

ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ



Ευαγγελία Εμμανουηλίδου, PhD

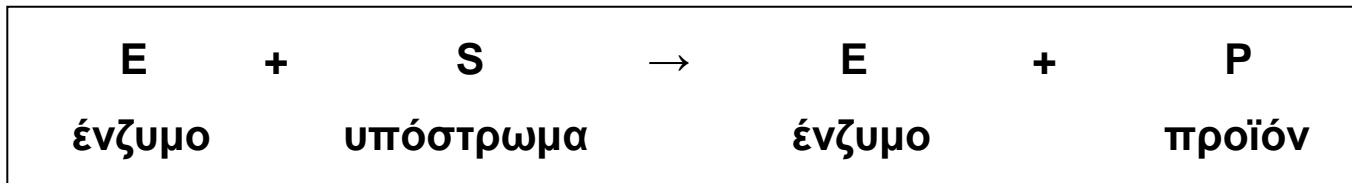
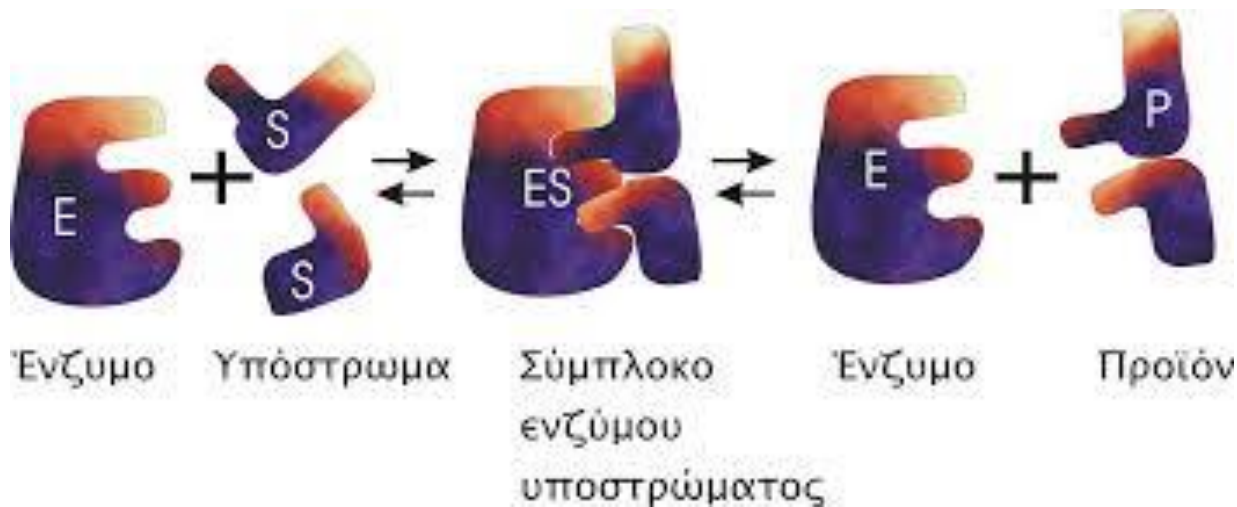


ΣΥΝΟΨΗ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ

- **Ιστορικά στοιχεία**
- **Χαρακτηριστικά και λειτουργία ενζύμων**
- **Κινητική ενζύμων**
- **Η ενζυματική ανάλυση στην ιατρική**
- **Η ενζυματική ανάλυση στην έρευνα**

Δομή και λειτουργία ενζύμων

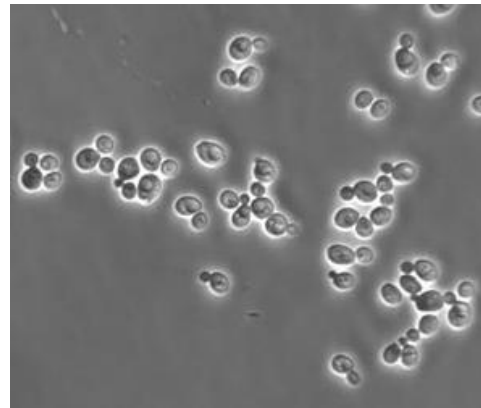
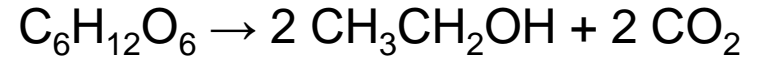
Ένζυμο: πρωτεΐνες* που δρουν ως βιοκαταλύτες χημικών αντιδράσεων



*Μπορεί να είναι και μόρια ριβοσωματικού RNA (0,1%)

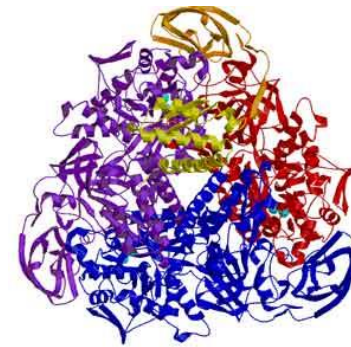
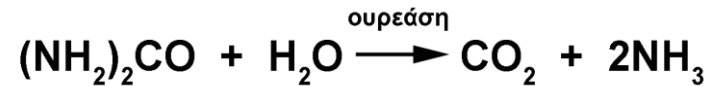
Ένζυμα: οι πρώτες ανακαλύψεις

1. 19ος αιώνας: μελέτες του Louis Pasteur για τη ζύμωση των σακχάρων σε αλκοόλη από τη μαγιά (αλκοολική ζύμωση)
2. Το 1878 ο γερμανός γιατρός Wilhelm Kuhne χρησιμοποιεί για πρώτη φορά τον όρο *enzyme* (από την ελληνική λέξη «ένζυμον») για να περιγράψει τις ζύμες
3. Το 1897, ο Eduard Buchner ανακαλύπτει ότι η αλκοολική ζύμωση γίνεται και από μη ζώντες οργανισμούς από το ένζυμο ζυμάση. Για τις μελέτες αυτές κερδίζει το βραβείο Nobel Χημείας το 1907.



Ένζυμα: οι πρώτες ανακαλύψεις

4. Ο James Sumner απομονώνει το πρώτο ένζυμο, την ουρεάση, και μετά την καταλάση. Η ουρεάση ήταν το πρώτο ένζυμο του οποίου η κρυσταλλική μορφή απομονώθηκε.
5. Οι Northrop & Stanley απομονώνουν τα πεπτικά ένζυμα, πεψίνη, τρυψίνη και χυμοτρυψίνη. Οι τρεις κερδίζουν το Nobel Χημείας το 1946.
6. Το 1965 η ομάδα του David Chilton Phillips αναλύει την κρυσταλλογραφική δομή της λυσοζύμης.



Ουρεάση

Η δομή της ανακαλύφθηκε πολύ αργότερα, το 1995, από τον P.A.

Karplus



Χαρακτηριστικά των ενζύμων

Στην ενζυμική κατάλυση, τα ένζυμα:

- ελαττώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) της αντίδρασης αυξάνοντας δραματικά τη ταχύτητα της αντίδρασης

(αποκαρβοξυλίωση 5' - μονοφωσφορικής οροτιδίνης: $t_{1/2} = 78$ εκατ. χρόνια χωρίς ένζυμο, $t_{1/2} = 25$ ms με ένζυμο)

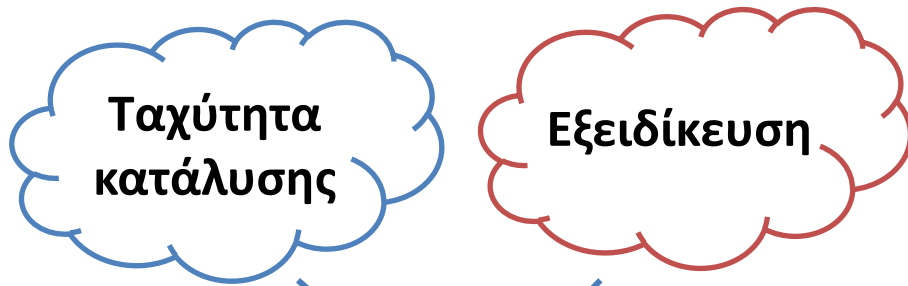
- δεν καταναλώνονται
- δεν αλλάζουν την ισορροπία των αντιδράσεων
- έχουν υψηλή ειδικότητα
- αυξάνουν τη ταχύτητα εκατομμύρια φορές σε σχέση με τις μη καταλυόμενες αντιδράσεις
- καταλύουν περίπου 4000 βιοχημικές αντιδράσεις
- η καταλυτική τους ικανότητα (στα ενεργά κέντρα) εξαρτάται από τη στερεοχημική τους δομή

Κύριες κατηγορίες ενζύμων

Ανάλογα με την αντίδραση που καταλύουν:

- Οξειδοαναγωγάσες → οξείδωση – αναγωγή
- Μεταφοράσες → μεταφορά ομάδας
- Υδρολάσες → υδρόλυση
- Λυάσες → πρόσθεση – αφαίρεση ομάδας για τη δημιουργία διπλού δεσμού
- Ισομεράσες → ισομερείωση (ενδομοριακή μεταφορά ομάδας)
- Λιγάσες → σύνδεση 2 ομάδων με ταυτόχρονη υδρόλυση ATP

Βασικές ιδιότητες ενζύμων



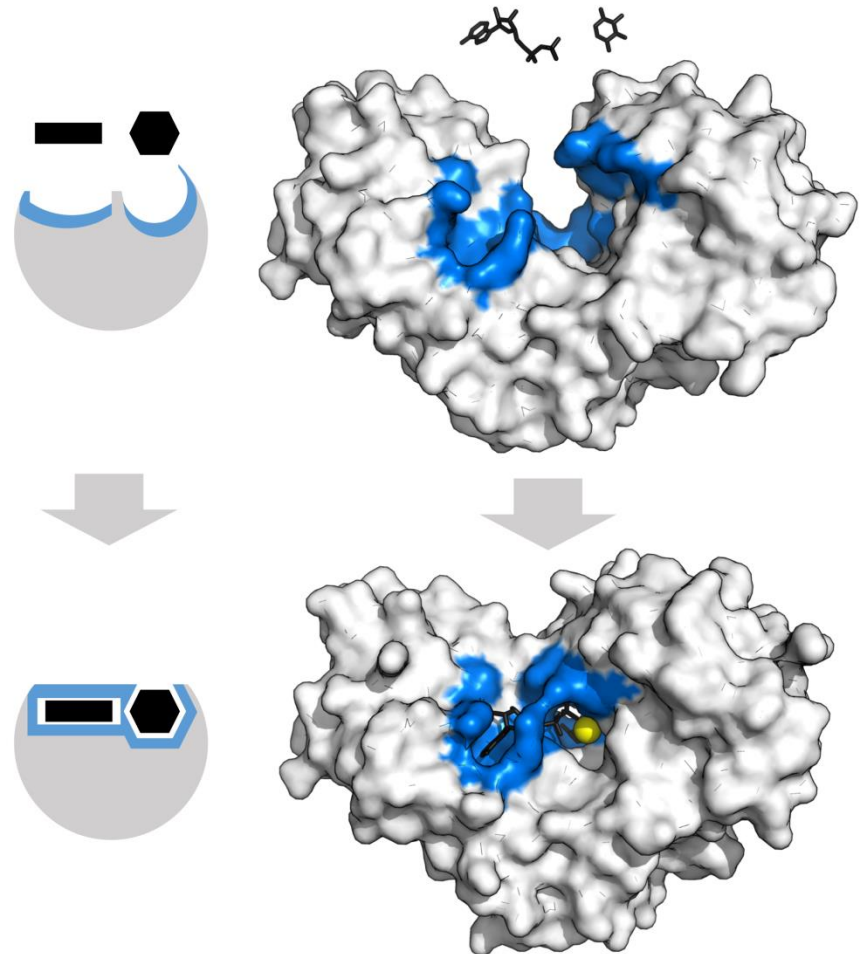
Ενεργό κέντρο

η περιοχή του ενζύμου όπου προσδένεται το υπόστρωμα και μετατρέπεται στο προϊόν

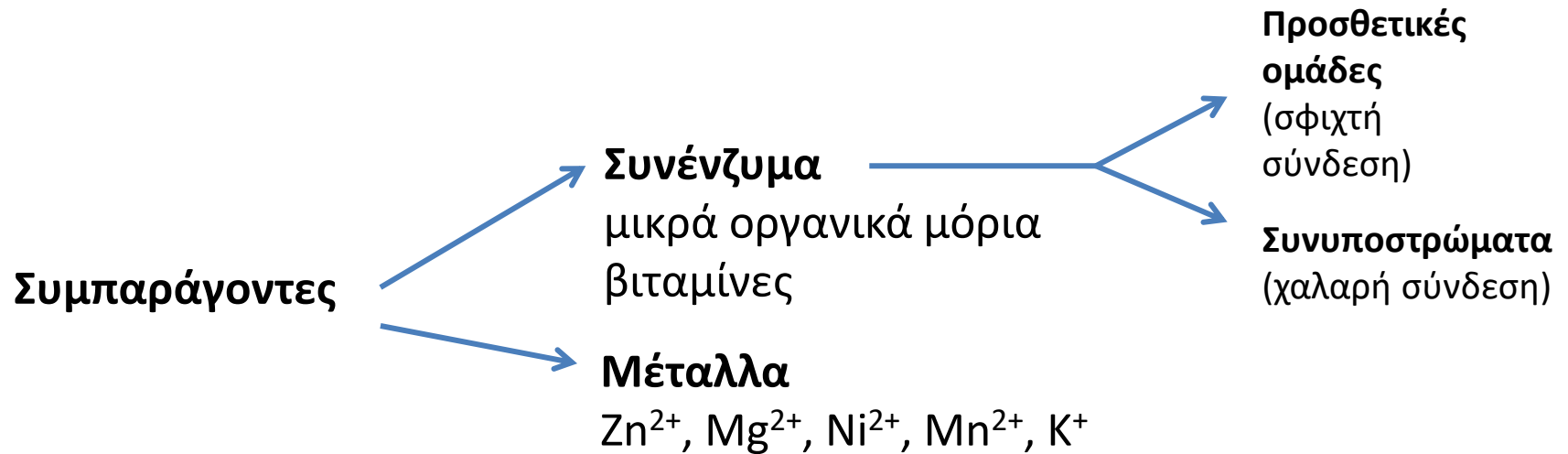
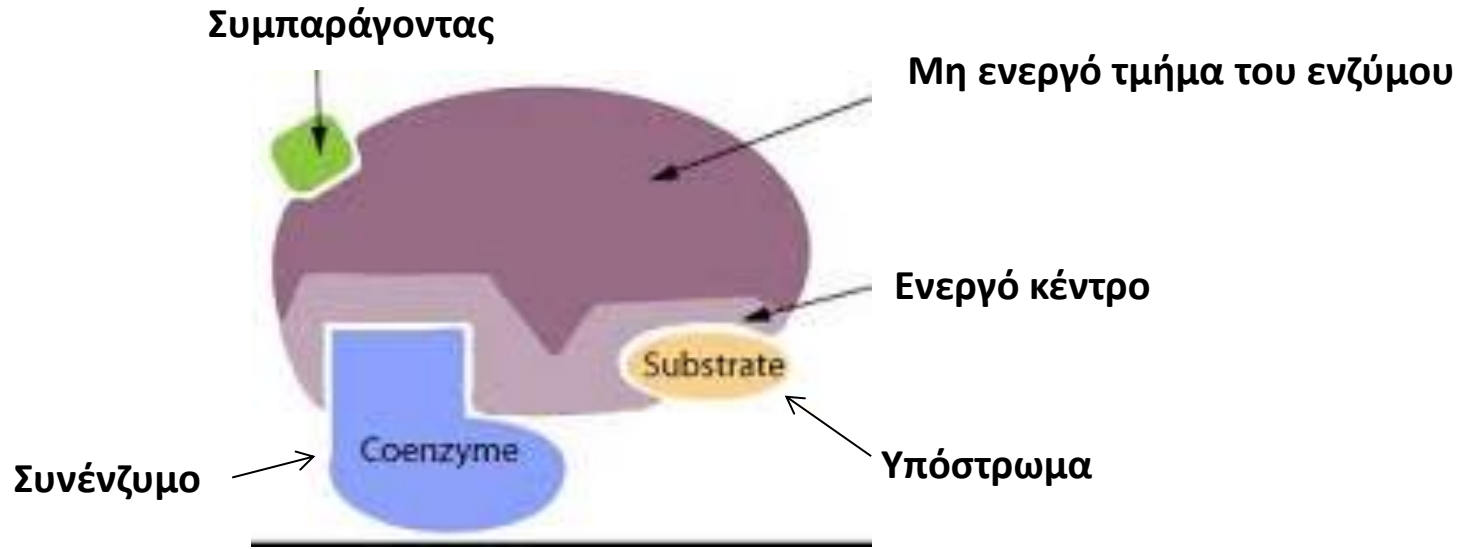
σχηματίζεται
MONO στη
τριδιάστατη
δομή

εξασφαλίζει ειδική
και δυναμική
αλληλεπίδραση με
το υπόστρωμα

Μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς



Συμπαράγοντες ενζύμων

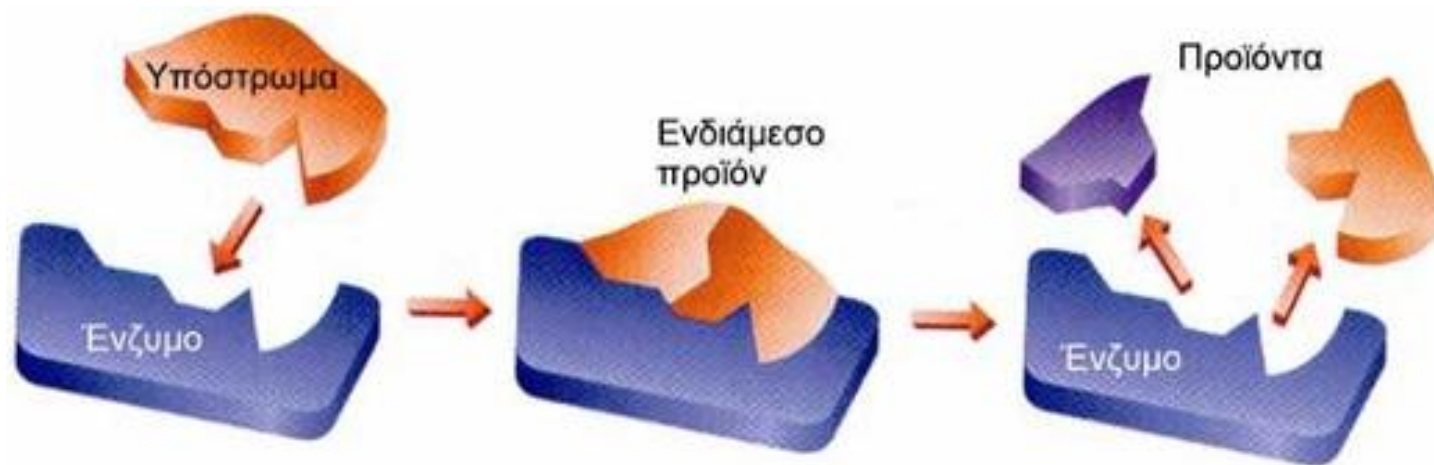


Δράση ενζύμων: βασικός μηχανισμός

1^ο βήμα: σύνδεση υποστρώματος στο ένζυμο

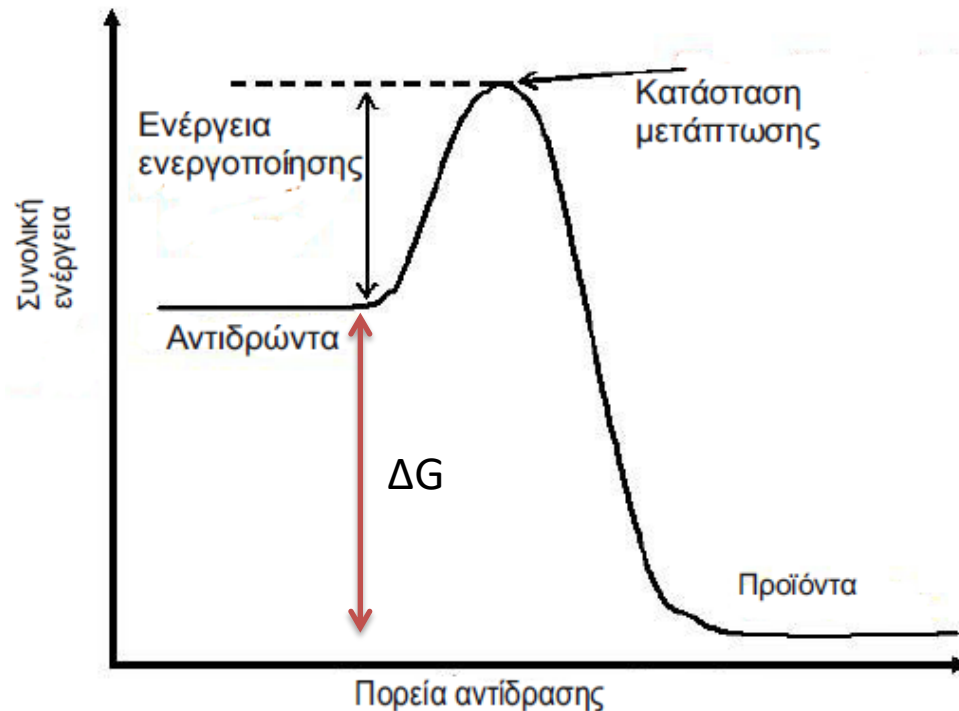
2^ο βήμα: σταθεροποίηση ενδιάμεσου προϊόντος

3^ο βήμα: απελευθέρωση προϊόντων



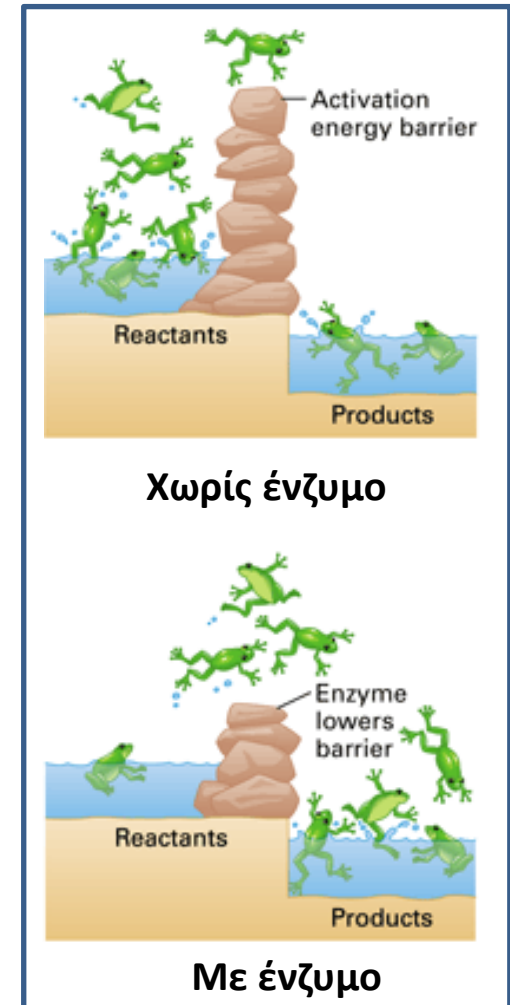
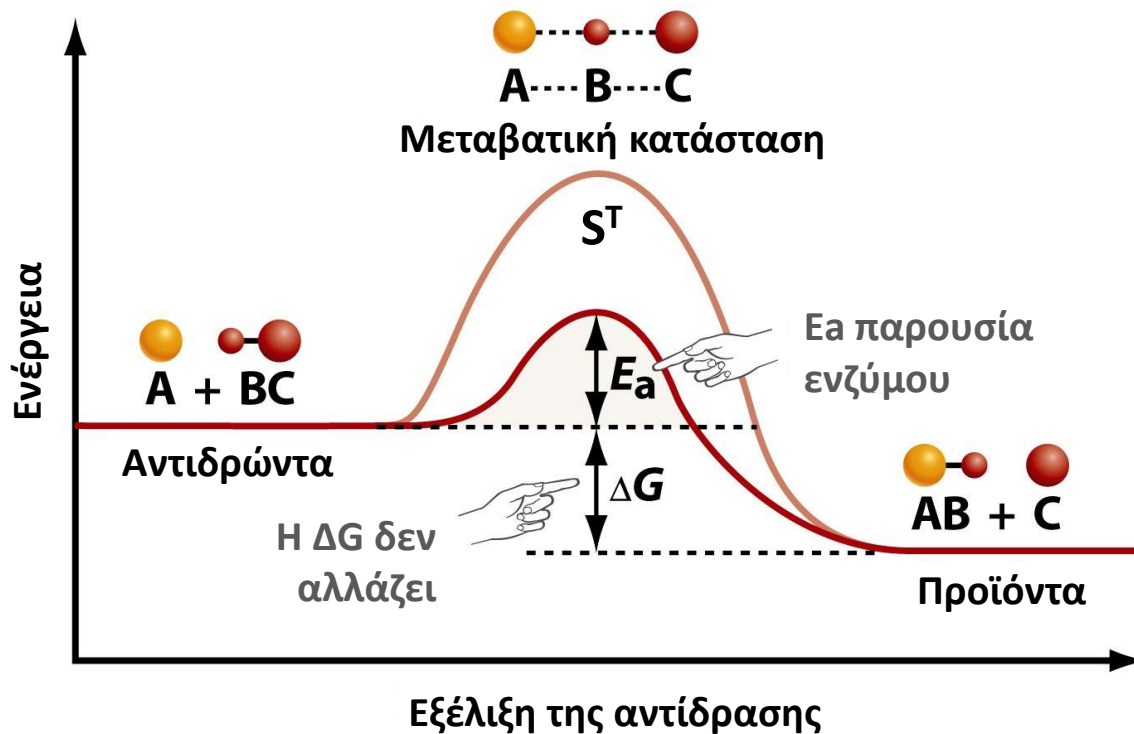
Μηχανισμός δράσης: βασικές έννοιες

- **Ενέργεια ενεργοποίησης (Activation energy, E_a)** : προσδιορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης
- **Κατάσταση μετάπτωσης (Transition state, S^{\ddagger})**: προσδιορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης
- **Διαφορά ελεύθερης ενέργειας (Free energy, ΔG)**: προσδιορίζει κατά πόσο η αντίδραση θα γίνει αυθόρμητα (αλλά δεν δίνει πληροφορίες για την ταχύτητα)



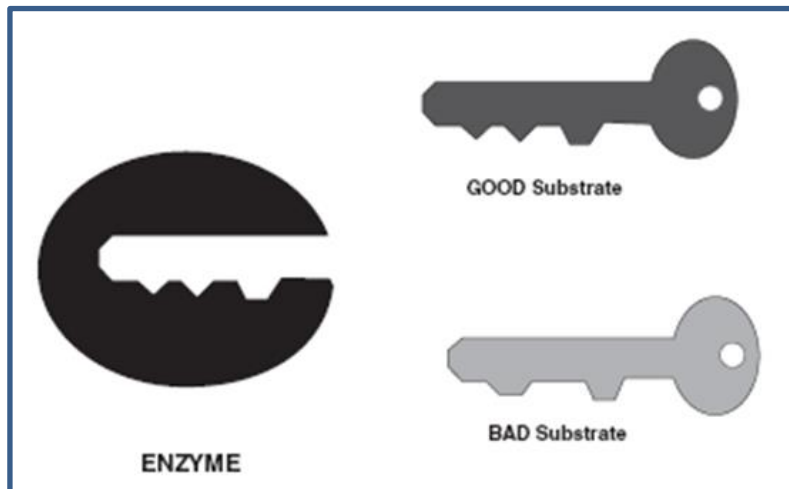
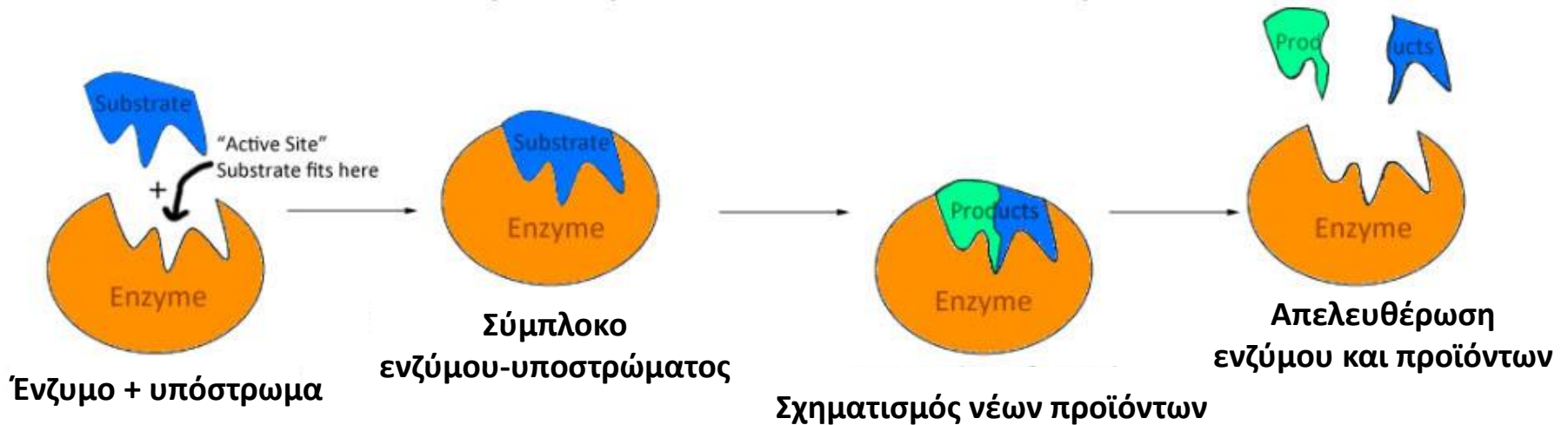
Μηχανισμός δράσης: μεταβατική κατάσταση

Τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις διευκολύνοντας τον σχηματισμό της μεταβατικής κατάστασης



Μοντέλα δράσης των ενζύμων: κλειδί-κλειδαριά

Υπόστρωμα = κλειδί, ένζυμο = κλειδαριά, Ενεργό κέντρο = κλειδαρότρυπα

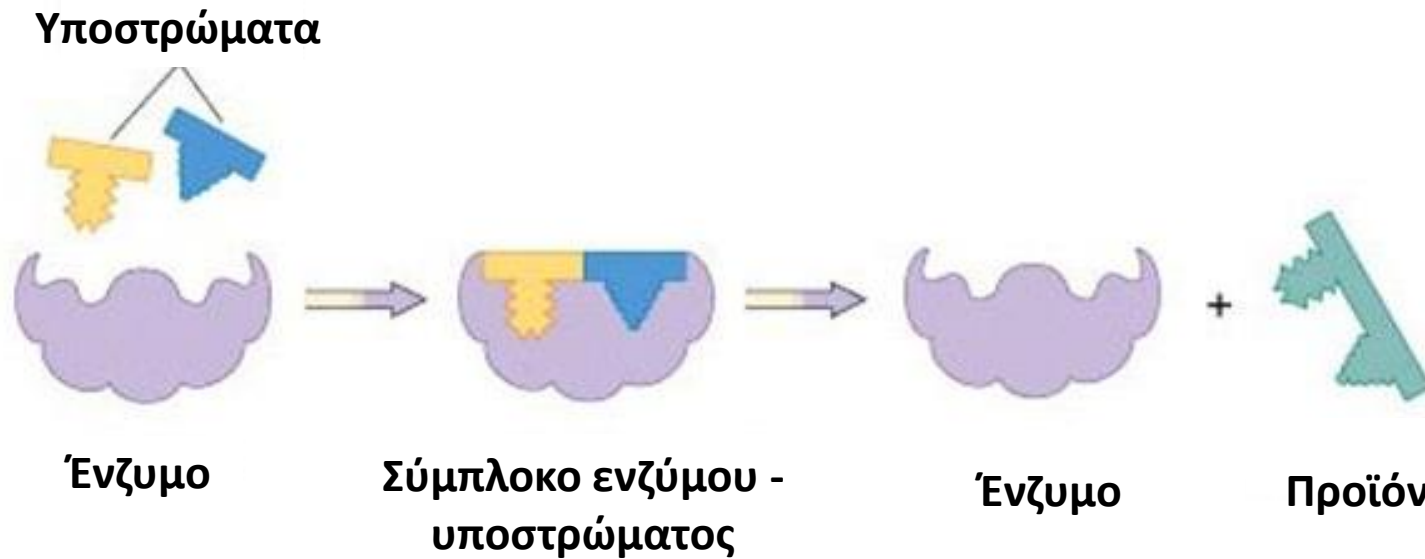


Μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς (lock and key)

- Το υπόστρωμα ταιριάζει απόλυτα με το ενεργό κέντρο του ενζύμου (συμπληρωματικότητα).
- Το ένζυμο είναι άκαμπτο (δεν αλλάζει διαμόρφωση κατά την πρόσδεση του υποστρώματος).

Μοντέλα δράσης των ενζύμων: επαγόμενη προσαρμογή

Μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής (induced fit)



Η διαμόρφωση του ενεργού κέντρου διαμορφώνεται κατά την αναγνώριση του υποστρώματος.

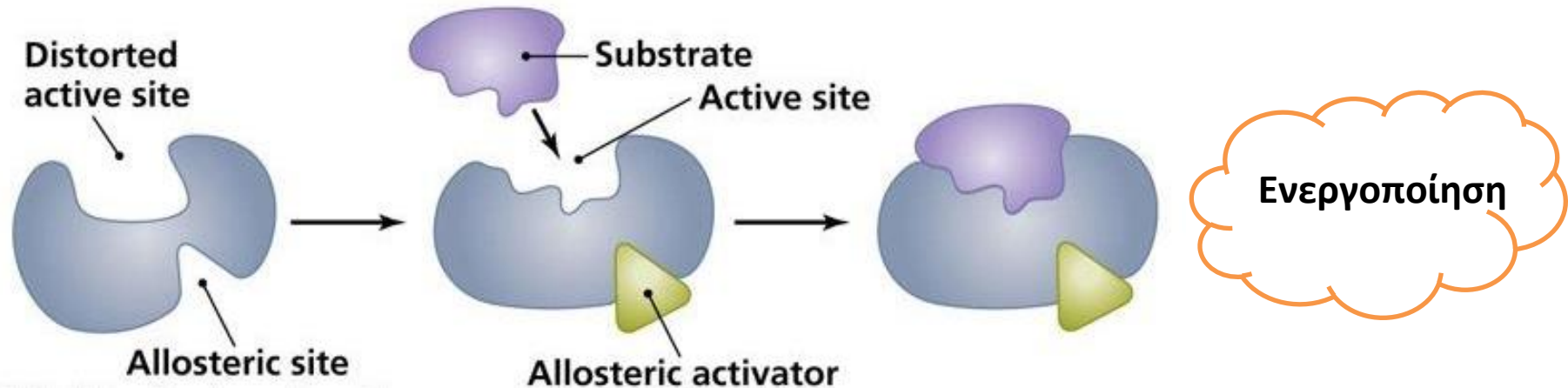
Μοντέλα δράσης των ενζύμων: αλλοστερική ρύθμιση

Μοντέλο αλλοστερικής ρύθμισης (allosteric regulation)

- Η αλλαγή της διαμόρφωσης είναι αποτέλεσμα της σύνδεσης ενός άλλου μορίου στο ένζυμο (τροποποιητής).
- Οι τροποποιητές συνδέονται μη ομοιοπολικά σε μία περιοχή του ενζύμου (περιοχή αλλοστερικής ρύθμισης) αλλάζοντας τη δραστηριότητα σε μια άλλη, συχνά μακρινή, περιοχή (ενεργό κέντρο).
- **Αλλοστερισμός:** το φαινόμενο μεταβολής της ενεργότητας ενός ενζύμου από ουσία που δεσμεύεται σε θέση διαφορετική από τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος.
- Με την σύνδεση του τροποποιητή, το ένζυμο σταθεροποιείται στην ενεργή διαμόρφωση (R μορφή) ενώ πριν τη σύνδεση βρίσκονταν στη μη ενεργή διαμόρφωση (T μορφή).
- Η μέθοδος της αλλοστερικής ρύθμισης χρησιμοποιείται και από άλλες πρωτεΐνες που δεν είναι ένζυμα (υποδοχείς, πρωτεΐνες κίνησης κτλ).

Μοντέλα δράσης των ενζύμων: αλλοστερική ενεργοποίηση

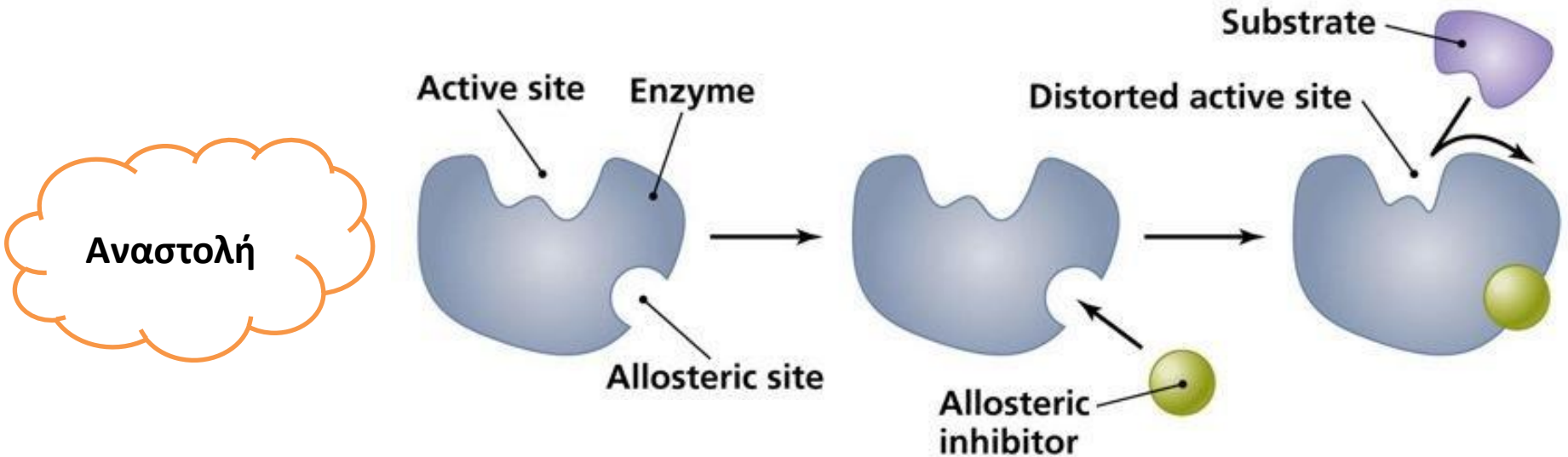
Μοντέλο αλλοστερικής ρύθμισης (allosteric regulation)



- Η θέση δέσμευσης του ενεργοποιητή είναι κενή. Το υπόστρωμα δεν μπορεί να δεσμευτεί ή μπορεί να δεσμευτεί με χαμηλή συγγένεια.
- Δέσμευση του ενεργοποιητή οδηγεί σε αλλαγή της δομής του ενεργού κέντρου με αποτέλεσμα τη δέσμευση του υποστρώματος με υψηλή συγγένεια.

Μοντέλα δράσης των ενζύμων: αλλοστερική αναστολή

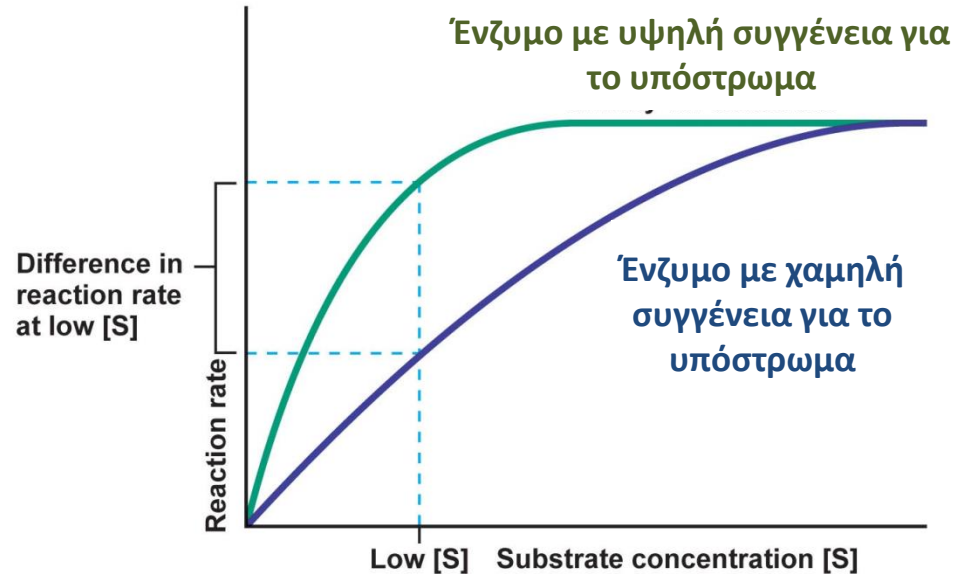
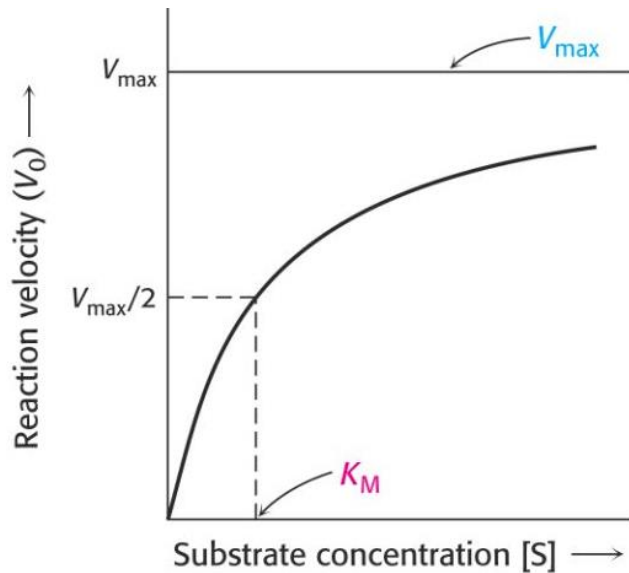
Μοντέλο αλλοστερικής ρύθμισης (allosteric regulation)



- Η θέση δέσμευσης του αναστολέα είναι κενή. Το υπόστρωμα μπορεί να δεσμευτεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.
- Δέσμευση του αναστολέα οδηγεί σε αλλαγή της δομής του ενεργού κέντρου με αποτέλεσμα το υπόστρωμα να μην μπορεί να δεσμευτεί στο ενεργό κέντρο.

Κινητική ενζύμων

Μοντέλο Michelis-Menten



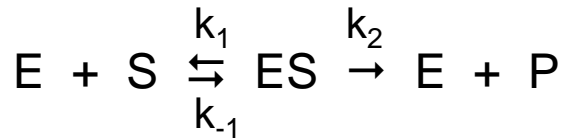
© 2011 Pearson Education, Inc.

- V_{max} : όλα τα ενεργά κέντρα είναι συνδεδεμένα με το υπόστρωμα ($ES = E$)
- Σταθερά Michaelis-Menten K_m : η συγκέντρωση υποστρώματος που απαιτείται για το ένζυμο να φτάσει το $V_{max} / 2$ (\rightarrow υποδηλώνει το πόσο σθεναρά συνδέεται το υπόστρωμα στο ένζυμο (ειδικότητα ή συγγένεια / affinity))

Κινητική Michaelis – Menten

Κινητική Michaelis – Menten (1913): Παραδοχή αποκατάστασης ισορροπίας

Βασίζεται στην ιδέα δημιουργίας του ενδιάμεσου συμπλόκου: Το σύμπλοκο, ES, βρίσκεται σε ισορροπία με το ελεύθερο ένζυμο, E και το υπόστρωμα, S και ο σχηματισμός του προϊόντος P μπορεί να λάβει χώρα μόνο μέσω του συμπλόκου ES



Η ταχύτητα της αντίδρασης

$$v = k_2 [ES]$$

δίνεται από τη σχέση:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_S + [S]}$$

όπου η σταθερά διάστασης $K_S = [E] [S] / [ES]$ ονομάζεται τώρα σταθερά Michaelis – Menten, K_m

😊 **Ισχύει μόνο αν $k_{-1} \gg k_2$**

Κινητική Michaelis – Menten

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ MICHAELIS, K_m

Η K_m αποτελεί σταθερά για κάθε ένζυμο:

- ισχύει για δεδομένο υπόστρωμα
- ισχύει υπό ορισμένες συνθήκες
- δεν επηρεάζεται από την ενεργότητα του ενζύμου
- υπολογίζεται από την εξίσωση Briggs – Haldane:
- κυμαίνεται μεταξύ 10^{-1} - 10^{-6} mol/L
- όσο μειώνεται, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος

$$K_m = [S] \frac{V_{\max}}{v} - 1$$

ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ

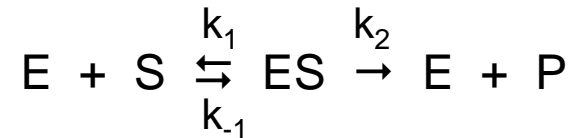
- όταν $[S] \ll K_m$ – η ταχύτητα αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογη της $[S]$ (αντίδραση πρώτης τάξης)
- όταν $[S] \gg K_m$ – η ταχύτητα αντίδρασης καθίσταται ανεξάρτητη της $[S]$ (αντίδραση μηδενικής τάξης)
- όταν $[S] = K_m$ – η ταχύτητα της αντίδρασης $v = V_{\max}/2$

Κινητική Briggs – Haldane

Κινητική Briggs – Haldane (1925): Παραδοχή αποκατάστασης σταθεροποιημένης κατάστασης (steady state)

Βασίζεται στο ότι ο ρυθμός σχηματισμού και διάσπασης του ES είναι σχεδόν ίσος ώστε αποκαθίσταται μια δυναμική ισορροπία. Συγκεκριμένα:

- η ισορροπία αποκαθίσταται αμέσως μετά την ανάμιξη E και S
- η συγκέντρωση του ES είναι σχεδόν σταθερή
- το S είναι σε μεγάλη περίσσεια σε σχέση με το E
- η [S] είναι περίπου ίση με την αρχική
- η k_{-2} μπορεί να αγνοηθεί λόγω μικρής ποσότητας του [ES]



Η ταχύτητα της αντίδρασης

$$v = k_2 [ES]$$

δίνεται από τη σχέση:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

όπου

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \text{ η σταθερά Michaelis}$$

• Η εξίσωση **Briggs – Haldane** είναι ίδια με την εξίσωση **Michaelis-Menten** εκτός της αντικατάστασης της K_s (k_{-1}/k_1) με την πιο σύνθετη σταθερά $k_m = k_{-1} + k_2 / k_1 = K_s + k_2 / k_1$

Ισχύει μόνο αν $k_{-1} \gg k_2$, διαφορετικά, K_m θα είναι $>$ της K_s

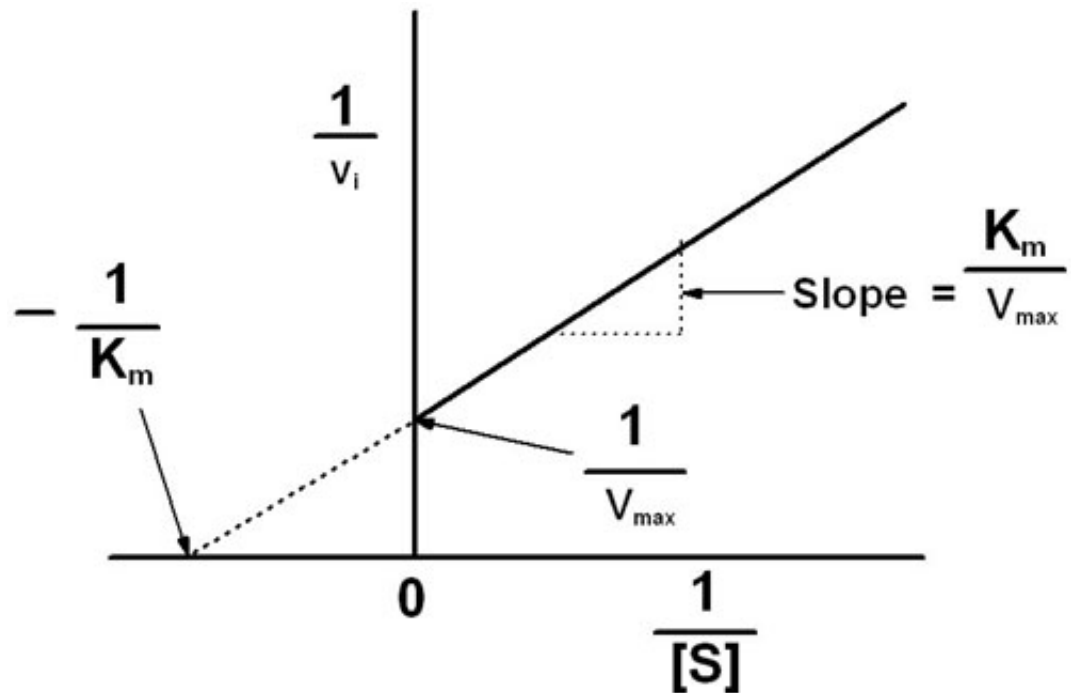
• Οι εξισώσεις **Michaelis-Menten** και **Briggs – Haldane** αναφέρονται στην απλούστερη περίπτωση ενός ενζύμου – ενός υποστρώματος.

Κινητική ενζύμων

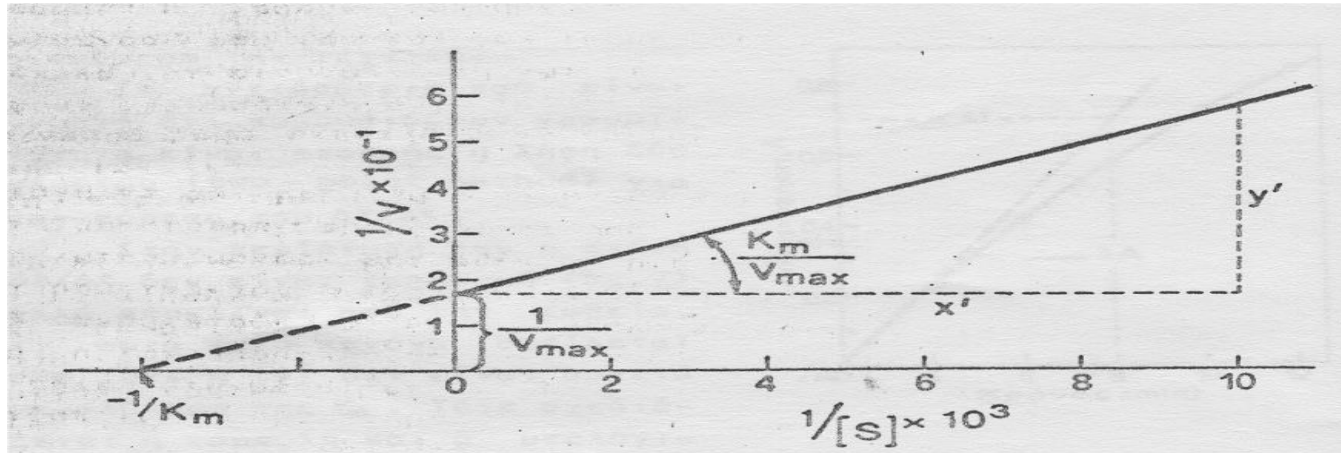
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ V_{\max} & K_m

Εξίσωση Lineweaver - Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$



ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΩΝ V_{\max} & K_m



Η V_{\max} υπολογίζεται γραφικά από την $1/V_{\max} = 1,7 \times 10^{-1}$ και $V_{\max} = 5,9$ και $K_m = V_{\max} y'/x' = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$

Γνωρίζοντας την K_m υπολογίζουμε την ταχύτητα της ενζυματικής αντίδρασης βάσει της εξίσωσης (6) για οποιαδήποτε συγκέντρωση υποστρώματος.

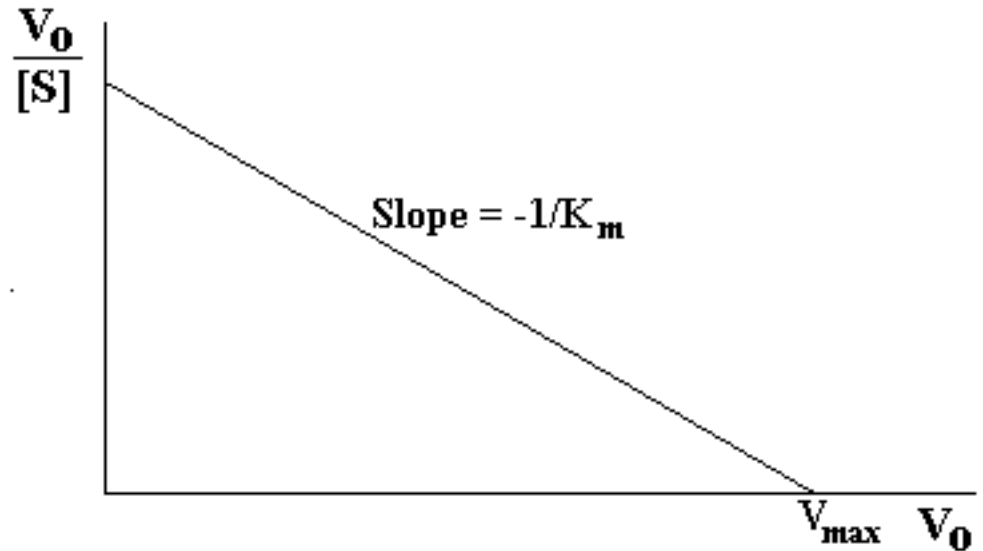
Έστω $K_m = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ και $[S] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$, τότε για $V_{\max} = 5,9$, βάσει εξίσωσης (6) $v = 5,4$, δηλαδή το 91,5% της μέγιστης ταχύτητας

Στο παραπάνω παράδειγμα το 91,5% επιτυγχάνεται με $[S] = 10 \times K_m = 10 \times 2,5 \times 10^{-4} = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΩΝ V_{\max} & K_m

Εξίσωση Eadie - Hofstee

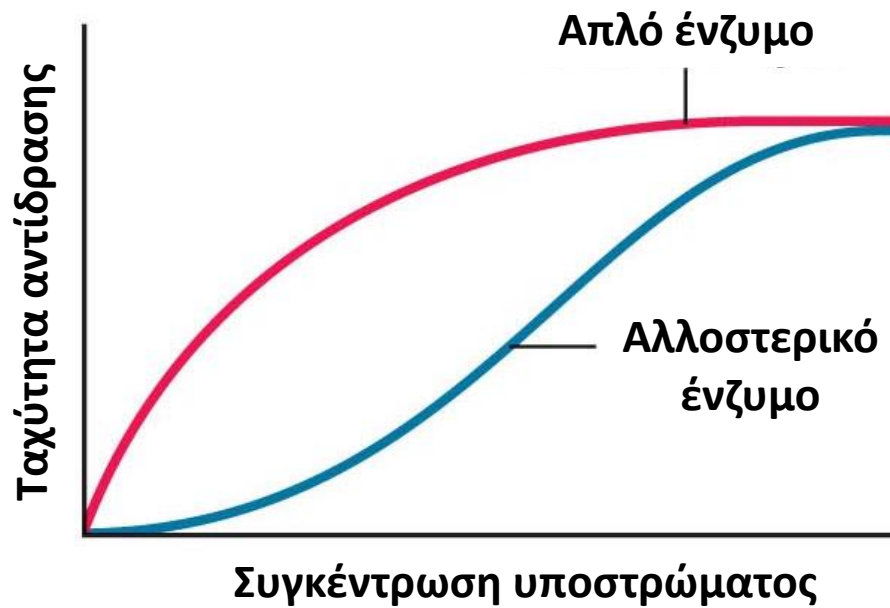
$$v = V_{\max} - \frac{K_m v}{[S]}$$



Αυτή η γραφική παράσταση πλεονεκτεί έναντι της γραφικής παράστασης **Lineweaver-Burk** στο ότι τα πειραματικά δεδομένα σε όλη την περιοχή συγκεντρώσεων έχουν τον ίδιο συντελεστή βαρύτητας.

Κινητική ενζύμων

Η κινητική των αλλοστερικών ενζύμων δεν ακολουθεί το μοντέλο Michaelis-Menten



Τα ένζυμα στην αναλυτική χημεία: Ενζυματική ανάλυση

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

Οι ενζυματικές μέθοδοι ανάλυσης:

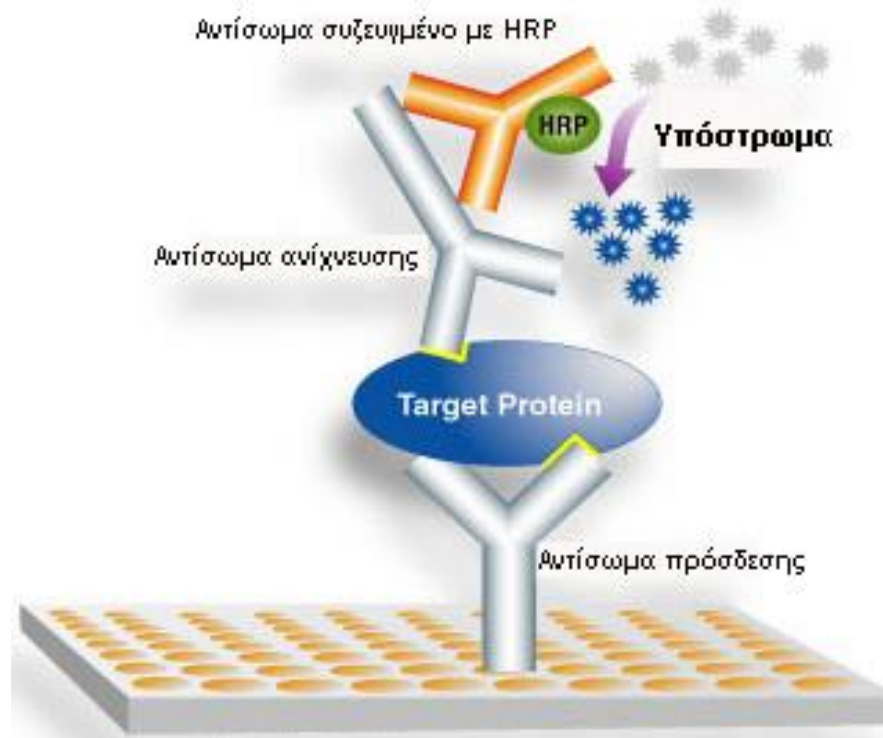
- Επιτρέπουν τον εξειδικευμένο (εκλεκτικό) προσδιορισμό ενός υποστρώματος ή της ενεργότητας ενός ενζύμου σε μίγμα
- Δεν είναι απαραίτητη η χρήση μεθόδων διαχωρισμού (χρονοβόρες και συνοδεύονται από μεγάλη απώλεια δείγματος)
- Καθιερώθηκαν ως μεθοδολογία σε προσδιορισμούς σε όργανα ζώϊκών και φυτικών οργανισμών, βιολογικά υγρά, θρεπτικά υλικά, τρόφιμα, φάρμακα

Πλεονεκτήματα:

- Υψηλή ευαισθησία (από μmol σε συνήθεις φασματοφωτομετρικές τεχνικές σε nmol με καταλυτικές)
- Υψηλή ακρίβεια (λόγω εκλεκτικότητας των ενζυμικών αντιδράσεων)
- Καλή επαναληψιμότητα
- Οικονομικές μέθοδοι (κυρίως μετά την εισαγωγή των ακινητοποιημένων ενζύμων)

Ενζυματική ανάλυση

- Ως εξειδικευμένοι καταλύτες για τον ποσοτικό προσδιορισμό υποστρωμάτων και για τη μέτρηση της ενεργότητας ενζύμων (άμεση χρήση)
- Για την ιχνηθέτηση (μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης) με ενζυμικά ανενεργές ουσίες (ανοσοσφαιρίνες, ολιγονουκλεοτίδια) (έμμεση χρήση)



Ενζυματική ανάλυση

ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΟΥ

Τα ένζυμα ακινητοποιούνται ή εγκλείονται επί ή εντός αδρανούς υλικού (χωρίς απώλεια καταλυτικής δράσης).

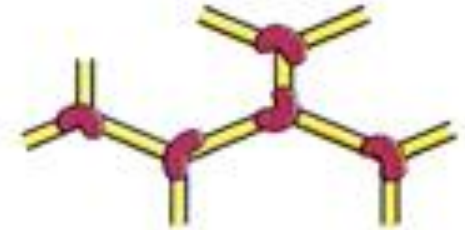
Οι τρόποι ακινητοποίησης είναι προσρόφηση, παγίδευση σε μικροσφαίρες ή ομοιοπολική σύνδεση μέσω χημικής αντίδρασης.

Η χρήση των ακινητοποιημένων ενζύμων προσφέρει ιδιαίτερα στις αυτοματοποιημένες τεχνικές. Π.χ. –ακινητοποίηση της ουρεάσης ή οξειδάσης της γλυκόζης στο εσωτερικό τοίχωμα πλαστικού σωλήνα χρησιμοποιείται σε αυτόματους αναλυτές συνεχούς ροής για τον προσδιορισμό ουρίας και γλυκόζης στον ορό αίματος

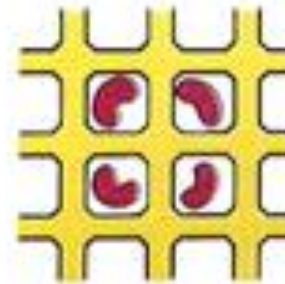
Πλεονέκτημα – η επαναχρησιμοποίηση τους –
μείωση κόστους αναλύσεων



Φορείς ενζυμικών μορίων



Ομοιοπολική σύνδεση



Έγκλειστα



Μικροκάψουλες

Χρήσεις ενζυματική ανάλυσης στην Ιατρική

- Η συγκέντρωση των ενζύμων στα κύτταρα παραμένει σε σχετικά σταθερά επίπεδα χάρη στην ισορροπία μεταξύ σύνθεσης και αποδόμησης τους. Μικρό ποσοστό από αυτά περνά στα υγρά του σώματος (αίμα, ούρα κτλ).
- Ανίχνευση υψηλών επιπέδων ενζύμων στον ορρό υποδηλώνει καταστροφή ιστών ή συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών.
- Οι μεταβολές αυτές έχουν συσχετιστεί με ασθένειες ώστε να βοηθούν στη διάγνωση, πρόγνωση και αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Μέθοδοι μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας

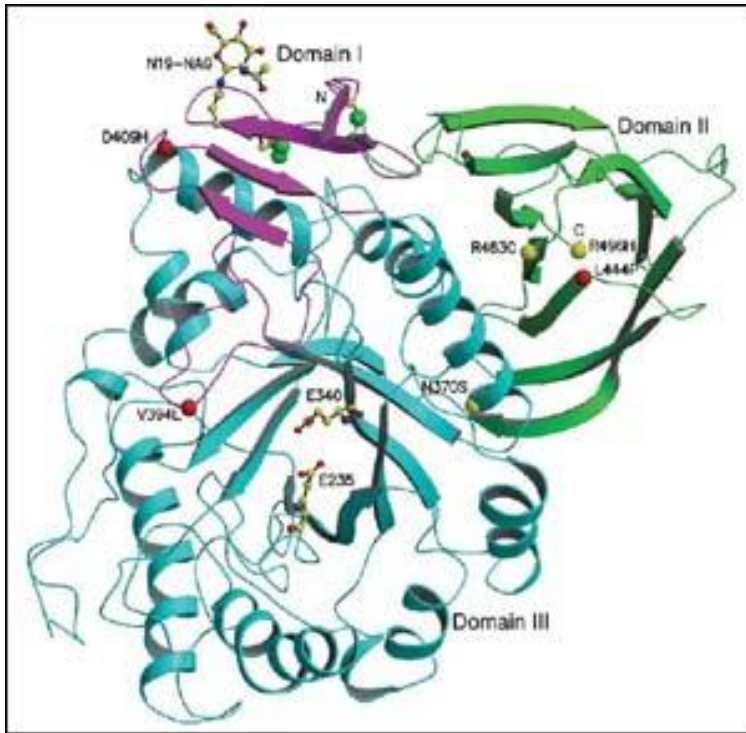
Η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου γίνεται είτε με μέτρηση της κατανάλωσης του υποστρώματος είτε μέτρηση του παραγόμενου προϊόντος σε ορισμένο χρόνο.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι:

- **Συνεχείς** (λαμβάνονται συνεχώς μετρήσεις ενεργότητας από την αρχή ως το τέλος της ενζυμικής αντίδρασης)
- **Μη συνεχείς ή τελικού σημείου** (λαμβάνονται δείγματα σε ορισμένο χρόνο, η αντίδραση τερματίζεται, και μετρούνται οι συγκεντρώσεις υποστρωμάτων/προϊόντων)

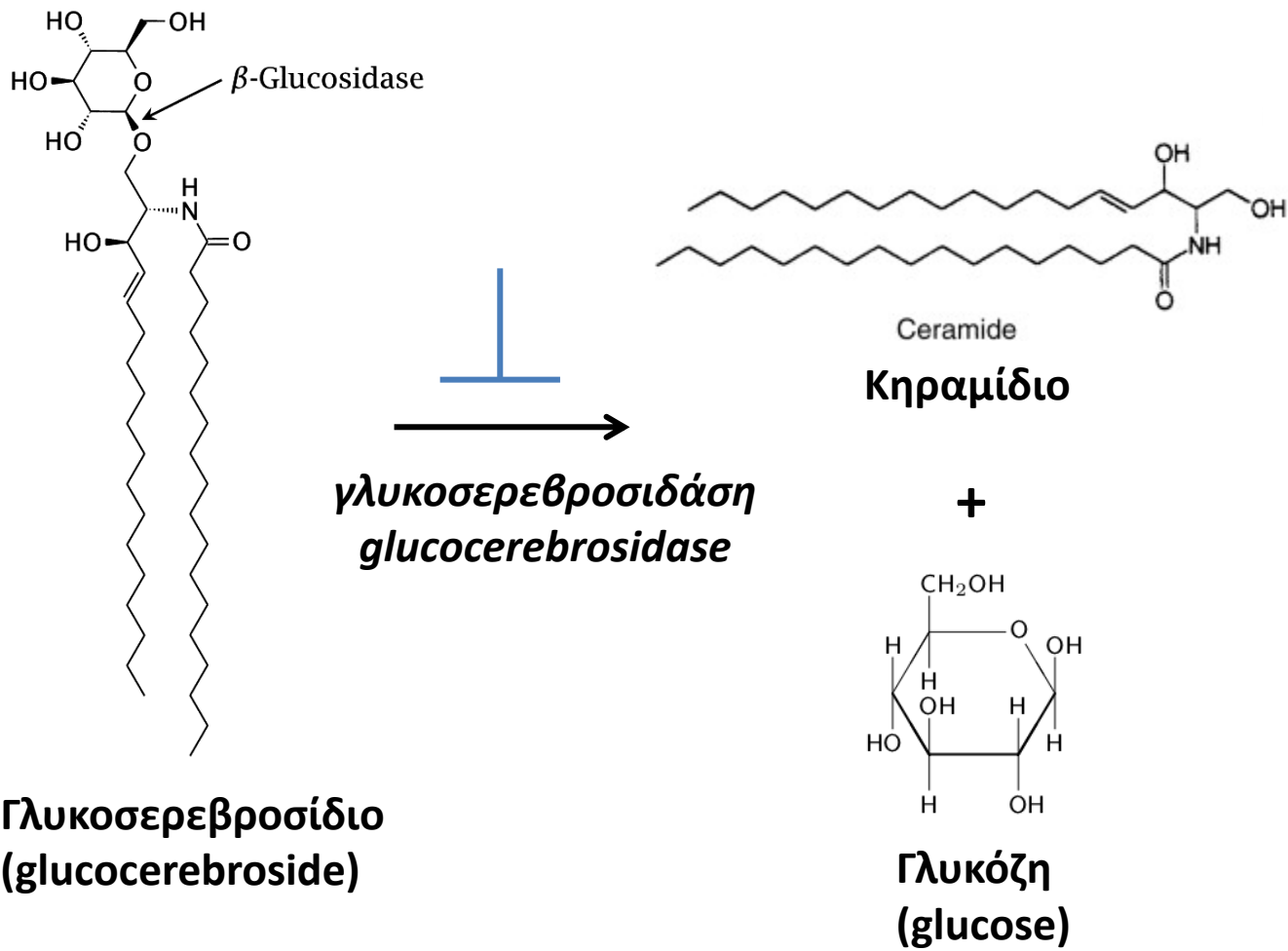
Τα ένζυμα στην Ιατρική: Νόσος Gaucher

Η **Νόσος Gaucher**: γενετική νόσος που οφείλεται σε ανεπαρκή επίπεδα ή δράση του λυσοσωμικού ενζύμου **γλυκοσερεβροσιδάση** (χρωμόσωμα 1).



- Σπληνομεγαλία (μέχρι και 50x)
- Ηπατομεγαλία (μέχρι και 5x)
- Διαταραχές των οστών
- Αναιμία
- Καθυστέρηση στην ανάπτυξη
- Νευρολογικές διαταραχές

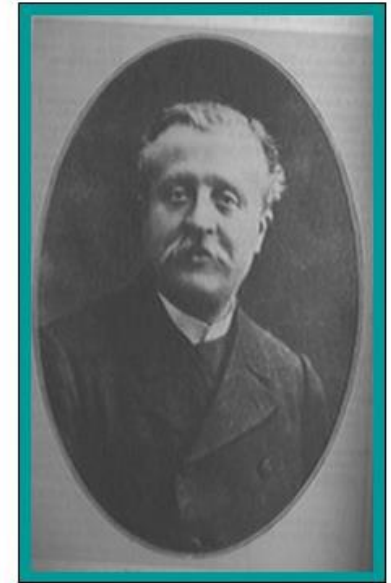
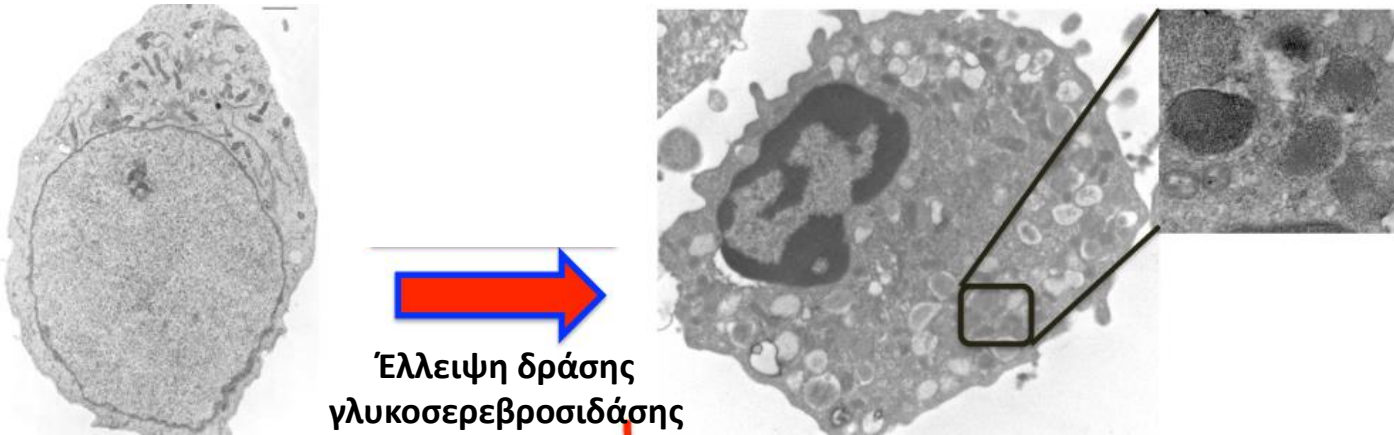
Νόσος Gaucher: αντίδραση γλυκοσερεβροσιδάσης



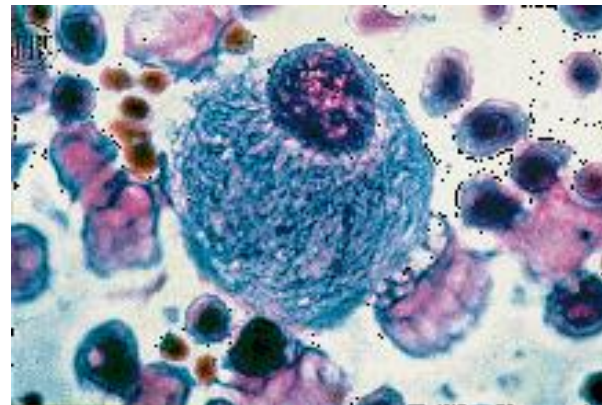
Σφιγγολιπίδιο που βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες

Νόσος Gaucher: τα κύτταρα Gaucher

- Η Νόσος Gaucher (GD) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1882 από το γάλλο γιατρό Philippe Gaucher.
- Το χαρακτηριστικό της GD είναι τα **κύτταρα Gaucher**: διογκωμένα **μακροφάγα** κύτταρα που περιέχουν λυσοσώματα με συσσωρευμένο γλυκοσερεβροσίδιο.



Philippe Gaucher
1854 – 1918



Νόσος Gaucher: Θεραπευτικές προσεγγίσεις

- Θεραπεία αντικατάστασης ενζύμου (**Enzyme Replacement Therapy, ERT**)
- Η χορήγηση ενεργού ενζύμου είναι ενδοφλέβια, διαρκεί 1-2 ώρες, γίνεται συνήθως κάθε 2 εβδομάδες.



Pretreatment
Age 8 Years, 8 Months



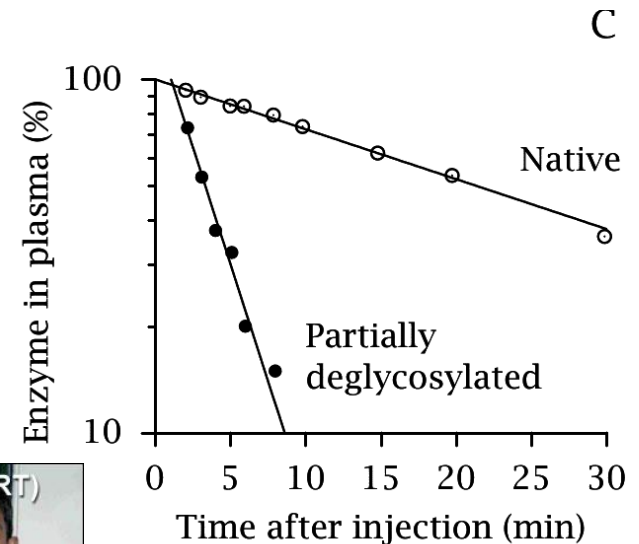
Post-treatment
Age 10 Years, 10 Months



Enzyme Replacement Therapy (ERT)

Before ERT

After ERT



C

Τα ένζυμα στην Ιατρική: Νόσος Gaucher

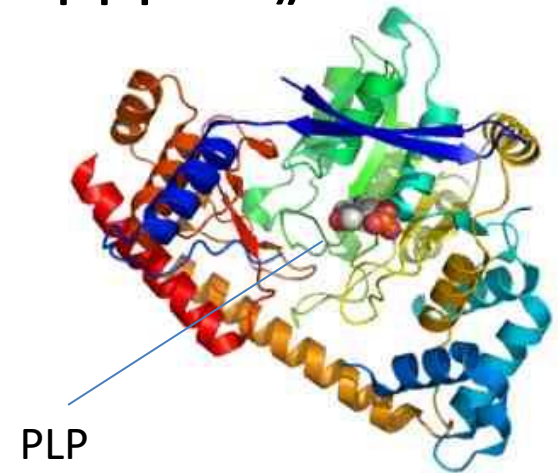
- Θεραπεία μείωσης υποστρώματος (**Substrate Reduction Therapy, SRT**)
- Μειώνει την παραγωγή του γλυκοσερεβροσιδίου.
- Είναι εφικτή για συγκεκριμένους ασθενείς, δυστυχώς όχι παιδιά.
- Το φάρμακο (αναστολέας σύνθεσης γλυκοσερεβροσιδίου) χορηγείται από το στόμα (χάπι) οπότε δεν έχει τα μειονεκτήματα της μετάγγισης.

Τα ένζυμα στη διαγνωστική / κλινική ανάλυση

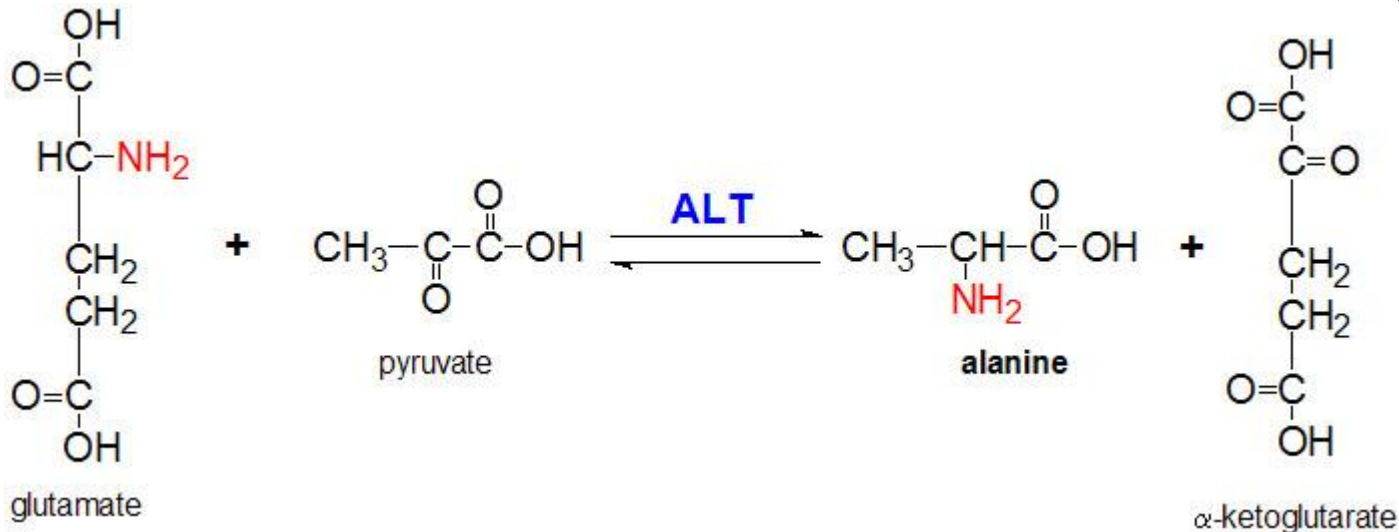
Βλάβες στο ήπαρ (ηπατίτιδα, μονοπυρήνωση, καταστροφή ήπατος)

Τρανσαμινάση (ή μεταφοράση) της αλανίνης (alanine transferase, ALT)

- ❑ Είναι ομοδιμερές ένζυμο
- ❑ Έχει ως συνένζυμο τη φωσφορική πυριδοξάλη
- ❑ Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στις μεμβράνες
- ❑ Βρίσκεται στο αίμα και σε διάφορους ιστούς με ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα στο ήπαρ



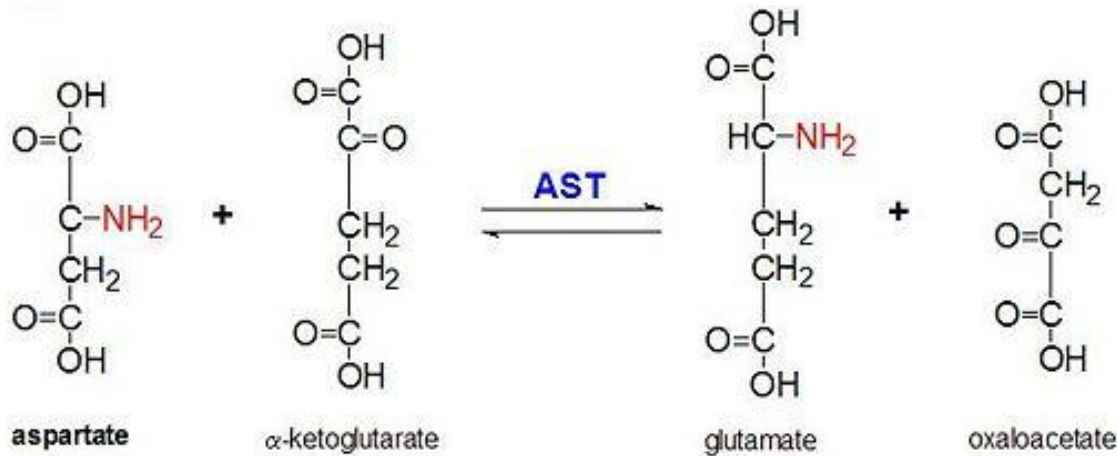
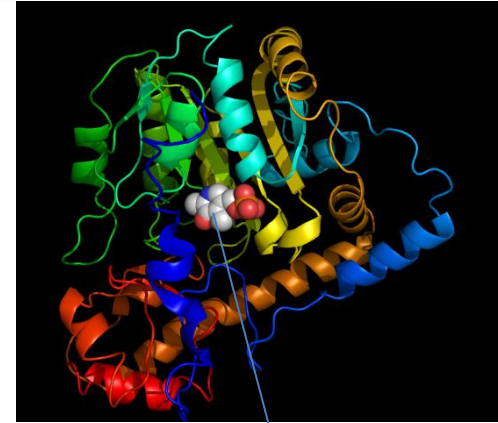
Φ.Τ. 9 to 60 IU/L



Τα ένζυμα στη διαγνωστική / κλινική ανάλυση

Αμινομεταφοράση του ασπαρτικού ή ασπαραγινική τρانشαμινάση (aspartate transferase, AST)

Βρίσκεται στο αίμα και σε διάφορους ιστούς (ήπαρ, νεφροί, καρδιά, εγκέφαλος και σκελετικοί μύες)



PLP

Φ.Τ. 10 to 40 IU/L

Χρήση τιμής ALT και λόγου AST / ALT (Φ.Τ. ~ 2)

Συνεχείς ενζυμικές μέθοδοι: Φωτομετρία

Αρχή μεθόδου

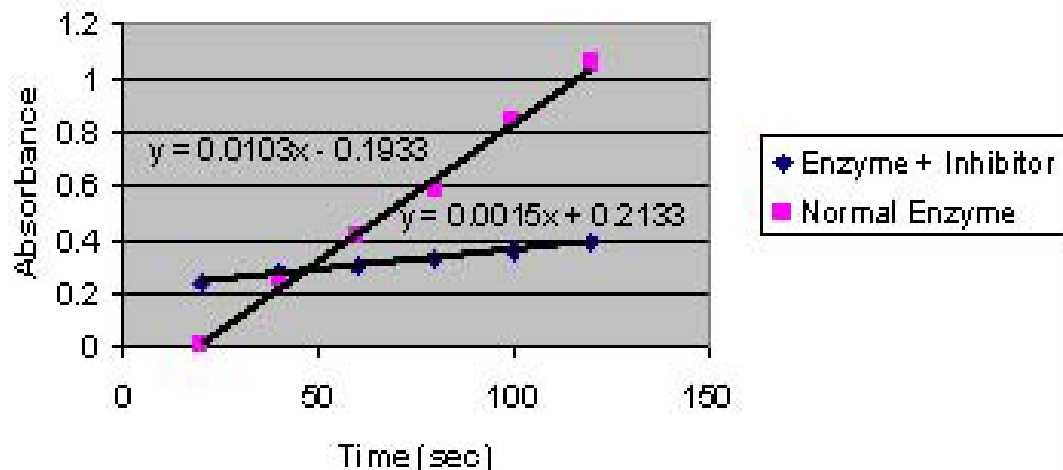
Η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου γίνεται με μέτρηση της αλλαγής της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης.

- Μετρήσεις σε χρονικά διαστήματα 30 s ή 60 s (600 s και 1200 s για πολύ αργές αντιδράσεις). Συνολικός χρόνος μέτρησης 3 ως 20 min

- Σε περίπτωση μη γραμμικής σχέσης ([S] δεν είναι αρκετά μεγαλύτερη της K_m) – μέτρηση της αρχικής ταχύτητας

- Μέτρηση σε επίπεδα μmol

→ Μέτρηση του λόγου: $\frac{\Delta A}{\Delta t}$



Συνεχείς ενζυμικές μέθοδοι: Φωτομετρία

Υπολογισμοί

$$A = \epsilon b C$$

$$C = \frac{A}{\epsilon b}$$

Οπότε:

$$\Delta C = C_1 - C_2 = \frac{\Delta A}{\epsilon b} (\text{mmol l}^{-1})$$

→

$$\frac{\Delta C \times V}{\Delta t} = \frac{\Delta A \times V \times 1000}{\epsilon \times b \times \Delta t}$$

ενεργότητα ($\mu\text{mol min}^{-1}$, U)

όπου A – απορρόφηση

ϵ – συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ($\text{mmol}^{-1} \text{ l mm}^{-1}$)

b – πάχος κυψελίδας (mm)

C – συγκέντρωση ουσίας (mmol l^{-1})

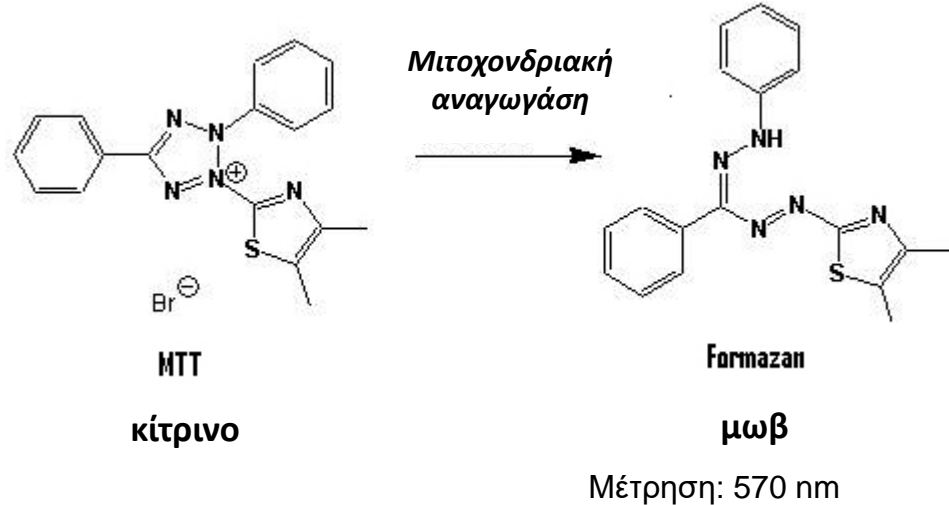
V – όγκος μετρούμενου διαλύματος σε L

Συνεχείς ενζυμικές μέθοδοι: Φωτομετρία

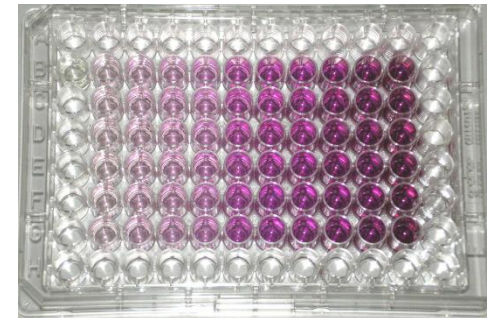
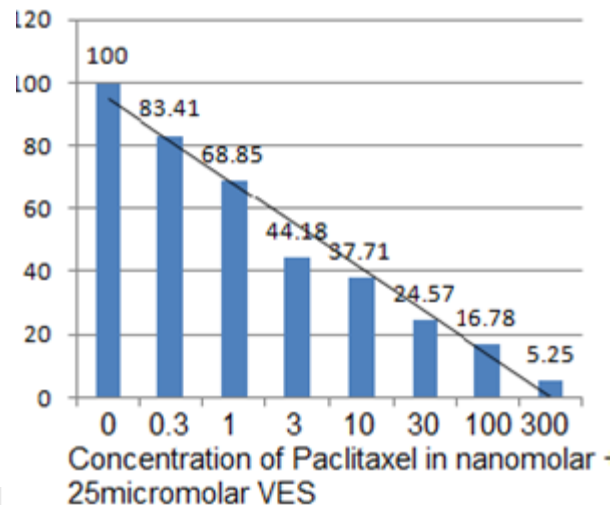
Παραδείγματα Μέθοδος μέτρησης MTT

Χρήσεις:

- προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων
- προσδιορισμός ρυθμού ανάπτυξης κυτταρικών πληθυσμών
- προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας φαρμακευτικών ουσιών

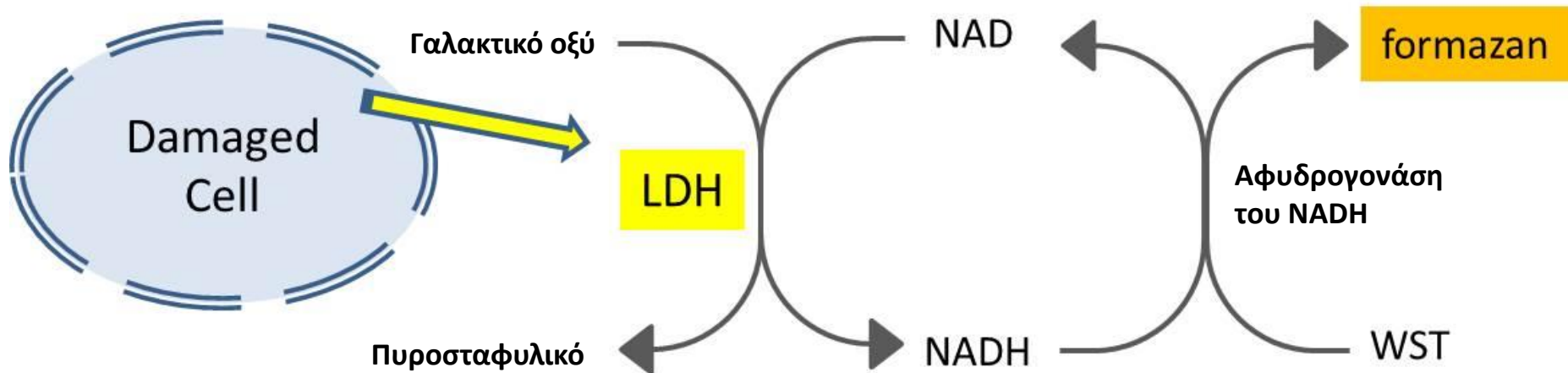


βιωσιμότητα των
κυττάρων (%)



Συνεχείς ενζυμικές μέθοδοι: Φωτομετρία

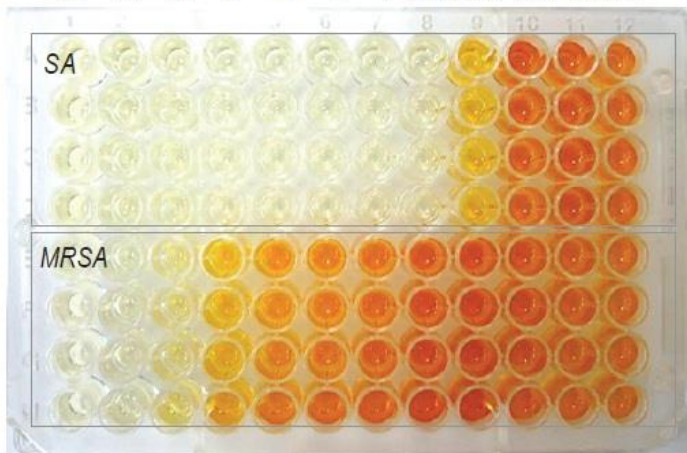
Παραδείγματα Μέθοδος μέτρησης LDH



Μέτρηση: 340 nm

Oxacillin concentration, $\mu\text{g/ml}$

64 32 16 8 4 2 1 0.5 0.25 0.13 0.06 0



Χρήσεις:

- προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων
- προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας φαρμακευτικών ουσιών

Συνεχείς ενζυμικές μέθοδοι: Φωτομετρία

Άσκηση

Υπολογισμός ενεργότητας γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) σε ορό αίματος με πυροσταφυλικό οξύ και NADH βασίζεται στη μέτρηση ταχύτητας οξειδωσης του NADH σε NAD:

$$\lambda = 365 \text{ nm}, b=10\text{mm}, \epsilon = 0,340 \text{ l mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$$

$$\Delta A/\Delta t = 0,100 / 8 \text{ min}, V_{\text{κυψ}} = 3,0 \text{ ml και } V_{\text{δείγματος}} = 0,02 \text{ ml}$$

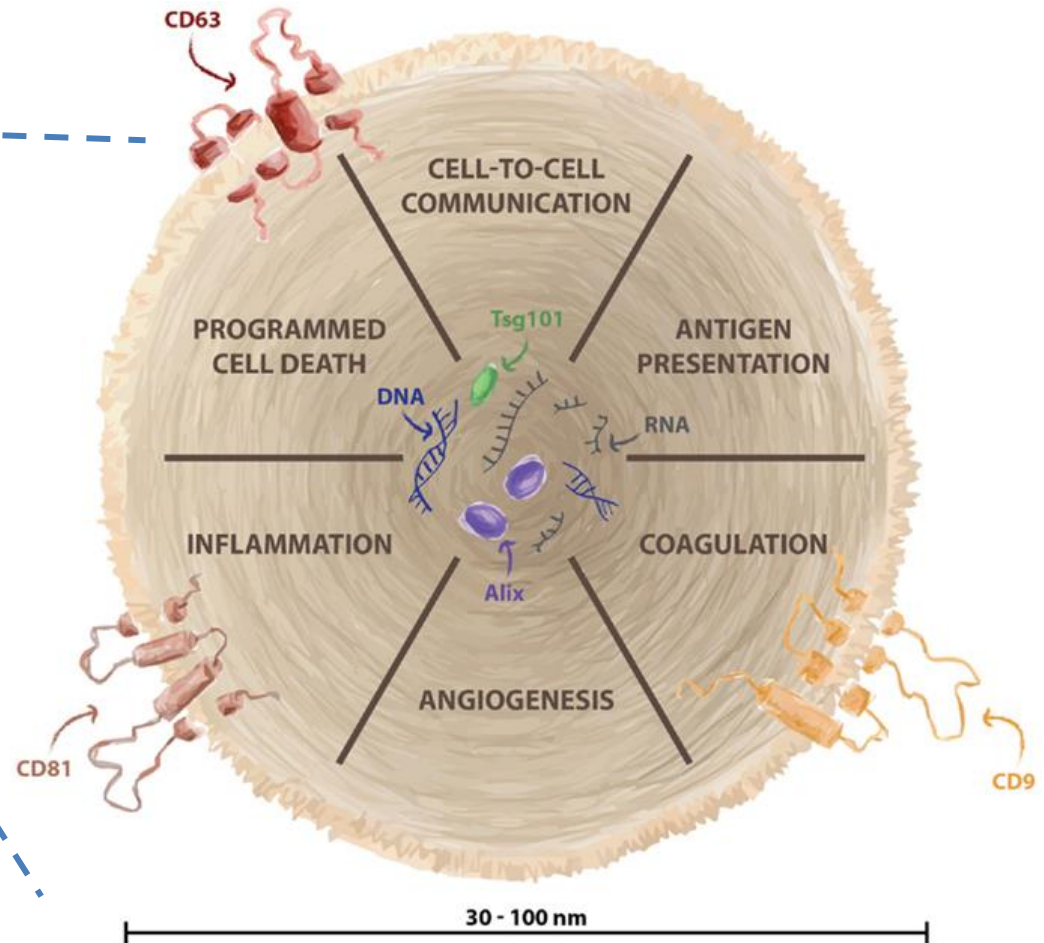
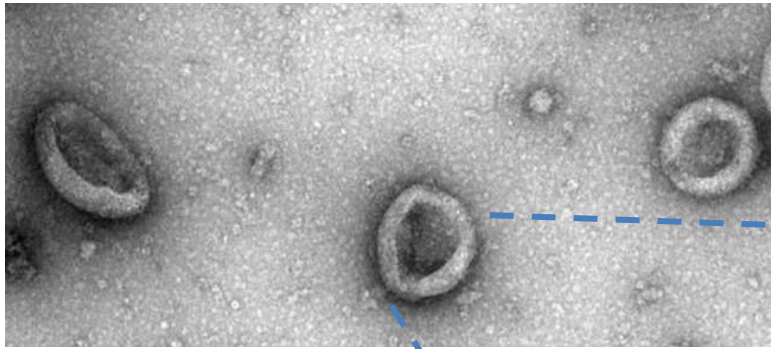
Να υπολογιστεί η ενεργότητα του LDH σε $\mu\text{mol}/\text{min}$ (U) και σε U/100ml ορού

$$\text{βάση της σχέσης (11) η ενεργότητα LDH} = (0,100 \times 3,0 \times 10^{-3} \times 1000) / (0,34 \times 10 \times 8) = 0,011 \text{ U}$$

$$\text{ενεργότητα LDH σε 100 ml ορού} = 0,011 \times 100 / 0,02 = 55 \text{ U} / 100 \text{ ml}$$

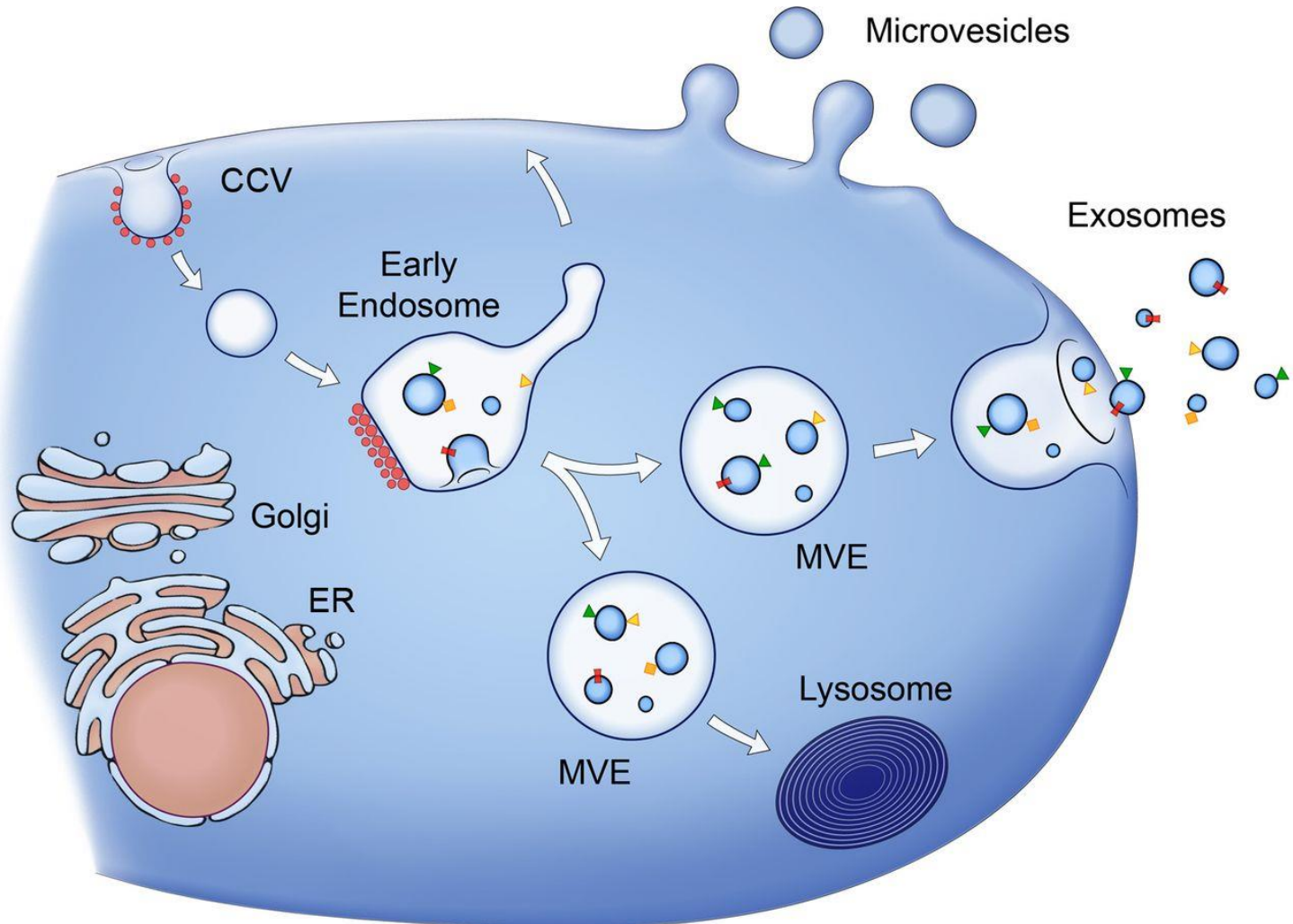
Η ενζυματική ανάλυση στην έρευνα

Ο προσδιορισμός της ποσότητας ενός ενζύμου μέσω φωτομετρίας για τον έμμεσο προσδιορισμό του αριθμού των εξωσωμάτων.



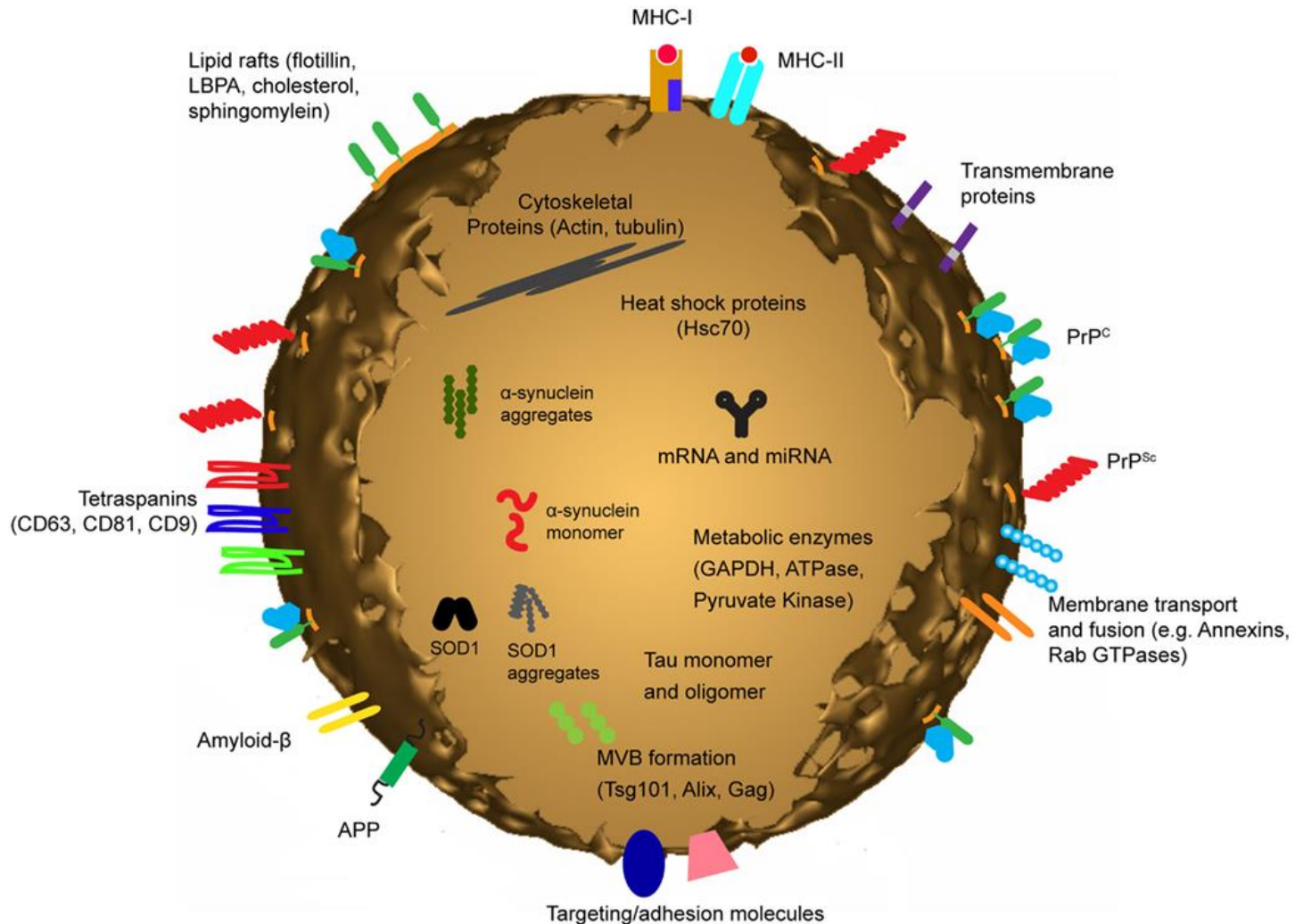
Η ενζυματική ανάλυση στην έρευνα

Δημιουργία και έκκριση εξωσωμάτων

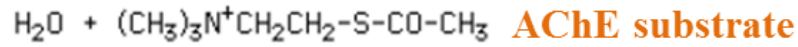


Η ενζυματική ανάλυση στην έρευνα

Ο ρόλος των εξωσωμάτων έχει υποδειχθεί από τις πρωτεΐνες που «κουβαλούν».



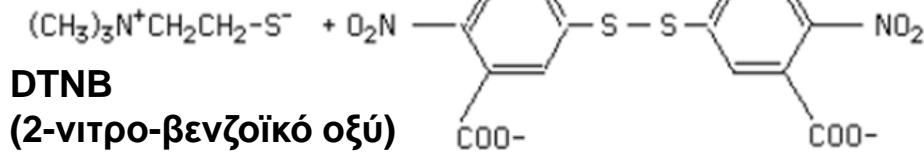
Η ενζυματική ανάλυση στην έρευνα



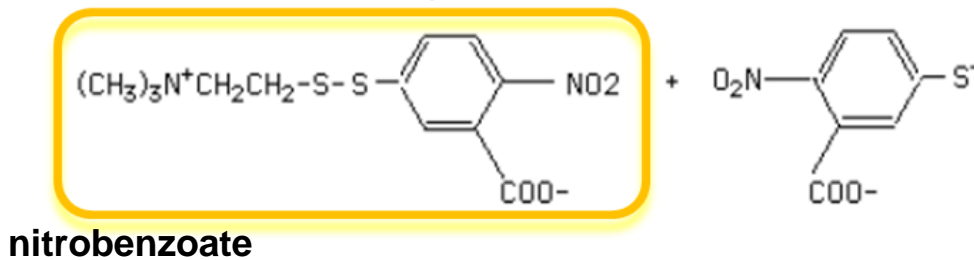
hydrolysis

AchE

Ακέτυλο-θειοχολίνη

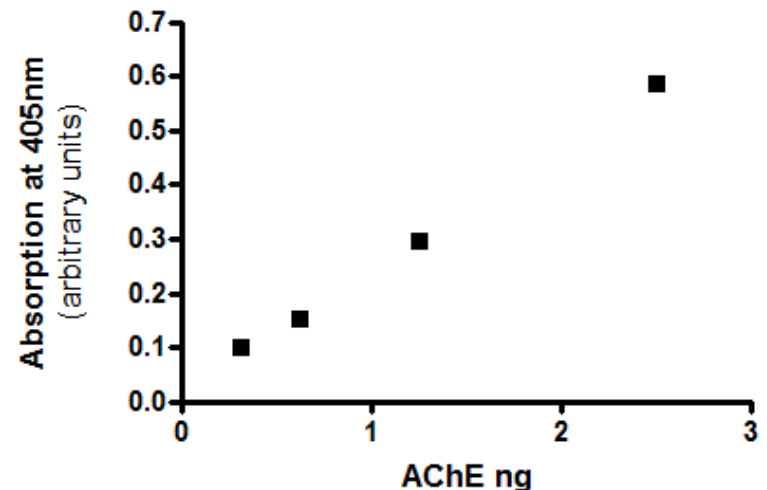


reduction



**Absorbs at
405nm**

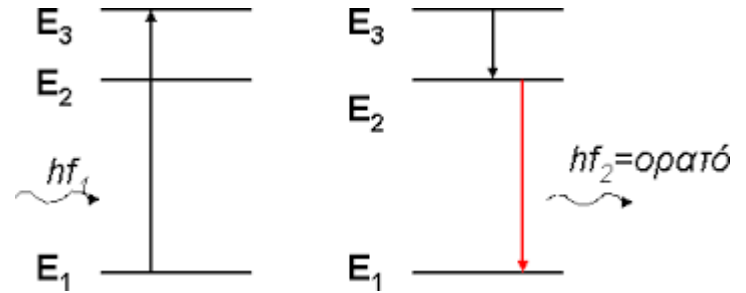
**Η δοκιμασία Ellman για τον
προσδιορισμό της
ακετυλοχολινεστεράσης**



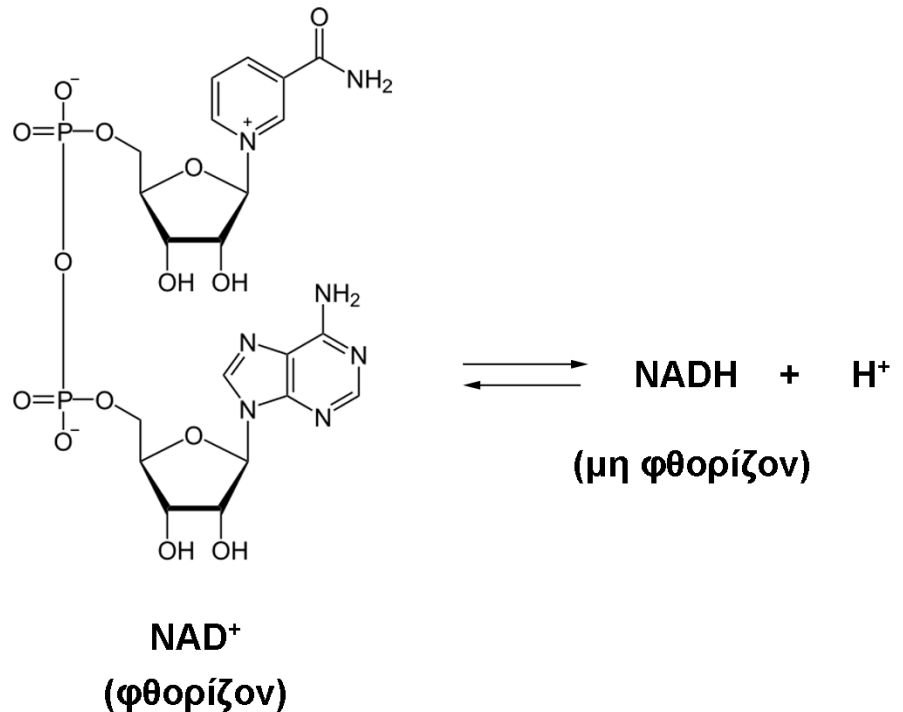
Συνεχείς ενζυμικές μέθοδοι: Φθορισμός

ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου γίνεται με μέτρηση της αλλαγής του φθορισμού κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης.



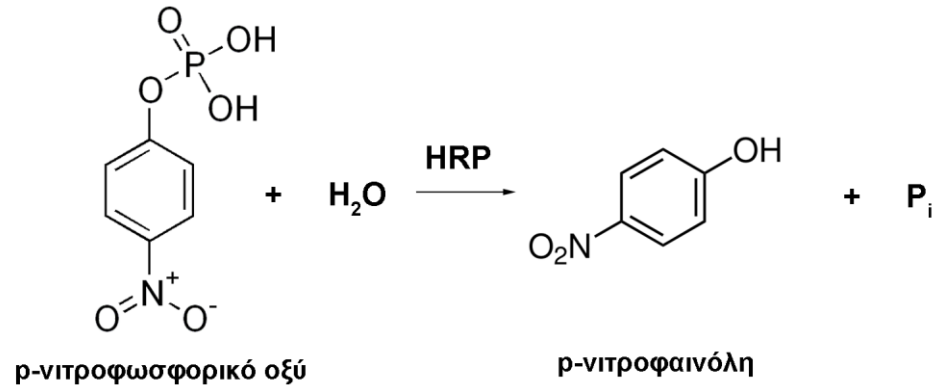
- Προσφέρουν 100-1000 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από τις φωτομετρικές τεχνικές
- Μέτρηση σε επίπεδα nmol



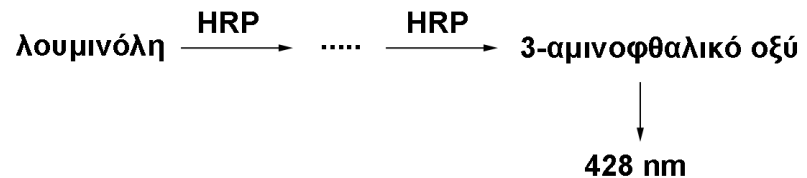
Συνεχείς ενζυμικές μέθοδοι: Φωταύγεια

ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ: η εκπομπή προέρχεται από διεγερμένο σωματίδιο που παράγεται από μια χημική αντίδραση (συντά του αναλύτη και ενός ισχυρού οξειδωτικού).

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του προϊόντος γίνεται με μέτρηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας που εκλύεται κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης.



Φωτομετρικός προσδιορισμός

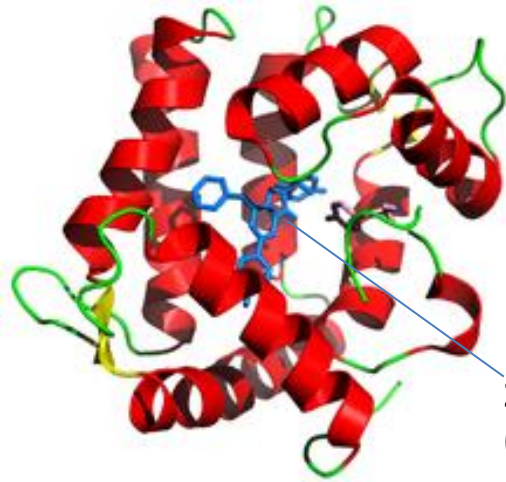


Χημειοφωταυγιομετρικός προσδιορισμός (ECL)

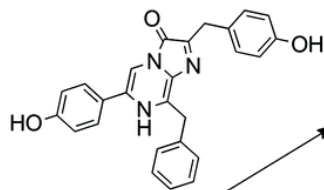
Συνεχείς ενζυμικές μέθοδοι: Φωταύγεια

ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

Ακουορίνη

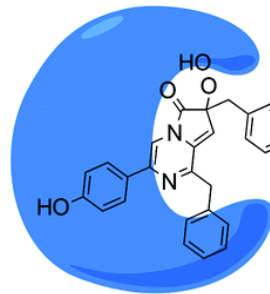


Σελεντεραζίνη
(luciferin)



Από-ακουορίνη

O₂

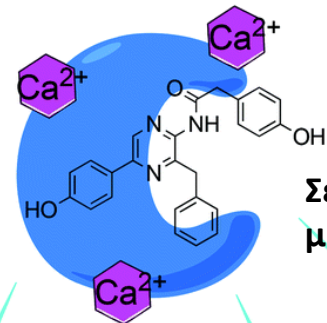


Ακουορίνη
(luciferase)

οξείδωση

CO₂

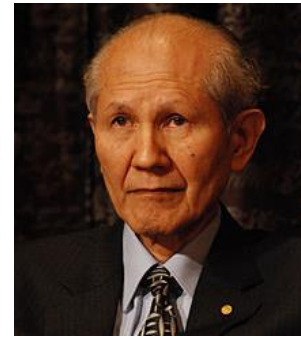
- Ca²⁺



Σελεντερα-
μίδιο

light

465 nm

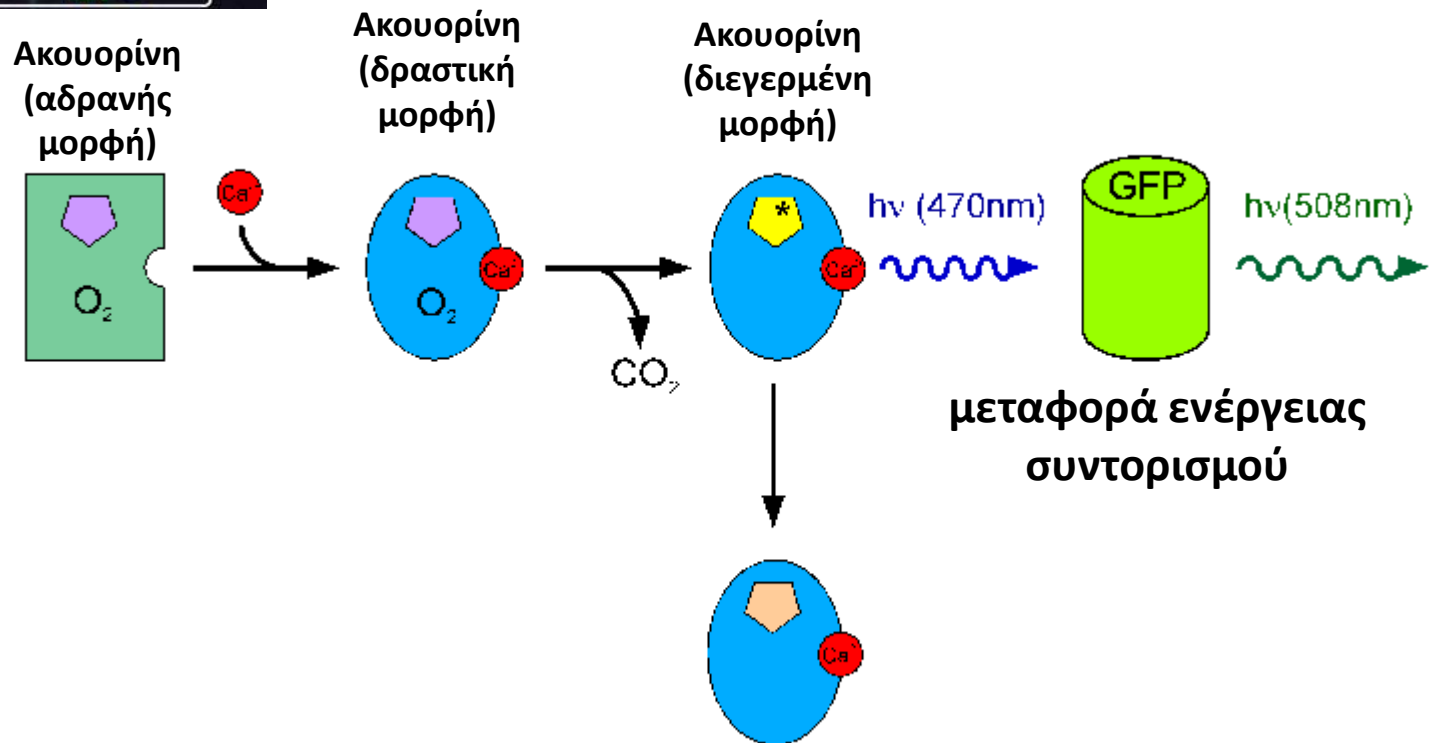
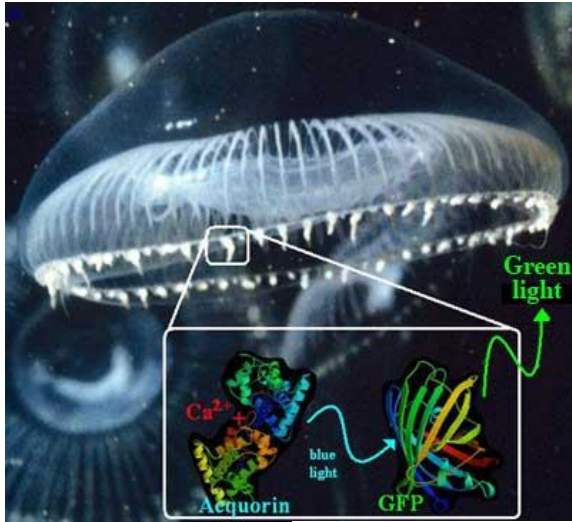


Osamu Shimomura
(Nobel Χημείας 2008)

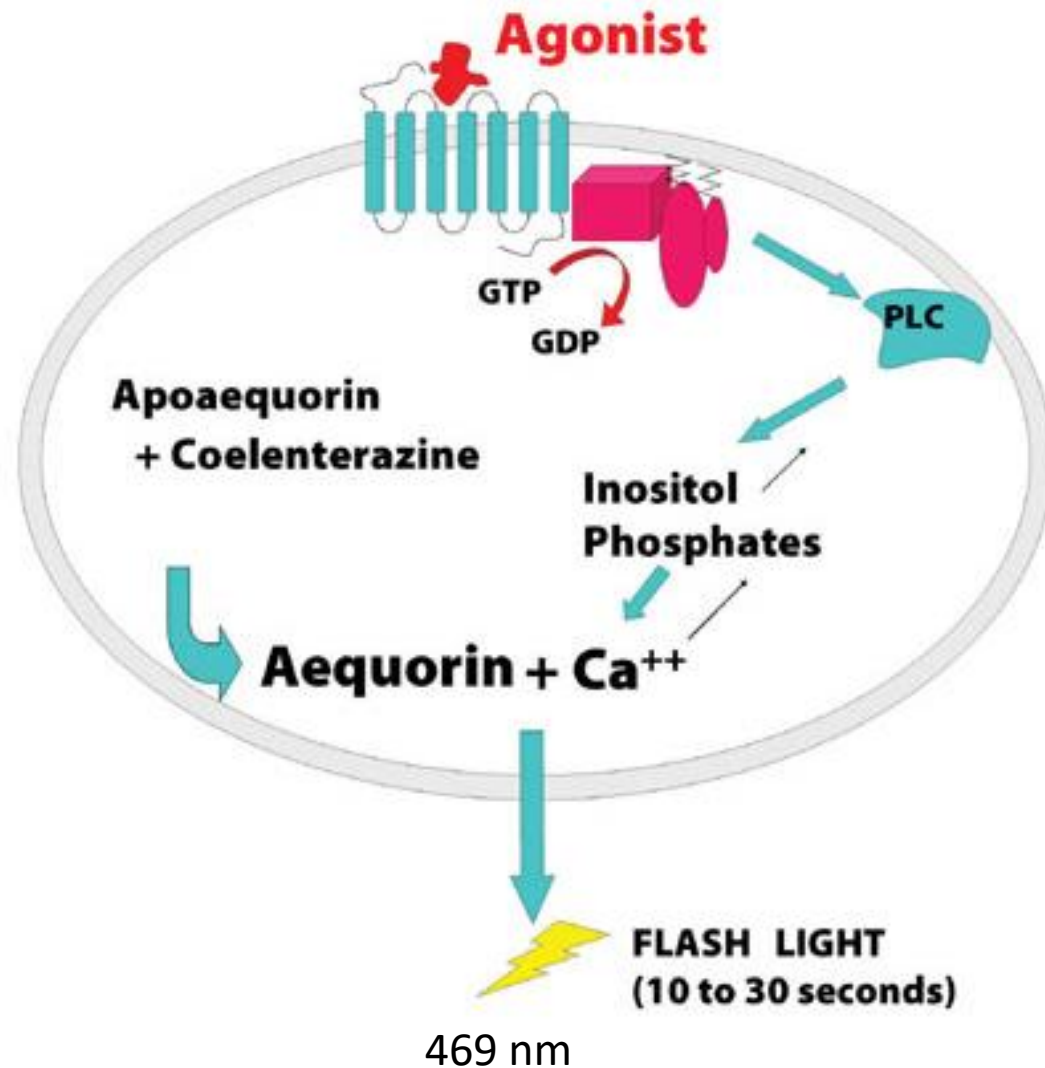


Aequorea victoria

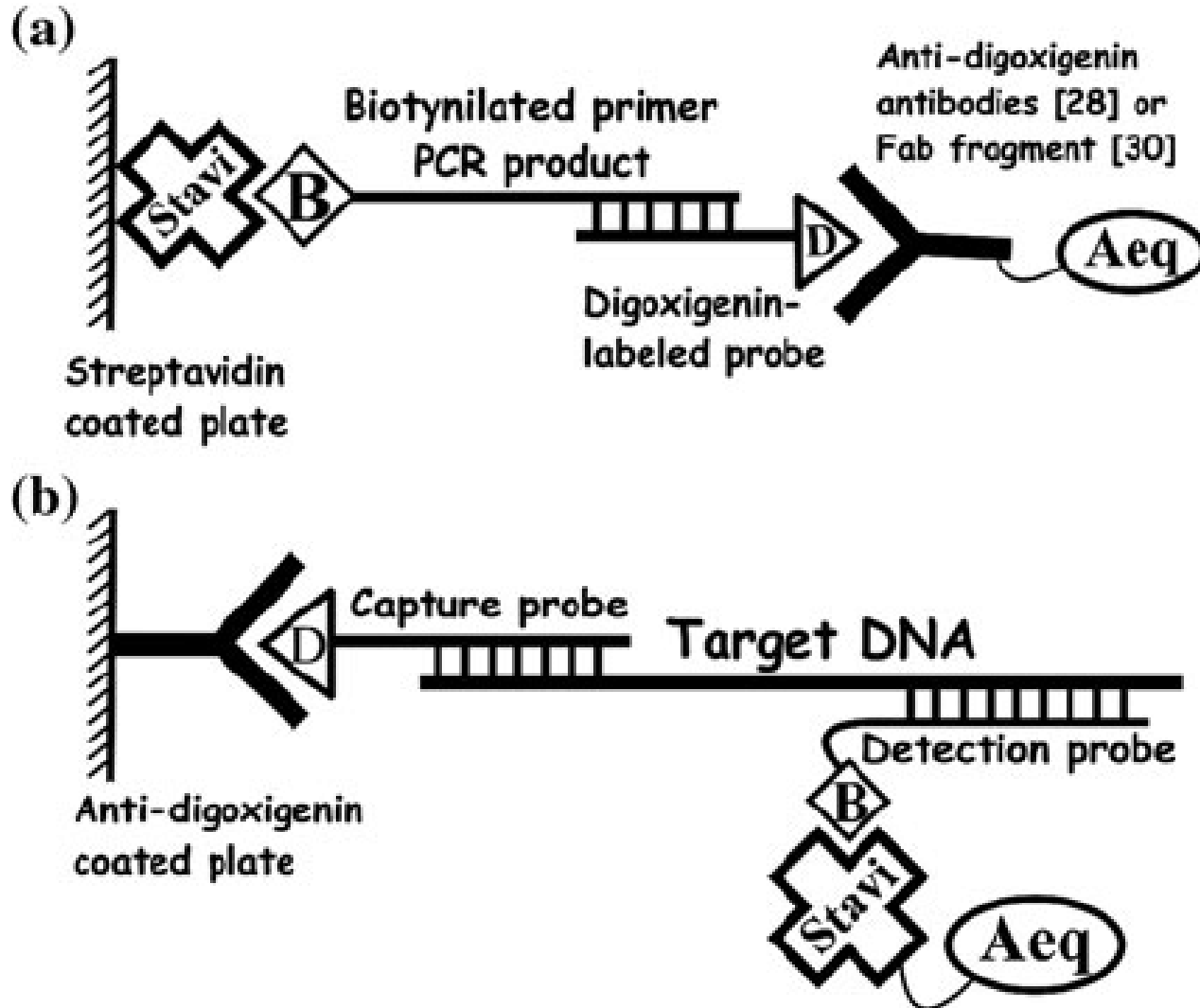
Η Ακουορίνη στη φύση



Η ακουορίνη ως ανιχνευτής ασβεστίου



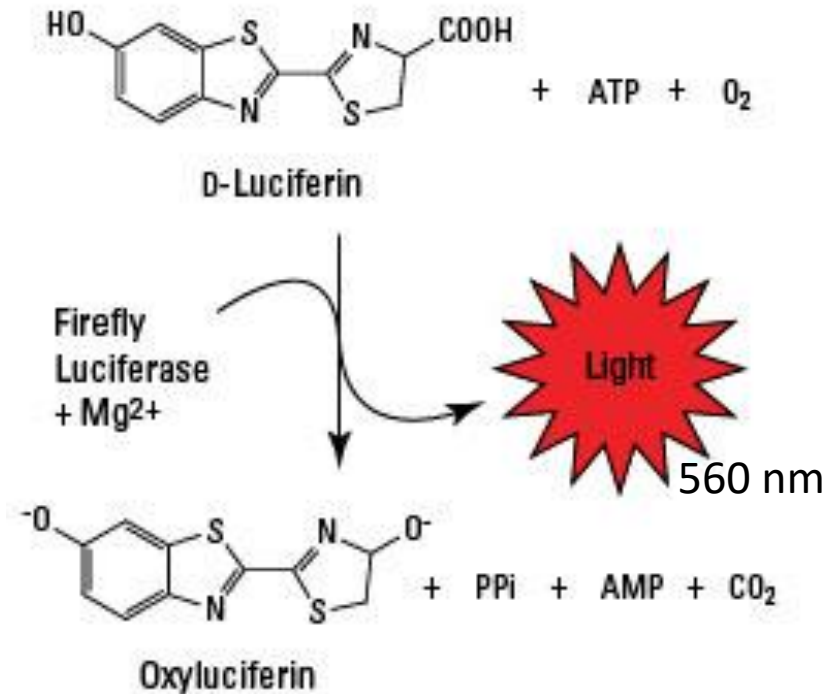
Η ακουορίνη ως ιχνηθέτης



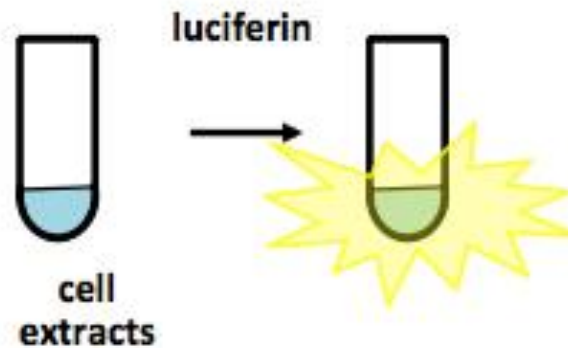
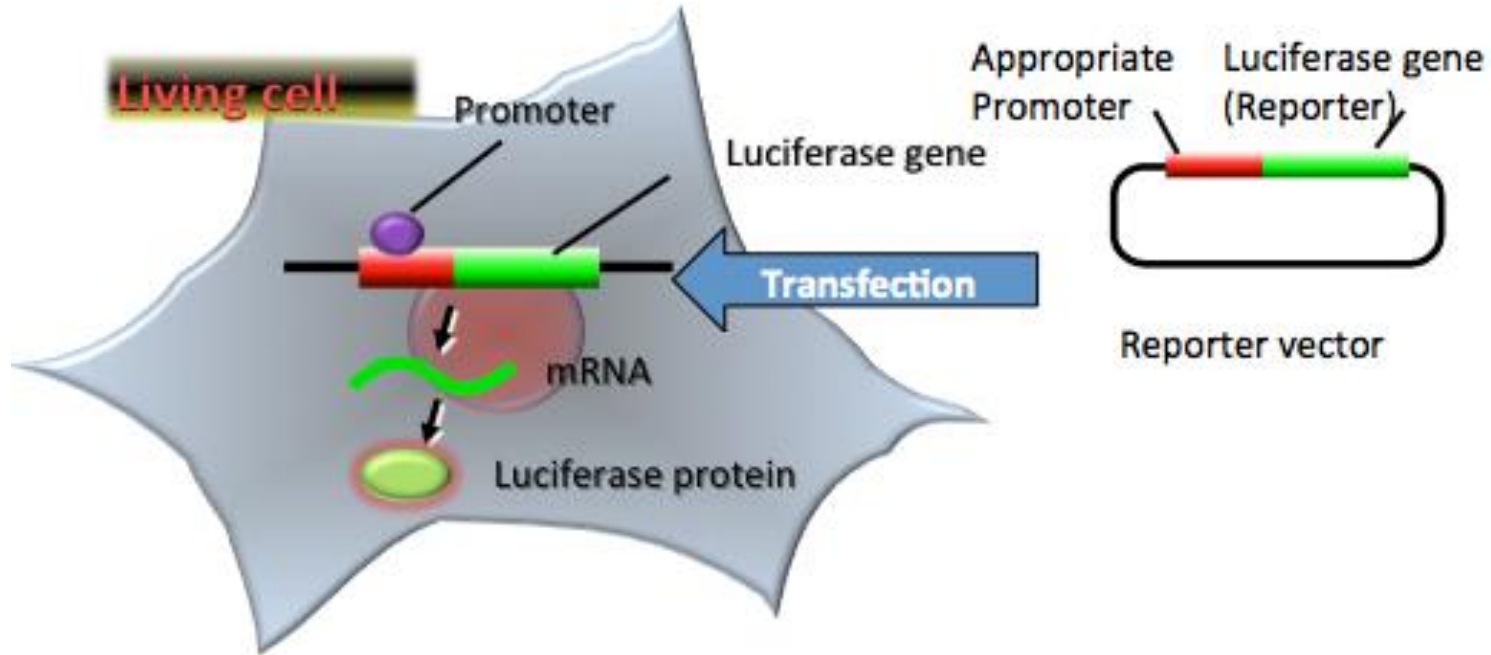
Η βιοφωταύγεια της πυγολαμπίδας



Το ζευγάρι λουσιφεράσης – λουσιφερίνης της πυγολαμπίδας

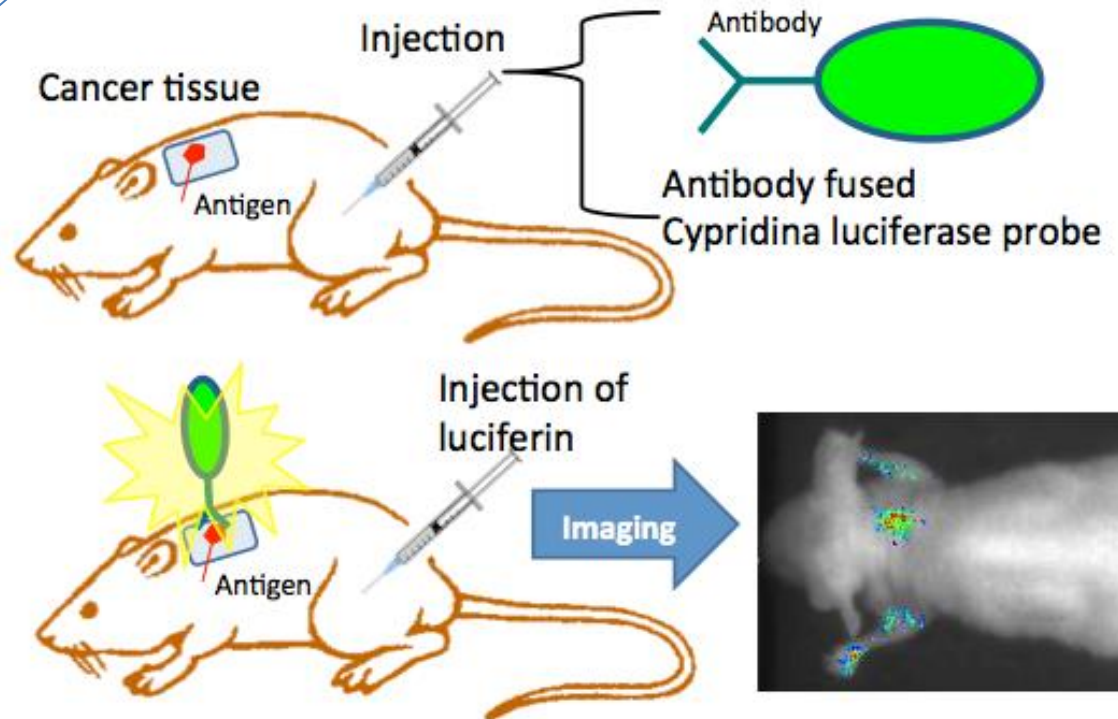
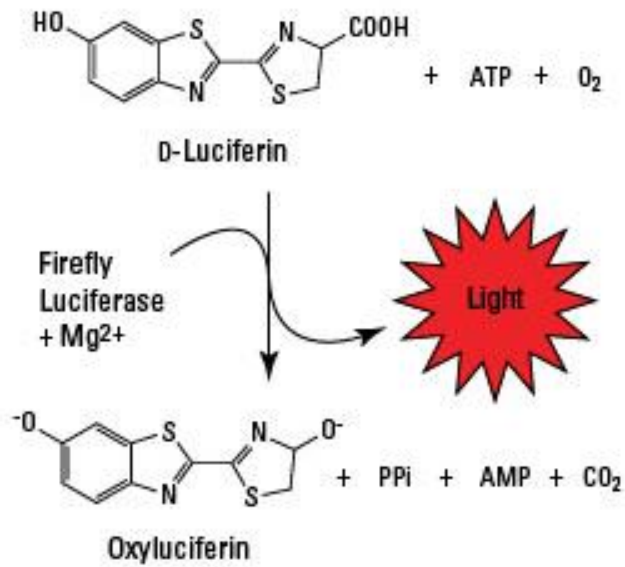


Η μέτρηση βιοφωταύγειας ως μέτρο ενεργοποίησης υποκκινητών



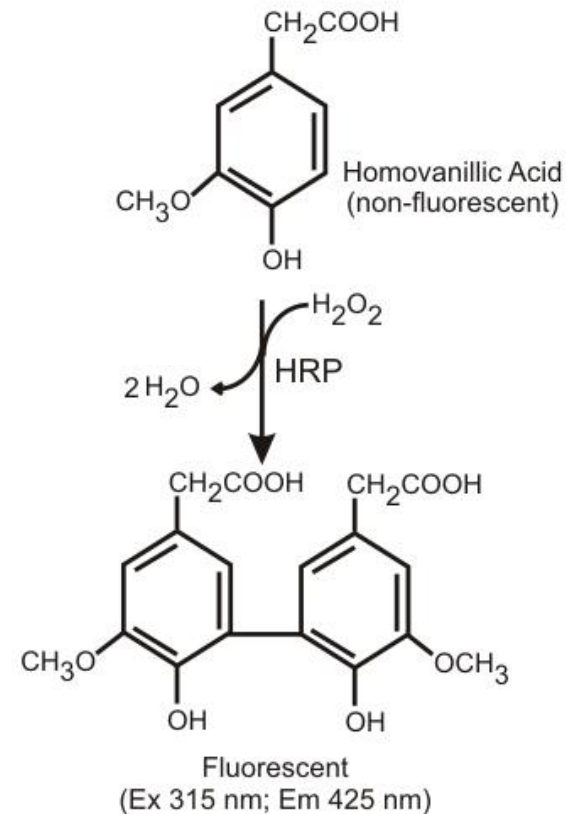
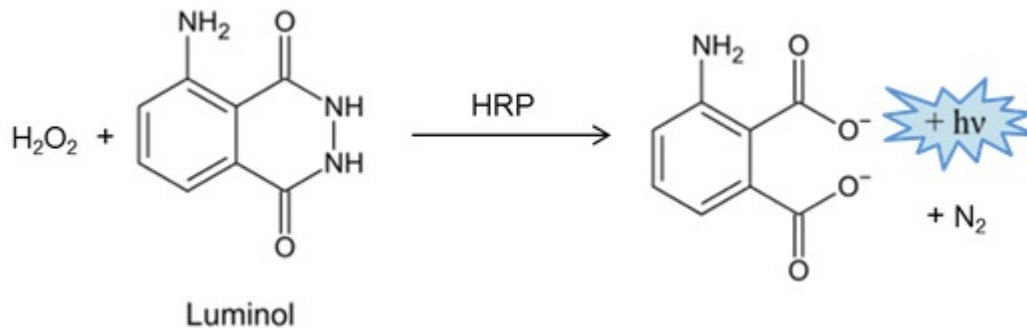
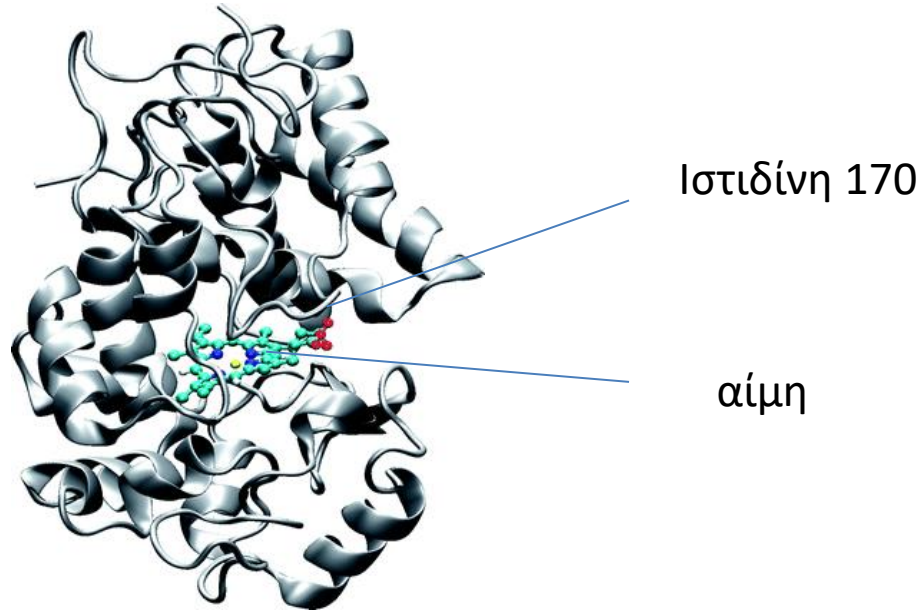
$$\text{Promoter activity} = \text{Luciferase activity} / \text{Cell number or cellular enzyme activity}$$

Βιοφωταύγεια για την ανίχνευση καρκινικού ιστού

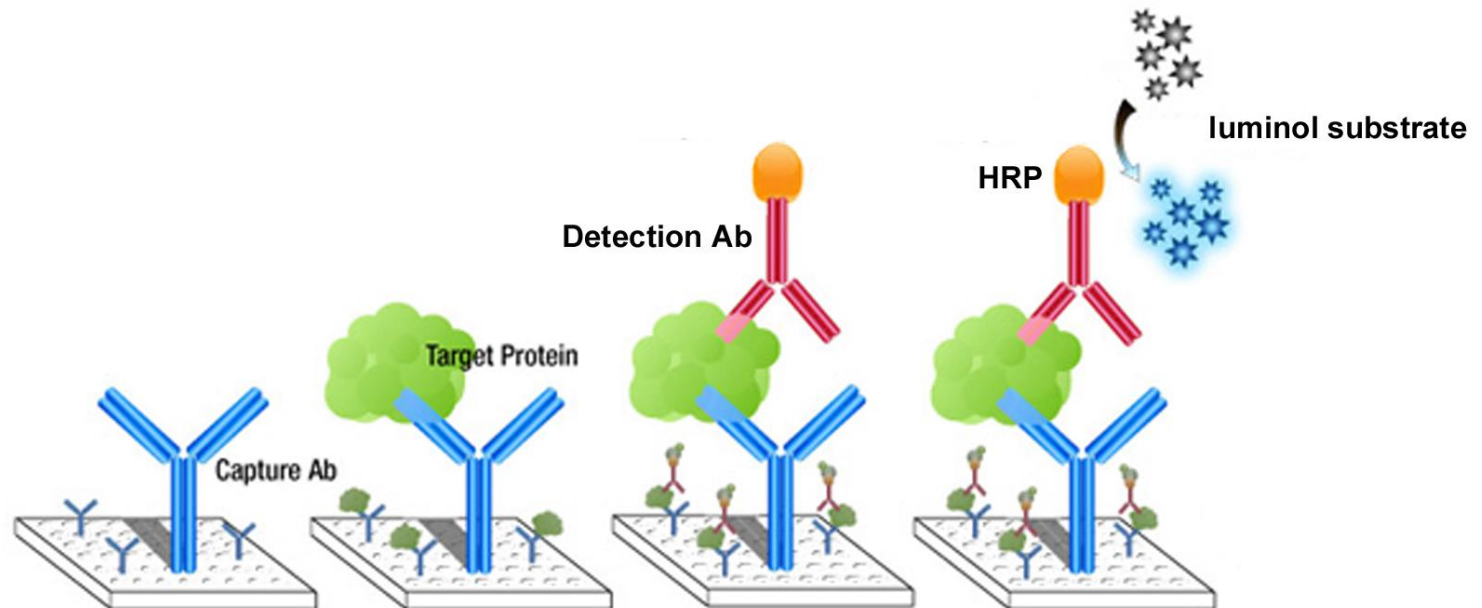
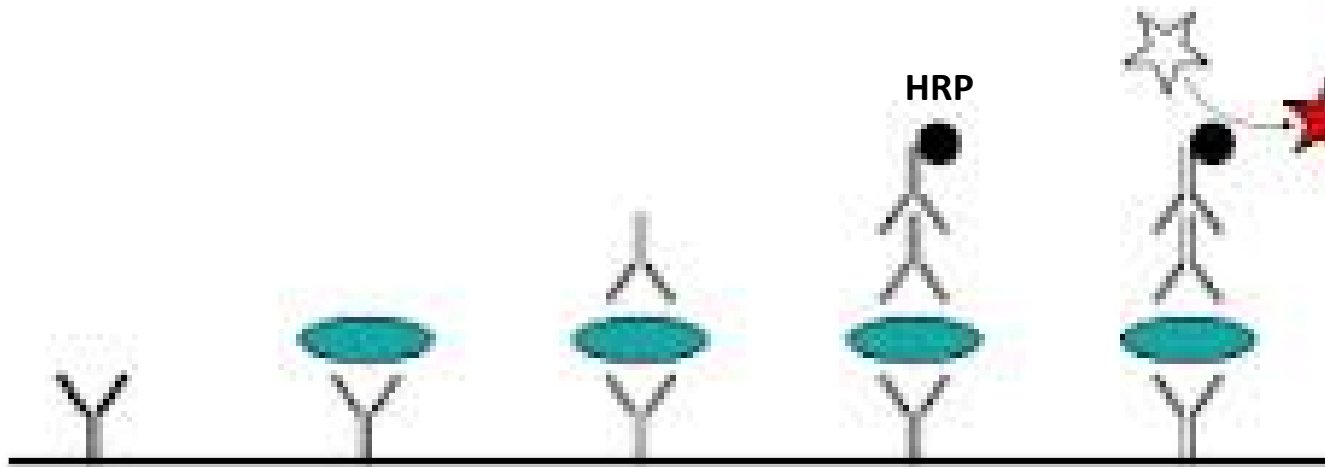


Τα ένζυμα στη βιοχημεία: χημειοφωταύγεια

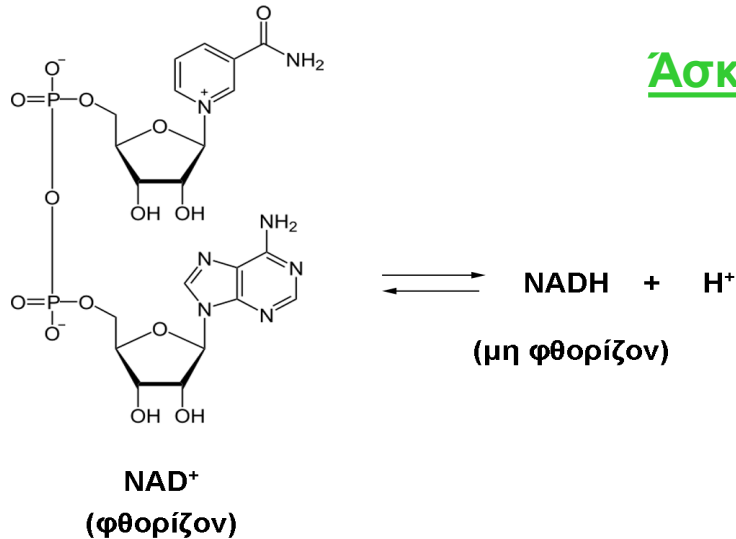
Υπεροξειδάση του αγριοραπανιού (horseradish peroxidase, HRP): ο τέλειος ιχνηθέτης



Χρήση του ενζύμου HRP σε δοκιμασίες ELISA



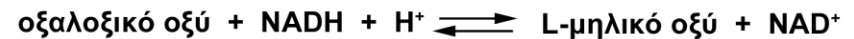
Άσκηση



αλκοολική
αφυδρογονάση



μηλική
αφυδρογονάση



Παράδειγμα:

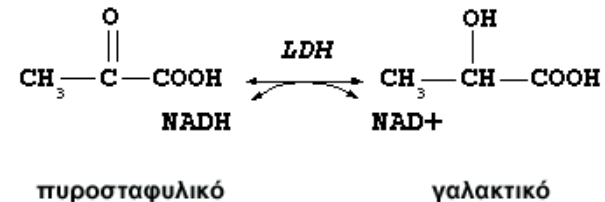
Προσδιορισμός πυροσταφυλικού οξέος στο αίμα

Αποπρωτεΐνωση δείγματος

Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος (τελική αραίωση δείγματος 2,5 φορές)

$V_s = 2,0 \text{ ml}$, $V_t = 2,1 \text{ ml}$, $b = 1 \text{ cm}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $\Delta A = 0,150$, $\epsilon = 6,3 \text{ mmol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$, $MW = 88,06$

$$C = \frac{\Delta A}{\epsilon b} \times \frac{V_t}{V_s} \times 2,5 \times \frac{MW}{10} = 0,55 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$$



ΑΛΛΕΣ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΣΥΝΕΧΕΙΣ

- Θερμιδομετρία
- Σκέδαση φωτός

ΜΗ ΣΥΝΕΧΕΙΣ

- Ραδιομετρία
- Χρωματογραφία (HPLC, TLC)