

Глава 2

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ФУНКЦИЯ БЕЛКОВ (ОСНОВЫ ЭНЗИМОЛОГИИ)

Основные вопросы, рассматриваемые в настоящей главе

1. Роль ферментов в жизнедеятельности организма
2. Структура ферментов
3. Номенклатура ферментов
4. Классификация ферментов
5. Шифры ферментов
6. Механизм действия ферментов
 - 6.1. Сходство ферментов с минеральными катализаторами
 - 6.2. Энергетический барьер реакции и энергия активации
 - 6.3. Структура активного центра ферментов
7. Свойства ферментов, обусловленные их белковой природой
 - 7.1. Общие свойства ферментов как белковых структур
 - 7.2. Специфические свойства ферментов
8. Методы определения и единицы активности ферментов
9. Изоферменты
10. Распределение ферментов в организме
11. Локализация ферментов внутри клетки
12. Основные направления развития медицинской энзимологии
 - 12.1. Энзимопатология. Понятие об энзимопатиях
 - 12.2. Энзимодиагностика
 - 12.3. Принципы и основы энзимотерапии
13. Регуляция действия ферментов
 - 13.1. Регуляторные ферменты
 - 13.2. Аллостерическая модификация ферментов
 - 13.3. Ковалентная модификация ферментов
14. Гормональные механизмы регуляции синтеза и активности Ферментов
 - 14.1. Общая характеристика гормонов
 - 14.2. Классификация гормонов
 - 14.3. Механизм действия гормонов

Вопросы для проверки усвоения

Одной из основных функций белков, определяющих их важнейшую роль в жизнедеятельности человека и животных, является ферментативная.

ФЕРМЕНТЫ (ЭНЗИМЫ) - БИОЛОГИЧЕСКИЕ КАТАЛИЗАТОРЫ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ

Раздел биохимии, изучающий структуру, свойства, биологическую роль ферментов и возможность их использования с практической целью получил название ЭНЗИМОЛОГИИ.

Название ф е р м е н т произошло от латинского слова fermentum - закваска, которым обозначались вещества, содержащиеся в дрожжах и ускоряющие процесс брожения. Другой, не менее широко распространенный термин, - э н з и м - происходит от греческого "en zyme " - содержащийся в дрожжах.

Подобно всем белкам ферменты избирательно присоединяют определенные вещества – л и г а н д ы .

Лиганд, присоединяющийся к ферменту и подвергающийся химическим превращениям, называется СУБСТРАТОМ; вещества, образовавшиеся из него под действием фермента, – ПРОДУКТАМИ РЕАКЦИИ

2.1. Роль ферментов в жизнедеятельности организма

Согласно современным представлениям

ферменты являются функциональными единицами клеточного метаболизма

Они действуют в строго определенной последовательности: каждый из них катализирует одну из реакций многостадийных процессов, в ходе которых осуществляются обменные превращения всех субстратов в клетке. Ферменты обеспечивают реализацию таких важнейших механизмов, как передача наследственной информации, освобождение и аккумуляция энергии, синтез и распад биологически активных соединений и др.

Особая группа так называемых р е г у л я т о р н ы х ферментов воспринимает метаболические и гормональные сигналы, в соответствии с которыми они изменяют свою активность, а следовательно, и скорость соответствующих реакций. Благодаря этому обеспечивается чёткая координация и взаимосвязь отдельных обменных процессов в организме.

Понижение активности или полное отсутствие ферментов в тканях приводит к возникновению патологических состояний – наследственных и при-

обретенных энзимопатий, определяя их ведущие проявления и клинические симптомы.

Ферменты находят широкое применение в медицинской практике с целью диагностики и лечения заболеваний, в биотехнологии для синтеза биологически активных соединений, в химической и пищевой промышленности.

2.2. Структура ферментов

Ферменты по своей природе являются простыми или сложными белками

Ферменты - простые белки представлены полипептидными цепями и при гидролизе распадаются только на аминокислоты.

Ферменты - сложные белки (холоферменты) состоят из двух частей: простого белка (апофермента), и небелковой части - кофактора. **Кофактор** представлен веществами неорганической природы (чаще всего ионами металлов) или органическими соединениями, которые могут быть либо рыхло связаны с апоферментом (**коферментные группы**) либо соединяются с ним прочными связями (**простетические группы**).

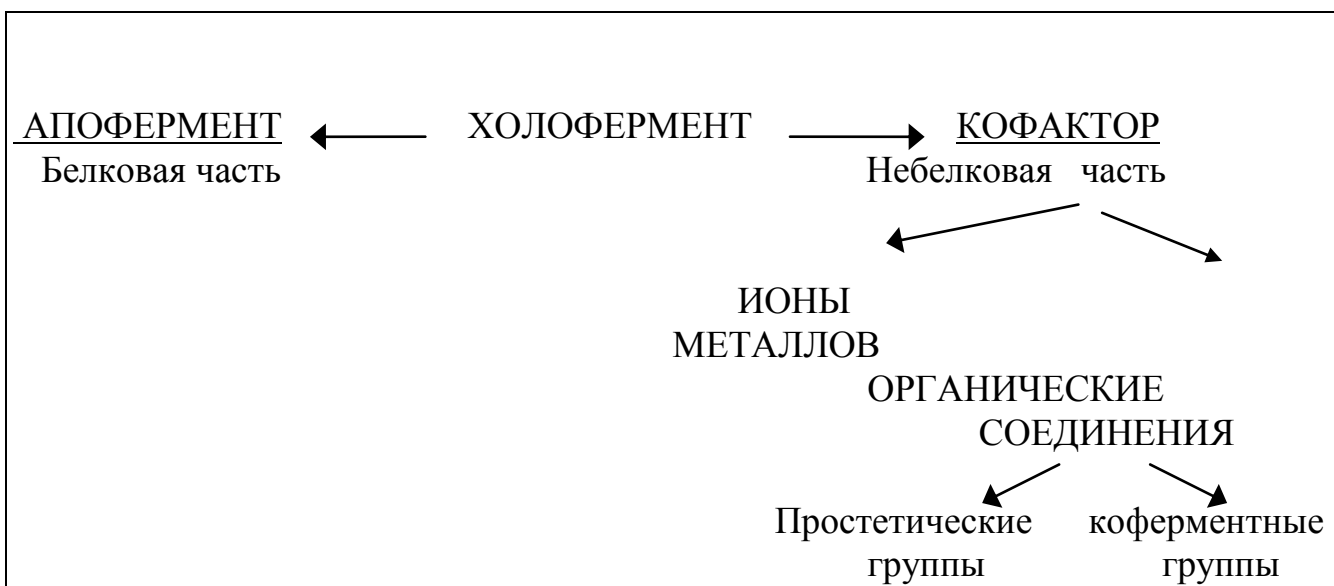


Рис. 1. Структура ферментов – сложных белков

По отдельности ни апофермент, ни кофактор каталитической активностью не обладают: она проявляется лишь при объединении их друг с другом.

Апоферменты синтезируются в организме, термолабильны и определяют специфичность ферментов. Кофактор термостабилен, не всегда может образоваться в организме и поэтому должен поступать с пищей

Важнейшими кофакторами ферментов кроме металлов являются витамины, производные которых входят в состав большого числа ферментов; нуклеотиды и

нуклеозиды (адениловая кислота, АТФ, уридинфосфаты) и некоторые другие соединения

2.3. Номенклатура ферментов

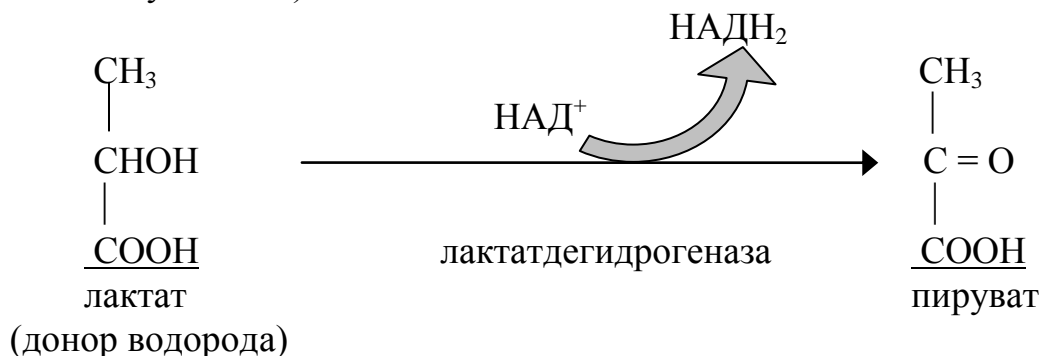
Для обозначения ферментов используются рабочие и систематические названия. В основе **рабочих** названий лежат несколько принципов:

2.3.1. Название фермента чаще всего складывается из **названия субстрата с добавлением окончания - аза**. Например, фермент, расщепляющий крахмал (amylum), называется амилазой; фермент, участвующий в распаде РНК - рибонуклеазой.

2.3.2. Многие ферменты обозначаются по **названию субстрата и характеру катализируемой реакции**. Например, фермент, окисляющий молочную кислоту, называется лактатдегидрогеназой; фермент, синтезирующий глутамин, – глутаминсинтетазой.

2.3.3. Некоторые ферменты имеют **исторически сложившиеся случайные названия** (например, термин « пепсин » происходит от слова pepsis - пищеварение, « трипсин » - от слова tripsis - разжижаю).

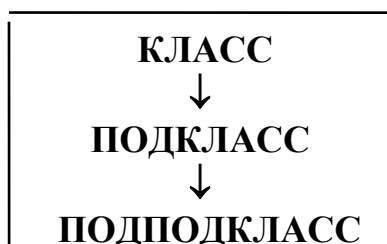
Систематические названия ферментов также складываются из **названий субстратов, участвующих в реакции, и класса, к которому принадлежит данный фермент**. Они отражают функцию фермента и полностью характеризуют его действие. Так, систематическое название лактатдегидрогеназы - L -лактат: НАД⁺ - оксидоредуктаза - означает, что данный фермент катализирует окислительно-восстановительную реакцию, в которой донором водорода является лактат, а акцептором - НАД⁺ (никотинамиддинуклеотид).



2.4. Классификация ферментов

В основу современной классификации ферментов (1961 г.) положен **тип катализируемой реакции**, специфичной для действия данного фермента

Согласно современной классификации все ферменты делятся на классы, классы - на подклассы, а подклассы – на подподклассы.



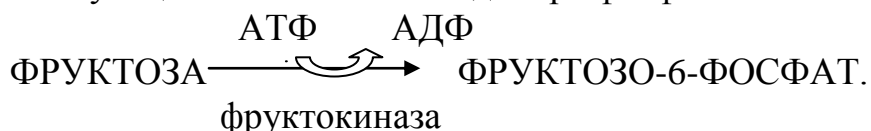
К л а с с указывает на тип катализируемой реакции.

В **подклассе и подподклассе** более детально характеризуется действие фермента, указывается природа химической группы субстрата, изменяющейся под его действием, конкретизируется тип преобразуемой связи или уточняется химическая природа доноров и акцепторов, участвующих в данной реакции.

Все ферменты подразделяются на 6 классов:

2.4.1. Оксидоредуктазы - катализируют окислительно-восстановительные реакции. Окисляющийся субстрат рассматривается как донор водорода, в связи с чем большинство ферментов этого класса называют дегидрогеназами. К оксидоредуктазам относятся такие ферменты, как **анаэробные дегидрогеназы**, переносящие протоны и электроны на промежуточный субстрат; **аэробные дегидрогеназы (оксидазы)**, катализирующие перенос водорода непосредственно на кислород; **цитохромы**, осуществляющие транспорт электронов; **каталаза и пероксидаза**, катализирующие реакции с участием H_2O_2 . Этот класс включает 480 ферментов, разделенных на 17 подклассов, в которых указывается тип связи в молекуле донора, подвергающейся окислению ($CH-OH$, $C=O$, $CH-NH_2$, $CH-CH_2$ и т.д.).

2.4.2. Трансферазы - осуществляют перенос атомов или групп атомов между отдельными субстратами (от донора к акцептору). В зависимости от характера переносимой группы они делятся на 8 подклассов: аминотрансферазы, трансферазы, переносящие одноуглеродные группы (метильные, карбоксильные, формильные), фосфотрансферазы, ацилтрансферазы, гликозилтрансферазы и т.д. В подкласс фосфотрансфераз входят киназы - ферменты, использующие АТФ в качестве донора фосфатного остатка.



2.4.3. Гидролазы - ферменты, расщепляющие внутримолекулярные связи в субстрате с участием молекул воды. В зависимости от характера расщепляемой связи этот класс, объединяющий свыше 460 ферментов, делится на 11 подклассов: эстеразы, гликозидазы, пептидазы, амидазы и т.д.

2.4.4. Лиазы - ферменты, катализирующие:

- разрыв связей между атомами С - О, С - N, С - С и др., а также обратимые реакции отщепления различных групп от субстрата негидролитическим путём;
- учитывая обратимость ферментативных реакций, присоединение различных групп по месту разрыва образовавшихся при этом двойных связей.

К лиазам относятся такие ферменты, как альдолаза, декарбоксилазы, гидратазы, дегидратазы и т.д.

2.4.5. Изомеразы - ферменты, осуществляющие различные типы реакции изомеризации. Класс включает около 80 ферментов, подразделяемых на 4 подкласса в зависимости от типа реакции изомеризации – рацемазы и эпимеразы, цис-транс-изомеразы и т.д. Ферменты, катализирующие внутримолекулярный перенос атомов, называются мутазами.

2.4.6. Лигазы (синтегазы) - ферменты, участвующие в синтезе различных соединений с использованием энергии АТФ. Делятся на 4 подкласса в зависимости от характера новообразуемой связи (например, глутаминсинтетаза катализирует синтез глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака в присутствии АТФ).

2.5. Шифры ферментов

На основании принятой классификации составлен список, включающий свыше 2000 известных в настоящее время ферментов. Для каждого из них разработан шифр (КФ) в виде четырехзначного кода:

I цифра - **обозначает номер класса, к которому относится фермент.**

II цифра - **номер подкласса.**

III цифра - **номер подподкласса.**

IV цифра - **порядковый номер фермента в данном подподклассе (в алфавитном порядке).**

Так, указанный выше фермент - лактатдегидрогеназа, участвующий в обратимой реакции окисления лактата в пируват и содержащий НАД в качестве кофермента, имеет шифр КФ I. I. I. 27.

Этот шифр обозначает, что лактатдегидрогеназа относится к I классу (оксидоредуктазы), I подклассу (ферменты, окисляющие связь СН-ОН в субстрате), I подподклассу (ферменты, акцептором водорода у которых является НАД) и занимает 27 место в этом подподклассе.

2.6. Механизм действия ферментов

2.6.1. Сходство ферментов с минеральными катализаторами

Ферменты, как и минеральные катализаторы:

- **проявляют своё действие в ничтожно малых концентрациях.** Так, амилаза ускоряет гидролиз крахмала даже в разведении 1: 1000000. Одна

молекула каталазы способна ускорить разложение 5 миллионов молекул пероксида водорода в 1 минуту; карбоангидраза гидратирует 10^5 молекул CO_2 в 1 секунду;

- **не расходуются в ходе катализируемой ими реакции** и выходят из неё в неизменном виде;

- **не могут инициировать реакцию**, а лишь изменяют скорость химических превращений;

- **не смещают химического равновесия**: ускоряют как прямую, так и обратную реакцию, причем её направленность при данной температуре определяется лишь концентрацией исходных субстратов и конечных продуктов;

- **снижают энергию активации и обеспечивают течение реакции в обход энергетического барьера**.

2.6.2. Энергетический барьер реакции и энергия активации

Как известно, в химическую реакцию могут вступить лишь те молекулы, которые имеют определенный запас энергии.

Уровень энергии молекул, необходимый для протекания данной химической реакции, называется энергетическим барьером

Та избыточная энергия, которая необходима для перевода всех молекул одного моля вещества в активированное состояние для достижения или превышения энергетического барьера при обычной температуре, называется энергией активации

Энергия активации зависит от природы реагирующих веществ, их внутреннего строения. Источником энергии активации служит тепловое движение молекул.

При участии фермента реакция осуществляется в обход энергетического барьера

Это обусловлено тем, что в ходе реакции фермент вступает во взаимодействие с субстратом с образованием промежуточного соединения – фермент-субстратного комплекса.



(E – фермент, S – субстрат, P – продукт, ES – фермент-субстратный комплекс).

При этом происходит изменение конформации субстрата, создается напряжение ковалентных связей, в результате чего энергии, необходимой для их разрыва, потребуется значительно меньше, т.е. **реакция с высокой энергией активации заменяется реакцией с низкой её величиной**.

2.6.3. Структура активного центра ферментов

В ходе ферментативной реакции субстрат присоединяется к специфическому участку фермента, называемому **активным центром**.

Активный центр – тот участок молекулы фермента, который обуславливает возможность присоединения субстрата и его химические превращения

У фермента - сложного белка в образовании активного центра, как правило, принимает участие коферментная или простетическая группа; у фермента - простого белка активный центр представлен **участком полипептидной цепи, включающим определенные аминокислоты**.

У различных ферментов активные центры имеют неодинаковое строение, однако характеризуются рядом общих закономерностей:

а) формирование активного центра происходит одновременно с формированием третичной структуры

Поэтому любые воздействия, приводящие к изменению третичной структуры фермента, сопровождаются нарушением конформации активного центра и, следовательно, потерей ферментативной активности.

б) структура активного центра фермента комплементарна структуре соответствующего субстрата

Еще в 1890 г. Эмиль Фишер для характеристики взаимодействия фермента с субстратом использовал сопоставление "ключ - замок", на основании которого сформировалось представление о стереоспецифичности ферментативного катализа (рис.2).

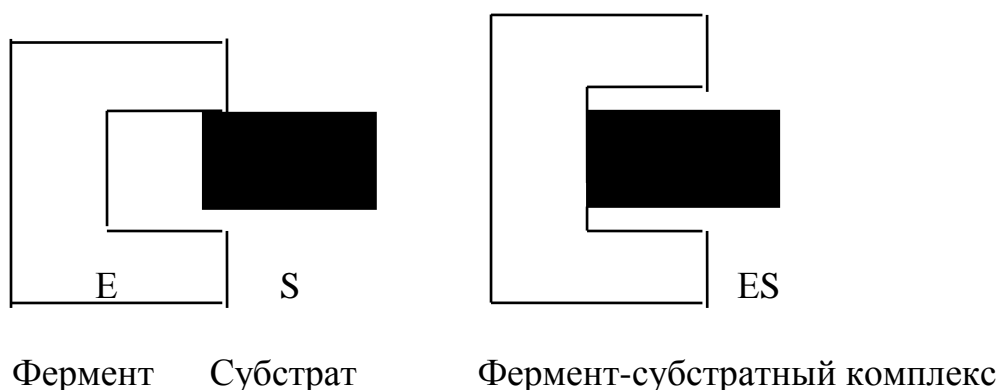


Рис.2. Взаимодействие фермента с субстратом по типу "ключ-замок".

Однако активные центры некоторых ферментов не являются жесткой структурой и могут модифицировать свою форму в процессе взаимодействия с субстратом. У этих ферментов активный центр становится комплементарным субстрату только во время его связывания (в этом случае уместно сопоставление не «ключ-замок», а «рука – перчатка»).

Такой процесс динамического узнавания получил название индуцированного соответствия (рис.3).

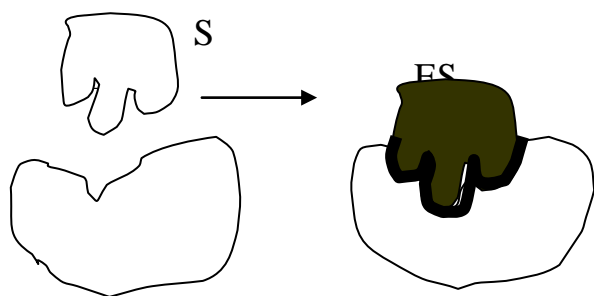


Рис. 3. Взаимодействие фермента с субстратом по типу «рука-перчатка»

в) субстраты вступают во взаимодействие с ферментами на очень короткий промежуток времени

В образовании фермент-субстратного комплекса участвуют водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия, а в ряде случаев ковалентные и координационные связи.

г) в активном центре различают субстратсвязывающий (контактный или якорный) участок, который обеспечивает присоединение фермента к субстрату и формирование фермент-субстратного комплекса, и каталитический участок, непосредственно осуществляющий химические превращения субстрата

Субстратсвязывающий (контактный или якорный) участок у большинства ферментов представлен узким углублением или нишей, содержащей гидрофобные радикалы аминокислот (гидрофобный карман), куда входит участок полипептидной цепи субстрата (бензольное кольцо или гидрофобные радикалы аминокислот). Между аминокислотными остатками активного центра фермента и субстратом образуются связи (гидрофобные, водородные, ионные) и формируется фермент-субстратный комплекс.

У ряда же ферментов (например, холинэстеразы, участвующей в гидролитическом расщеплении ацетилхолина) в состав якорного участка входят

остатки аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, в результате чего здесь концентрируется отрицательный заряд, к которому притягивается положительно заряженная головка субстрата (ацетилхолина).

За счёт взаимодействия с контактными центрами молекула субстрата ориентируется на молекуле фермента таким образом, что при этом атакуемая ферментом связь оказывается расположенной в непосредственной близости от каталитического участка.

В каталитическом участке располагаются группы аминокислот (серин, гистидин, аспарагиновая кислота), которые являются донорами или акцепторами протонов. Между каталитическим центром и субстратом образуются нестабильные промежуточные соединения, что вызывает напряжение в молекуле субстрата или её деформацию. В результате этого энергетический барьер реакции понижается, и расщепление субстрата ускоряется в сотни раз.

2.7. Свойства ферментов, обусловленные их белковой природой

Белковая природа ферментов определяет ряд свойств, отличающих их от минеральных катализаторов.

2.7.1. Общие свойства ферментов как белковых структур

а) амфотерность;
б) электрофоретическая подвижность;
в) способность осаждаться из растворов путем высаливания;
г) неспособность проходить через полупроницаемые мембраны;
д) способность к кристаллизации. Первым ферментом, полученным в кристаллическом состоянии Самнером в 1926 г., был фермент **уреаза**, расщепляющий мочевины. В настоящее время в кристаллическом виде получено более 200 ферментов.

Однако наряду с общими для всех белков свойствами ферменты обладают и рядом уникальных, только им присущих специфических свойств.

2.7.2. Специфические свойства ферментов

В отличие от минеральных катализаторов активность ферментов является регулируемой, что позволяет изменять скорость превращения веществ в организме в зависимости от условий среды.

К специфическим свойствам ферментов относятся:

а) высокая специфичность действия;
б) зависимость действия от температуры;
в) зависимость действия от рН среды;
г) зависимость действия от ингибиторов
д) зависимость действия от активаторов.

2.7.2.1. Высокая специфичность действия

Ферменты обладают высокой специфичностью действия как в отношении катализируемой ими реакции, так и в отношении субстратов, участвующих в ней

РАЗЛИЧАЮТ 3 ВИДА СПЕЦИФИЧНОСТИ ФЕРМЕНТОВ:

- а) абсолютную (индивидуальную);**
- б) относительную (групповую);**
- в) стереохимическую (пространственную)**

Ферменты, обладающие абсолютной специфичностью, катализируют превращение лишь одного определенного субстрата. Так, например, каталаза расщепляет только перекись водорода, уреазы – только мочевины.

Ферменты групповой специфичности действуют на группу сходных по структуре субстратов, имеющих одинаковый тип связи. Например, пепсин расщепляет те белки, которые содержат пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами, липаза – гидролизует сложноэфирные связи в различных по структуре триацилглицеринах.

Сtereохимическая специфичность – способность фермента катализировать превращение только одного стереоизомера субстрата. Например, фумараза может расщеплять лишь *trans*-изомер - фумаровую кислоту и не взаимодействует с *cis*-изомером – малеиновой кислотой; β -глюкозидаза расщепляет только β -глюкозидные связи, не взаимодействуя с α -изомерами. Большинство ферментов, катализирующих превращение аминокислот, действуют лишь на их L - изомеры, а ферменты, участвующие в обмене углеводов, – на D - изомеры.

7.7.2.3. Зависимость действия ферментов от температуры

При повышении температуры на каждые 10 градусов скорость ферментативной реакции, так же как и всех реакций, протекающих с участием минеральных катализаторов, увеличивается в 2 – 3 раза (правило Вант-Гоффа).

Однако в отличие от минеральных катализаторов эта закономерность проявляется лишь в определенном температурном интервале, лежащем в пределах от 0⁰ до 37–40⁰С. Температура, при которой фермент обладает максимальной активностью, называется **температурным оптимумом (37–40⁰С)**. При более высоких температурах начинается постепенная денатурация

фермента, его активность понижается и при 80 –90 °С полностью подавляется (рис.4).

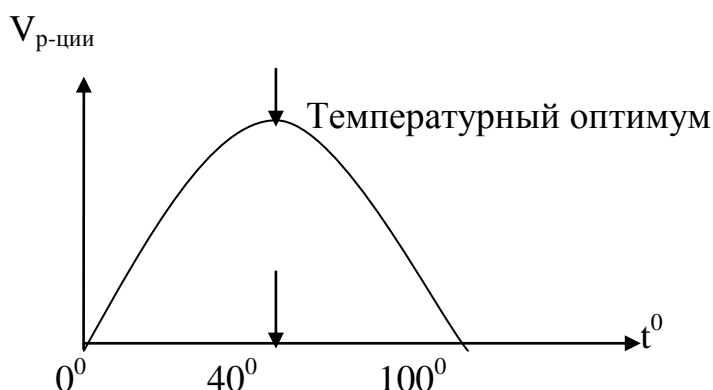


Рис.4. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.

Ферменты, которые подчиняются описанной закономерности, называются **термолабильными**.

Таким образом, **термолабильность, или чувствительность к повышению температуры**, является одним из характерных свойств ферментов, отличающих их от минеральных катализаторов.

Однако среди ферментов выделяют также группу **термостабильных соединений**, которые способны выдерживать высокие температуры и даже проявлять при них максимальное действие. К ним относится, например, миокиназа мышц, которая сохраняет активность при нагревании до 100°C , а также ряд энзимов микроорганизмов-термофилов (обитающих, в частности, в горячих источниках). Как правило, эти ферменты по структуре являются сложными белками-гликопротеинами.

Как видно из рисунка, **при 0°C ферментативная реакция практически прекращается**; однако это ингибирование в отличие от необратимой тепловой денатурации является обратимым, и при создании для фермента оптимальных условий активность его полностью восстанавливается. Разительным примером такого сохранения активности могут служить ферменты, выделенные из туши мамонтов, находившихся длительное время в условиях ледникового периода, но проявляющие при создании оптимальной температуры достаточно высокую активность.

Однако некоторые ферменты при низких температурах не только сохраняют свою активность, но и характеризуются максимальным действием. Так, амилаза картофеля имеет температурный оптимум при -4°C , чем объясняется сладкий вкус подмороженного картофеля.

Изучение зависимости действия ферментов от температуры важно как для понимания процессов жизнедеятельности, так и для использования в практической медицине.

При понижении температуры тела некоторые животные впадают в состояние **анабиоза**, что обеспечивает низкую интенсивность потребления организмом питательных веществ и даёт возможность выжить в неблагоприятных условиях существования.

Искусственное охлаждение организма (гибернация) используется в клинике для **проведения хирургических операций**, в частности, на сердце и кровеносных сосудах. Понижение активности ферментов в этих условиях приводит к снижению интенсивности обменных процессов в организме, в результате чего понижается потребность тканей, в частности, головного мозга, в кислороде.

Охлаждение изолированных органов применяют для **замедления в клетках скорости обменных процессов** и таким образом получают возможность сохранять эти органы определённое время без риска их аутокаталитического распада. На этом же принципе обоснована **сохранность продуктов питания и исследуемых биоматериалов** (сыворотки крови, тканевых срезов и гомогенатов) при низких температурах для возможности их дальнейшего использования.

Применение высоких температур для подавления активности ферментов также используется в медицинской практике, в частности, для стерилизации инструментов, при которой полностью ингибируется активность ферментов микроорганизмов, и они становятся нежизнеспособными.

2.7.2.4. Зависимость действия ферментов от рН среды

Ферменты проявляют свою максимальную активность лишь при определённых значениях рН среды. **Большинство из них действуют при рН 6,8 – 7,4**, т.е. в среде, близкой к нейтральной; однако некоторые из них, наоборот, наиболее активны либо в кислой, либо в щелочной среде. Так, оптимальными значениями рН для действия следующих ферментов являются:

пепсина – 1,5 – 2,5;
трипсина – 7,5 – 8,5;
аргиназы – 8,5 – 9,9;
кислой фосфатазы – 4,5 – 5,0.

При смещении рН в ту или другую сторону от оптимума активность ферментов понижается (рис. 5). Это происходит потому, что

при сдвиге рН изменяется степень диссоциации ионогенных групп в активном центре, что приводит к нарушению конформации фермента и влияет на его сродство к субстрату

Наряду с этим при сдвиге рН по той же причине изменяется и конформация субстрата.

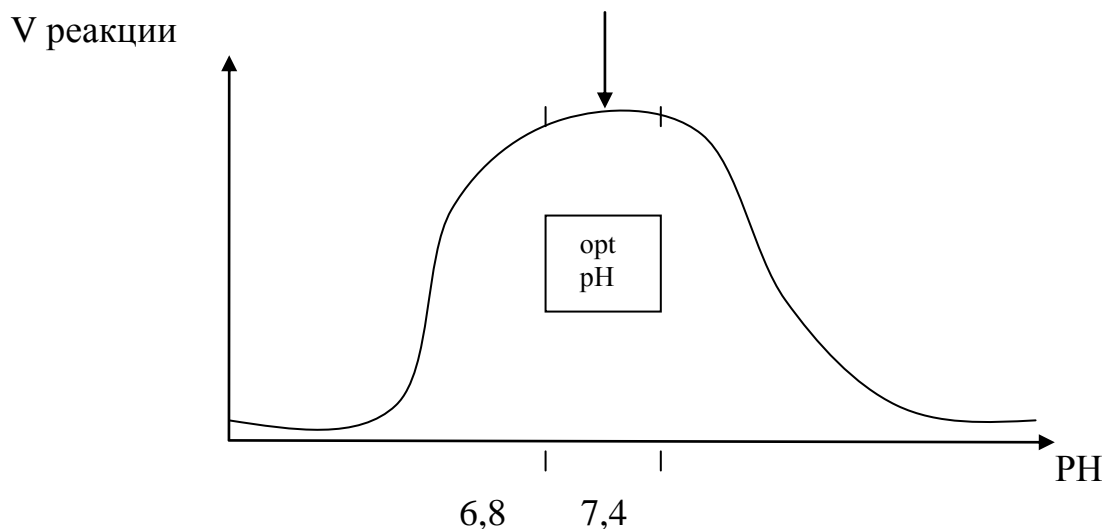
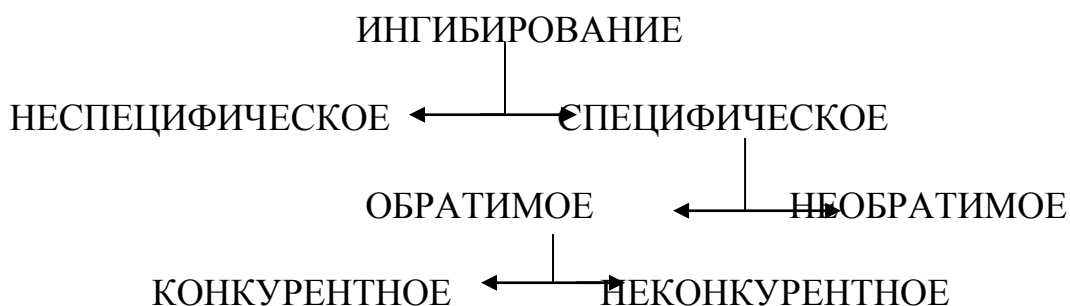


Рис. 5. Влияние рН на активность ферментов.

2.7.2.5. Зависимость действия ферментов от наличия ингибиторов

Ингибиторы – вещества, вызывающие частичное или полное торможение ферментативной активности

Различают несколько типов ингибирования:



Неспецифические ингибиторы вызывают денатурацию апофермента; их влияние непосредственно не связано с воздействием на активный центр, и поэтому ингибитор подавляет активность не одного, а большинства ферментов. К ним относятся соли тяжелых металлов, органические и минеральные кислоты и другие денатурирующие агенты.

Специфические ингибиторы оказывают влияние лишь на один или группу ферментов

Их действие связано непосредственно с механизмом ферментативного катализа. Различают необратимое и обратимое специфическое ингибирование.

Необратимое специфическое ингибирование обусловлено тем, что ингибитор соединяется ковалентными связями с функциональными группами фермента, необходимыми для проявления его активности. Действие ингибиторов может быть обусловлено:

а) блокированием SH-групп в активном центре (йодацетат и др.);

б) связыванием ионов металла в молекуле фермента (цианиды, например, связывают трёхвалентное железо в простетической группе цитохромов, блокируя перенос электронов от окисляемого субстрата по дыхательной цепи на кислород);

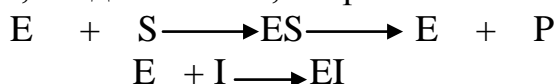
в) взаимодействием с остатком серина в каталитическом центре. Так, например, диизопропилфторфосфат (ДФФ) – отравляющее вещество нейропаралитического действия, – связываясь с остатком серина в активном центре ацетилхолинэстеразы, блокирует её активность. В результате разрушение ацетилхолина становится невозможным, и нейроны утрачивают способность проводить нервные импульсы.

Необратимое специфическое ингибирование не зависит от концентрации ингибитора

Обратимое специфическое ингибирование может быть конкурентным и неконкурентным

Конкурентные (изостерические) ингибиторы имеют структуру, похожую на структуру субстрата, и поэтому могут связываться с активным центром фермента, что препятствует образованию фермент-субстратного комплекса

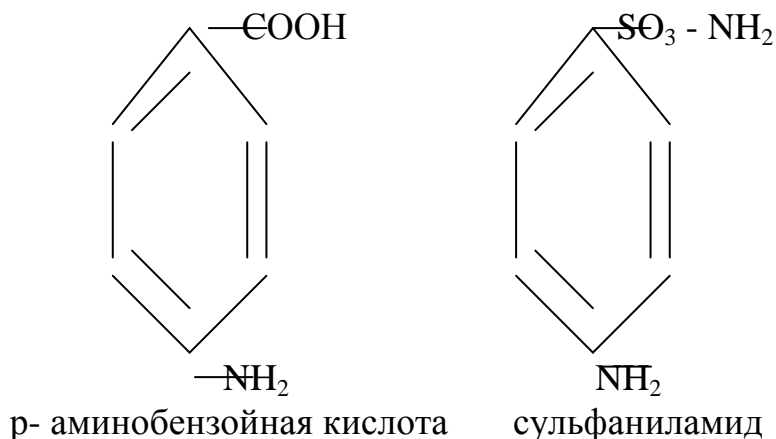
В результате уменьшается количество молекул фермента, способных соединяться с субстратом и, следовательно, скорость катализа повышается.



При повышении концентрации субстрата возможность образования фермент-субстратного комплекса увеличивается. Поэтому при достаточно высокой концентрации субстрата практически весь фермент будет находиться в форме комплекса ES и скорость реакции будет достаточной, несмотря на присутствие ингибитора. Таким образом,

конкурентное ингибирование можно снять, повышая концентрацию субстрата

На принципе конкурентного ингибирования основано **действие различных лекарственных препаратов**, имеющих структурное сходство с субстратами, необходимыми для жизнедеятельности различных микроорганизмов.



Так, например, сульфаниламидные препараты, применяемые для лечения некоторых инфекционных заболеваний, похожи на структуру р-аминобензоата, входящего в структуру фолиевой кислоты, являющейся коферментом энзимов микроорганизмов. При введении в организм сульфаниламидных препаратов они вытесняют р-аминобензоат из комплекса с ферментом, что приводит к торможению роста бактерий.

Неконкурентное ингибирование вызывается веществами, не имеющими структурного сходства с субстратом

Неконкурентные ингибиторы связываются не с активным центром, а с другим участком молекулы фермента - аллостерическим или регуляторным центром, изменяя его конформацию. При этом происходит сопряженное изменение конформации активного центра, приводящее к затруднению взаимодействия фермента с субстратом реакции.

Степень торможения активности фермента неконкурентными ингибиторами зависит от продолжительности их действия и их концентрации, но в отличие от конкурентного торможения

НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ НЕ МОЖЕТ БЫТЬ СНЯТО ПОВЫШЕНИЕМ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

2.7.2.6. Зависимость действия ферментов от наличия активаторов

Активаторы - вещества, которые повышают активность ферментов или переводят их неактивные формы (проферменты) в активное состояние

К активаторам относятся:

1. Ионы металлов. Ионы металлов являются и кофакторами ферментов, и их активаторами. Механизм активирующего действия металлов может быть различен:

- они могут входить в состав активного центра ферментов, принимая непосредственное участие в ферментативной реакции;

- они способствуют формированию и стабилизации каталитически активной конформации апофермента за счёт образования солевых мостиков между металлом и карбоксильными группами кислых аминокислот, а также между отдельными субъединицами, входящими в состав четвертичной структуры фермента (цинк, например, стабилизирует таким путем алкогольдегидрогеназу, так как без него она диссоциирует на отдельные субъединицы);

- они могут взаимодействовать с субстратами, образуя металл-субстратные комплексы, которые легче взаимодействуют с ферментами (например, магний образует комплекс с АТФ, расщепляемый АТФ-азой);

- при помощи металла может связываться апофермент с коферментом.

2. Соединения, содержащие в своём составе SH-группы (цистеин, глутатион)

3. Специфические активаторы (соляная кислота активирует пепсиноген желудочного сока; желчные кислоты - панкреатическую липазу, хлориды - α -амилазу слюны и т.д.).

Превращение неактивных форм ферментов (проферментов) в активные осуществляется путём **ограниченного протеолиза, т.е. отщепления отдельных аминокислот или пептидов от молекулы профермента** вследствие чего происходит перестройка его пространственной структуры и формируется (демаскируется) активный центр, т.е. неактивный предшественник превращается в активный фермент. Такой механизм активации наиболее характерен для протеолитических ферментов (рис.6).

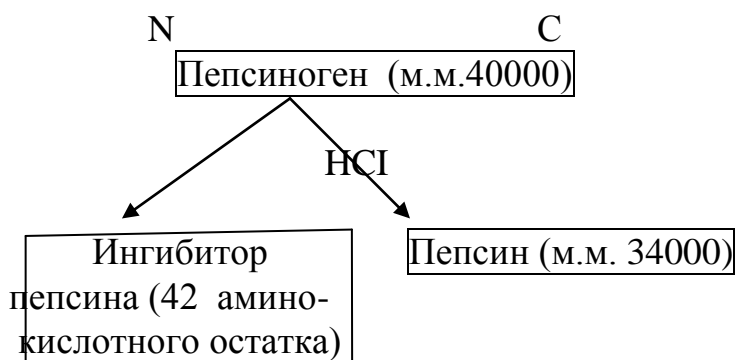


Рис.6. Механизм активации пепсиногена

2. 9. Методы определения и единицы активности ферментов

Методы определения активности ферментов значительно отличаются от обычных химико-аналитических методов, поскольку в большинстве случаев количество фермента в тканях незначительно и его невозможно измерить в абсолютных величинах. Поэтому

о действии фермента судят либо по появлению продукта реакции, либо по исчезновению субстрата, т. е. производимому ферментом действию

Например, подействовала ли амилаза на крахмал, можно определить либо по исчезновению крахмала из сферы реакции (отрицательная проба Люголя), либо по появлению мальтозы или свободной глюкозы (положительная проба Фелинга).

О количестве фермента судят по количеству субстрата, изменяющемуся под действием фермента в единицу времени, т.е. по величине произведенного ферментом действия

Количественная оценка действия фермента может выражаться в международных единицах активности, каталах или числе оборотов фермента.

Международной единицей (МЕ) активности фермента является то количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля субстрата в 1 минуту (мкмоль/мин) при оптимальных условиях

- В связи с введением международной системы единиц СИ активность ферментов можно выражать в каталах

КАТАЛ (КАТ, kat) - количество фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата в 1 секунду (моль/сек)

1 МЕ активности = 16,67 нанокатал.

Число оборотов, или молярная активность, – величина, показывающая, какое количество молекул субстрата подвергается превращениям под действием одной молекулы фермента за единицу времени (1 сек.)

Число оборотов позволяет сравнивать между собой активности различных ферментов. Так, число оборотов каталазы эритроцитов равно 44000, ацетилхолинэстеразы сыворотки крови – 90000, α -амилазы – 19000 и т.д.

Помимо этих единиц, в биохимических исследованиях часто приходится определять удельную активность фермента.

Удельная активность (УА) – число МЕ фермента в пересчете на 1 мг белка

Эта величина характеризует меру чистоты ферментного препарата и определяется при выделении ферментов из тканей и их очистке от других балластных белков. По мере удаления этих белков доля энзима в препарате, т.е. его удельная активность, повышается.

$$УА = \frac{\text{Общая активность фермента в пробе (в единицах)}}{\text{Содержание белка в данной пробе (в мг)}}$$

2.10 . Изоферменты

Изоферменты – множественные формы фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся друг от друга рядом структурных, кинетических и регуляторных свойств

Каждый из изоферментов кодируется особым геном, и поэтому они отличаются друг от друга рядом особенностей:

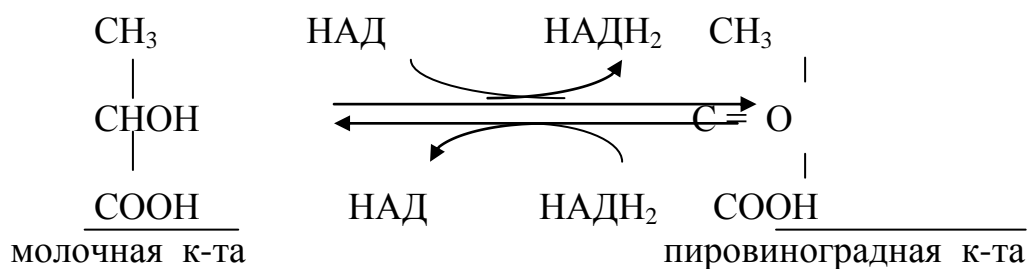
- различным аминокислотным составом и последовательностью расположения аминокислот в молекуле, что отражается на величине их электрического заряда;
- различной локализацией во внутренних органах и различных субклеточных фракциях;
- хотя различные изоферменты катализируют одну и ту же реакцию, однако участвуют либо в протекании прямой, либо обратной реакции
- хотя характеризуются одинаковой специфичностью, но активируются или ингибируются различными концентрациями субстратов, а также неоднозначно относятся к действию ингибиторов.

В настоящее время известно около 100 ферментов, которые обладают изоферментным спектром, разделяющимся методом электрофореза на геле, крахмале, целлюлозе, а также хроматографическими методами.

Классическим примером ферментов, обладающих изоферментным спектром, является лактатдегидрогеназа.

2.10.1. Изоферменты ЛДГ

ЛДГ катализирует обратимую реакцию окисления молочной кислоты в пировиноградную:



Каждый из изоферментов ЛДГ состоит из двух типов субъединиц, обозначаемых условно Н - (heart - сердце) и М-субъединицами (muscle - мышца). Различные их сочетания приводят к возникновению 5 возможных изоферментов ЛДГ (рис.7).

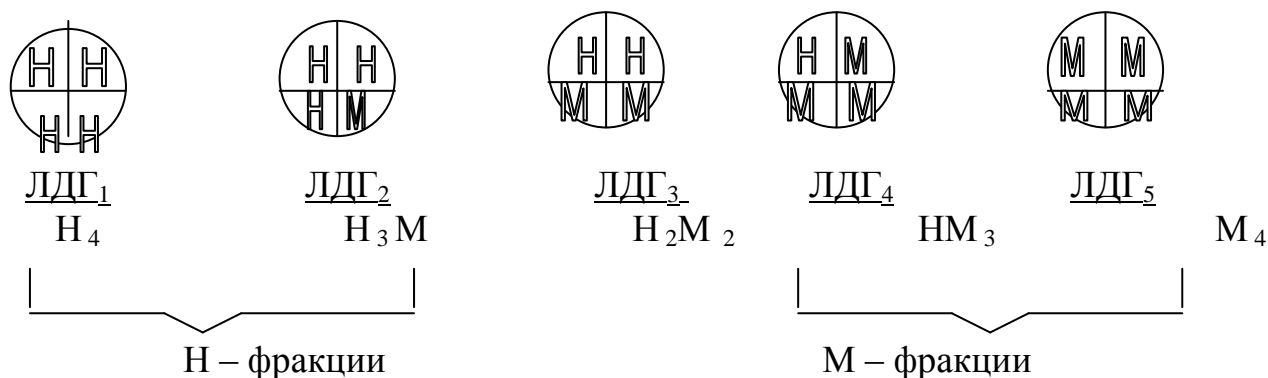


Рис. 7. Изоферменты лактатдегидрогеназы

Н-фракции (ЛДГ₁ и ЛДГ₂) богаты аспарагиновой кислотой, имеют наиболее выраженный отрицательный заряд, при электрофорезе передвигаются к аноду и поэтому называются **анодными фракциями**.

М-фракции (ЛДГ₄ и ЛДГ₅), наоборот, богаты диаминомонокислотами – аргинином и лизином, имеют положительный заряд, при электрофорезе передвигаются к отрицательному электроду и поэтому называются **катодными фракциями**.

Основные различия между изоферментами ЛДГ представлены в таблице 1.

Таблица 1

Различия между изоферментами лактатдегидрогеназы

| | Анодные фракции ЛДГ _{1,2} | Катодные фракции ЛДГ _{4,5} |
|----------------------------|---------------------------------------|--|
| Отрицательный заряд | Максимальный | Минимальный |
| Преобладающие аминокислоты | Моноаминодикарбоновые | Диаминомонокислотные |
| Отношение к кислороду | Фракции аэробные | Фракции анаэробные |

| Катализируемая реакция | Лактат → пируват | Пируват → лактат |
|--|---|---|
| Отношение к субстрату реакции | Проявляют активность при высоких концентрациях лактата, ингибируются высокими концентрациями пирувата | Действуют лишь при высоких концентрациях пирувата, ингибируются высокими концентрациями лактата |
| Локализация в клетке | Митохондрии | Цитоплазма |
| Преимущественная локализация в организме | Сердечная мышца, корковый слой почек | Скелетные мышцы, мозговой слой почек, печень |

Сдвиг изоферментного спектра ЛДГ сыворотки крови в сторону преобладания отдельных фракций может служить диагностическим признаком, свидетельствующим о поражении того или иного органа. Так, повышение в сыворотке крови процентного содержания фракции ЛДГ_{1,2} характерно для заболеваний сердечной мышцы, а ЛДГ_{4,5} – скелетной мышцы и печени. Фракция ЛДГ₃ (H₂M₂) сосредоточена в основном в легочной ткани, и поэтому её содержание в сыворотке крови повышается при заболеваниях легких

2.11. Распределение ферментов в организме

В зависимости от выполняемых функций в организме ферменты можно разделить на 2 группы:

- **ферменты жизнеобеспечения клетки**, присутствующие во всех органах и клетках и обеспечивающие их жизнедеятельность. К ним относятся: ЛДГ, трансаминазы, РНК- и ДНК-полимеразы, ферменты цикла трикарбоновых кислот и т.д. Наиболее богатым спектром этих ферментов обладает печень, наиболее бедным – эритроциты.

- **органоспецифические ферменты**, присутствующие в высокодифференцированных клетках и принимающие участие в выполнении специфических функций данного органа или в протекании метаболических превращений, характерных только для данного вида клеток. Так, ферменты мочевинообразования функционируют исключительно в печени; ферменты, участвующие в синтезе кортикостероидов, – лишь в корковом слое надпочечников.

Однако некоторые органоспецифические ферменты могут быть обнаружены и в других органах, хотя здесь активность их очень низкая. Так, кислая фосфатаза, локализованная в основном в предстательной железе, где её активность составляет 1200 ед/г ткани, обнаруживается также в почках, однако здесь она равна лишь 2,9 ед/г.

2.12. Локализация ферментов в клетке

В основе распределения ферментов в клетке лежит принцип компартментализации

Компартментализация – приуроченность ферментных систем к определенным участкам клетки

Различные органеллы клетки – ядро, митохондрии, лизосомы, мембраны – имеют строго специфический набор ферментов. Так, в лизосомах локализованы гидролазы, в митохондриях – оксидоредуктазы, в ядре – ферменты синтеза нуклеиновых кислот. Такое распределение обуславливает возможность одновременного протекания в клетке разнонаправленных процессов, часто не совместимых друг с другом (синтез и распад, фосфорилирование и дефосфорилирование и др.)

2.13. Основные направления развития медицинской ЭНЗИМОЛОГИИ

Успехи общей и молекулярной энзимологии способствовали развитию её новой ветви – медицинской энзимологии, играющей большую роль в решении вопросов профилактики, диагностики и лечения заболеваний. Не подлежит сомнению, что в основе патогенеза любого заболевания лежат нарушения метаболических процессов, а следовательно, изменения определенных ферментных систем.

Изучение роли ферментов в развитии патологических состояний, использование их с целью диагностики и лечения составляют основные задачи медицинской энзимологи



2.13.1. Энзимопатология. Понятие об энзимопатиях

Энзимопатология – область клинической энзимологии, занимающаяся изучением этиологии и патогенеза различных энзимопатий

Энзимопатии – патологические состояния, в основе патогенеза которых лежат изменения активности, количества или компартиментализации ферментов.

Различают наследственные и приобретенные энзимопатии

Наследственные энзимопатии могут быть обусловлены двумя причинами:

- нарушением биосинтеза фермента, что приводит к полному выпадению соответствующей ферментативной реакции в организме;
- изменениями первичной структуры фермента, возникающими вследствие точечных мутаций.

Примерами наследственных энзимопатий могут служить **гликогенозы** – заболевания, связанные с нарушением синтеза ферментов, участвующих в распаде гликогена; **липидозы** (болезнь Гоше и болезнь Тей-Сакса), обусловленные накоплением гликолипидов в клетках и органах, вследствие выпадения активности гликозидаз, участвующих в их распаде; различные энзимопатии аминокислотного обмена – **фенилпировиноградная олигофрения, алкаптонурия** и др.

Приобретенные энзимопатии сопровождают практически все заболевания. Они возникают либо из-за нарушения компартиментализации фермента, либо вследствие временного прекращения его биосинтеза.

Нарушение компартиментализации протеолитических ферментов имеет место, например, **при остром панкреатите**, когда из-за повреждения мембранного аппарата лизосом ферменты выходят в цитозоль, преждевременно активируются и проявляют свою активность еще находясь внутри клеток. В результате происходит цитолиз клеток железы и стенок пронизывающих её сосудов.

Аналогичная картина наблюдается при **силикозе легких**, развивающемся под влиянием кремниевой пыли, попадающей при вдыхании воздуха в легочную ткань. Частицы пыли разрывают лизосомальную мембрану, что приводит к освобождению лизосомальных ферментов и к разрушению клеток, замещающихся в дальнейшем соединительной тканью.

Временное прекращение биосинтеза ферментов наиболее часто встречается в детском возрасте; в частности, у грудных детей может развиваться временная недостаточность лактазы, что приводит к диарее при грудном вскармливании, появляющейся внезапно на фоне полного здоровья ребенка. Со временем активность фермента восстанавливается.

2.13.2. Энзимодиагностика

Энзимодиагностика – выявление комплекса энзимологических нарушений, характерного для определенного заболевания

Изменения ферментного состава крови при разных заболеваниях неоднозначны, поэтому определение ферментов в сыворотке крови используется как способ их диагностики. В плазме крови здоровых людей имеется небольшой по сравнению с клетками набор ферментов, и их концентрация значительно ниже, чем в тканях. Все ферменты плазмы крови можно условно разделить на 3 группы: клеточные, секреторные и экскреторные.

Клеточные ферменты поступают в кровь из органов и тканей, где их концентрация значительно выше, чем в крови. В кровоток эти ферменты попадают в результате повреждения клеточных мембран, а также естественной гибели клеток.

Секреторные ферменты, синтезирующиеся клетками, поступают в кровь, где выполняют специфические функции (ферменты фибринолиза, калликреин-кининовой системы и др.)

Экскреторные функции образуются пищеварительными железами и из их секретов поступают в кровь (амилаза, липаза, трипсин и др.).

Наиболее часто наблюдается повышение активности ферментов в сыворотке крови – **гиперферментемия**. Она может быть обусловлена повышенной гибелью клеток, усиленной их пролиферацией с ускорением клеточного цикла (опухолевый рост), повышенным синтезом ферментов и обструкцией путей их секреции в полости, а также понижением их распада (рис.8).

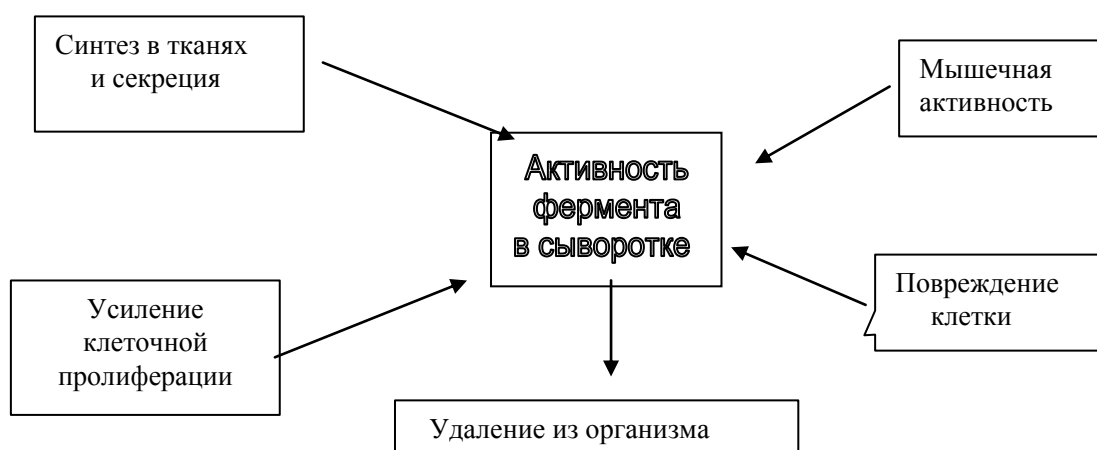


Рис.8. Факторы, влияющие на активность ферментов в сыворотке.

В ряде случаев отмечается **появление в крови ферментов**, отсутствующих в норме. Так, обнаружение в крови ферментов синтеза

мочевины, протекающего только в печени, свидетельствует о повреждении этого органа.

Понижение активности ферментов – **гипоферментемия** отмечается значительно реже (например, понижение активности холинэстеразы при инфаркте миокарда).

Определение активности ферментов с целью диагностики различных заболеваний дает возможность врачу:

- получить информацию **о локализации** очага повреждения; в этом отношении наибольший эффект имеет определение активности **органоспецифических ферментов**, а также **изоферментов**, поскольку каждый орган характеризуется специфическим изоферментным спектром;
- сделать заключение **о прогнозе** заболевания, так как степень повышения активности фермента в сыворотке крови, как правило, пропорциональна тяжести поражения;
- получить существенную помощь при **дифференциальной диагностике** заболеваний, сходных по клиническому течению и жалобам больного;
- судить об **эффективности проводимого лечения**.

Помимо этого, ферменты в последние годы получили широкое распространение в качестве основных аналитических реагентов при лабораторной диагностике различных заболеваний. Так, они широко используются для определения содержания глюкозы (глюкозооксидазный метод), холестерина, мочевой кислоты и ряда других биохимических показателей в крови.

2.13.3. Принципы и основы энзимотерапии

Энзимотерапия – использование ферментов и регуляторов их активности в качестве лекарственных препаратов

Основными преимуществами энзимотерапии являются:

- **строгая избирательность действия** вводимого препарата, воздействующего точно на пораженное звено метаболизма;
- **отсутствие токсичности**;
- **высокая эффективность**.

Основными направлениями энзимотерапии являются:

- **использование ферментов с целью заместительной терапии** в качестве средств, восполняющих их недостаточное количество (например, применение пепсина в сочетании с соляной кислотой при ахилических гастритах или других заболеваниях желудка);
- **использование ферментов как лекарственных средств** при лечении различных патологических процессов. Так, **трипсин** применяют для лечения

ожогов, язв, при первичной обработке ран: гидролизируя белки разрушенных клеток, он способствует очищению раны и уменьшению воспалительных явлений.

При лечении бронхитов, сопровождающихся образованием вязкой и трудноотделяемой мокроты, которая содержит остатки лейкоцитов, имеющих большое ядро и богатых ДНК, используется **дезоксирибонуклеаза**, при ингаляции которой разрушаются ядра и повышается отделение мокроты. ДНК-аза находит применение и при лечении вирусных заболеваний (глазные капли, содержащие ДНК-азу, оказывают положительное действие при лечении вирусного конъюнктивита).

Большим достижением в лечении лейкозов стало применение **аспарагиназы**. Лейкоциты, содержание которых при лейкозах резко увеличивается, неспособны самостоятельно образовывать аспарагин, необходимый для синтеза белка, и поглощают его из плазмы крови. Аспарагиназа разрушает аспарагин, вследствие чего лейкоциты лишаются этого единственного источника; синтез белка в них нарушается – клетки погибают. В то же время все остальные клетки способны к биосинтезу аспарагина и поэтому в этих условиях не страдают.

- **использование коферментов и ингибиторов** с целью подавления активности определенной ферментной системы. Так, сульфаниламиды являются конкурентными ингибиторами ферментов микроорганизмов, требующих для своей жизнедеятельности синтеза р-аминобензойной кислоты (см. стр.); противоопухолевые препараты тормозят активность ферментов биосинтеза нуклеиновых кислот в клетках злокачественных опухолей; ингибиторы протеиназ (трасилол, контрикал) нашли применение в лечении острых панкреатитов, артритов, аллергических заболеваний.

Однако широкому распространению энзимотерапии препятствуют ряд сложностей, которыми сопровождается применение ферментов. К ним относятся:

- лабильность ферментов;
- их выраженные антигенные свойства;
- затруднение доставки ферментов к пораженным органам и тканям.

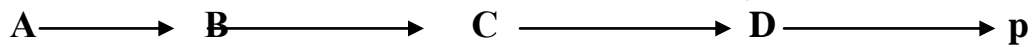
2.14. Регуляция действия ферментов

Регуляция действия ферментов осуществляется на уровне их синтеза и активности при участии клеточных и гормональных механизмов.

2.14.1. Регуляторные ферменты

Ферменты, осуществляющие в клетке различные превращения, действуют в строго определенной последовательности, образуя единые мультиферментные системы.

Последовательность ферментативных реакций, в которых продукт предшествующей реакции становится субстратом для последующей, называется метаболическим путем



Лимитирует скорость метаболического пути тот фермент, который катализирует наиболее медленную реакцию, называемую **узким местом**. Он может изменять свою активность в зависимости от действия различных факторов и, тем самым, приспосабливать интенсивность метаболических превращений к изменяющимся потребностям клетки.

Такие ферменты - "дирижеры", активность которых изменяется под влиянием различных метаболических сигналов, получили название регуляторных

- Активность регуляторных ферментов может изменяться двумя путями:
- путем аллостерической модификации;
 - путем ковалентной модификации.

2.14.2. Аллостерическая модификация ферментов

Ряд ферментов могут обратимо связывать различные метаболиты, повышающие или ингибирующие их активность, – так называемые **эффекторы, или модуляторы**. Такие ферменты называются **аллостерическими** (allos – другой, stereo – место, участок).

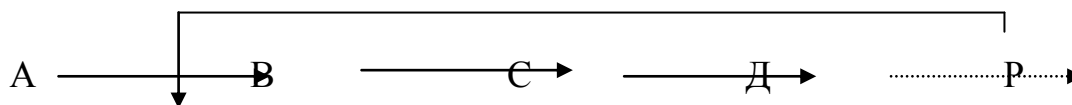
Аллостерические ферменты имеют четвертичную структуру и состоят из каталитических (C) и регуляторных (R) субъединиц. Конформация каждой субъединицы поддерживается связями с другими субъединицами.

Аллостерический модулятор присоединяется к регуляторной субъединице, что приводит к изменению её конформации; вследствие этого изменяется конформация каталитической субъединицы, а следовательно, и каталитического активного центра. В результате активность всего фермента в целом изменяется: при присоединении аллостерического ингибитора – понижается, а при взаимодействии с аллостерическим активатором – наоборот, повышение.

2.14.2.1. Регуляция активности фермента продуктом реакции

Одной из разновидностей аллостерической регуляции является ингибирование фермента **по типу обратной связи**, когда конечный продукт

цепи ферментативных превращений аллостерически подавляет активность фермента, катализирующего первую их стадию.



Такой тип аллостерического ингибирования скорости многостадийного ферментативного процесса получил названия **ретроингибирования**.

Ретроингибирование - один из основных типов саморегуляции ферментативных процессов в клетке.

2.14.2.2. Регуляция активности фермента субстратом реакции

Активация фермента субстратом заключается в том, что первый метаболит в многоступенчатом пути превращений аллостерически активировывает фермент, катализирующий последнюю стадию процесса (например, глюкозо-6-фосфат повышает активность гликогенсинтазы, фруктозодифосфат – активность пируваткиназы).

Однако высокие концентрации субстрата могут привести не к активации, а наоборот, к ингибированию фермента за счёт блокирования его активного центра. При этом образуется фермент-субстратный комплекс, неспособный подвергнуться каталитическим превращениям.

Так как субстратное торможение вызывается избытком субстрата, оно может быть снято при снижении его концентрации.

2.14.3. Ковалентная модификация ферментов

Ряд белков при формировании третичной структуры подвергается посттранслационной ковалентной модификации.



Ведущее значение в реализации ковалентной модификации ферментов принадлежит реакциям фосфорилирования-дефосфорилирования, осуществляемым специфическими ферментами – протеинкиназами и протеинфосфатазами соответственно.

Фосфорилирование белковой молекулы - образование фосфопротеина – происходит путем присоединения остатка фосфорной кислоты к гидроксильной группе оксиаминокислот – серина или треонина в молекуле белка; при этом

фермент приобретает активность. Наоборот, отщепление фосфорной кислоты от молекулы белка лишает его ферментативной активности (рис.9).

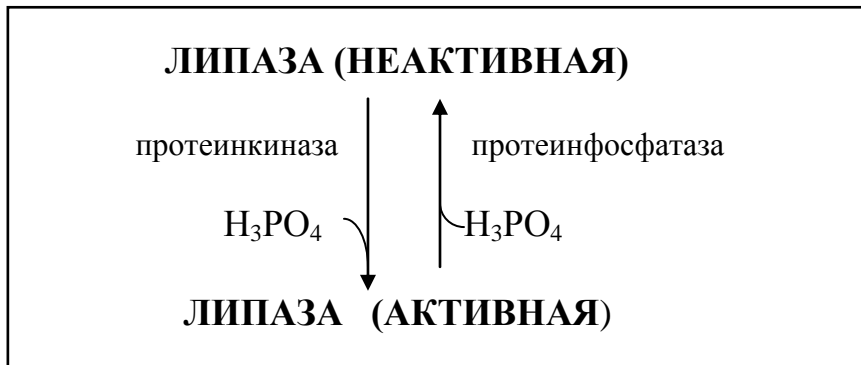


Рис.9. Регуляция активности липазы путём фосфорилирования-дефосфорилирования

Помимо этих реакций, к ковалентной модификации фермента относятся **реакции ограниченного протеолиза**, т.е. отщепления от молекулы белка части аминокислотных остатков. Этим путем осуществляется превращение профермента в активное состояние (стр. 34).

