

## EXPRIMAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE

Pentru a exprima activitatea enzimei sunt necesari următorii factori: ecuația sumară a reacției; metoda de analiză; cofactorii enzimei, ionii sau coenzimele ei; valoarea constantă după Michaelis; pH și T°C optime.

În practica biochimică curentă sunt importante variațiile de activitate, și nu activitatea absolută. Se ia o anumită unitate arbitrară, care servește drept referință.

- *Unitatea Internațională (U.I.)* e acea activitate enzimatică ce asigură conversia a 1 μmol de substrat într-un minut în condiții standardizate de pH, T°C (25-30). Cofactorii și alte condiții optime asigură acțiunea enzimelor.

- *Katalul (kat)* constituie activitatea care asigură transformarea unui mol de substrat într-o secundă (1 mkat = 60 U.I.), (1 U.I. = 16,67 nkat).

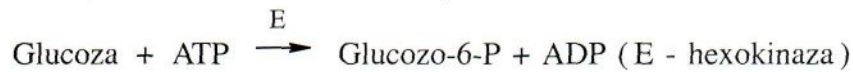
Se mai utilizează:

- *activitatea specifică* — numărul de U.I. cu referință la 1mg proteină;

- *activitatea moleculară* - numărul de molecule de substrat transformate de către o moleculă de enzimă într-o secundă — *numărul turnover* (carbanhidraza - 36 milioane pe minut, catalaza - 40.000.000/sec.);

- *activitatea oxidoreductazelor* cu coenzima NAD<sup>+</sup> sau NADP<sup>+</sup> se exprimă prin *creșterea sau descreșterea extincției la 340 nm* (absorb numai formele reduse). Ca unitate servește creșterea sau scăderea cu 0,001 a extincției într-un minut.

**La reacțiile fermentative ale metabolismului** iau parte enzimele care se leagă cu moleculele diferitelor substraturi. Exemplu:



Reacțiile cu participarea a 2 și mai multe substraturi includ transferul atomilor sau grupelor funcționale de la un substrat la altul. Atare reacții decurg în două moduri.

Primul tip de reacții — *reacții de substituție unitară*: 2 substraturi A și B se leagă specific sau sporadic cu enzima, rezultând formarea complexului EAB cu scindarea lui în C și D (fig. 1.23); al doilea tip de reacții — reacții ce decurg conform *mecanismului substituției duble* (de tipul «ping-pong»). În astfel de reacții CA al enzimei în fiecare moment leagă un substrat.

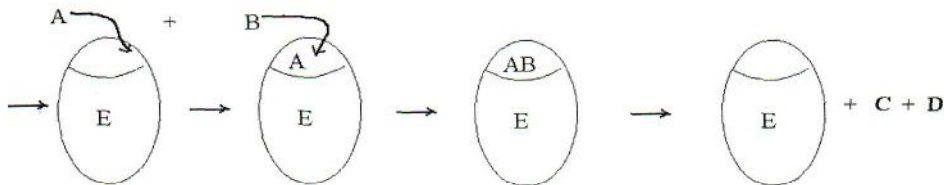


Figura 1.23. Reacții de substituție unitară

Adiționarea primului substrat e însoțită de transferul grupei funcționale pe enzimă și numai după eliminarea produsului format din primul substrat poate să adiționeze la enzimă și al doilea substrat, după care să recepționeze grupa funcțională:



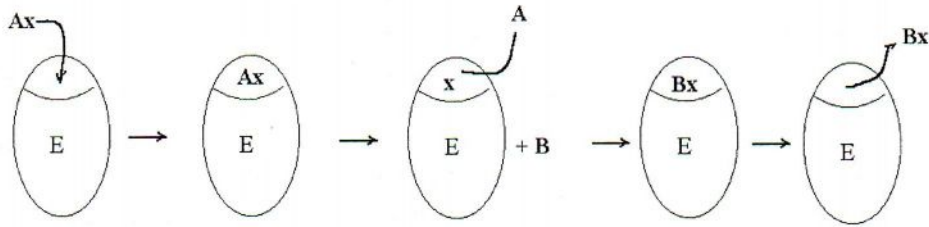


Figura 1.24. Reacții de substituție dublă

Am accentuat că enzima accelerează viteza reacțiilor catalizate de  $10^8 - 10^{20}$  ori. Ureaza la  $\text{pH} = 8$  și  $T = 20^\circ\text{C}$  mărește viteza reacției de  $10^{14}$  ori.

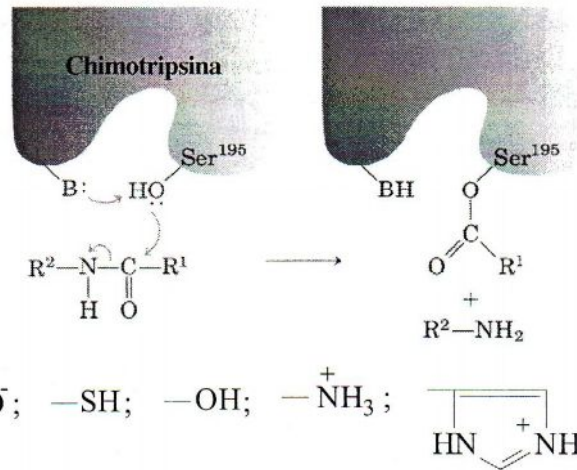
Care este mecanismul ce atribuie enzimelor o activitate intensă în condiții atât de subtile?

Sunt antrenate 4 factori decisivi:

1. *Apropierea și orientarea substratului de grupa catalitică.* Legătura chimică explorată a substratului se află nu numai foarte aproape, dar și direct orientată față de grupele catalitice. În consecință, probabilitatea că complexul ES va atinge starea de tranziție se amplifică.

2. *Tensionarea și deformarea* sunt într-o concordanță indusă: alipirea substratului produce modificări conformaționale în molecula enzimei, tensionând structura CA, concomitent deformându-se și substratul legat, ceea ce favorizează atingerea stării de tranziție a complexului ES. Apare concordanța indusă, adică modificări în structura terțiară și cuaternară a moleculei enzimatică.

3. *Cataliza generală acido-bazică.* În CA al enzimei conlucrează grupe specifice ale resturilor de aminoacizi, servind drept donatori sau acceptori de protoni. Grupele acide și bazice reprezintă catalizatori efectivi ai multor substanțe organice din soluțiile apoase (fig.1.25).



4. *Cataliza covalentă.* Enzimele reacționează cu substraturile, formînd compuși ES nestabili legați covalent, care în reacțiile ulterioare formează produsul reacției mult mai rapid decît în reacțiile necatalizate. Compușul covalent e nestabil și se hidrolizează mult mai rapid decît R.





Enzimele stimulează diferite procese metabolice în celule, fiind organizate în sisteme (sau complexe) multienzimatice, în care enzimele activează coordonat. Ele generează reacții succesive ale unei anumite căi metabolice. Produsul primei reacții din astfel de sisteme devine substrat pentru cealaltă enzimă.

Sistemele multienzimatice pot include 15 și mai multe enzime, care activează într-o anumită succesiune. În fiecare sistem există un ferment cu rol de dirijor, care determină viteza tuturor reacțiilor catalitice din lanț, fiindcă catalizează stadiul-limită, adică reacția cea mai lentă, ce determină viteza procesului în întregime. Enzimele de acest tip îndeplinesc nu numai funcția catalitică, dar și cea de modificador al propriei activități ( $\downarrow \uparrow$ ), ca respondente la diferite semnale. Ca rezultat, fiecare reacție metabolică își schimbă viteza, fapt ce conduce la adaptări rapide. În condițiile noi apare o adaptare imediată, de avarie. În această categorie logic se include transformarea enzimei neactive în activă, sub influența factorilor afiți specifici, cât și nespecifici.

În majoritatea sistemelor multienzimatice fermentul-dirijor catalizează prima reacție din lanțul lor consecutiv. Cantitatea suficientă de ceilalți fermenți determină activitatea catalitică intensivă, îndeplinind indicațiile dirijorului și intensificându-și activitatea la creșterea cantității de substrat.

Enzimele, activitatea cărora se găsește sub influența unor semnale moleculare, sunt numite **enzime reglatoare**. Există 2 clase de astfel de enzime: una — alosteric reglate (Allo stereos - alt loc) de modulatori ce se fixează necovalent, și a doua — enzime ce se reglează prin modificări covalente.

**ENZIMELE ALOSTERICE.** Ele posedă cu totul alt sau alte centre decât cel activ, în care sunt fixați liganzii. Ce le este caracteristic acestor enzime?

1. Posedă, ca și toate enzimele, centru catalitic, unde se fixează și se modifică substratul, dar mai posedă un alt centru care are o poziție spațială pentru fixarea metabolitului reglator, numit efector sau modulator. Acest centru e specific pentru fiecare modulator.

2. Moleculele enzimelor alosterice sunt mai mari, mai complexe și primordial oligomere pare.

3. Au cinetica lor — viteza reacțiilor, în dependență de concentrația substratului, are forma sigmoidală, dar nu hiperbolică, cauzată de urmările interacțiunii între protomeri ce leagă substratul în mod cooperativ (exemplu — mioglobina și hemoglobina — fig. 1.26).

Există 2 tipuri de enzime alosterice:

a) *homotrope* în care modulatorul și substratul constituie aceeași substanță. Acumularea substratului activează viteza reacției catalizate de această enzimă:

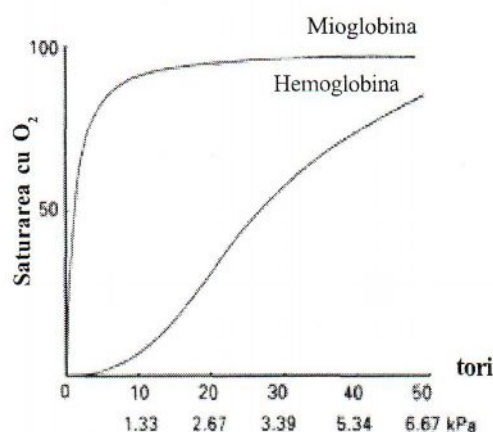


Figura 1.26. Curbele de oxigenare ale mioglobinei (Mb) și hemoglobinei (Hb)

Glucosa + ATP  $\xrightarrow{\text{Hexokinaza}}$  G-6-P + ADP  
 (de altfel, ca și alcoolul ce activează enzima ce îl scindează - alcooldehidrogenaza);

b) *heterotrope* — enzimele sunt reglate de modulatori care diferă după structură de substrat, mulți dintre ei avînd acțiuni antipodă. La fixarea modulatorului, enzimele alosterice își modifică conformația. Modulatorii accelerează sau inhibă utilizarea substratului de enzima respectivă (fig. 1.27).

Unele sisteme enzimatiche manifestă o particularitate deosebită: produsul final al sistemului inactivează enzima — un rezultat al activității mai

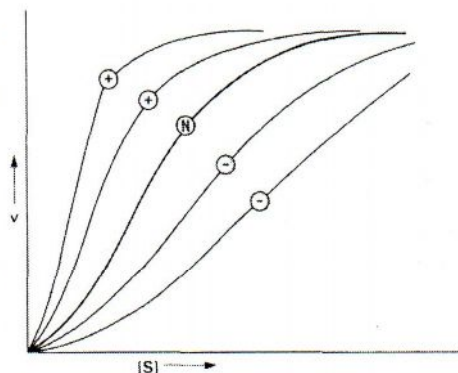


Figura 1.27. Influența modulatorilor pozitivi (+) și negativi (-) asupra cineticii reacțiilor catalizate de enzimele alosterice

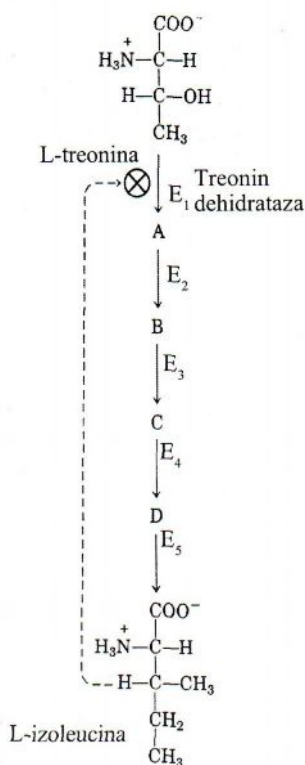


Figura 1.28. Inhibiția de tipul *feed back*. Conversia L-treoninei în L-izoleucină catalizată de o succesiune de enzime. Treonindehidrataza  $E_1$  este inhibată de produsul final

productive a sistemelor multienzimatice, decît e necesar celulei. Acest produs final acționează ca un inhibitor specific al primei enzime și, ca rezultat, viteza sistemului se echilibrează în corespundere cu cerințele celulei - *retroinhibiție* sau inhibiție prin produs final, inhibiție de tip *feed back*. Transformările L-treonina  $\rightarrow$  L-izoleucina necesită 5 enzime. Prima enzimă e treonindehidrataza, inactivată de izoleucină, modulator ce se fixează în CA. Este un exemplu clasic de *reglare necovalentă* și e reprodus în fig. 1.28.

Se înregistrează *enzime reglatoare*, la baza activării cărora se atestă modificări covalente ale moleculei:



Enzima *fosforilaza A* (forma activă constituie un dimer compus din 2 protomeri identici, fiecare avînd rest specific de serină, fosforilat pe grupa OH) catalizează reacția. *Fosfataza fosforilazei* catalizează hidroliza legăturii P cu serina și transferă F «A» în F «B» mai puțin activă. *Kinaza fosforilazei* catalizează transferul grupei P de la ATP la OH serinei și reactivează activitatea enzimei ("B"  $\rightarrow$  "A") (fig. 1.29).

Trecerea dintr-o formă în alta e însoțită de modificări ale structurii cuaternare ce atinge centrul activ, reglează activitatea enzimei. Asocierea protomerilor "B" activează "A".

Reacțiile catalizate de enzimele alosterice sunt ireversibile, au  $\Delta G$  - negativă. Există și alte modificări covalente ale enzimelor — metilarea resturilor de aminoacizi, adăugarea adenilatului etc. (fig. 1.30).



La unele enzime foarte complexe activitatea poate fi reglată atât covalent, cât și necovalent.

O categorie de enzime sunt sintetizate în forma neactivă de precursor, care se activează la o *proteoliză limitată* (proenzimele). Exemplu:

1) enzimele digestiei ce scindează proteinele în stomac și duoden - pepsinogenul, chimotripsinogenul, tripsinogenul, proelastaza, procarboxi peptidaza;

2) coagularea sîngelui e determinată de avalanșa de reacții cu acțiune proteolitică;

3) hormonii proteici (insulina);

4) proteinele fibrilare (colagenul).

Există o grupă de proteine-enzime, starea activă a cărora e condiționată de împachetarea spontană a moleculelor cu formarea unei structuri tridimensionale caracteristice enzimei date (lizozim).

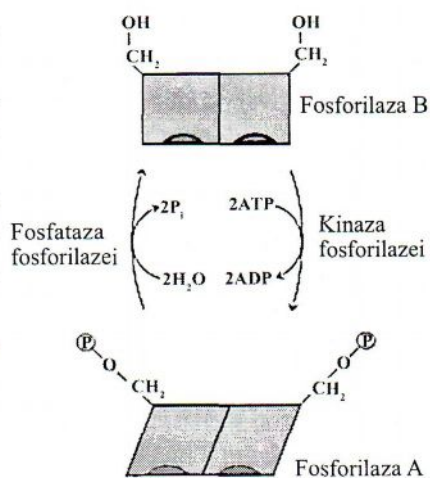


Figura 1.29. Reglarea activității glicogen fosforilazei prin modificările covalente

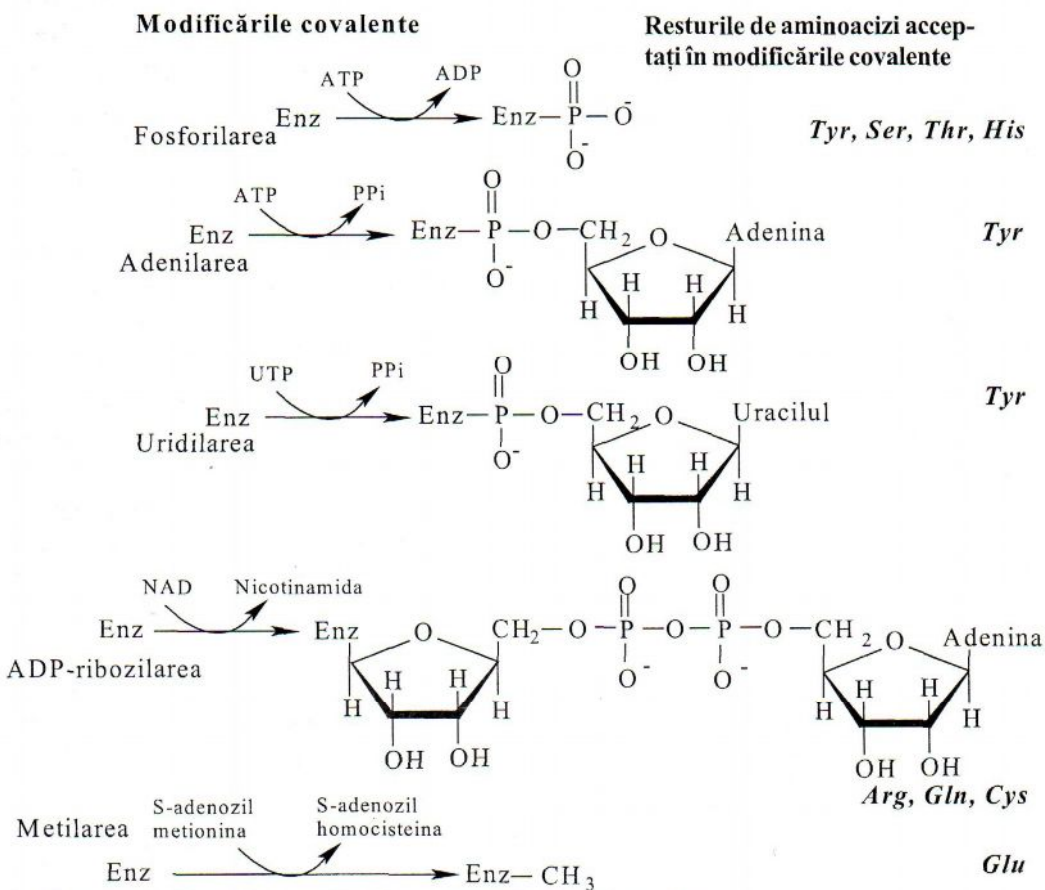


Figura 1.30. Exemple de modificări covalente ale diferitelor enzime

În 1922 Al. Fleming descoperă, într-un mod deosebit, lizozimul, iar în 1929 tot dînsul descoperă și penicilina.

### Mecanismul interacțiunii alosterice

În 1965 savanții J. Monod, J. Wyman, J. Changeux au propus un model fin și clar al interacțiunilor alosterice (MWC) — *modelul simetric* sau "*concentrat*", avînd următoarele caracteristici cardinale (fig.1.31):

1. enzima alosterică este compusă din 2 subunități identice, simetrice, cu un centru activ, centrele fiind echivalente;
2. enzima (oligomerul) poate exista în două stări: T-tensionată (constrînsă), cu afinitate mică de substrat, și R-relaxată, cu o afinitate mare de substrat;
3. conformația fiecărui monomer este constrînsă de asocierea cu ceilalți monomeri;
4. formele T și R pot trece din una în alta și se află în echilibru  $T \rightleftharpoons R$ ;

5. pentru acest model se face o excepție: întru a păstra simetria dimerului, ambele subunități trebuie să adere la aceeași conformație.

În lipsa substratului, toate moleculele se află în forma T (la  $10^4$  molecule — o moleculă poate căpăta forma R).

Prezența substratului modifică conformația, ducînd la apariția formei R. Cînd substratul se leagă cu centrul activ, celălalt la fel trebuie să se afle în R - stare. Trecerea de la T la R și viceversa se produce coordonat. La adiționarea substratului partea moleculară a enzimei în starea R progresează și fixarea substratului devine cooperativă. La o saturație completă toate moleculele enzimei se fixează în R stare.

Inhibitorul se leagă cu forma T, activatorul — cu forma R, astfel efectele homotrope devin pozitive, iar cele heterotrope — pozitive sau negative (fig.1.32).

D.Koshland, G.Nemethy și D.Filmer (KNF) propun *modelul secvențial*, mai clasic (fig.1.33). Baza lui constituie trei postulate:

1. fiecare monomer poate exista în una din conformațiile posibile - T sau R;
2. fixarea substratului modifică forma doar a unei subunități, cealaltă nu suferă modificări vădite;
3. modificările conformaționale determinate de substrat la o subunitate pot mări sau micșora afinitatea la substrat a celorlalte subunități. Fixarea este cooperativă.

Deosebirile între modele: cel simetric nu presupune echilibru între formele R și T în lipsa substratului, dar din contra, fixarea substratului induce trecerea  $T \rightarrow R$ .

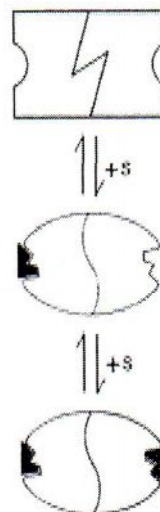


Figura 1.31. Modelul simetric de fixare cooperativă a substratului

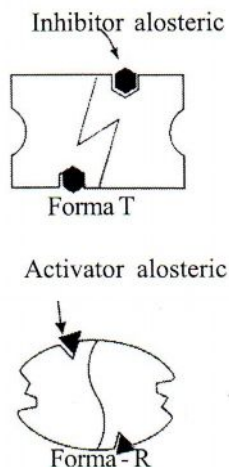


Figura 1.32. Inhibitorul alosteric stabilizează forma T, pe cînd activatorul respectiv — forma R



În acest model esențială este simetria monomerilor.

Modelul secvențial denotă că trecerea de la T la R în diferite subunități are loc coordonat și într-o anumită succesiune. Un rol primordial are forma hibrid RT. Monomerii interacționează cu condiția prezentei formei conformaționale diferite. În ultimul model (secvențial) efectul substanțelor homotrope poate fi pozitiv și negativ. Fixarea de enzimă a două molecule de substrat depinde efectiv de natura modificărilor structurale, determinate de fixarea primei molecule de substrat.

Recent se consideră că aceste modele reprezintă două cazuri aparte de interacțiune. În realitate ea e mult mai complexă, dependentă de particularitățile structurii cuaternare, terțiare etc.

E stabilit că sub acțiunea guanidinhidroclorei ( $G_4HCl$ ) sau a ureei inactivația unor enzime are loc la concentrații relativ mici ale agenților denaturanți, în care nu se observă modificări globale în conformația moleculei. Studiile recente confirmă că pierderea activității fermentative e determinată de micșorarea interacțiunii în molecule ce are, drept consecință, creșterea mobilității părții ei lăuntrice. Și denaturarea termică prezintă date că pentru un șir de enzime inactivarea este antecedentă modificărilor conformației, care este indusă de T înaltă. Pierderea activității enzimatică în acest caz nu e provocată de *efectul inhibitorilor*. Posibil că enzimele oligomere (*creatin kinaza*), disociind la monomeri, ar putea să se inactiveze în lipsa vădită a desfășurării moleculei enzimatică. Observațiile denotă că disocierea creatin kinazei are loc la concentrații ale agentului denaturant, cu mult mai majore decât ale celor ce provoacă inactivarea enzimei.

Studiile actuale demonstrează că micșorarea activității enzimatică în condiții de concentrații relativ mici ale agenților denaturanți sunt cauzate nu de efectul lor inhibitor sau de disociația enzimelor oligomere, dar de dependența de *perturbarea conformației centrului activ*.

Datele experimentale elucidează că centrele active ale majorității enzimelor sunt situate în regiuni ale moleculei mult mai mobile (între domenii) și deci sunt mult mai sensibile la acțiunea agenților denaturanți sau a factorilor fizici. În conformitate cu ipoteza "*potrivirii induse*" a lui D.Koshland, în fiecare fază a ciclului catalitic regiunea centrului activ capătă o conformație specifică fazei. Activarea enzimei este rezultatul coaptării CA a conformației, perfecte, ce determină efectul catalitic maxim. Dar în caz de sporire a activității enzimatică la încălzire și proteoliză, are loc trecerea dintr-o conformație compactă și stabilă în alta relativ mai deschisă și structurată mai fin. La proteoliză limitată activarea zimogenului e cauzată nu de coaptarea CA a conformației perfecte cu modificări fine în trecerea de la conformația zimogenului la cea necesară pentru cataliză, dar de majorarea mobilității moleculei proteice în regiunea CA. Anume *flexibilitatea*, dar nu structura bine formată a centrului activ, e responsabilă pentru funcția catalitică.

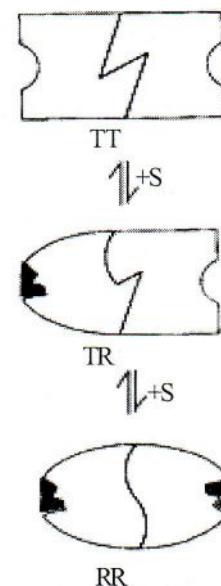


Figura 1.33. Modelul secvențial de fixare cooperativă a substratului

## INHIBIȚIA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

Activitatea enzimatică poate fi inhibată de molecule mici specifice, precum și de ioni, în ansamblu prezentând un mecanism de control. Distingem *inhibiție specifică și nespecifică*. Inhibiția stă la baza acțiunii substanțelor medicamentoase, a agenților toxici și poate fi *reversibilă și ireversibilă*.

La **inhibiția ireversibilă** inhibitorul se fixează sau se leagă covalent atât de profund de enzimă, încât disocierea are loc foarte lent. În acest tip de inhibiție se formează un complex enzimă-inhibitor stabil, nedisociabil:  $E + I \rightarrow EI$  (reacție ireversibilă).

Inhibiția ireversibilă prezintă următoarele caracteristici:

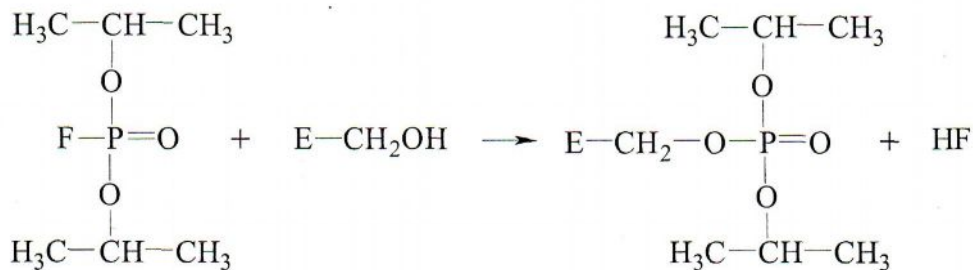
1. Inhibiția se accentuează progresiv, până la înlăturarea completă a activității enzimaticе și nu poate fi anulată prin îndepărtarea inhibitorului.

2. Se datorează unor modificări covalente și permanente ale grupărilor funcționale necesare catalizei, transformând enzimele în molecule inactice.

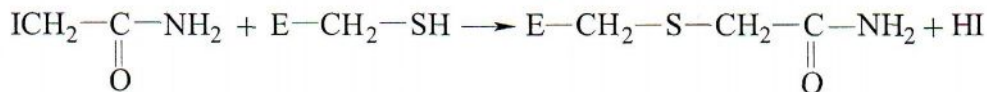
3. La început, acest tip de inhibiție este incompletă, dar crește pe durata timpului, pe măsură ce apar modificările chimice respective.

Aproape toți inhibitorii ireversibili sunt substanțe toxice, fiind numite și «otrăvuri enzimaticе». Amintim în acest sens acidul iodacetic, DIPFP, metalele grele, compușii arsenici, etc. Aceștia interacționează cu radicalii aminoacizilor din centrul activ al enzimei, esențiali pentru structura și funcția acestuia.

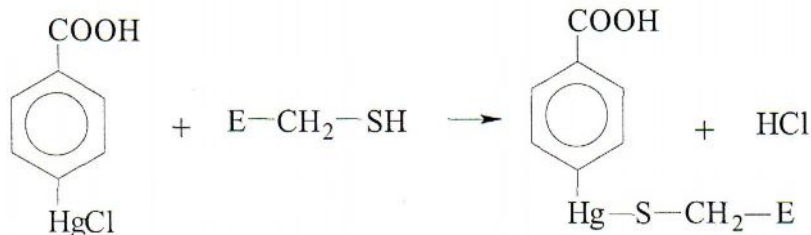
Exemple: *Diizopropilfluor fosfatul* (toxina neuroparalitică) se fixează de grupa OH a serinei în CA al acetil colinesterazei cu formarea enzimei neactive:



*Iodacetamida* se fixează de cisteina din centrul activ al enzimelor:

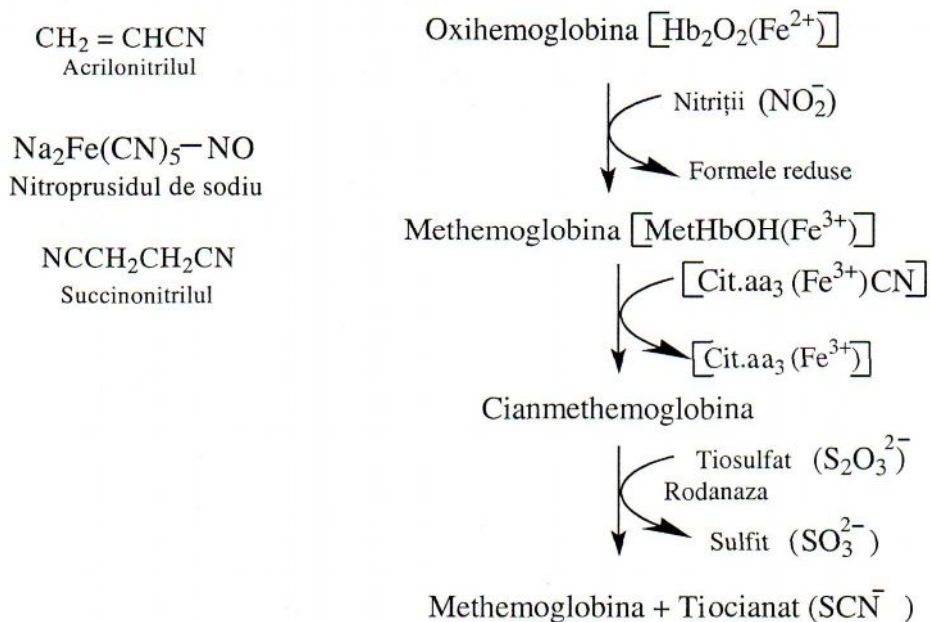


*Paraclormercur benzoatul* de asemenea leagă grupele SH din centrul activ:





Ca surse nedietare de cianide poate fi *nitroprusidul de sodiu* (agent hipotensiv), *succinonitrilul* (agent antidepresant), *acrilonitrilul*, cât și fumul de țigară. Expoziția cronică se manifestă prin demielinizare, leziuni ale nervului optic, ataxia și depresia funcției glandei tiroide. Intoxicația acută cu cianide necesită un tratament rapid. Baza biochimică a tratamentului efectiv constă în crearea unui complex nontoxic al fiero-porfirinei. Administrând nitriții ( $\text{NaNO}_2$  - intravenos, amidnitra - inhalatie) convertim porțiunea de hemoglobină normală în methemoglobină ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ultima e capabilă să fixeze complexul CN-citocromoxidazic eliberând citocromoxidaza și generând cianmethemoglobina. Methemoglobina este reînvoarsă în proces grație activității *rodanazei* (tiosulfat-cianid sulfransferaza) eritrocitare, care va transforma tiosulfatul în tiocianat.



La o **inhibiție reversibilă** echilibrul dintre enzime și inhibitori se instalează repede. Inhibiția reversibilă prezintă următoarele caracteristici:

1. Între enzimă și inhibitor se formează un complex EI,  $\text{E} + \text{I} \rightleftharpoons \text{EI}$  (reacție reversibilă). Reacția fiind reversibilă, inhibiția poate fi înlăturată prin deplasarea echilibrului spre stînga, cu regenerarea enzimei.

2. Se poate defini și o constantă de disociere a inhibiției complexului EI:



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

3. Inhibiția reversibilă poate fi competitivă, uncompetitivă și necompetitivă.

La **inhibiția competitivă** inhibitorul se fixează de centrul activ al enzimei, ca urmare a afinității structurii cu substratul, concurînd cu el și împiedicînd fixarea lui.

Nu e posibilă fixarea simultană a substratului și inhibitorului. Enzima va fixa acel competitor care se acumulează într-o concentrație mai mare. Inhibiția competitivă diminuează viteza catalizei, micșorând cota moleculelor de enzima fixatoare ale substratului.

Se poate prevedea efectul unor inhibitori pentru o enzimă dată, utilizând ecuația Lineweaver-Burk - o formă invers reciprocă a ecuației

Michaelis-Menten. Grafic este reprezentată în fig.1.34.

$$1/V_o = 1/V_{max} \times K_M/[S] + 1/V_{max}$$

În cazul inhibiției competitive: 
$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \frac{1}{V_{max}}$$

Analizînd această ecuație se constată că dacă concentrația S crește foarte mult,  $1/[S]$  tinde spre zero, iar ecuația devine: 
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}}$$

În inhibiția competitivă, unde are loc interacțiunea de tipul  $E + I \rightleftharpoons EI$ ,  $K_M$  crește,  $V_{max}$  rămîne nemodificată, panta curbei L - B variază la intersecția constantă (fig.1.35 a și b).

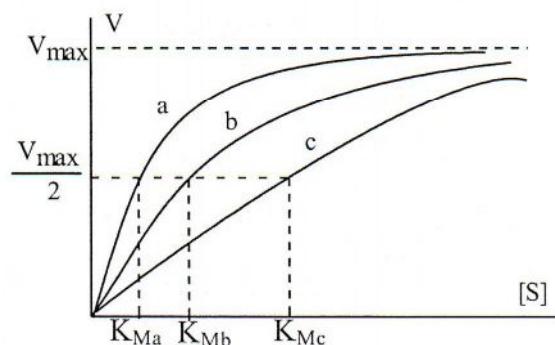


Figura 1.35a. Curba Michaelis-Menten în absența și prezența inhibitorilor competitivi. a) fără inhibitor; b) cu cantități mici de inhibitor; c) cu cantități mari de inhibitor

Exemplu:

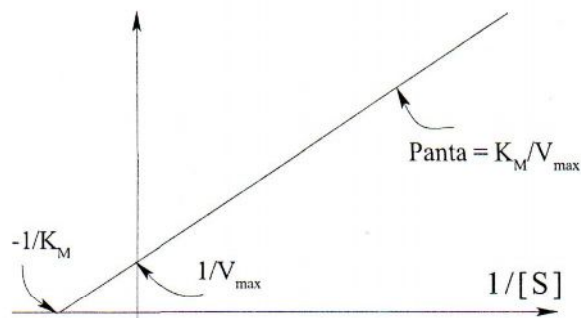
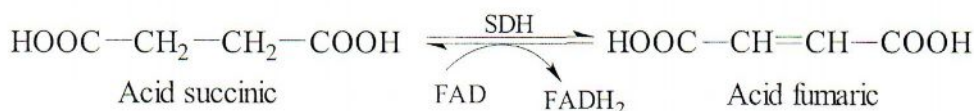


Figura 1.34. Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk

Prin urmare, în cazul inhibiției competitive viteza de reacție poate atinge  $V_{max}$ , ca și cum inhibitorul nu ar fi prezent, dacă se mărește suficient de mult concentrația substratului.

Inhibitorii competitivi însă măresc considerabil panta curbei  $K_M$ , scăzînd afinitatea enzimei pentru substrat.

Se observă că adăugarea inhibitorului nu modifică  $V_{max}$ , deci atingîndu-se viteza maximă. În același timp crește mult  $K_M$ , scăzînd afinitatea enzimei pentru substrat.



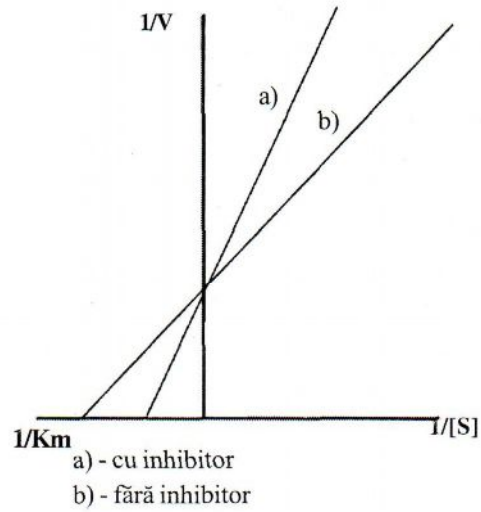
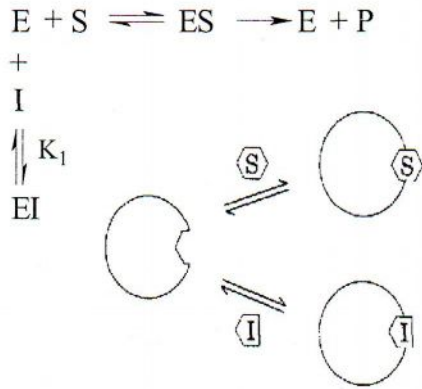
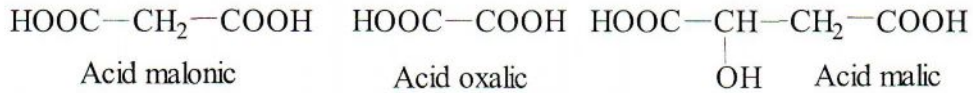
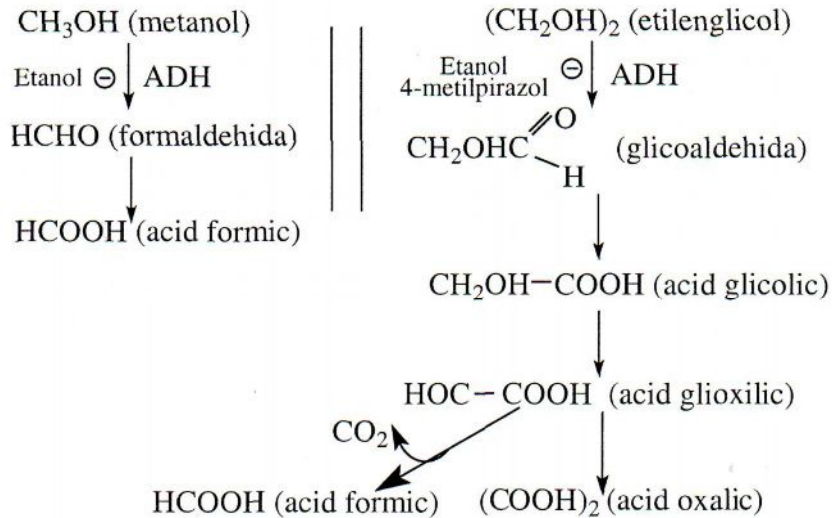


Figura 1.35b. Inhibiția competitivă

O structură similară o au acizii malonic, oxalic, malic, care pot servi drept inhibitori competitivi ai SDH.



Inhibitorul nu se scindează fermentativ. O particularitate esențială constă în faptul că efectul se înlătură la creșterea concentrației de substrat (succinat). Acest principiu stă la baza tratamentului intoxicațiilor cu *etilenglicol* ( $\text{CH}_2\text{OH}$ )<sub>2</sub>, component al antigelului. Produsul oxidării,  $(\text{COOH})_2$ , este toxic și apare ca rezultat al acțiunii alcool dehidrogenazei (ADH). Cristalele de oxalați ușor se precipită, deregând funcțiile rinichilor. Administrarea *etanolului* în doze aproape toxice inhibă reacția de oxidare și *etilenglicolul* se elimină din organism fără consecințe grave.



Același mecanism stă la baza tratării intoxicațiilor cu *metanol*. Produsul oxidării este *acidul formic* (HCOOH). Foarte sensibile la intoxicații cu metanol sunt celulele retinei ochiului, sistemului nervos central (depresie). O terapie întârziată include hemodializa și administrarea bicarbonaților exogeni.

O categorie importantă de inhibitori competitivi sunt *sulfamidele* și derivații respectivi. Acțiunea antibacteriană a sulfamidelor constă în substituirea *acidului p-aminobenzoic* (PAB) din *acidul folic*, indispensabil pentru creșterea microorganismelor, împiedicând dezvoltarea lor. Metabolismul în organismul gazdei nu este afectat deoarece acidul folic este asigurat de aport alimentar. Eficacitatea sulfamidelor e dependentă de cantitățile administrate.

La o **inhibiție necompetitivă**, dar reversibilă, inhibitorul și substratul se leagă simultan cu enzima, dar locusurile sunt diferite. Acțiunea inhibitorului constă în micșorarea numărului turnover al enzimei, dar nu și a numărului de molecule de substrat. Mărirea concentrației de substrat nu micșorează inhibiția.

Inhibiția necompetitivă prezintă următoarele caracteristici:

1. Între inhibitor și substrat nu se realizează o competiție pentru a se lega de enzimă.
2. Inhibitorul nu prezintă asemănări structurale cu substratul.
3. Inhibitorul se leagă de enzimă în alt loc decât centrul activ.
4. Inhibitorii necompetitivi scad  $V_{\max}$ , dar nu afectează  $K_M$ .

Deoarece inhibitorii se leagă de enzimă în alt loc decât centrul activ, este posibilă formarea complexului ES, cât și a complexului ESI. Deoarece complexul ESI nu se poate scinda pentru a forma produsul de reacție, la o viteză de formare a complexului ES mai mare decât a complexului ESI, reacția este încetinită, dar nu oprită.

La o inhibiție necompetitivă (noncompetitivă) de tipul



$K_M$  nu se modifică,  $V_{\max}$  descrește, iar panta și intersecția variază (fig. 1.36a și b).

Se observă că  $1/V_{\max}$  crește, deci în inhibiția necompetitivă  $V_{\max}$  scade.

Practic, în cazul inhibiției necompetitive inhibitorul, chiar dacă nu se leagă de centrul activ al enzimei, acționează asupra acesteia deformînd-o, astfel încît ea nu mai poate forma complexul ES la viteză normală pe de o parte, iar pe de altă parte complexul ES format nu se mai descompune cu viteză normală pentru a forma produsul de reacție. Este evident că în acest caz inhibiția nu poate fi înlăturată prin mărirea concentrației substratului.

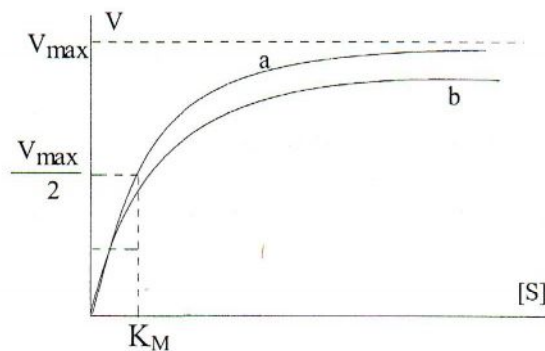


Figura 1.36a. Curba Michaelis-Menten în absența și prezența inhibitorilor necompetitivi.  
a) fără inhibitor; b) cu inhibitor necompetitiv



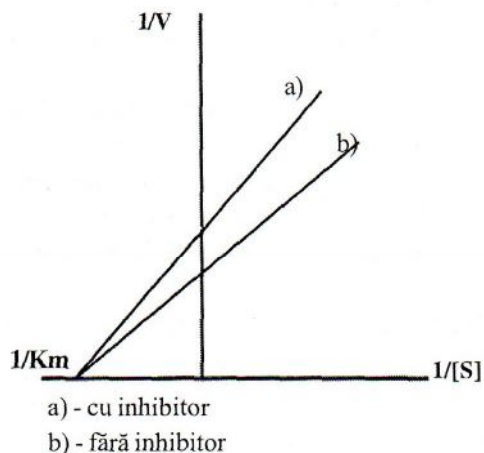
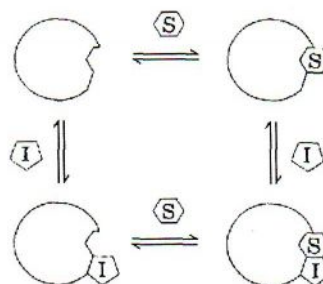
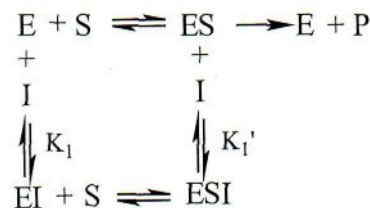


Figura 1.36b. *Inhibiția noncompetitivă*



Cei mai vădiți inhibitori de acest tip în celulele vii sunt produsele intermediare ale metabolismului, care se fixează reversibil cu locusurile specifice pe suprafața unor enzime reglatoare, modificînd activitatea lor.

Iată cîteva exemple:

1. Cel mai comun tip de inhibiție necompetitivă este produs de agenții chimici care se pot combina cu unele grupări funcționale ale enzimei; acestea, chiar dacă nu fac parte din centrul activ al enzimei, sunt esențiale pentru menținerea structurii tridimensionale și, prin urmare, pentru activitatea catalitică a acesteia.

Spre exemplu, ionii metalelor grele ( $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Pb^{2+}$ ), unele substanțe organice ca acidul iodacetic, PCMB, DTNB etc. sunt inhibitori necompetitivi pentru numeroase enzime.

2. Unele enzime metaloactive sunt inhibate necompetitiv de agenți capabili să lege aceste metale, precum este EDTA care complexează ionii  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ .

3. Inhibitori necompetitivi sunt și  $CN^-$  și CO pentru citocromi, substanțe care intervin în ultimul segment al lanțului respirator mitocondrial.

***Inhibiția uncompetitivă (incompetitivă)*** prezintă următoarele caracteristici:

1. Inhibitorul nu se combină cu enzima liberă și nu afectează relația ei cu substratul.

2. Inhibitorul se combină cu complexul ES, formînd un complex ESI ce nu poate genera produsul dorit.

3. Se întîlnește rar în reacțiile cu un substrat, dar este frecventă în reacțiile cu două sau mai multe substraturi.

Deci, la o inhibiție incompetentivă panta este constantă, intersepta variază,  $K_M$  și  $V_{max}$  se micșorează (fig. 1.37a și b).

Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk în diferite cazuri de inhibiție este redată în fig. 1.38.

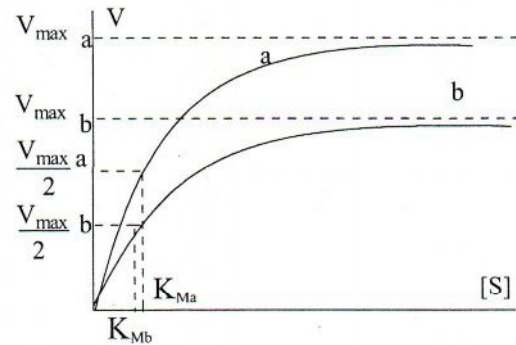
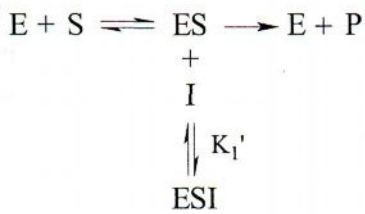


Figura 1.37a. Curba Michaelis-Menten în absența și prezența inhibitorilor incompetitivi.  
a) fără inhibitor; b) cu inhibitor incompetitiv

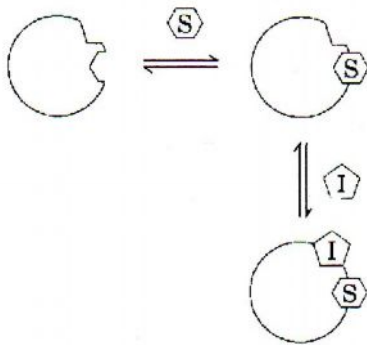


Figura 1.37b. Inhibiția incompetitivă

Activitatea enzimatică poate fi inhibată la interacțiunea diferitor subunități ale enzimelor oligomere - *inhibiția alosterică*.

**Izoenzimele.** Se atestă enzime ce există în *forme moleculare multiple*, la aceeași specie, în același țesut și chiar în aceleași celulă. Catalizează aceeași reacție, dar se deosebesc după proprietățile cinetice, după aminoacizi ca componentă și succesiune. Atare forme multiple se numesc *izoenzime*.

E studiată mai detaliat LDH - lactat dehidrogenaza ce catalizează transformarea lactatului în piruvat. Fiecare izoenzimă e compusă din 4 lanțuri polipep-

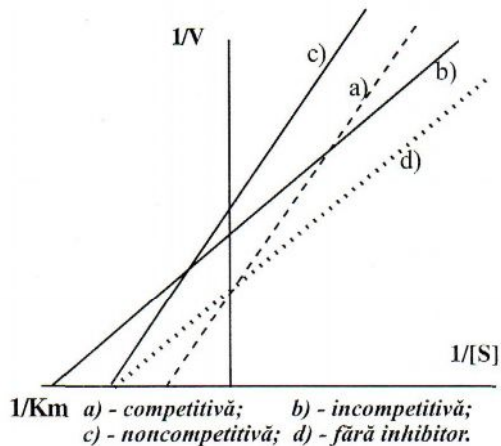
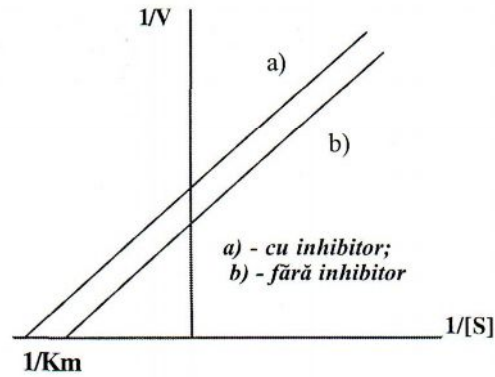


Figura 1.38. Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk în diferite cazuri de inhibiție



tidice cu masa moleculară aproximativ egală cu 33500 Da, care conțin două tipuri de lanțuri polipeptidice în diferite raporturi: A(M) și B(H), codificate de gene diferite. Enzima ce conține  $H_4$  se localizează în inimă - LDH<sub>1</sub>, iar cea compusă din  $M_4$  - în mușchi - LDH<sub>5</sub>. Izoenzimele diferă atât după  $V_{max}$  și  $K_M$  pentru substratul lor, cât și după sensibilitatea la modulatori alosterici (fig. 1.39-1.40). E bine cunoscută și creatin kinaza care are 3 izoenzime (M, B, MB) la asocierea a 2 lanțuri polipeptidice.

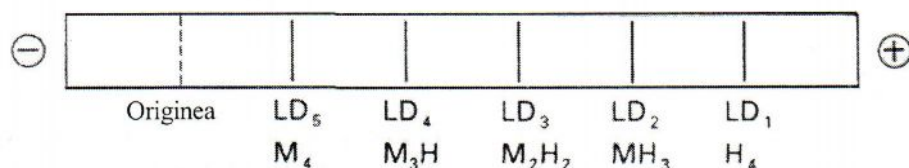


Figura 1.39. Repartizarea electroforetică a izoenzimelor lactat dehidrogenazei



Figura 1.40. Subunitățile componente ale izoenzimei lactat dehidrogenazei

Care-s factorii ce determină prezența izoenzimelor? Aceștia sunt:

1. Particularitățile metabolice ale diferitelor organe.
2. Localizarea și rolul metabolic al enzimei anumite în celulele aceleiași specii - (mitocondrii sau citozol-malat dehidrogenaza-MDH).
3. Procesul de evoluare și diferențiere a țesutului omului matur din formele inițial-embriionare (LDH ficatului la embrion are o anumită caracteristică, ce se schimbă o dată cu evoluția organului; scindarea glucozei la tumori e catalizată de aceleași enzime, proprii și embrionului).
4. Sensibilitatea la modulatorii alosterici care permit o reglare fină a reacțiilor metabolice.

5. Rezultatul mutațiilor ce modifică activitatea catalitică a enzimelor și cauzează maladii genetice, dar nu întotdeauna. Se pot observa și fenomene opuse - adaptarea la factorii nocivi.

Enzimele din celule se pot afla și în stare liberă (în citozol), se pot fixa de structuri supramoleculare (în matricea mitocondrială); se organizează în complexe multienzimatice sau asociate, îndeosebi cele ce conțin mai multe subunități (fosforilaza). Unor enzime le este caracteristică o localizare dublă: în citozol și în mitocondrii (MDH).

Există enzime atașate la membrane (membrana citoplasmică - adenilatciclaza); mitocondriile înzestrate cu două membrane se caracterizează printr-o distribuție complexă a enzimelor.

Complexele enzimatică sunt fixate de diferite structuri. P. Srere (1985) propune termenul *metabolon* care reprezintă un complex enzimatic supramolecular ce catalizează consecutiv fazele unei căi metabolice și elementele structurale ale celulei. Adică noțiunea include și

substructura celulară în care este absorbit complexul. Exemplu: enzimele glicolitice cu proteina respectivă în membrana eritrocitului; complexul PDH cu elementele structurale ale membranei interne mitocondriale; sintetaza acizilor grași etc. Dimensiunile metabolonilor oscilează vădit (2-5 mln kDa) cu diametrul particulelor 20-50 nm. Enzimele ciclului Krebs la fel reprezintă o organizare de enzime de tipul metabolonului. Este evident că enzimele în celule agreghează în complexe și structuri bine determinate. Interacționează cu formarea asocierilor de grad înalt, asigurând integritatea celulei.

## CLASIFICAREA ENZIMELOR

Principiul cardinal ce stă la baza clasificării și denumirii enzimelor e determinat de tipul reacției catalizate și mecanismul ei. Criteriile acestei sistematizări constau în următoarele:

1. Reacțiile și enzimele respective sunt aranjate în șase clase, în fiecare clasă se diferențiază câteva subclase (de la 4 la 13).

2. Denumirea enzimei e compusă din două părți: prima - de numirea substratului (sau a substraturilor), a doua — tipul reacției catalizate și se finalizează cu *-aza*.

3. Fiecare ferment are codul său după clasificarea dată: prima cifră reprezintă clasa de reacții, a doua — subclasa, și a treia — subsubclasa (acceptorul), ultima cifră indică numărul de ordine.

Enzimele, în afară de denumirea lor sistemică, mai posedă și o denumire trivială. Mai jos sunt redate cele 6 clase de enzime și unele exemple.

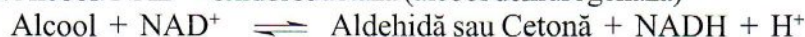
### 1. Oxidoreductazele

Enzimele date catalizează reacțiile de oxidoreducere, transferul electronilor cu participarea a două substraturi:  $S_R + S_O' \rightleftharpoons S_O + S_R'$ . Sunt catalizate reacțiile cu participarea grupelor: CH-OH (1), C-OH, C=O (2), CH-CH (3), CH-NH<sub>2</sub> (4) și CH-NH- (5).

Unele exemple de subclase:

1.1. Enzimele ce acționează asupra grupei CH-OH ca donatoare.

1.1.1.1. Alcool: NAD<sup>+</sup> - oxidoreductaza (alcool dehidrogenaza)



1.2. Enzimele ce acționează asupra grupelor C-OH sau C=O ca donatoare.

1.2.1.12. D-gliceraldehid-3-fosfat: NAD<sup>+</sup> - oxidoreductaza (gliceraldehid-fosfat dehidrogenaza)



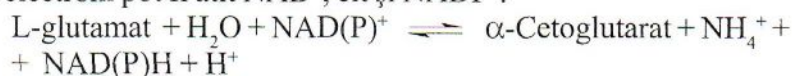
1.3. Enzimele ce acționează asupra grupei CH-CH ca donatoare.

1.3.1.3. 4,5-dihidrocortizon: NADP<sup>+</sup> - oxidoreductaza (cortizon reductaza).



1.4. Enzimele ce acționează asupra grupei CH-NH<sub>2</sub> ca donatoare.

1.4.1.3. L-glutamat: NAD(P)<sup>+</sup> - oxidoreductaza (dezaminaza). Denumirea trivială - glutamat dehidrogenaza. Forma NAD(P)<sup>+</sup> confirmă că acceptori de electroni pot fi atât NAD<sup>+</sup>, cât și NADP<sup>+</sup>.





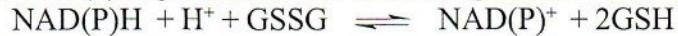
1.5. Enzimele ce acționează asupra grupei C-NH ca donatoare.

1.5.1.3. 5,6,7,8-tetrahidrofolat:  $\text{NAD(P)}^+$  - oxidoreductaza (tetrahidrofolat dehidrogenaza).



1.6. Enzimele ce acționează asupra grupelor NADH sau NADPH ca donatoare.

1.6.4.2.  $\text{NAD(P)H}$ : glutation-oxidoreductaza (glutation reductaza).



1.8. Enzimele ce acționează asupra grupelor ce conțin sulf ca donator.

1.8.4.1. Glutition: homocistin-oxidoreductaza (glutation-homocistin transhidrogenaza).

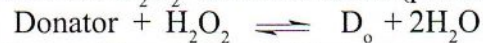


1.11. Enzimele ce acționează asupra  $\text{H}_2\text{O}_2$  ca acceptor.

1.11.1.6.  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $\text{H}_2\text{O}_2$  - oxidoreductaza (catalaza).



1.11.1.7. Donator:  $\text{H}_2\text{O}_2$  - oxidoreductaza (peroxidaza).



1.99. Alte enzime ce utilizează  $\text{O}_2$  ca oxidant - lipooxygenaza, homogentizat oxigenaza etc.

**2. Transferazele** sunt enzime ce catalizează transferul grupelor funcționale (G) (diferite de atomul de hidrogen) de la un substrat la altul:  $\text{S-G} + \text{S}' \rightleftharpoons \text{S}'\text{-G} + \text{S}$ .

Catalizează aceste enzime transferul grupelor: monocarbonice(1), cetonice sau aldehidice (2), acil (3), glicozil (4), azotice (6), ce conțin fosfor (7) și sulf (8). Unele exemple:

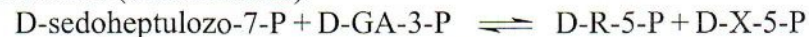
2.1. Transferul grupelor monocarbonice.

2.1.2.1. L-serina: tetrahidrofolat-10-oximetiltransferaza (serin-oximetil-transferaza).



2.2. Transferul grupelor aldehidice și cetonice.

2.2.1.1. D-sedoheptulozo-7-fosfat: D-gliceraldehid-3-fosfat-glicolaldehid transferaza (transcetolaza).



2.2.1.2. D-sedoheptulozo-7-fosfat: D-gliceraldehid-3-fosfat-dioxiaceton transferaza (transaldolaza).



2.3. Transferul grupelor acil.

2.3.1.6. Acetil-CoA: cholin-o-acetil-transferaza (cholin-acetil-transferaza)



2.6. Transferul grupelor azotice.

2.6.1.1. L-aspartat: 2-cetoglutarat-aminotransferaza (aspartat-aminotransferaza)



2.7. Transferul grupelor ce conțin fosfor:

a) ca acceptor servește grupa alcoolică:

2.7.1.1. ATP: D-hexozo-6-fosfat transferaza (hexokinaza).



2.7.1.11. ATP: D-fructozo-6-fosfat-1-fosfotransferaza (fosfofructokinaza)



2.7.1.40. ATP: piruvat-fosfotransferaza (piruvatkinaza)



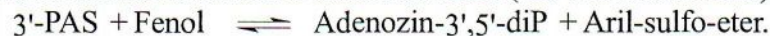
b) ca acceptor servește grupa fosfat:

2.7.4.3. ATP: AMP-fosfotransferaza (adenilatkinaza):



2.8. Transferul grupelor ce conțin sulf.

2.8.2.1. 3'-fosfoadenilil-sulfat: fenol-sulfotransferaza (aril-sulfotransferaza)



**3. Hidrolazele** catalizează reacțiile de hidroliză, cu utilizarea moleculelor de apă.

3.1. Acționează asupra legăturilor esterice.

3.1.1.3. Hidrolaza esterilor glicerolului (lipaza).



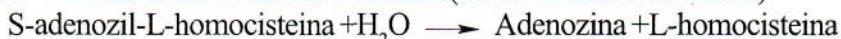
3.2. Acționează asupra compușilor glicozilici.

3.2.1.1.  $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucano-hidrolaza ( $\alpha$ -amilaza)

Hidrolizează legăturile 1-4 în polizaharide.

3.3. Acționează asupra legăturilor eterice.

3.3.1.1. S-adenozil-L-homocistein-hidrolaza (adenozil-homocisteinaza)



3.4. Acționează asupra legăturilor peptidice.

3.4.1.2. Aminopeptidaza. Hidrolizează di- și tripeptidele, scindând restul N-terminal.

3.4.4.1. Pepsina. Hidrolizează peptidele prin grupele aminice ale aminoacizilor aromatici sau ale acizilor dicarboxilici.

3.5. Acționează asupra legăturilor C-N.

3.5.1.2. L-glutamin-amidohidrolaza (glutaminaza)



3.5.1.5. Carbamid-amidohidrolaza (ureaza)



3.6. Acționează asupra legăturilor anhidrice.

3.6.1.8. ATP - pirofosfohidrolaza (ATP-aza)



**4. Liazele** catalizează adiția la legăturile duble și reacțiile inverse.

4.1. C-C liazele

4.1.1.1. Carboxiliaza 2-cetoacizilor (piruvat decarboxilaza)





4.1.2. Aldehid-liazele.

4.1.2.7. Ceto-1-fosfat-aldehid-liaza (aldolaza).



4.1.3. Liazele cetoacizilor.

4.1.3.7. Citrat-oxaloacetat-liaza (CoA acetilată) (Citrat-sintaza sau citrat-enzima de condensare)

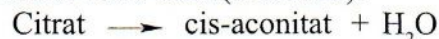


4.2. C-O liazele.

4.2.1.2. L-malat-hidro-liaza (fumaraza)



4.2.1.3. Citrat-hidro-liaza (aconitaza).



**5. Izomerazele** determină transferul grupelor în interiorul moleculei, cu formarea izomerilor.

5.1. Racemazele și epimerazele.

5.1.1.1. Alanin racemaza.



5.1.3.2. UDP-glucozo-4-epimeraza.



5.3. Oxidoreductazele intramoleculare.

5.3.1.1. D-gliceraldehid-3-fosfat-cetoizomeraza (triozofosfat-izomeraza)



5.4. Transferazele intramoleculare.

5.4.2.1. D-fosfoglicerat-2,3-fosfomutaza (fosfogliceratfosfo mutaza)



**6. Ligazele** catalizează reacțiile, formînd legăturile covalente cu utilizarea ATP.

6.1. Formarea legăturilor C-O.

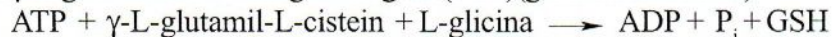
6.2. Formarea legăturilor C-S.

6.2.1.1. Acetat: CoA-ligaza (ATP) (acetil-CoA-sintetaza)



6.3. Formarea legăturilor C-N.

6.3.2.3.  $\gamma$ -L-glutamil-L-cistein: glicin-ligaza (ATP)(glutation-sintetaza)



6.4. Formarea legăturilor C-C.

6.4.1.1. Piruvat:  $\text{CO}_2$ -ligaza (ATP) (piruvat-carboxilaza).



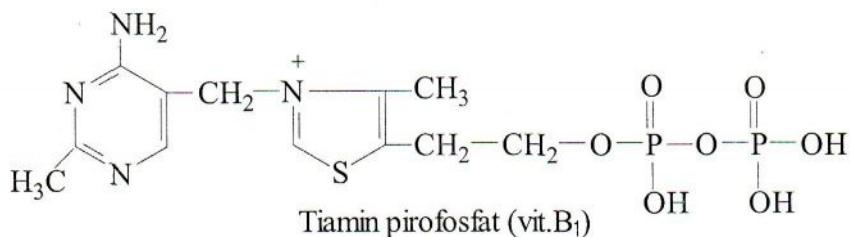
6.4.1.2. Acetil-CoA:  $\text{CO}_2$ -ligaza (ADP) (Acetil-CoA-carboxilaza).



## COENZIMELE

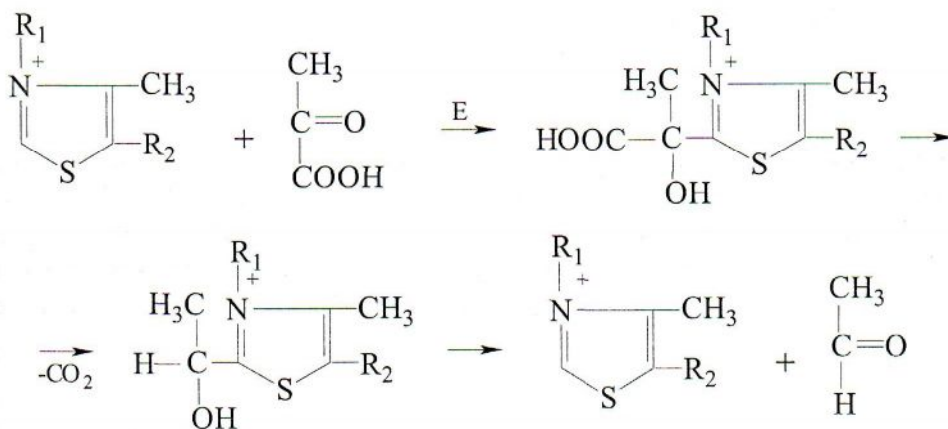
Drept constituenți coenzimatici servesc *vitaminele*. Ele nu reprezintă materie structurală (de felul proteinelor, glucidelor, lipidelor), nu au valoare energetică, dar participă la multiple și variate reacții metabolice. Pentru îndeplinirea acestor roluri funcționale organismul are nevoie de cantități mici de vitamine. Animalele superioare și omul au pierdut capacitatea de a sintetiza vitamina, și conținutul ei în rația alimentară e obligatorie.

**Vitamina B<sub>1</sub>**. Drept coenzimă servește forma ei activă — tiamin pirofosfatul.



Participă la reacții enzimatiche de transfer al unei unități de aldehydă activă (în reacția de decarboxilare oxidativă a  $\alpha$ -cetoacizilor - piruvat,  $\alpha$ -cetoglutarat), în reacția de transetolare a metabolismului glucidic; se include în alte complexe multienzimatiche.

În ciclul tiazolic, datorită ionizării azotului (N<sup>+</sup>), carbonul C<sub>2</sub> devine carbanion și declanșează un atac nucleofil asupra C<sub>2</sub> din molecula acidului piruvic. Ca urmare, se formează un compus de adiție, care apoi se decarboxilează, rezultând hidroxietil TPP. Ulterior, acesta elimină acetaldehidă și regenerează TPP.

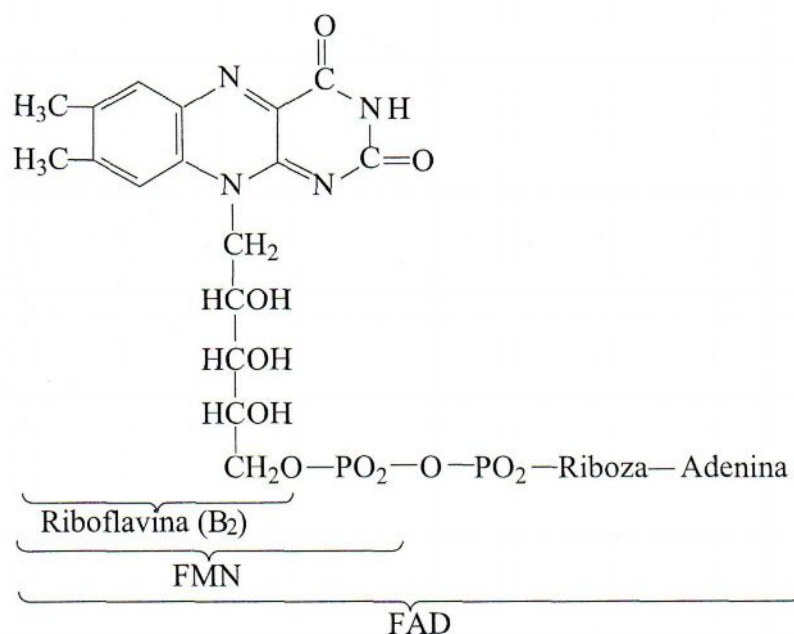


La insuficiența de vitamină B<sub>1</sub> suferă dereglări sistemul nervos central, sistemul cardiovascular, tractul gastrointestinal, drept consecință a deficitului de energie, prin defectarea degradării glucozei.

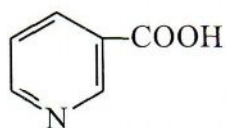


**Vitamina B<sub>2</sub> — riboflavina** — e componenta coenzimelor flavinice.

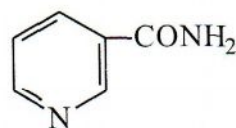
Centrul activ al enzimelor conține unele metale, de aici și denumirea enzimelor respective — metaloflavoproteine. FAD și FMN sunt coenzime implicate în procesele de oxidoreducere. Enzimele respective se numesc *flavoenzime* sau *flavoproteine*. În cadrul reacțiilor de oxido-reducere, concomitent, ciclul izoaloxazinic suferă reduceri reversibile prin fixarea la azotul N(1,10) a 2 atomi de hidrogen preluați de la substrat — substratul se oxidează, iar flavinele se reduc — FMNH<sub>2</sub> sau FADH<sub>2</sub>. Acest sistem FAD - FADH<sub>2</sub> sau FMN - FMNH<sub>2</sub> dispune de un potențial electric standard.



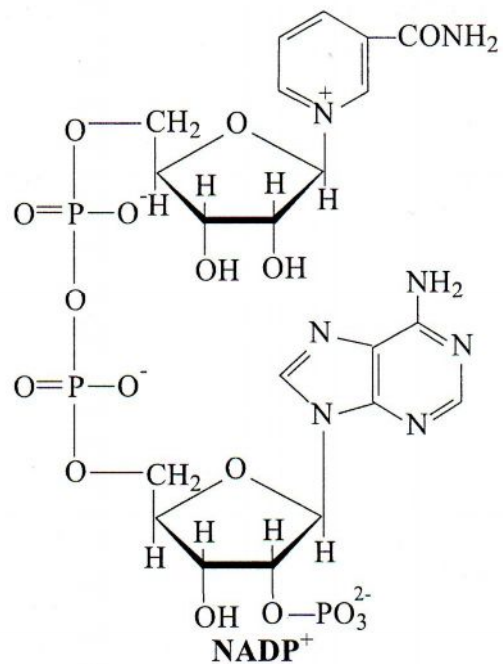
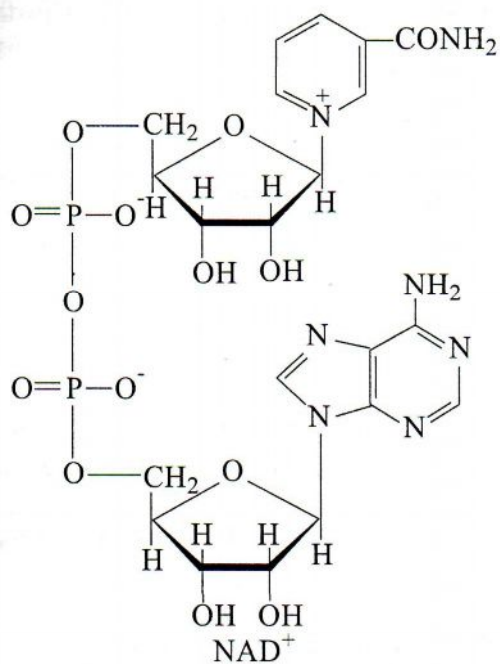
**Vitamina PP — niacina, niacinamida, B<sub>3</sub>**. Se include în structura a două coenzime nicotinamidice, care participă la reacțiile de oxidoreducere — NAD<sup>+</sup> și NADP<sup>+</sup>. Ambele contribuie la dehidrogenarea substraturilor — transferul unui hidrid-ion —H<sup>-</sup> (H<sup>+</sup> și 2e<sup>-</sup>), alt proton se permută în soluție (H<sup>+</sup>). Legătura cu componenții proteici este slabă (enzimele NAD<sup>+</sup> dependente participă la procesele catabolice, cele NADP<sup>+</sup> dependente anabolice).



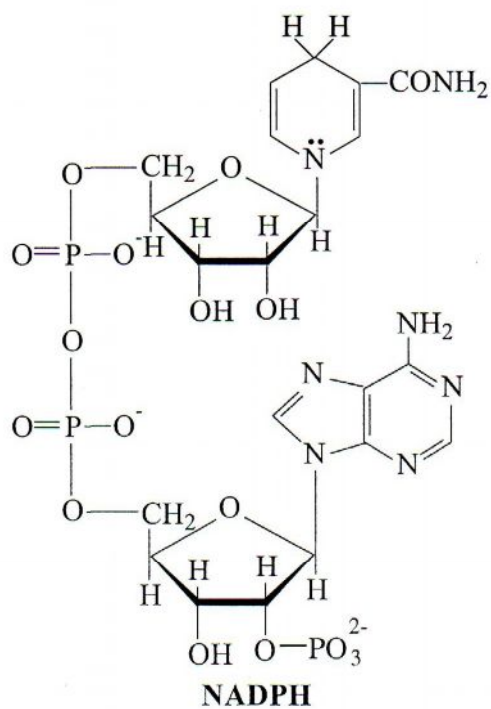
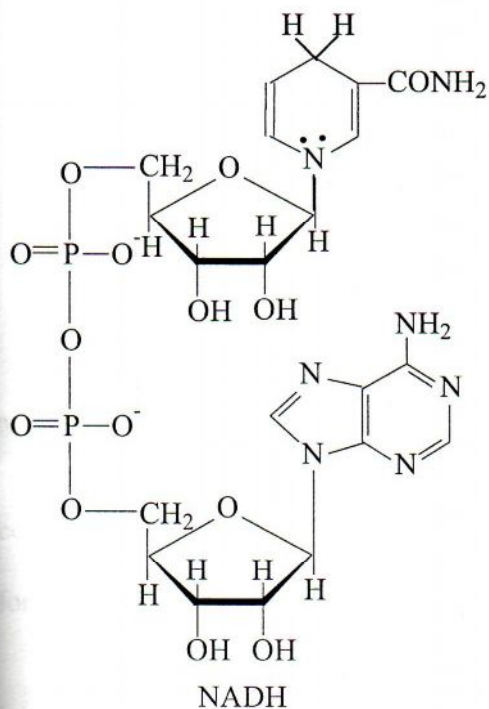
Acid nicotinic



Nicotinamida (NA)



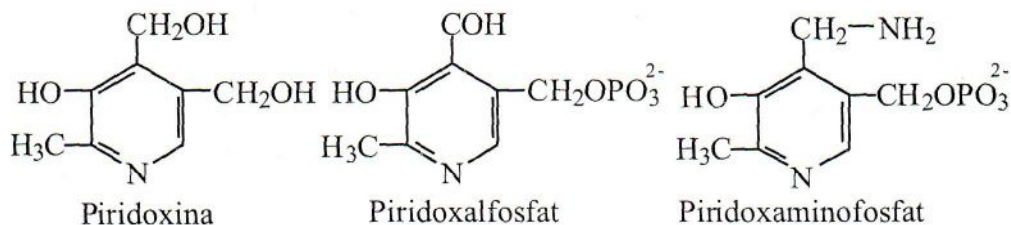
*Structura  $\text{NAD}^+$  și  $\text{NADP}^+$*



*Structura  $\text{NADH}$  și  $\text{NADPH}$*



**Vitamina B<sub>6</sub>** — *piridoxina*. Drept coenzimă servesc formele active — piridoxalfosfat și piridoxaminfosfat.



Enzimele B<sub>6</sub> dependente iau parte la:

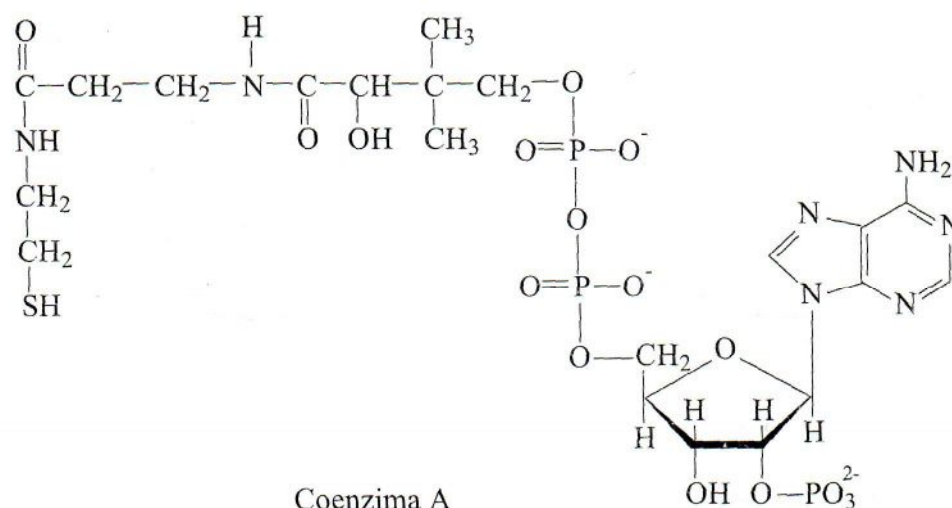
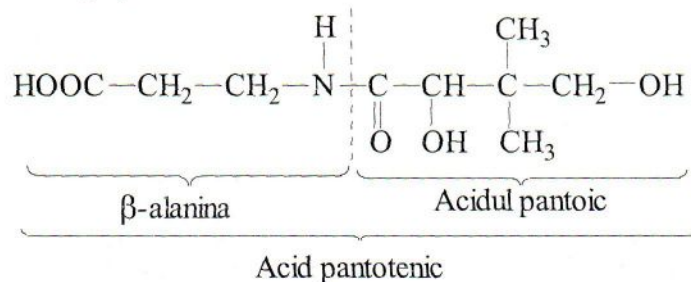
1) procesele de transaminare, transformând un aminoacid în cetoacid și, viceversa, servind ca coenzimă în aminotransferaze (mecanismul “ping-pong”) prin formarea de baze Schiff intermediare;

2) reacțiile de decarboxilare a aminoacizilor, aplicându-se același mecanism;

3) procesul de transulfurare a unor aminoacizi;

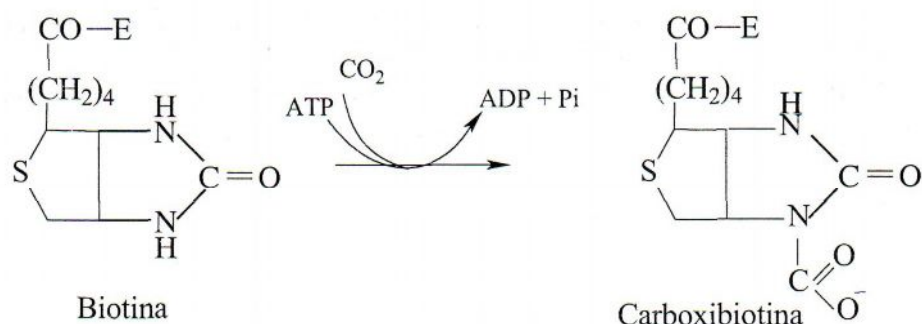
4) determinarea activității glicogen fosforilazei (degradarea glicogenului).

**Vitamina B<sub>3</sub>** — *acidul pantotenic* — componenta CoA. Conlucrează la transferul grupelor acil, datorită grupului reactiv SH cu formarea tioesterilor.

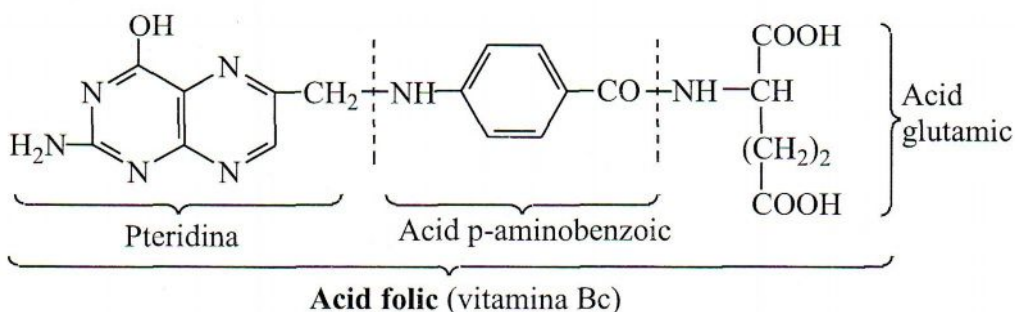


Coenzima A

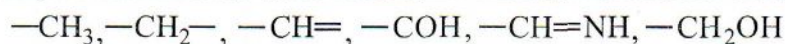
**Vitamina H** — *biotina* — servește drept coenzimă a carboxilazelor ce leagă  $\text{CO}_2$  și-l transferă la substraturi.  $\text{CO}_2$  se activează, unindu-se cu biotina și utilizând ATP.



**Vitamina Bc** - *acidul folic*. Vitamina Bc în organism se reduce, formînd fermentativ acidul tetrahidrofolic ( $\text{FH}_4$ ) ce servește drept coenzimă (5,6,7,8), transferînd de la o moleculă la alta grupările atomilor de carbon în cadrul diverselor reacții fermentative.



Grupările atomilor de carbon care sunt transferate de către acidul folic:



**Vitamina C** — *acidul ascorbic* (organismul uman nu e apt să-l sintetizeze).

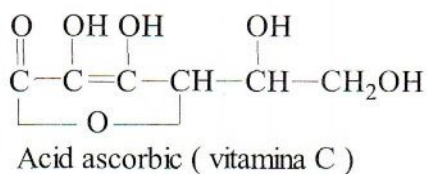
Vitamina C joacă un rol esențial la:

1. Reacții de hidroxilare, cu implicarea  $\text{O}_2$ .
2. Hidroxilarea poate avea loc și în baza reducerii formei oxidative (pe seama acidului dehidroascorbic).

Triptofanul  $\rightarrow$  5-hidroxitriptofan.

3. Diverse reacții de oxidoreducere, în care funcționează cuplat cu glutatiunul sau coenzimele  $\text{NAD}^+$  și  $\text{FAD}$  - dependente.

4. Drept cofactor activator al anumitor enzime (degradarea oxidativă a tirozinei, formarea adrenalinei, etc).

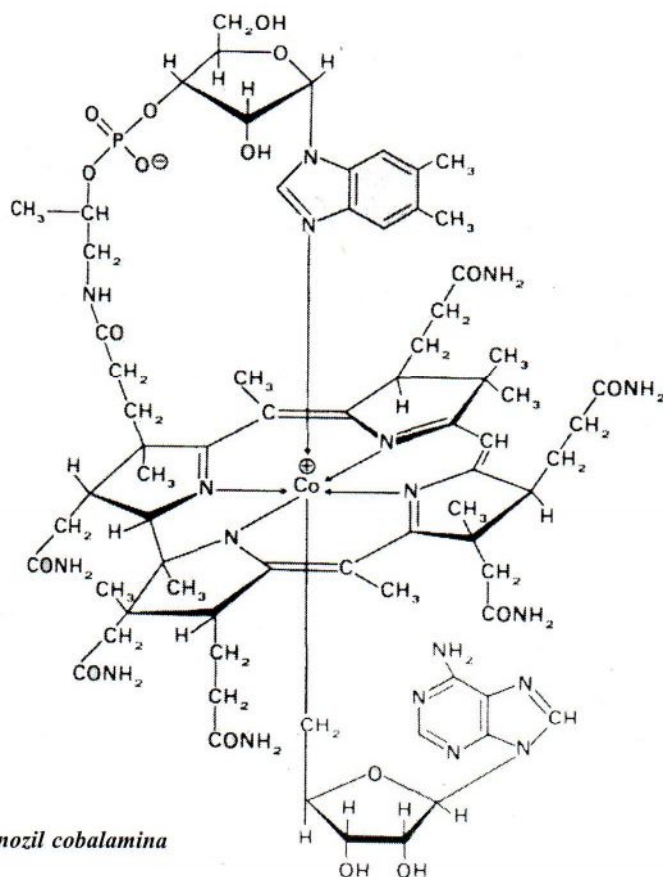




**Vitamina B<sub>12</sub> — ciancobalamina** — posedă o structură complicată, depistată în 1957. Gruparea CN din coenzimă este substituită prin adenozil. Servește drept coenzimă pentru unele transmetilaze și anumite mutaze (izomeraze):

1. La transformarea homocisteinei în metionină, se utilizează FH<sub>4</sub> ca donator de CH<sub>3</sub>, dar enzima acceptă metil-cobalamina drept coenzimă.

2. La transformarea metilmalonil CoA în succinil CoA (restructurarea scheletului de atomi de C), drept coenzimă servește 5-dezoxiadenozil cobalamina.

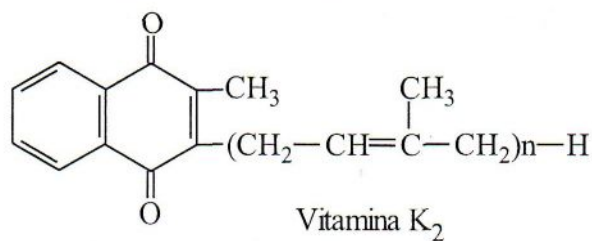


Structura 5-dezoxiadenozil cobalamina

### Vitaminele liposolubile:

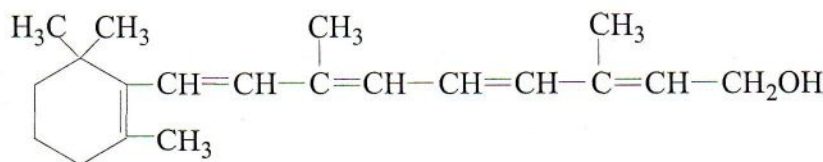
**Vitamina K** servește drept cofactor al sistemului enzimatic (carboxilaza), ce exercită carboxilarea acidului glutamic în gama-carboxiglutamic cu asocieri de oxigen. Acest acid se conține în protrombină (10 resturi de acid) ce poate chelata calciul.

Se presupune că ea participă activ la fosforilarea oxidativă, fiindcă sub acțiunea avitaminelor K acest proces se decuplează. Vitamina K e necesară pentru coagulare (vezi capitolul respectiv).



**Vitamina A — retinolul** — este un derivat poliizoprenoidic, care conține nucleul ciclohexenului și mai multe unități izoprenice.

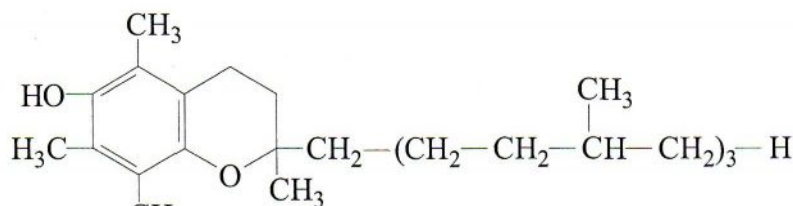
Retinolul (retinalul) este un component al rodopsinei din bastonașele retinei (opsina și 11-cis-retinal).



Retinol (vitamina A)

La absorbția de către rodopsină a quantumurilor de lumină are loc descompunerea ei în opsină și trans-retinal, care vor izomera în cis sub influența enzimei specifice — retinol izomeraza. Acidul retinoic participă la transportul prin stratul bilipidic al oligozaharidelor încorporate în glicoproteine (grație modificărilor cis-trans.)

**Vitamina E** este un antioxidant. Ea protejează celulele de diverși oxidanți toxici, exclude oxidarea vit. A, a acizilor grași esențiali. Conlucrează cu selenul în procesele antioxidante și previne, de altfel, acțiunea distructivă a peroxizilor.



Vitamina E

Pentru funcționarea normală a organismului sunt necesare și unele **microelemente** în cantități mici (miligrame). Ele funcționează drept *cofactori* sau *grupe prostetice*. Rolul pe care-l comportă:

1. Au funcție catalitică vizavi de o anumită reacție chimică, viteza căreia se amplifică în prezența proteinei fermentative (Fe, Cu).

2. Ionul poate forma simultan un complex cu substratul și centrul activ al enzimei și, atașându-se, trec în formă activă, modificând conformația.

3. La un stadiu anumit al ciclului catalitic, ionul de metal joacă rolul de acceptor al electronilor — sunt antrenate metaloenzimele.

4. Ionii stabilizează structura enzimelor.

Exemple de diverse enzime ce conțin metale:

**Fe:** Citocromoxidaza, catalaza, peroxidaza, proteinele fiero-sulfidice (nu conțin hem, ci un număr par de Fe și S într-o formă labilă).



**Cu:** Liziloxidaza și citocromoxidaza, contribuind la împachetarea colagenului și elastinei.

**Zn:** Enzimele NAD<sup>+</sup> dependente, alcool dehidrogenaza, RNA și DNA polimerazele, carbanhidraza, carboxipeptidazele.

Între Zn<sup>2+</sup> și Cu<sup>2+</sup> sunt sesizabile fenomenele de antagonism, la fel ca și între Mg<sup>2+</sup> și Ca<sup>2+</sup>.

Îngrășămintele minerale conțin sulfat de amoniu, care surcusează seleniul necesar pentru activitatea glutatation peroxidazei (scindării H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Organismul uman, pentru funcționarea lui normală mai necesită: nichel — urează; crom — pentru asimilarea glucozei de către țesuturi; plumb — pentru procesul de calcifiere a scheletului; cobalt — intră în componența vit. B<sub>12</sub>; molibden — în structura xantin oxidazei.

**Metaloproteinazele** reprezintă o grupă importantă de enzime care comportă o activitate majoră în celulele tumorale, activitate ce corelează cu procesul invaziv și metastazic. Toate au structură asemănătoare, dar diferă după tipul de proteină ce scindează. Exemplu: scindarea colagenului (IV) din membrana bazală.

Metaloproteinazele se sintetizează în forma neactivă determinată de o secvență foarte conservatoare de 9 aminoacizi. La acest capăt se află cisteina foarte reactivă, care leagă metalul în centrul activ al enzimei și “blochează scindarea”, adică capacitatea de a scinda proteinele - țintă.

*Ce inițiază scindarea acestui peptid, transformând MP în forma activă?*

S-a stabilit că forma activă a metaloproteazelor nu acționează în prezența inhibitorului tisular al proteazei (TIMP) — o familie de proteine ce reglează creșterea țesutului. Celula tumorilor la fel le sintetizează, activitatea fermentativă fiind determinată de echilibrul acțiunii pozitive și negative a proteinelor reglatoare. TIMP sunt supresori ai metastazei, depistându-se deja gena absentă sau inactivă din tumorile maligne. Proteina — produsul ei — lipsește în celulele cancerigene.

Celulele ce nu metastazează, conțin cantități mari de proteină nm 23 ( nonmetastazic), corelând cu trecerea celulelor de la stare normală la tumoare, cu capacitate de invaziune. Determinarea proteinei joacă un rol important în diagnosticul, pronosticul și tratamentul bolnavului (cancer mamar).

*Cum inhibă proteina procesul metastazic al celulelor?*

Proteina activă nm 23 favorizează adăugarea grupelor fosfat la moleculele proteice, modificând transferul semnalelor ce influențează creșterea celulelor.

Pe parcursul a milioane de ani de evoluție proteina dată nu s-a modificat, și practic rămâne intactă atât la om, cât și la *awd*. La ultima e absolut necesară pentru dezvoltarea normală a organelor ce se diferențiază din epiderma embrionului - creierul, ochii, aripile, picioarele, organele genitale. Se poate presupune, după analogie, că și la om proteina joacă un rol determinant în organizarea și comunicarea intercelulară. Reglarea aberantă a nm 23 conduce, în consecință, la o stare celulară nestabilă, ce stimulează comportări autonome ale celulelor cancerigene și metastazarea lor.

Modificările comunicației intercelulare, prin intermediul preparatelor sintetice, precum și modificările fluxului de ioni de calciu în celule pot bloca metastazele celulelor cancerigene.