

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

ТЕРАПИЈСКИ ЗНАЧАЈНИ ЕНЗИМИ

10. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

Ензими

- **Ензими** су најчешће велики и сложени глобуларни протеини који имају улогу **биокатализатора**, односно утичу на:
 - брзину,
 - специфичност и
 - контролу хемијских реакција.
- Ензими омогућавају да се постојеће реакције брже одвијају.
 - Без каталитичке снаге ензима, реакције укључене у спровођење нервних импулса, контракције срца и дигестије би се одвијале споро, чиме би се онемогућило функционисање организма.

Ензими

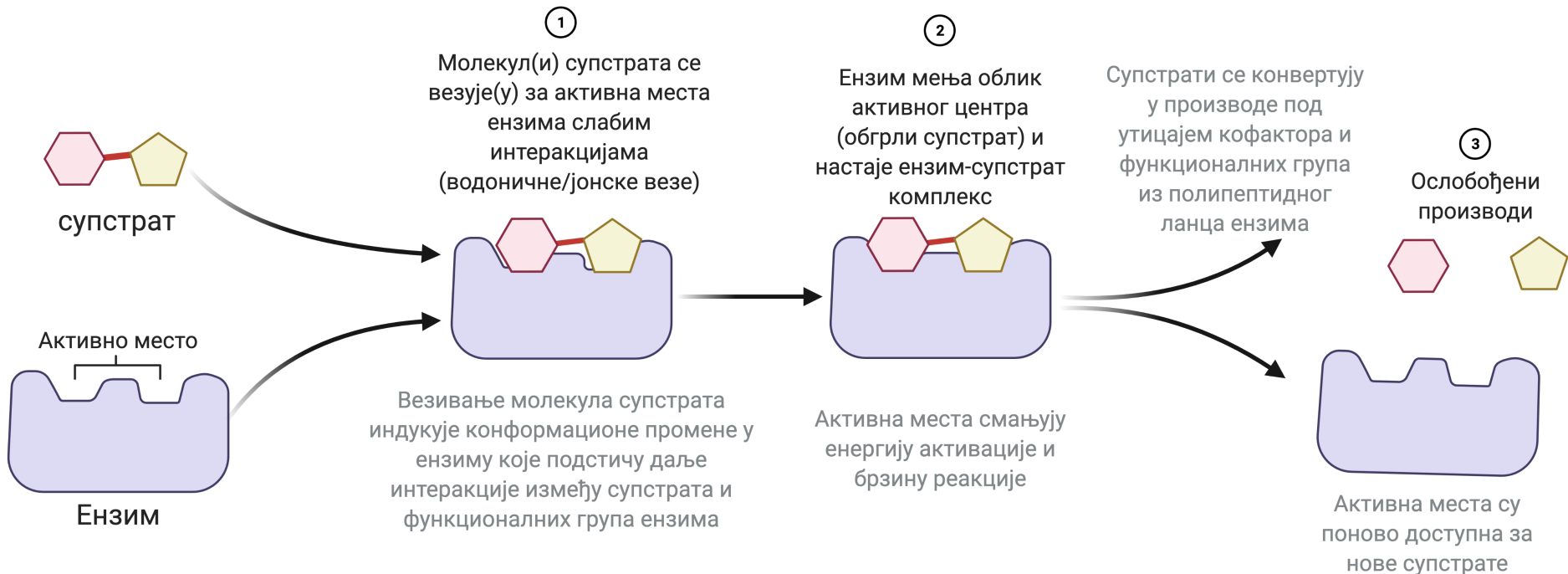
- Сваки ензим катализује одређену биохемијску реакцију, односно специфичан је за супстрат(е).
- Специфичност ензима за супstrate може бити:
 - **апсолутна** – ензим реагује само са једним одређеним супстратом;
 - **групна** – ензим реагује са једињењима која имају сличну хемијску структуру;
 - **стереохемијска** – ензими реагују са одређеним типом стереоизомерних једињења.
- Специфичност, као и брзина ензимски катализоване реакције, последица је јединствене аминокиселинске секвенце која чини тродимензионалну структуру ензима.
- Активно место је најчешће "пукотина" или "расцеп" на површини ензима формиран од једног или више делова полипептидног ланца за које се везује супстрат.

Ензими

-везивање супстрата

- Ензимски катализоване реакције имају три основне фазе:

1. Везивање супстрата: $E + C \leftrightarrow EC$
2. Конверзија везаног супстрата у везани производ: $EC \leftrightarrow EP$
3. Ослобађање производа: $EP \leftrightarrow E + P$



Ензими

-везивање супстрата

- Постоје два модела интеракције ензима и супстрата:
 1. Модел кључ-брава за везивање супстрата
 2. Модел индукованог прилагођавања за везивање супстрата

Модел кључ-брава за везивање супстрата

- Место везивања супстрата садржи остатке аминокиселина распоређене у комплементарну тродимензионалну површину која препознаје супстрат и везује га хидрофобним и електростатичким интеракцијама и водоничним везама.
- Стерне сметње или репулзија наелектрисања онемогућавају везивање једињења чија се структура, чак и у малој мери, разликује од структуре супстрата.

Ензими

-везивање супстрата

Модел индукованог прилагођавања за везивање супстрата

- Након везивања супстрата долази до промене конформације ензима (индуковано прилагођавање). Бочни ланци аминокиселина и функционалне групе унутар активног места се премештају и повећава се број интеракција при везивању супстрата. На овај начин се поспешује реакција, побољшава се место везивања косупстрата или активирају суседне подјединице.
- Место везивања супстрата је динамичка површина створена помоћу тродимензионалне структуре ензима, за разлику од претходно описаног модела где је место везивања супстрата ригидна “брава”.

Ензими

-везивање супстрата

Модел индукованог прилагођавања за везивање супстрата

- Индуковано прилагођавање обухвата промене у конформацији целог ензима које затварају пукотину на превоју, чиме се формира место за везивање АТР и елиминише вода (која може ометати реакцију) из активног места.
- Због тога, вишеструке интеракције између ензима и супстрата у каталитичком центру имају улогу и да препознају супстрат и да подстакну следећу фазу реакције, стварање комплекса прелазног стања.

Ензими

-комплекс прелазног стања

- Супстрат који учествује у реакцији мора бити активиран да би се реакција одиграла. Разлика енергије супстрата и комплекса прелазног стања назива се **енергија активације**.
- Према теорији прелазног стања, укупна брзина реакције одређује се на основу броја молекула који достигну енергију активације потребну за стварање комплекса прелазног стања.
- Да би повећали брзину реакције и смањили потребну енергију активације ензими користе каталитичке процесе попут:
 - електронске стабилизације комплекса или
 - киселинско-базне катализе.
- Када се комплекс прелазног стања једном формира, он се може поново превести у супстрат или се може распасти, формирајући производ реакције. Ензим не мења почетни енергетски ниво супстрата нити крајњи енергетски ниво производа.

Ензими

-клиничка примена

- Већина ензима се примењује интравенски, а мањи број (дигестивни ензими) се примењује перорално.

Ензим	Примена	Ензим	Примена
tPA	Тромболитик	Уратна оксидаза	Хиперурикемија
Урокиназа	Тромболитик	Ларонидаза	Мукополисахаридоза
Анкрод	Антикоагуланс	Нуклаеаза (ДНКаза)	Цистична фиброза
Фактор IXa	Хемофилија Б	Кисела α -глюкозидаза	Помпеова болест
Аспарагиназа	Антитуморски лек	α -L-идуронидаза	Мукополисахаридоза I
SOD	Токсичност изазвана кисеоничним врстама	N-ацетилгалактозамин-4-сулфактаза	Мукополисахаридоза VI
Глукоцереброзидаза	<i>Gaucher</i> -ова болест	α -галактозидаза	Фабријева болест
Трипсин/папаин/ колагеназа	Дебридман, антиинфламаторни молекули	Лакзата/пепсин/папаин/ панкретин	Дигестивни ензими

α -глюкозидаза

-алглюкозидаза алфа

- Кисела α -глюкозидаза (кисела малтаза) је ензим који катализује реакцију разлагања гликогена, при чему настају молекули глюкозе.
- Услед недостатка ензима гликоген се нагомилава у бројним ткивима, нарочито у срчаном и скелетним мишићима, доводећи до развоја кардиомиопатије, прогресивне мишићне слабости, поремећаја респираторне функције.
- **Алглюкозидаза алфа** (*Myozyme*[®], *Lumizyme*[®]) је егзогени извор ензима α -глюкозидазе добијен рекомбинантном ДНК технологијом у СНО ћелијским линијама.
- Алглюкозидаза алфа је гликопротеин састављен од 883 АК, молекулске масе 109 kDa.

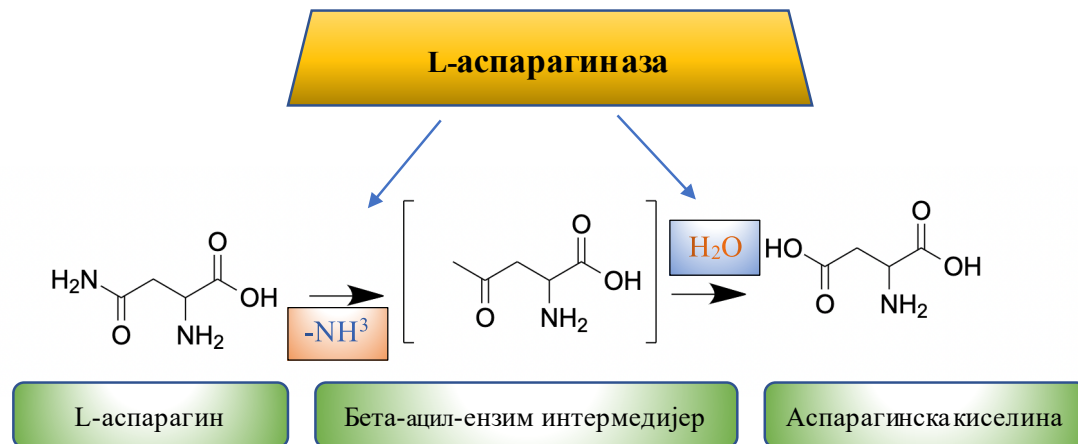
α -глюкозидаза

-алглюкозидаза алфа

- Алглюкозидаза алфа се везује за маноза-6-фосфатни (M6P) рецептор на површини ћелија, интернализује се и захваљујући угљенохидратној компоненти транспортује у лизозоме.
- У лизозомима се протеолитички разграђује (чиме се повећава ензимска активност), хидролизује α -1,4 гликозидну везу и омогућава разградњу гликогена.
- Примењује се код пацијената са Помпеовом болешћу који услед дефицита лизозомалне α -1,4 гликозидне везе имају недостатак α -глюкозидазе.

Аспарагиназа

- Аспарагиназа је ензим који катализује хидролизу L-аспарагина при чему настају аспарагинска киселина и амонијак.



- Већина здравих ћелија сисара је способна да директно из глутамина синтетише аспарагин (неесенцијална аминокиселина). Међутим, многе трансформисане ћелије, као што су ћелије акутне лимфобластне леукемије губе способност да синтетишу аспарагин, због чега он постаје есенцијална аминокиселина.

Аспарагиназа

-клиничка примена

- L-аспарагиназа је на тржишту доступна у три облика:
 - природни (немодификован) препарат, дериват *E. coli* (*Spectrila*®),
 - природни (немодификован) препарат, дериват бактерија *Erwinia chrysanthemi* (*Erwinase*®),
 - хемијски модификован (пегирован) препарат, дериват *E. coli* (*Oncaspar*®).
- Због разлике у метаболизму здравих и малигних ћелија, препарати L-аспарагиназе се примењује за лечење деце и одраслих оболелих од акутне лимфобластне леукемије.
- Механизам дејства подразумева да након примене препарата аспарагиназе долази до хидролизе аспарагина у ћелијама акутне лимфобластне леукемије, и последичне инхибиције синтезе протеина, DNK и RNK доводећи до смрти ових ћелија апоптозом.

Аспарагиназа

-клиничка примена

- Примењују се i.m./i.v., а на почетку примене може доћи до низа нежељених ефеката који настају као последица пролазног дефицита аспарагиназе у ткивима:
 - алергијске реакције, јака мучнина, повраћање, дијареја, нефротоксичност и хепатотоксичност.
- Код око 2% пацијената, након примене настају озбиљне нежељене реакције:
 - анафилакса и друге озбиљне алергијске реакције, тешка тромбоза ЦНС-а, коагулопатије, панкреатитис, хипергликемија, хипербилирубинемија.
 - присуство анти-аспарагиназа антитела може смањити ниво активности аспарагиназе због потенцијалне неутралишуће активности ових антитела, услед чега се ефикасност терапије смањује. У таквим случајевима, треба размотрити примену другог препарата аспарагиназе.

Аспарагиназа

-пегаспаргаза

- Пегаспаргаза (*Oncaspar*®) је одобрена за клиничку примену 1994. године. Пегаспаргаза је производ који у себи садржи тетрамерни ензим L-аспарагиназе добијен рекомбинантном ДНК технологијом у *E. coli*. Састоји се од идентичних подјединица молекулске масе 34,5 kDa и ковалентно је коњугован са 69 - 82 молекула мПЕГ.
- Пегаспаргаза има дужи полуживот у плазми ($t_{1/2}$ око 5,8 дана) од немодификованог ензима и примењује се на сваких 14 дана.
- Формулише се као бистар, безбојан, изотонични стерилан раствор без конзерванса, рН вредности 7,3. Ексципијенси коришћени у формулацији су фосфатни пуфер и натријум хлорид.
- Сви препарати аспарагиназе се чувају на температури 2 - 8° С, заштићен од светлости. Производе треба чувати од замрзавања и не треба их мућкати.

Деоксирибонуклеаза

-клиничка примена

- Деоксирибонуклеазе (DNKазе) су ензими који катализују хидролизу фосфодиестарских веза које повезују нуклеотиде, при чему долази до разградње молекула DNK.
- Рекомбинантни препарати DNKазе се користе за лечење цистичне фиброзе јер смањују вискозност респираторне слузи.
- Цистична фиброза је наследна, аутозомно рецесивна болест која настаје услед специфичних мутација гена за цистичну фиброзу који се налази на хромозому број 7. Код оболелих од цистичне фиброзе присутна је вискозна слуз која угрожава функцију бројних органа.
 - У плућима угрожава респираторну функцију, у панкреасу и јетри блокира канале и изазива инсуфицијенцију, а услед мешавине слузи и дигестивних течности долази до опструкције танког црева.

Деоксирибонуклеаза

-клиничка примена

- Ове патофизиолошке промене чине ткиво подложно честим и рекурентним микробиолошким инфекцијама (посебно *Pseudomonas*).
 - Микроорганизми привлаче елементе имунског система, посебно фагоцитне неутрофиле који ингестирају микроорганизме. Оштећени микроорганизми и неутрофили ослобађају велике количине DNK који је због своје велике молекулске масе изузетно вискозан, па повећава и вискозност респираторне слузи.
- У *in vitro* студијама доказано је да DNКазе смањују вискозност спутума оболелих пацијената, а развој генског инжењеринга и побољшање хроматографских метода олакшали су производњу високо пречишћених rhDNКаза.

Деоксирибонуклеаза

-дорназе алфа

- Крајем 1993. године за клиничку примену је одобрена rhDNКаза дорназе алфа (*Pulmozyme*®) која се производи у инжењерисаној CHO ћелијској линији.
- Након *upstream* процеса, пречишћава се филтрацијом и комбинацијом хроматографских корака.
- Пречишћени гликопротеин садржи 260 аминокиселина, молекулске масе 37 kDa. Примарна аминокиселинска секвенца је идентична секвенци нативног ензима.
- Формулише се као водени раствор у концентрацији од 1 mg/ml, уз додатак калцијум хлорида и натријум хлорида као ексципијенаса.
- Примењује се инхалацијом аеросола помоћу небулизера.

Глукоцереброзидаза

-клиничка примена

- Глукоцереброзидаза је ензим који катализује хидролизу глукоцереброзида у глюкозу и церамид.
- **Глукоцереброзиди** су посебна класа липида, који се састоје од молекула сфингозина, масне киселине и молекула глюкозе. Налазе се у многим ткивима (посебно у мозгу) у којима су повезани мијелинском овојницом нерава.
- Дефицијенција глукоцереброзидаза доводи до акумулације супстрата глукоцереброзид у лизозомима макрофага, што доводи до настанка генетског поремећаја метаболизма липида, односно *Gaucher*-ове (Гошеове) болести. Ово обољење се карактерише формирањем пенастих "Гошеових" ћелија које се накупљају у јетри, слезини и коштаној сржи.

Глукоцереброзидаза

-клиничка примена

- Пацијенти са овим обољењем имају увећање и компромитовану функцију ткива која садрже макрофаге, посебно јетре и слезине, као и оштећења других костију и понекад менталну ретардацију.
- Примена препарата егзогене глукоцереброзидазе у циљу надокнаде ензима доводи до смањења главних симптома болести.
- Препарати се примењују спором, двочасовном *i.v.* инфузијом, једном у 2 недеље и имају рок трајања 2 године када се чувају на 2 - 8° C.
- Најчешћа нежељена дејства су:
 - диспнеја, кашаљ, вртоглавица, главобоља, повраћање, болови у стомаку и реакције преосетљивости (уртикарија, ангиоедем, свраб, осип) које могу настати ако дође до појаве IgG антитела на β -глукоцереброзидазу (код 15% пацијената у току прве године лечења).

Глукоцереброзидаза

-аглуцераза

- Аглуцераза (*Ceredase*®) је први регистрован препарат глукоцереброзидазе (1991. године), добијен модификацијом олигосахаридног ланца β -глукоцереброзидазе, изоловане из хумане плаценте.
- Ензим је мономерни гликопротеин од 497 АК, молекулске масе 65 kDa, а четири од пет потенцијалних места за гликозилацију су гликозирани. Аглуцераза, слично као глукоцереброзидаза катализује разградњу гликолипида, глукоцереброзида у лизозомима ретикулоендотелног система.
- За једногодишње потребе просечног пацијента неопходно је око 27 000 плаценти, што ово лечење чини изузетно скупим. Иако је процес производње унапређен у погледу увођења додатних процеса за инактивацију вируса, и даље постоји ризик за пренос крвних патогена као што су вирус хепатитиса В и HIV.

Глукоцереброзидаза

-аглуцераза

- С обзиром да се аглуцераза добија из хумане плаценте, постоји могућност присуства хуманог хорионског гонадотропина hCG као нечистоће.
 - због тога су у производни процес уведени нови кораци који су значајно смањили количину hCG присутног у *Ceredase*[®] производу на 1 µg hCG по µg *Ceredase*[®] протеина.

Глукоцереброзидаза

-имиглуцераза

- Имиглуцераза (*Cerezyme*®) је одобрена за клиничку употребу 1994. године. Представља мономерни гликопротеин од 497 аминокиселина, који садржи 4 места за N-гликозилацију. Производи се у СНО ћелијској линији која садржи комплементарну ДНК која кодира хуману β -глукоцереброзидазу.
- Пречишћени производ се формулише у облику лиофилизата, а као ексципијенсе садржи манитол, натријум цитрат, лимунску киселину и *Polysorbate 80*. Примењује у облику интравенске инфузије током 1-2 сата на сваке 2 недеље или 3 пута недељно.
- Саставни део *downstream* процеса подразумева модификацију олигосахаридних компоненти. Бочни ланци нативног ензима су сложени и на њиховим крајевима се налазе сијалинска киселина или галактоза.

Глукоцереброзидаза

-талиглуцераза алфа

- Талиглуцераза алфа (*Elelyso*®) је рекомбинантни облик хумане глукоцереброзидазе експримиран на генетски модификованим ћелијама корена шаргарепе, култивисаним у биореакторском систему за једнократну употребу. Одобрен за клиничку примену 2012. године код пацијената са Гошеовом болешћу тип 1.
- Талиглуцераза алфа се разликује од хумане глукоцереброзидазе за две аминокиселине на N терминусу и за до 7 аминокиселина на C терминусу. Талиглуцераза алфа је гликозилирани протеин који на местима гликозилације садржи олигосахаридне ланце који на својим крајевима имају шећер манозу. Ови олигосахаридни ланци специфично препознају ендоцитне угљенохидратне рецепторе на макрофагима.

Глукоцереброзидаза

-велаглуцераза алфа

- **Велаглуцераза алфа** (*Vpriv*[®]) је још један рекомбинантни препарат глукоцереброзидазе индикуван за лечење педијатријских и адултних пацијената оболелих од Гошеове болести тип 1 одобрен 2010. године.
- Производи се у ћелијској линији хуманог фибросаркома, које експримирају ензим.
- Структура велаглуцеразе алфа је идентична нативном ензиму .

Алфа галактозидаза

-клиничка примена

- Алфа галактозидаза је ензим који катализује хидролизу терминалних, нередукуюћих α -D-галактозних остатака у α -D-галактозидима, укључујући галактозне олигосахариде, галактоманане и галактолипиде.
- Хумана α -галактозидаза је хомодимерни гликопротеин молекулске масе 100 kDa. Сваки мономер је састављен од 398 АК, молекулске масе 45,3 kDa (искључујући угљенохидратну компоненту) и гликозилиран је у три положаја (аспарагини у позицијама 108, 161 и 184).
- Дефицијенција овог ензима доводи до прогресивне акумулације гликосфинголипида у неколико типова ћелија. Као последица настаје *Fabry*-јева (Фабријева) болест која се карактерише сложеним клиничким манифестацијама на нервном систему, васкуларним ендотелним ћелијама и виталним органима.

Алфа галактозидаза

-клиничка примена

- Препарати α -галактозидазе се најчешће примењују сваке друге недеље интравенском инфузијом током 40 минута.
- Након примене α -галактозидазе, различити типови ћелија је усмеравају према лизозомима. Ћелијски процес преузимања и испоруке је посредован остацима маноза-6-фосфата, присутних у бочним ланцима олигосахарида ензима.
- Нежељена дејства повезана са применом α -галактозидазе:
 - веома честа - главобоља, црвенило, мучнина и повишена Т,
 - честа – периферни едем, вртоглавица, тинитус, хипертензија, тахикардија, кашаљ, акне, дијареја...
 - повремена - паросмија, анафилактичка реакција...
 - ретко - срчане аритмије, хипотензија, појачано знојење...
- Препарати имају рок трајања 2 године када се чувају на 2 - 8° С.

Алфа галактозидаза

-препарати

- Агалзидаза бета (*Fabrazyme*®) се производи тако што се врши трансфекција плазмида који садржи ДНК која кодира алфа галактозидазу у CHO ћелијску линију, а *downstream* процес подразумева комбинацију пет хроматографских корака, праћених концентрисањем и дијафилтрацијом. Ексципијенси који се користе су манитол и натријум-фосфатни пуфер, а финални производ се формулише као лиофилизат.
- Агалзидаза алфа (*Replagal*®) се производи у трансформисаној хуманој ћелијској линији и такође се пречишћава комбинацијом пет хроматографских корака. Финални производ се формулише као раствор.

Уратна оксидаза

-клиничка примена

- Уратна оксидаза је ензим који катализује оксидацију мокраћне киселине у алантоин који је растворљивији у води и у слободном облику се излучује путем бубрега.
- Дефицит овог ензима доводи до настанка хиперурикемије, односно пораста концентрације мокраћне киселине у серуму, таложења њених кристала и последично настанка гихта, камена у мокраћним каналима и бубрежне инсуфицијенције.
- Повећане концентрације мокраћне киселине у серуму могу настати услед:
 - пролиферишућег карцинома јер брза ћелијска деоба повећава стопу катаболизма нуклеинских киселина;
 - хемиотерапије јер условљава ћелијску лизу која у крвоток ослобађа слободне пурине и нуклеинске киселине које садрже пурине.

Уратна оксидаза

-расбуриказа

- **Расбуриказа** (*Fasturtec*[®]) је рекомбинантна уратна оксидаза добијена помоћу комплементране ДНК гљивице *Aspergillus flavus* која је експримирана у *S. cerevisiae*. Добијени ензим је тетрамер састављен идентичних полипептидних подјединица. Свака подјединица садржи 301 аминокиселину, молекулске масе 34 kDa и има ацетилован N-терминус.
- Индикувана је примена код хиперурикемије индуковане хемотерапијом или не-Хоџкин лимфомом
- Најчешће нежељене реакције повезане са применом овог производа су мучнина, повраћање, главобоља и дијареја.
- Међутим, услед разградње мокраћне киселине у алантоин расбуриказа доводи до настанка водоник пероксида, па код пацијената са дефицитом глукоза 6-фосфат дехидрогеназе може настати хемолитичка анемија или метхемоглобинија.

Уратнаоксидаза

-расбуриказа

- Расбуриказа се формулише у облику лиофилизата и примењује у виду инфузије. Садржи аланин, манитол и фосфатни пуфер као ексципијенсе.
- Прашак се непосредно пре примене реконституише растварачем који садржи воду за инјекције и *Poloxamer* 188.
- Реконституисани раствор треба применити одмах или најкасније током 24 часа уколико се чува на температури 2 - 8°C.
- Полувреме елиминације износи 15 - 22 h.
- Прашак има рок трајања 3 године ако се заштићен од светлости чува у фрижидеру на 2 - 8°C. Не сме се замрзавати.

Алфа-L-идуронидаза

-ларонидаза

- α -L-идуронидаза је ензим који катализује хидролизу терминалних остатака α -L-идуронске киселине из гликозаминогликана дерматан сулфата и хепаран сулфата.
- Услед недостатка овог ензима долази до накупљања гликозаминогликана у организму, што изазива дисфункцију ћелија и ткива и настанка аутозомно рецесивне болести мукополисахаридозе тип 1 (MPS I).
- Ларонидаза (*Aldurazyme*®) је рекомбинантна форма једне полиморфне варијанте хуманог ензима α -L-идуронидаза који се производи у CHO ћелијској линији.
- Ларонидаза је мономерни гликозилирани ензим састављен од 628 аминокиселина, молекулске масе 83 kDa који садржи шест N-олигосахаридних бочних ланаца.

Алфа-L-идуронидаза

-ларонидаза

- Након култивисања, препарат се пречишћава комбинацијом хроматографских метода заснованих на афинитету према бојама, металима и хидрофобним интеракцијама.
- Финални производ се формулише у облику течног концентрата који садржи ларонидазу, натријум-фосфатни пуфер, натријум-хлорид и *Polysorbate 80*.
- Пакује се у бочице за једнократну употребу и примењује у виду споре интравенске инфузије, једном недељно.
- Два бочна ланца олигосахарида у ларонидази на терминалном крају садрже маноза-6-фосфат, што олакшава преузимање у ћелије које на површини имају рецептор за M6P.
- Најчешћи нежељени ефекти су инфекције дисајних путева, осип и реакције на месту примене, а врло ретко анафилактичка реакција.

Идуронат-2 сульфатаза

-идурсулфаза

- Идуронат-2 сульфатаза је ензим који катализује хидролизу 2-сулфатну групу са краја гликозаминогликан дерматан сулфата и хепаран сулфата у лизозомима различитих ћелија.
- Услед недостатка овог ензима организам не може да метаболише угљени хидрат гликозаминогликан, па долази до његовог последичног накупљања и дисфункције различитих органа. Као последица недостатка лизозомалног ензима идуронат-2 сульфатаза настаје Хантеров синдром (MPS II).
- Идурсулфаза (*Elaprase*®) је ензим идуронат-2 сульфатаза који је добијен рекомбинантном ДНК технологијом коришћењем трансформисаних хуманих ћелијских линија. Идурсулфаза се користи за лечење пацијената са Хантеровим синдромом.

Идуронат-2 сулфатаза

-идурсулфаза

- Идурсулфаза је гликопротеин састављен од 525 аминокиселина, молекулске масе 76 kDa. Ензим има 8 места за N-гликозилацију на аспарагину за које се везују олигосахаридне групе. Активност ензима зависи од посттранслационе модификације цистеина до формилглицина.
- Идурсулфаза се преко М6Р који се налазе на њеном олигосахаридном ланцу специфично везује за М6Р рецептор на површини ћелије и ендоцитозом улази у лизозом.

N-ацетилгалаткозамин 4-сулфатаза

-галсулфаза

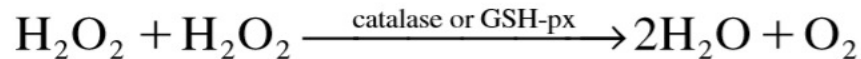
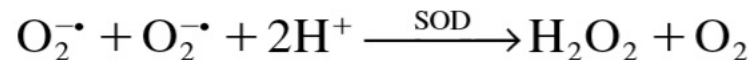
- N-ацетилгалаткозамин 4-сулфатаза је ензим који катализује хидролизу 4-сулфатних група N-ацетил-D-галаткозамина хондроитин сулфата и дерматан сулфата.
- Услед недостатка овог ензима долази до настанка *Maroteaux-Lamy*-јевог синдрома (MPS VI).
- Галсулфаза (*Naglazyme*®) је ензим N-ацетилгалаткозамин 4-сулфатаза добијен рекомбинатном ДНК технологијом, коришћењем CHO ћелијских линија.
- Галсулфаза је гликопротеин, састављен од 495 аминокиселина, молекулске масе 56 kD. Садржи 6 места за N-гликозилацију на аспарагину, четири од њих поседују бис маноза-6-фосфат маноза 7 олигосахарид који је одговаран за препознавање са М6Р рецептором на површини ћелије. Активност ензима зависи од посттранслационе модификације цистеина до формилглицина.

Супероксид дисмутаза

- У физиолошким условима у аеробном метаболизму, кисеоник се редукује за четири електрона формирајући H_2O , али може доћи и до непотпуне редукције и настанка реактивних радикалских и нерадикалских честица.
- Супероксидни анјон (O_2^-) и хидроксилни радикали (OH^\cdot) су најмутагеније радикалске честице које настају јонизујућим зрачењем и нападају компоненте мембране, нуклеинске киселине и друге ћелијске макромолекуле, што доводи до њиховог уништавања/модификације. Међутим, аеробни организми су развили специфичне одбрамбене системе посредоване ензимима који штите ћелију од реактивних врста.

Супероксид дисмутаза

- У ензиме заштите убрајају се супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GSH-px), који катализују реакције:



- За сада су идентификоване три врсте SOD:
 - цитосолна еукариотска дисмутаза (најчешће димер), садржи и бакар и цинк, MW= 31 kDa;
 - митохондријална, садржи два атома мангана, MW=75 kDa;
 - бактеријска, садржи два атома мангана, MW=40 kDa.
 - У неким бактеријама, плавозеленим алгама и многим биљкама постоји и облик који садржи гвожђе.
- Јони метала имају директну улогу у каталитичкој конверзији и служе као прелазни акцептори/донори електрона.

Супероксид дисмутаза

- Код људи, повећана производња $O_2^{\cdot -}$ и/или снижени ниво SOD повезани су са бројним стањима (старење, астма, убрзан раст тумора, неуродегенеративне болести и некроза запаљенског ткива).
- Примена SOD смањује оштећење ткива услед зрачења или других услова који стварају $O_2^{\cdot -}$.
- Повећана производња SOD у *Drosophila melanogaster* повећава толеранцију на кисеоник и продужава животног век.
- SOD изолован из говеђе јетре или еритроцита користи се као антиинфламаторно средство.
- Хумани SOD је експримиран у неколико рекомбинантних система и тренутно се испитује њихова способност да спрече оштећење ткива изазвано излагањем крвљу која је прекомерно оксидована.

Протеолитички ензими

-клиничка примена

- Дебридман представља поступак чишћења рана уклањањем страног материјала и/или мртвог ткива. Чишћење ране олакшава зарастање и смањује ризик од инфекција услед присуства бактерија на површини ране. Формирање угрушка, праћено настанком красте на површини ране задржава бактерије које се размножавају (стварање гноја) и успоравају процес зарастања.
- Дебридман се може обавити механички (одсецањем мртвог ткива, прањем/чишћењем ране), али да би се овај процес олакшао често се користе и протеолитички ензими.
 - Значај протеаза у чишћењу рана познат је већ неколико стотина година. Ране су се некада чистиле применом слузи црва која садржи протеазу.
 - Данас се трипсин, папаин, колагеназа или различити микробиолошки ензими формулишу у виду кремова на бази воде или се импрегнирају у посебне завоје.

Протеолитички ензими

-трипсин

- Трипсин је протеолитички ензим молекулске масе 24 kDa, синтетише га панкреас сисара у неактивном зимогеном облику - трипсиноген. Након доспевања у танко црево деловањем ентеропептидазе протеолитички се претвара у трипсин.
- Активни трипсин има дигестивну улогу и хидролизује пептидне везе између карбоксилне групе аргинина или лизина.
- Трипсин који се користи у медицинске сврхе добија се ензимском активацијом трипсиногена, изолованог из панкреаса животиња.

Протеолитички ензими

-химотрипсин

- Химотрипсин се такође користи да подстакне дебридман, као и да смањи инфламацију меког ткива. Такође се користи и у неким офталмолошким поступцима, посебно за уклањање катаракте. Припрема се активацијом зимогена химотрипсиногена, екстрахованог из говеђег панкреаса.
- Још један протеолитички препарат који се користи за дебридман рана и улцера на кожи састоји се од протеолитичких ензима који потичу из *B. subtilis*. Препарат поседује разнолику протеолитичку активност и примењује се локално на површину ране неколико пута дневно.

Протеолитички ензими

-папаин и колагеназа

- Папаин је цистеинска протеаза изолована из латекса незрелог плода и лишћа биљке *Carica papaya*. Састоји се од једног полипептида од 212 аминокиселина, молекулске масе 23,4 kDa и поседује разнолику протеолитичку активност. Користи се као средство за дебридман, али и за поједине индустријске процесе, омекшавање меса и избистравање пића.
- Колагеназа (*Santyl*®) је протеаза која се користи као супстрат за колаген. Производе је анималне ћелијске културе, али и одређени микроорганизми, врсте *Clostridia* (способност ових патогена да стварају колагеназу олакшава њихово брзо ширење по организму). Терапијска колагеназа се добија из супернатанта ћелијских фермената *Clostridium histolyticum*. Ови препарати се примењују локално (маст) за дебридман рана, улцера на кожи и опекотина.

Дигестивни ензими

-клиничка примена

- Дигестивни ензими се користе као помагачи у процесу варења, регулацију физиолошке дигестивне активности или за надокнаду дефицијентне дигестивне способности.
- У неким случајевима се користи само један ензим, али постоје и препарати који садрже комбинацију ензима.

Ензим	Употреба
α-амилаза	Помаже у варењу скроба
целулаза	Побољшава делимично варење целулозе
α-галактозидаза	Побољшава деградацију фактора који изазивају надимање
Лактаза	Помаже у интолеранцији на лактозу
Папаин, пепсин, бромелаин	Повећавају разградњу протеина из хране
Панкреатин	Повећава разградњу угљених хидрата, протеина и масти из хране

Дигестивни ензими

-клиничка примена

- Препарати дигестивних ензима се углавном формулишу у облику прашка или таблета, а њихова перорална примена се препоручује непосредно пре, или током јела.
- Већина функционише на неутралним рН вредностима, што значи да активност показују у пљувачци и танком цреву. Међутим, њихова ефикасност може бити смањена због:
 - њихове денатурације услед киселе средине у желуцу (рН вредност може бити испод 1,5);
 - ендогеним протеолитичким ензимима у желуцу и танком цреву.
- Ови проблеми могу се делимично превазићи формулисањем производа у облику ацидореизистентних таблета.
- Дигестивни ензими не доспевају до циркулације, па њихова чистоћа не мора бити тако висока као код ензима који се примењују интравенским путем.

Дигестивни ензими

-панкреатин

- Панкреатин је екстракт панкреаса, који се добија из панкреаса животиња. Садржи мешавину ензима, углавном амилазе, протеазе и липазе, па поседује широку дигестивну способност.
- Примењује се перорално за лечење инсуфицијенције панкреаса изазване цистичном фиброзом или панкреатитисом.
- Због осетљивости на желудачну киселину, примењује се у високим дозама или у облику обложених гранула/капсула, које се могу узимати директно *per os* или служити за посипање хране.
- Поједини дигестивни ензими, као што су папаин, пепсин, бромелаин или α -амилаза, се понекад користе уместо панкреатина.

Дигестивни ензими

-целулаза

- Целулаза се не производи у хуманом дигестивном систему већ је производе искључиво микроорганизми попут бактерија, гљивица и актиномицета. Целулаза представља групу ензима (ендоглюканаза и егзоглюканаза) који катализују разградњу β -1,4 гликозидне везе полимерног молекула целулозе до мономерних јединица глукозе.
- Препарати целулазе се добијају из *Aspergillus niger* или других гљивица и њихов унос побољшава целокупну дигестију, нарочито хране богате дијететским влакнима.

Дигестивни ензими

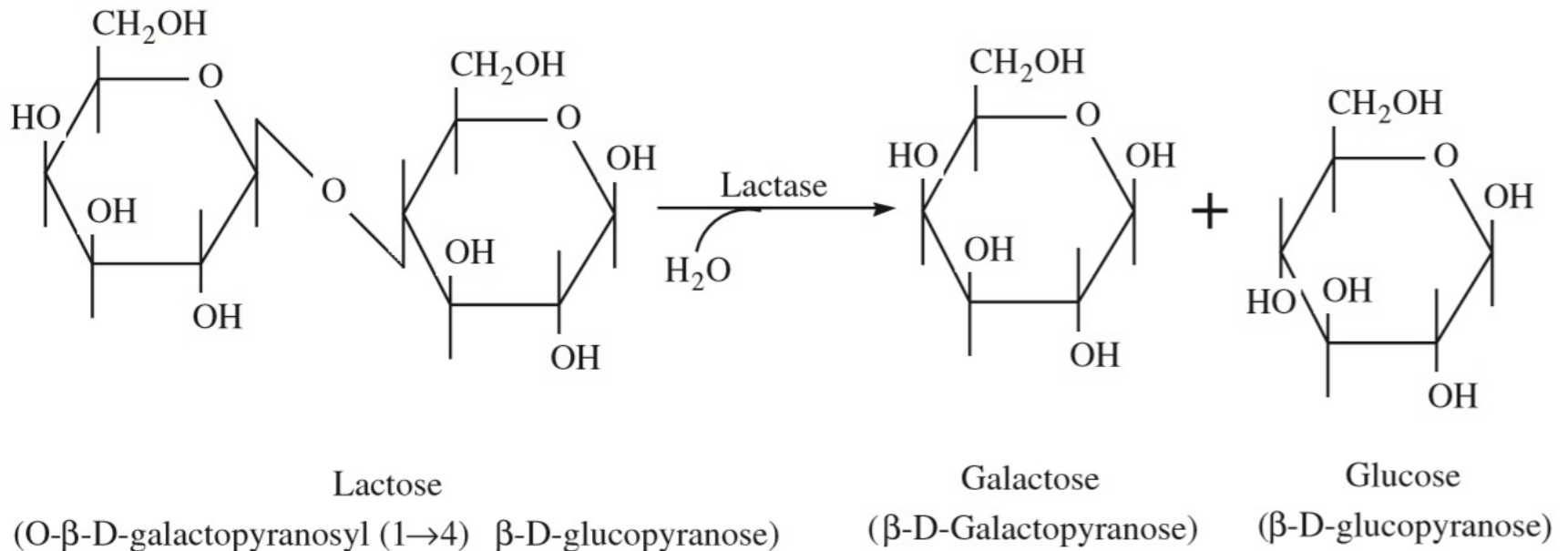
-α-галактозидаза

- α-галактозиди су олигосахариди присутни у биљкама, посебно у пасуљу. Не разграђују се у људском дигестивном тракту због непостојања одговарајућег ендогеног дигестивног ензима (тј. α-галактозидазе). Међутим, након уласка у дебело црево, ови олигосахариди се разграђују микробиолошким α(1–6) галактозидазама, подстичући ферментацију микроорганизама. Крајњи производи ферментације су испарљиве масне киселине, угљен диоксид, метан и водоник, који доводе до надимања.
- Ово се може избећи уколико се не уноси храна која садржи α-галактозиде или истовременим узимањем таблета које имају активност α-галактозидазе. Ако се ови „фактори надимања“ разграде пре или у танком цреву, ослобођени моносахариди ће се апсорбовати и самим тим бити недоступни за нежељене микробиолошке ферментације у дебелом цреву.

Дигестивни ензими

-лактаза

- Лактоза, главни дисахарид присутан у млеку, састоји се од молекула глюкозе повезаног гликозидном везом са молекулом галактозе. Дигестивни тракт младих животиња производи значајне количине ензима β -галактозидазе (лактазе), који катализује хидролизу лактозе, ослобађајући моносахариде. То је предуслов за њихову накнадну апсорпцију.



Дигестивни ензими

-лактаза

- Дигестивни тракт многих одраслих људи производи мало или нимало лактазе, чинећи ове људе интолерантним на лактозу. Ово је нарочито уобичајено у Азији, Африци, Латинској Америци и на Блиском Истоку.
- У недостатку довољне ендogene активности лактазе, лактоза из млека се не апсорбује и самим тим служи као извор угљеника за цревне микроорганизме. Резултат тога је производња млечне киселине, CO_2 и других гасова који изазивају иритацију дигестивног тракта и дијареју.
- Како би се превазишао овај проблем, усвојени су бројни приступи. Већина њих подразумева употребу ензима лактазе микробиолошког порекла.

Дигестивни ензими

-лактаза

- У неким случајевима, ензим је имобилизован у колону, тако да пролазак млека кроз колону доводи до хидролизе лактозе. У млеко се додаје и лактаза непосредно пре флаширања, тако да се хидролиза лактозе може полако догодити пре њене евентуалне конзумације (тј. током транспорта и складиштења).
- Препарати лактазе добијени коришћењем гљивица и других микроорганизама се формулишу у облику таблета или прашка. Уносе се непосредно пре конзумирања млека или млечних производа који садрже лактозу, или се посипају по храни пре конзумације. Овакви препарати лактазе доступни су у супермаркетима у многим деловима света.

Ензими

- регистровани за клиничку примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Експресиони систем	Индикације	Формулација
Агалзидаза алфа	<i>Replagal</i>	Хумане ћелијске линије	Фабријева болест	Концентрат за раствор за инфузију
Агалзидаза бета	<i>Fabrazyme</i>	CHO	Фабријева болест	Прашак за раствор за инфузију
Дорназе алфа	<i>Pulmozyme</i>	CHO	Цистична фиброза	Раствор за распршивање
Алглукозидаза алфа	<i>Myozyme</i>	CHO	Помпеова болест	Прашак за раствор за инфузију
Имиглуцераза	<i>Cerezyme</i>	CHO	<i>Gaucher</i> -ова болест тип 1 и 3	Прашак за раствор за инфузију
Талиглуцераза алфа	<i>Elelyso</i>	Ћелијске линије шаргарепе	<i>Gaucher</i> -ова болест тип 1 код деце и одраслих	Прашак за раствор за инфузију
Пегаспаргаза	<i>Oncaspar</i>	<i>E. coli</i>	Акутна лимфобластна лейкомија	Прашак за раствор за инф /ини

Ензими

- регистровани за клиничку примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Експресиони систем	Индикације	Формулација
Ларонидаза	<i>Aldurazyme</i>	CHO	Мукополисахаридоза I	Концентрат за раствор за инфузију
Идурсулфаза	<i>Elaprase</i>	Хумане ћелијске линије	Мукополисахаридоза I (Хантеров синдром)	Концентрат за раствор за инфузију
Елосулфазе алфа	<i>Vimizim</i>	CHO	Мукополисахаридоза тип IVa	Концентрат за раствор за инфузију
Панкреатин	<i>Kreon</i> <i>Pangrol</i> <i>Mezym forte</i>	Свињски панкреас	Цистична фиброза, Панкреатектомија, Гастректомија, Тумор панкреаса, Хронични панкреатитис и фиброза панкреаса , Ресекција панкреаса, желуца, жучине кесе или дуоденума, Поремећаји варења	Гастро- резистентне тврде капсуле Гастро- резистентне таблете

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Хвала на пажњи