

ЭНЗИМОЛОГИЯ

*номенклатура и классификация
ферментов*

*Медицинская энзимология
(ферменты -3)*

Локализация ферментов в клетке (компартментализация)

Клет. мемб. – *Na/K АТФ-аза, АЦ, транспортеры*

Цитозоль – *ферм гликолиза, б/с ЖК*

Ядро – *ферм метаболизма ДНК, РНК*

Мх - *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 $t 0^{\circ} C$

Этапы выделения:

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

Очистка ферментов

Широко используются следующие методы очистки:

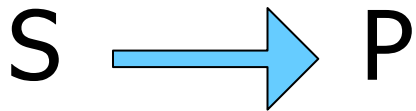
- **Высаливание** - осаждение различными концентрациями солей щелочных металлов (Na_2SO_4 ,)
- **Высаливание** с органическими растворителями (ацетоном, этанолом),
- **Дифференциальная денатурация** при нагревании или изменении pH,
- **Дифференциальным центрифугирование** –разделение ферментов по массе,
- **Гель-фильтрация** - разделение белков по размерам
- **Электрофорез** - разделение белков по массе и заряду.
- **Избирательная адсорбция и элюция** с ионообменников (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

E

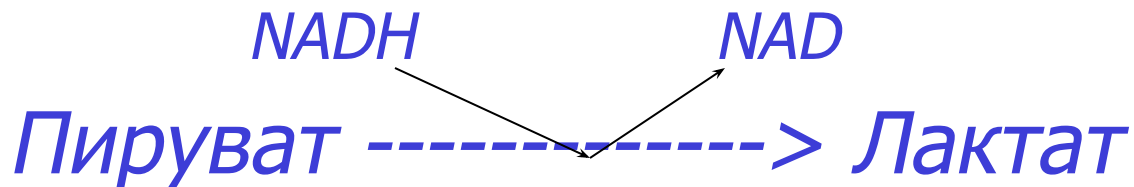


□ Качественное обнаружение

Цветные реакции на S или P

(крахмал ----> глюкоза)

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



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.

$$1\text{kat} = 1 \text{ моль/сек.}$$

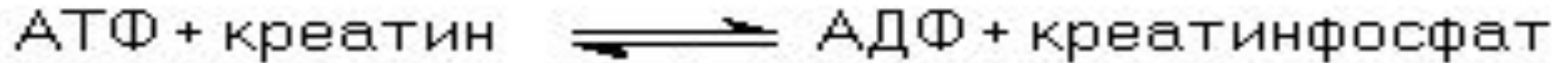
Размерность её слишком велика, пользуются нанокатала (нкат). Это одна миллиардная катала или 10^{-9} кат. **1 U = 16,67 нкат**

- **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



креатинфосфокиназа

КФ 2.7.3.2

КОМИССИЯ
по ферментам

класс
(трансфер

порядковый номер в списке

Optimized using
trial version
www.balesio.com

класс
феразы
кащим
ом]

подкласс
(фосфотрансферазы)

Изоферменты

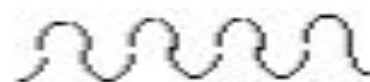
- Изоферменты – группа родственных **E**, катализир. одну и ту же реакцию, но отличных по физ-хим свойствам:
 - *четвертичной структурой*
 - *зарядом (ЭФ подвижностью)*
 - *чувствительностью к t° , pH, ингибиторам*
 - *скоростью, направлением реакции и др*
- Известно более 100 изоферментов, имея различную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

Происхождение изоферментов

ДНК



иРНК



Полипептиды



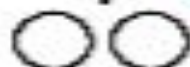
B

Субъединицы

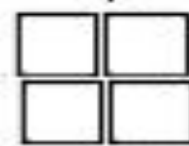
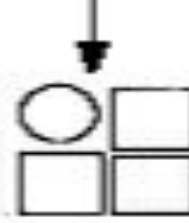
Optimized using trial version
www.balesio.com

B

Димеры



Тетрамеры



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 **E** попадают в кровь,
→ инактивация → клетки РЭС
(протеолиз) → турновер АК
- Малая часть **E** 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 полипептидов (Мв = $5,3 \cdot 10^6$)

■ **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 min, после рождения их активность резко возрастает*)

Основные направления медицинской ЭНЗИМОЛОГИИ

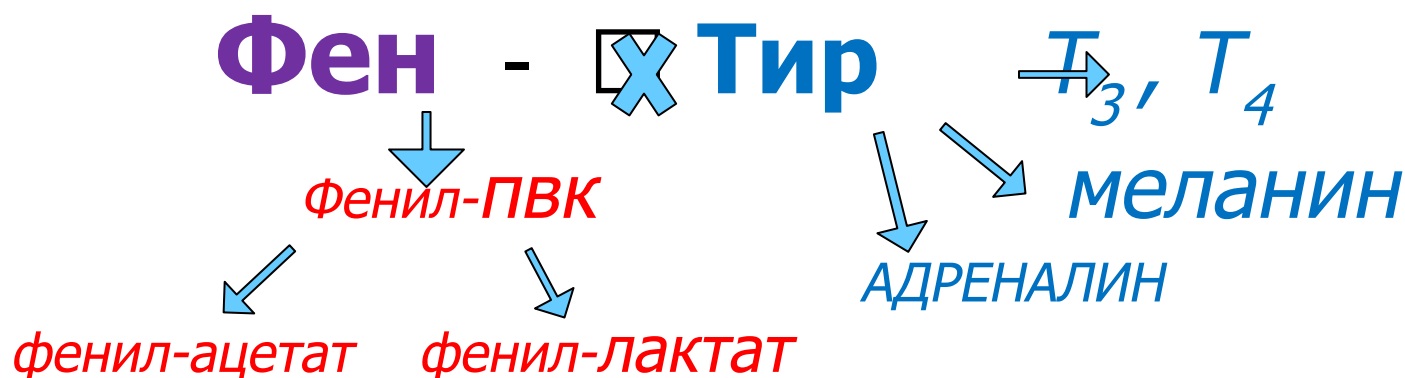
- *Энзимопатии – патологические состояния, обусловленные нарушением активности ферментов*
- *Энзимодиагностика – диагностика заболеваний путем определения активности ферментов в тканях, биол. жидкостях и др. объектах*
- *Энзимотерапия – применение ферментов в качестве лекарств*
- *Применение ферментов 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, [P] дает, а [S] возрастает, что ведет к активации альтернативных минорных метаболических путей и образованию необычных метаболитов, конкурентно ингибирующих естественные метаболические пути.



Энзимодиагностика

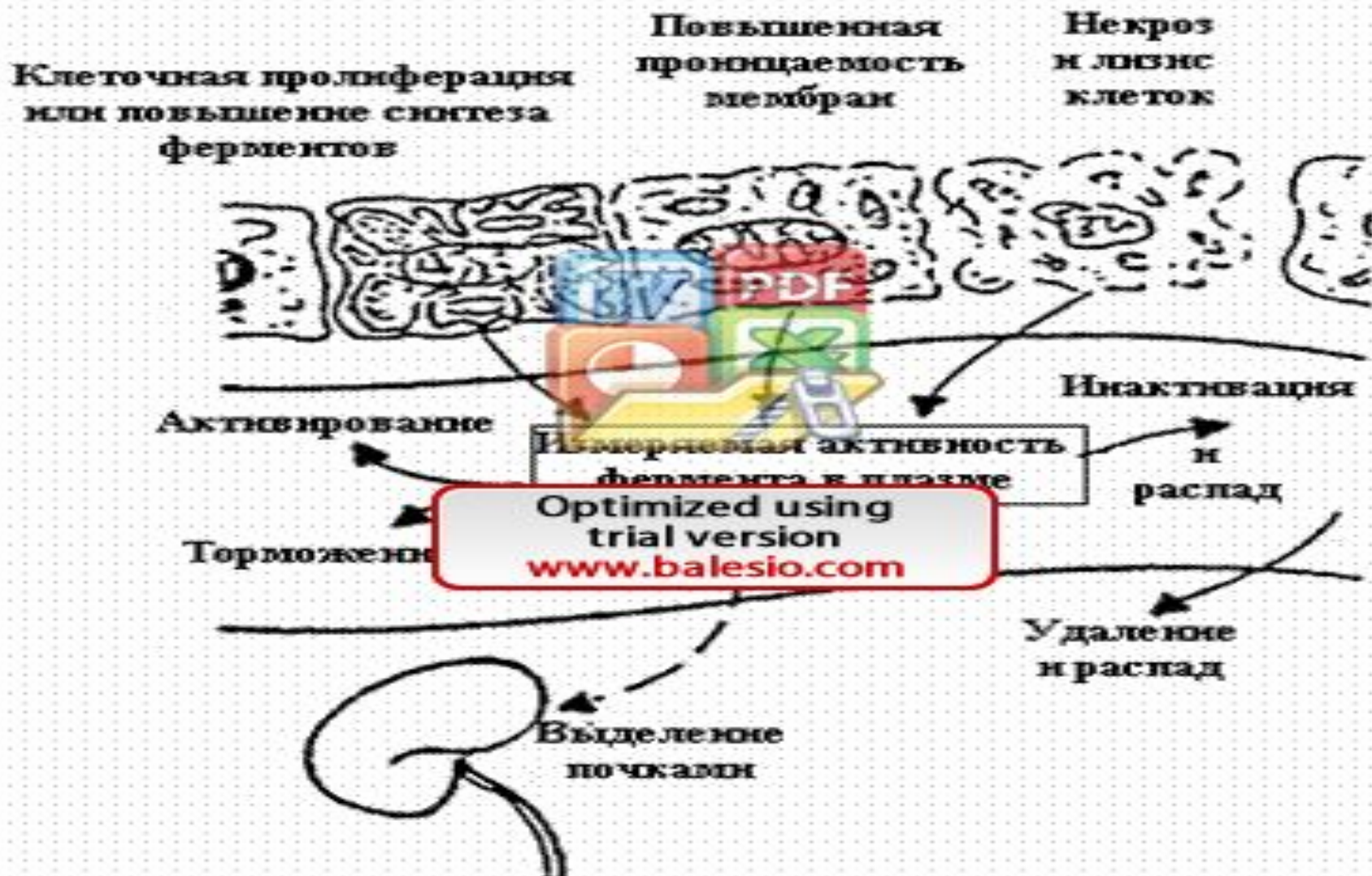
- Диагностика заболеваний путем определения в биол. жидкостях и тканях активности ферментов, которые делятся на:
 1. *Клеточные*
 2. *Секреторные (гемостаз, ЛП-липаза, ...)*
 3. *Экскреторные (ферм. ЖКТ)*

- **Типы активности ферментов в крови:**
 1. *Гиперферментемия*
 2. *Гипоферментемия*
 3. *Дисферментемия обычно при вялотекущих хрон. процессах – алкогольный цирроз печени*

Задачи энзимодиагностики

1. Ранняя Ds-ка (*активность АЛТ и АСТ при гепатите возрастает гораздо раньше, чем появляется желтуха*)
2. Дифференциальная Ds-ка (*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

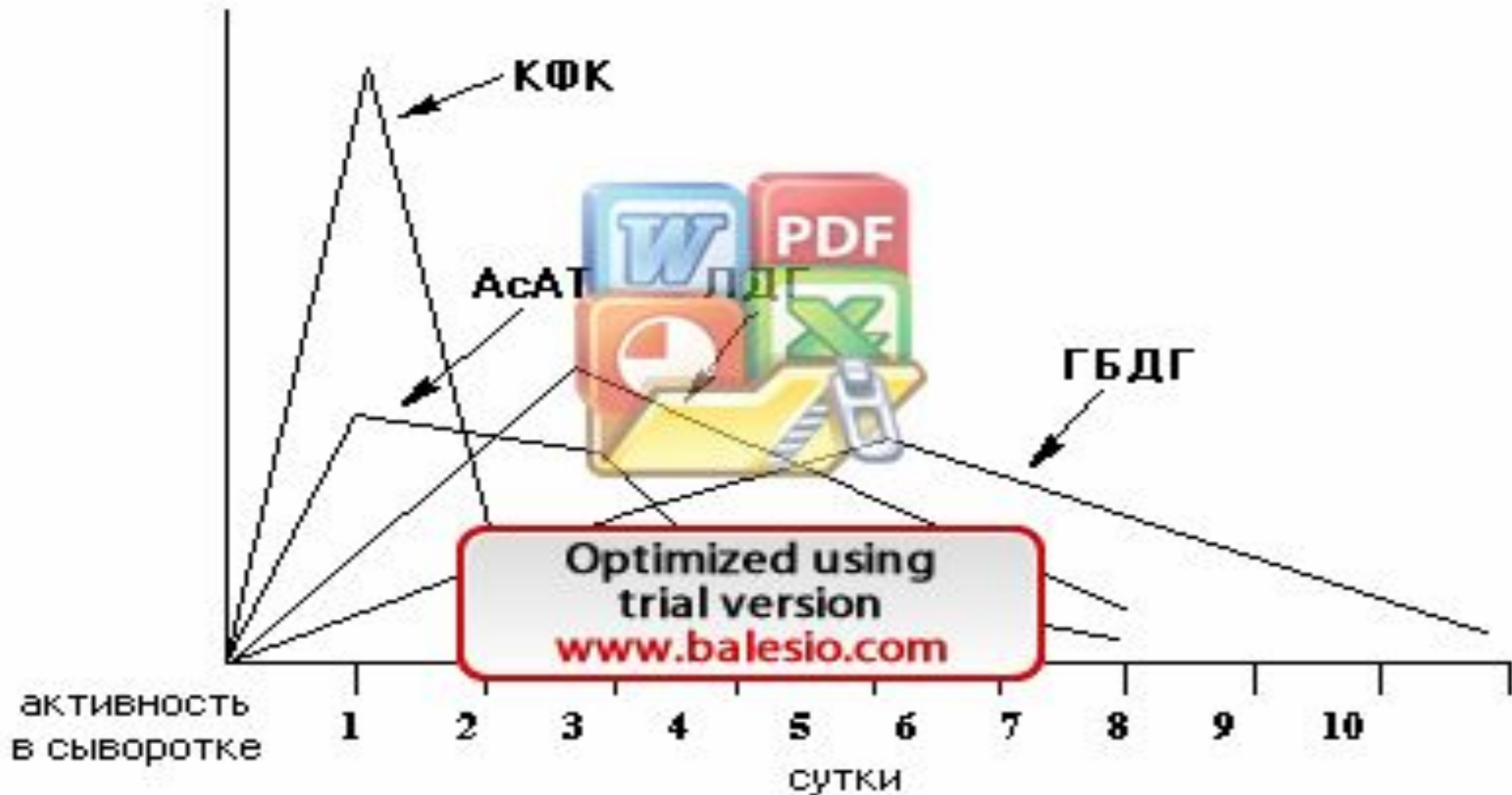
- **Амилаза** Слюнные железы, поджелудочная железа, яичники *Заболевания поджелудочной железы*
- **Кислая фосфатаза** Простата, эритроциты *Рак простаты*
- **Щелочная фосфатаза** Печень, кость, слизистая оболочка кишечника, плацента, почки *Болезни костной ткани, болезни печени*
- **АЛТ** Печень, скелетная мышца, сердце *Гепатиты*
- **АСТ** 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:

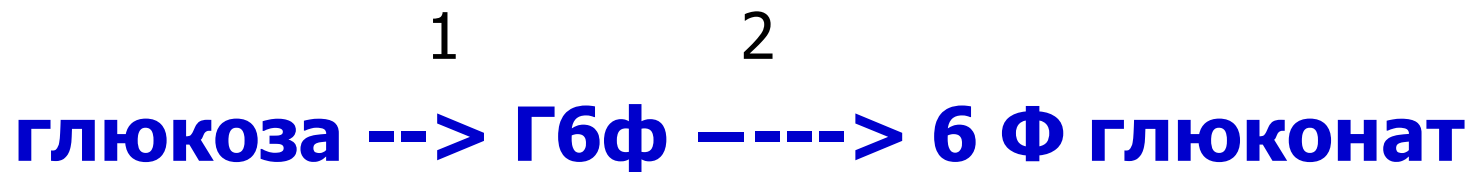
- Заместительная терапия болезней ЖКТ (фестал, мезим и т. д.)
- В комплексной терапии в виде, орошений, промываний для санации гнойных ран, полостей (протеазы, нуклеазы и др. гидролазы)
- Для тромболизиса (стрептолиаза, стрептодеказа, урокиназа)
- Для лечения лейкозов (аспарагиназа)
- Для рассасывания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



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