

Локализация ферментов в клетке

Клеточные компартменты имеют различную локализацию ферментов.

Плазмалемма-Na/K -АТФ-аза, транспортные белки-пермеазы

Цитоплазма-ферменты гликолиза, синтеза ЖК, ПФП

Митохондрии-ферменты ЦТК, бета-окисления ЖК, ферменты начальных этапов ЦСМ

Лизосомы-гидролитические ферменты

Ядро-ферменты обмена НК

Гладкий ЭПР-ферменты обмена ксенобиотиков

Шероховатый ЭПР-ферменты биосинтеза белков

Органоспецифические ферменты

- АЛТ-печень,
- АСТ, КФК, ЛДГ-1, и ЛДГ-2 характерны для миокарда
- КФК- мышечная ткань
- ЩФ-костная ткань и желчные протоки
- Кислая фосфатаза- простата

Маркерные ферменты

- Являются маркерами определенной органеллы.
- СДГ-внутренняя мембрана МХ.
- Na/K-АТФ-аза плазмалеммы
- ГДГ- митохондриальный матрикс
- МАО- наружная сторона внутренней мембрана МХ

Единицы активности фермента

- ME- количество фермента, который катализирует превращение 1 мкМ S
- (или образование 1 мкМ продукта) за 1 мин.
- Международная единица-катал. Это количество фермента(F), который катализирует превращение 1 M S (или образование 1 M продукта) за 1 сек.
- Ввиду ее большой величины, существуют нано и микрокатылы.
- Удельная активность-число единиц ферментативной активности на мг белка или число Кат/кг белка-фермента.

- Число оборотов фермента или молярная активность- количество молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в единицу времени. Диапазон молярной активности для различных ферментов огромен (за 1 мин).
- Карбангидраза- 36 000 000
- Фосфоглюкомутаза- 1 240

Медицинская энзимология

- МЭ имеет основные направления- энзимопатология, энзимодиагностика, энзимотерапия, применение ферментов в лабораторной диагностике.
- Энзимопатии- заболевания причиной которых является нарушение функций ферментов.
- Любое заболевание можно рассматривать как нарушение сложной, согласованной и последовательной во времени и пространстве работой ферментов.

Классификация по А.А. Покровскому.

- 1. Наследственные энзимопатии:
 - а. связанные с полным выпадением синтеза фермента
 - б. связанные с конституциональной слабостью отдельных звеньев метаболизма
- 2. Токсические энзимопатии:
 - а. связанные с избирательным подавлением биосинтеза отдельных ферментов.
 - б. Связанные со неспецифическим подавлением биосинтезом отдельных ферментов

- 3. Пищевые(алиментарные) энзимопатии, вызванные:
 - -. дефицитом витаминов
 - -. дефицитом белков
 - -. дефицит микроэлементов
 - несбалансированным питанием
- 4. Энзимопатии, вызванные нарушением нейрогуморальной регуляции
- 5. Энзимопатии, связанные с нарушением внутриклеточной организации
- 6. Большая группа патологических процессов

Поздняя классификация

- 1. Первичные или наследственные Э, в
- патогенезе которых основную роль
- играет отсутствие, недостаток или
- аномальная структура какого-либо
- фермента. Это молекулярные
- болезни, связанные с аномалией
- фермента.
-

Вторичные энзимопатии-

- Энзимопатии заболевания при которых, ферментативные нарушения развиваются вторично, в ходе патологического процесса- это приобретенные Э.
- Причинами Э являются: 1. А. Отсутствие, недостаток или аномальная структура Фермента;
- - Отсутствие, недостаток или аномальная структура аномальная структура Апофермента
- Отсутствие, недостаток или патологическая структура соответствующих матриц ДНК и РНК
- - нарушение энергообеспечения, биосинтеза
- апофермента(дефицит АТФ, ГТФ и т.д.)
- -регуляторное нарушение биосинтеза апоферментов(
- усиленное образование репрессоров или снижение синтеза
- индукторов).
- -недостаток аминокислот- голодание, распад тканей
- - тяжелые повреждения клеток (интоксикация, травмы, инфекции).

- Б.Отсутствие или недостаток
- коферментов:
- - недостаточное поступление
- витаминов, микроэлементов, или
- незаменимых ЖК;
- нарушение всасывания витаминов в ЖКТ
- нарушение процесса активации витаминов в
- тканях
- другие причины гиповитаминозов
- -клеточная деструкция различного
- происхождения

- -

- 2. Усиленное расщепление или выведение ферментов
- 3. Отсутствие активаторов ферментов
- 4. Нарушение температурного и рН оптимумов, оптимальной концентрации субстратов и др.
- Патогенез энзимопатий связан с развитием метаболических блоков, вызванных недостаточной активностью фермента. В результате содержание S в тканях и биолог. жидкостях возрастает, а концентрация продукта снижается, лимиттируя дальнейшее превращение продукта этой реакции.

- Механизм развития вторичных метаболических блоков, связан с увеличением концентрации субстрата дефектного фермента, активацией минорных(альтернативных) путей метаболизма, приводящих к образованию нефизиологических метаболитов, которые блокируют по конкурентному механизму, естественные метаболические пути

Степень выраженности энзимопатий

- Бессимптомное течение-доброкачественная фруктозурия, пентозурия, почечная глюкозурия, некоторые аминокацидурии
- Относительно бессимптомное течение проявляется при действии провоцирующих факторов(при действии миорелаксантов- скрытый дефицит холинэстеразы, гемолитические анемии при употреблении лекарств, пищевых продуктов).
- Клинически выраженные- основная масса энзимопатий

Цель и задачи ЭНЗИМОДИАГНОСТИКИ

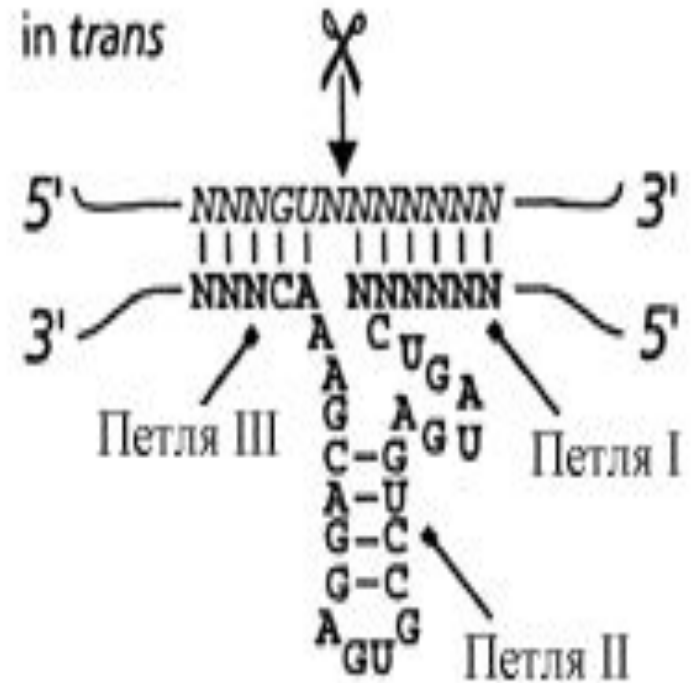
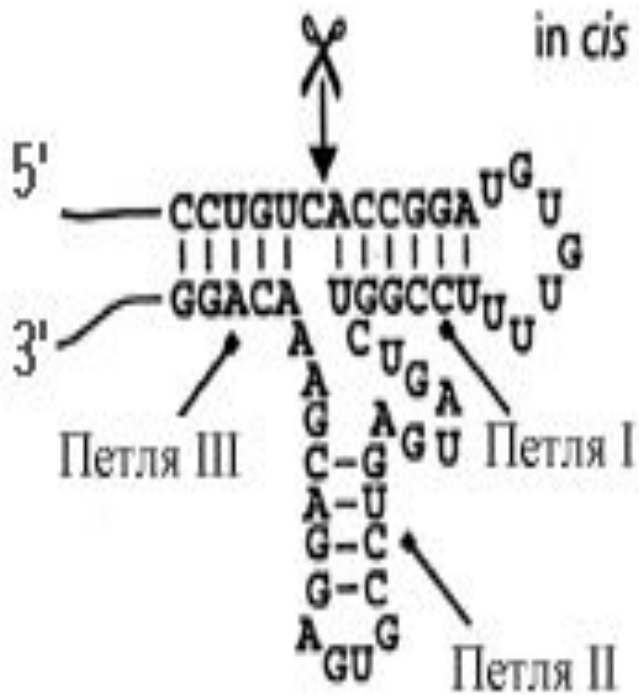
1. Ранняя диагностика
2. Дифференциальная диагностика
3. Оценка динамики течения
 - заболевания
4. Определение эффективности лечения
5. Определение степени выздоровления
6. Определение прогноза заболевания

Объектами энзимодиагностики являются- плазма(сыворотка) крови, моча, ликвор, слюна, биопсийный материал и т.д.

Ферменты как лекарственные препараты

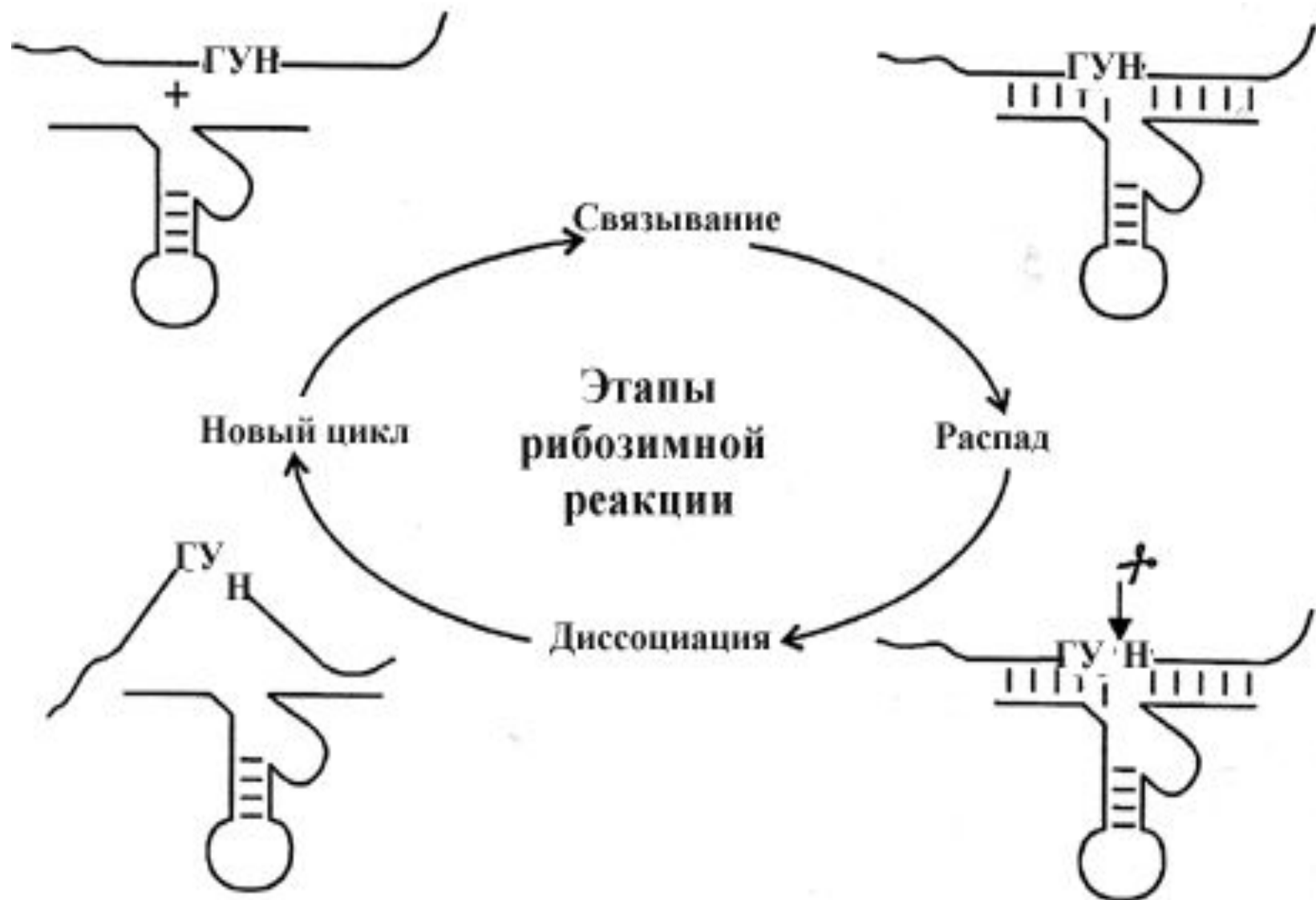
- Ферменты все больше завоевывают признание как лекарственные препараты в лечении многих заболеваний. Их используют, прежде всего, при нарушении синтеза ферментов в организме (заместительная терапия), для растворения сгустков крови при тромбозах, при лечении воспалительных процессов и т.д. Не меньшей популярностью пользуются и ингибиторы ферментов, например, при лечении панкреатитов используют ингибиторы протеолитических ферментов.
- Большой интерес представляет использование в лечебной практике иммобилизованных ферментов (от лат *immobilis*- неподвижный). Фермент ковалентно "пришивают" к нерастворимому в воде носителю. Такие ферменты можно использовать в лабораторной практике как реагенты для анализа. При этом в отличие от растворимых форм такие ферменты можно многократно использовать. В промышленности такие ферменты вводятся в технологические процессы получения многих соединений. Такие формы ферментов удобны в лечении поражений кожи (марлевые повязки с иммобилизованными ферментами при лечении ожогов, кожных болезней).

Рибозимы- антисмысловые молекулы РНК



- Они функционируют, связываясь с РНК субстратом по принципу комплементарности и катализируют расщепление фосфодиэфирной связи в специфическом участке субстрата.
- Пять классов рибозимов были описаны на основании их уникальных характеристик последовательностей нуклеотидов и их пространственной структуры. Они могут катализировать саморасщепление (внутримолекулярный или "in cis" катализ) и распад внешних субстратов (межмолекулярный или "in trans" катализ).
- Основное исследование проведено Томасом Сечом (Thomas Cech) в 1980-ых, который показал, что РНК может участвовать во внутримолекулярном катализе автономного сплайсинга, действуя как белковый фермент. Признание ферментативной функции некоторых молекул РНК расширило определение понятия биологического катализатора

- В структуре рибозима обозначены три петли, образованные по принципу комплементарности отдельных участков одной цепи и место разрыва связи. Автономный сплайсинг происходит, если последовательность G-U-C попадает между петлями I и III, а G и U становится участком узнавания для катализа. Показанный на рисунке рибозим обладает только способностью к аутосплайсингу. Однако большинство рибозимов способны проводить *in trans* катализ РНК. У них можно выделить каталитический домен (петля II на рис.2-20 справа) и распознающий участок, который представляет антисмысловую последовательность, способную специфически узнавать комплементарную последовательность на РНК субстрате и соединяться с этой последовательностью, образуя петли I и III. Рибозимы, обладающие таким механизмом действия, могут быть полезными в исследованиях в молекулярной биологии и технологии лекарственных форм



- По сравнению с обычными антисмысловыми РНК, рибозимы обладают способностью многократно взаимодействовать с РНК субстратами, образуя циклический процесс расщепления РНК. Другое важное отличительное свойство рибозимов - специфичность. Рибозим способен расщеплять уникальную последовательность нуклеотидов. (на рис 2-21 это последовательность Г-У-Н где Н – любой нуклеотид). Эти свойства рибозимов обеспечиваются распознающим участком (петли I и III). Важным в обеспечении функции рибозима является длина распознающего участка. Если это очень короткая последовательность, то скорость диссоциации субстрата от рибозима может превысить скорость расщепления связи, что может привести к низкой производительности рибозима. Однако, и стабильные гибриды проявляют низкую каталитическую активность из-за медленной диссоциации расщепленного субстрата. Таким образом, идеальной ситуацией может такая длина узнающей последовательности, которые обеспечивая расщепление тем не менее способствовала быстрой диссоциации расщепленных продуктов.

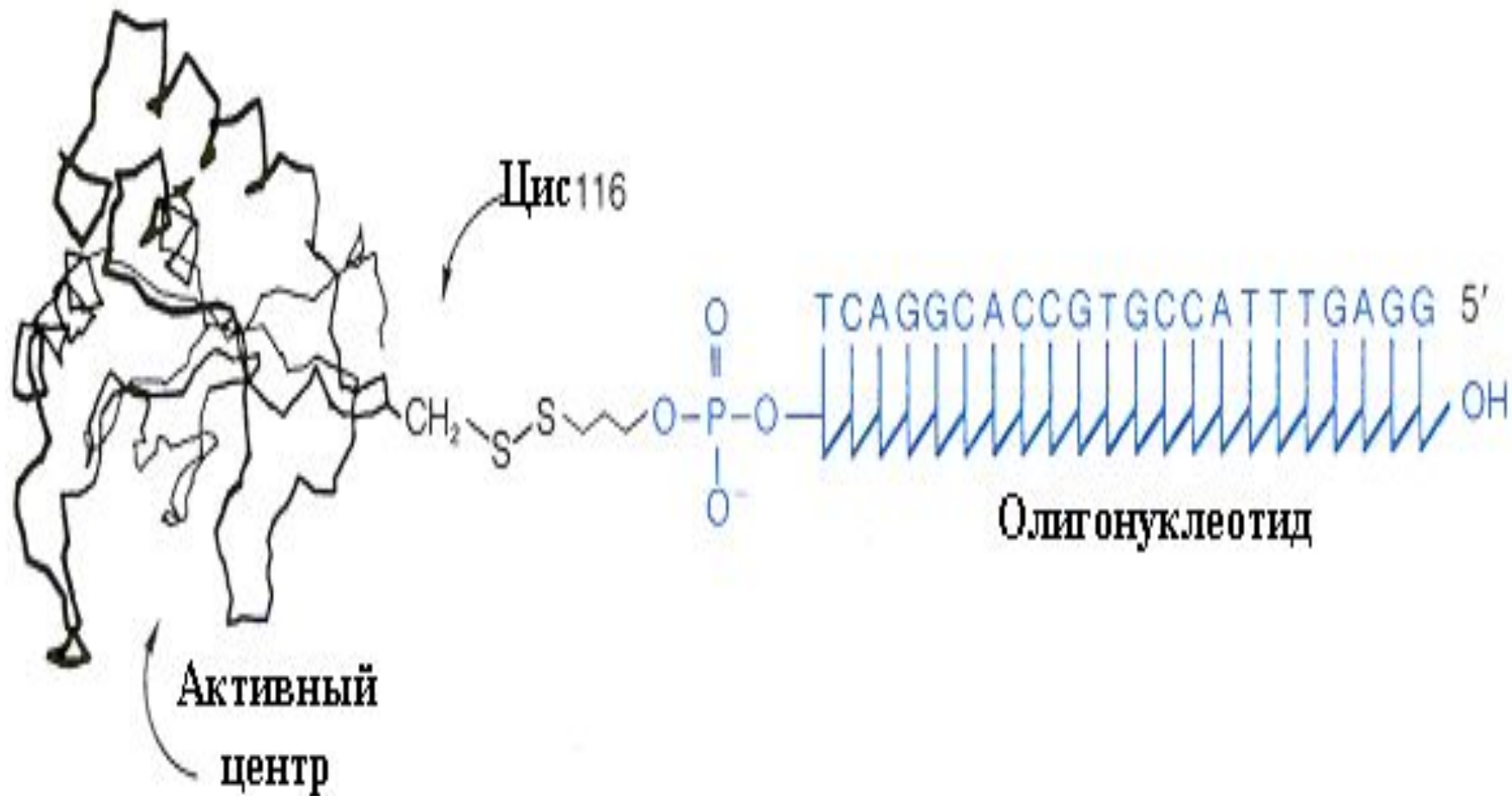
Молекулярная инженерия

- Это раздел молекулярной биологии, занимающийся конструированием молекул с заранее заданными структурными параметрами. В приложении к ферментам это означает получение ферментов с измененной структурой с целью исследования механизма действия фермента или обладающих новыми качественными характеристиками

-

Точечный направленный мутагенез - В этом случае целенаправленно изменяется последовательность нуклеотидов в структуре гена, кодирующего данный фермент и после экспрессии этого гена, проводится тщательное исследование кинетических характеристик полученного фермента. Заменяя аминокислоты в активном центре, можно получить информацию о механизме катализа.

Гибридный фермент



- К нуклеазе, выделенной у стафилококка, присоединен олигонуклеотид со специфической последовательностью нуклеотидов. Этот олигонуклеотид позволяет гибриднему ферменту связаться с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты -мишени и подействовать специфично в строго определенном месте. Нативный фермент не обладает такой специфичностью.
- **Каталитические антитела.** Эти молекулы являются антителами с очень специфическим центром связывания переходного состояния субстрата ферментативной реакции. Такие антитела получили название абзимы, В них сочетается высокая специфичность антител с возможностью ускорять химические реакции порой до 10^7 раз по сравнению с не катализируемой реакцией . Высокая стереоспецифичность ферментов (включая абзимы) может оказать огромную помощь в синтезе стереоспецифических соединений в органической химии.