

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ

Иммуноферментные электроды

К кислород-проницаемой тефлоновой пленке кислородного электрода Кларка плотно прилегает мембрана *не с иммобилизованным ферментом, а с иммобилизованными антителами* к анализируемому антигену.

В раствор, содержащий анализируемый антиген, добавляют определенное количество антигенов, предварительно меченных каталазой.



Иммуноферментный электрод погружают в исследуемый раствор и выдерживают при нужной температуре в течение необходимого времени.



Меченые и немеченые антигены, *конкурируя* между собой, связываются с антителами на поверхности электрода.

Удаляют свободные антигены, путем промывки
иммуноферментного электрода



Добавляют в исследуемый раствор пероксид
водорода



По сигналу электрода определяют скорость
образования кислорода в результате
катализируемой каталазой реакции :



Строят кривую зависимости сигнала от числа
немеченых антигенов.

Аналитические проточные реакторы с иммобилизованными ферментами

Для анализа метаболитов и ферментов в клинической и лабораторной практике достаточно широко используются аналитические проточные реакторы с иммобилизованными ферментами.

Пример: определение триптофана

В колонке иммобилизованы Е: *триптофаназа и лактатдегидрогеназа*

триптофан + пиридоксальфосфат →

индол + NH_3 + ПВК;

$\text{ПВК} + \text{НАДН}_2 \rightarrow \text{молочная кислота} + \text{НАД}$.

Детекция убыли НАДН на 360 нм

Ферментные микрокалориметрические датчики

Две идентичные колонки ,заполненных носителем с иммобилизованным на нем Е.

В нижней части каждой из колонок имеется термистор.

При пропускании через колонки простого буфера разность t° между термисторами будет равна нулю.

При введении в одну из колонок S в результате ферментативной реакции произойдет тепловыделение.

Разность t° между измерительной колонкой и колонкой сравнения будет пропорциональна количеству превращенного S.

Основные направления использования ферментов в медицине:

1) Энзимопатология

2) Энзимодиагностика

3) Энзимотерапия

Использование:

- 1. Заместительная терапия (ряда наследственных заболеваний и функциональной недостаточности пищеварительных желез).**
- 2. Тромболитическая терапия (парентеральное применение свободных и связанных форм ферментов для лизиса тромбов в кровеносных сосудах).**
- 3. Терапия воспалительных процессов.**
- 4. Лечение онкологических заболеваний.**
- 5. Терапия вирусных заболеваний.**

6. В качестве локальных литических средств
(для расщепления и удаления из организма
некротических масс и экссудатов).

7. Для улучшения биодоступности
лекарственных препаратов (ускорения процессов
их проникновения).

8. Специфическая модуляция активности
ферментов, участвующих в патогенезе
заболеваний, а также обеспечивающих
детоксикацию ксенобиотиков.

1. Заместительная терапия

**При недостаточности поджелудочной железы
применяют смесь различных ферментов –
пепсина, трипсина, химотрипсина, липазы и α -
амилазы.**

(надо кратко знать, как они действуют=)

2. Тромболитическая терапия

Стрептокиназа –активирует плазминогена (естественный предшественник протеиназы плазмина, предотвращающей образование тромба в кровеносной системе).

Многие осложнения, связанные с применением стрептокиназы, были сняты благодаря внедрению **иммобилизованной стрептокиназы**, т.к. она:

- 1) Более стабильна
- 2) Не искажает общую формулу крови,
- 3) Нетоксична
- 4) Более безопасная с точки зрения иммуногенности.

2. Тромболитическая терапия

Урокиназа - превращает плазминоген в плазмин.

Фибринолизин- гидролизует фибрин (основной белка, образующегося при свертывании крови).

3. Терапия воспалительных процессов

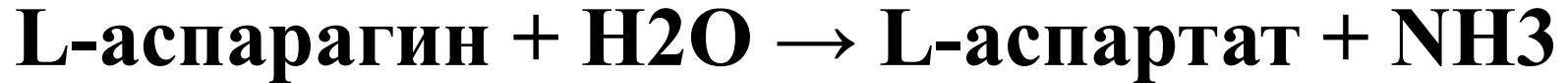
В отличие от живых клеток, мертвые клетки обычно не способны защищать себя от привнесённых извне протеаз.

Протеазы гидролизуют денатурированные белки в омертвевших тканях и не затрагивают нативные внутриклеточные белки из-за компактной третичной структуры.

При внутримышечном введении протеолитические ферменты оказывают противовоспалительное действие.

4. Лечение онкологических заболеваний

Аспарагиназа :



Для некоторых опухолей и лейкемических клеток аспарагин -незаменимая аминокислота.

Аспарагиназа, введенная в область опухолевых клеток, разрушает аспарагин и вызывает этим торможение их роста и последующую гибель.

На нормальные клетки аспарагиназа существенного влияния не оказывает, так как они способны синтезировать аспарагин.

5. Терапия вирусных заболеваний

Вирусные НК в период интенсивной репликации, транскрипции и трансляции по сравнению с нуклеопротеидными комплексами инфицированной клетки в меньшей степени защищены от действия нуклеаз.

Нуклеазы из поджелудочной железы крупного рогатого скота используют для лечения вирусных заболеваний.

Пример: Для лечения клещевого энцефалита применяют панкреатическую РНКазу.

Панкреатическая ДНКаза - при герпесных и аденовирусных инфекциях.

6. В качестве локальных литических средств

Протеолитические Е расщепляют некротизированную ткань и фибринозные образования, разжижают вязкие секреты, экссудаты (*жидкость, накапливающаяся при воспалениях в тканях и полостях тела*).

Трипсин (из поджелудочной железы крупного рогатого скота) облегчает удаление вязких секретов и экссудатов при воспалительных заболеваниях дыхательных путей (трахеитах, бронхитах, пневмонии и т. д.).

Применяется в виде аэрозоля для ингаляции или в иммобилизованном виде. Носители (волокнистые материалы на основе целлюлозы, поливинилового спирта, солей альгиновой кислоты).

7. Для улучшения биодоступности лекарственных препаратов

Гиалуронидаза (получают из семенников крупного рогатого скота):

гиалуроновая кислота → глюкозамин + глюкуроновая кислота

Увеличивается проницаемость тканей, т.к. гиалуроновая кислота является своеобразным цементирующим веществом соединительной ткани

Применяют для ускорения всасывания различных лекарственных веществ, вводимых под кожу и внутримышечно.

Недостатки применения ферментов:

1) высокая иммуногенность

2) невысокая стабильность

3) низкий терапевтический индекс

4) кратковременность действия

Недостатки можно устранить с помощью специфической модификации ферментов:

.нековалентная модификация

низкомолекулярные соли, ионы которых влияют на растворимость, стабильность и специфическую активность Е. Ca^{2+} стабилизируют и активируют α -амилазу.

Полиэлектролиты. Активность панкреатической РНКазы по отношению к вирусу стоматита в комплексе с сульфированными декстранами возрастала на несколько порядков.

Недостатки можно устранить с помощью специфической модификации ферментов:

2. Ковалентная модификация с полисахаридами или полиэтиленгликолем часто приводит к снижению иммуногенности препарата, из-за снижения количества антигенных детерминант модифицированного белка.

3. Вторичная модификация

Террилитин (протеолитический фермент), связанный через полимерную цепочку с антителами к фибрину, более специфичен при лизисе тромбов.

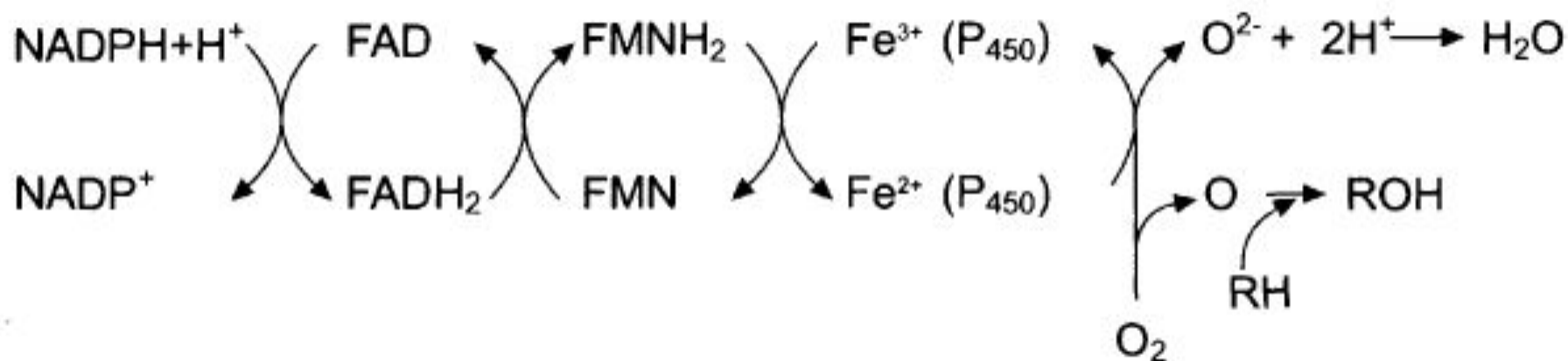
8. Специфическая модуляция активности ферментов, детоксикация ксенобиотиков.

Первая стадия биотрансформации ксенобиотиков микросомальная монооксигеназная система (может приводить к образованию как более, так и менее токсичных по сравнению с исходным соединением метаболитов).

Вторая стадия обеспечивается ферментативными системами, ведущими различного рода реакции конъюгации и в большинстве случаев заканчивается полным обезвреживанием ксенобиотика и его реакционноспособных метаболитов.

Первая стадия

Цитохромы P-450



Индукция цитохромов Р-450 флавоноидами

Механизмы:

- прямая стимуляция генной экспрессии через специфический рецептор (в результате связывания с лиганд активируемым транскрипционным фактором – рецептором арилзамещенных углеводородов (AhR – aryl hydrocarbon receptor)).
- стабилизация мРНК

Индукция цитохромов Р-450 флавоноидами

При **низких концентрациях** флавоноиды выступают как AhR антагонисты, связывающиеся с рецептором без активации транскрипционного фактора.

При **высоких концентрациях** те же самые флавоноиды функционируют как AhR агонисты

Индукция цитохромов Р-450 флавоноидами

Минусы:

- Часто продукты микросомального окисления ксенобиотика представляют большую опасность для клетки по сравнению с исходным соединением.
 - ускорение процессов микросомального окисления ксенобиотика сопровождается усилением генерации АФК (активных форм кислорода) и последующей инициацией процессов ПОЛ.
- Часто используют соединения подавляющие активность микросомальных монооксигеназ.

Ингибирование цитохромов Р-450 флавоноидами

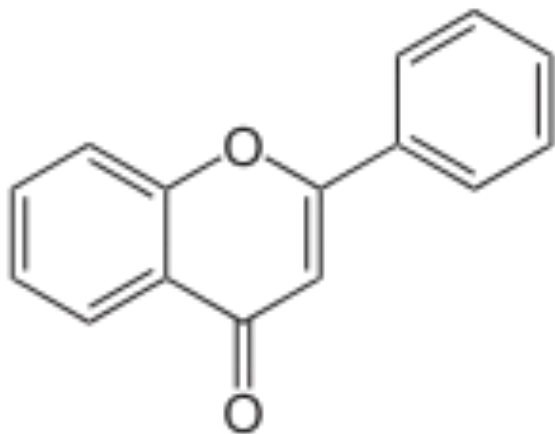
- Ингибирование генной экспрессии семейства CYP1 посредством блокирования AhR рецептора в ряде случаев определяет антиканцерогенную активность отдельных флавоноидов (пр. кверцетин).
- Связывания флавоноида с NADPH – цитохром Р-450 редуктазой или с цитохромом Р-450;
- Конкуренции с другими субстратами
- Модификации мест их связывания
- Изменение липидного микроокружени, вследствие чего затрудняется перенос электронов к цитохрому.

Эффекторное действие флавоноидов во многом определяется:

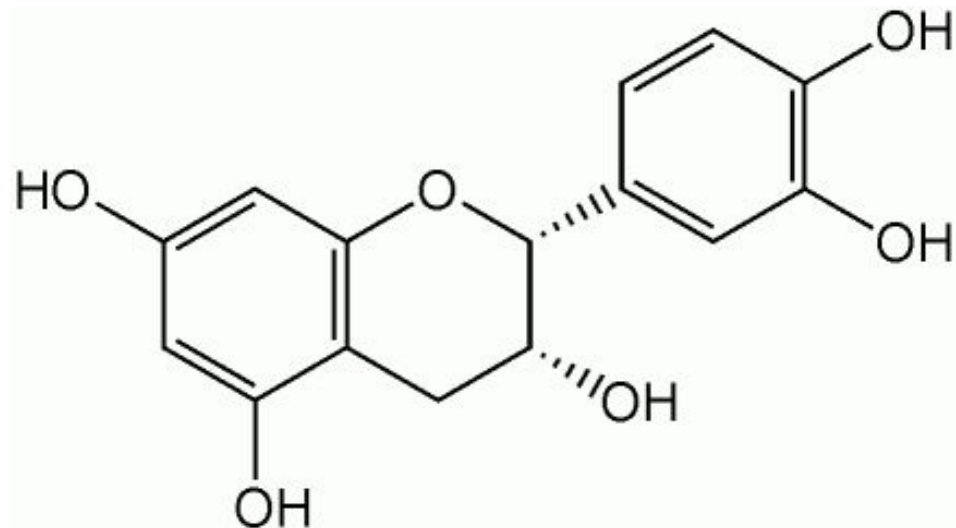
- особенностями структуры их пропанового фрагмента,
- наличием различных радикалов в ароматической части молекулы,
- степенью гликозилирования,
- местом присоединения углеводных остатков и их природой,
- конфигурацией гликозидных связей
- характером сочленения гликозидной части с агликоном (О-гликозиды, С-гликозиды).

Примеры флавоноидов

Флафон



Эпикатехин

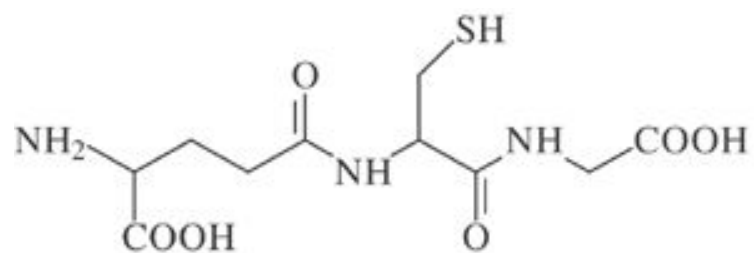


Кверцетин



Лучше действовать на вторую стадию биотрансформации ксенобиотиков.

- Действие на глутатион S-трансферазы(ГТ), которые
- конъюгируют ксенобиотики и их реакционноспособные метаболиты с глутатионом,
 - восстанавливают органические гидропероксиды,
 - участвуют в метаболизме конечных цитотоксичных продуктов ПОЛ
 - обеспечивают связывание и внутриклеточный транспорт ряда эндогенных лигандов (билирубина, желчных кислот, жирных кислот, производных гема, нейромедиаторов и стероидных гормонов).

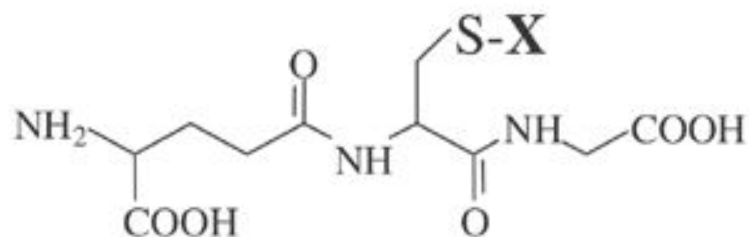


+

Xenobiotic (X)

Glutathione

GST



Glutathione-S-Conjugate

Глутатион S-трансфераза

3 класса: альфа, мю и пи.

У млекопитающих ГТ присутствуют практически во всех типах клеток.

Изоферментный состав ГТ варьирует в зависимости от их локализации, что определяет разную устойчивость органов и тканей к окислительному стрессу, к действию ксенобиотиков и эндотоксинов.

В растительной пище много химических соединений, выступающих в качестве индукторов ГТ, что приводит к снижению частоты раковых заболеваний.

Флаваноны и флавоны увеличивают не только активность ГТ, но и активность других ферментов второй стадии биотрансформации ксенобиотиков (УДФ-глюкуронозилтрансфераз).

При различных хронических и острых заболеваниях печени, сопровождающихся эндогенной интоксикацией организма, нормальное функционирование ГТ может нарушаться.

Для профилактики цитотоксического действия ксенобиотиков при заболеваниях, сопровождающихся эндогенной интоксикацией организма используют эффекторные свойства флавоноидов.

Введение экспериментальным животным растительных экстрактов из семян расторопши, лофанта, душицы и горца с повышенным содержанием флавоноидов



снижает тяжесть патобиохимических проявлений холестаза, благодаря способности флавоноидов индуцировать ГТ печени.

Глутатион S-трансферазы способны эффективно связывать билирубин и желчные кислоты, которые в избыточных количествах накапливаются в печени при холестазах.

Билирубин и желчные кислоты благодаря своей гидрофобной природе активно взаимодействуют с мембранами и белками, вызывая различного рода повреждения.