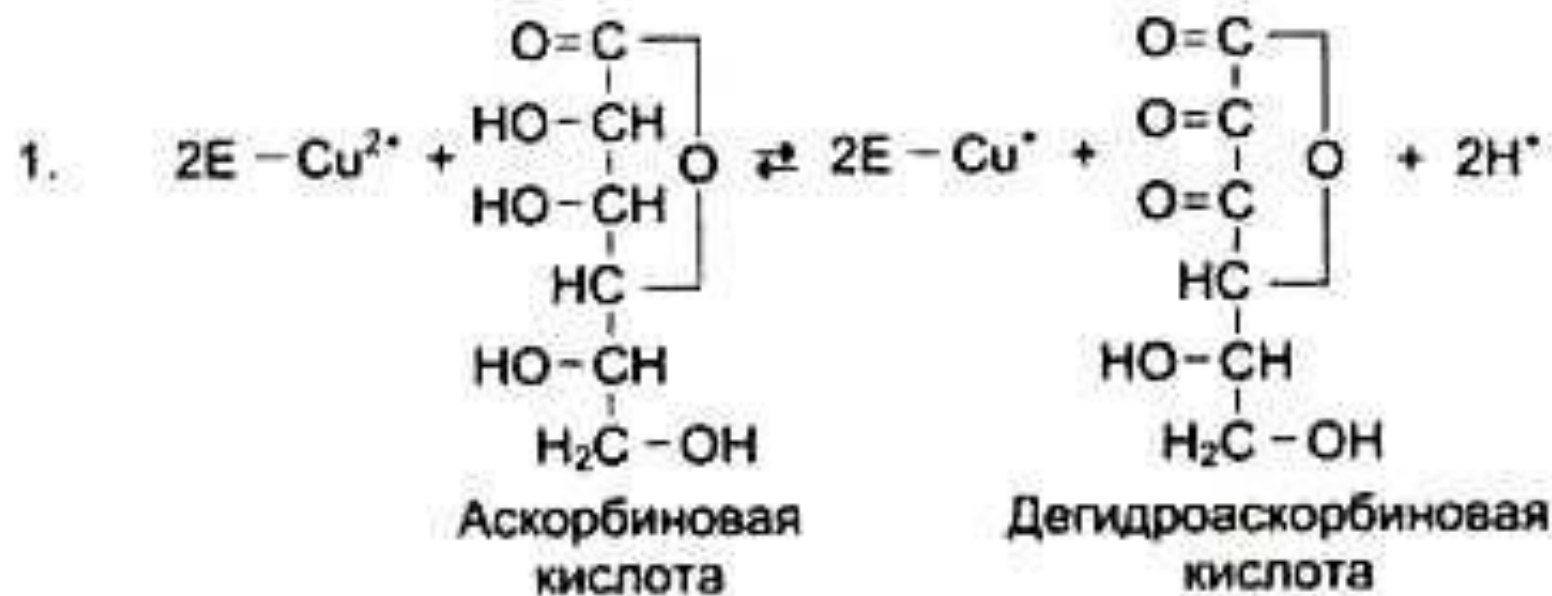
Участок связывания
АДФ



Фермент не активен

Алкогольдегидрогеназа
Фермент активен





Коферменты

- Производные витаминов (фосфорилированные: **пиридоксальфосфат, тиаминпирофосфат** или аденилированные: **НАД, ФМН, ФАД**)
- Гем (ы)
- Нуклеотиды (АТР, ГТР)
- Убихинон (КоQ)
- ФАФС
- S – аденозилметионин
- Глутатион

ВИТАМИНЫ

- Низкомолекулярные органические **вещества различного строения**, которые животные **должны получать извне** полностью или частично (**микронутриенты**).
- Не являются источниками энергии!
- Не служат пластическим материалом!

Из истории витаминологии

- Научные основы витаминологии – начало 19 века:
- **Н.И. Лунин, Ф. Мажанди, К. Танаки**
- Для нормального роста и развития животных недостаточно макронутриентов: белков, жиров и сахаров.
- **К.Функ, 1911 г.** – выделил вещество, излечивающего от бери-бери (тиамин, B_1).
- **Н. Зелинский, 1921 г.** – роль витаминов, как кофакторов ферментов. Существование провитаминов, антивитаминов

История витаминологии

- **А.Виндаус, 1928 г. – открытие витамина Д и холестерина.**
- **У.Хеворс и П. Каррер, 1937 г. – витамины С, А, каротиноиды; В₂, флавины**
- **В. Дю Винью, 1955 г. – витамин Н.**
- **А. Тодд, 1957 г. – нуклеотидсодержащие ферменты.**
- **Д.Ходжкин, 1964 г. – строение витамина В₁₂.**

Номенклатура витаминов

- **Буквенные символы** (А, В, С...)
- **Химические названия** (тиамин, рибофлавин, никотинамид....)
- **Биологическая классификация**
(антирахитический, антигеморрагический, антинеуритный...)
- **Жиро** – (А, Д, Е, К) и **водорастворимые** (В, Р, РР, Н, С)
- **Витаминоподобные факторы** (холин, липоевая кислота, оротовая кислота)

Биохимические функции ВИТАМИНОВ

- 1. Обеспечивают активность ферментов (**кофакторная ф –ция**): V_1 , V_2 , V_6 , РР, Н, К, фолиевая кислота, липоевая кислота.
- 2. Обладают **гормоноподобным** действием: А, Д, К.
- 3. Являются **антиоксидантами**: А, Е, С, Р, липоевая кислота.



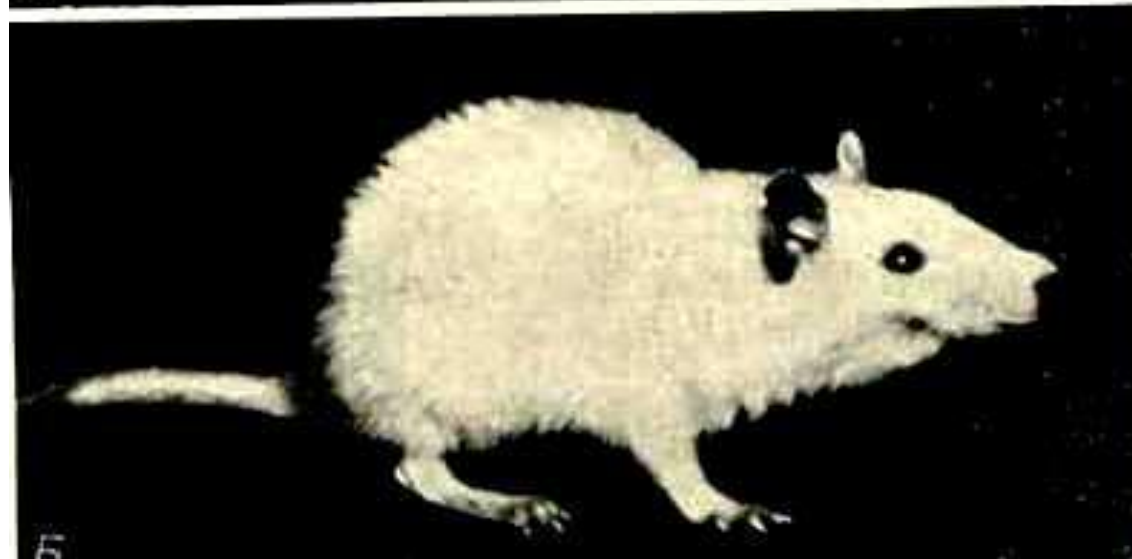
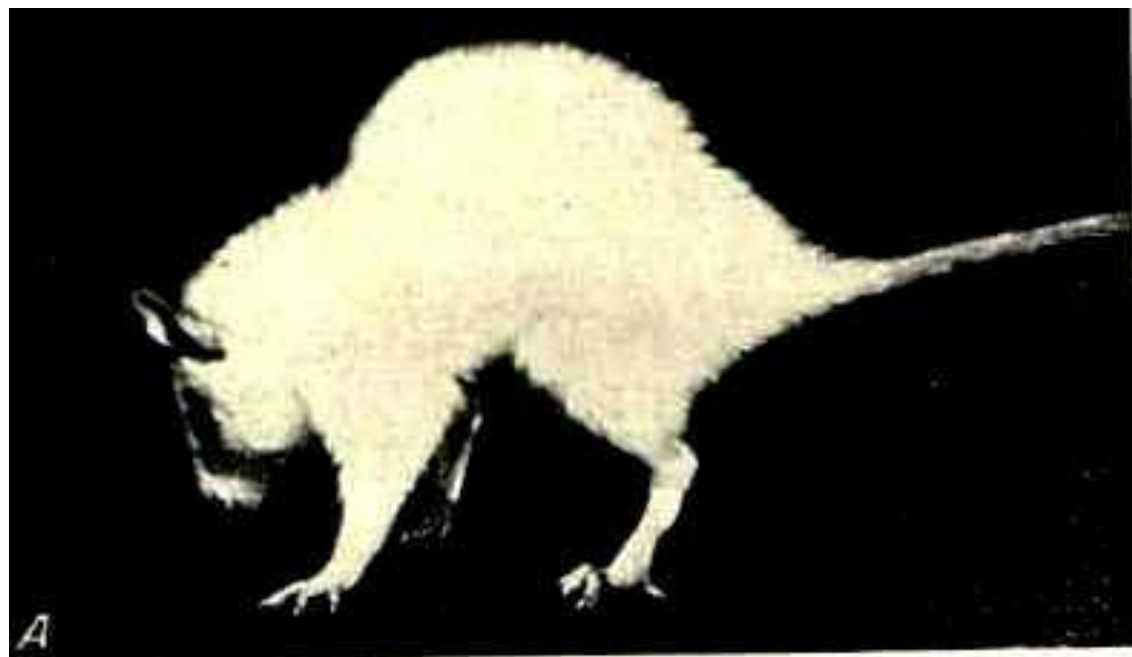
Ф и г. 239. Влияние витамина А на глаза.

А. Типичное состояние глаз при недостатке витамина А. *Б.* Ежедневное скармливание 3 МЕ (около 0,001 мг) витамина А привело к восстановлению нормального состояния глаз.



Ф и с. 240. Ребенок, страдающий рахитом.

Недостаточность витамина D понижает способность организма усваивать кальций и фосфор; кости становятся мягкими, и форма их нарушается. Это особенно заметно на ребрах, на запястьях и лодыжках.



Ф и г., 241. Влияние тиамина (витамина В₁) на крысу.

А. Подливирит (бери-бери) у крысы, получавшей рацион с недостатком тиамин. Обратите внимание на то, что спина у крысы выгнута, а задние конечности выпрямлены и широко расставлены. Такие животные имеют характерную «хромающую» походку; особенно они неуловимы при поворотах и легко теряют равновесие. Если животное повернуть, ему очень трудно бывает восстановить равновесие, вероятно вследствие дегенерации нервов, идущих к полукружным каналам. Б. Та же крыса спустя 8 час после введения достаточной дозы тиамин: спина и задние конечности приняли нормальное положение; животное легко восстанавливает равновесие после вращения.

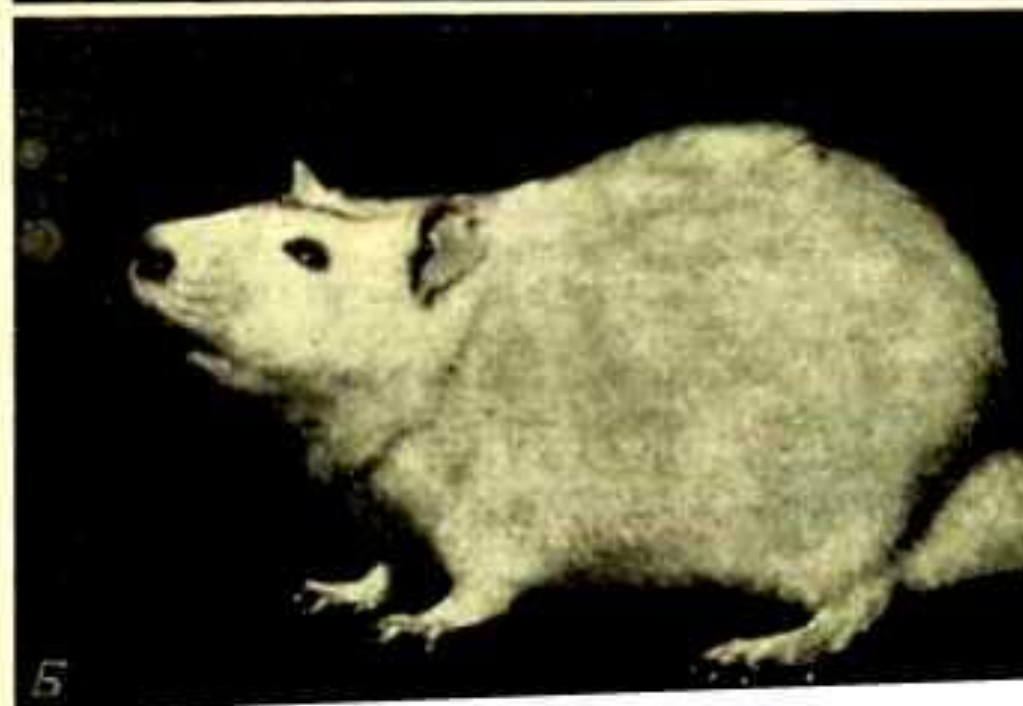
Ф и г. 242. Влияние рибофлавина (витамина В₂) на крысу.

А. Крыса с недостаточностью рибофлавина. Задержка роста, генерализованный дерматит (видны открытое поражение на левой передней конечности), скудный рост шерсти и воспаление глаз. *Б.* Та же крыса после двух месяцев лечения рибофлавином. Не видно никаких признаков авитаминоза: рост шерсти возобновился, поражения кожи и глаз исчезли.



Ф и г. 244. Влияние биотина на крысу.

А. Крыса, получавшая рацион с недостатком биотина и с добавлением сырого яичного белка. Рост замедлен; наблюдается генерализованный дерматит. *Б.* Та же крыса после трех месяцев кормления пищей с достаточным количеством биотина: рост нормальный, кожные поражения полностью ликвидированы.



Метаболизм витаминов

- Обмен очень интенсивный. **Не накапливаются!** (Исключение – жирорастворимые витамины, частично депонируются в печени и жировой ткани).
- **Кофакторную функцию** выполняют чаще всего в виде **фосфорилированных** или **аденилированных производных** (образуются в печени).
- Инактивируются и выводятся после образования растворимых продуктов: глюкуронидов, сульфатов или окисленных форм.

Источники витаминов:

- **Пищевые:** желток яиц, печень, икра, проростки злаков, дрожжи.
- **Микрофлора кишечника.**

**КАК СОХРАНИТЬ ВИТАМИНЫ В
ПРОДУКТАХ?**

КАК УБЕРЕЧЬ МИКРОФЛОРУ?

Причины гиповитаминозов:

- **Первичный (экзогенный)** гипо- или авитаминоз: алиментарная недостаточность. Голодание, «однобокая» диета, потребление «рафинированных» продуктов.
- **Вторичные (эндогенные)** авитаминозы, гиповитаминозы:
- Недостаток белкового или минерального обмена, нарушение гормональной регуляции (паратгормон участвует в синтезе активной формы витамина Д, тиреоидные гормоны стимулируют каротиндеоксигеназу)

Причины гиповитаминозов:

- Нарушение **всасывания** в ЖКТ жирорастворимых витаминов (снижение желчеобразования); V_{12} (недостаток фактора Касла).
- Нарушение **микробиоты кишечника**, производящей витамин В, Н, К, РР.
- Нарушение **превращения провитаминов** в активные формы, энзимопатии, недостаточность печени или почек.
- Поступление в организм пищевых или лекарственных **антивитаминов**. (овидин, изониазид (РР), сульфаниламиды (п-АБК), салициловая кислота (К)).
- **Увеличенные потери** витаминов (снижение ретинол-связывающего белка), повышенная активность тиаминазы, аскорбатоксидазы.
- **Увеличенные потребности** в витаминах (беременность, лактация, физические нагрузки и т.д.).
- **«Обкрадывание»** организма паразитами.

Взаимодействие витаминов

- **Витамин влияет на метаболизм другого витамина** (Токоферол препятствует переокислению витамина А; полиеновые кислоты (витамин F) увеличивают потребность в витамине Е, витамины В₁₂ и С способствуют образованию коферментной формы фолиевой кислоты).
- **Несколько витаминов участвуют в одной метаболической цепи:** А, В₂, В₆, РР обеспечивают фотохимический акт зрения; фолиевая кислота, В₁₂, С, участвуют в регуляции пролиферации клеток крови; витамины С и Р регулируют проницаемость стенок капилляров.
- **Клиническая картина многих гиповитаминозов сходна! Чаще всего страдают активно пролиферирующие ткани (эпителий кожи, ЖКТ, кроветворная ткань) ткани, с интенсивным энергетическим обменом (нервная).**

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ.

А (ретинол, ретиналь),

антиксерофтальмический.

- **Источник:** продукты животного происхождения (печень рыб); растительные продукты содержат **каротин** – предшественник витамина А, при окислении каротиндиоксигеназой образуется 2 молекулы ретиналя.
- Участвует в регуляции **роста и дифференцировке эмбриональных и др. пролиферирующих тканей.**
- Участвует в **образовании и функционировании зрительных пигментов сетчатки глаза.**

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ.

Д (кальциферол), антирахитический.

- Источники: **эндогенный синтез (УФ)**, продукты животного происхождения, дрожжи содержат **эргостерин**.
- **Увеличивает содержание Ca^{2+} в крови**, индуцируя синтез Ca^{2+} -АТФ-азы и Ca^{2+} -связывающего белка в кишечнике и почках.

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ. Е (токоферол), антистерильный

- Источники: растительные масла.
- Обеспечивает **стабильность клеточных** мембран, являясь **антиоксидантом** и снижая переокисление липидных компонентов.
- **Повышает биологическую функцию витамина А**, защищая его от окисления.

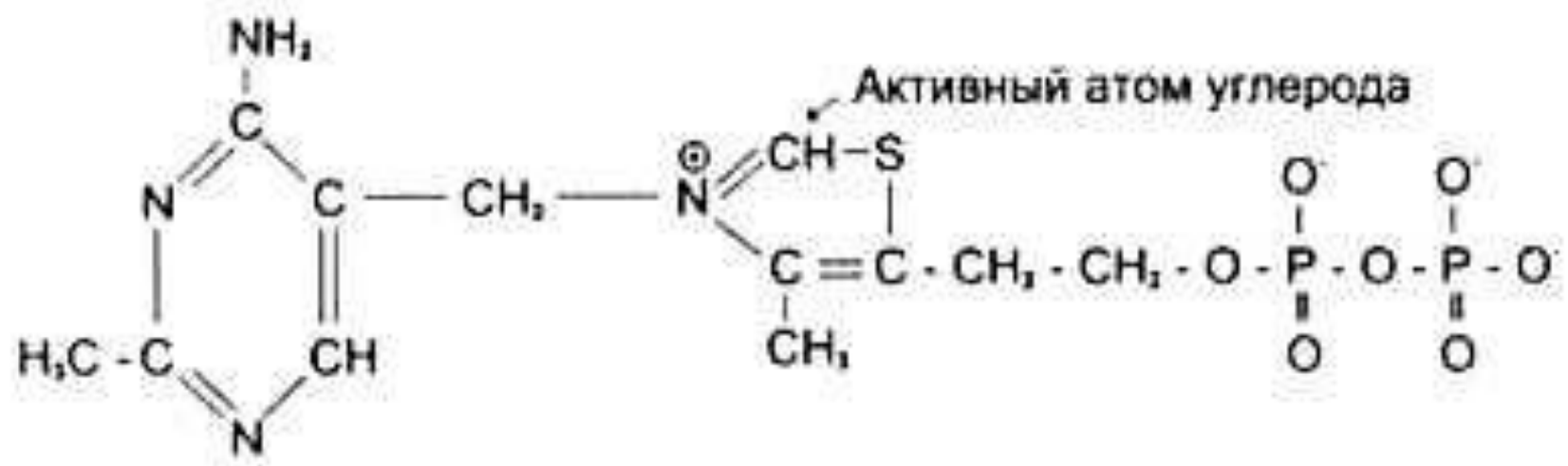
ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ. К (филлохиноны), антигеморрагический

- Источники: зелень, печень, дрожжи, синтез микрофлорой.
- Является **кофактором карбоксилазы глутамата** , активируя 4 –е фактора свертывания крови.

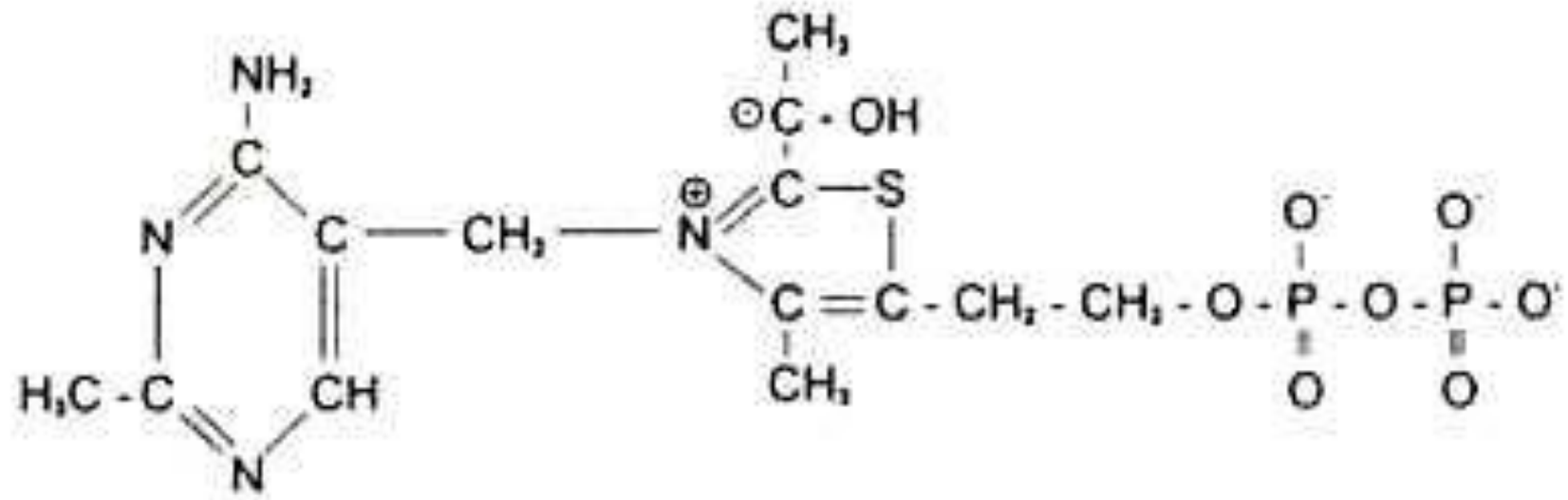
Водорастворимые витамины.

B_1 (тиамин), антиневритный

- Кофакторная форма – **ТДФ (тиаминдифосфат)**
- Работает в составе дегидрогеназных комплексов, обеспечивая **декарбоксилирование кетокислот**.
- В составе **транскетолаз и трансальдолаз**, обеспечивая межмолекулярные перестройки сахаров.
- Гиповитаминоз – **«бери-бери»** (полиневрит, сердечно-сосудистая недостаточность, нарушение ЖКТ)
- Источники: хлеб грубых сортов, мясо, дрожжи



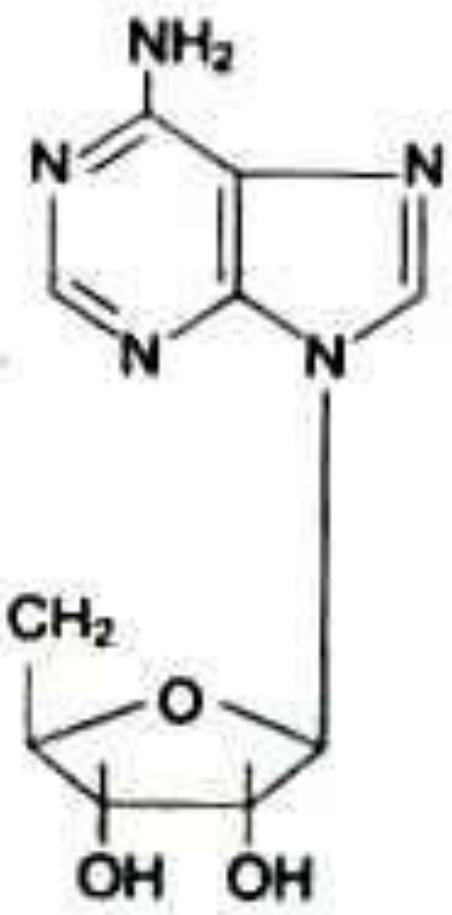
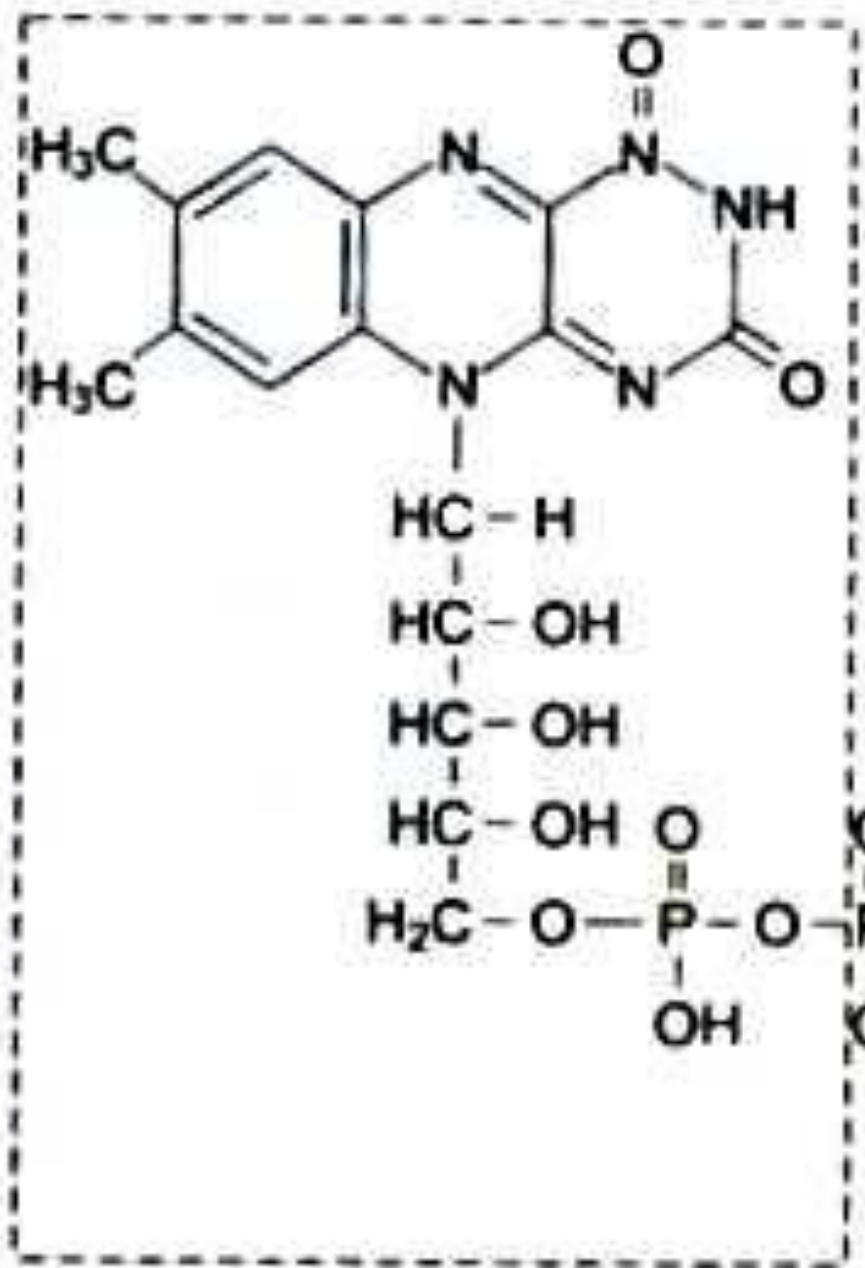
Тиаминдифосфат (ТДФ)

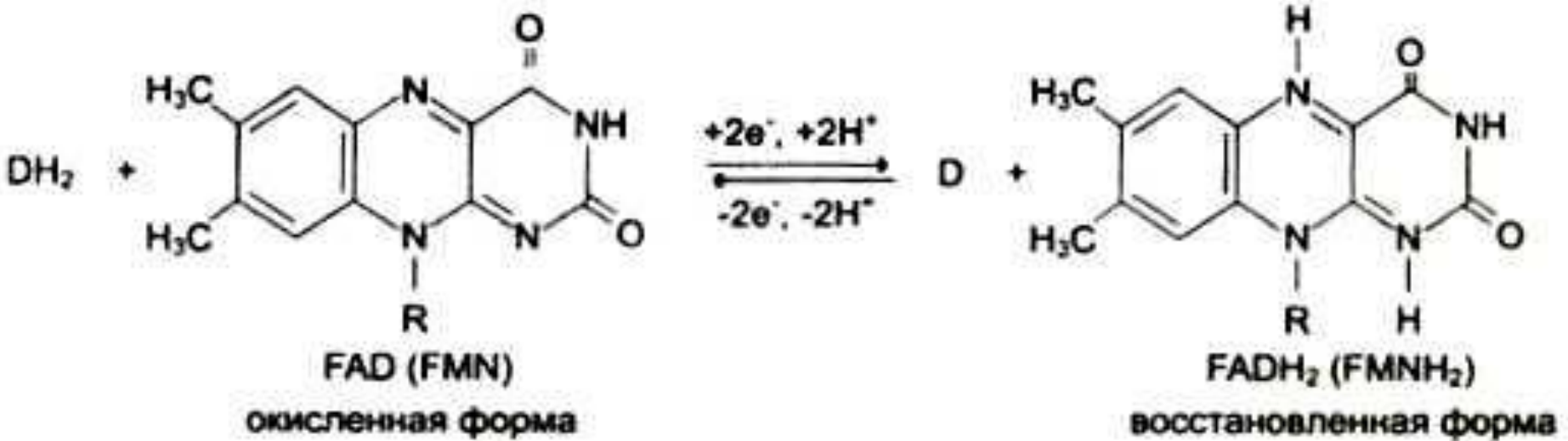


Водорастворимые витамины.

B_2 (рибофлавин), витамин роста

- Образует **кофакторы ФМН, ФАД**. Работает в составе анаэробных дегидрогеназ различных субстратов, передает водород в дыхательной цепи на КоQ.
- Гиповитаминоз - **снижение интенсивности клеточного дыхания** (биологического окисления).
- Источники: молоко, печень, яйца, злаки.





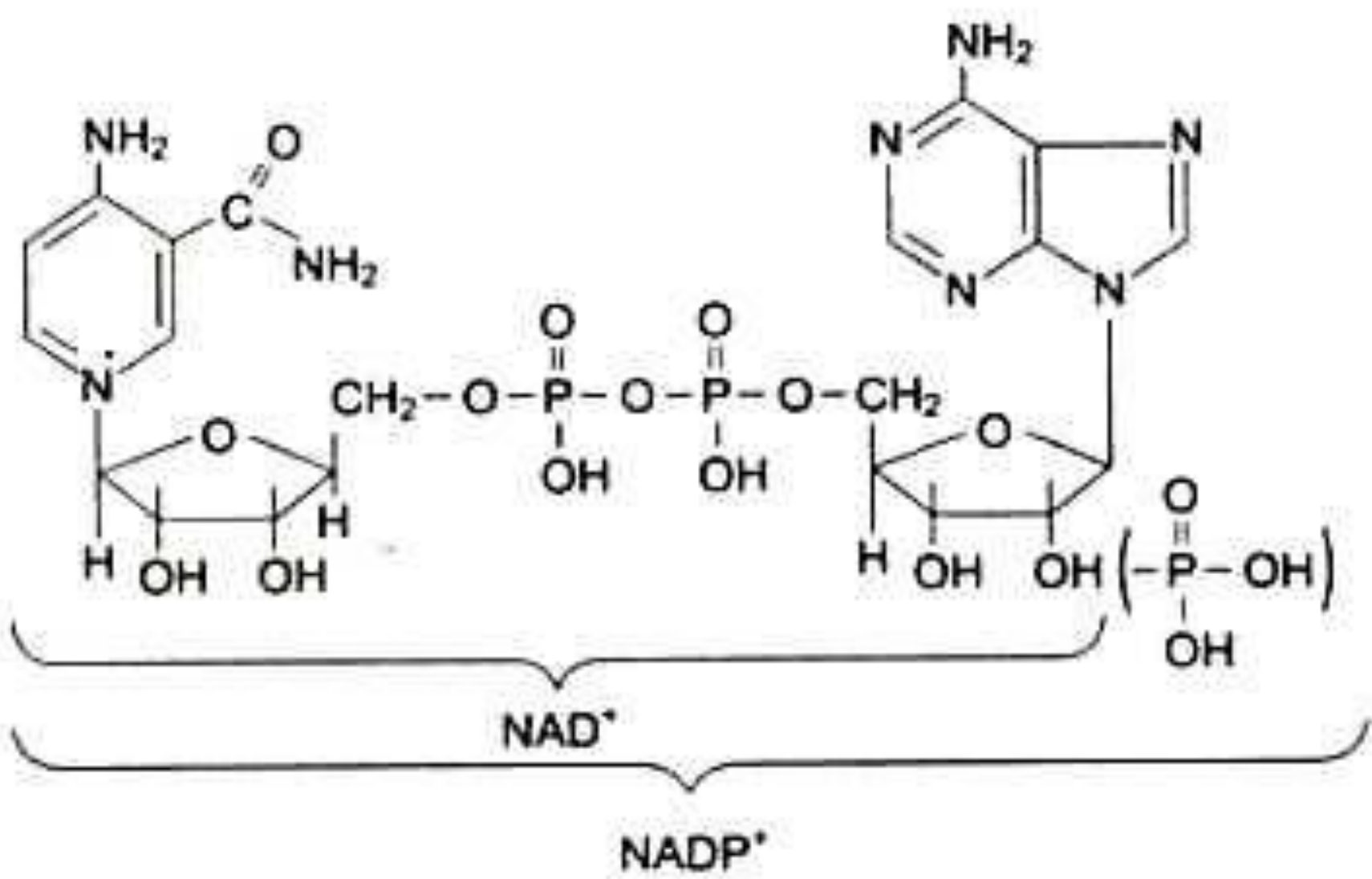
Водорастворимые витамины.

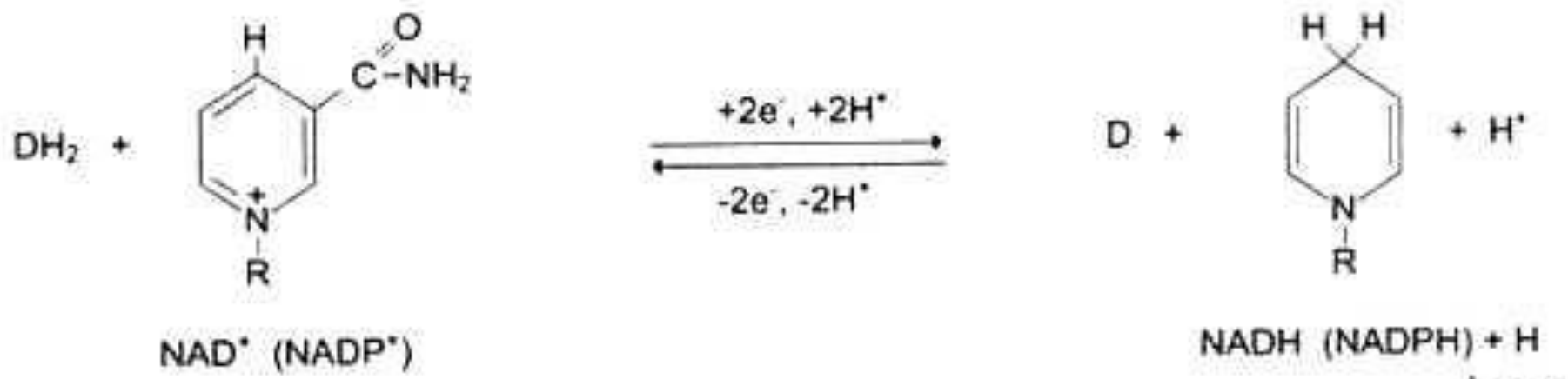
B₃ (пантотеновая кислота), универсальный витамин.

- Входит в состав **КоА**, активатора и **переносчика ацетильных и ацильных остатков** (метаболизм жирных кислот: β -окисление и биосинтез, доставка «топлива» в ЦТК).
- Гиповитаминоз не описан.
- Источники: дрожжи, печень, яйца, мясо, молоко. ppp

Водорастворимые витамины. В₅, РР (никотинамид), антипеллагрический.

- Образует кофакторы **НАД, НАДФ**.
- Входит в состав анаэробных дегидрогеназ, обратимо фиксирует гидрит - ион.
- Гиповитаминоз : синдром 3 Д (дерматит, диарея, деменция)
- Источники: мясо, печень, синтез микрофлорой кишечника, образуется из триптофана.





Водорастворимые витамины.

V₆ (пиридоксаль), антидерматитный

- Образует кофактор **пиридоксальфосфат**.
- **Входит в состав трансфераз и декарбоксилаз аминокислот, моно- и диаминооксидаз, синтазы аминоклевулиновой к-ты...**
- **Гиповитаминоз: дерматиты, повышенная возбудимость, анемия.**
- **Источники: зерновые, бобовые, мясо, рыба. Синтез кишечной микрофлорой.**

**Водорастворимые витамины.
H (биотин), антисеборейный.**

Водорастворимые витамины.
С (аскорбиновая кислота),
антикорбутный