Энзимология

номенклатура и классификация ферментов
Медицинская энзимология (ферменты -3)

Локализация ферментов в клетке (компартментализация)

```
Клет. мемб. — Na/K AT\Phi-аза, AU, транспортеры
Цитозоль – ферм гликолиза, б/с ЖК
Ядро – ферм метаболизма ДНК, РНК
Mx - ЦТК, β-окисл ЖК
Лизосомы - разл. гидролазы Б,Ж,У
Рибосомы - б/с Б
Аппарат Гольджи — ферм глизилирования
```

Маркерные и органоспецифические ферменты

- Маркерные ферменты являются маркерами отдельных органелл
- Органоспецифические ферменты высокая активность которых имеется в отдельных органах (КФК – мышечная тк)
- Оба вида ферментов используются в энзимодиагностике

Выделение ферментов

Все работы по выделению и очистке ферментов ведутся при t 0° C

Этапы выделения:

- Гомогенизация ткани или органа
- Дифференц. центрифугирование гомогената и выделение нужной фракции органелл
- Очистка фермента

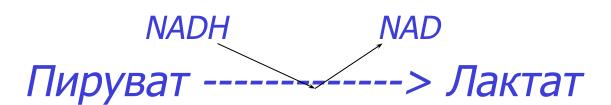
Очистка ферментов

Широко используются следующие методы очистки:

- Высаливание осаждение различными концентрациями солей щелочных металлов (Na2SO4,)
- Высаливание с органическими растворителями (ацетоном, этанолом),
- Дифференциальная денатурация при нагревании или изменении pH,
- **Дифференциальным центрифугирование** разделение ферментов по массе,
- Гель-фильтрация разделение белков по размерам
- Электрофорез разделение белков по массе и заряду.
- Избирательная адсорбция и элюция с ионобменников (ДЭАЭ или КМ целлюлозы и др.) применяется для их быстрой очистки
- Поскольку все эти методы мало избирательными (если они не сочетаются) для выделения индивидуального фермента из сложной смеси, применяют:
- Метод аффинной хроматографии

качественное обнаружение и количественное определение

□ Количественное определение - количественное измерение ΔS или ΔP (или $\Delta NADH$ для дегидрогеназ) количественные цветные реакции, спектры поглощения NADH при λ = 340 нM)



ጥ

Единицы измерения активности ферментов

- Внесистемная единица активности "U" (unit-единица) и определяется как 1 мкмоль субстрата/мин.
- **В системе СИ** в качестве единицы ферментативной активности используют "катал" (kat). Катал определяется как 1 моль/сек.

1kat = 1 моль/сек.

Размерность её слишком велика, пользуются нанокатала (нкат). Это одна миллиардная катала или 10^{-9} кат. 1 U = 16,67 нкат

- Удельная активность активность в пересчете на объем биол.
 жидкости, грамм ткани или мг белка
- **Молекулярная активность (число оборотов)** показывает, сколько молекул субстрата в секунду превращаются в продукт 1 молекулой фермента и используется для сравнительной характеристики активности нескольких ферментов (*карбангидраза Э 36 000 000 в мин*).

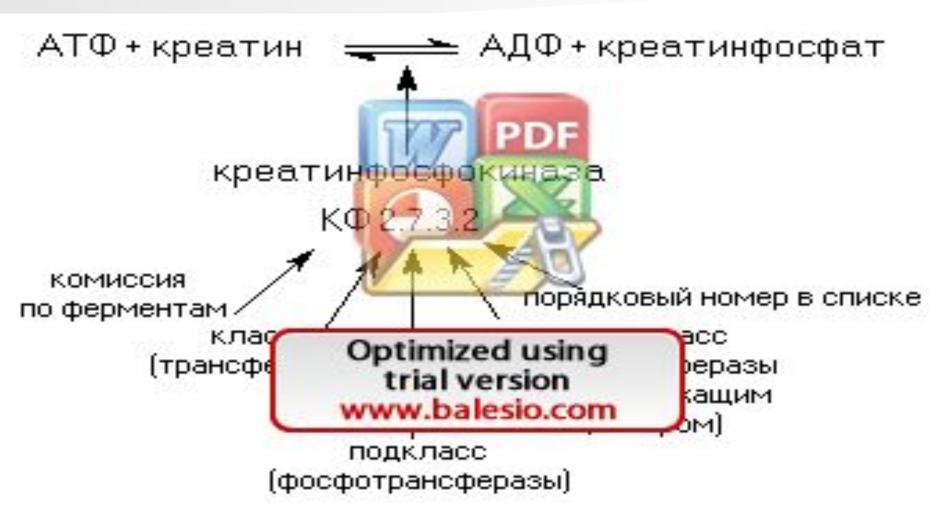
Классификация ферментов

- **Тривиальная** исторически сложившаяся (пепсин, трипсин и т.д.)
- Рациональная название фермента образуется:
 корень субстрата + суффикс аза

амилаза (amyl um) + **аза**

 Международная в основу положен тип катализируемой реакции (6 типов, поэтому 6 классов)

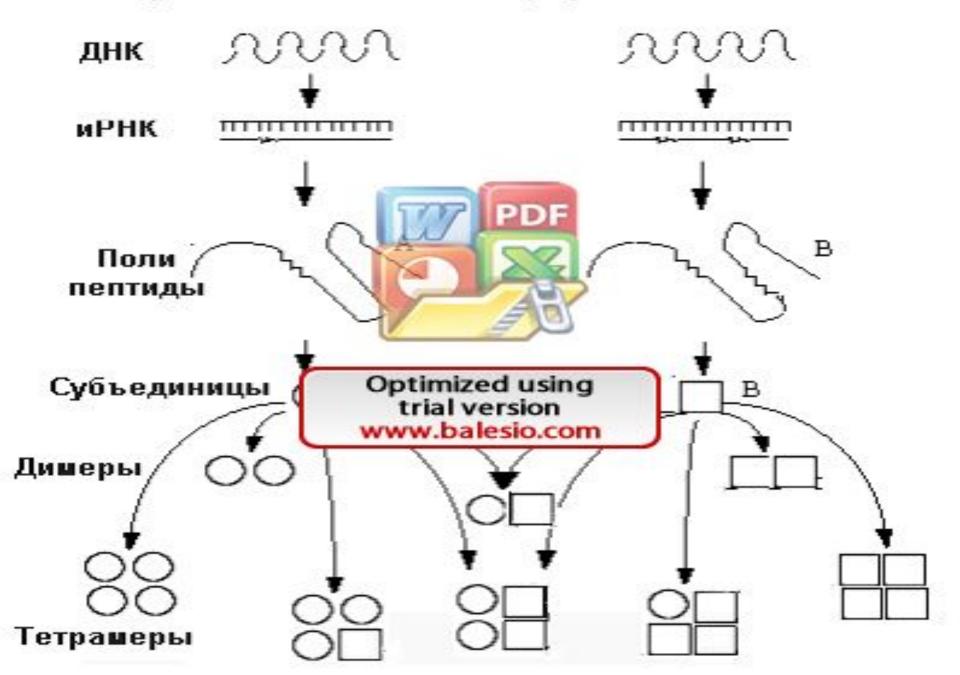
Номенклатура (шифр) КФК



Изоферменты

- Изоферменты группа родственных Е, катализир. одну и ту же реакцию, но отличных по физ-хим свойствам:
 - четвертичной структурой
 - эарядом (ЭФ подвижностью)
 - чувствительность к t°, pH, ингибиторам
 - скоростью, направлением реакции и др
- Известно более 100 изоферментов, имея различную тканевую локализацию, они используются в энзимодиагностике

Происхождение изоферментов



Роль изоферментов

- Для каждой ткани характерен свой набор изоферментов, обеспечивающий специфику, гибкость, регулируемость и адаптивность ее метаболизма в условиях внешних и внутренних воздействий
- В зависимости от возраста, пола, физического состояния и др. в организме устанавливается то или иное соотношение изоферментов, определяющее уровень его метаболической активности
- При патологии (опухоли, травмы, воспаление и др.)
 в тканях наблюдается «изоферментный сдвиг»

Метаболизм ферментов

- Сходен с таковым для белков
- При гибели клеток Е попадают в кровь,
 → инактивация → клетки РЭС
 (протеолиз) → турновер АК
- Малая часть Е экскретируются с мочой, желчью и калом

Полиферментные комплексы и метаболоны

Полиферментные комплексы -

структурно-функциональные блоки, катализирующие ключевые стадии метаболизма (Пируват ДГ)

Пируват -----> Ацетил КоА

комплекс (E. coli) состоит из 60 полипетидов ($MB = 5,3 \cdot 10^6$)

Метаболон – объединение нескольких ферментов и полиферментных комплексов метаболического пути (ЦТК, гликолиз и др.), повышающих скорость и эффективность метаболизма

Изменение активности ферментов в онтогенезе

В процессе онтогенеза разворачивается генетическая программа, которая сопровождается изменением активности многих ферментов (внутриутробный период – активность ферментов ГНГ, аэробного обмена, гидролаз ЖКТ тіп, после рождения их активность резко возрастает)

Основные направления медицинской энзимологии

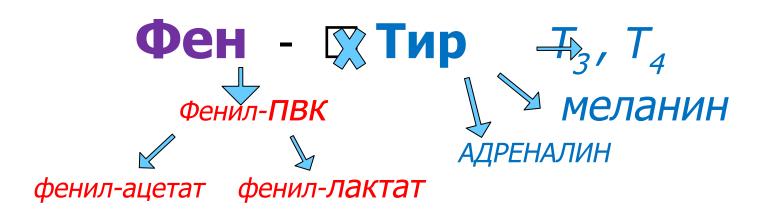
- Энзимопатии патологические состояния, обусловленные нарушением активности ферментов
- Энзимодиагностика диагностика заболеваний путем определения активности ферментов в тканях, биол. жидкостях и др. объектах
- Энзимотерапия применение ферментов в качестве лекарств
- Применение ферментов в лабораторной практике

Энзимопатии

- Первичные или наследственные связаны с нарушением экспрессии генетической информации, процессинга или фолдинга ферментов. Возможно также нарушение соотношения естественных активаторов и ингибиторов ферментов.
- Вторичные или приобретенные м.б.
 - *алиментарными* (дефицит микронутриентов витаминов, микроэлементов, ненасыщенных ЖК)
 - токсические отравления, интоксикации

Механизм развития метаболических нарушений при энзимопатиях

При блоке фермента метаболической цепи, [Р] дает, а [S] возрастает, что ведет к активации альтернативных минорных метаболических путей и образованию необычных метаболитов, конкурентно ингибирующих естественные метаболические пути.



Энзимодиагностика

- Диагностика заболеваний путем определения в биол.
 жидкостях и тканях активности ферментов, которые делятся на:
- 1. Клеточные
- 2. Секреторные (гемостаз, ЛП-липаза, ...)
- 3. Экскреторные (ферм. ЖКТ)

Типы активности ферментов в крови:

- 1. Гиперферментемия
- 2. Гипоферментемия
- 3. Дисферментемия обычно при вялотекущих хрон. процессах – алкогольный цирроз печени

Задачи энзимодиагностики

- 1. Ранняя Ds-ka (*активность АЛТ и АСТ при гепатите* возрастает гораздо раньше, чем появляется желтуха)
- 2. Дифференциальная Ds-ka (*стенокардия и ИМ*)
- 3. Оценка динамики заболевания
- 4. Оценка эффективности лечения
- 5. Оценка эффективности выздоровления
- 6. Оценка прогноза заболевания

Механизмы ферментемий и ферментурий



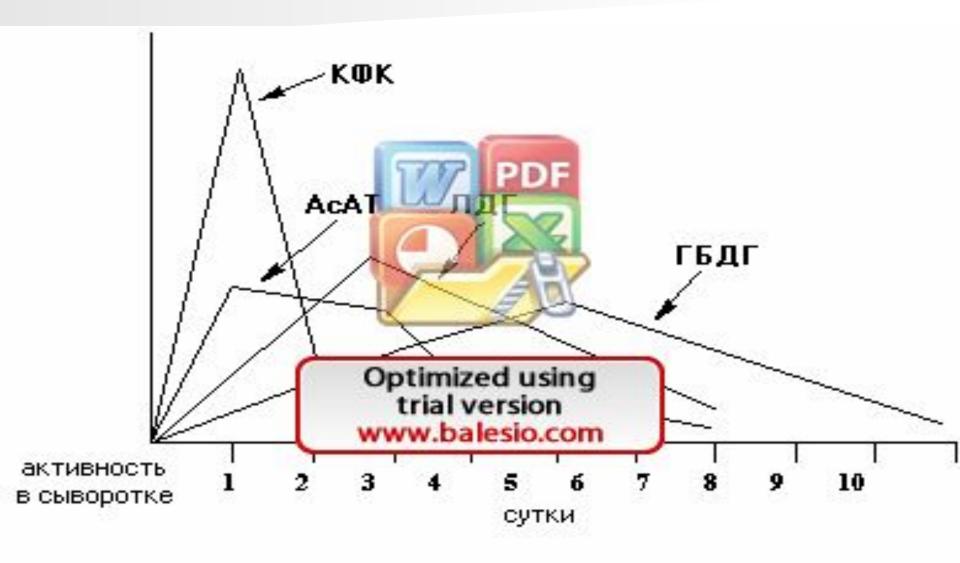
Ферменты энзимодиагностики заболеваний

- Амилаза Слюнные железы, поджелудочная железа, яичники Заболевания поджелудочной железы
- Кислая фосфатаза Простата, эритроциты Рак простаты
- Щелочная фосфатаза Печень, кость, слизистая оболочка кишечника, плацента, почки Болезни костной ткани, болезни печени
- АЛТ Печень, скелетная мышца, сердце Гепатиты
- **ACT** Печень, скелетная мышца, сердце, почки, эритроциты *Инфаркт миокарда, Гепатиты, болезни мышц*
- Холинэстераза Печень Отравление фосфорорганическими инсектицидами, болезни печени

Ферменты энзимодиагностики заболеваний (прод)

- КФК Скелетная и гладкая мышцы, мозг, сердце, Инфаркт миокарда, болезни мышц
- ГГТП Печень, почки *Гепатобилиарные болезни, алкоголизм*
- **ЛДГ** Сердце, печень, скелетная мышца, эритроциты, тромбоциты, лимфоузлы *Инфаркт миокарда, гемолиз, Гепатиты*
- **5 ' нуклеозидаза**. Гепатобилиарный тракт Гепатобилиарные болезни
- **Трипсин (оген)** Панкреас Заболевания поджелудочной железы

Изменение активности ферментов в крови при ИМ



Энзимотерапия

Применение ферментов с лечебной целью:

- Заместительная терапия болезней ЖКТ (фестал, мезим и т. д.)
- В комплексной терапии в виде, орошений, промываний для санации гнойных ран, полостей (протеазы, нуклеазы и др. гидролазы)
- Для тромболизиса (стрептолиаза, стрептодеказа, урокиназа)
- Для лечения лейкозов (аспарагиназа)
- Для рассасывания контрактур и рубцов после ожогов и операций (гиалуронидаза - лидаза)
- Для лечения вирусных конъюнктивитов и кератитов (РНКаза и ДНК-аза)

Иммобилизованные ферменты и липосомы

- В биотехнологии для повышения эффективности действия ферментов их иммобилизуют на твердой поверхности или путем внутримолекулярных сшивок
- Для «адресной» доставки лекарства к пораженному органу используют:
- 1. липосомы загруженные лекарством на их поверхности расположены АТ, специфически «атакующие» определенные клетки и ткани
- 2. Вирусные векторы (невирулентные формы вирусов), специфически тропные к отдельным клеткам и тканям

Применение ферментов в лабораторной практике

- Высокая специфичность ферментов позволяет использовать их как хим. реагенты (точное определение в тканях и биол. жидкостях конц. глюкозы, лактата, мочевины и др метаболитов).
- Для этого создают сопряженные реакции из нескольких ферментов

глюкоза --> Г6ф ----> 6 Ф глюконат

1. гексокиназа, 2. NADP- зависимая Г6ф ДГ Измеряя количество образованного NADPH можно судит о конц. глюкозы.

Применение ферментов в производстве быту и

- Биотехнология производства лекарств,
 препаратов высокой степени чистоты
- Пищевые технологии в хлебопечении, пивоварении, производства табака и т.д.
- Кожевенном производстве
- Стиральные порошки