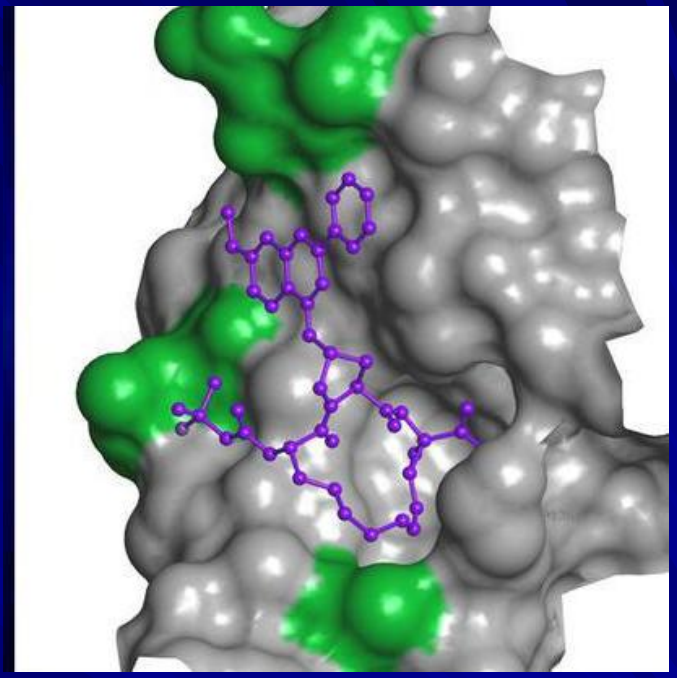


Ферменты

И.С. Григорьянц
Т.А. Попова

Ферменты

- Ферменты (энзимы, Е) – биокатализаторы белковой природы.
- Исключение - некоторые типы РНК, обладающие ферментативной активностью - рибозимы.
- Наука – энзимология.
- Биороль –каталитическая и регуляторная.

Особенности ферментативного катализа:

- высокая эффективность действия;
- специфичность;
- способность к регуляции;
- мягкие условия протекания ферментативных реакций (t = 37° C, нормальное атмосферное давление, pH близкое к 7,0).

Строение ферментов

- **Субстрат (S) – лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента.**
- **Продукт реакции (P).**
- **Ферментативная реакция в общем виде:**

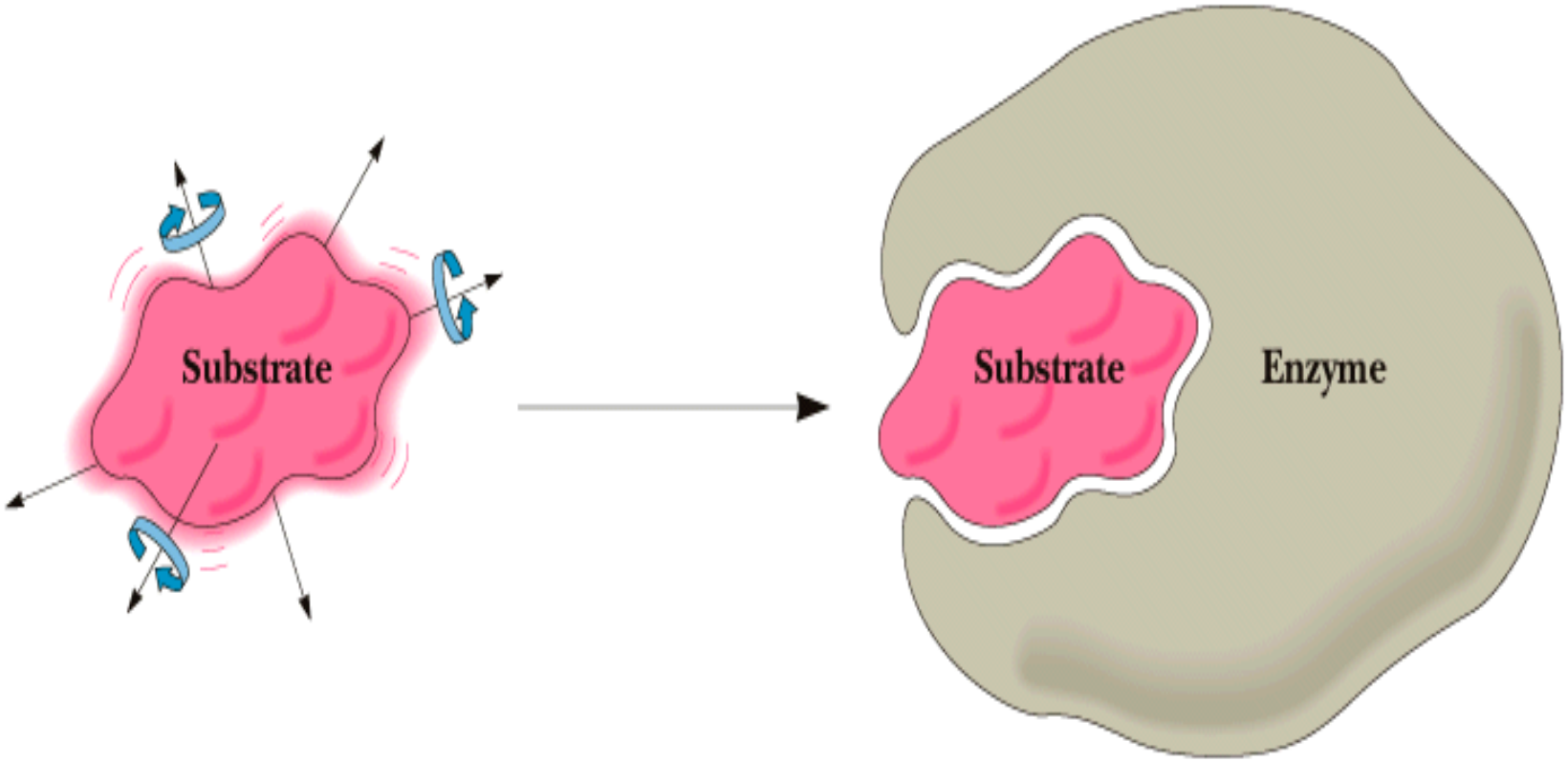
$$S \xrightarrow{E} P$$

Апофермент и кофермент

- В составе фермента, являющегося сложным белком – апофермент (белковая часть) и небелковая часть (низкомолекулярные органические соединения – коферменты или ионы металлов – кофакторы). Комплекс апофермента и кофермента – холофермент.
- Апофермент + кофермент ↔ холофермент

Строение ферментов

- Активный центр (АкЦ) – уникальная комбинация АК остатков в молекуле фермента, обеспечивает связывание её с молекулой S и участие в акте катализа, расположен в узком гидрофобном углублении (щели) молекулы фермента, образуется на уровне третичной структуры.



Substrate (and enzyme) are free
to undergo translational motion.
A disordered, high-entropy situation

The highly ordered, low-entropy complex

Функциональные участки молекулы фермента

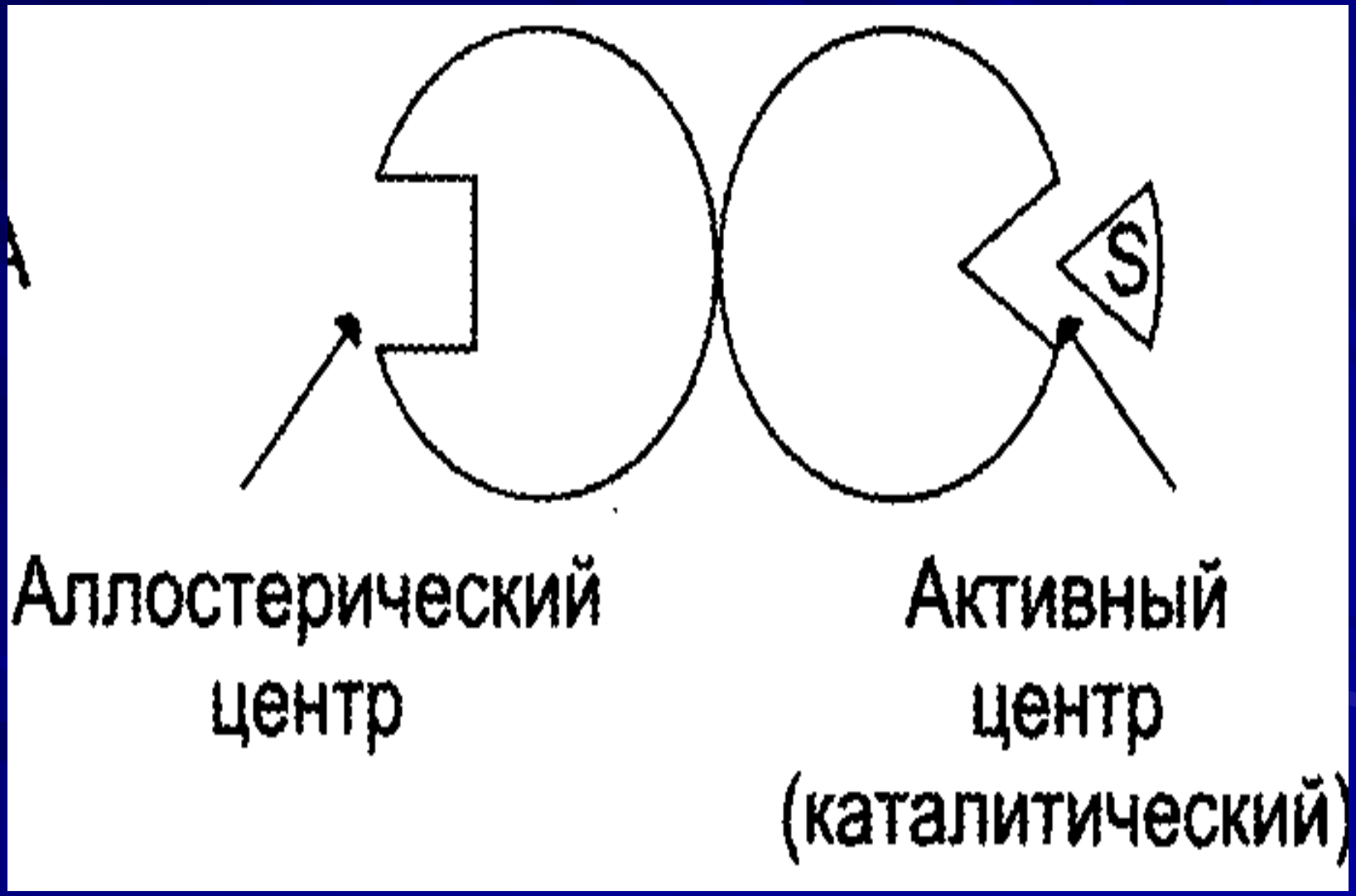
- В АкЦ Е различают:
- участок связывания S (обеспечивает субстратную специфичность — выбор S) и
- каталитический участок (обеспечивает выбор пути химического превращения субстрата).
- S связывающий участок по форме соответствует S (геометрическое соответствие), между АК остатками активного центра и S образуются связи (Н, гидрофобные, ионные), т.е. устанавливается электронное или химическое соответствие.

Функциональные участки молекулы фермента

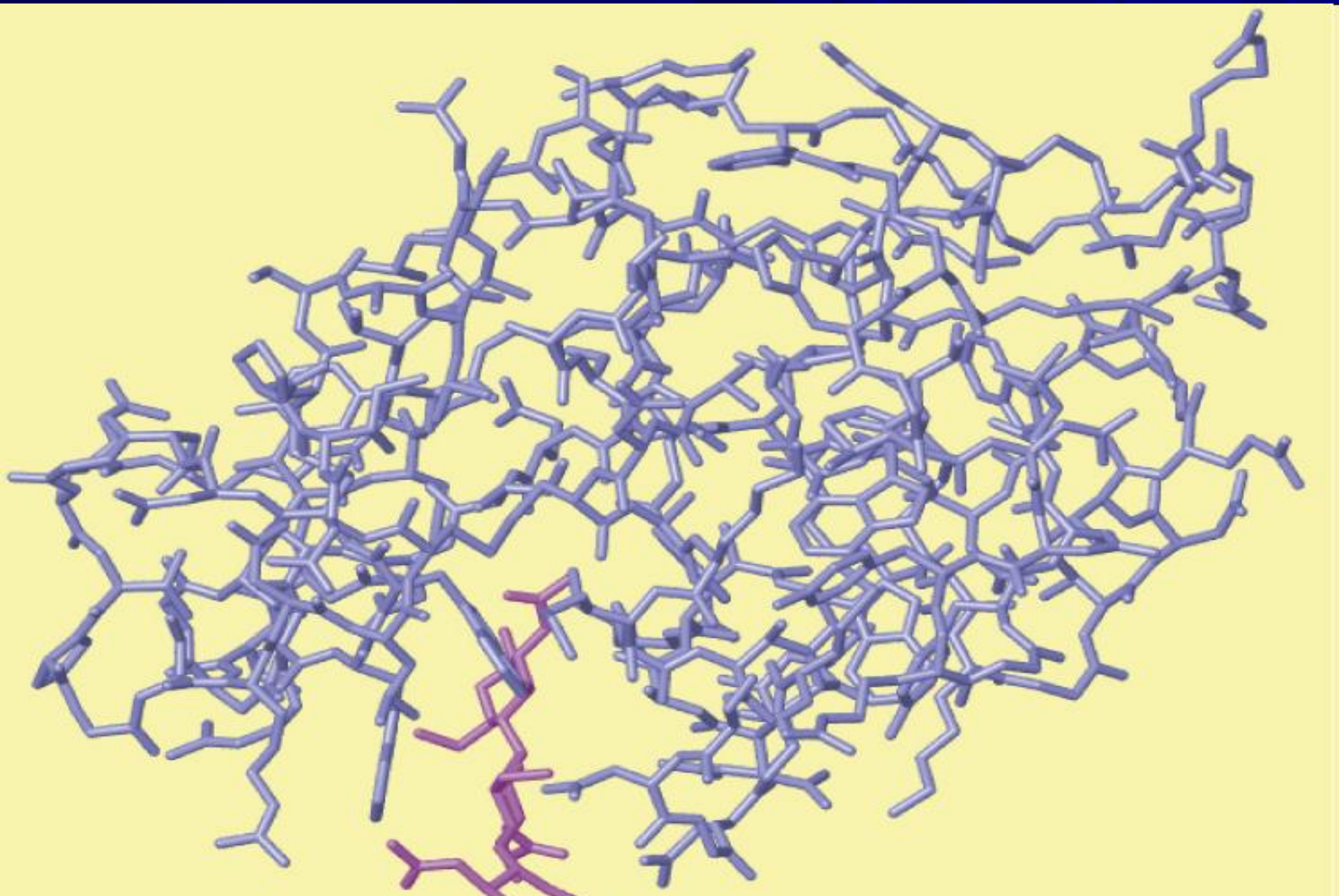
- S комплементарен активному центру **(гипотеза «ключ-замок», теория индуцированного соответствия).**
- **аллостерический (регуляторный) центр– участок молекулы фермента, с которым связываются низкомолекулярные вещества (эффекторы, или модификаторы), изменяющие активность Е.**

  Такой Е — аллостерический.
- **В АкЦ фермента - участок или домен для связывания кофермента.**

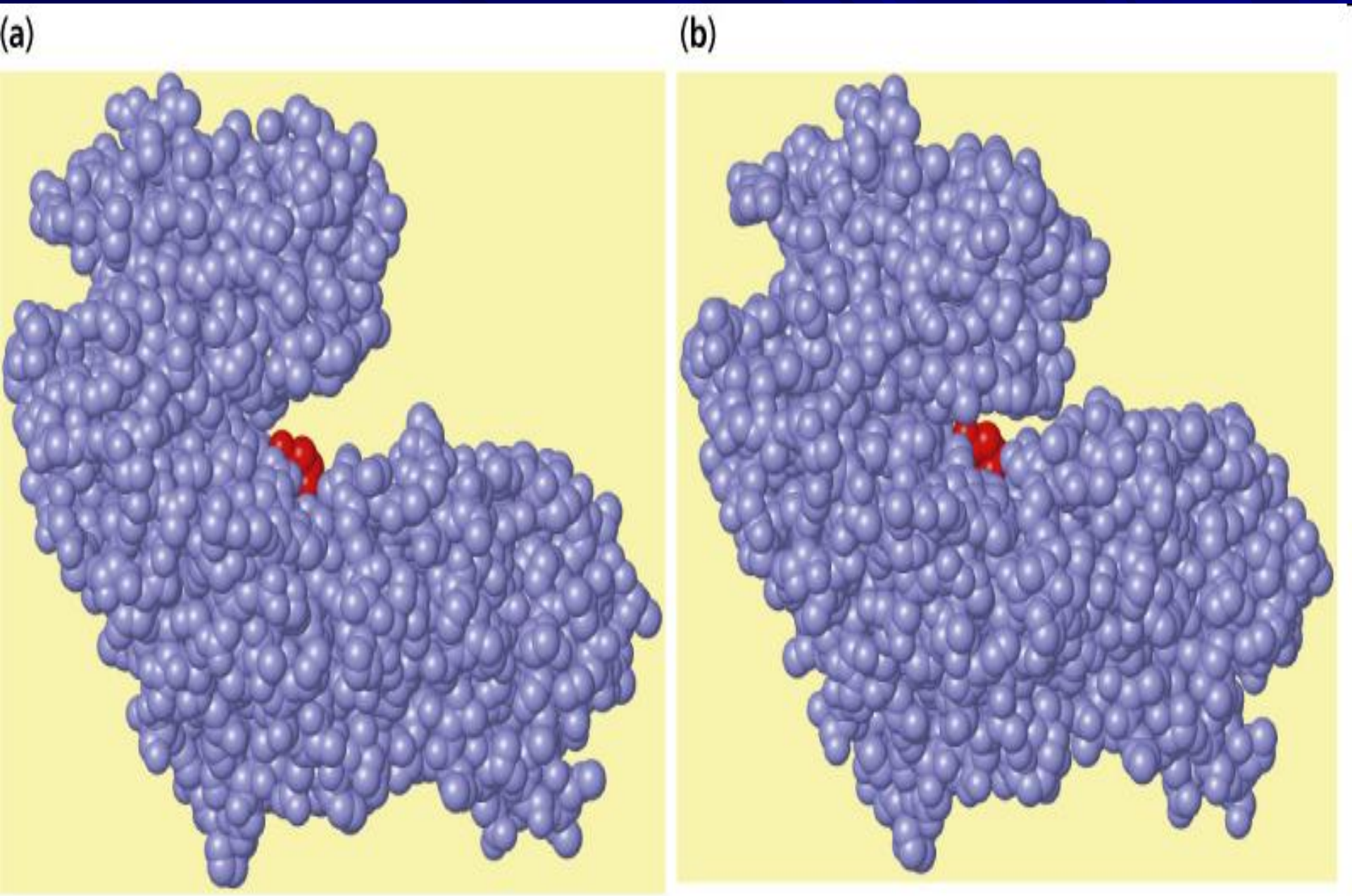
Аллостерический (регуляторный) центр



Лизоцим



Дрожжевая гексокиназа

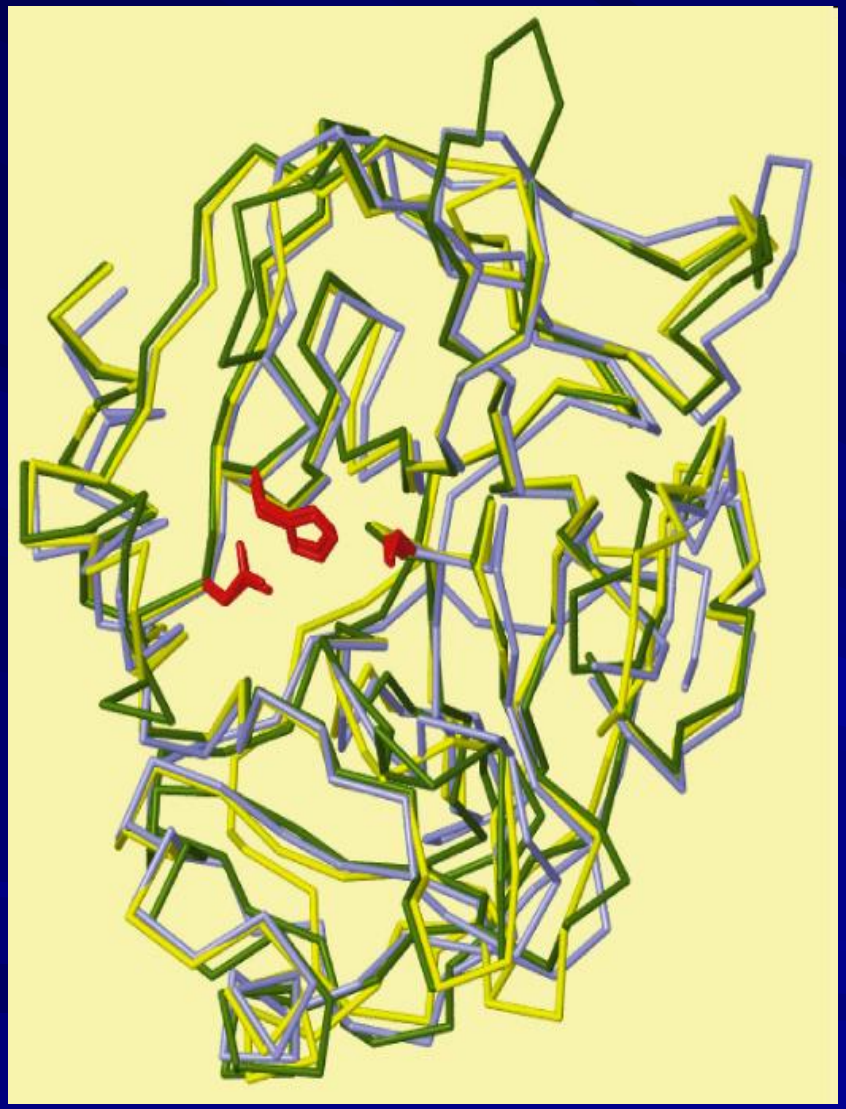


Backbones of chymotrypsinogen and alpha-chymotrypsin

Chymotrypsinogen (blue, [PDB 2CGA]) and alpha-chymotrypsin (green, [BDB 5CHA]) are shown in stick drawing. The sidechains of the catalytic triad (Asp-102, His-57 and Ser-195) are shown red. Ile-16 and Asp 194 in both zymogen and the active enzyme are shown in yellow.

The structures of chymotrypsinogen and alpha-chymotrypsin are aligned at the catalytic triad. It is clear that very little changes in the tertiary structure for most of the protein upon proteolytic cleavage. In trypsin, the oxanion hole and specificity pocket are properly formed but are not in the zymogen.

The structures of chymotrypsin, trypsin, and elastase



The backbones of chymotrypsin (blue) [PDB 5CHA], trypsin (yellow) [PDB1TLD], and elastase (green) [PDB 3EST] are shown by aligning the catalytic triad in all three structures (red).

There is great structural similarity between the three proteins. The specificity pocket (to the right and slightly down from the catalytic triad) differs, however, to allow the proteins to be specific for large hydrophobic sidechains (chymotrypsin), negatively charged sidechains (trypsin) and small hydrophobic sidechains (elastase.) The figure in the text is in stereo.

Классификация ферментов

- В соответствии *с типами* катализируемых реакций все ферменты разделены на 6 классов.
- 1. Оксидоредуктазы.
- 2. Трансферазы.
- 3. Гидролазы.
- 4. Лиазы.
- 5. Изомеразы.
- 6. Лигазы (синтетазы).
- Каждый класс разделен на подклассы и далее на подподклассы.

Классификация ферментов

№	Класс	Реакции	Основные подклассы, группы
	1.Оксидоре-дуктазы	Окислительно-восстановительные реакции $A_{восст} + B_{окис} \rightarrow A_{окис} + B_{восст}$	Дегидрогеназы, оксидазы, оксигеназы, пероксидазы
	2.Трансферазы	Перенос групп A-B+C->A+B-C	Киназы (фосфатные группы), трансаминазы (аминогруппы)
	3. Гидрола-зы	Гидролиз связей (эфирных, пептидных, гликозидных связей C-C, P-N) A-B+H_2O->A-H + B-OH	Эстеразы, фосфатазы, протеазы, липазы, нуклеазы, тиолазы

Классификация ферментов

4. Лиазы	Разрыв связей C-C, C-O, C-N, C-S путем элиминирования молекулы с образованием двойных связей В обратной реакции ускоряют присоединение воды, аммиака и т.д. по двойной связи A(XH)-B->A-X+B-H	Альдегидлиазы (альдолаза), углерод-кислородлиазы (фумараза), дегидратазы (енолаза), декарбоксилазы
5.Изомеразы	Взаимопревращение изомеров A<->Изо-A	Изомеразы, мутазы
6. Лигазы	Соединение 2 молекул, сопряженное с гидролизом ATP A+B+ATP->A-B+ADP+Pi	Карбоксилазы, синтетазы

Классификация ферментов

Класс	Примеры
1. Оксидоредуктазы — ,катализируют окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов (перенос e^- и атомов H с одного S на другой.).	ЛДГ, глутаматдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, оксидазы АК, каталаза, СОД, цитохромы и т. д.
2.Трансферазы — перенос функциональных групп с одного соединения к другому. В подкласс фосфотрансфераз входит группа Е, называемых киназами, они используют АТФ в качестве донора фосфатного остатка.	Аминотрансферазы (АлАТ, АсАТ, ТАТ); ацилтрансферазы (холинацетилтрансфераза, ЛХАТ); фосфотрансферазы (гексокиназа, глицерокиназа), фосфофруктокиназа, протеинкиназы); гликозилтрансферазы (фосфорилаза); метилтрансферазы (сериноксиметилтрансфераза) и др.
3. Гидролазы — катализируют реакции расщепления ковалентных связей с присоединением воды по месту расщепления	пептидазы (пепсин, трипсин, химотрипсин); эстеразы (липаза, ацетилхолинэстераза); гликозидазы (амилаза, мальтаза. лактаза, сахараза); фосфатазы (кислая и щелочная фосфатазы); амидогидролазы (глутаминаза , аспарагиназа) и др;
4. Лиазы — отщепляют от S негидролитическим путем определенную группу (CO_2, H_2O или присоединяющие чаще всего H_2O по месту двойной связи	- С — С – лиазы (альдолаза,ж декарбоксилазы АК); - С — О – лиазы (фумаратгидратаза, аконитатгидратаза); -С—N – лиазы (гистидаза, аргининосукцинатлиаза, сериндегидратаза); -С —- S – лиазы (гомосериндегидратаза)
5. Изомеразы — осуществляют взаимопревращения изомеров	триозофосфатизомераза, фосфоглицеромутаза, метилмалонил-КоА--мутаза, глюкозо-6-фосфатизомераза и др;
6. Лигазы (синтетазы) осуществляют реакции присоединения друг к другу двух молекул с образованием ковалентной связи, в качестве источника АТФ используется АТФ.	-С — С- лигазы (ацетил-КоА–карбоксилаза, пируваткарбоксилаза), - С— О – лигазы (аминоацил –тРНК- синтетаза), -С – -С – N - лигазы (глутаминсинтетаза, аргининосукцинатсинтетаза), - С — S- лигазы (ацил-КоА-синтетаза, ацетил-КоА-синтетаза) и др.

Класс	Примеры
1. Оксидоредуктазы — катализируют окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов (перенос e^- и атомов Н с одного S на другой).	ЛДГ, глутаматдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, оксидазы АК, каталаза, СОД, цитохромы и т. д.
2.Трансферазы — перенос функциональных групп с одного соединения к другому. В подкласс фосфотрансфераз входит группа Е, называемых киназами, они используют АТФ в качестве донора фосфатного остатка.	Аминотрансферазы (АлАТ, АсАТ, ТАТ); ацилтрансферазы (холинацетилтрансфераза, ЛХАТ); фосфотрансферазы (гексокиназа, глицерокиназа, фосфофруктокиназа, протеинкиназы); гликозилтрансферазы (фосфорилаза); метилтрансферазы (сериноксиметилтрансфераза) и др.
3. Гидролазы — катализируют реакции расщепления ковалентных связей с присоединением воды по месту расщепления	пептидазы (пепсин, трипсин, химотрипсин); эстеразы (липаза, ацетилхолинэстераза); гликозидазы (амилаза, мальтаза. лактаза, сахараза); фосфатазы (кислая и щелочная фосфатазы); амидогидролазы (глутаминаза , аспарагиназа) и др;

Классификация ферментов

4. Лиазы — отщепляют от S негидролитическим путем определенную группу (CO_2 H_2O) или присоединяющие чаще всего H_2O по месту двойной связи	**- С—С– лиазы (альдолаза, декарбоксилазы АК); -С—О–лиазы (фумаратгидратаза, аконитатгидратаза); -С—N–лиазы (гистидаза, аргининосукцинатлиаза, серинДегидратаза); -С — S – лиазы (гомосериндегидратаза)**
5.Изомеразы - осуществляют взаимопревращения изомеров	**триозофосфатизомераза, фосфоглицеромутаза, метилмалонил-КоА--мутаза, глюкозо-6-фосфатизомераза и др;**
6. Лигазы (синтетазы) - осуществляют реакции присоединения друг к другу двух молекул с образованием ковалентной связи, в качестве источника энергии используется АТФ.	**-С — С- лигазы (ацетил-КоА–карбоксилаза, пируваткарбоксилаза), - С— О – лигазы (аминоацил –тРНК- синтетаза), -С – N - лигазы (глутаминсинтетаза, аргининосукцинатсинтетаза), - С — S- лигазы (ацил-КоА-синтетаза, ацетил-КоА-синтетаза) и др.**

Номенклатура ферментов

- Рабочее название ферментов – название S и окончание «аза» (амилаза, липаза и др.)
- Тривиальные названия – пепсин, трипсин и др.
- Систематическая (рациональная) номенклатура – название S или субстратов, тип катализируемой реакции и окончание «аза».

Пример:

- АСТ- L-аспартат: 2-оксоглутарат - аминотрансфераза;
- Глутаминсинтетаза - L-глутамат: аммиак — лигаза;
- Орнитиндекарбоксилаза - ОДК - L-орнитин-карбокси-лиаза;
- Малатдегидрогеназа (МДГ) —L-малат-НАД-оксидоредуктаза.

Если необходима дополнительная информация, то она заключается в скобки.

Шифр ферментов

Каждый фермент имеет кодовый номер (шифр) по классификации ферментов (КФ).

Код каждого Е имеет 4 цифры, разделенные точками.

- 1 - номер класса,
- 2 – подкласс,
- 3 – подподкласс,
- 4 цифра - порядковый номер фермента в его подподклассе.

Примеры:

- шифр гексокиназы или АТФ:D- гексозо — 6-фосфотрансферазы – КФ 2.7.1.1;
- шифр малатдегидрогеназы (МДГ) — 1.1.1.38

Шифр		Рекомендуемое (рабочее) название	Реакция	Систематическое название
КФ 1.1.1.27		Лактат-дегидрогеназа	L-лактат + НАД$^+$= пируват + НАДН$_2$	L-лактат НАД оксидо редуктаза
КФ 2.6.1.5		Тирозин-амино-трансфераза	L-тирозин + 2-оксоглутарат = 4-оксифенилпируват + L-глутамат	L-тирозин 2-оксоглутарат аминотрансфераза

Механизм действия ферментов

Механизм действия Е может быть рассмотрен с 2^x позиций:

- с точки зрения событий в активном центре,
- с точки зрения энергетики химических реакций.

Механизм действия ферментов

- В механизме ферментативного катализа ведущую роль играют промежуточные ES комплексы. E взаимодействует с S с образованием нестойкого промежуточного ES комплекса, который распадается на E и P по схеме:
- $E + S \rightarrow ES \rightarrow ES^* \rightarrow EP \rightarrow E + P$ (ES* - комплекс в переходном состоянии).
- Т.о. различают следующие этапы ферментативного катализа:
- $E + S \rightarrow ES \rightarrow ES^* \rightarrow EP \rightarrow E + P$ (ES* - комплекс в переходном состоянии).
- I II III IV

Механизм действия ферментов

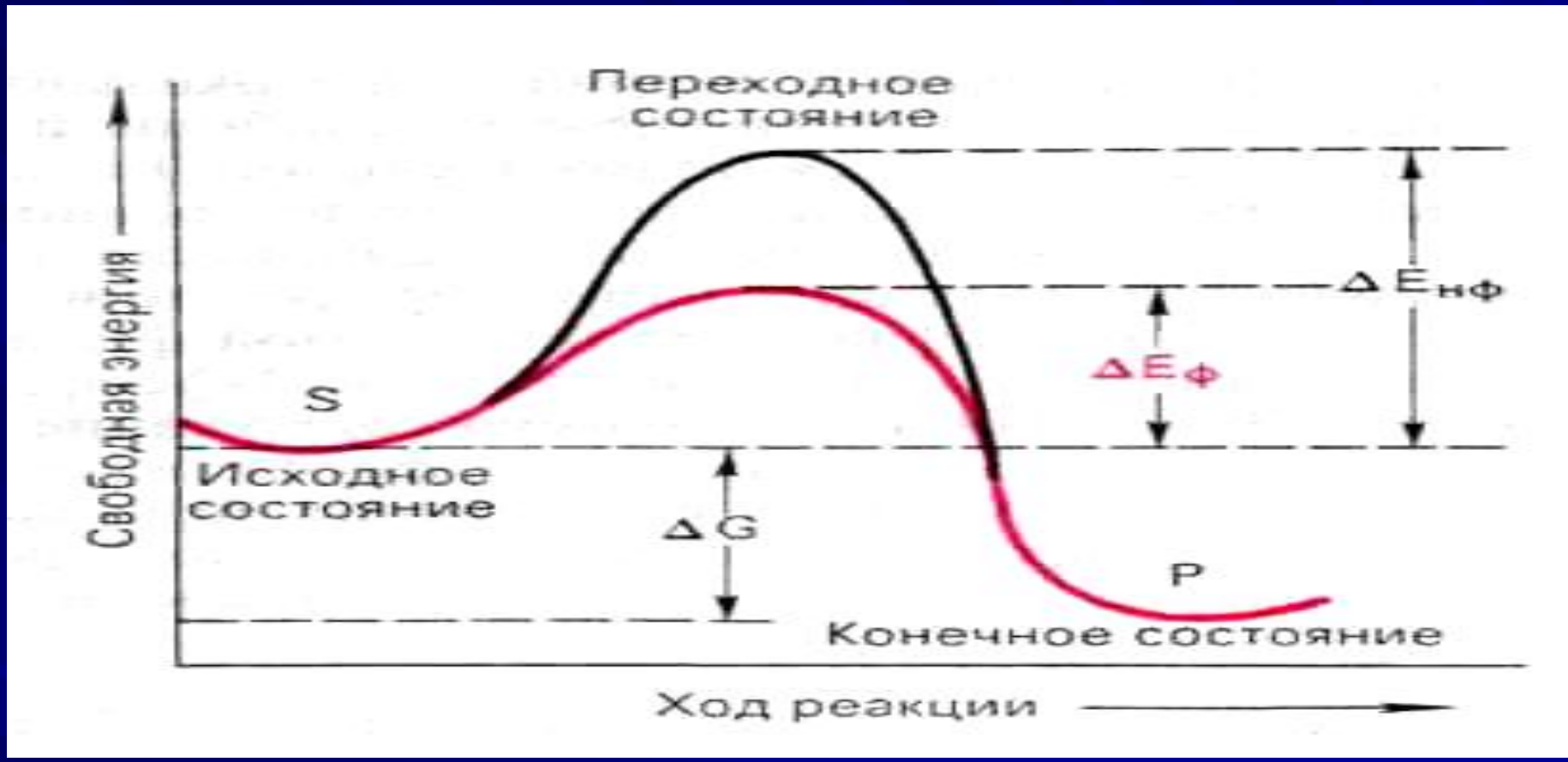
- Согласно теории «ключ-замок» Э. Фишера или теории «жесткой матрицы» АкЦ Е — стабильная, жестко детерминированная структура. Жесткая структура АкЦ комплементарна структуре S, обеспечивая высокую специфичность Е.
- Теория «индуцированного соответствия» (Д. Кошланд) допускает высокую конформационную лабильность молекулы Е и гибкость и подвижность АкЦ. S т.о. индуцирует конформационные изменения молекулы Е так, что АкЦ принимает необходимую для связывания S пространственную ориентацию. Присоединение S к Е создается также геометрической и электронно-топографической перестройкой молекулы S.

Механизм действия ферментов

- E ↓ энергию активации, т.е. ↓ высоту энергетического барьера, в результате ↑ доля реакционноспособных молекул, следовательно ↑ V реакции. Реакция, катализируемая E, имеет более низкую энергию активации.
- Катализируемая E и некатализируемая им реакции имеют одинаковую величину изменения свободной энергии (ΔG).

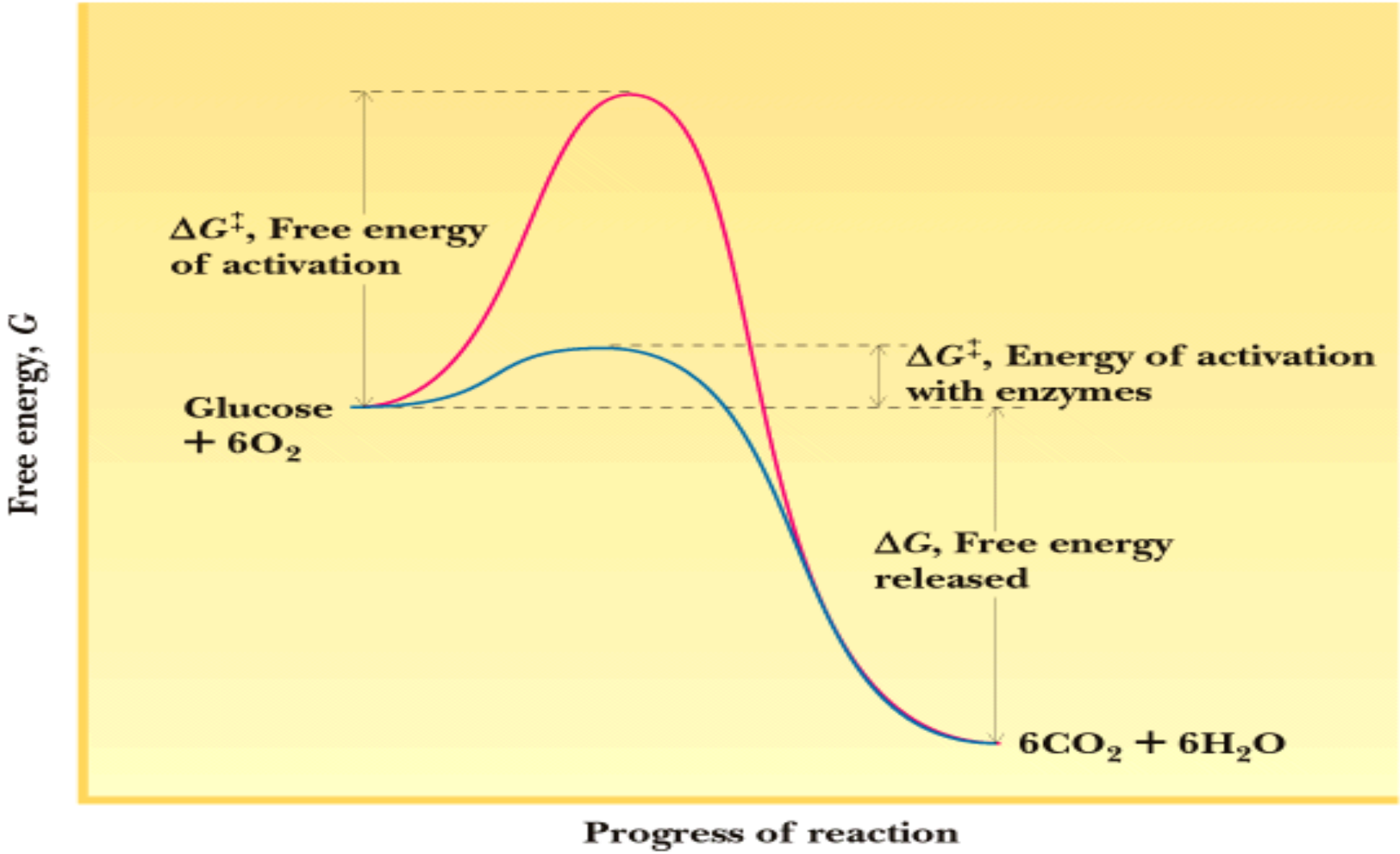
Механизм действия ферментов

С термодинамической точки зрения, Е, как и любые катализаторы, ускоряют химические реакции за счет снижения энергии активации



S- субстрат; P- продукт; ΔEнф- энергия активации неферментативной реакции; ΔEф- энергия активации ферментативной реакции; ΔG- стандартное изменение свободной энергии.

Механизм действия ферментов



Роль кофактора и кофермента

- Изменение третичной структуры белка и создание комплементарности между E и S.
- Непосредственное участие в реакции в качестве еще одного S. Обычно это органические коферменты, они доноры или акцепторы химических групп.

Роль кофактора

- Многие ферменты являются металлоферментами. 1/4 всех известных Е нуждаются в присутствии металла.
- Для активации ферментов свёртывания крови требуется Ca^{2+},
- у оксидоредуктаз - кофакторы Fe^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+};
- у киназ – Mg^{2+} ;
- у глутатионпероксидазы – Se.
- Карбоангидраза активна только в присутствии Zn^{2+}.
- Карбоксипептидаза А (Е поджелудочной железы), построенная из одной полипептидной цепи (307 АК), содержит атом Zn в АкЦ.

Роль иона Ме

Участие:

- в присоединении субстрата;
- собственно в катализе;
- в стабилизации оптимальной конформации молекулы фермента;
- в стабилизации четвертичной структуры.

Роль иона Ме:

- функции простетических групп;
- служат акцепторами и донаторами электронов;
- Роль Ме в присоединении S в АкЦ Е:

  - стабилизаторы молекулы S;

  - стабилизаторы АкЦ Е;

  - стабилизаторы третичной и четвертичной структуры.
- Роль Ме в регуляции активности Е.

Некоторые металлозависимые ферменты

Фермент	Ион металла	Функция иона металла
Гексокиназа	Mg^{2+}	Связывание субстрата
Пируваткиназа	Mg^{2+}, K^{+}	Связывание субстрата и катализ
Аргиназа	$4Mn^{2+}$	«
α-амилаза	Ca^{2+} (и анион Cl)	Стабилизация третичной структуры
Карбоксипептидаза А	Zn^{2+}	Катализ
Транскетолаза	Ca^{2+}	Стабилизация четвертичной структуры
Супероксиддисмутаза	$2Zn^{2+}$, $2Cu^{2+}$	Катализ
Церулоплазмин	$8Cu^{2+}$	«
Ксантиноксидаза	$2Mo^{6+}$	«

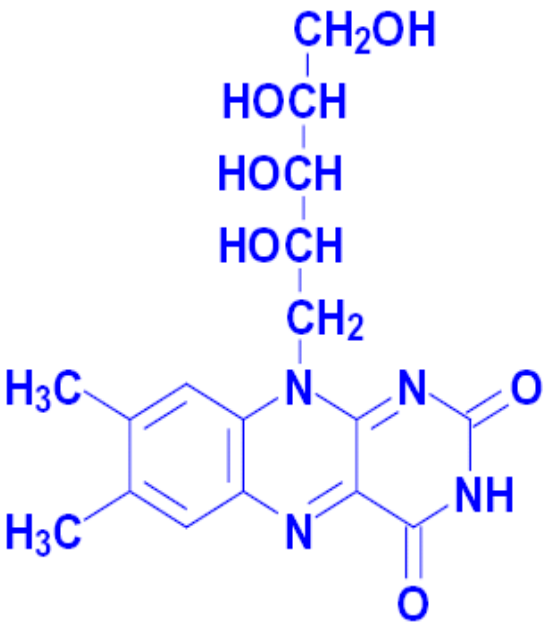
Коферменты – производные витаминов

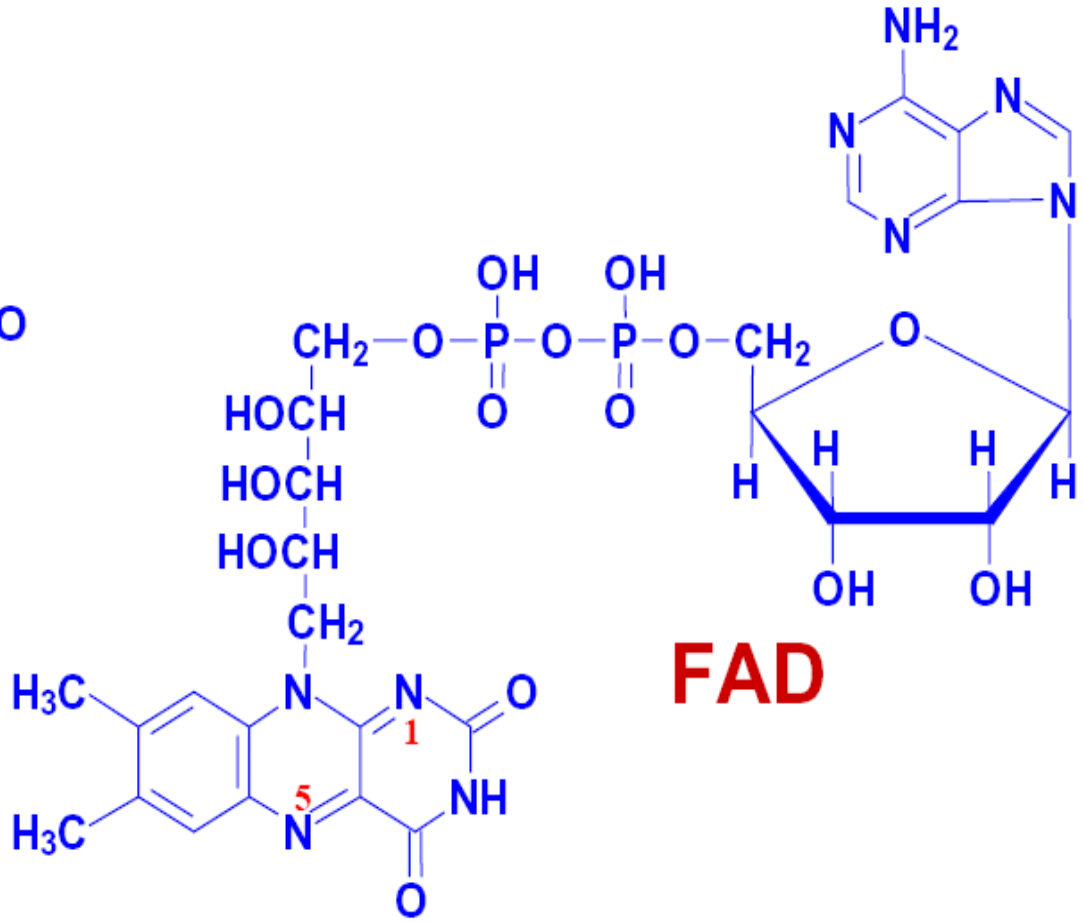
Кофермент	Роль в катализе	Витамин-предшественник
НАД и НАДФ	Перенос водорода (электронов)	Витамин РР (амид никотиновой кислоты)
ФАД и ФМН	Перенос водорода (электронов)	Витамин B_2 (рибофлавин)
Кофермент А (коэнзим А, КоА)	Активация и перенос ацильных групп	Пантотеновая кислота (вит. B_5)
Биотин	Связывание CO_2	Биотин (вит. Н)

Коферменты – производные витаминов

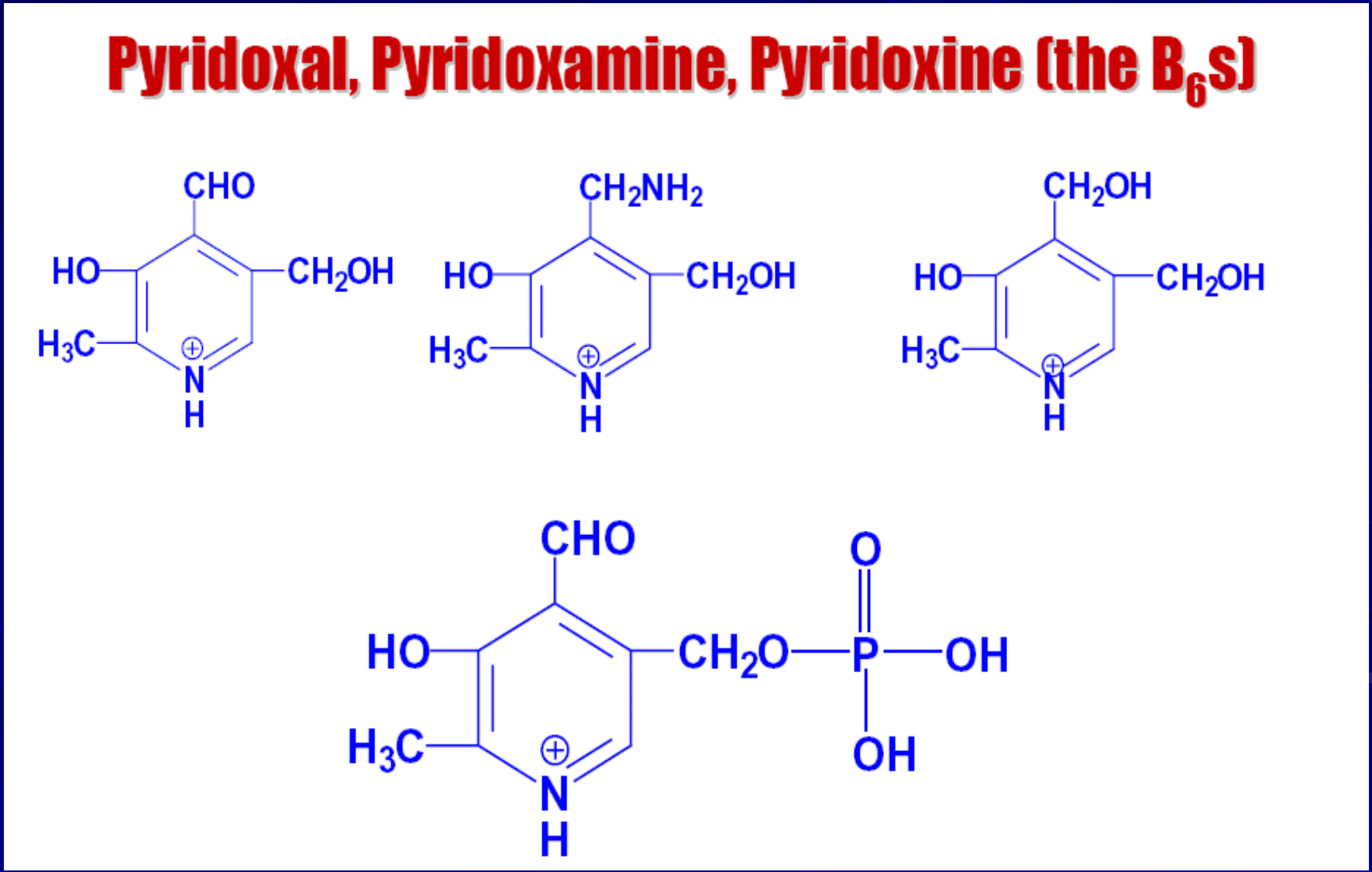
Кофермент	Роль в катализе	Витамин-предшественник
Пиридоксаль-фосфат (ПФ)	Перенос аминогрупп, декарбоксилирование аминокислот	Витамин B_6 (пиридоксин)
Тетрагидро-фолиевая кислота (ТГФК, H_4-фолат)	Транспорт одноуглеродных фрагментов	Фолиевая кислота (вит. B_c)
Тиамин-пирофосфат (ТПФ, ТДФ)	Декарбокси-лирование α - кетокислот	Витамин B_1 (тиамин)
Дезоксиаденозил- (или метил) кобаламин	Перенос алкильных групп; метилирование гомоцистеина	Витамин B_{12} (кобаламин)

ФАД. Витамин B_2 (рибофлавин)

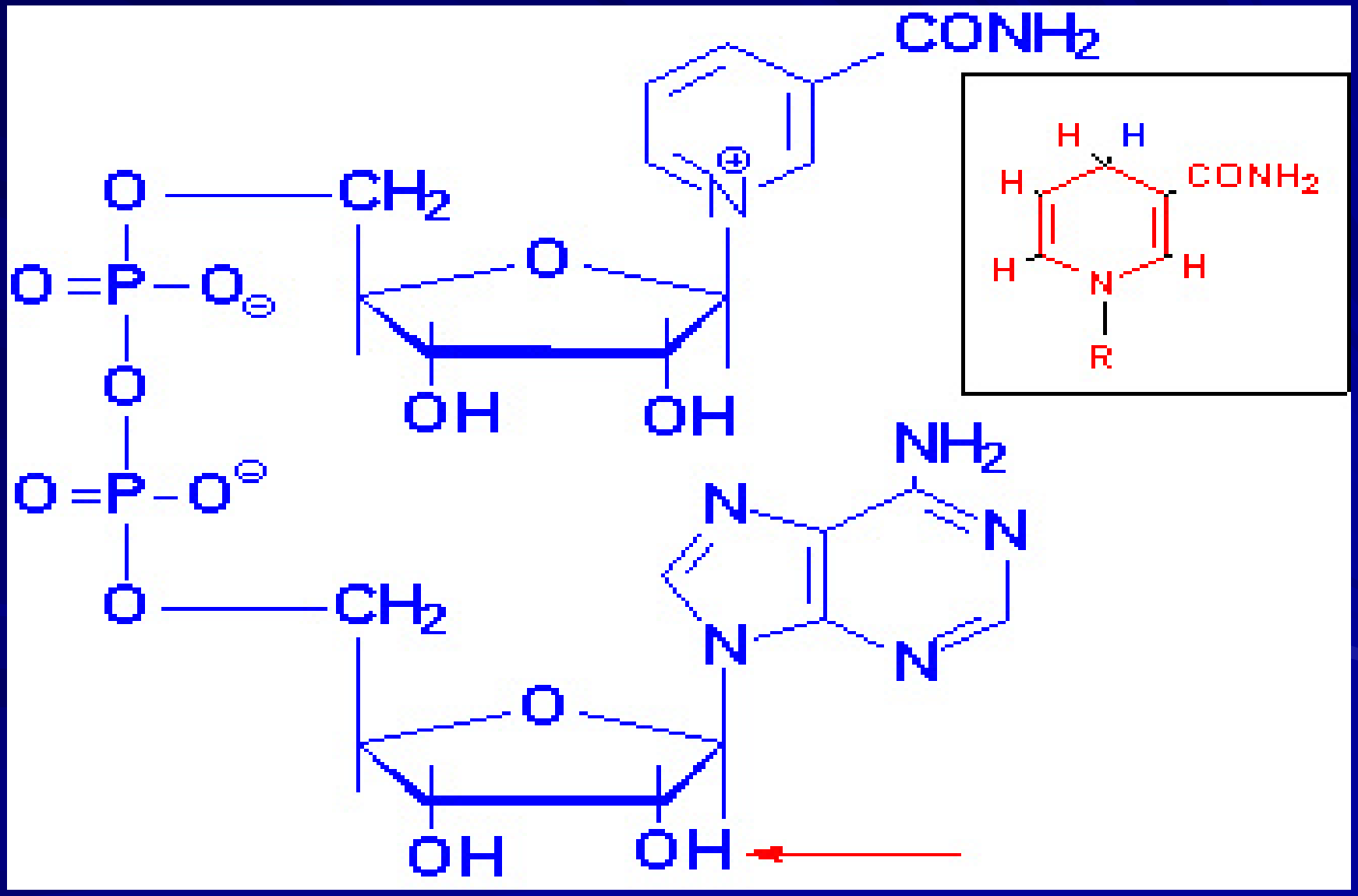




Витамин B_6. Пиридоксальфосфат



НАД, вит. РР


CONH2
H H
H
CONH2
H
H
N
R
O
CH2
O
O=P–O⊖
O
O=P–O⊖
O
CH2
O
OH
OH
NH2
N
N
N
N
O
OH
OH

Коферменты

К коферментам относят:

- производные витаминов;
- нуклеотиды АТФ, УТФ, ЦТФ;
- Фосфоаденозинфосфосульфат (ФАФС);
- HS-глутатион;
- S-аденозилметионин (SAM);
- гем;
- липоевая кислота и т.д.

Специфичность ферментов

Специфичность ферментов обусловлена комплементарностью между S и E и уникальной структурной организацией АкЦ.

- **Виды специфичности: субстратная и каталитическая**

Субстратная:

- **абсолютная специфичность – E действует только на один S (уреаза, каталаза, аргиназа, фумараза, сахараза и др.);**
- **относительная (групповая) специфичность – E катализирует однотипные превращения сходных по строению веществ (липаза → сложноэфирные связи, пептидазы → пептидные связи, гексокиназа фосфорилирует все гексозы и др.);**

Специфичность ферментов

- **Стереохимическая специфичность –**

- Е катализирует превращение только одного из стереоизомеров (стереоспецифичность к цис-транс-изомерам - для фумаразы S – фумаровая к-та, а не малеиновая;

- Е, осуществляющие метаболизм моносахаридов специфичны к Д-сахарам, а большинство Е, участвующих в обмене АК, стереоспецифично к L-АК;

- стереоспецифичность к α и β гликозидным связям – амилаза расщепляет α-гликозидные связи в крахмале и гликогене, но не действует на целлюлозу.

Специфичность ферментов

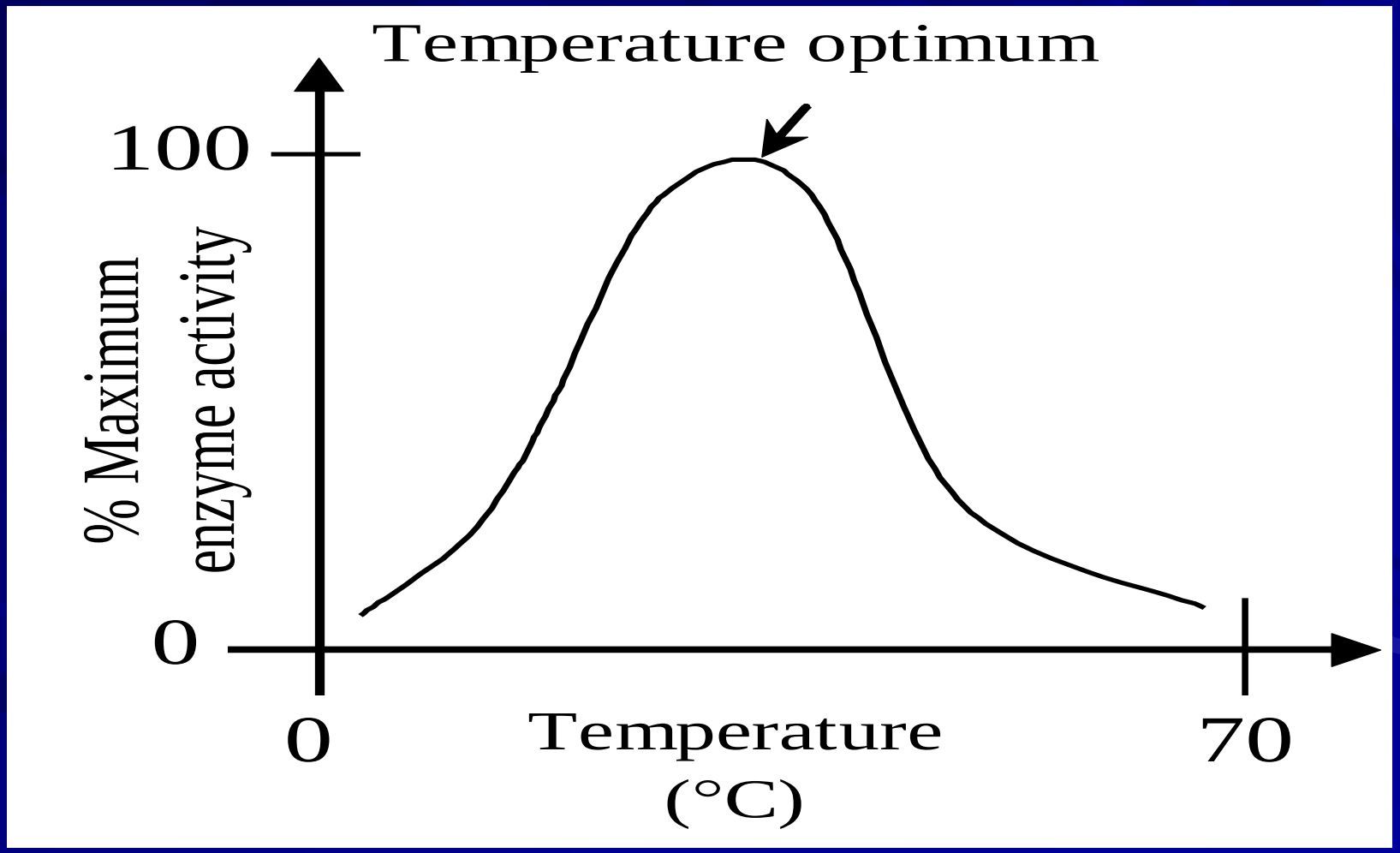
- **Каталитическая специфичность – специфичность пути превращения S.**

Е катализирует превращение присоединенного S по одному из возможных путей превращения, обусловлено строением каталитического участка АкЦ Е. Так, глюкозо-6-фосфат в клетках печени —S 4 различных Е. Из-за особенностей строения каталитических участков этих Е происходит различное превращение глю-6-фосфата с образованием 4 различных Р.

Кинетика ферментативных реакций

- - раздел химической кинетики, изучающий зависимость V ферментативной реакции от:
- t°;
- pH среды;
- [E];
- [S];
- действия активаторов и ингибиторов и др. факторов.
- ***<u>V ферментативной реакции определяют по убыли S или нарастанию P за единицу времени.</u>***

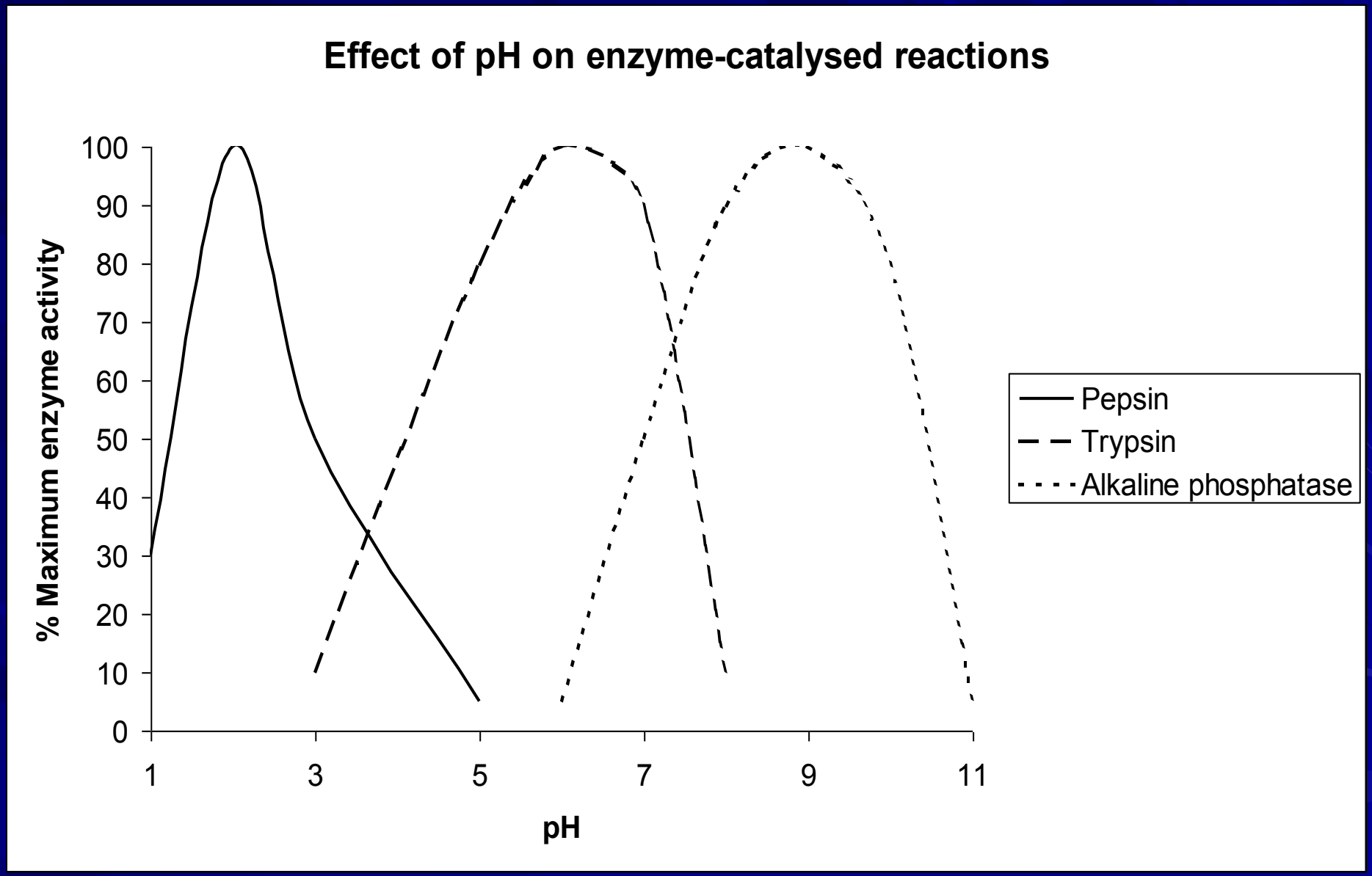
Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры



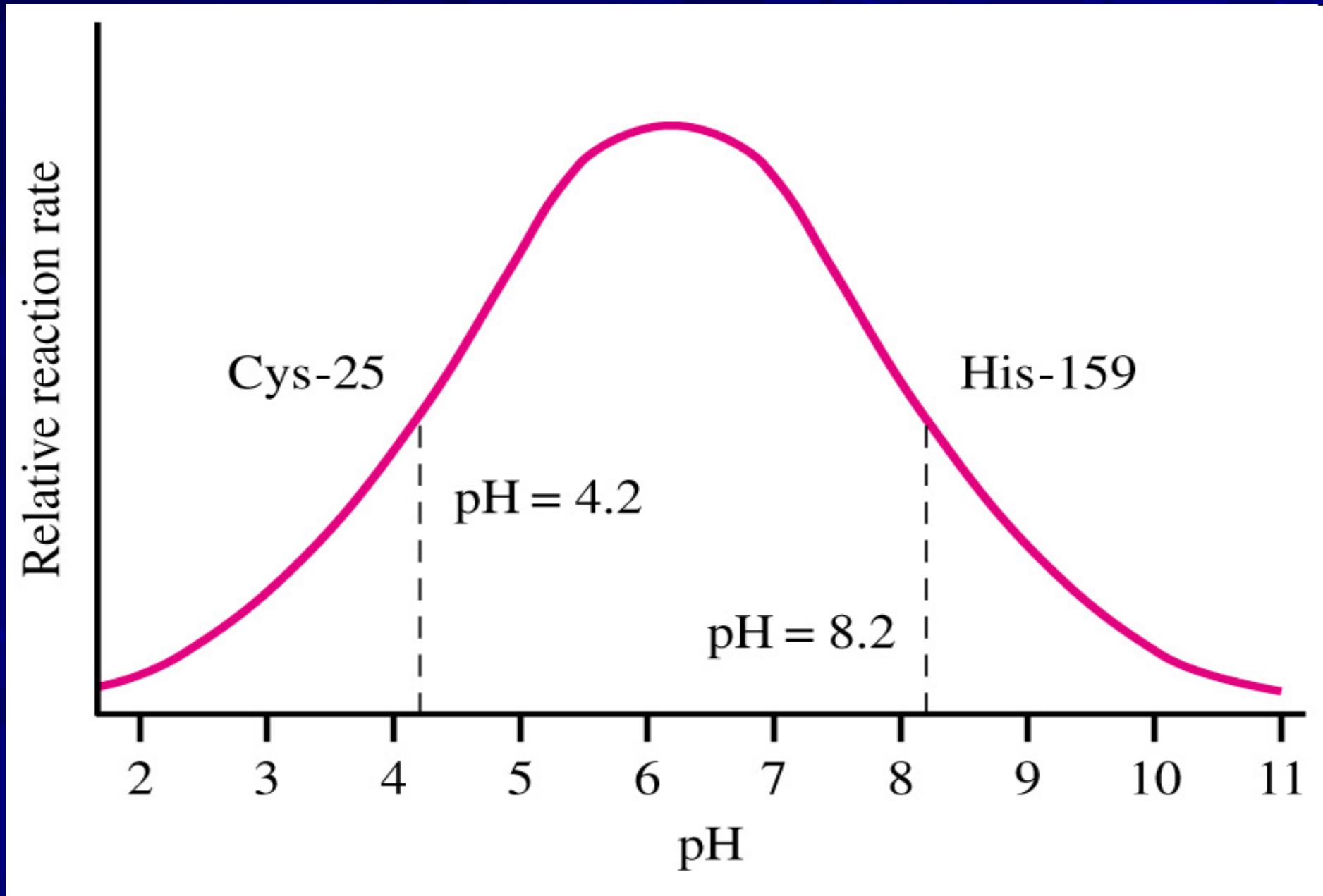
Tag –полимераза (Thermus aquaticus)

- Выделена из микроорганизмов, живущих в горячих источниках, не инактивируется до 95°, используется для молекулярной диагностики заболеваний с использованием ПЦР.

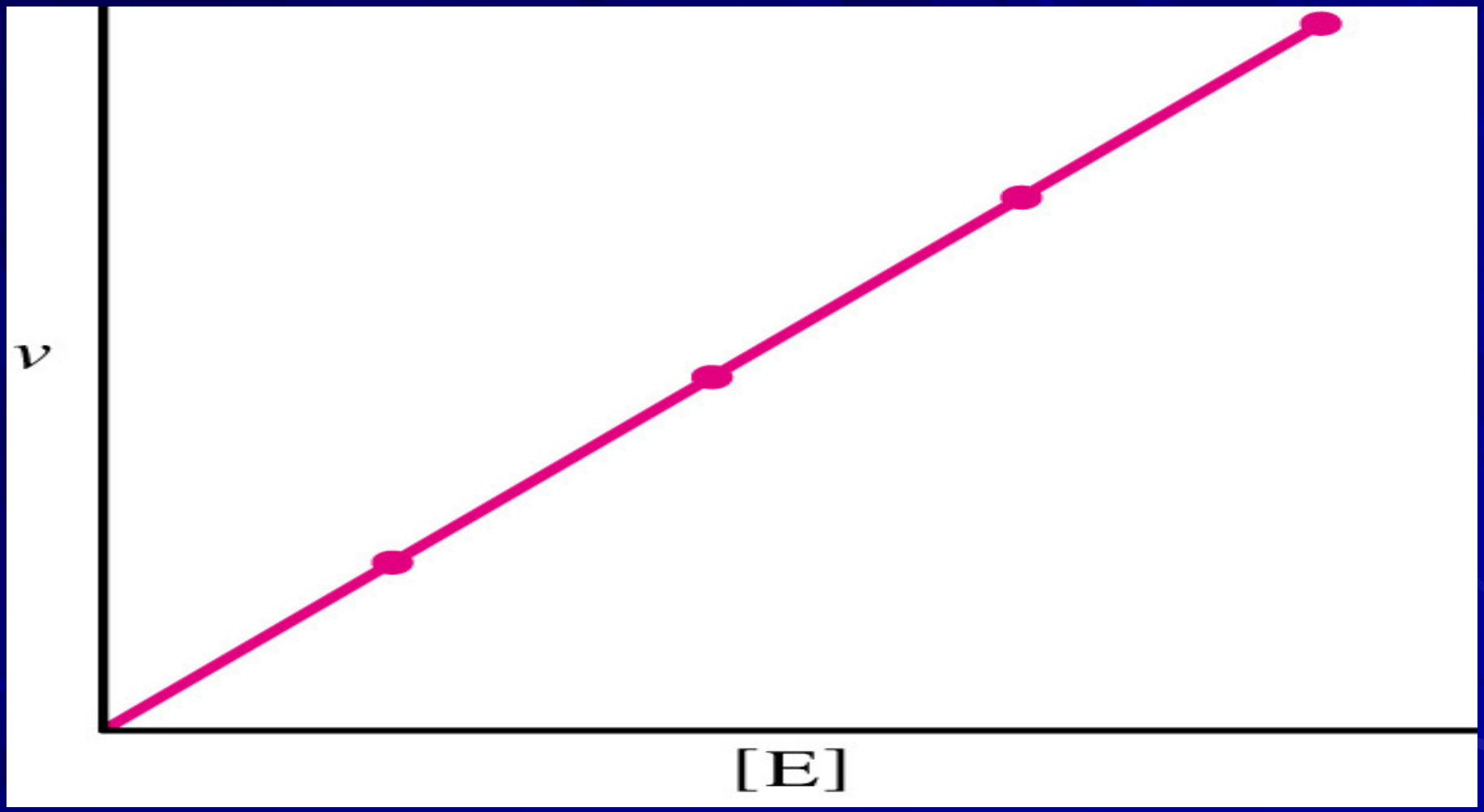
Зависимость V реакции от pH среды



Оптимум pH папаина 6,2

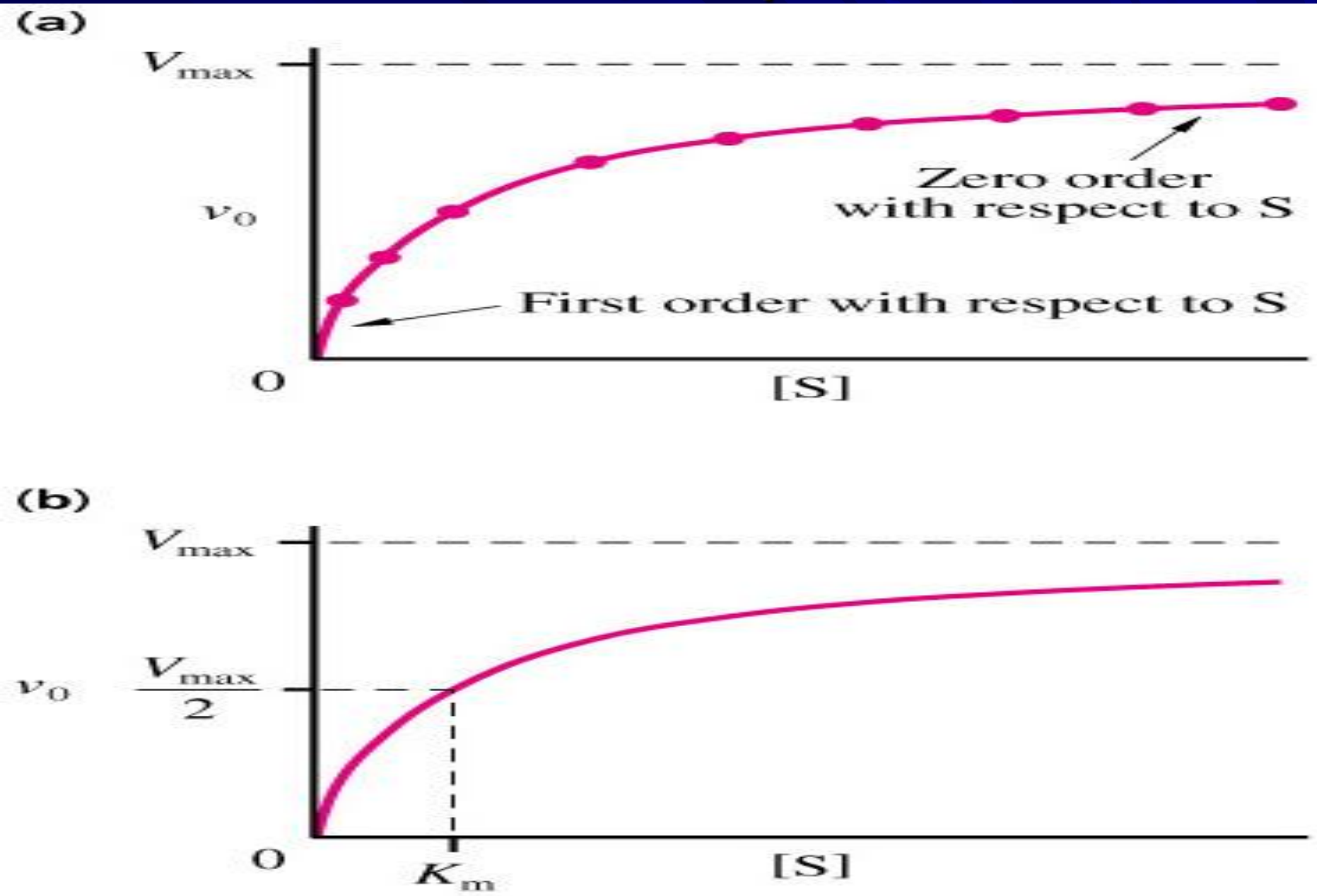


Зависимость V реакции от [E]

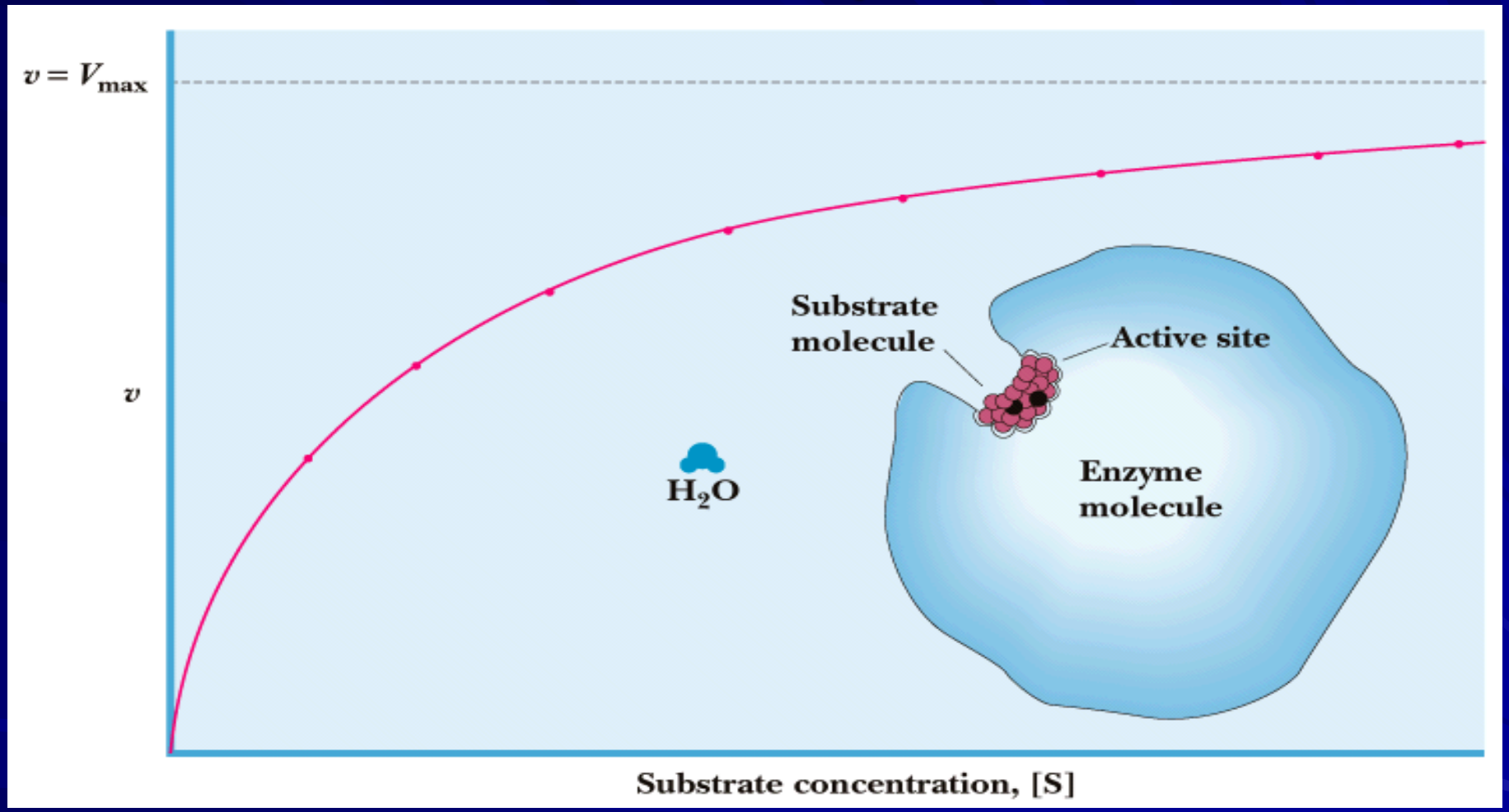


V = K [E]

Влияние концентрации S на V



Влияние концентрации S на V



Кривая зависимости V ферментативной реакции от [S] - гипербола.

Константа Михаэлиса (Km)

- Km - численно равна концентрации субстрата [S], при которой скорость равна половине максимальной (1/2 Vmax).

Vmax и Km — кинетические характеристики эффективности E. Vmax позволяет оценить эффективность действия E, определяет максимальную возможность образования P при данной [E] и в условиях избытка S.

Vmax и Km

- ***Физический смысл Km, — сродство Е к S. Чем ↓ Km, тем ↑ сродство Е к данному S, тем > начальная скорость реакции и наоборот.***
- **Пример: в печени 2 Е, фосфорилирующие глюкозу — глюкокиназа (Km =10 ммоль/л) и гексокиназа (Km < 0,1ммоль/л). Глюкокиназа, имеющая ↑ Km и ↓ сродство к S (глюкозе) активна при ↑ [глю] в крови, т.е. в абсорбтивный период (период пищеварения), а гексокиназа, имеющая ↓ Km и ↑ сродство к S активна при низкой [глю] в крови, т.е. в постабсорбтивный период (промежуток между приемами пищи).**

Уравнение Михаэлиса-Ментен

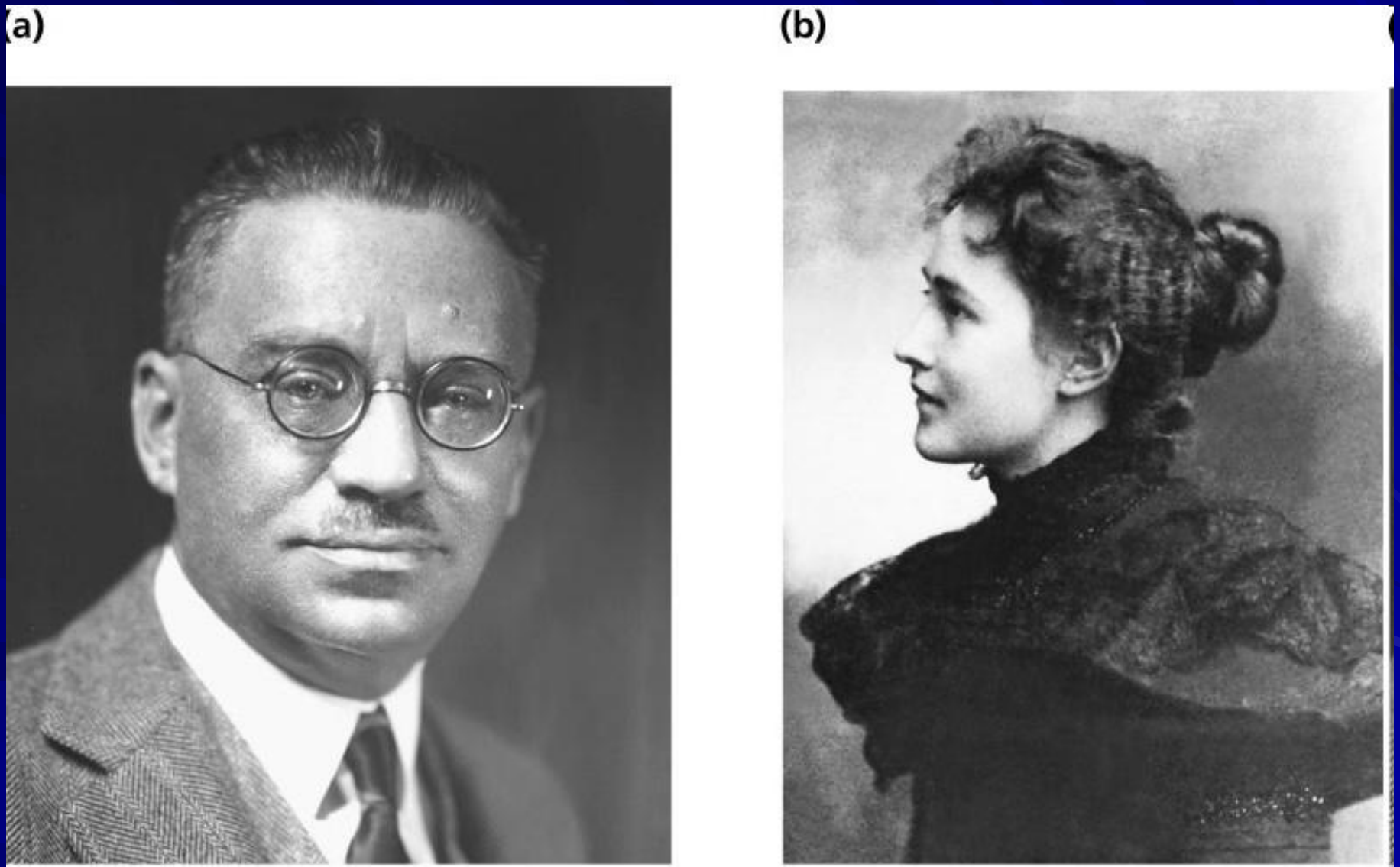
- уравнение Михаэлиса – Ментен:

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

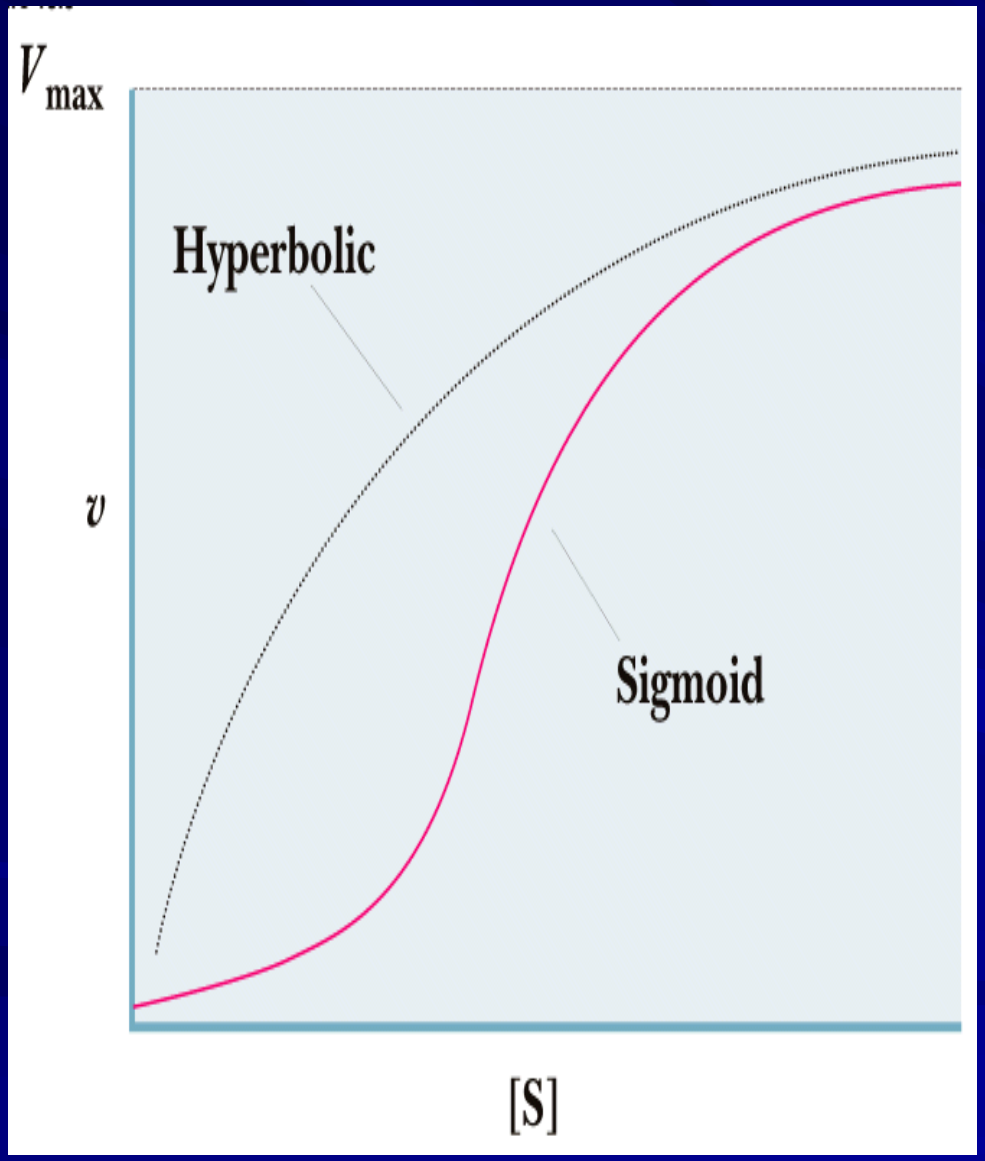
- Уравнение Лайнуивера-Бэрка:

$$1/v = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]}$$

Леонор Михаэлис (1875-1949) и Мауд Ментен (1879-1960) пионеры в кинетике ферментов.



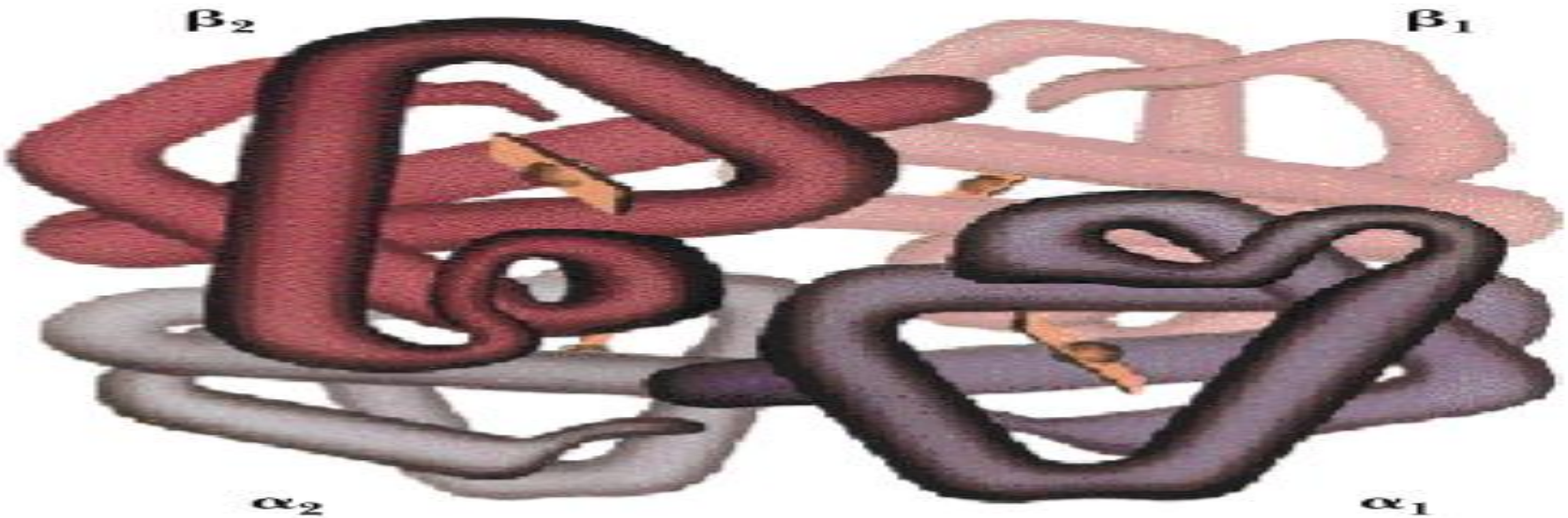
Влияние [S] на V у аллостерических ферментов



У аллостерических Е график зависимости V от [S] — не гипербола, а S-образная кривая (связывание одной молекулы S в одном каталитическом центре ↑ связывание S с другим центром – положительный кооперативный эффект).

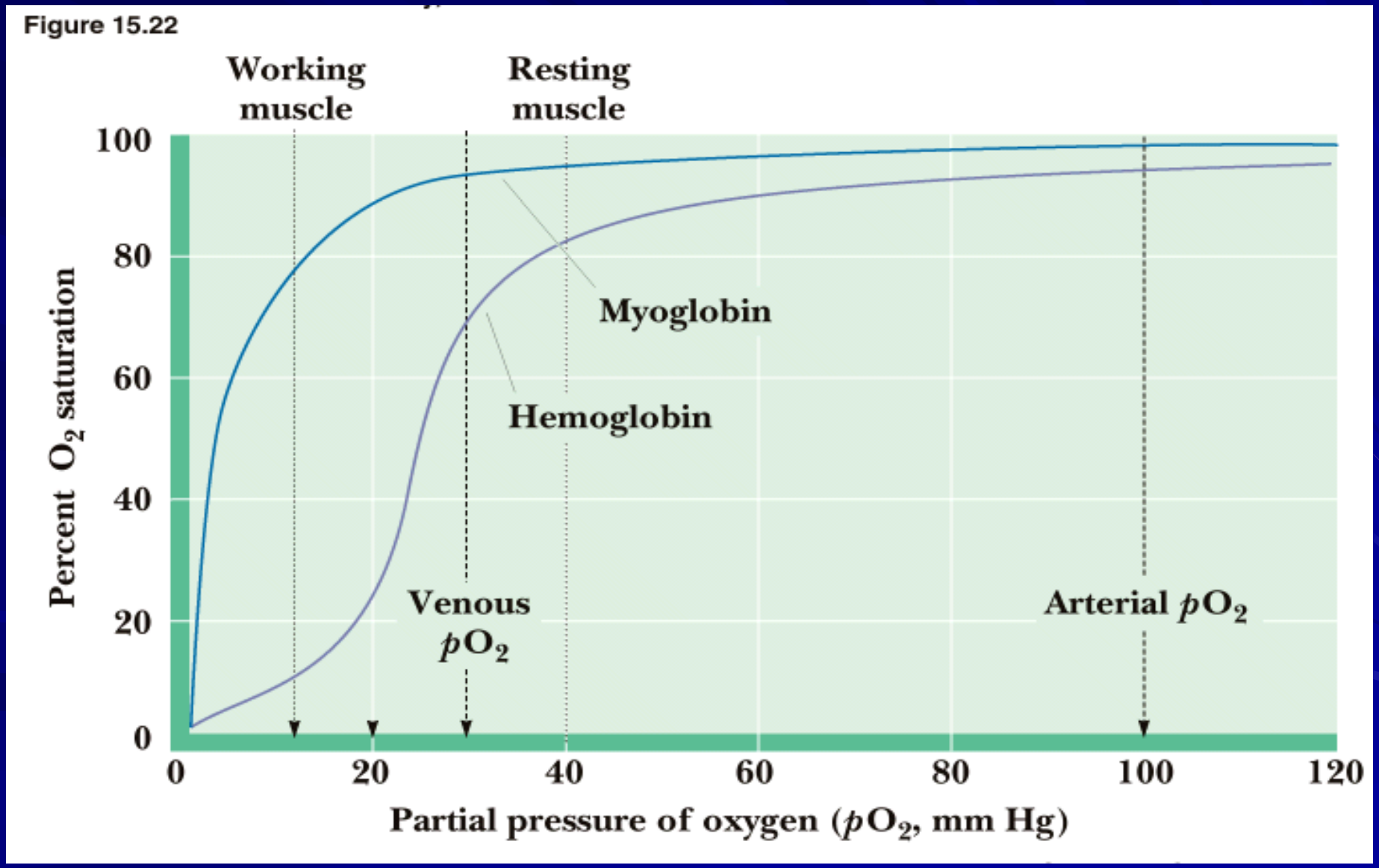
МВ и НВ

Myoglobin (Mb)

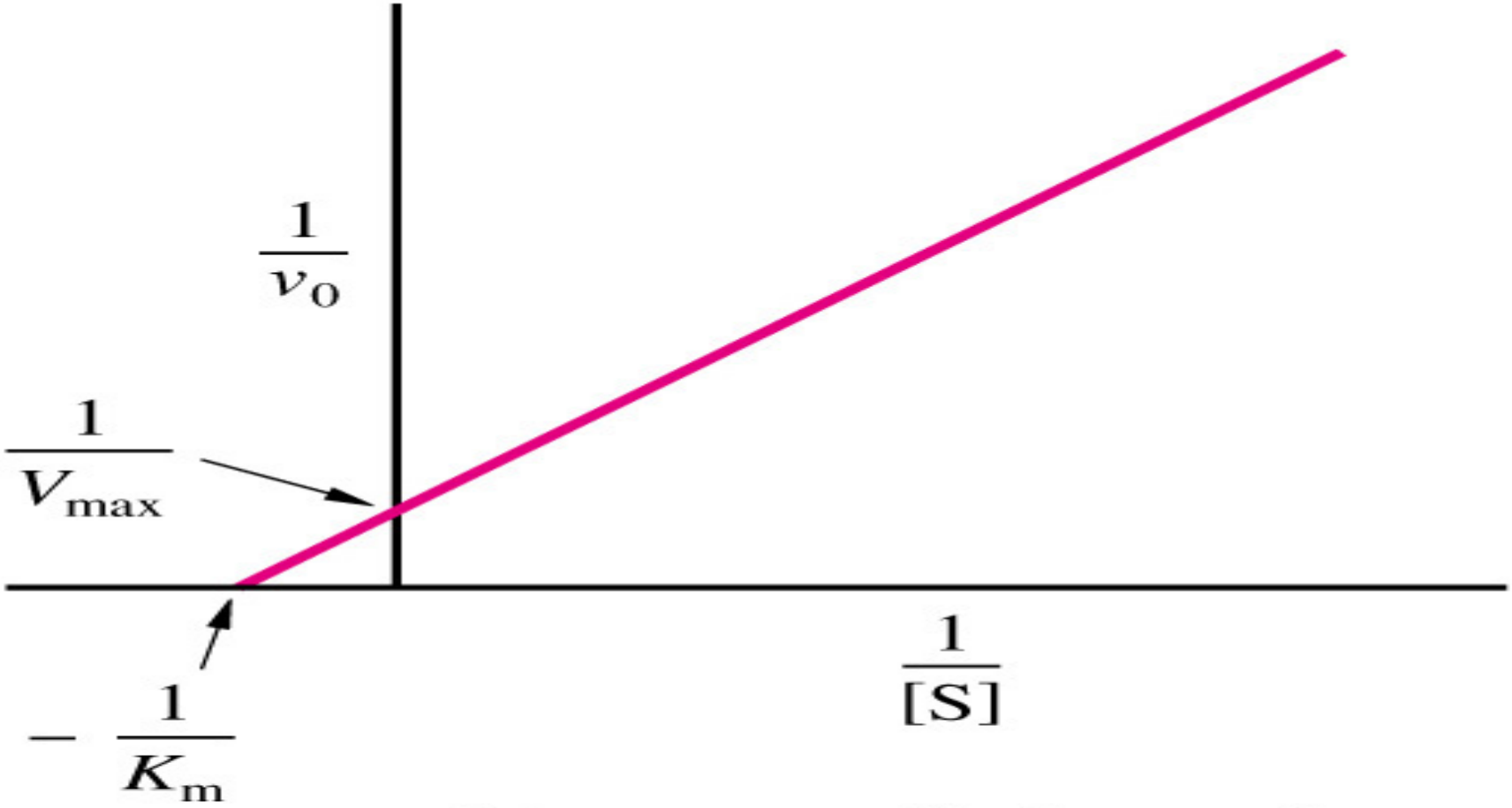


Hemoglobin (Hb)

Кривые насыщения Нв и Мв O_2



Уравнение и график Лайнуивера-Бэрка



Lineweaver-Burk equation:

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

$$\frac{[E][I]}{[EI]}$$

Ингибиторы (I) – вещества, снижающие активность ферментов

- Ингибирование - обратимое и необратимое.
- Обратимые I нековалентно связываются с E и могут отделяться от E.
- Реакция в общем виде: $E + I \leftrightarrow EI$
- Константа ингибирования:

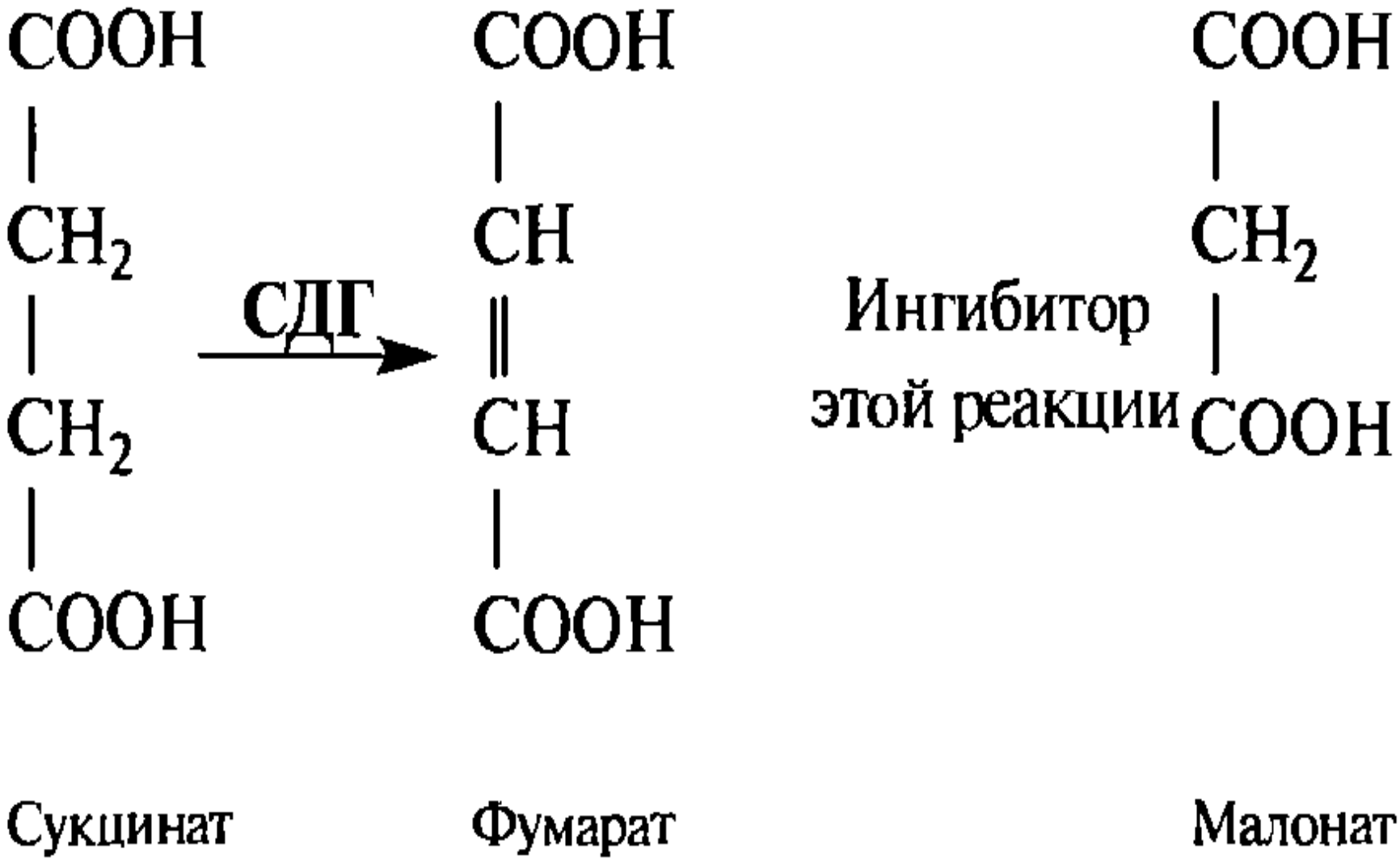
$$K_i = \frac{[E]\,[I]}{[EI]}$$

- Необратимые (специфически связывают определенные функционально важные группы АкЦ , образуя прочные ковалентные связи с ферментом, необратимо изменяя нативную конформацию E). Необратимые I - ионы тяжелых металлов (Hg^{2+}, Ag^{+}, As^{3+} и др) в малых концентрациях блокируют SH группы АкЦ, а в больших – денатурация белка, инактивация E.
- Обратимое ингибирование - конкурентное и неконкурентное

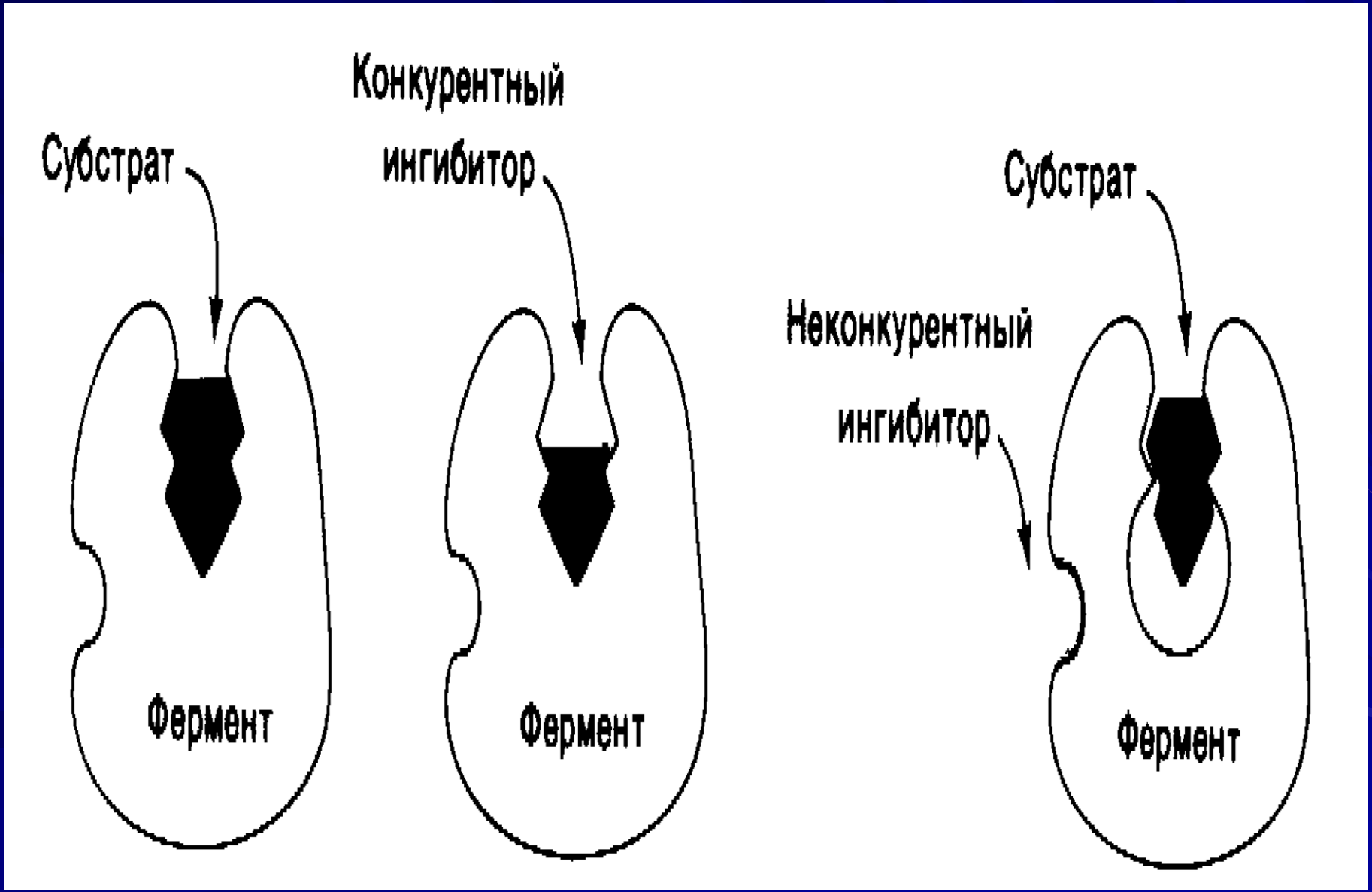
Особенности конкурентного ингибирования:

- I конкурирует с S за связывание в S-связывающем участке АкЦ;
- I является структурным аналогом S и комплементарен ему;
- При ↑ [S] действие I может быть снято;
- Конкурентный I ↑ Km (↓ сродство к E), т.к. вследствии конкуренции I и S за один и тот же центр для 1/2 насыщения требуется большее количество S, однако, когда система достигает насыщения, Vмакс не изменяется.
- Пример: малонат – конкурентный I СДГ.

Пример конкурентного ингибирования



Ингибиторы


Субстрат
Фермент
Конкурентный
ингибитор
Фермент
Субстрат
Неконкурентный
ингибитор
Фермент

Неконкурентное ингибирование

- I не имеет структурного сходства с S;
- I связывается не с АкЦ E;
- ↑ [S] не уменьшает действие I;
- I ↓ Vмакс (I изменяет конформацию E так, что нарушается взаимодействие E с S) и не влияет на Км (не влияет на сродство E к S).
- Важные неконкурентные I — метаболиты, связывающиеся в АлЦ E и участвующие в аллостерической регуляции метаболизма.

Бесконкурентное и смешанное ингибирование

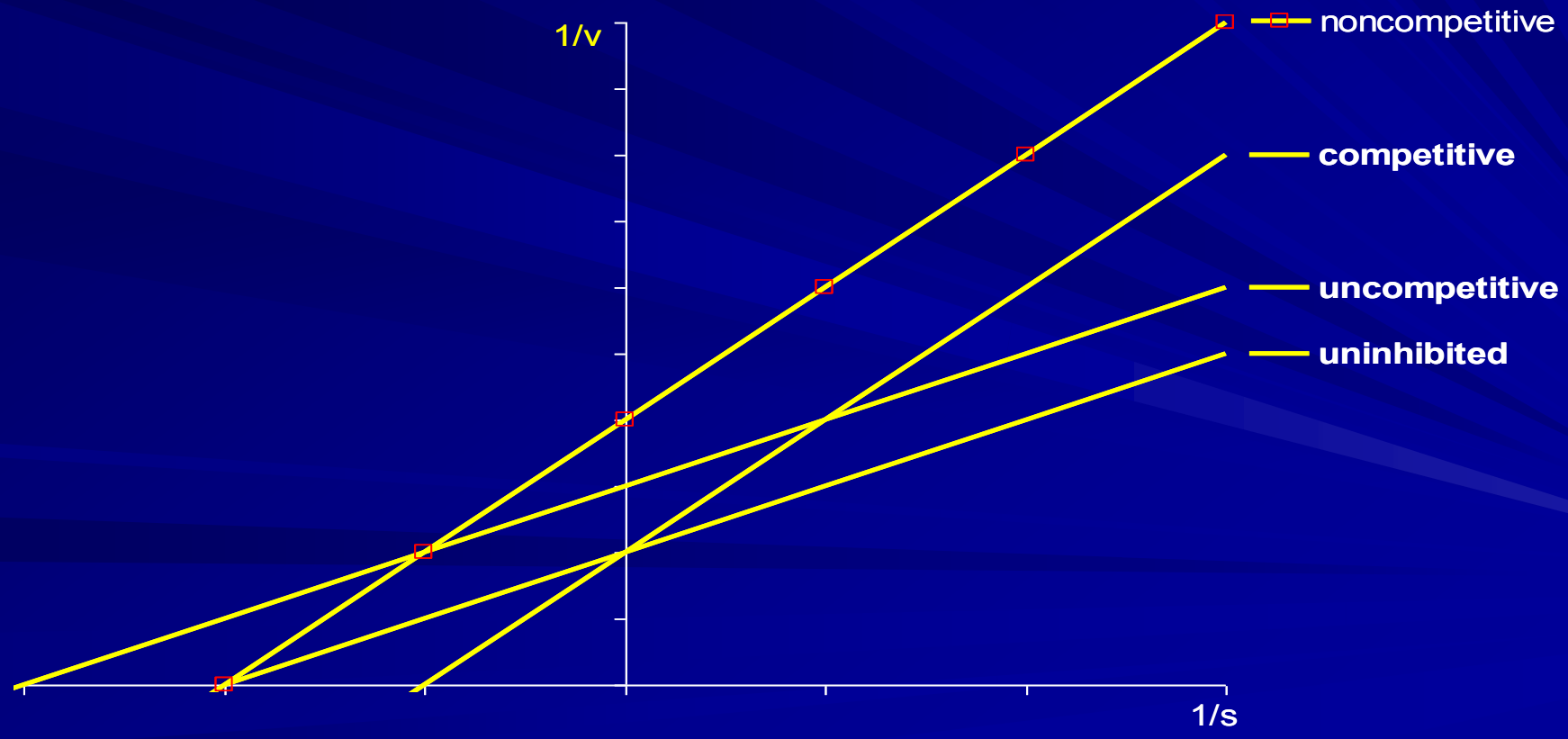
Бесконкурентное ингибирование — по схеме:

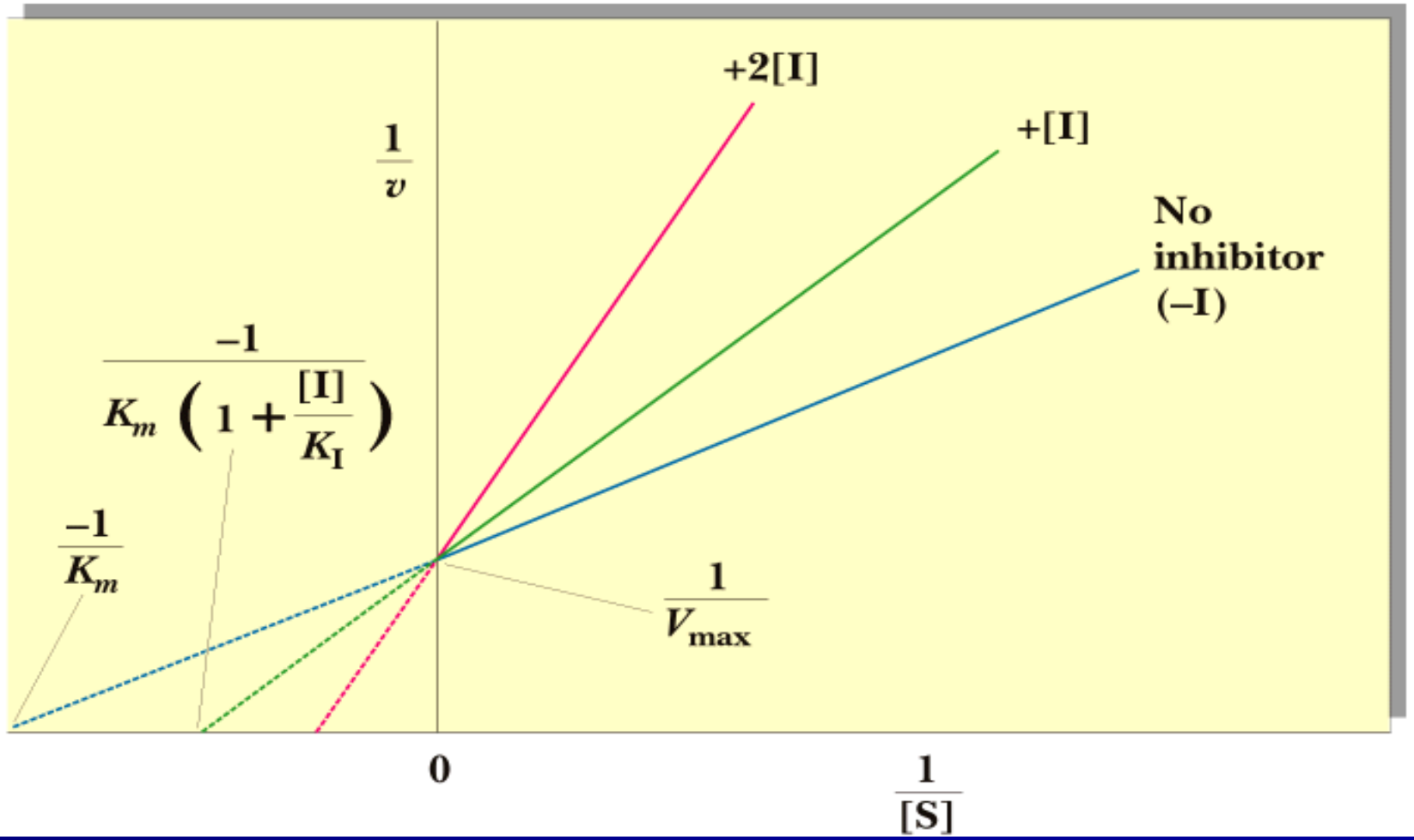
$E + S \leftrightarrow ES + I \leftrightarrow ESI \rightarrow E + P$

- I связывается с E также не в каталитическом центре, однако не со свободным E, а с комплексом ES, т.е. центр, связывающий I, становится доступным для I только после того, как свяжется S. Значения V и Km при этом уменьшаются в одинаковой степени.
- Смешанное (частично неконкурентное) ингибирование, ↓ Vmax сочетается с изменением Km (I модифицирует как связывание S, так и уменьшает Vmax).

Влияние конкурентного, неконкурентного и бесконкурентного ингибиторов на кинетику ферментативной реакции

Lineweaver-Burk plots showing the effects of uncompetitive, competitive, and noncompetitive inhibitors on the kinetics of enzyme-catalyzed reactions.




+2[I]
+[I]
No inhibitor (–I)
$\frac{1}{v}$
$\frac{-1}{K_m\left(1+\frac{[I]}{K_I}\right)}$
$\frac{-1}{K_m}$
$\frac{1}{V_{max}}$
0
$\frac{1}{[S]}$

Значение изучения и использования в медицине ингибиторов

- I дают информацию о строении АкЦ Е, о составе его функциональных групп и природе химических связей;
- применяются при изучении изоферментов, отличающихся различной чувствительностью к I;
- в основе действия некоторых токсинов и ядов – ингибирование Е (HCN – цитохромы, ФОС – холинэстеразу);
- многие лекарства – конкурентные I Е (аллопуринол – I ксантиноксидазы, дикумарол – I γ-глутамилкарбоксилазы, аспирин – ЦОГ, сульфаниламиды – структурные аналоги ПАБК – конкурентные I Е, необходимого у микроорганизмов для синтеза фолиевой кислоты (ФК), прозерин – I холинэстеразы и др);
- I могут быть аналоги коферментов (аналог витамина ФК аминоптерин - антивитамин –лечебный препарат).
- Активаторы Е (HCl - пепсин желудочного сока, желчные кислоты – панкреатическую липазу).

Мультимолекулярные (мультиэнзимные) ферментные системы

- ассоциация Е и коферментов в единый комплекс, имеет в составе разные Е, катализирующие последовательные превращения какого-либо S. Особенности:
- прочность ассоциации Е;
- промежуточные продукты передаются от одного АкЦ к другому, что делает работу мультиэнзимного комплекса эффективным.
- Примеры: ПДГ и α-кетоглутаратдегидрогеназный комплексы (окислительное.декарбоксилирование ПВК и α-кетоглутарата), а также синтетаза ВЖК.

Субклеточная локализация ферментов

Е расположены в различных органеллах соответственно их функции. Различные отсеки (компартменты) клетки различаются по набору Е и метаболизму – компартментализация метаболизма.

- в цитозоле (растворимая фракция) – Е гликолиза, пентозофосфатного пути распада глюкозы, активации АК, синтеза и распада гликогена, синтаза ВЖК и др;
- в митохондриях (МТХ) – обменные процессы, обеспечивающие клетку энергией, т.е. ферменты ЦТК, окислительного фосфорилирования, окисления ЖК, ГДГ, синтетаза δ- АЛК и др;

Субклеточная локализация ферментов

- **Лизосомы** участвуют в процессах внутриклеточного переваривания, содержат 30 Е – в основном гидролазы: РНК-азу, эстеразы, протеазы. Лизосомальные Е участвуют в воспалительных процессах, повреждениях клеток и некоторых наследственных заболеваниях метаболизма;
- **микросомальная фракция** включает рибосомы и эндоплазматический ретикулум, содержит Е синтеза белков, холинэстеразу, церулоплазмин, глюкозо-6-фосфатазу, γ-глутамилтрансферазу и др;
- **ядро** – 40 ферментов, в том числе репликативный комплекс, РНК – полимеразу и др;
- **клеточная (плазматическая) мембрана** – ферменты транспорта веществ – транслоказы, аденилатциклаза (АЦ), γ - глутамилтрансфераза и др.

Органоспецифические ферменты

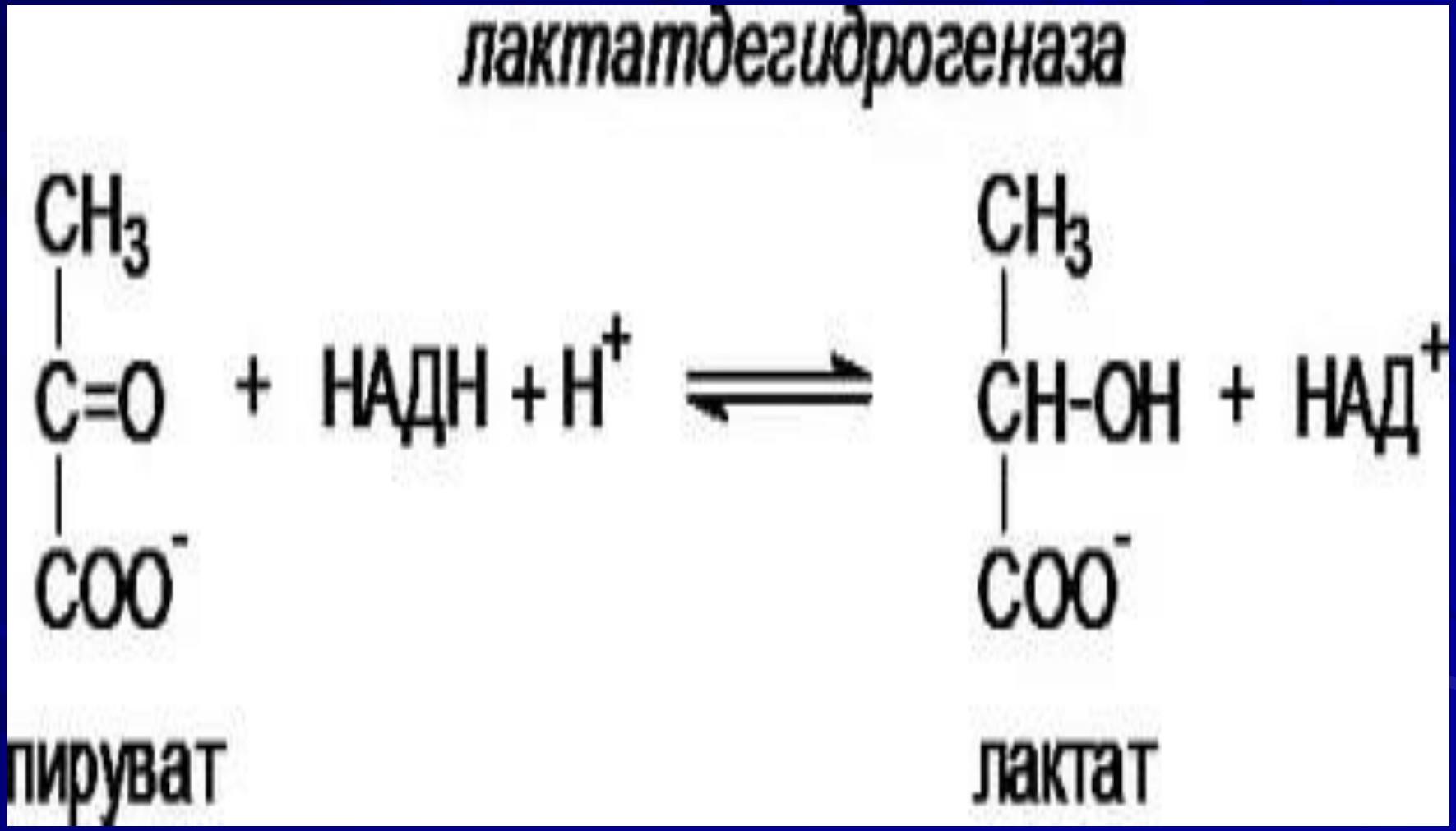
Е, которые - только в одном-двух органах:

- фруктозо 1-фосфатальдолаза, орнитинкарбамоилтрансфераза и уроканиназа – в печени;
- гистидаза – в печени и эпидермисе;
- трансамидиназа – в почках и поджелудочной железе;
- креатинкиназа – в сердечной и скелетной мышцах;
- кислая фосфатаза – в предстательной железе, малоактивна в др. органах и т.д.

Изоферменты

- изоферменты - белки, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся по первичной структуре, физико-химическим свойствам (молекулярной массой, сродству к S, Vмакс, Km, ЭФ подвижностью, оптимуму pH и t, регуляторными свойствами), локализацией в клетке и органах.
- изоферменты – продукты экспрессии разных генов, т.е. различия между Е обусловлены генетически, а не вызваны посттрансляционными модификациями.

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА



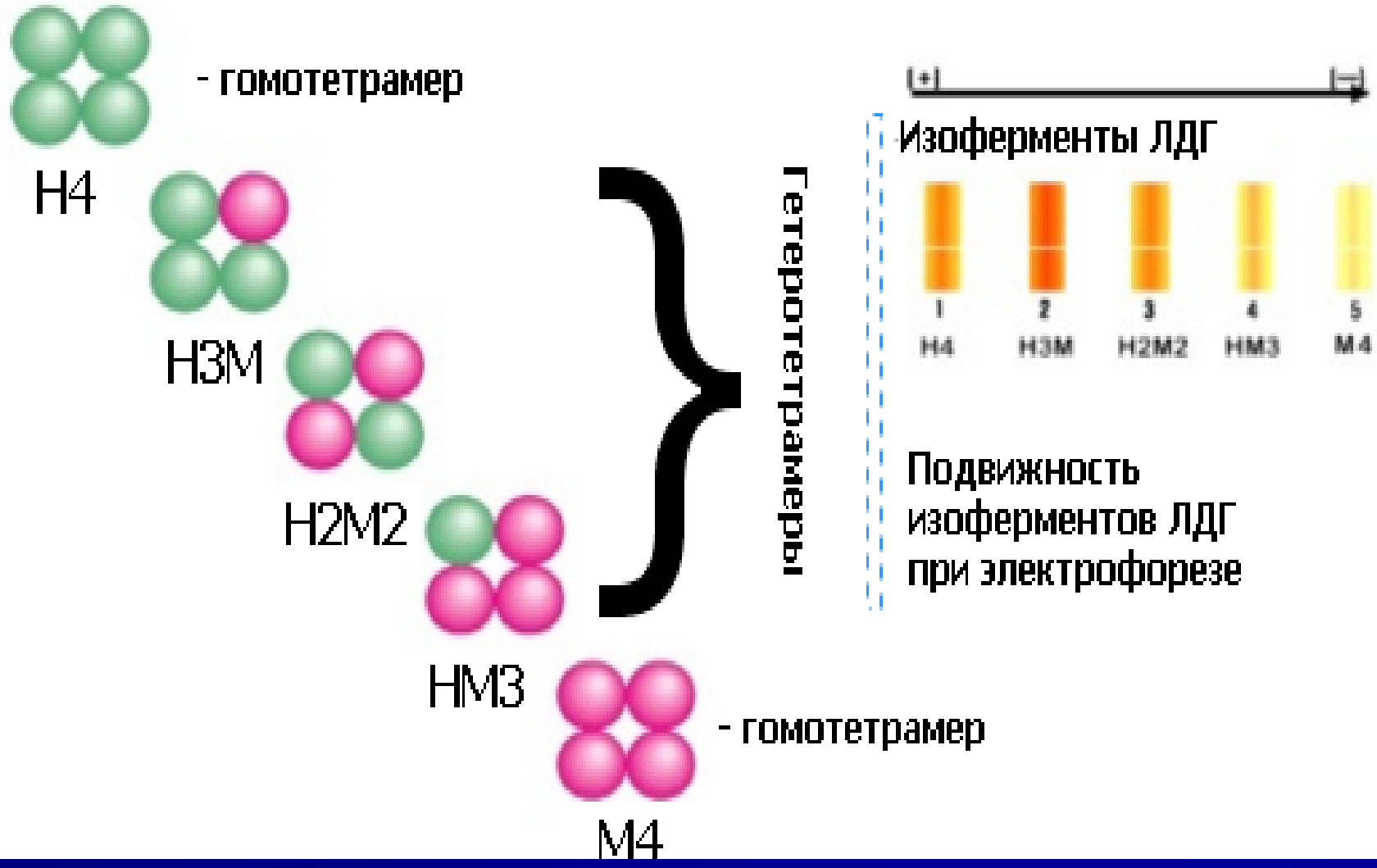
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

- **ЛДГ -тетрамер из Н и М субъединиц, имеет 5 изоферментов.**
- **ЛДГ-1 НННН при ЭФ - с наибольшей скоростью к +**

(↑ при остром инфаркте миокарда)

- **ЛДГ- 2 НННМ**
- **ЛДГ- 3 ННММ**
- **ЛДГ- 4 НМММ**
- **ЛДГ - 5 ММММ (↑ при заболеваниях печени)**

5 изоферментов ЛДГ



Креатинкиназа

- Креатинкиназа (КК) катализирует реакцию:

КРЕАТИНФОСФАТ + АДФ ↔ КРЕАТИН +АТФ

имеет В и М протомеры.

3 изофермента:

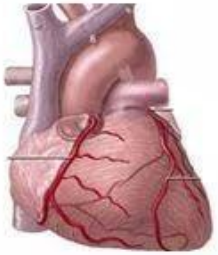
- $КК_1$ ВВ – мозг
- $КК_2$ МВ – сердце (↑ при инфаркте миокарда)
- $КК_3$ ММ – скелетная мускулатура (↑ при травмах мышц и мышечных дистрофиях)

Креатинкиназа

АТФ + креатин $\overset{\text{КФК}}{\leftrightarrows}$ АДФ + креатинфосфат

Активность фермента высока в:

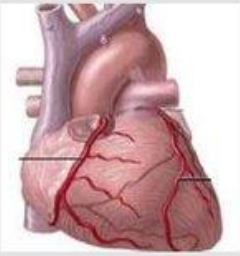
- мышцах,
- миокарде.



В сыворотке креатинкиназа содержится в следовых количествах.

Изоферменты КФК

- ММ – в скелетных мышцах,
- МВ – в миокарде (+ММ),
- ВВ - в ткани мозга.



Определение активности ферментов

- при оптимальных условиях:

- pH
- t°
- полном насыщении E субстратом.

V ферментативной реакции пропорциональна [E].

О скорости E реакции судят или по скорости убыли S или по скорости образования P реакции.

Единицы активности ферментов

- **Международная единица активности (МЕ или Е или U (unit) - количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоля вещества за 1 мин (мкмоль/мин):**

$$1\ \text{МЕ} = \frac{1\ \textbf{мкмоль}\ \textit{превращенного субстрата}}{1\ \textbf{мин}}$$

$$\text{Активность в МЕ} = \frac{\text{Количество}\ \textit{превращенного субстрата (мкмоль)}}{\textit{Время (}\textbf{мин}\textit{)}}$$

Единицы активности ферментов

- В системе единиц СИ – **катал** (кат) -количество Е, которое превращает 1 моль S за 1 секунду (1 моль/с).

$$\text{п катал} = \frac{\text{Количество превращенного субстрата}}{\text{Время (с)}}$$

- Удельная активность Е -– число единиц ферментативной активности на 1 мг белка (мкмоль/мин/мг)

$$\text{Уд. ак} = \frac{\text{Количество превращенного субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)} \times \text{масса белка (мг)}}$$

Проблемы медицинской энзимологии

3 направления:

энзимопатология,

энзимодиагностика,

энзимотерапия.

- **энзимопатология** (развитие некоторых болезней — энзимопатий, напр. галактоземии, фенилкетонурии, связано с наследственной недостаточностью или полным отсутствием синтеза даже одного Е; в основе патогенеза многих соматических заболеваний — нарушение регуляции и синтеза Е).

Энзимодиагностика

- энзимодиагностика — 2 пути :
- диагностика заболеваний по активности Е в биологических жидкостях,
- использование Е как аналитических реагентов в клинико-диагностических лабораториях для измерения концентрации глюкозы, ТАГ, ХС, мочевины в крови.

Диагностика заболеваний по активности Е в биологических жидкостях

В её основе –

1. наличие органоспецифических Е;

2. активность органоспецифических Е в крови или моче в норме отсутствует или очень низка;

3. при повреждении клеток соответствующего органа активность Е в крови или моче резко повышается. Причины:

- нарушение проницаемости мембран клеток (воспалительный процесс)
- нарушение целостности клетки (при некрозе).

Появление в плазме Е, имеющих ЦП локализацию – при воспалительном процессе, при глубоких повреждениях (некрозе) — МТХ или ядерные белки.

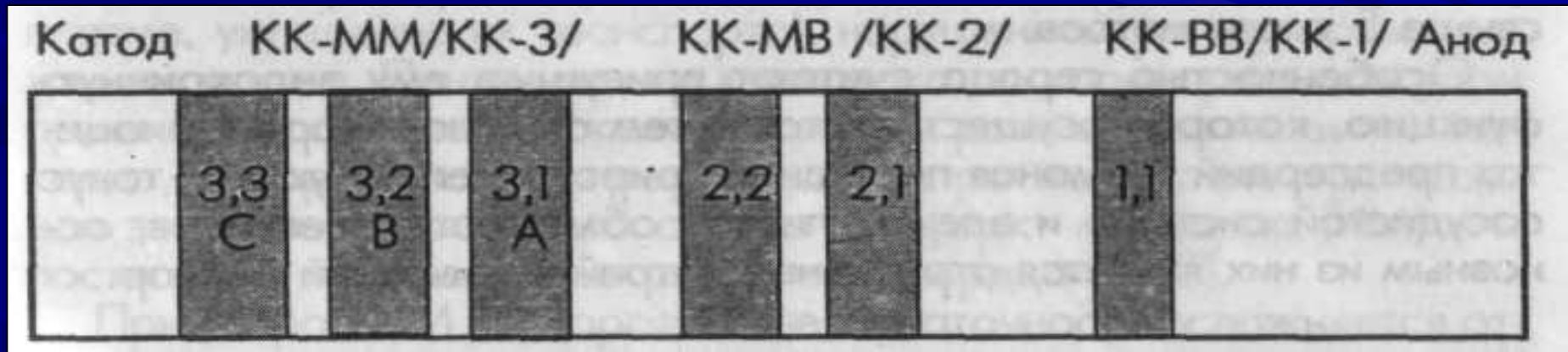
Ферменты крови Энзимодиагностика

- ферменты секреторные (ферменты свёртывающей системы крови; ХЭ),
- экскреторные (ЛАП, ЩФ и др.)
- индикаторные = органоспецифические (ЛДГ, АсАТ, АлАТ и др.)

Изоферменты-олигомеры, генетически детерминированные различия п/п цепей

Изоформы ферментов или изоферментов

результат посттрансляционной модификации



Диагностическое значение ферментов

Ферменты	Примеры использования
Лактатдегидрогеназа (изофермент ЛДГ-1)	Инфаркт миокарда
Аспартат-аминотрансфераза (АСТ)	Инфаркт миокарда
Аланин-аминотрансфераза (АЛТ)	Заболевания печени (например, инфекционный гепатит), инфаркт миокарда
КК (изофермент ММ — мышечный тип изофермент МВ — сердечный тип)	Прогрессирующая дистрофия Инфаркт миокарда
Кислая фосфатаза (КФ)	Рак предстательной железы
α-Амилаза	Заболевания поджелудочной железы

Использование ферментов как аналитических реагентов в клинико-диагностических лабораториях для измерения концентрации глюкозы, ТАГ, ХС, мочевины в крови.

Глюкозооксидаза	Определение концентрации глюкозы в крови
Холестеролоксидаза	Определение холестерина в крови
Липаза	Определение триацилглицеринов в крови
Уреаза	Определение мочевины в крови

Энзимотерапия

- Энзимотерапия - использование ферментов и модуляторов (активаторов и ингибиторов Е) в качестве лекарственных средств.

Ферменты как лекарственные препараты

Пепсин	Нарушение переваривания белков в желудке, нарушение синтеза или секреции пепсина
Трипсин, химотрипсин	Лечение гнойных ран
Стрептокиназа, урокиназа	Предотвращение тромбообразования при пересадке органов и других операциях
Гиалуронидаза	Рассасывание рубцов
Аспарагиназа	Лечение некоторых злокачественных образований
Нуклеазы (ДНКаза)	Вирусный конъюнктивит, ринит, гнойный бронхит
Уреаза	Удаление мочевины из организма в аппаратах «искусственная почка»

Иммобилизованные ферменты

- Фермент, ковалентно пришитый к любому органическому или неорганическому полимерному носителю – иммобилизованный. Иммобилизация Е обеспечивает высокую специфичность их действия, повышение стабильности. Иммобилизованные Е используются в промышленности (в том числе фармацевтической).

Регуляция активности ферментов

- Изменение скорости ферментативных реакций в клетке – основной механизм регуляции метаболизма, а также роста, развития клетки и её ответа на изменение окружающей среды.
- **В регуляции метаболизма играют роль:**
- Е одной из **начальных стадий превращения** (обычно необратимой) или Е, находящийся в **местах разветвлений метаболических путей**;
- Е, катализирующие самые **медленные (лимитирующие)** стадии. Такие Е – **ключевые ферменты.**
- **Существуют 3 основных способа контроля скорости ферментативной реакции:**
- **контроль активности фермента;**
- **контроль количества фермента.**
- **доступностью молекул S и кофермента.**

Регуляция активности ферментов

Активность ферментов регулируется:

- путем частичного (ограниченного) протеолиза;
- аллостерической регуляцией;
- путем ковалентной модификации (фосфорилирование – дефосфорилирование);
- с помощью белок-белковых взаимодействий;
- на генетическом уровне.

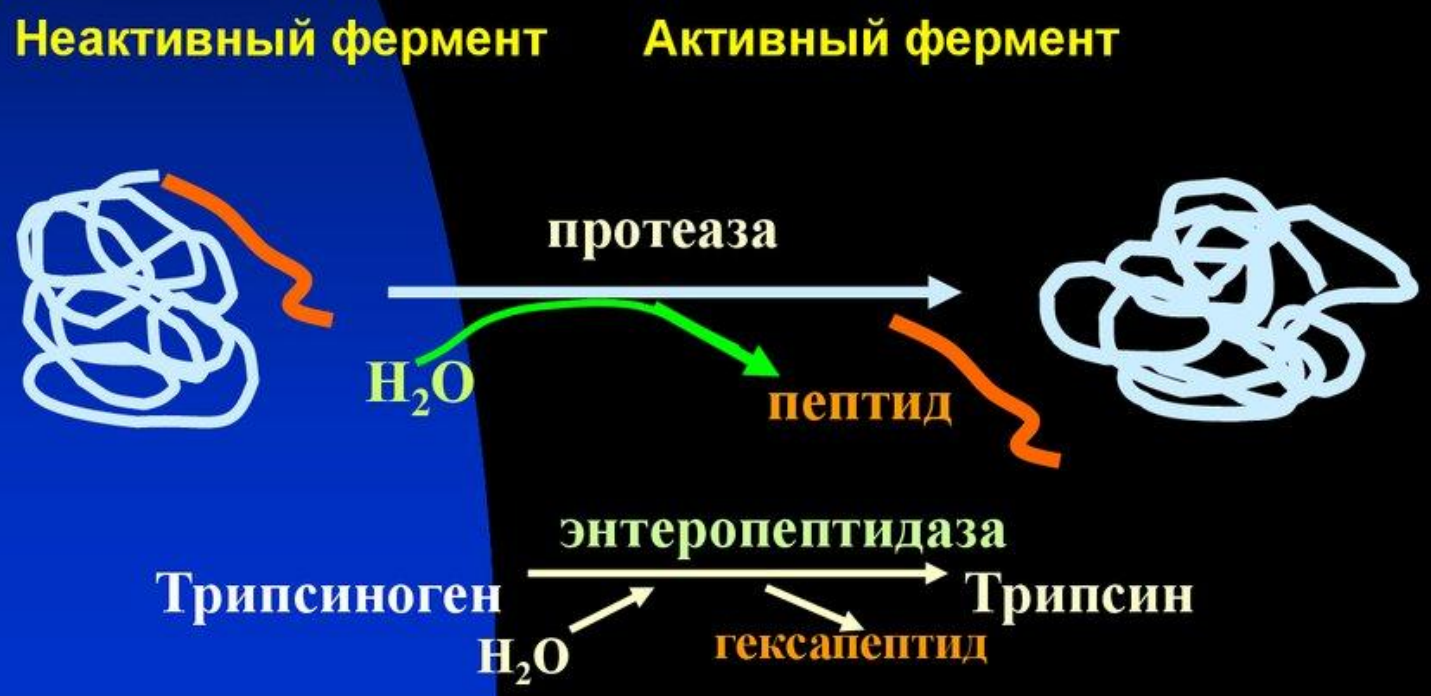
Частичный (ограниченный) протеолиз

- Профермент → Активная форма Е + пептид

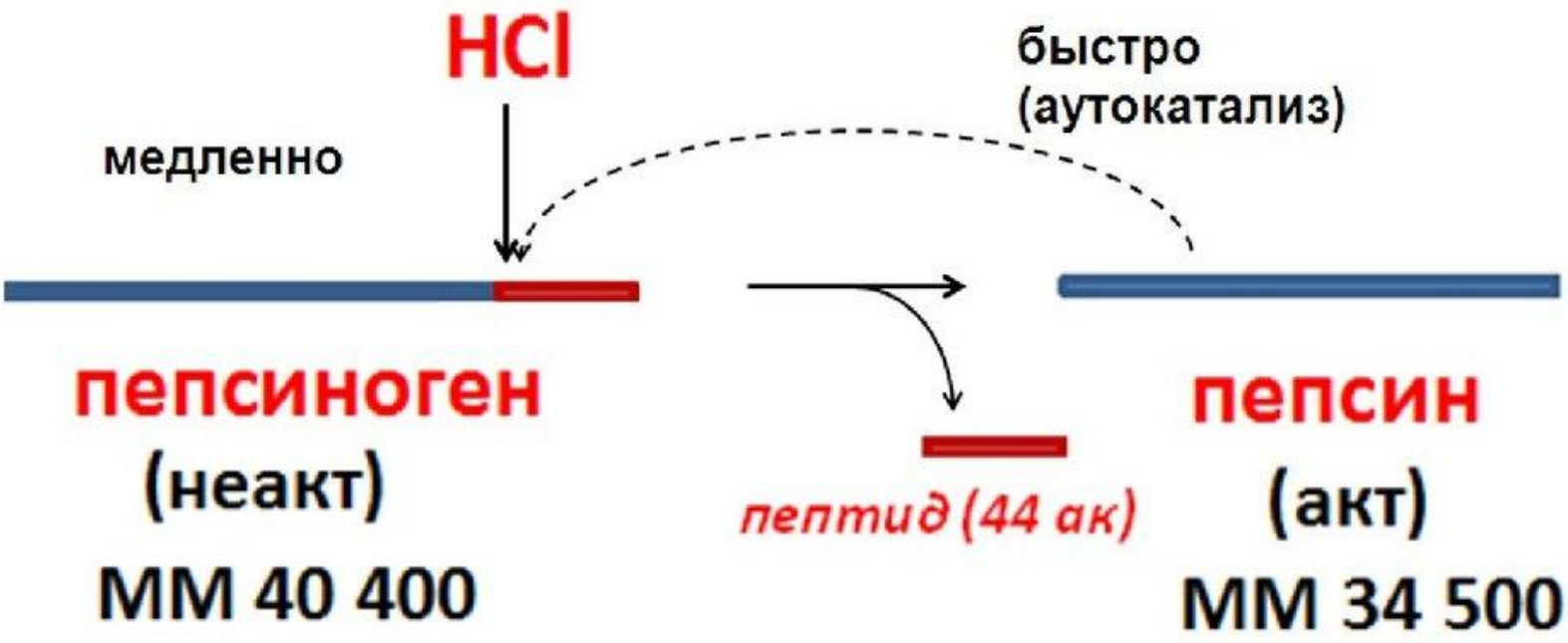
  (АкЦ не сформирован)
- Это необратимая активация Е с помощью протеолитических Е с участием активаторов.
- Решающее значение для изменения конформации имеет изменение первичной структуры.

Частичный протеолиз

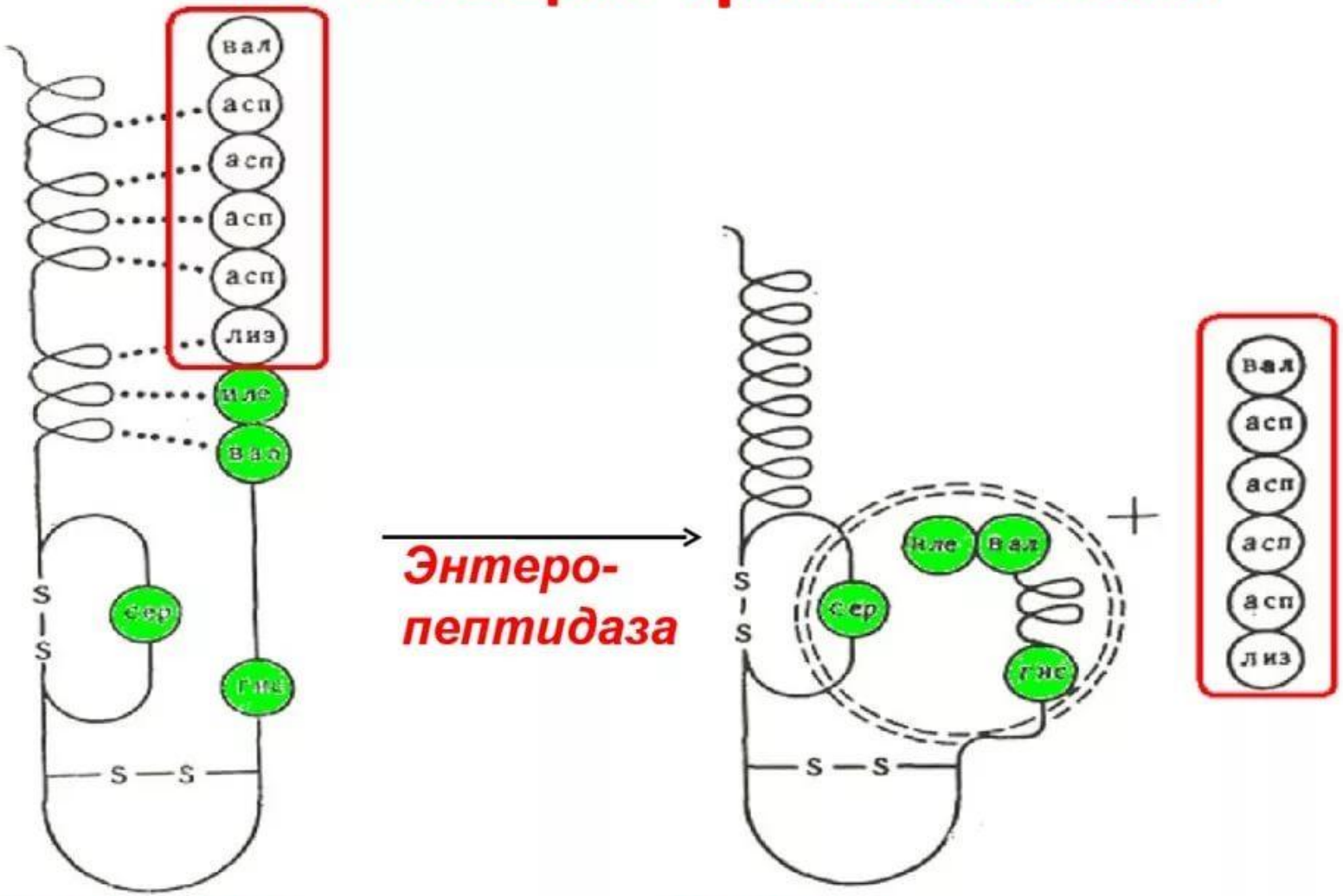
Активация профермента происходит путем отщепления от него одного или нескольких пептидов. При этом изменяются первичная структура, мМ, конформация фермента. Формируется активный центр.



Активация пепсиногена (механизм – частичный протеолиз)



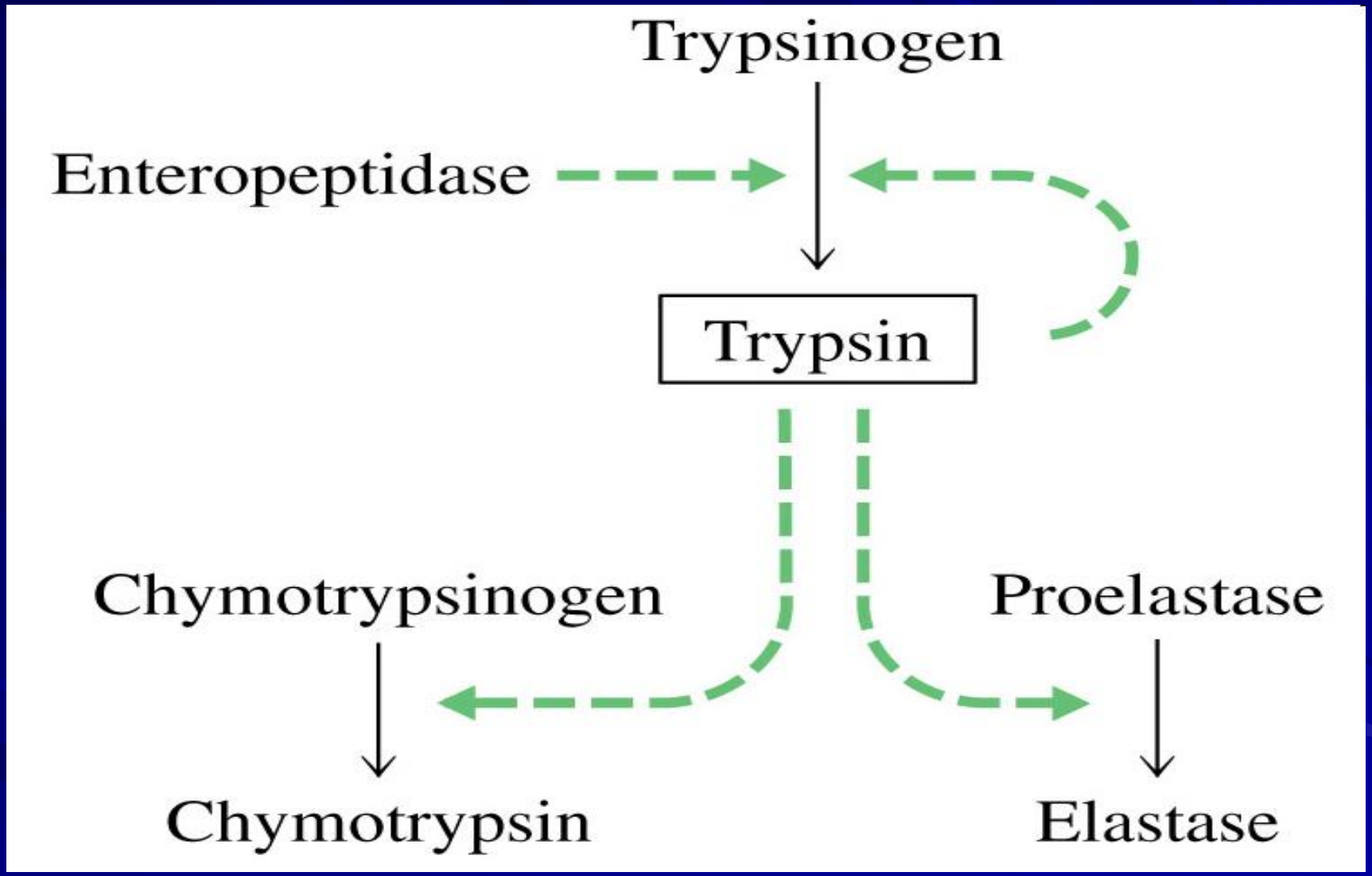
Активация трипсиногена



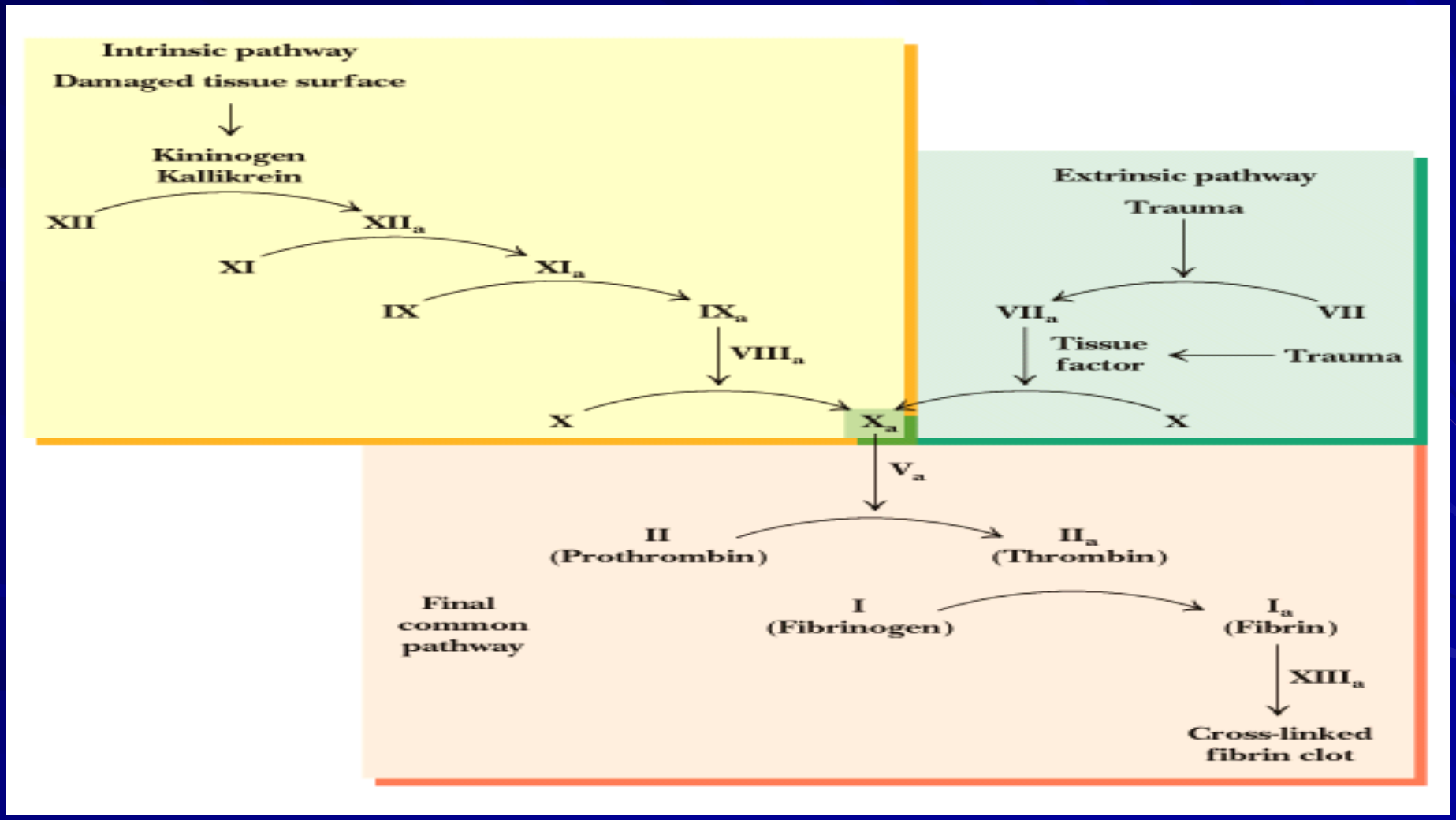
Трипсиноген неактивный

Трипсин активный

Частичный протеолиз



Частичный (ограниченный) протеолиз
БЕЛКОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ



Аллостерическая регуляция

Особенности строения и функционирования аллостерических ферментов:

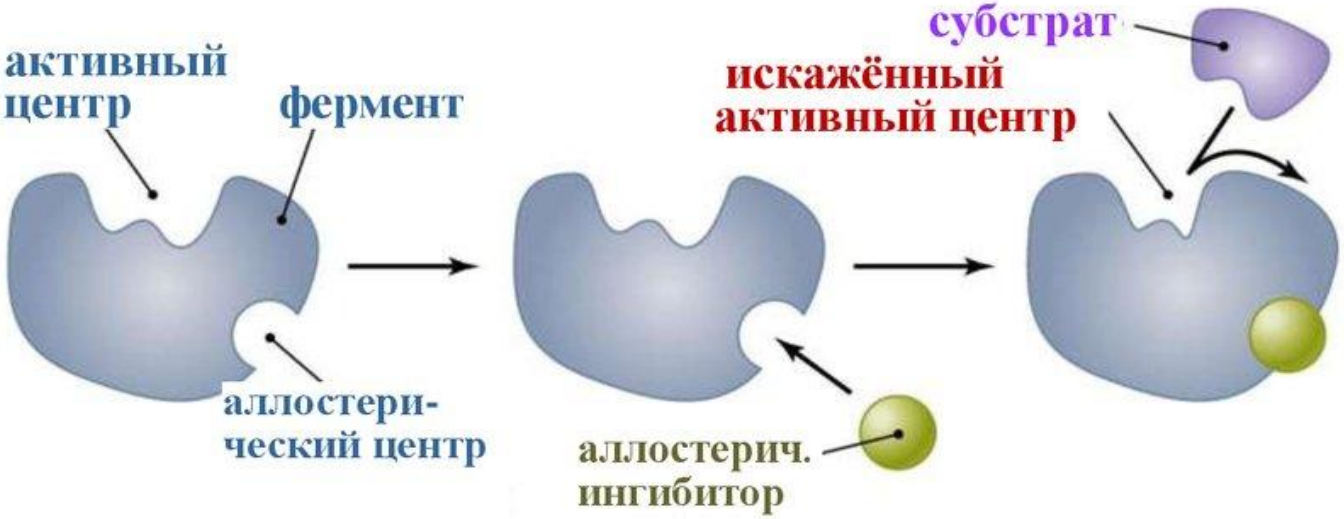
- состоят из нескольких субъединиц;
- имеют аллостерический центр, пространственно удаленный от активного центра;
- протомер, на котором аллостерический центр – регуляторный, каталитический протомер содержит активный центр;
- эффектор, или модулятор (положительный эффектор – активатор или отрицательный эффектор – ингибитор) связываются в аллостерическом центре Е;

Аллостерическая регуляция

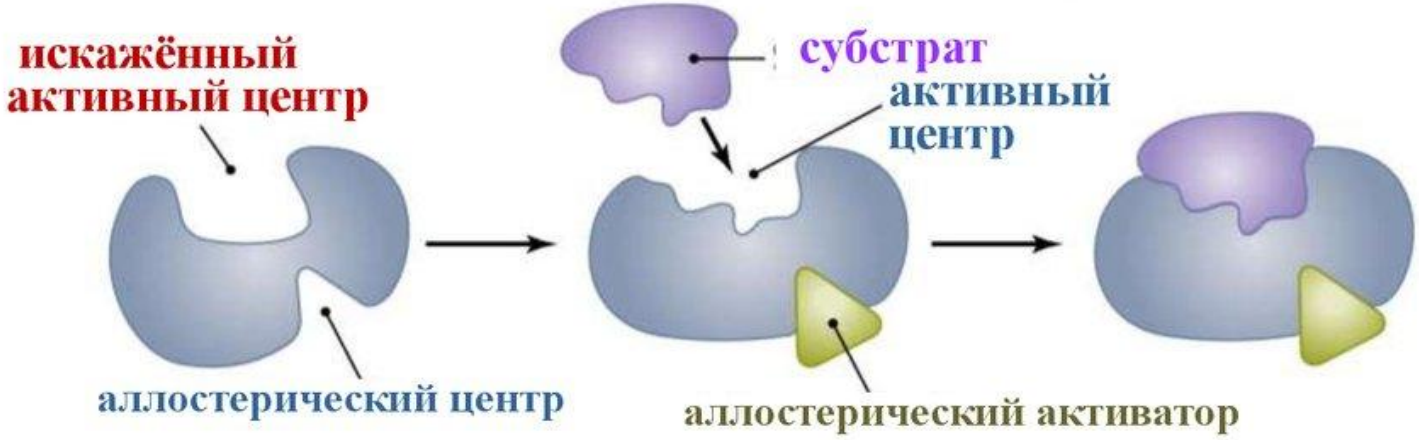
- **присоединение эффекторов к аллостерическому центру вызывает конформационные изменения АкЦ и изменение активности фермента;**
- регуляция аллостерических Е обратима;
- **аллостерические ферменты катализируют ключевые реакции данного метаболического пути.**

Аллостерическая регуляция активности

Аллостерическое ингибирование

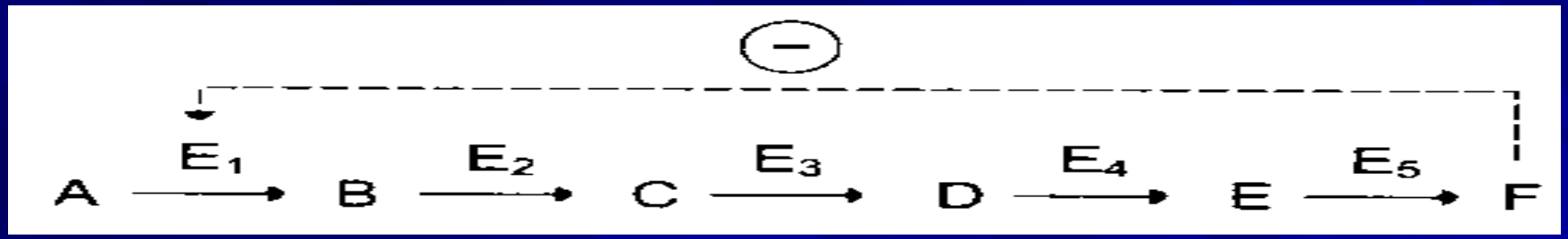


Аллостерическое активирование



Ингибирование по принципу обратной связи (ретроингибирование)

- в анаболических процессах. Конечный Р метаболической цепи, связываясь с АлЦ ключевого фермента Е1, ингибирует его и всю метаболическую цепь (ингибирование по принципу обратной связи, или ретроингибирование).



- Примеры: у E.coli L-изолейцин подавляет активность треониндегидратазы (1 Е на пути его биосинтеза);
- ЦТФ ингибирует аспартаткарбамоилтрансферазу (АКТ-азу) — 1 Е на пути его биосинтеза, а АТФ - начальный участник реакции, активирует АКТ-азу;
- Δ-АЛК-синтаза – ключевой Е (первый Е) на пути синтеза гема, ингибируется гемом.

Аллостерческая регуляция

- в катаболических процессах. В случае накопления макроэргического соединения АТФ в клетке — ингибирование метаболических путей, обеспечивающих образование энергии.
- для координации амфиболических процессов (одновременно анаболических и катаболических).
- АТФ и АДФ —аллостерические эффекторы, действующие как антагонисты.
- Так, Е гликолиза ФФК ингибируется АТФ и активируется АМФ.

- Е ЦТК ИДГ ингибируется АТФ и НАДН2, а активируется АДФ.

АТФ —-→ ФФК

АМФ —+→ ФФК

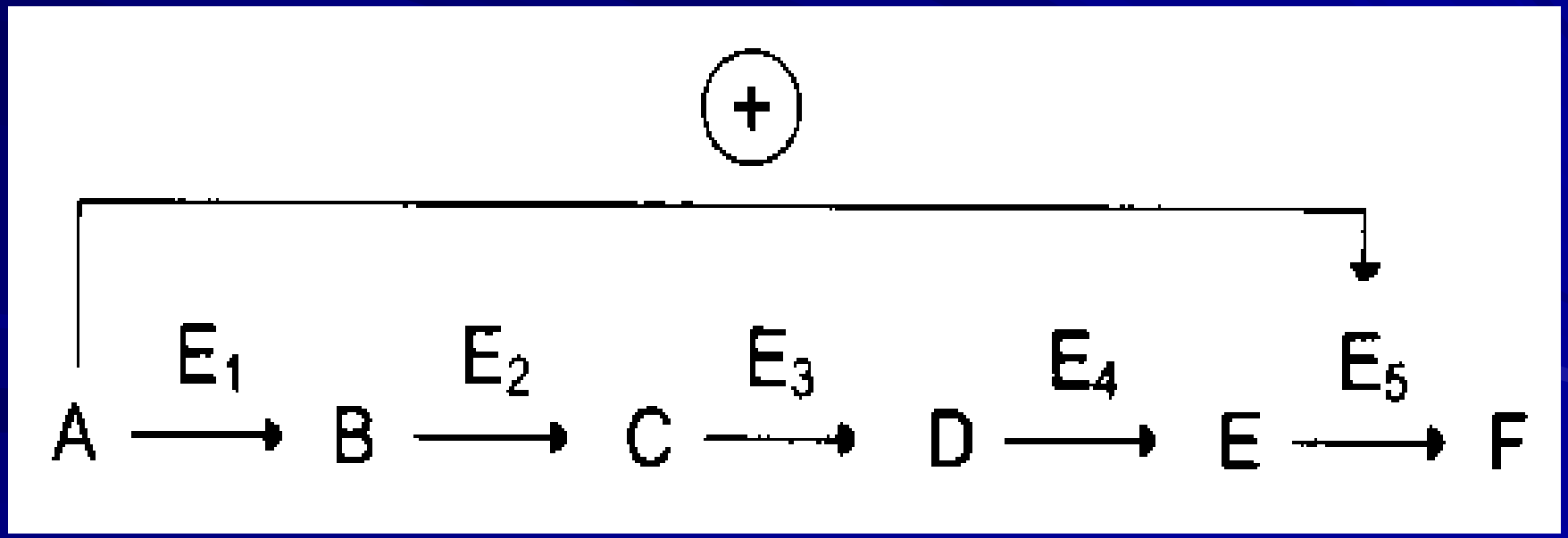
АТФ -
(НАДН2) —- → ИДГ

АДФ —+ → ИДГ

Исходные вещества как активаторы ключевых Е

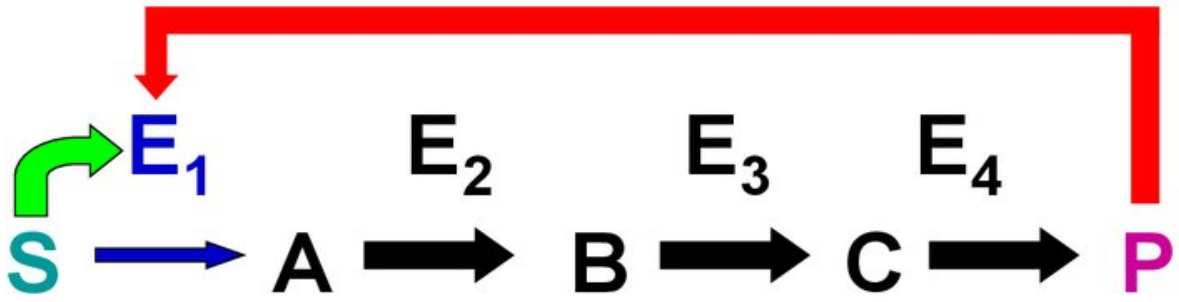
- Активации подвергаются Е, катализирующие ключевые реакции заключительных этапов метаболического пути.

  Пример: глюкозо-6-фосфат (первый метаболит), являющийся предшественником гликогена, активирует гликогенсинтетазу - активация предшественником – положительная связь.



1. Аллостерическая регуляция

Аллостерическими называют ферменты, активность которых регулируется обратимым нековалентным присоединением модулятора (активатора и ингибитора) к аллостерическому центру.



Активирование происходит по принципу прямой положительной связи, а ингибирование - по принципу отрицательной обратной связи.

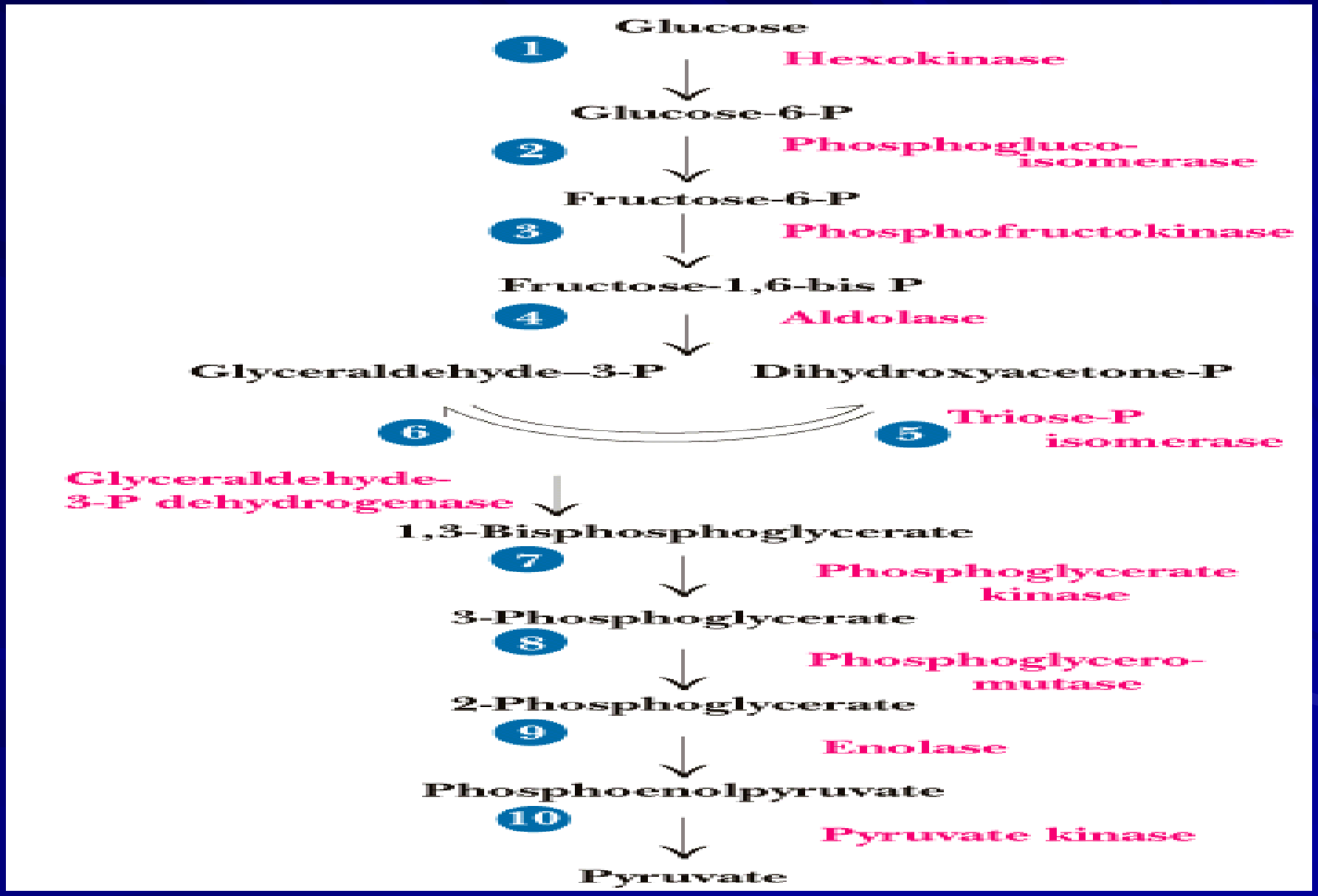
Активность аллостерических ферментов изменяется очень быстро

Аллостерическая регуляция гликолиза

- При катаболических процессах –накопление АТФ приводит к ретроингибированию аллостерических ферментов фосфофруктокиназы и пируваткиназы.
- При образовании большого количества фр-1,6-бисфосфата – аллостерическая активация пируваткиназы.

  Т.о. осуществляется положительная и отрицательная регуляция катаболизма глюкозы.
- Часто в роли аллостерического активатора – S. Конечные Р метаболического пути – часто ингибиторы аллостерических ферментов.

Схема гликолиза

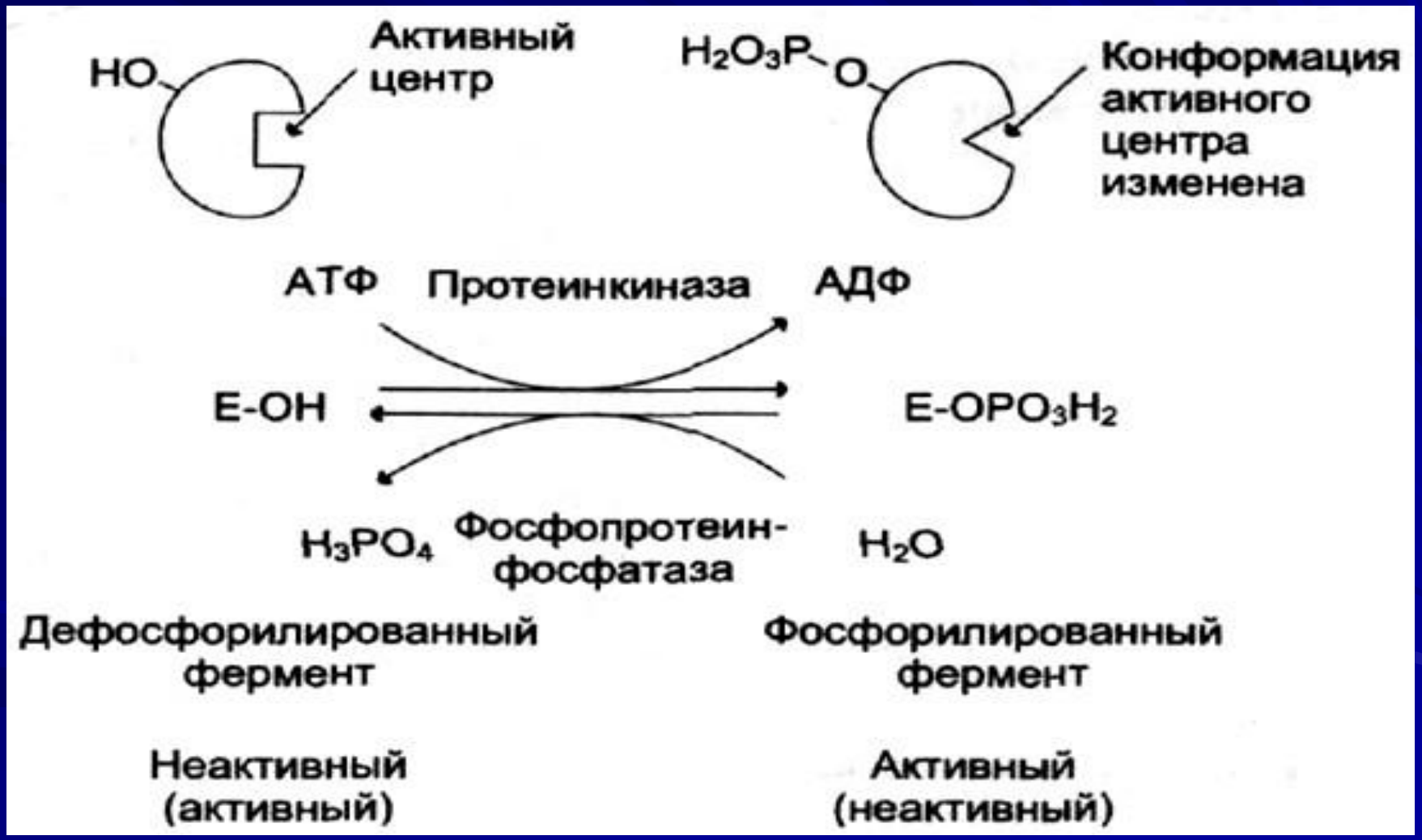


Регуляция активности ферментов путем ковалентной модификации

Ковалентное присоединение молекулы к аминокислотному остатку фермента может модифицировать активность последнего

Типы ковалентной модификации:
-фосфорилирование;
-ацетилирование;
-карбоксилирование и др.

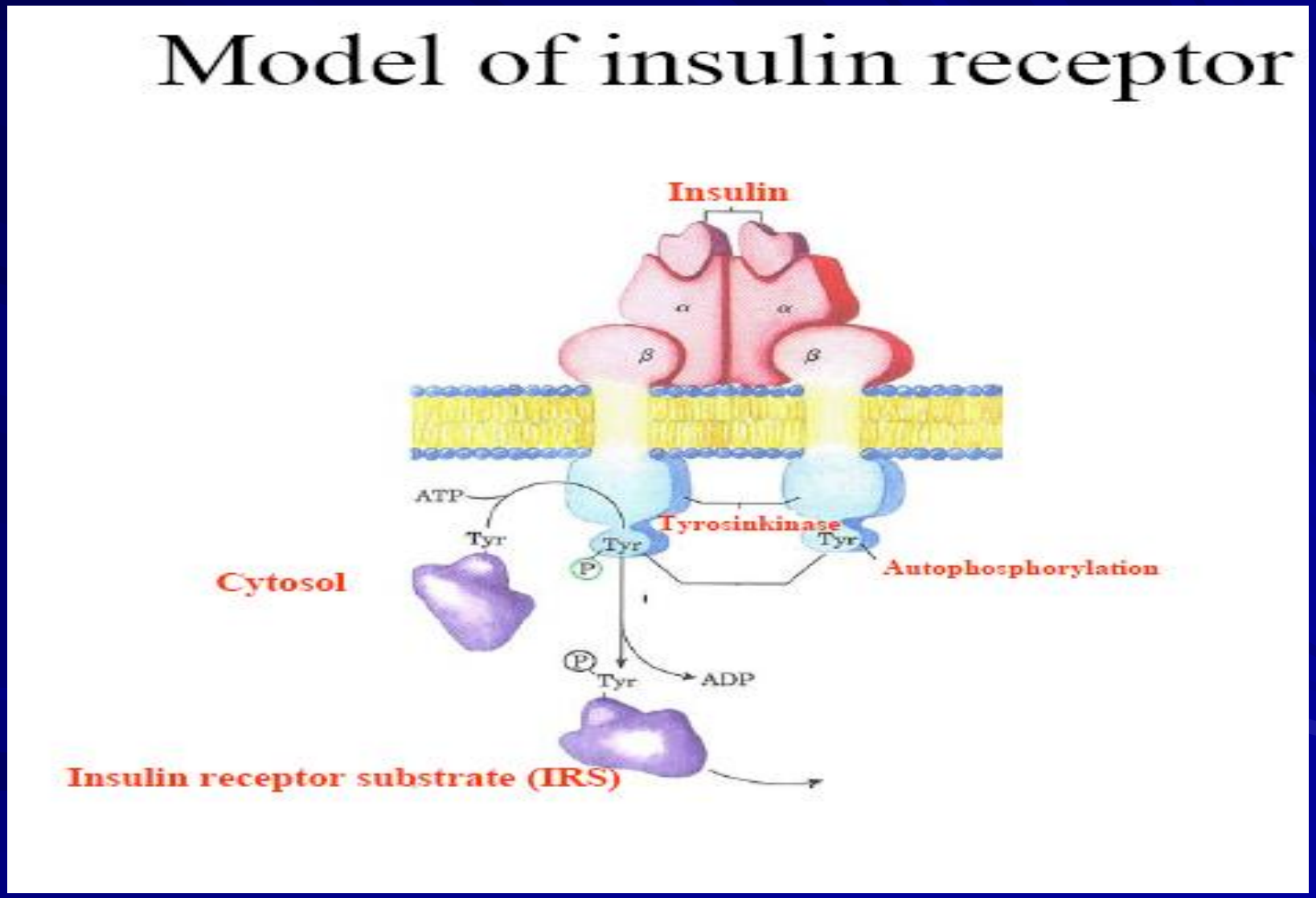
Ковалентная модификация ферментов путем фосфорилирования-дефосфорилирования



Ковалентная модификация ферментов путем фосфорилирования-дефосфорнилирования

- Е, катализирующие фосфорилирование белков - протеинкиназы (ПК, АТФ-зависимые). Белки фосфорилируются по Сер, Тре или Тир (серин-треонинкиназы и тирозинкиназы). Е обратной реакции –протеинфосфатаза.
- Протеинкиназы могут быть субъединицей мембранного R (напр. Тир-ПК R инсулина), активность которой регулируется гормоном. Другая группа ПК — ПК, регулируемые вторичными посредниками (цАМФ, цГМФ, $ИФ_3$, ДАГ, Ca^{2+}).

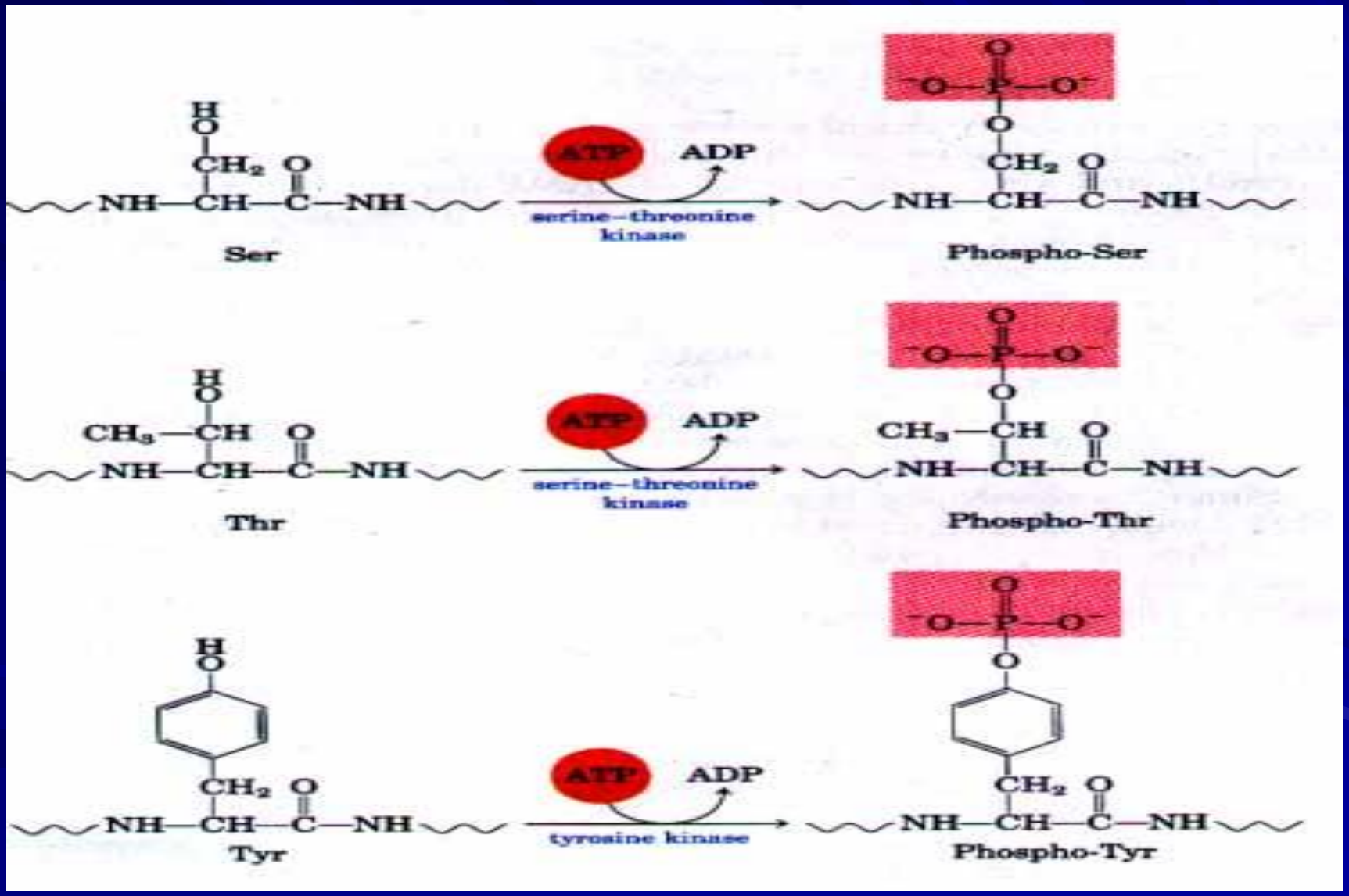
Строение рецептора инсулина, содержащего тирозинкиназные домены



Ковалентная модификация ферментов путем фосфорилирования-дефосфорнилирования

- цАМФ — активатор ПК А;
- цГМФ — активатор ПК G;
- $ИФ_3$ ↑ внутриклеточную [Ca^{2+}];
- комплекс ДАГ с Ca^{2+}активирует ПК С;
- комплекс $Ca2^{+}$-кальмодулин — активатор Ca^{2+}-кальмодулинзависимой ПК.

Ковалентная модификация ферментов



Ковалентная модификация Е

- Примеры Е, у которых Е - О - Р активны:

  гликогенфосфорилаза,

  киназа фосфорилазы,

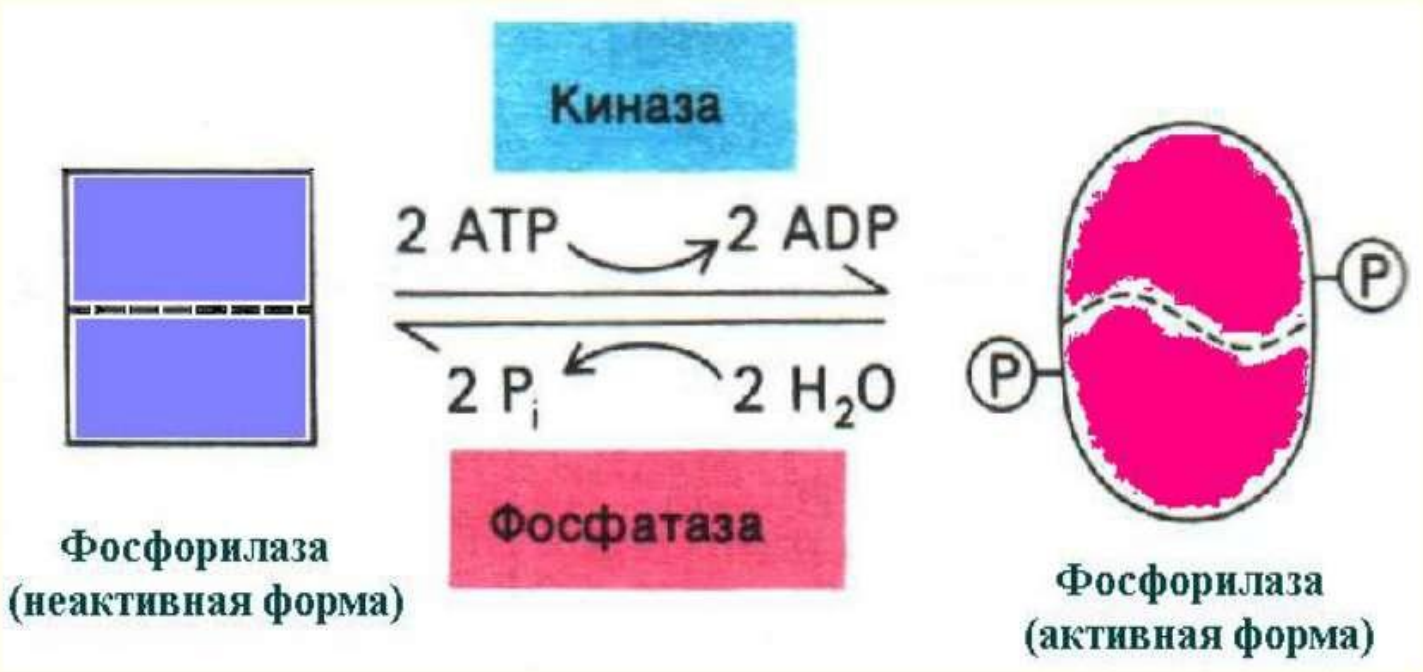
  ТАГ-липаза и др;
- Е, у которых Е – ОН активны:

  гликогенсинтетаза,

  ацетил-КоА карбоксилаза,

  ГМГ-КоА-редуктаза и др.

КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ



Пример фосфорилирования-дефосфорилирования фермента

Регуляция с помощью белок-белковых взаимодействий

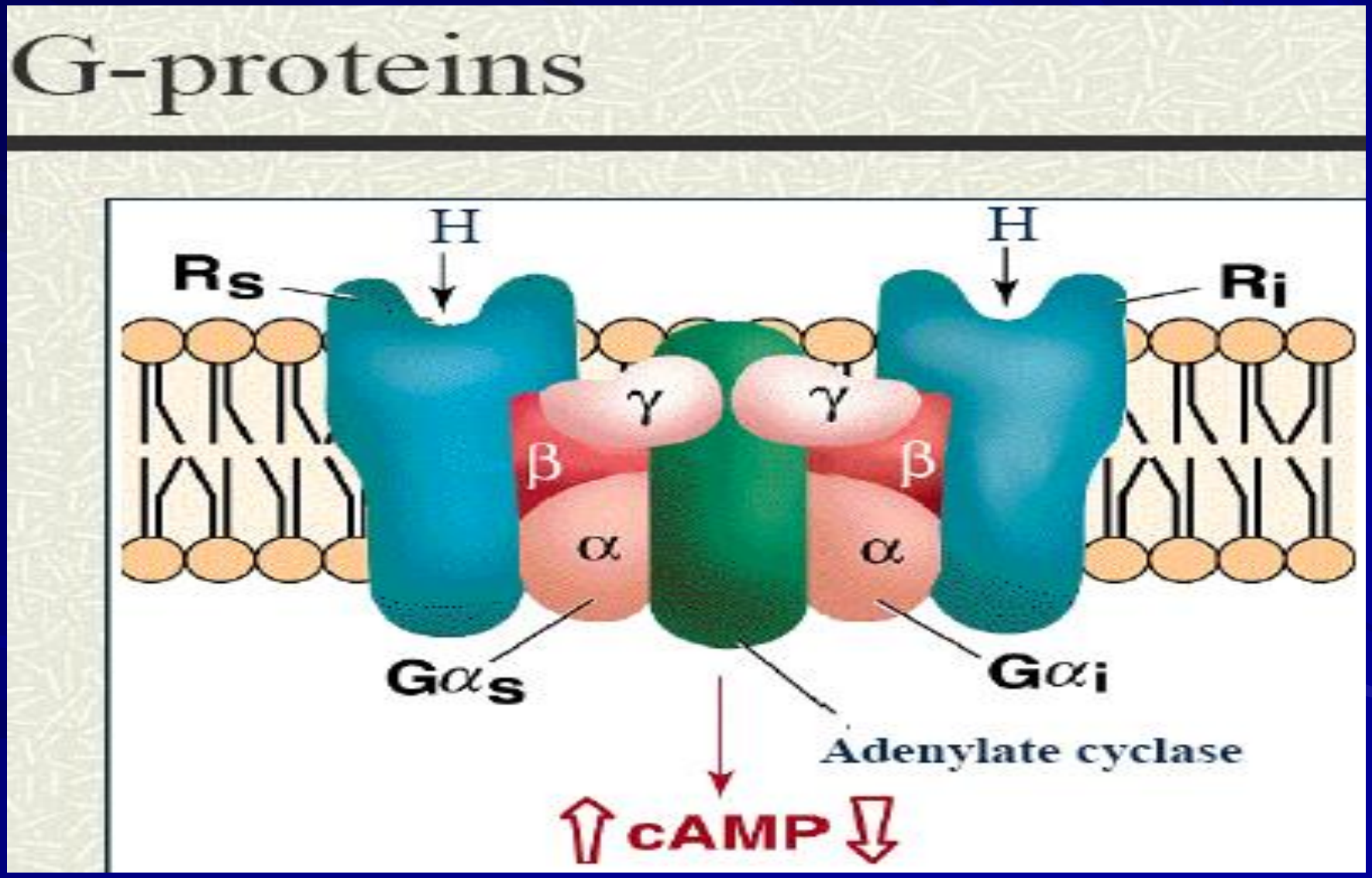
2 механизма активации:

- активация в результате присоединения регуляторных белков.
- ассоциация или диссоциация протомеров Е.

Активация Е в результате присоединения регуляторных белков на примере АЦ

- АЦ функционирует в мембране в комплексе с R гормона и с G-белком. G-белок (ГТФ-связывающий белок) – олигомерный белок (α, β и γ-субъединицы). α-субъединица имеет центр связывания и расщепления ГТФ. При отсутствии гормонального сигнала G-белок связан с ГДФ. При связывании Г с R → изменение конформации G-белка, ↓ его сродства к ГДФ и ↑ сродства к ГТФ. Присоединение ГТФ → конформационные изменения в G-белке и диссоциация его на α-субъединицу (α-ГТФ) и димер β, γ. α-ГТФ имеет сродство к АЦ, его присоединение активирует АЦ. Т.о., α-ГТФ – регуляторный белок.

Активация в результате присоединения регуляторных белков. G-белки



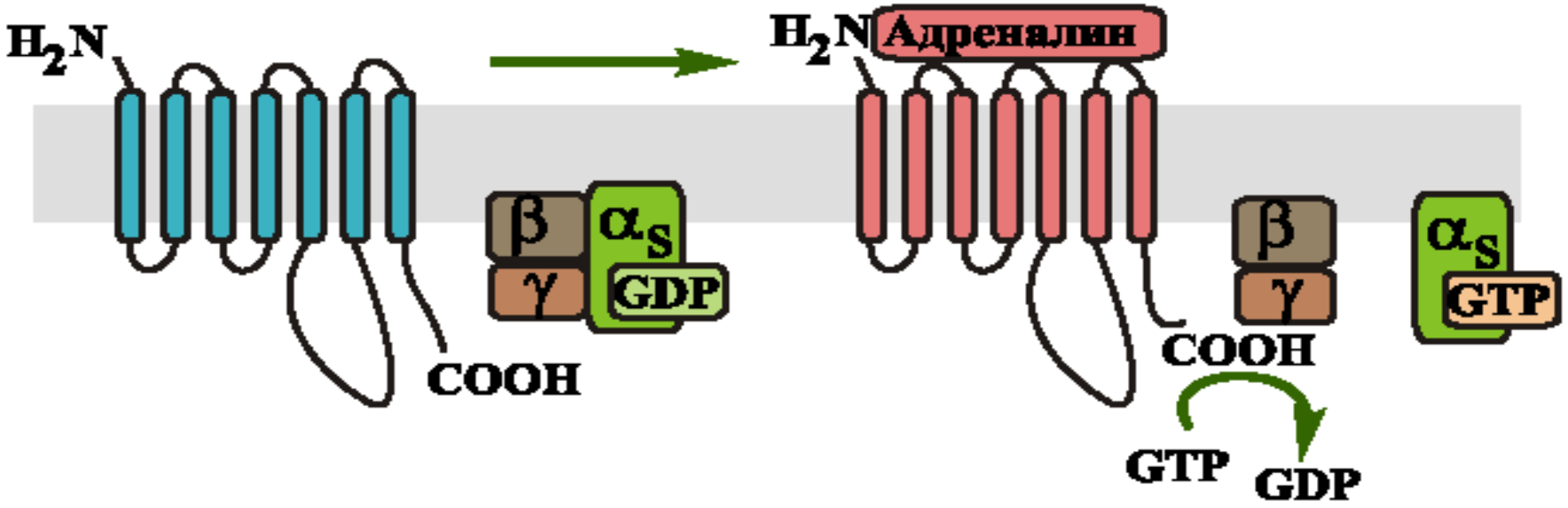
Рецепторы, действующие через G-белки

Рецепторы внеклеточных сигналов

Рецепторы, действующие через G-белки

β адренергический рецептор:

β_1 - учащение частоты сокращений сердечной мышцы
β_2 - релаксация гладкой мускулатуры бронхов



Регуляция активности ферментов путем ассоциации или диссоциации на примере протеинкиназы А

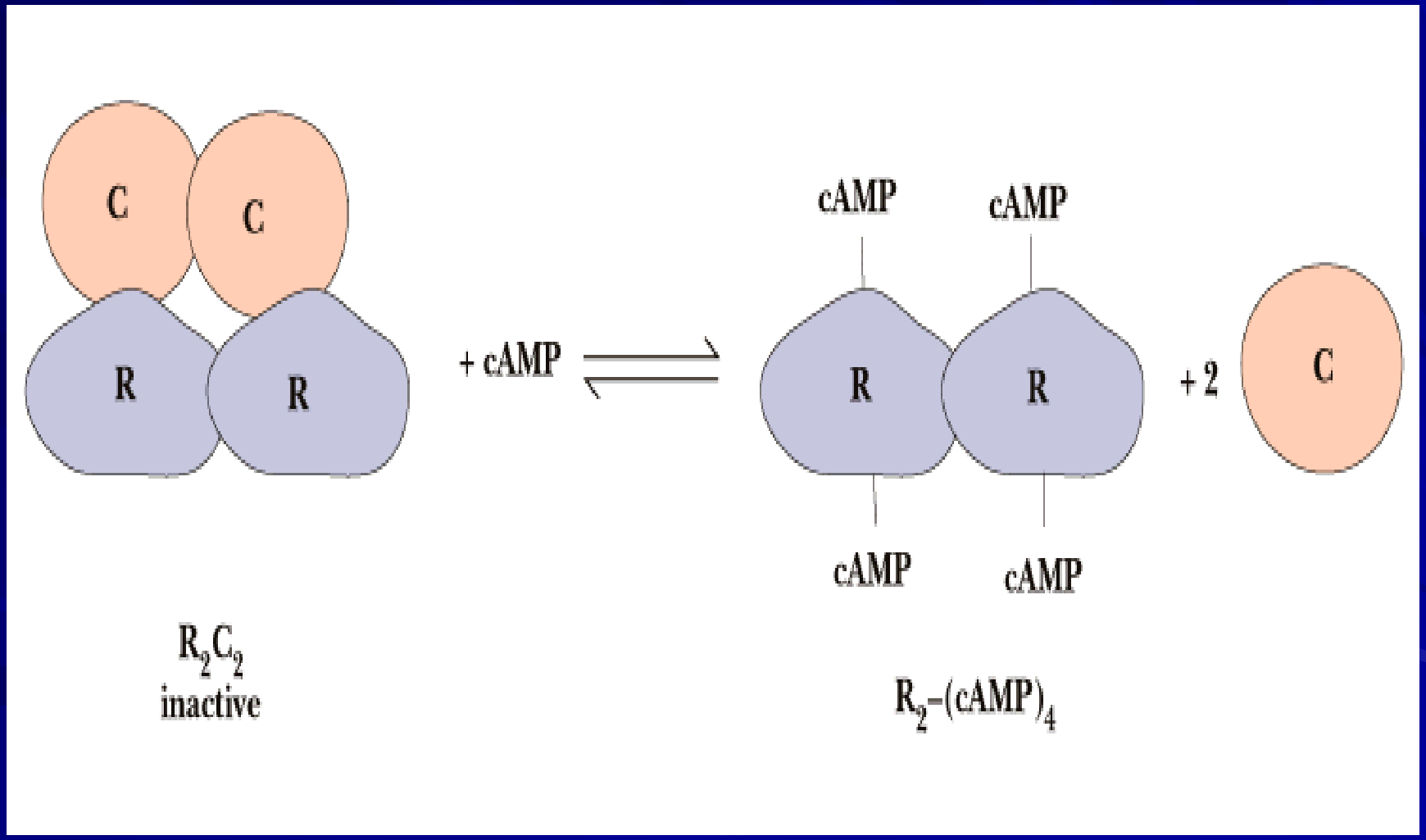
- ПК А – тетрамер R_2C_2 - не активен
- цАМФ – активатор ПК А

$$АТФ \xrightarrow{\text{Аденилатциклаза}} ц\ АМФ + H_4P_2O_7$$

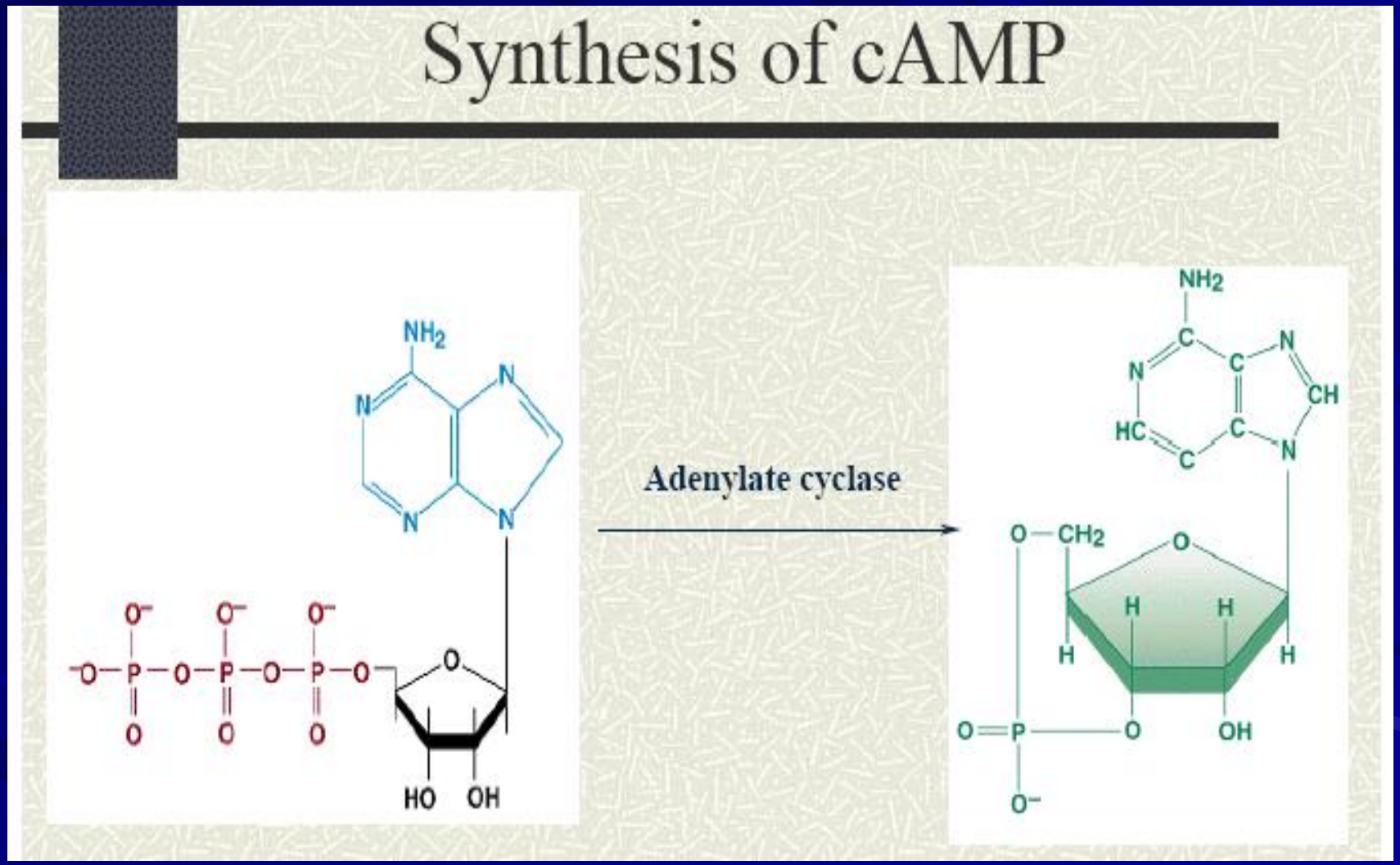
$$R_2C_2 + 4\ цАМФ \rightarrow R_2 \cdot 4\ цАМФ + 2C$$

Регуляция активности ферментов путем ассоциации или диссоциации на примере протеинкиназы А

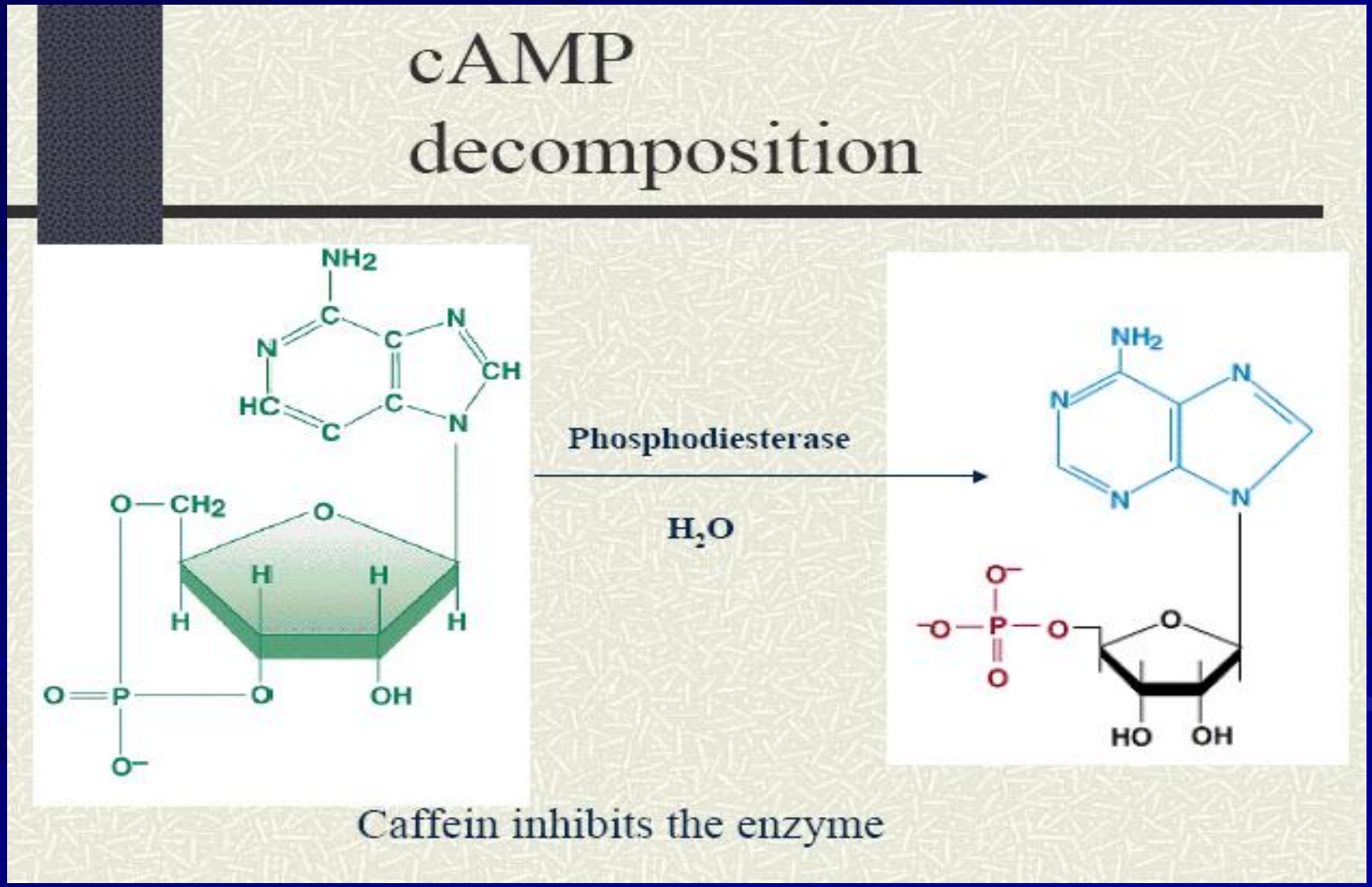
Регуляция активности ферментов путем ассоциации или диссоциации на примере протеинкиназы А



Синтез цАМФ из АТФ



Распад цАМФ под действием фосфодиэстеразы



Аденилатциклазная система регуляции

- цАМР — вторичный посредник в проведении гормональных сигналов внутрь клетки.
- **АЦ и ПК катализируют взаимозависимые реакции, которые составляют единую регуляторную систему. С помощью этой системы в клетку передаются сигналы из внеклеточной среды и метаболизм клетки изменяется в нужном направлении. Внеклеточным (первичным) посредником сигнала могут быть разные молекулы, в том числе и гормоны. Они не проникают внутрь клетки, но «узнаются» мембранными рецепторами.**

Схема аденилатциклазной системы регуляции

Г

↓

ЦПМ R → G-белок → аденилатциклаза

↓

АТФ → цАМФ

↓

ПК $А_{неакт}$ → ПК $А_{акт}$

↓

Е-ОН → Е-О-Р

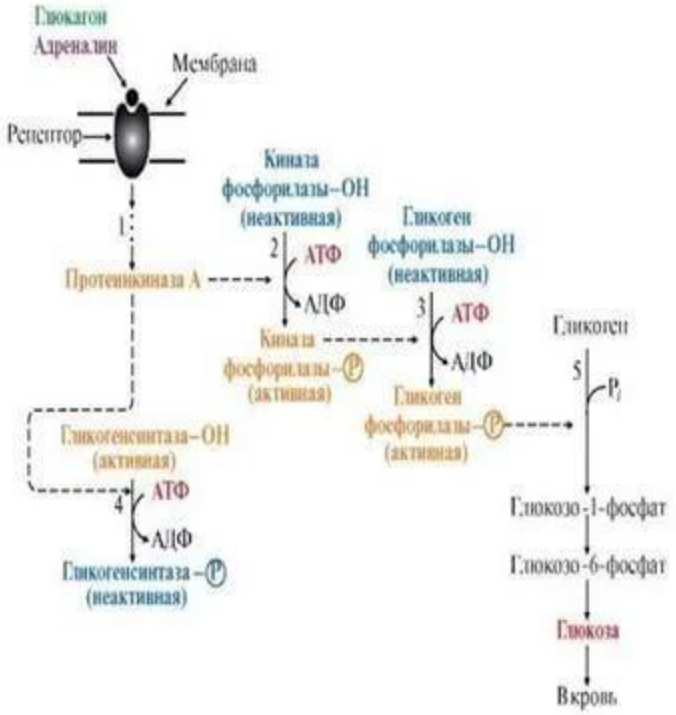
неактивный (активный) | активный (неактивный)

↓

клеточный ответ

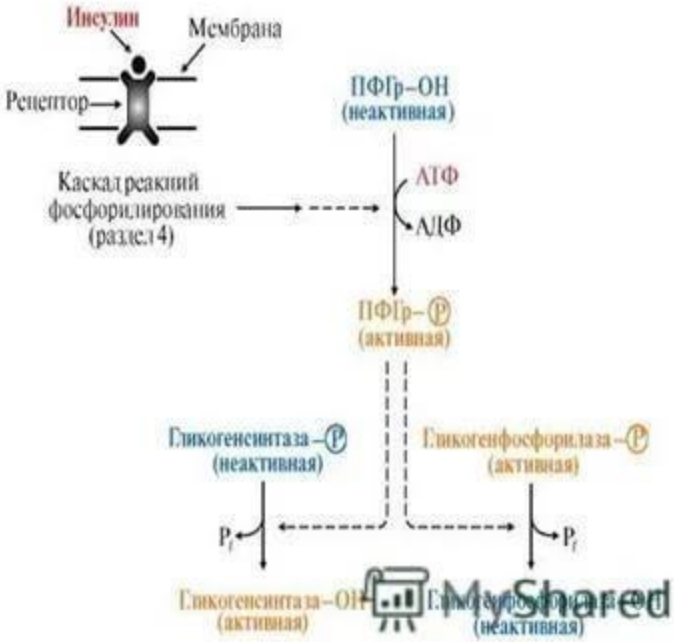
Гормональная регуляция метаболизма гликогена

Влияние глюкагона и адреналина на обмен гликогена (блокируют синтез и запускают распад)

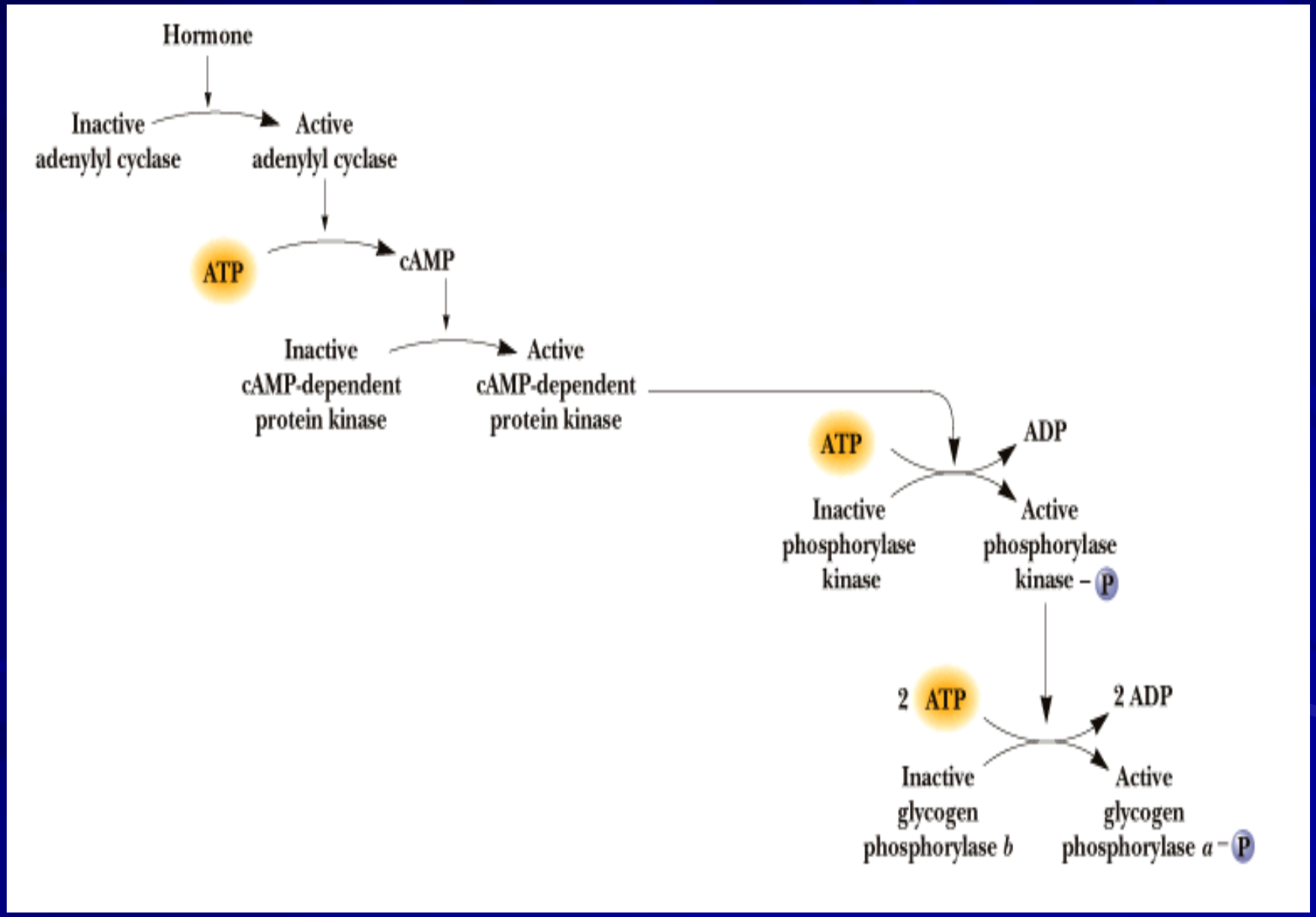


Влияние инсулина на обмен гликогена (запускает синтез и блокирует распад)

ПФГр - фосфопротеинфосфатаза гранул гликогена



Регуляция распада гликогена гормонами



Регуляция распада гликогена гормонами

- Фосфорилированная форма гликогенфосфорилазы активна, а гликогенсинтетазы неактивна. При дефосфорилировании их активность меняется на противоположную. Биологический смысл — когда происходит биосинтез гликогена, его распад ингибируется, и наоборот.

Активация Е в результате присоединения регуляторных белков

- Другой пример белка-модулятора — кальмодулин, он содержит 2 глобулярных домена, соединенных α-спиральным доменом. Каждый домен имеет два центра связывания Ca^{2+}. 4Ca-кальмодулин — активная форма белка образуется так: $4Ca^{2+}$ + кальмодулин $\leftrightarrow$ $4Ca^{2+}$-кальмодулин, способен связываться с Е и активировать их, в частности он активирует Ca-зависимые ПК.

Контроль транскрипции

- **Контроль за биосинтезом Е осуществляется на генетическом уровне – регуляция транскрипции.**

- **В основе процесса – индукция или репрессия синтеза Е с участием индукторов или корепрессоров, связывающихся с белком-репрессором. В качестве индуктора часто - S ферментативной реакции, а корепрессора – конечный продукт**

- **У животных индукцию синтеза белков – ферментов могут вызывать гормоны (глюкокортикоиды → ТАТ, ферменты глюконеогенеза и т.д.). ХС подавляет экспрессию генов, кодирующих ГМГ-КоА-редуктазу.**

Другие типы регуляции активности

Компартментализация – пространственное разъединение Е со своими субстратами с помощью биомебран (например, гидролитических Е лизосом - с веществами ЦП, на которые они действуют).

- Механизм позволяет разделить несовместимые метаболические процессы (например, синтез ВЖК – в ЦП, а окисление – в МТХ). Однако при этом возникает проблема транспорта метаболитов и восстановительных эквивалентов через биомембраны органелл. Эту задачу решают челночные механизмы, позволяющие перевести метаболиты в формы, способные пройти через мембраны.

Другие типы регуляции активности

- Модуляция лигандами. Активность ключевого Е может регулироваться лигандами (S, P, коферментом, другим эффектором).

- Важный параметр, контролирующий протекание метаболического пути, — наличие субстратов, и главным образом – наличие первого S. Чем больше [исходного S], тем выше скорость метаболического пути.

- Часто лимитирующий фактор — доступность кофермента, а именно наличие регенерированных коферментов. Например, в реакциях дегидрирования S коферментами дегидрогеназ служат окисленные формы NAD^+, FAD, FMN, которые восстанавливаются в ходе реакции. Чтобы Е вновь участвовали в реакции, необходимо превращение их в окисленную форму.