

“Fermentų panaudojimas medicinoje ir pramonėje“

Valdas LAURINAVIČIUS

**Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras,
Biochemijos institutas,
Profesorius emeritas**

valdas.laurinavicius@bchi.vu.lt

Fermentai tai baltyminės struktūros, kurios organizme atlieka cheminių reakcijų katalizės bei cheminių procesų valdymo funkcijas.

FERMENTAI

- Atpažįsta savo substratą ir jį suriša aktyviame centre
- Katalizuoja surišto substrato cheminį virsmą
- Išstumia produktus ir regeneruoja aktyvų centrą

Baltymas, kurio $M=100\ 000\ \text{Da}$,

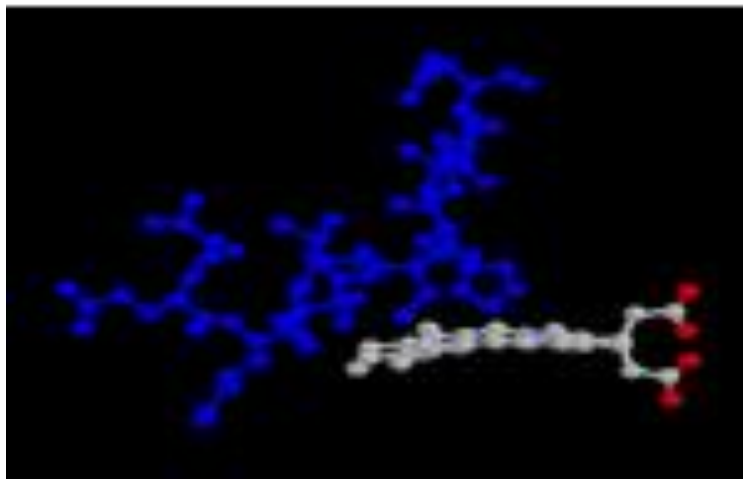
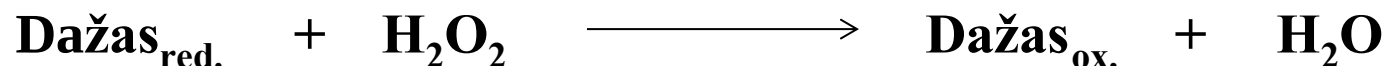
•apie 900 aminorūgščių;

•Apie:

- 4500 C atomų,
- 6500 H atomų,
- 1100 N atomų,
- 1300 O atomų.

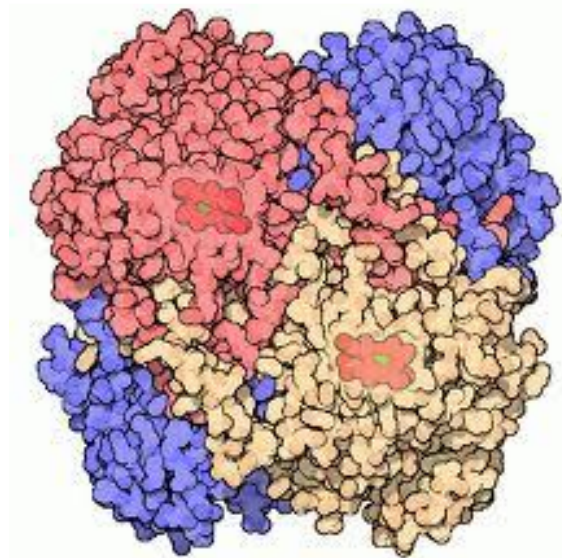
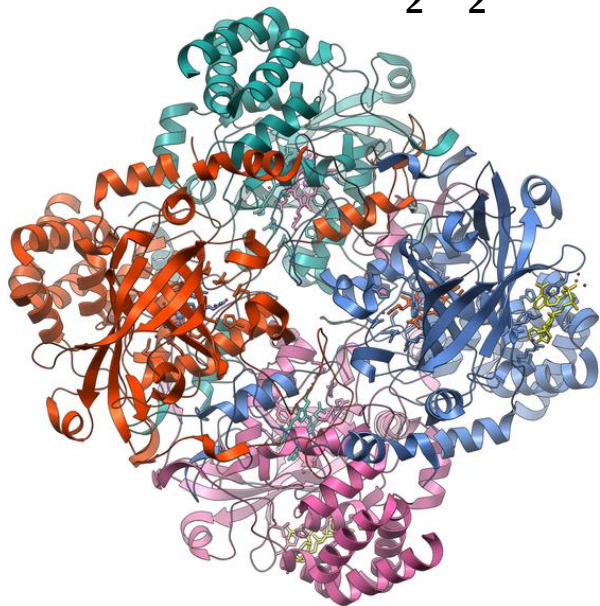
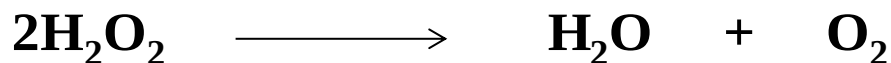
Yra labai mažų fermentų. Pavyzdžiui, mikro-peroksidazė. Ją sudaro 8-11 aminorūgščių ir hemos. Molekulinė masė tokio fermento yra apie 1500 Daltonų.

Fermentas katalizuoja vandenilio peroksido redukciją tam panaudodamas įvairius organinius junginius:



MP-11

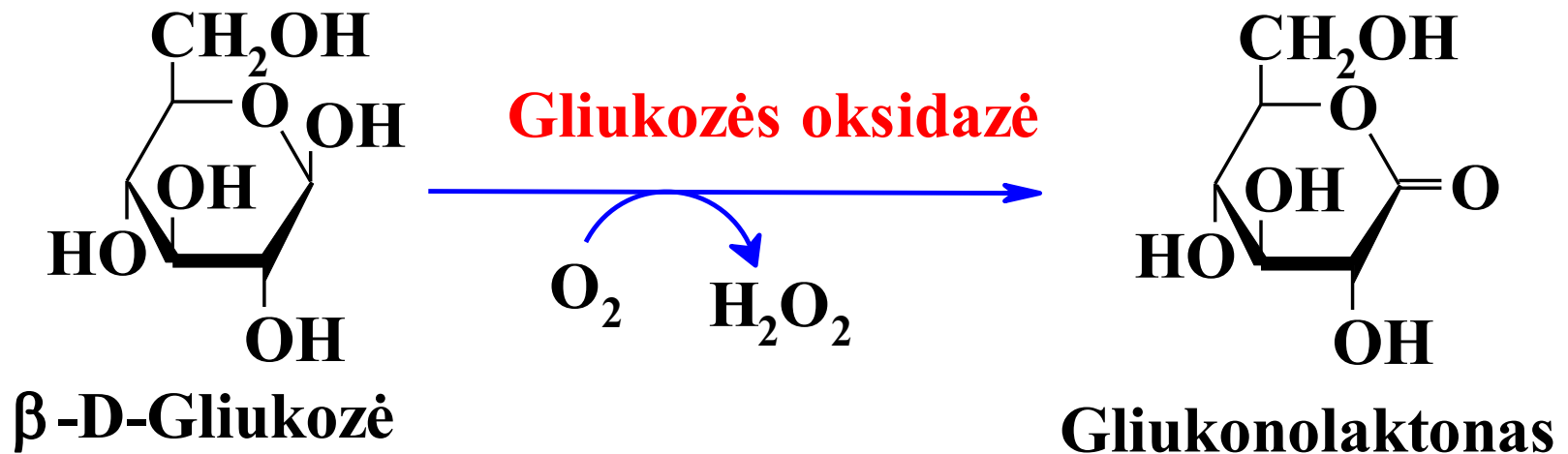
Yra ir labai didelių fermentų. Pavyzdžiui, katalazė. Fermentą sudaro 4 subvienetai, apie 2000 aminorūgščių. Kiekviename subviename po vieną hemą. Molekulinė masė apie 250 kDa. Fermento uždavinys – šalinti iš kraujo toksišką vandenilio peroksidą. Tam fermentas katalizuoja vienos vandenio peroksido molekulės redukciją iki vandens kitos vandenilio peroksido molekulės sąskaitą, kuri oksiduojasi iki laisvo deguonies.



Fermentai medicinoje naudojami gana plačiai. Tačiau fermentai yra svetimi baltymai, todėl kraujo imuninė sistema gana audringai reaguoja į svetimo baltymo atsiradimą kraujyje. Todėl fermentai fermentų panaudojimas tiesiog per kraujo sistemą yra gana ribota. Pavyzdžiui, fermentas trombozė naudojamas kraujo krešuliams tirpinti kraujagyslėse.

Žymiai efektyviau yra panaudojamas fermentų sugebėjimas atpažinti savo substratą. Ši savybė labai efektyviai naudojama diagnostikoje.

Plačiausiai fermentai naudojami gliukozės nustatymui kraulyje. Gliukozės nustatymui šiuo metu naudojamas fermentas gliukozės oksidazė. Šis fermentas katalizuoja gliukozės oksidaciją deguonimi:



Susidarantis vandenilio peroksidas gali būti nesunkiai nustatomas daugeliu metodų, pavyzdžiui panaudojant kitą fermentą peroksidazę ir atitinkamą dažą:



Dažas parenkamas toks, kuris oksiduotoje formoje yra ryškiai spalvotas. Taip pagal spalvos pokytį galima pasakyti kiek tiriamame pavyzdyje susidarė vandenilio peroksido. Kuo daugiau kraujyje bus gliukozės, tuo susidarys daugiau vandenilio peroksido, tuo pavyzdys intensyviau nusidažys.

Sergantys cukriniu diabetu privalo pastoviai kontroliuoti gliukozės lygį kraujyje. Tam reikia greitų ir paprastų metodų, kurie leistų tai atlikti pačiam pacientui. Tam reikėjo atlikti keletą konstrukcinių pakeitimų. Pirmiausia fotometrinių metodą reikėjo pakeisti paprastesniu, pavyzdžiui – elektrocheminiu.

Vandenilio peroksidas nesunkiai elektrochemiškai oksiduojasi ant platinos elektrodo paviršiaus. Taip galima sukonstruoti gliukozės biosensorių:

Gliukozės amperometrinio biosensoriaus struktūra

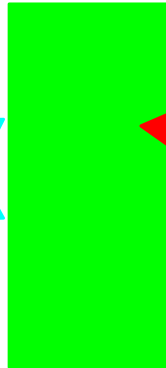
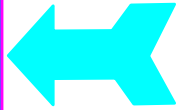
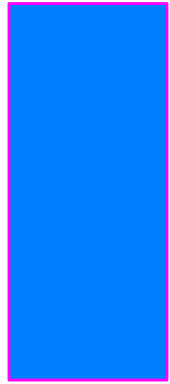
Signalų

registratorius

Pt elektrodas

+ 0,6 V

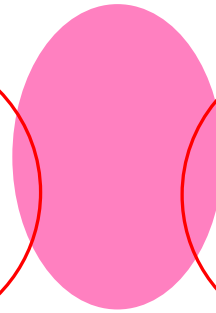
Gliukozės oksidazė



$2e^-$

O_2

H_2O_2

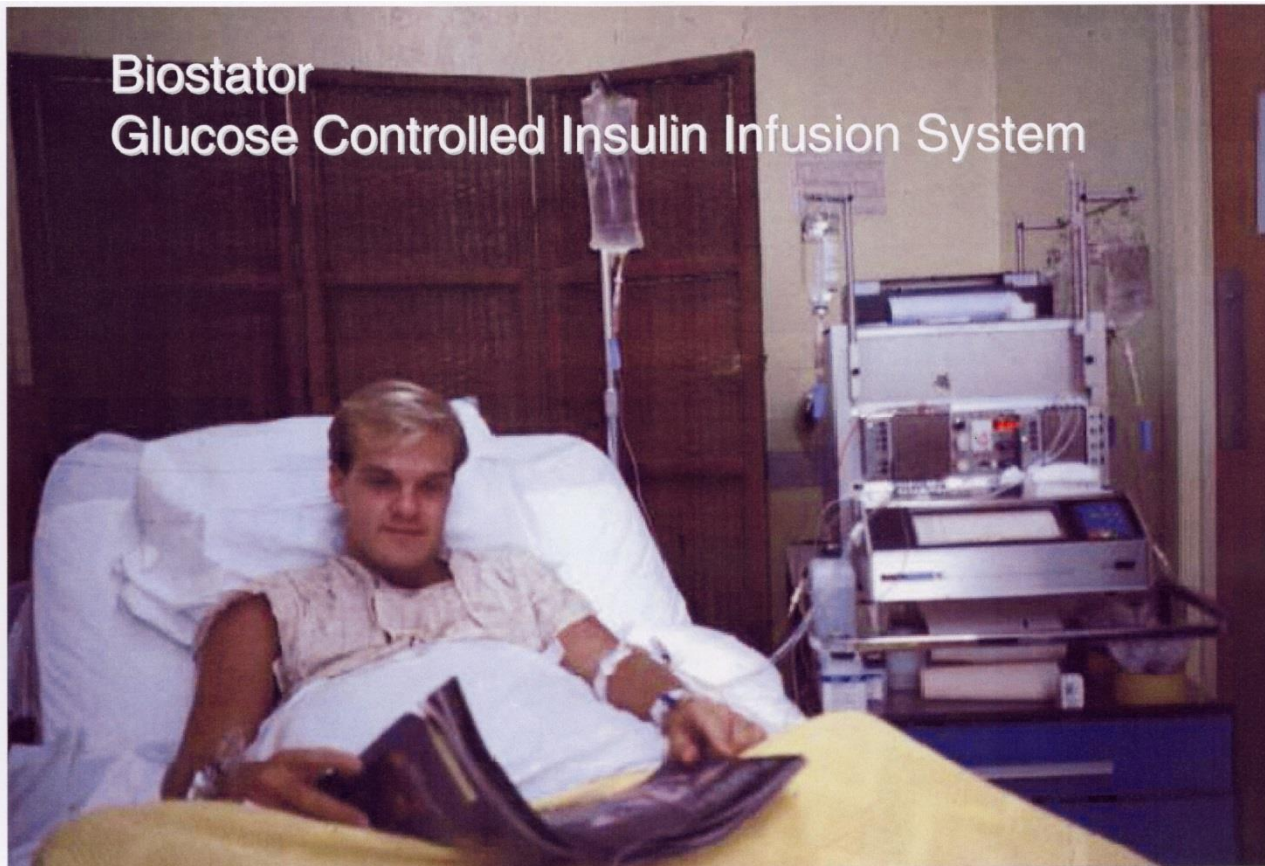


β -D-Gliukozė

D-Gliukono laktonas

Fermentas gliukozės oksidazė fiksuojama ant platinos elektrodo paviršiaus. Jei yra gliukozės ir ištirpusio deguonies, susidaro vandenilio peroksidas, kuris oksiduojasi ant platinos elektrodo paviršiaus. Kuo daugiau gliukozės, tuo daugiau susidaro vandenilio peroksido, tuo didesnė elektrodo anodinė srovė.

Greitai buvo sukurtas prietaisas automatiniam gliukozės valdymui oranizme. Iš paciento venos pumpuojamas kraujas į pratekama gliukozės biosensorių. Pakanka 30-50 ml kraujo per parą. Tai nedaug.



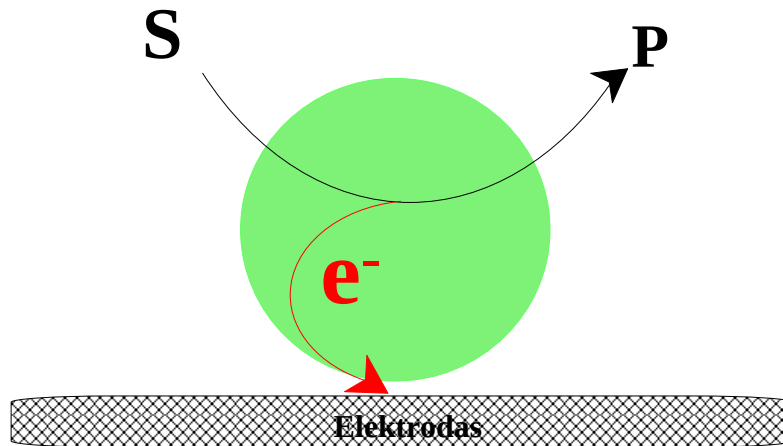
Informacija apie gliukozės lygį kraujyje perduodama į procesorių, kuris apskaičiuoja kiek reikia suleisti į kitą veną gliukozės (jei gliukozės koncentracija kraujyje mažesnė už normą) arba insulino (jei gliukozės koncentracija per didelė). Tai atlieka atskiros gliukozės ir insulino pompos, kurios valdomos to paties procesoriaus. Ligonis prijungiamas prie tokio prietaiso porai savaitių. Per tiek laiko organizmo gliukozės reguliavimo sistema atsistato ir maždaug tris mėnesius žmogus nejaučia jokių ligos požymių. Po to gydymo kursą reikia vėl pakartoti.

Nors sistema yra labai moderni, tačiau ji nėra patogi, nes reikia keletą savaitių praleisti lovoje „pririštam“ prie prietaiso.

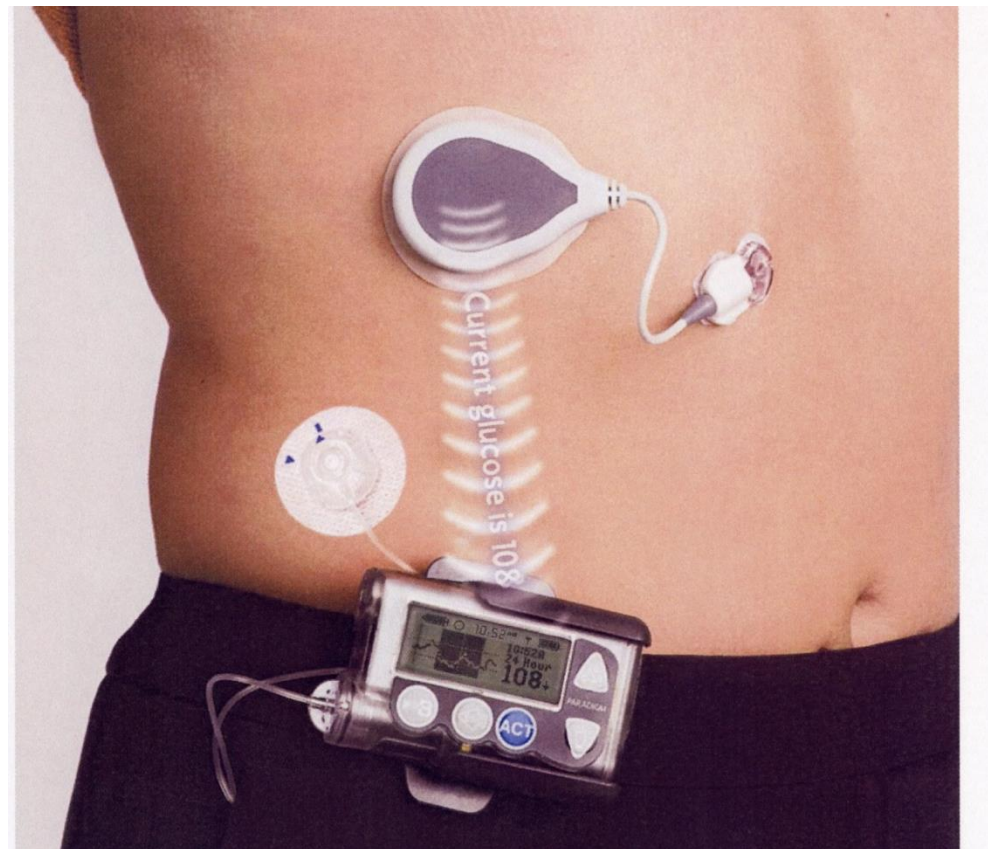
Todėl buvo imtasi žygių, kad tą sistemą sumažinti ir padaryti paprastesnę. Pirmiausia, procesorius nuo stalinio kompiuterio dydžio sumažėjo iki mikroschemos. Po to pavyko sukurti labai mažus gliukozės biosensorius, kuriuos galima buvo įmontuoti į švirkšto adatą.



Po to teko parinkti tokį fermentą, kurio veikimui nereikia deguonies, nes žmogaus organizme deguonies lygis dažnai svyruoja. Tam buvo pasirinkti fermentai, kurie gali nuo gliukozės atimtus elektronus perduoti tiesiogiai elektrodui.



Adata su gliukozės biosensoriumi implantuojami pacientui po oda. Biosensorius laideliu sujungtas su potenciostatu ir procesoriumi, kuris apdoroja gaunamą signalą ir radio ryšiu siunčia informaciją prie diržo prikabintai gliukozės ir insulino pompai, kuri pumuoja per greta įstatytą adatą į organizmą gliukozę arba insuliną. Tokią įrangą pacientas jau gali nešiotis su savimi.



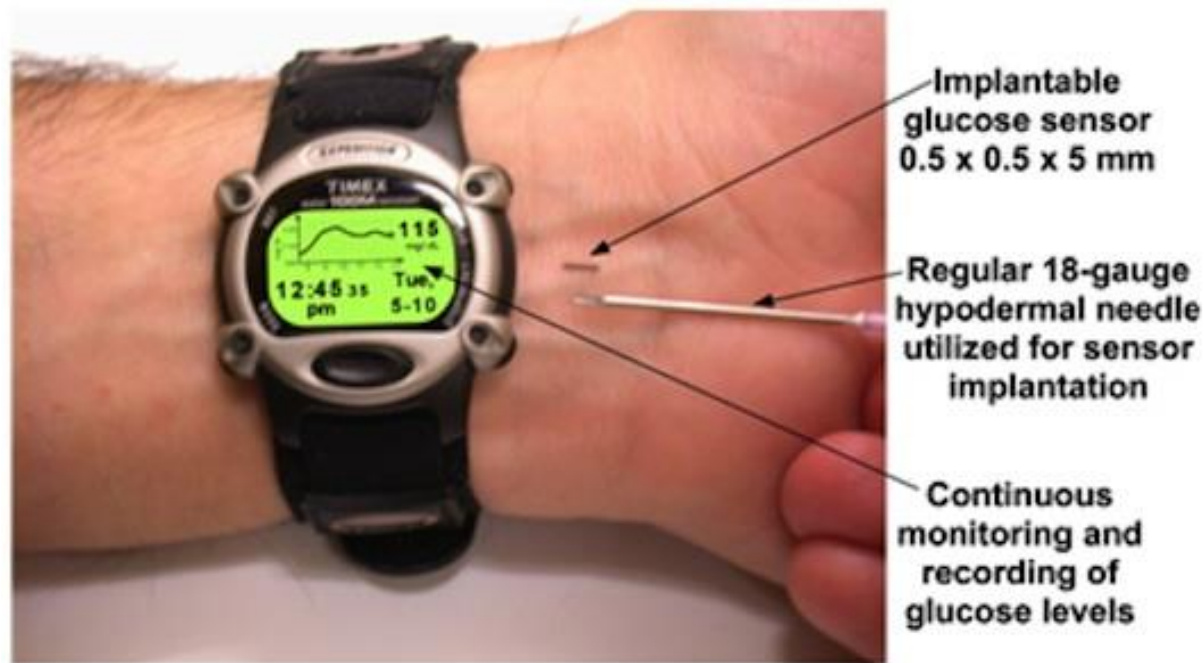
Gliukozės koncentracija kraujyje ir tarpląstelinėje terpėje, kurioje veikia biosensorius nesutampa. Gliukozės lygis tarpląstelinėje terpėje būna mažesnis nei kraujyje ir jos dinamika atsilieka laike. Tačiau procesorius su šiais uždaviniais susidoriya ir siunčia komandas pompoms įvertinęs šiuos parametrus.

Tokie prietaisai yra gana brangūs, todėl plačiai naudojami žymiai paprastesni gliukozės matavimo prietaisai. Pirmiausia verta paminėti elektrochemines gliukozės juosteles. Jos skirtos gliukozės koncentracijos matavimui kraujyje. Tam naudojami fermentai, kurie atpažįsta gliukozę ir katalizuoja jos oksidaciją specialiomis medžiagomis, kurios sugeba gautus elektronus atiduoti elektrodui.



Veikimo schema analogiška anksčiau parodytai gliukozės biosensoriaus schemai, tik vietoje deguonies veikia tinkamai parinktas mediatorius. Vienam matavimui sunaudojama viena juostelė. Ligonis pats pasirenka koku dažnumu atlikti matavimus.

Galima naudoti labai mažus implantuojamus biosensorius, kurie siunčia informaciją apie gliukozės dinamiką į specialų laikrodžio dydžio prietaisą.



Galima naudoti analogiškus implantuojamus gliukozės biosensorius, kurie siunčia informaciją į jūsų mobilų telefoną.



Šios priemonės naudojamos tiriant kaip žmogaus organizmas reaguoja į aplinkos veiksnius, ir kaip tie veiksniai veikia gliukozės lygį organizme. Tai labai svarbu parenkant tinkamą gydymo metodą.

Medicininėje diagnostikoje naudojama ne tik gliukozę atpažįstantys fermentai.

Pavyzdžiui:

Cholesterolio nustatymui naudojamas fermentas cholesteroloksidazė.

Pieno rūgšties nustatymui – laktatoksidazė arba laktatdehidrogenazė.

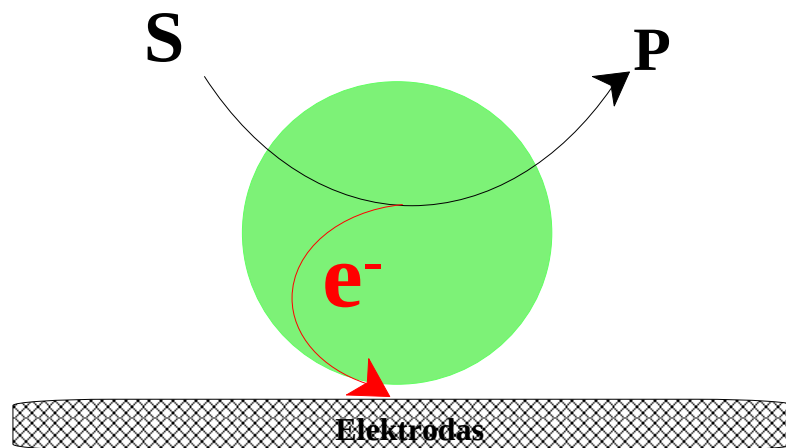
Šlapalo nustatymui – ureazė.

Šlapimo rūgšties nustatymui – urikazė

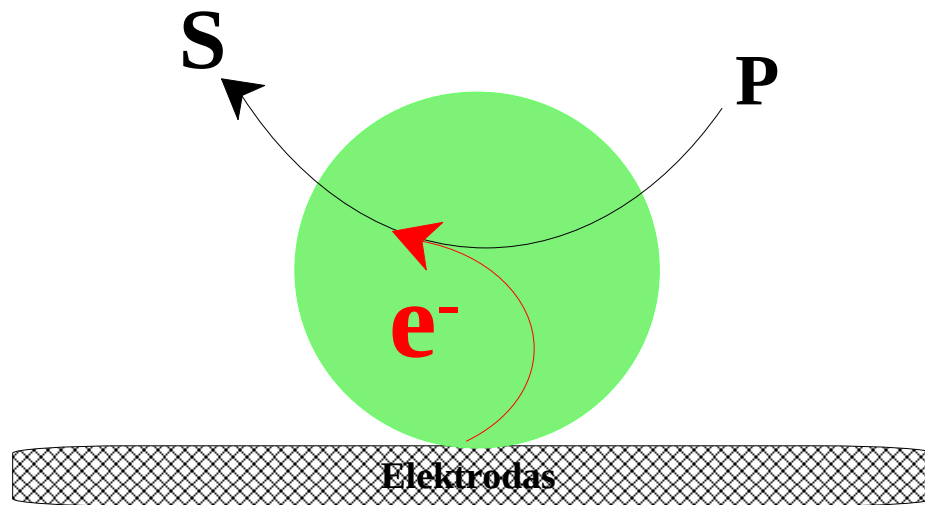
Etanolio nustatymui – alkoholdehidrogenazė

Dar daugiau fermentų kaip specifinių bioatalizatorių naudojama pramonėje ir žemės ūkyje:

Tai, kad kai kurie fermentai gali elektrochemiškai komunikuoti su elektrodais davė pagrindą atsirasti naujai medžiagų sintezės šakai, vadinamai bioelektrosinteze. Jei elektronus fermentas sugeba atimti iš substrato ir perduoti juos elektrodui, kaip parodyta šioje scheme:

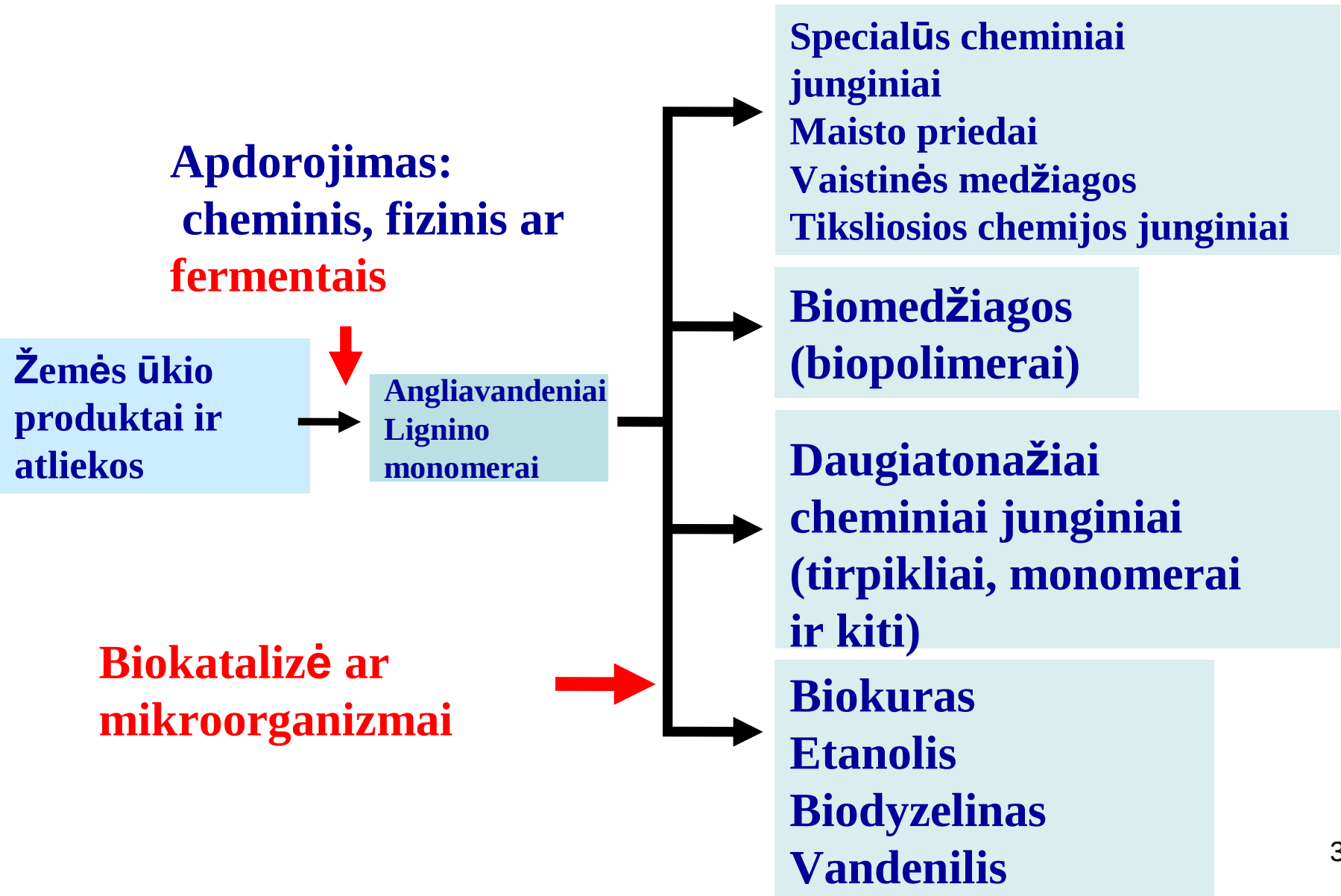


nėra principinio draudimo reakciją pasukti priešinga kryptimi:

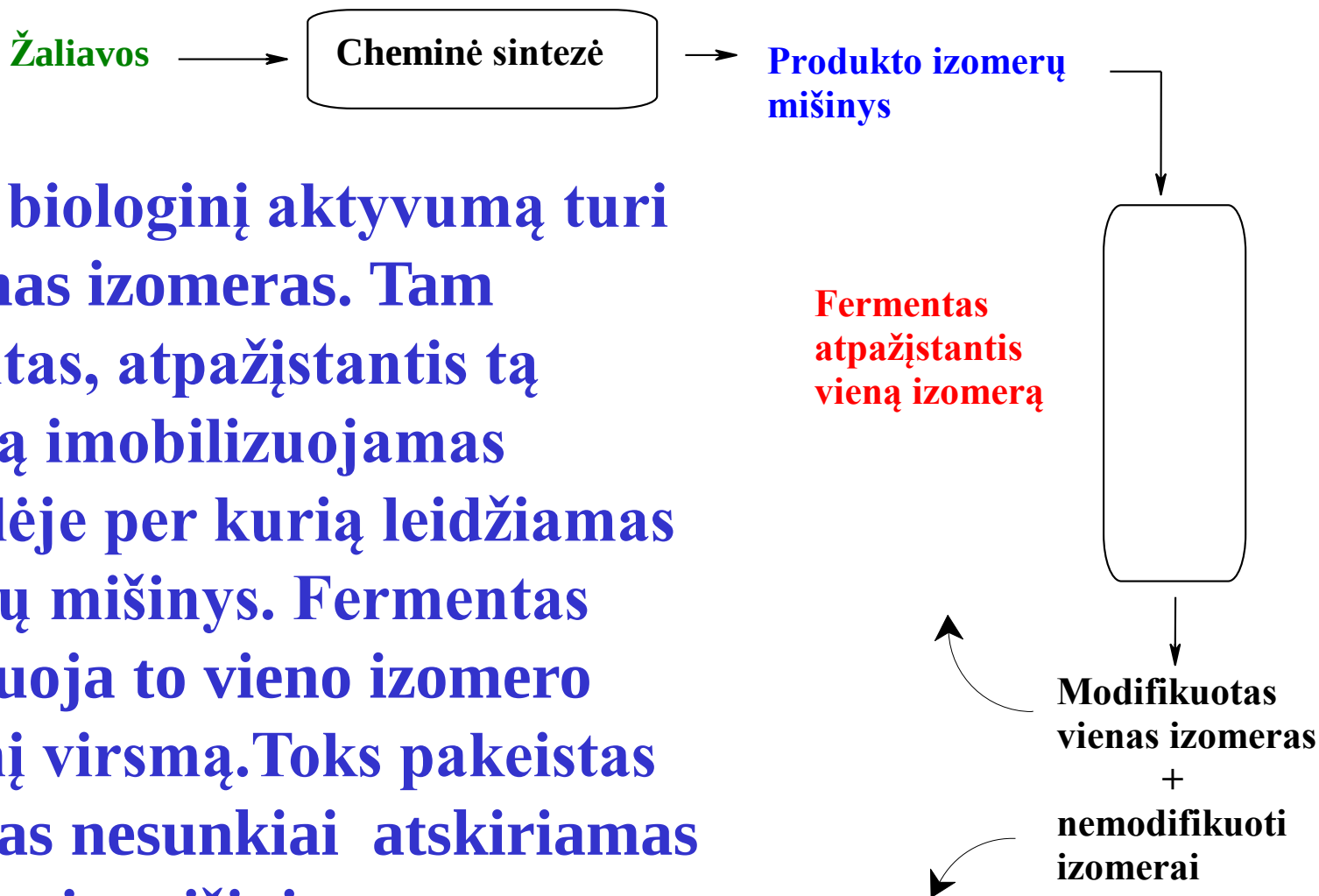


Tai reiškia, kad mes, panaudodami elektros energiją, galime sintetinti medžiagas, kurių sintezei reikalinga energija. Panaudojant fermentų sugebėjimą atpažinti tik tą vieną konkrečią medžiagą bei pasitelkiant geninės inžinerijos metodus modifikuoti fermentus, galima sintetinti naujus vaistus, naujus hormonus, reguliatorius.

Biokatalizės kuriama pridėtinė vertė



Fermentai naudojami izomerų perskyrimui. Vykiant cheminę sintezę dažnai gaunamas izomerų mišinys.



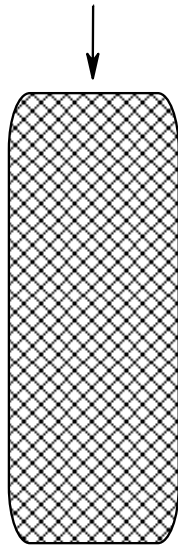
Tačiau biologinį aktyvumą turi tik vienas izomeras. Tam fermentas, atpažįstantis tą izomerą imobilizuojamas kolonėlėje per kurią leidžiamas izomerų mišinys. Fermentas katalizuoja to vieno izomero cheminį virsmą. Toks pakeistas izomeras nesunkiai atskiriamas nuo likusio mišinio.

Fermentas lakazė katalizuoja įvairių vandenyje tirpių fenolių oksidacinę polimerizaciją. Susidaro tokią į dervą panaši medžiaga, kuri vandenyje netirpsta ir lieka kolonėlėje.

**Geriamas vanduo
užterštas
fenoliniais dariniais**

Lakazė
→

**Polimeras
(derva)**



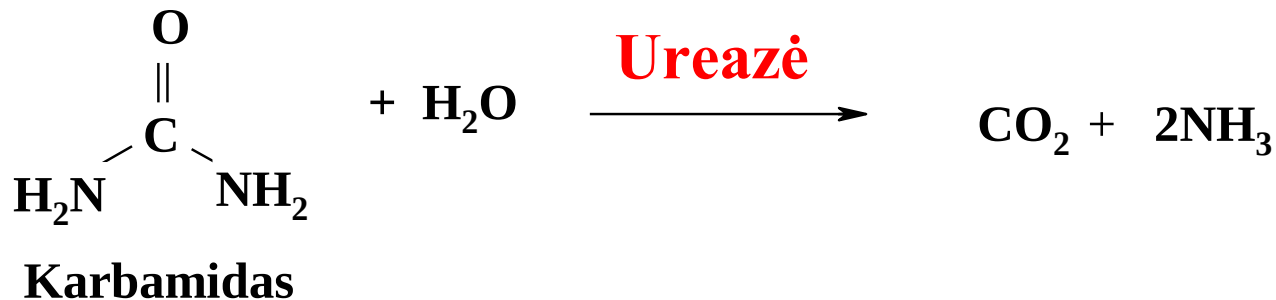
**Kolonėlė užpildyta skaidriomis granulėmis
su imobilizuota lakaze**

Švarus vanduo

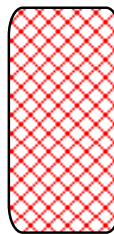
Jei kolonėlę padaryti skaidrią, fermentą imobilizuojant ant skaidrių granulių, tada tokią kolonėlę galima naudoti kaip indikatorinę sistemą. Kai tik vandenyje pasirodys fenoliniai teršalai, susidarys neskaidri derva ir kolonėlės pralaidumas šviesai sumažės. Tai bus signalas apie teršalų atsiradimą vandenyje.

Kosminiuose laivuose žmonės sunaudoja labai daug vandens. Į ilgą kelionę daug vandens pasiimti neįmanoma. Todėl tenka panaudotą vandenį regeneruoti. Sunkiausia yra iš vandens pašalinti karbamidą, kurį žmogaus organizmas išskiria su šlapimu. Tam galima panaudoti kolonėlę su imobilizuota ureaze, kuri katalizuoja karbamido molekulės skilimą iki amonjako ir anglies dvideginio. Šiuos komponentus pašalinti iš vandens galima labai nesunkiai, pavyzdžiui, panaudojant kolonėlę su jonitais, kurie surinks visas amonjako molekules.

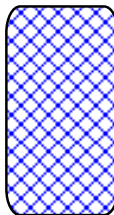
Vandens valymas (II)



Vanduo su šlapimu



Kolonėlė
su imobilizuota
ureaze



Kolonėlė
su jonitais



Švarus vanduo