

ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Ингибирование ферментативной активности - снижение каталитической активности в присутствии определённых веществ - ингибиторов.

К ингибиторам следует относить вещества, вызывающие снижение активности фермента.

Все **денатурирующие агенты** также вызывают уменьшение скорости любой ферментативной реакции, вследствие неспецифической денатурации белковой молекулы, поэтому денатурирующие агенты к ингибиторам **НЕ** относят.

Ингибиторы вызывают большой интерес для выяснения механизмов ферментативного катализа, помогают установить роль отдельных ферментов в метаболических путях организма.

В основе действия многих лекарственных препаратов и ядов лежит ингибирование активности ферментов, поэтому знание механизмов этого процесса крайне важно для молекулярной фармакологии и токсикологии.

Ингибиторы способны взаимодействовать с ферментами с разной степенью прочности.

На основании этого различают обратимое и необратимое ингибирование.

По механизму действия ингибиторы подразделяют на конкурентные и неконкурентные.

Обратимое ингибирование

Обратимые ингибиторы связываются с ферментом ***слабыми нековалентными связями*** и при определённых условиях легко отделяются от фермента.

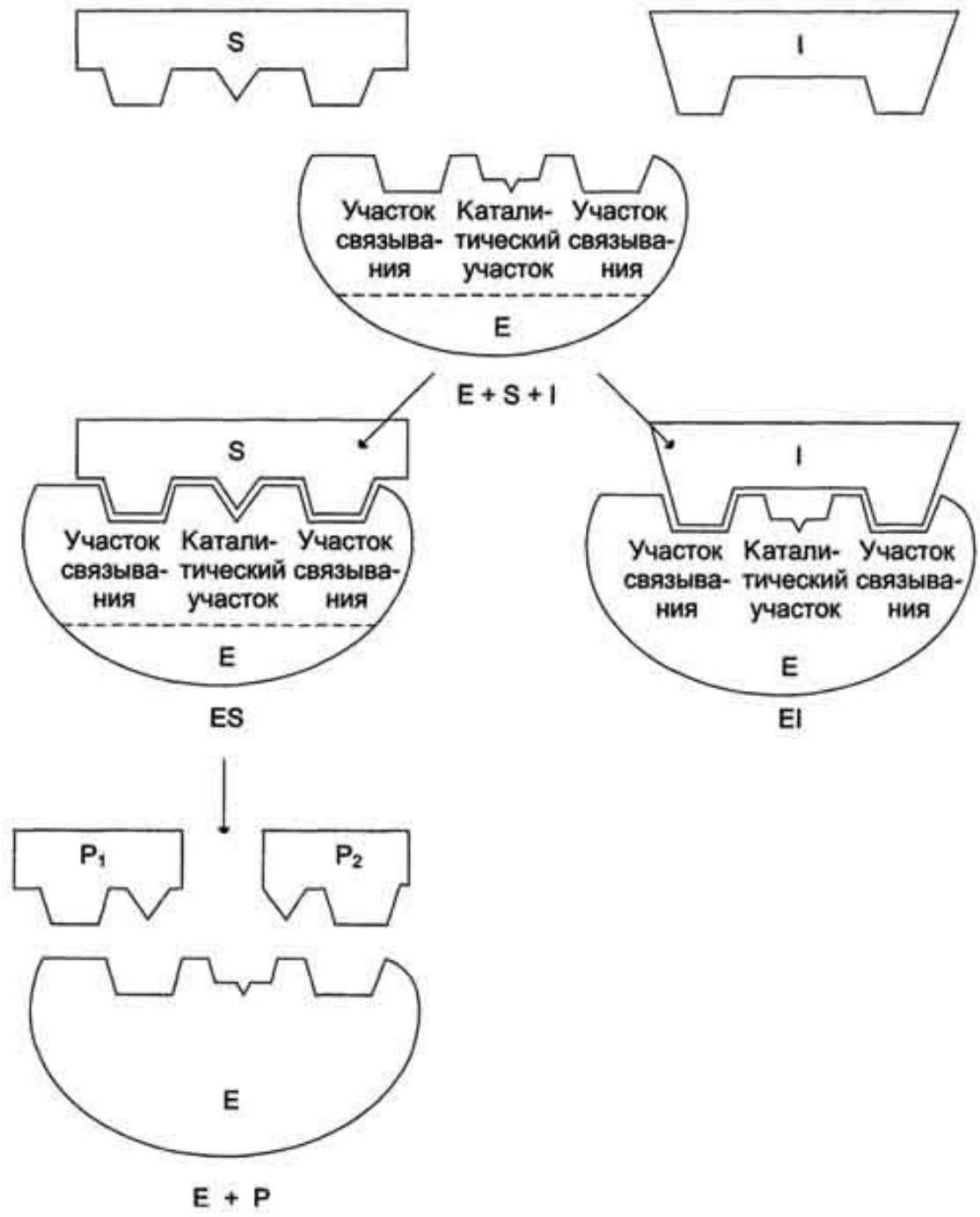
Характерная черта обратимого ингибирования – наличие равновесия между ферментом и ингибитором. При этом константа равновесия или ***константа ингибирования*** (K_i) служит мерой сродства фермента и ингибитора и выражает эффективность действия ингибитора.

Обратимые ингибиторы бывают конкурентными, неконкурентными и бесконкурентным.

1. Конкурентное ингибирование

К конкурентному ингибированию относят обратимое снижение скорости ферментативной реакции, вызванное **ингибитором, связывающимся с активным центром фермента и препятствующим образованию фермент-субстратного комплекса.**

Такой тип ингибирования наблюдают, когда ингибитор - **структурный аналог субстрата**, в результате возникает конкуренция молекул субстрата и ингибитора за место в активном центре фермента. В этом случае с ферментом взаимодействует либо субстрат, либо ингибитор, образуя комплексы фермент-субстрат (ES) или фермент-ингибитор (EI). При формировании комплекса фермента и ингибитора (EI) продукт реакции не образуется.

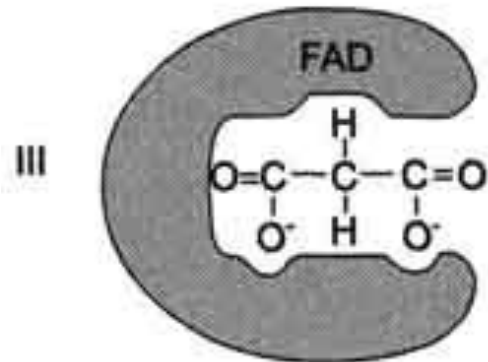
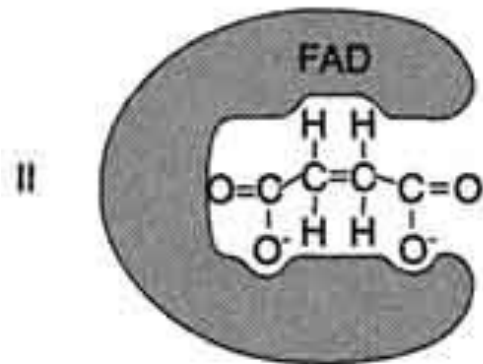
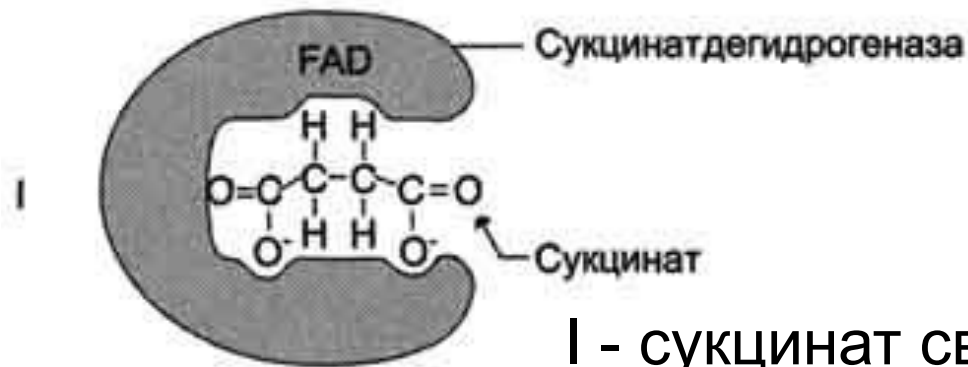


Для конкурентного типа ингибирования справедливы следующие уравнения:



Классический пример конкурентного ингибирования - ингибирование сукцинатдегидрогеназной реакции малоновой кислотой (рис).

Малоновая кислота - структурный аналог сукцината (наличие двух карбоксильных групп) и может также взаимодействовать с активным центром сукцинатдегидрогеназы. Однако отщепление двух атомов водорода от малоновой кислоты невозможно; следовательно, скорость реакции снижается.



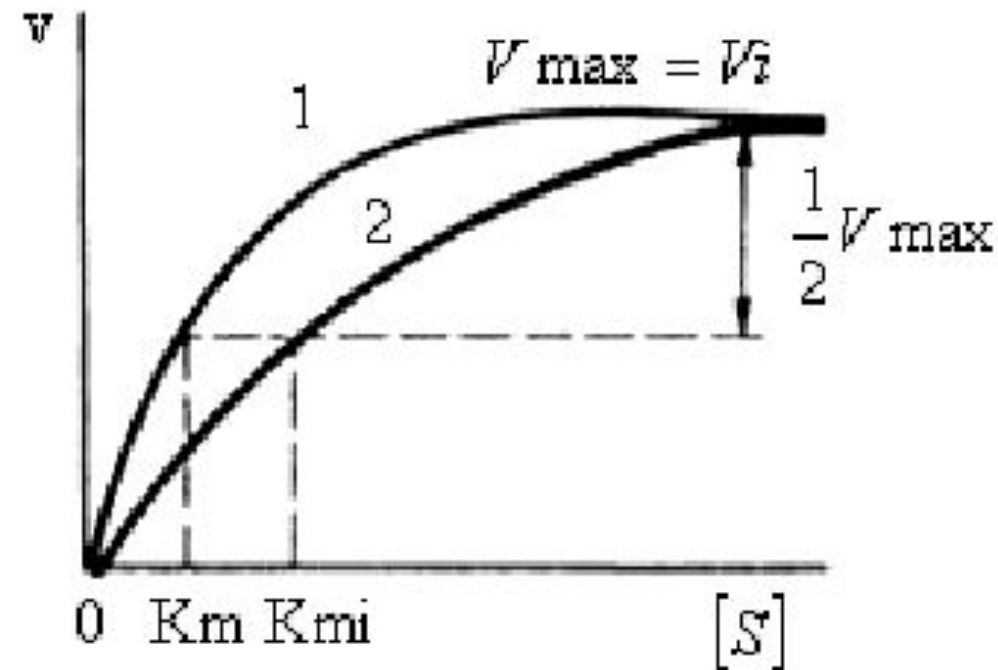
I - сукцинат связывается с активным центром фермента сукцинатдегидрогеназы; II - в ходе ферментативной реакции происходит отщепление двух атомов водорода от сукцината и присоединение их к коферменту FAD. В результате образуется фумарат, который высвобождается из активного центра сукцинатдегидрогеназы; III - малоновая кислота - структурный аналог сукцината, она также связывается с активным центром сукцинатдегидрогеназы. При этом химическая реакция не идёт.

Кинетические зависимости

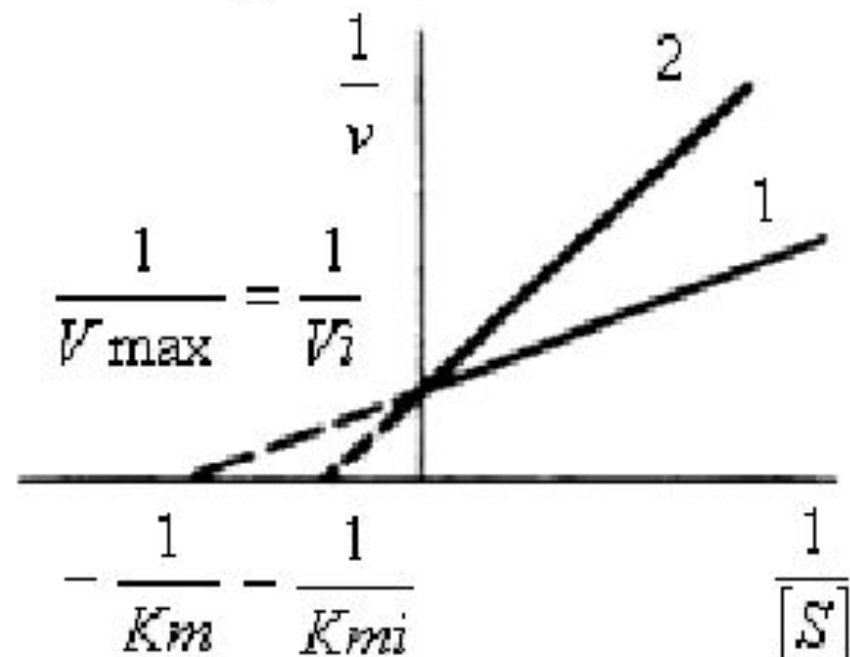
Конкурентные ингибиторы уменьшают скорость химической реакции. Конкурентный ингибитор **повышает K_m** для данного субстрата (уменьшает сродство субстрата к ферменту). **V_{max} не изменяется.** Это означает, что в присутствии конкурентного ингибитора необходима большая концентрация субстрата для достижения $1/2 V_{max}$.

Увеличение соотношения концентрации субстрата и ингибитора снижает степень ингибирования. При значительно более высоких концентрациях субстрата ингибирование полностью исчезает, потому что активные центры всех молекул фермента будут находиться преимущественно в комплексе с субстратом.

a



б



$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m(\text{каж}) + [S]}$$

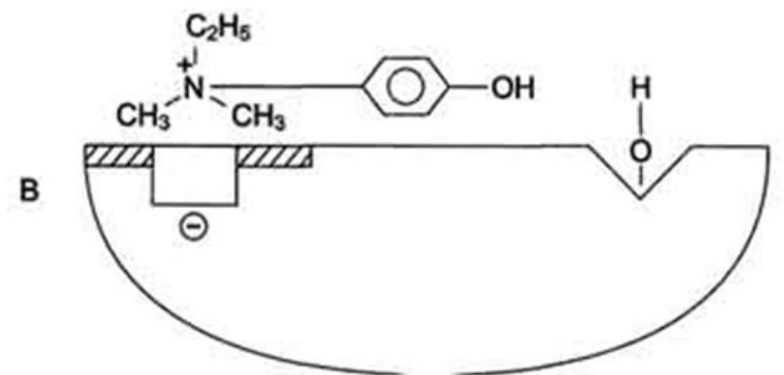
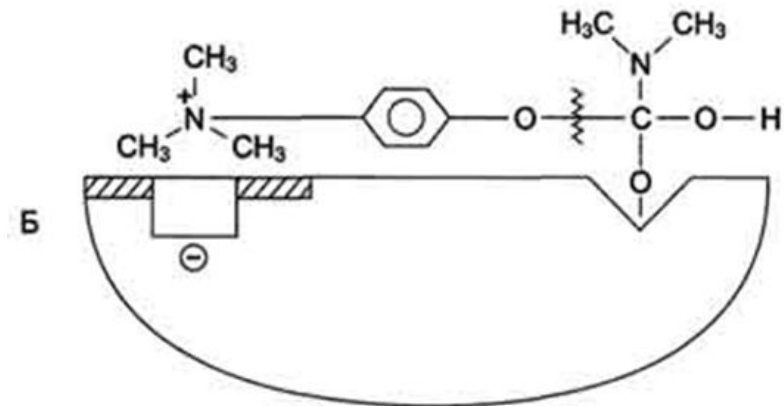
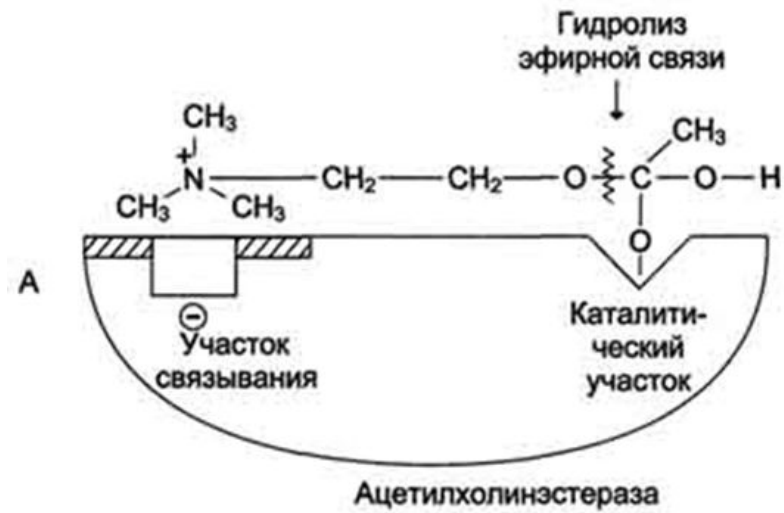
$$K_m(\text{каж}) = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Лекарственные препараты как конкурентные ингибиторы

Многие лекарственные препараты оказывают своё терапевтическое действие по механизму конкурентного ингибирования. Например, четвертичные аммониевые основания ингибируют ацетилхолинэстеразу, катализирующую реакцию гидролиза ацетилхолина на холин и уксусную кислоту.

При добавлении ингибиторов активность ацетилхолинэстеразы уменьшается, концентрация ацетилхолина (субстрата) увеличивается, что сопровождается усилением проведения нервного импульса. Ингибиторы холинэстеразы используют при лечении мышечных дистрофий. Эффективные антихолинэстеразные препараты - прозерин, эндрофоний и др.





А - присоединение ацетилхолина в активном центре фермента.

Стрелкой указано место гидролиза эфирной связи в молекуле ацетилхолина;

Б - присоединение конкурентного ингибитора - прозерина в активном центре фермента. Указано место гидролиза прозерина, однако реакция идёт намного медленнее, чем с ацетилхолином;

В - присоединение конкурентного ингибитора в активном центре фермента - эндропония.

Эндропоний связывается в активном центре ацетилхолинэстеразы, препятствуя присоединению ацетилхолина.

Антиметаболиты как лекарственные препараты

В качестве ингибиторов ферментов по конкурентному механизму в медицинской практике используют вещества, называемые антиметаболитами. Эти соединения, будучи структурными аналогами природных субстратов, вызывают конкурентное ингибирование ферментов, с одной стороны, и, с другой - могут использоваться этими же ферментами в качестве псевдосубстратов, что приводит к синтезу аномальных продуктов. Аномальные продукты не обладают функциональной активностью; в результате наблюдают снижение скорости определённых метаболических путей.

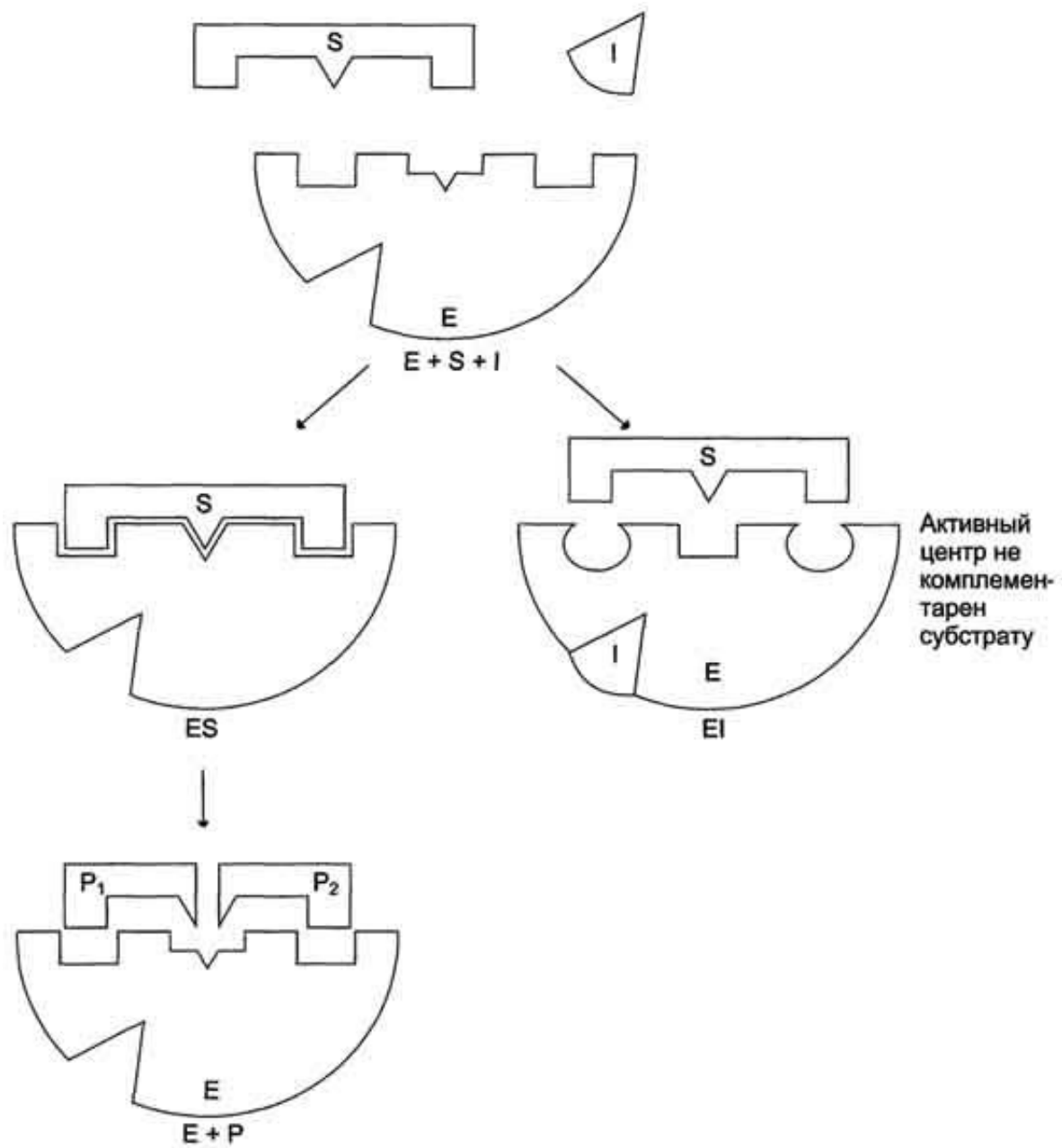
В качестве лекарственных препаратов используют следующие антиметаболиты: сульфаниламидные препараты (аналоги парааминобензойной кислоты), применяемые для лечения инфекционных заболеваний, аналоги нуклеотидов для лечения онкологических заболеваний

Неконкурентное ингибирование

Неконкурентным называют такое ингибирование ферментативной реакции, при котором ингибитор **взаимодействует с ферментом в участке, отличном от активного центра**. Неконкурентные ингибиторы не являются структурными аналогами субстрата.

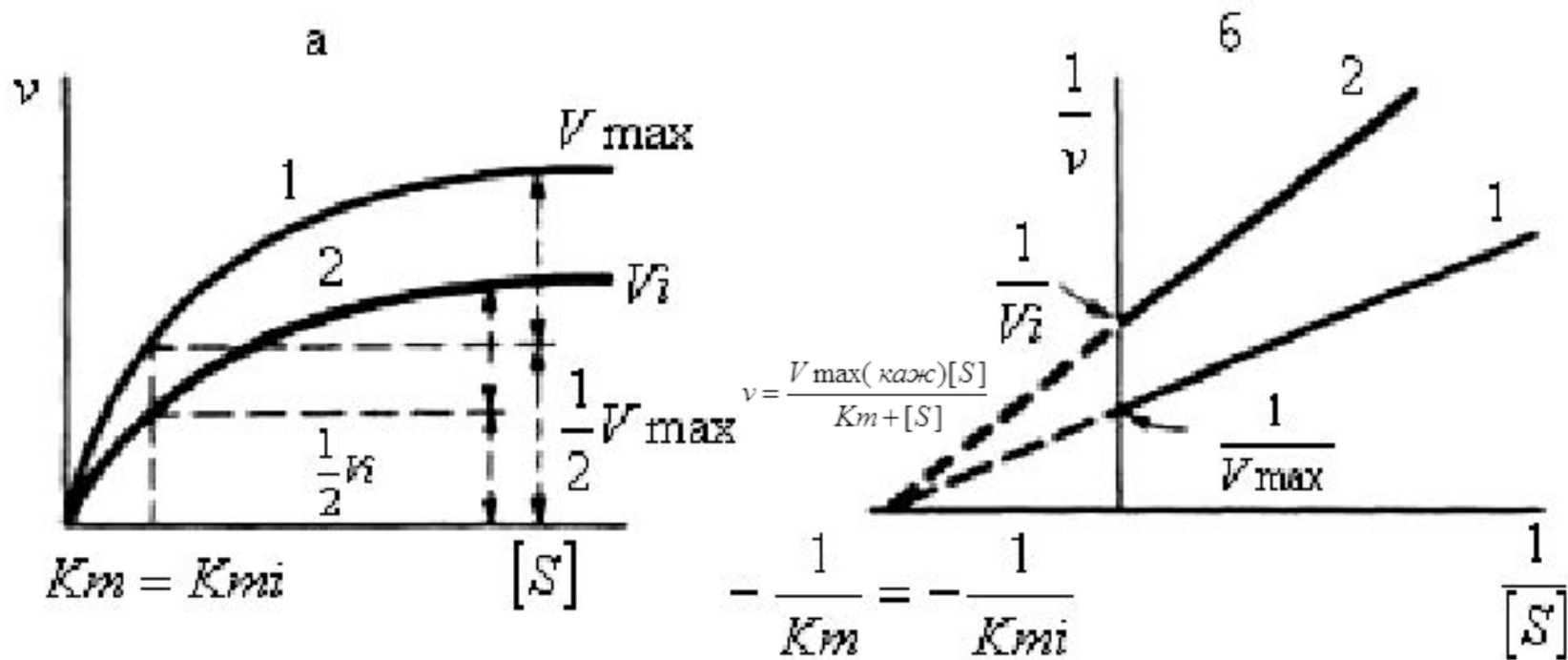
Неконкурентный ингибитор может связываться либо с ферментом, либо с фермент-субстратным комплексом, образуя неактивный комплекс.

Присоединение неконкурентного ингибитора вызывает изменение **конформации молекулы** фермента таким образом, что нарушается взаимодействие субстрата с активным центром фермента, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции.



Кинетические зависимости

Этот тип ингибирования характеризуется **снижением V_{\max}** и **постоянством K_m** .



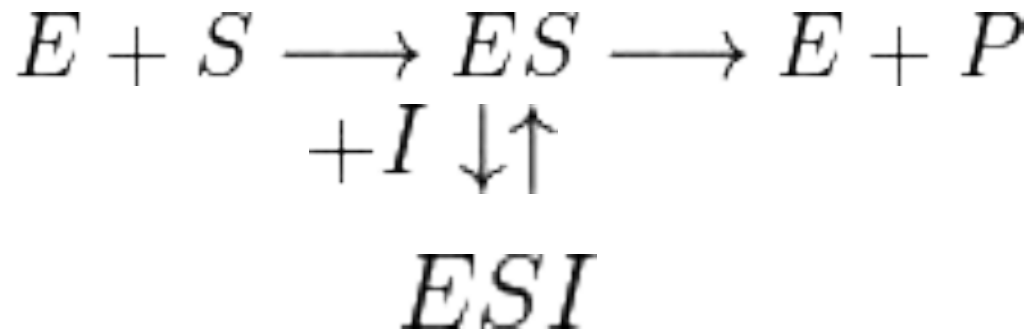
$$v = \frac{V_{\max}(\text{каж})[S]}{K_m + [S]}$$

$$V_{\max}(\text{каж}) = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Бесконкурентное ингибирование

При бесконкурентном ингибировании ингибитор связывается только с **фермент-субстратным комплексом**, но не со свободным ферментом. Субстрат, связываясь с ферментом, изменяет его конформацию, что делает возможным связывание с ингибитором. Ингибитор, в свою очередь, так меняет конформацию фермента, что катализ становится невозможным.

Схема и уравнение Михаэлиса-Ментен в случае
бесконкурентного ингибирования:



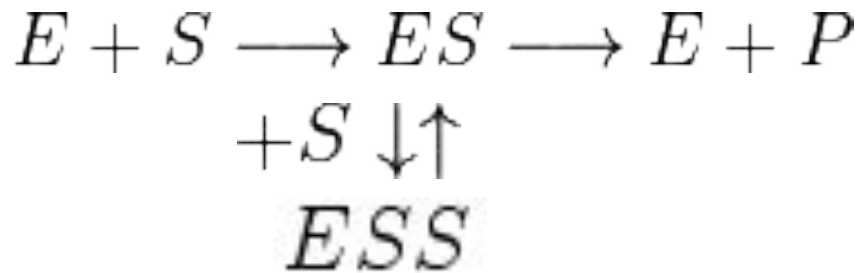
$$v_0 = \frac{\frac{V_{max}}{(1 + \frac{[I]}{K_I})} [S]}{[S] + \frac{K_m}{(1 + \frac{[I]}{K_I})}}$$

Максимальная скорость
реакции и константа
Михаэлиса уменьшаются
в одинаковое число раз.

Ингибирование субстратом

частный случай бесконкурентного ингибирования,
когда две молекулы субстрата связываются с ферментом,
что препятствует образованию продукта.

Схема и уравнение Михаэлиса-Ментен в случае
ингибирования субстратом:



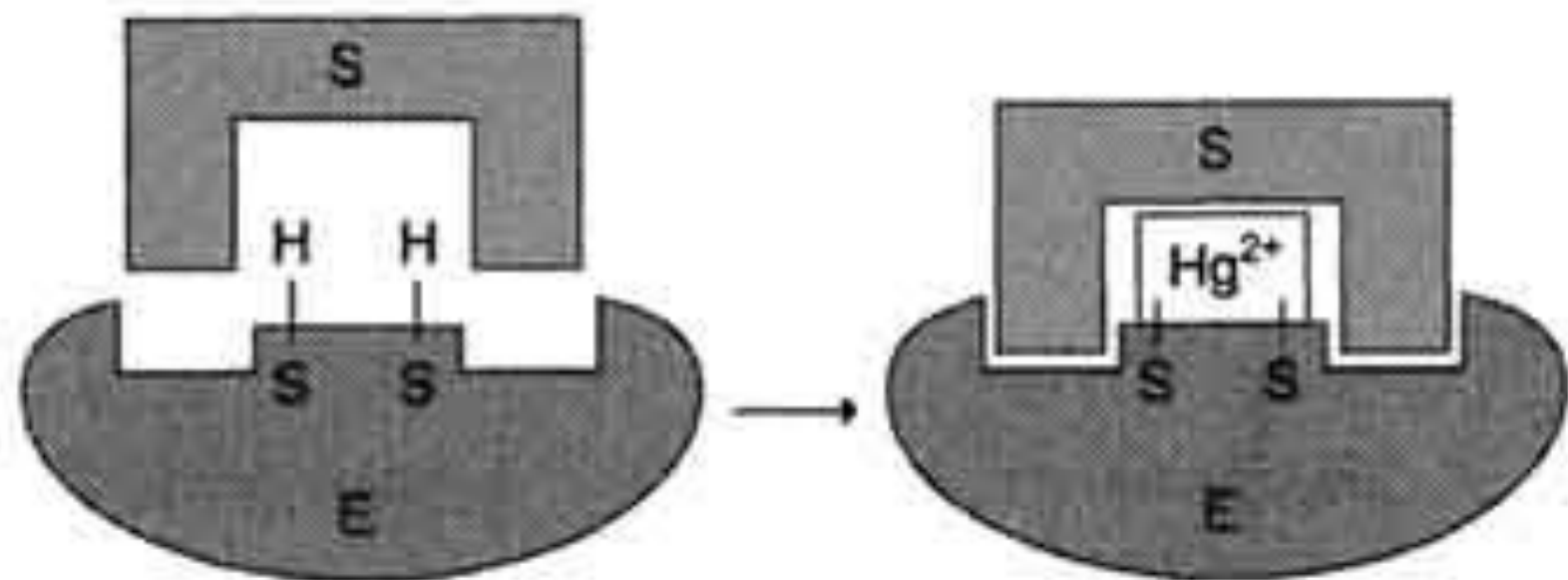
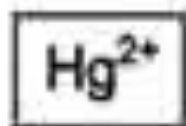
$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m + \frac{[S]^2}{K_I}}$$

Необратимое ингибирование

Необратимое ингибирование наблюдают в случае **образования ковалентных стабильных связей** между молекулой ингибитора и фермента. Чаще всего модификации подвергается активный центр фермента, в результате фермент не может выполнять каталитическую функцию.

К необратимым ингибиторам относят ионы тяжёлых металлов, например ртути (Hg^{2+}), серебра (Ag^{+}) и мышьяка (As^{3+}), которые в малых концентрациях **блокируют сульфгидрильные группы** активного центра. Субстрат при этом не может подвергаться химическому превращению.

При наличии реактиваторов ферментативная функция восстанавливается. В больших концентрациях ионы тяжёлых металлов вызывают денатурацию белковой молекулы фермента, т.е. приводят к полной инактивации фермента.



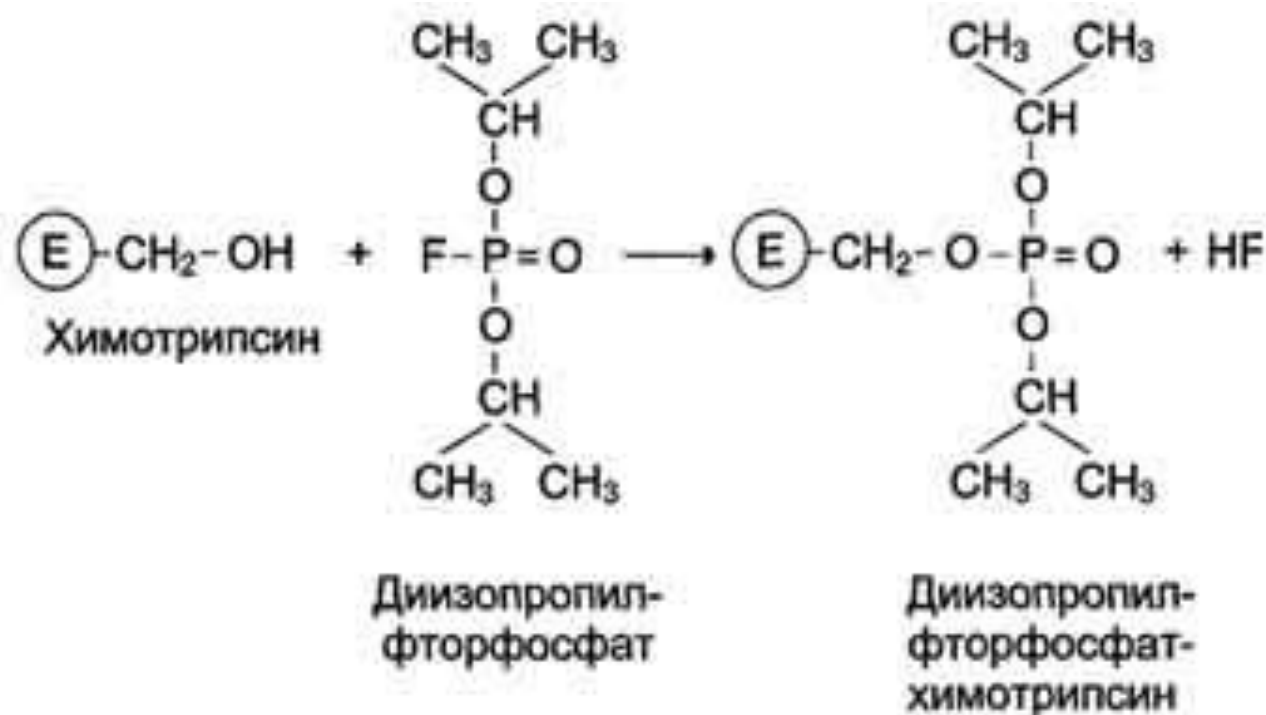
Специфические и неспецифические ингибиторы

Использование необратимых ингибиторов представляет большой интерес для выяснения механизма действия ферментов.

С этой целью применяют вещества, блокирующие определённые группы активного центра ферментов. Такие ингибиторы называют специфическими. Ряд соединений легко вступает в реакции с определёнными химическими группами. Если эти группы участвуют в катализе, то происходит полная инактивация фермента.

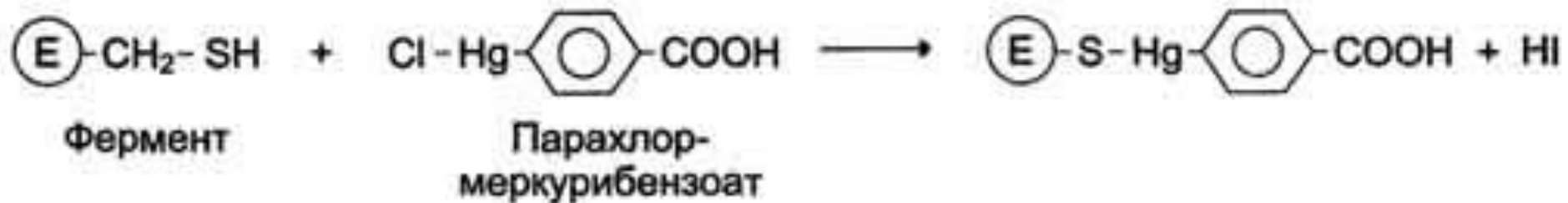
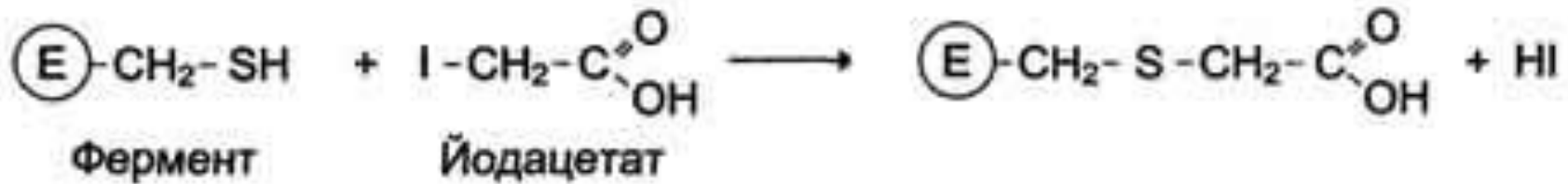
Роль гидроксильных групп серина в механизме катализа исследуют с помощью фторфосфатов, например диизопропилфторфосфата.

Диизопропилфторфосфат (ДФФ) специфически реагирует лишь с одним из многих остатков серина в активном центре фермента.



Ацетат йода, п-хлормеркурибензоат легко вступают в реакции с SH-группами остатков цистеина белков.

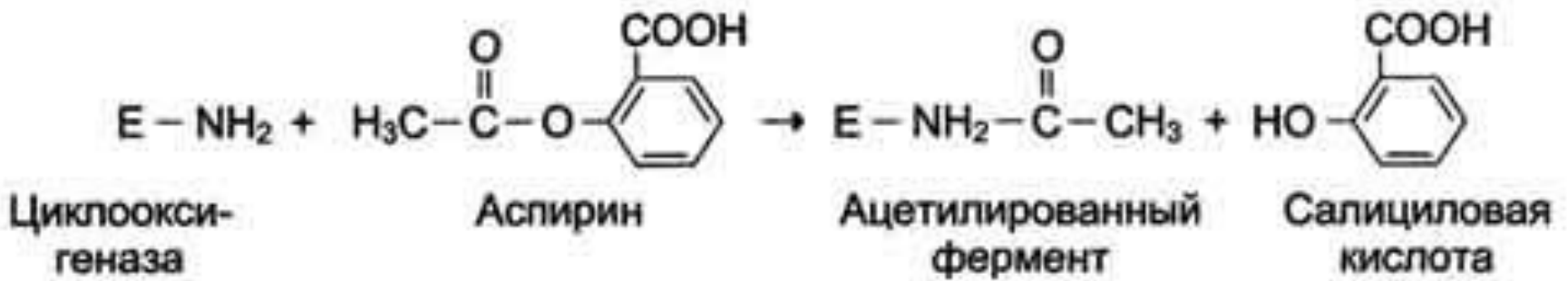
Эти ингибиторы не относят к специфичным, так как они реагируют с любыми свободными SH-группами белков и называются неспецифическими ингибиторами. Если SH-группы принимают участие непосредственно в катализе, то с помощью этих ингибиторов представляется возможным выявление роли SH-групп фермента в катализе.



Необратимые ингибиторы ферментов как лекарственные препараты

Пример лекарственного препарата, действие которого основано на необратимом ингибировании ферментов, - широко используемый препарат аспирин.

Противовоспалительный нестероидный препарат аспирин обеспечивает фармакологическое действие за счёт ингибирования фермента циклооксигеназы, катализирующего реакцию образования простагландинов, которые обладают широким спектром биологических функций, в том числе являются медиаторами.



В результате химической реакции ацетильный остаток аспирина присоединяется к свободной концевой NH₂-группе одной из субъединиц циклооксигеназы.