

BIOREGULATORI

Bioregulatori

- Mnogi biohemijski procesi u organizmu zavise od strukture i funkcije specifičnih molekula koji se nalaze u ćeliji. Neki od njih su nazvani **bioregulatorima**.
- To su najčešće organski molekuli koji na različite načine “regulišu” ili “stimulišu” brojne biohemijske reakcije u metabolizmu. U grupu bioregulatora su svrstani *koenzimi i vitamini*.
- **Koenzimi** ulaze u sastav enzima, najčešće kao dio aktivnog centra, te na taj način direktno stimulišu katalitičku aktivnost enzima. **Vitamini** uglavnom ulaze u sastav koenzima.

Koenzimske forme vitamina

Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups*

Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biocytin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (: H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

Koenzimi

- Većina enzima obavlja svoju katalitičku funkciju uz “pomoć” molekula ili jona – **kofaktora**, koji su nazvani **koenzimima** i **prostetičnim grupama**.
- Oni se razlikuju samo u stepenu afiniteta prema enzimima u toku enzimskih reakcija (koenzimi se lako, a prostetične grupe teško odvajaju dijalizom od proteinskog dijela enzima). Danas se prostetičnom grupom nazivaju takve grupe (molekuli ili joni) koje se hemijski mjenjaju, a koenzimima grupe odnosno jedinjenja, koja se ne mjenjaju u enzimskim reakcijama. Oni svoju funkciju biostimulatora obavljaju uglavnom kao posrednici u vezivanju enzima za supstrat, čineći supstrat dostupnim enzimu da ga po mehanizmu enzimske katalize, transformiše do krajnjih proizvoda reakcije.

Klasifikacija koenzima

- Većina koenzima sadrži u svojoj strukturi fosforu kiselinu, koja je često povezana u obliku nukleozid-fosfata ili nukleotida. Neki koenzimi sadrže u svojoj strukturi i vitamine, te ih nazivamo i derivatima vitamina.
- Koenzimi se prema vrsti enzima, u čiji sastav ulaze, mogu podijeliti u tri grupe:
 - ◆ *koenzimi oksidoreduktaza,*
 - ◆ *koenzimi transferaza,*
 - ◆ *koenzimi za prenos C1 jedinica,*
 - ◆ *koenzimi za prenos C2 jedinica i*
 - ◆ *koenzimi liaza, izomeraza i ligaza.*

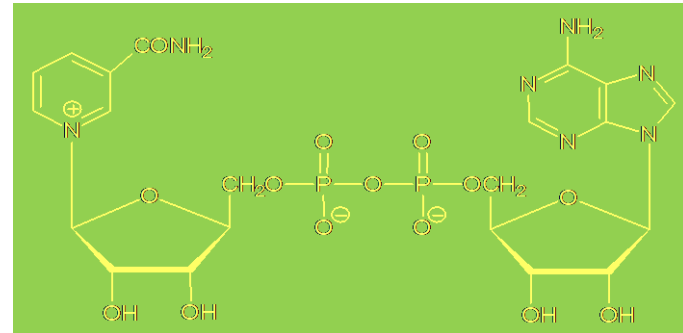
I. Struktura i funkcija koenzima oksidoreduktaza

- Koenzimi oksidoreduktaza su sastojci preko stotinu specifičnih enzima, koji katalizuju oksidoredukcijske procese u ćeliji. Najznačajniji su:
 - ◆ *nikotinamidski nukleotidi - NAD, NADP,*
 - ◆ *flavinski nukleotidi – FMN, FAD,*
 - ◆ *ubihinoni – koenzim Q,*
 - ◆ *liponska kiselina – α -lipoijska kiselina,*
 - ◆ *citohromi (hem-proteini) – citohrom P450, i*
 - ◆ *ne-hem proteini – Fe-S protein (feredoksini).*

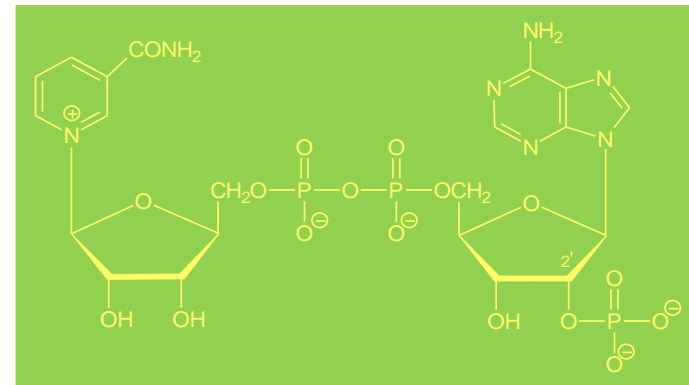
A. Nikotinamidski nukleotidi

- **NIKOTINAMIDSKI NUKLEOTIDI** su koenzimi *nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺/NADH)* i *nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADP⁺/NADPH)*, koji prenose vodonik (H₂), odnosno elektrone i protone (H⁺), pri oksidacijama supstrata sa dehidrogenazama.
- Dokazani su u svim ćelijama. Njihovi redukovani oblici su sastojci **mnogih dehidrogenaza u mitohondrijama, citosolu i endoplazmatičnom retikulumu ćelija**. Rastvorni su u vodi i obično slobodno difunduju od enzima.

- *nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD/NADH)*



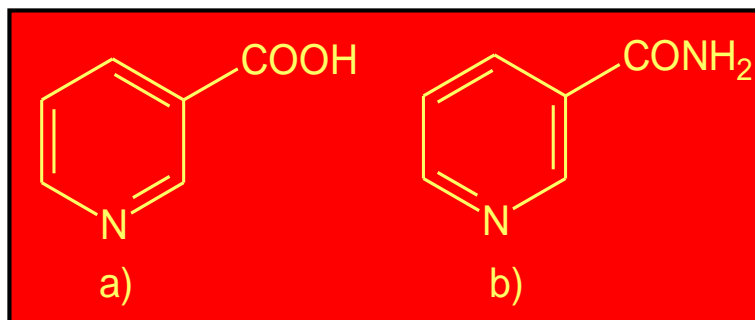
- *nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADP/NADPH)*,



Vitamin PP

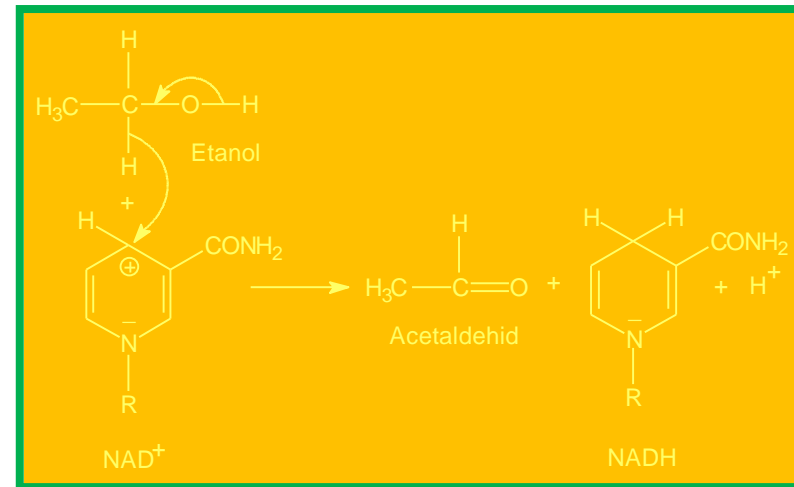
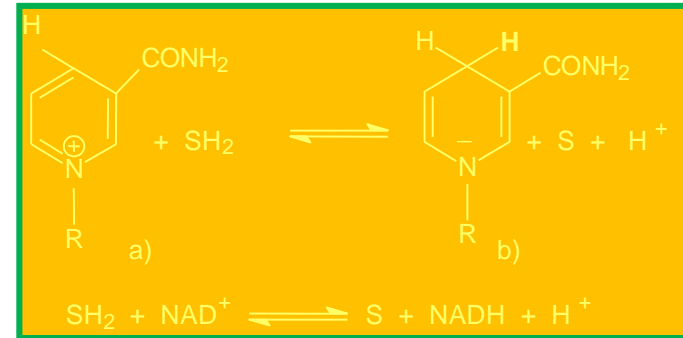
- **Vitamin PP** - je sastojak koenzima NAD^+ i NADP^+ . Sintetizuje se iz ***triptofana*** ili ***asparaginske kiseline***.

- **Vitamin PP** (niacin, niacinamid) - ili nikotinska kiselina, odnosno njen amid nikotinamid su oblici vitamina.



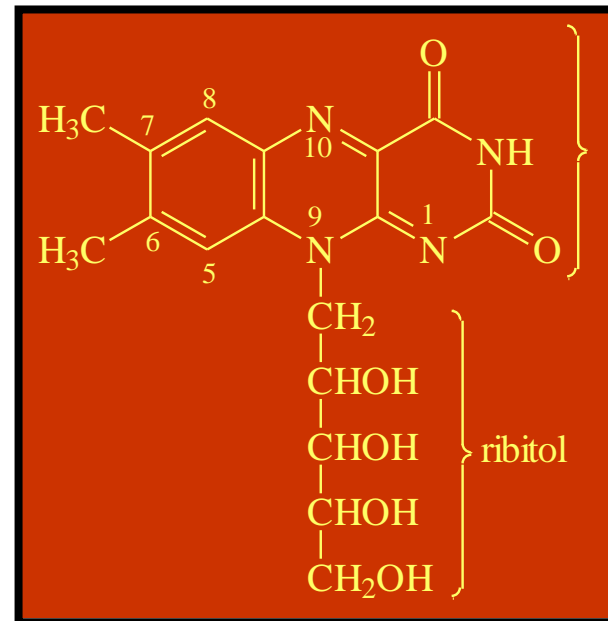
Mehanizam djelovanja NAD^+ i $NADP^+$

- Reaktivno mjesto u NAD^+ i $NADP^+$ je nikotinamidski prsten (vitamin PP; niacin). Da bi se redukovao, potrebna su 2H po molekulu piridinskog prstena nikotinamida. Prvi atom H se razlaže na H^+ i e^- .
- Proton odlazi u rastvor, a elektron neutrališe pozitivno naelektrisanje piridinijum katjona. Drugi H atom će se vezati za piridinski prsten čime on gubi aromatičnu (a) i dobija hinoidnu (b) strukturu (NAD^+).



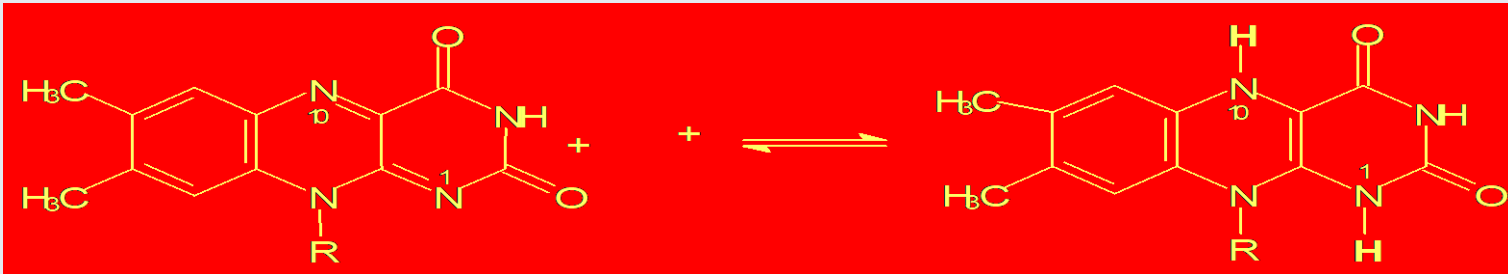
- **Vitamin B2** (riboflavin, laktoflavin) je po hemijskom sastavu 6,7-dimetil-9-ribitil-izoaloksazin.
- Vitamin B₂ ima ulogu koenzima u više od 60 enzima, poznatiji pod nazivom ***flavoproteini***, koji prenose H⁺ i e⁻.
- Prvi put ga je u obliku narandžastih kristala izolovao Szent Gyorgy sa saradnicima 1933. godine.

Vitamin B₂



Mehanizam djelovanja FMN i FAD

- ▶ Flavinski nukleotidi kao **koenzimi oksidoreduktaza** mogu vezivati vodonikove atome. Proizvodi reakcije su FMNH₂ ili FADH₂, koji nastaju vezivanjem 2 vodonika u položajima 1 i 10.



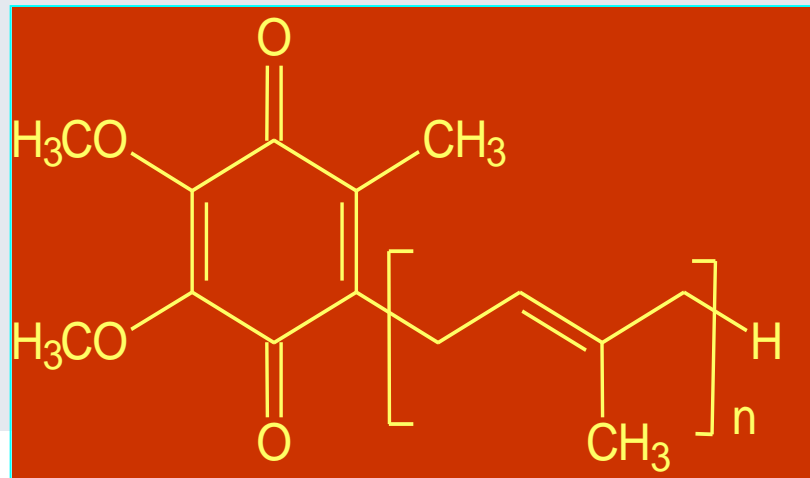
- Enzimi zavisni od flavinskih koenzima se nazivaju flavin-zavisnim enzimima, jer sadrže čvrsto vezane FMN ili FAD, zbog čega ove koenzime često ubrajamo i u prostetične grupe.

C. Ubihinoni (Q; CoQ)

- **UBIHINONI (KOENZIMI Q; CoQ)** - su niskomolekularna redoks jedinjenja respiratornog lanca. Po hemijskom sastavu su benzohinonski derivati koji u bočnom lancu sadrže 6-10 izoprenskih jedinica.
- Razlažu se sporo kiseonikom, UV zracima i sunčevom svjetlosti.

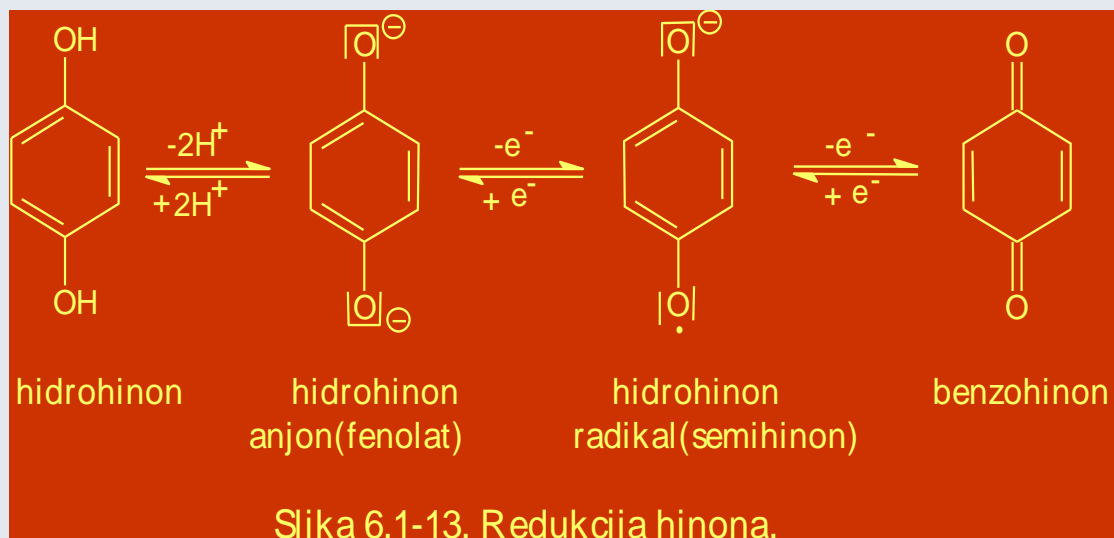
- UBIHINONI (CoQ)

U raznim živim organizmima nalaze se različiti oblici koenzima Q od Co Q1 - Co Q10. Smatra se da **samo Co Q10** je oblik sposoban da inicira i modulira ćelijske energetske procese. Ovaj koenzim služi kao prenosilac H koji dobija od NADH.



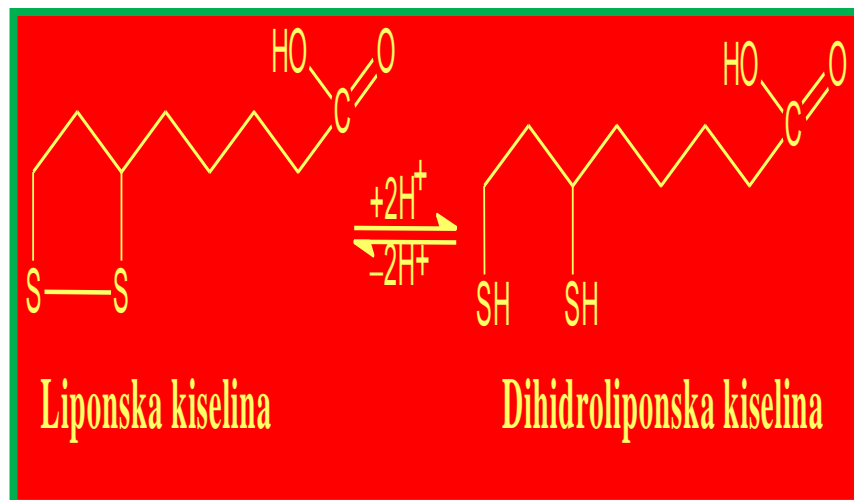
Mehanizam djelovanja hinona

- Reverzna reakcija je dehidrogenovanje hidrohina u hinon, koja započinje disocijacijom hidrohina u hidrohinski anjon uz oslobađanje dva protona. Dalja oksidacija se odvija u tri stepena odstranjivanja elektrona.



D. Liponska kiselina – vitamin N

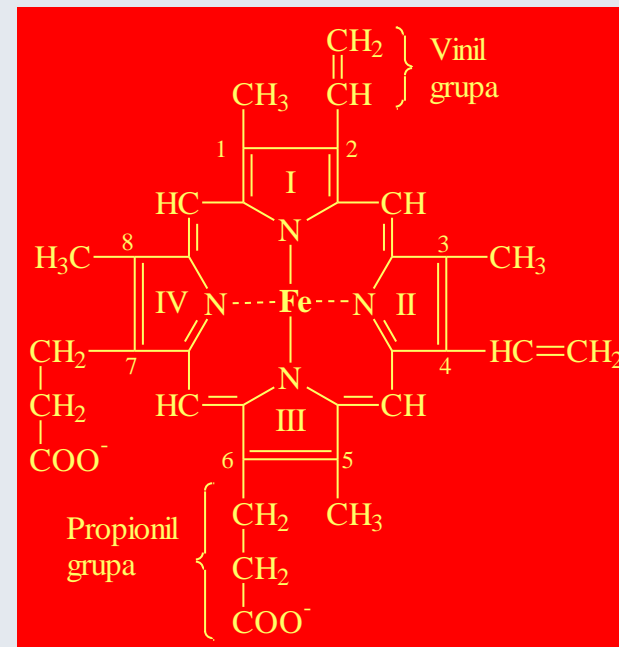
- **Liponska kiselina** [Lip(S₂)] – ili tioksična kiselina je ciklični disulfid koji u bočnom lancu sadrži karboksilnu grupu. Ona je koenzim u reakcijama u kojima **se prenose vodonik i acil-grupe**.
- Vezuje se karboksilnom grupom za **dehidrogenaze** (npr. dihidrolipoil-dehidrogenaza) ili **neke transferaze** (npr. dihidrolipoil-transferaza) i gradi amidnu vezu sa ε-grupom ostatka lizina. Redukcijom gradi **dihidroliponsku kiselinu**.
- **Obnavlja antioksidanse u organizmu (vit.C,E, glutation) i veže slobodne jone (u terapiji kod trovanja olovom i živom).**
- **Sintetiše se u organizmu.**



E. CITOHROMI (HEM PROTEINI)

- **CITOHROMI – CYP (HEM PROTEINI)** - su **porfirinski hromoproteini**, koji služe kao redoks katalizatori u respiraciji (prenose elektrone od dehidrogenaza na molekularni kiseonik), konverziji energije i dr.
- Sastojci su svih ćelija i vezani su za mitohondrije ili druge ćelijske organele.
- **Hem** je po hemijskom sastavu tetrapirolski helat sa gvožđem. Četiri pirola povezana metinskim vezama ($-\text{CH}=\text{}$) grade tetrapirrol ili porfirin u kojem H atomi mogu biti supstituisani alkilnom, hidroksilnom, vinilnom, karbonilnom ili karboksilnom grupom.
- Oni deluju kao donori ili akceptori elektrona reverznom izmjenom valence atoma gvožđa koji se nalaze u centru porfirinskog kompleksa.

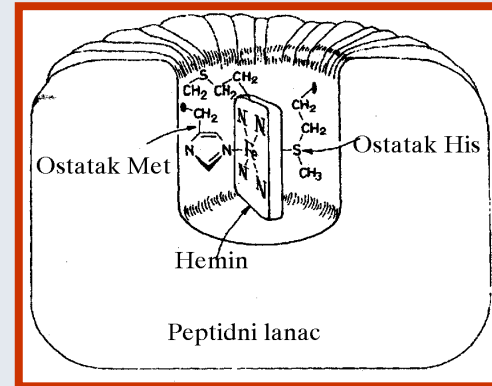
- ◆ *citohrom a* (sadrži Fe-formilporfirin)
 - ◆ *citohrom b* (sadrži Fe-protoporfirin)
 - ◆ *citohrom c* (sadrži Fe-mezoporfirin sa kovalentno vezanim ostatkom proteina).
- **Struktura hema citohroma b**



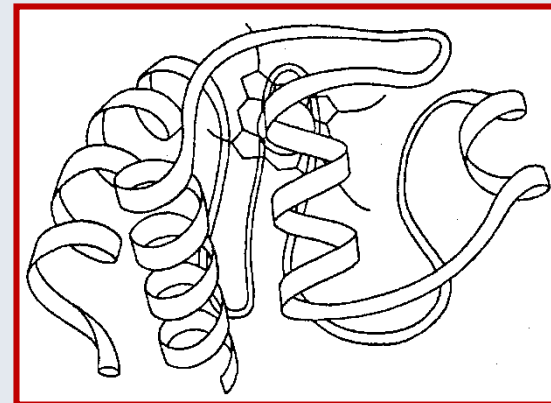
Citohrom c

- **Citohrom c (Cyt c)** – jeste konjugovani hemoprotein s porfirinskim helatnim kompleksom gvožđa. Sastoji se iz monomernog lanca od 112 aminokiselinskih ostataka. Jedan molekul citohroma c sadrži jedan porfirinski prsten sa atomom Fe u centru.
- Porfirinski prsten je kovalentno vezan za proteinski lanac preko sulfhidrilne grupe cisteina.

Model strukture citohroma c

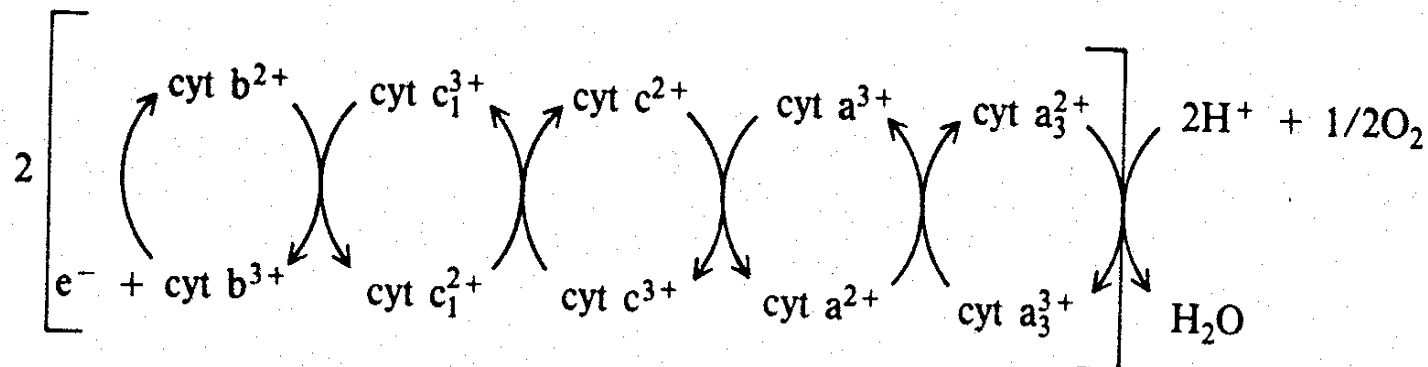


Tercijarna struktura cyt C



Funkcije citohroma

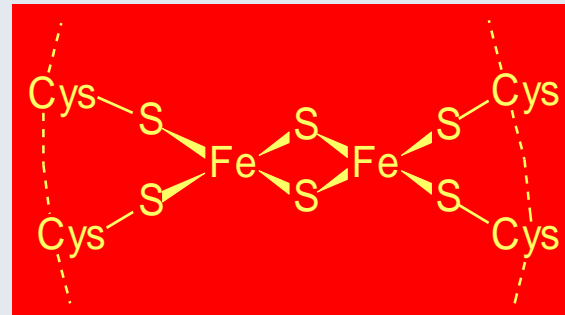
- Uloga citohroma u biohemijskim procesima je značajna i višestruka. Sastavni su dio respiratornog lanca, učestvuju pri enzimskim reakcijama hidrosilovanja, posreduju kod fiksacije N_2 u bakterijama itd.
- Citohromi su nazvani i **redoks katalizatorima**, jer u oksidovanom obliku oduzimaju elektrone od vodonika i prenose ga u lancu disanja, procesu u kojem se oslobađa energija i skladišti u obliku ATP.



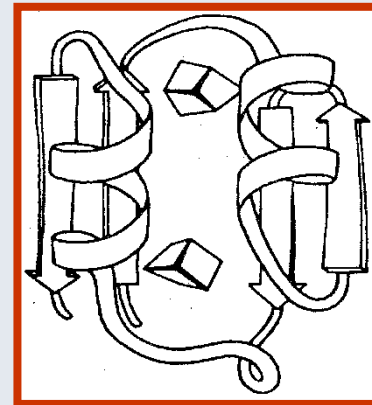
F. Ne-hem proteini (feredoksini)

- **Ne-hem proteini (Fe-S-proteini)** - su posebna grupa redoks jedinjenja koja sadrže **Fe-S-centre** i učestvuju u prenosu elektrona.
- Kako u svojoj strukturi ne sadrže hem, nazivaju se još i ne-hem proteini. Mnogi, najvažniji proteini iz ove grupe sadrže i **sumpor**, kao što je slučaj sa ne-hem proteinima uključenim u transport elektrona; to su **Fe-S-proteini** kao komponente respiratornog kompleksa.

Struktura feredoksina 2Fe-2S



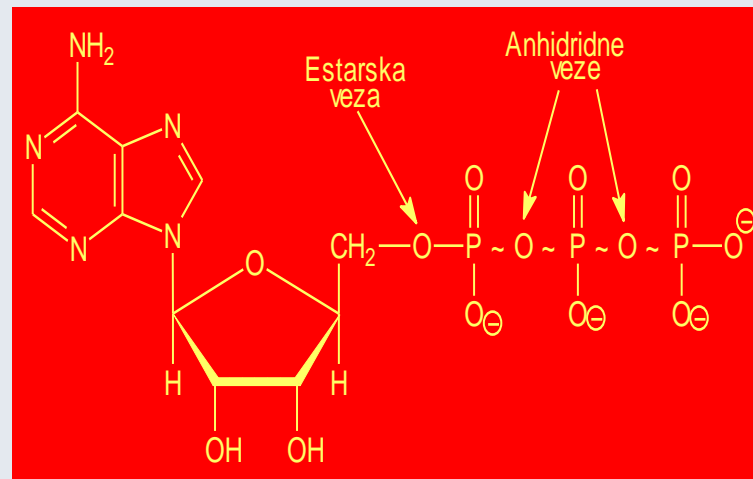
Tercijarna struktura feredoksina



II. Struktura i funkcija koenzima transferaza - ATP

- **ADENOZIN-FOSFATI** - su koenzimi koji u obliku *adenozin-trifosfata* (ATP), *adenozin-difosfata* (ADP) i *adenozin-monofosfata* (AMP) u metabolizmu učestvuju kao **prenosioci orto- i difosfata (često pisani kao Pi i P_{Pi})**. Od navedenih posebno je značajan ATP
- **Adenozin-trifosfat** (ATP) - kao prototip jedinjenja bogatog energijom (oslobađa 34.5 kJ/mol kada prenosi orto-, odnosno 37.4 kJ/mol kada prenosi difosfat), **pripada grupi koenzima transferaza**, jer je sastojak enzima koji prenose fosfatne grupe: orto (Pi) i difosfat (P_{Pi}) na različite akceptore.

• Struktura ATP

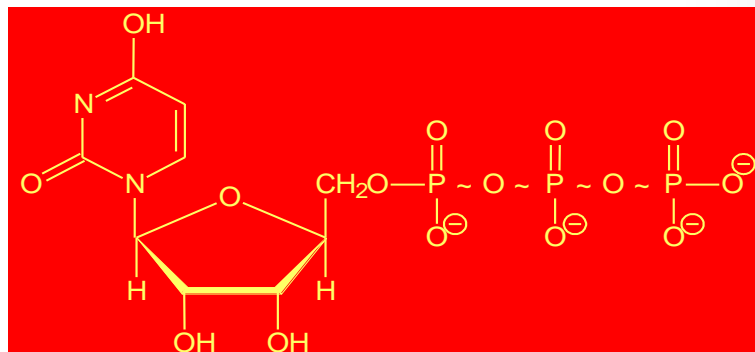


- Strukturu ATP karakteriše prisustvo estarske veze i veza bogatih energijom tzv talasastih veza (anhidridnih veza). Kao koenzim ATP ima katalitičku i regulatornu funkciju u brojnim reakcijama sa različitim enzimima, koji u zavisnosti od tipa reakcije odnosno supstrata mogu biti **kinaze, ATP-aze, nukleotidil-transferaze itd.**

2. UTP i CTP

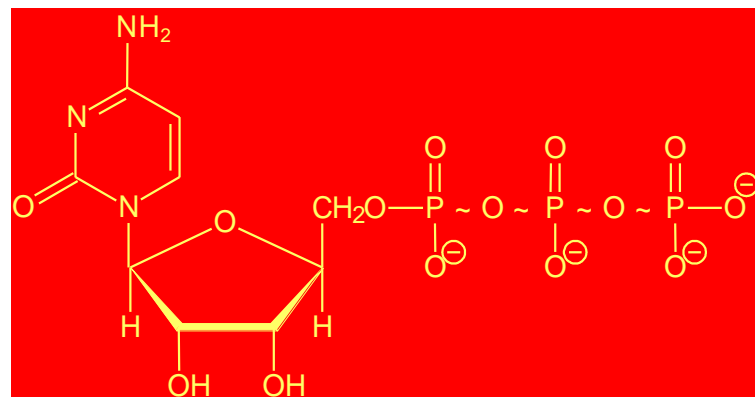
- **URIDIN-FOSFATI** - (*uridin-trifosfat*, *uridin-difosfat*) su koenzimi u biosintetičkim reakcijama šećera. Posebno je značajan uridin-trifosfat.
- **Uridin-trifosfat (UTP)** - je koenzim enzima **glukozo-1-fosfat-uridintransferaze** (EC 2.7.7.1), koji prenosi ostatke glukoze (Glc) u biosintezi saharoze. U prvoj fazi reakcije stvara se uridindifosfat-glukoza (UDP-Glc) koja poseduje veliki potencijal za prenos grupa. Može se preneti na nukleofilne reaktante, prije svega one sa hidroksilnim funkcionalnim grupama dajući glikozide.
- $\text{Glc-1-fosfat} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-Glc} + \text{Pi}$
 $\rightarrow \text{Glikozid} + \text{UDP}$

- **Struktura UTP**



Slika 6.1-26. Struktura uridin-trifosfata (UTP).

- **Struktura CTP**



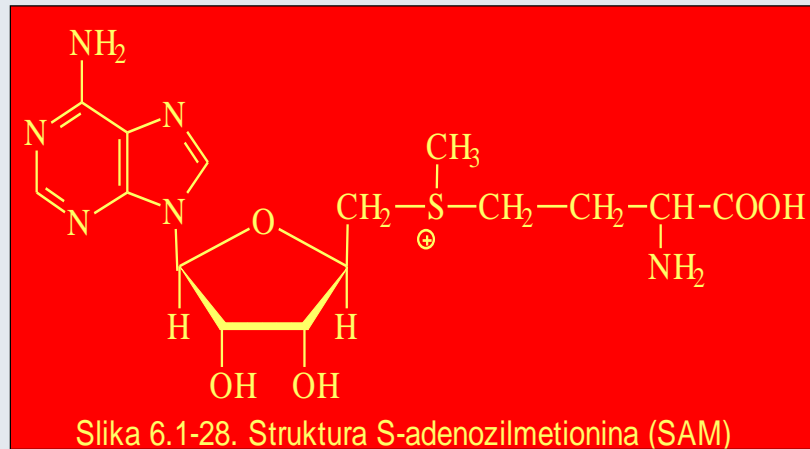
3. Koenzimi C₁ metabolizma

- SAM -

- U nekim reakcijama u metabolizmu se pojavljuju različiti fragmenti sa jednim ugljenikovim atomom kao npr.:
- a) metil-grupa (-CH₃) od metanola (HO-CH₃),
- b) hidroksimetil-grupa (-CH₂ OH) od formaldehida (H₂C=O),
- c) formil-grupa (H₂C=O) od mravlje kiseline (HCOOH) i
- d) karboksilna grupa (COOH) od karbonatne kiseline (HO-COOH).

► **Prenos navedenih grupa omogućuju sledeći koenzimi i prostetične grupe:**

- **S-adenozilmetionin (SAM)** - je reaktivno sulfonijum jedinjenje koje ima funkciju koenzima prenosioca metil-grupe u C1-metabolizmu i kao takav spada u grupu najznačajnijih metilirajućih agenasa u metabolizmu ćelije.

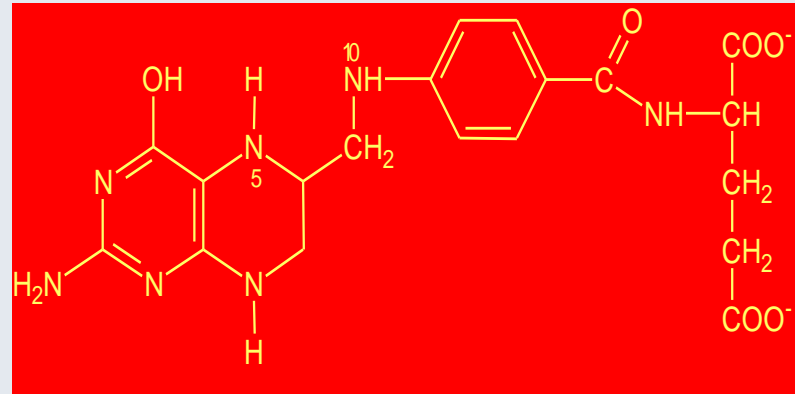


- Adenin... Adenozil...Adenozin...?

Tetrahydrofolna kiselina (FH4)

- **Tetrahydrofolna kiselina (FH4)** - je koenzim prenosilac C1-grupe; hidrokсимetil-("aktivirani formaldehid") i formilnih grupa ("aktivirana mravlja kiselina") u velikom broju enzimskih reakcija u kojima se ove grupe prenose sa jednog metabolita na drugi i obrnuto.
- Poznata je pod nazivom pteroilglutaminska kiselina. Koenzim sadrži **supstituisan pteridinski prsten, zatim 4-aminobenzoevu kiselinu i za nju vezanu glutaminsku kiselinu.**
- Naziv joj potiče od latinske reči folium = list. Najpre je otkrivena u listu spanaća a kasnije u mnogim drugim biljkama.

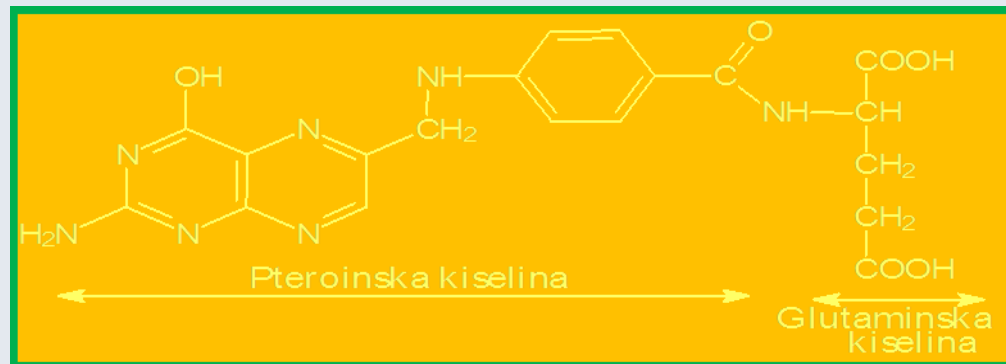
• Struktura FH₄



- Svoju koenzimsku funkciju obavlja u nizu kompleksnih reakcija. C1-jedinice prenosi tako što ih veže za atome azota (N5 i N10). Kao donor C1-jedinica učestvuje u **biosintezi aminokiselina glicina, serina i metionina te purina**, komponenata DNK i intermedijera u sintezi tiamin-pirofosfata itd.

Folna kiselina – vitamin B9

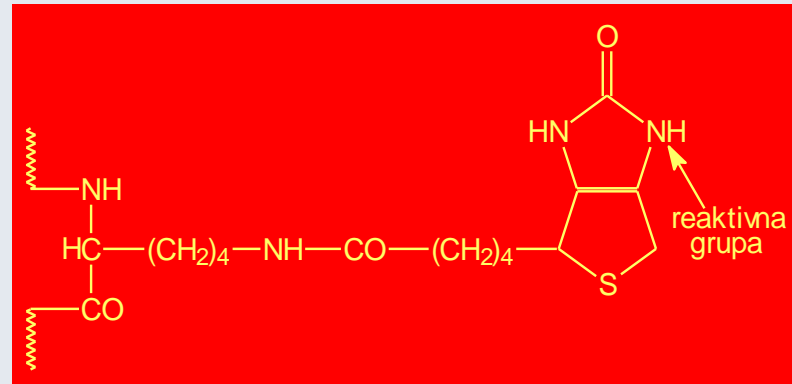
- **Folna kiselina** (pteroilglutaminska kiselina, ranije nazivana vitaminom B9) je po hemijskom sastavu derivat pteridin-p-aminobenzoeve i glutaminske kiseline.
- Redukovan oblik folne kiseline (tetrahidrofolna kiselina, FH4) ima ulogu koenzima C1-metabolizma. Značajna je u biosintezi purina i pirimidina, serina, histidina i metionina. Naziv joj potiče od latinske reči folium = list. Najpre je otkrivena u listu spanaća, a kasnije u mnogim biljnim vrstama.



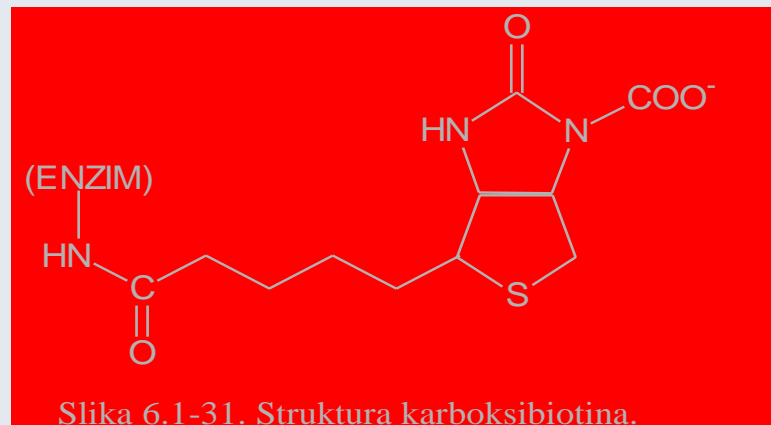
Biotin – vitamin H

- **Biotin** - je mobilni *nosač karboksilne grupe* odnosno aktiviranog CO₂, prevodeći ga u *biocitin*.
- On je prostetična grupa *karboksilaza, karboksil-transferaze*, te tako katalizuje reakcije karboksilovanja.
- Od značaja u sintezi masnih kiselina, rastu ćelija, glukoneogenezi, i metabolizmu masti i aminokiselina.
- *Poznat je po najjačoj protein-ligand interakciji – veže čvrsto AVIDIN (detekcija bioloških eukariotskih procesa).*

• Struktura biocitina



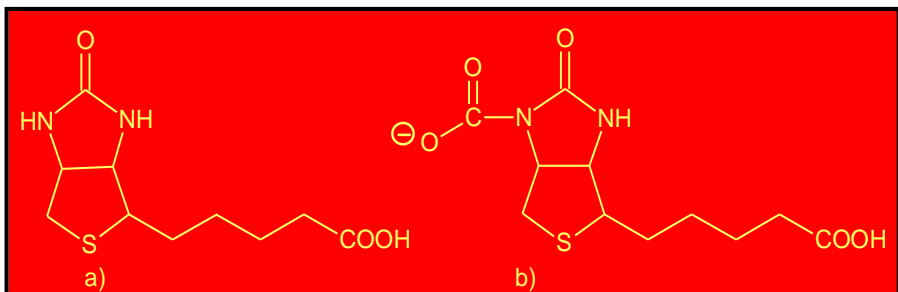
- *U reakciji karboksilovanja učestvuje reaktivna grupa biotina u imidazolskom prstenu pri čemu se gradi N-karboksiderivat biotina kao međuproizvod.*



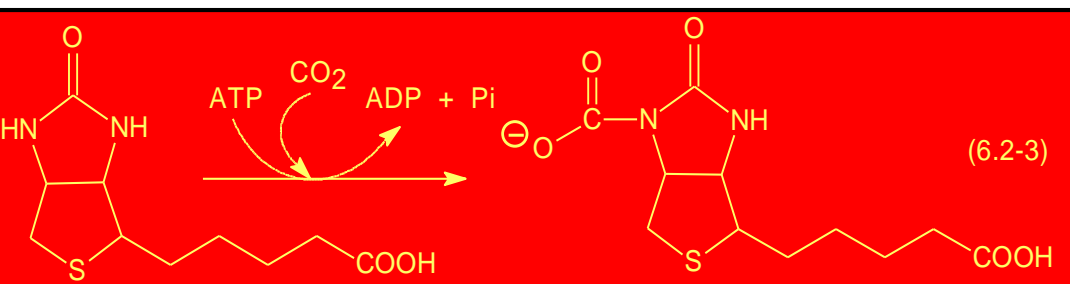
Slika 6.1-31. Struktura karboksibiotina.

Vitamin H

- **Vitamin H** (biotin) - je kondenzovani proizvod karbamida i tiofenskog prstena.



- **Vitamin H** je izolovan u kristalnom stanju prvi put 1936. godine.
- Njegova biohemijska funkcija koenzim je **karboksilazama** npr. piruvat-karboksilaze, enzima koji učestvuje u karboksilovanju pirogroždane kiseline do oksalacetata, zatim karboksi-laza koje učestvuju u sintezi masnih i aminokiselina itd.
- Biotin ne izaziva avitaminozu kod ljudi.



Sinteza karboksibiotina

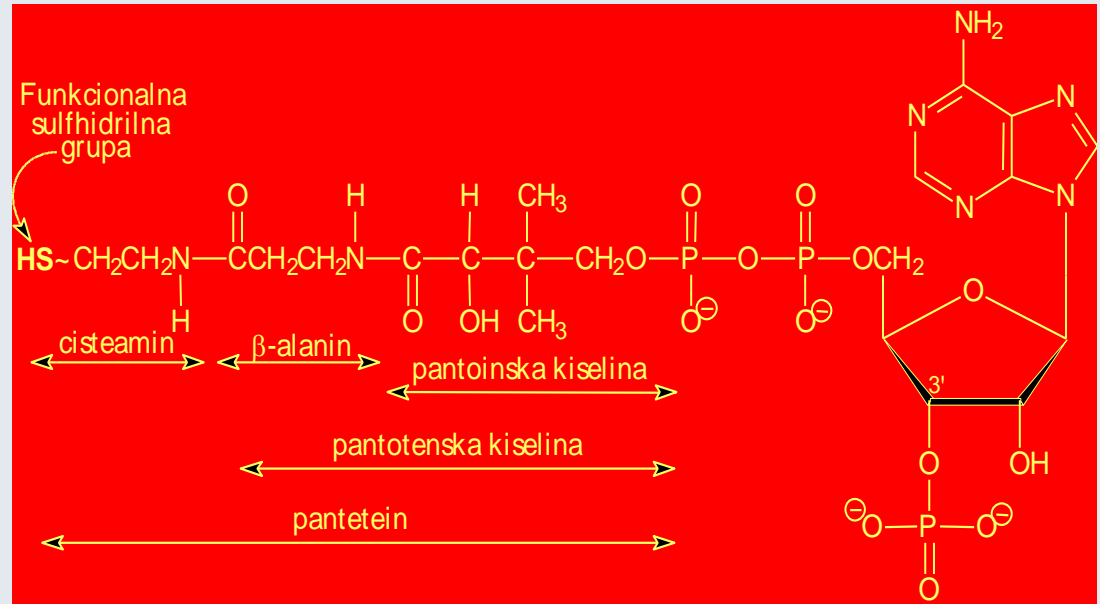
4. KOENZIMI C₂ METABOLIZMA

- CoA

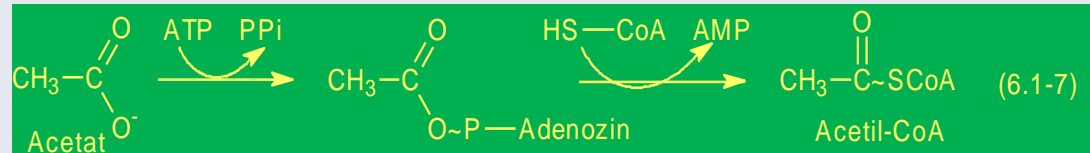
► **Koenzim A (HS~CoA)** - je kompleksan molekul koji sadrži reaktivnu **sulfhidrilnu grupu** (tiolna grupa), koja može reagovati sa karboksil- nom grupom i graditi **tioestre**.

► Izgrađen je iz **pantotenske kiseline** (vitamin B5), **cisteamina**, **β-alanina** i **adenozinskog ostatka**, koji je fosforilovan u položaju 3'.

• Struktura CoA



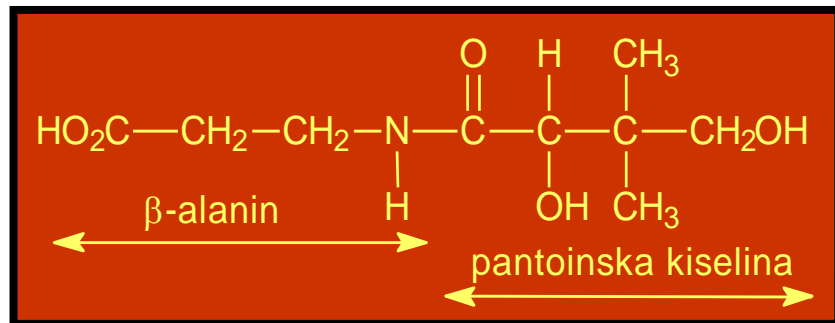
Slika 6.1-32. Struktura koenzima A (HS~CoA).



Vitamin B₅

- **Vitamin B₅** (pantotenska kiselina) je derivat pantoinske kiseline i β-alanina povezanih međusobno amidnom vezom.
- Prvi put je izolovan u kristalnom stanju 1939. godine.
- Vitamin B₅ je sastojak **CoA** i kao takav učestvuje u aktiviranju i prenosu sirćetne kiseline (acetyl-CoA) i drugih organskih kiselina (acyl-CoA).

- Pantotenska kiselina se nalazi u svim živim organizmima, a najviše je ima u višim biljkama i mikroorganizmima u kojima se sintetizuje iz aminokiseline triptofana.



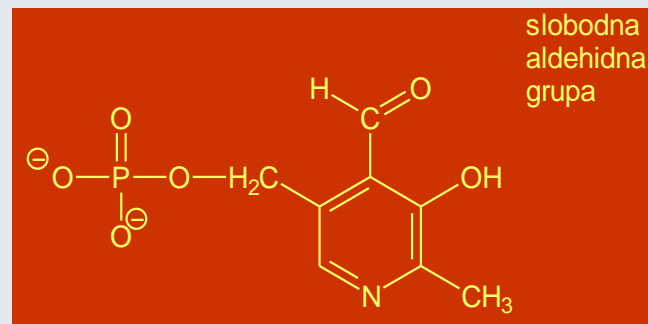
Najvažnije reakcije CoA

- 1. Oksidativna dekarboksilacija piruvata** (I faza proizvodnje energije u mitohondrijama)
- 2. Oksidativna dekarboksilacija α - ketoglutarata** (IV faza Krebsovog ciklusa)
- 3. Aktivacija masnih kiselina**
- 4. Sinteza acetil - CoA** od oksidacije masnih kiselina (IV faza β - oksidacije)
- 5. Katabolizam acetata** (iz etilnog alkohola) u hepatocitima

III. Struktura i funkcija koenzima liaza, izomeraza i ligaza - PALP

- **LIAZE** - su enzimi koji katalizuju razlaganje nekog jedinjenja (supstrata) ili obrnuto-spajanje dva jedinjenja u neko treće (sintaze). Ta poslednja reakcija poklapa se često sa prenosom grupa i dok kod enzima još možemo povući neku granicu, to nije moguće kod koenzima. Mnogobrojne grupe, aktivirane koenzimima, učestvuju u reakcijama sintaza, npr. acetil-CoA, karboksibiotin itd.

- **Piridoksal-fosfat (PALP)** - je najznačajniji koenzim enzima **aminotransferaza** (koje katalizuju prenošenje amino grupa sa aminokiseline-davaoca na α -ketokiseline), **aminodekarboksilaza** i **različitih liaza** koje učestvuju u metabolizmu aminokiselina. Po hemijskom sastavu PALP je fosforilovan piridoksal.

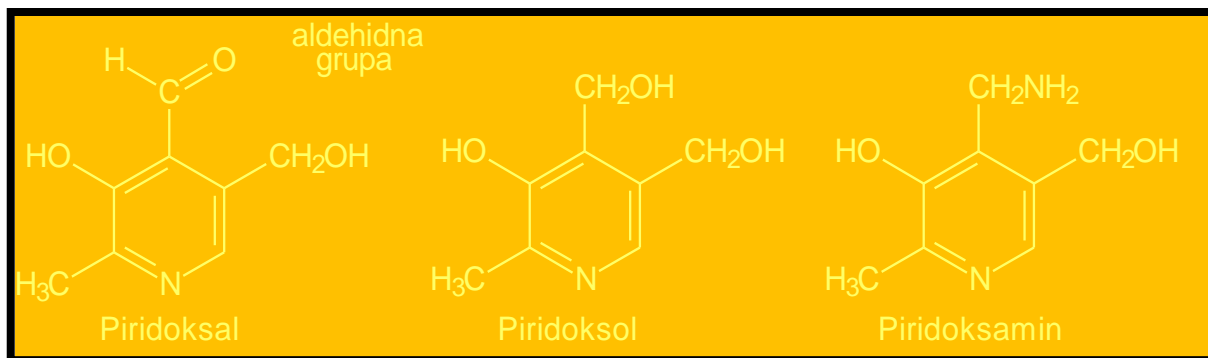


- Kao što se iz formule vidi piridoksal-fosfat ima slobodnu aldehidnu grupu koja se sa amino-grupom neke aminokiseline povezuje u **Shiff-ovu bazu**.

Vitamin B₆

- **Vitamin B₆** (piridoksin) - je izgrađen iz tri vitamina i to: *piridoksala, piridoksola i piridoksamina.*

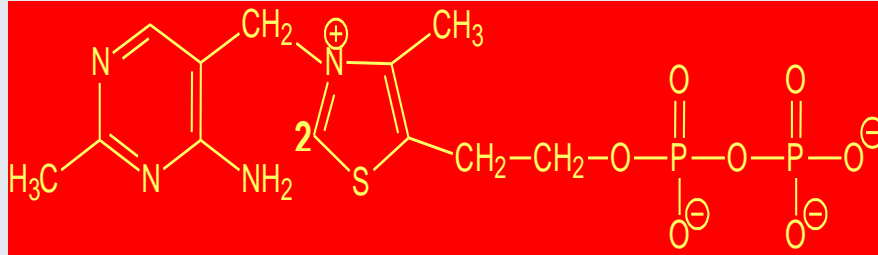
- Svi navedeni vitamini B6 prelaze u živim organizmima u piridoksal-fosfat, koenzim enzima **transaminacije, dekarboksilacije i racemizacije.**



TPP

- **Tiamin-pirofosfat** (TPP, tiamin-difosfat) - je koenzim u više enzimskih reakcija u kojima se aldehidna grupa prenosi od donora akceptoru. Po hemijskom sastavu je pirofosfatni ester tiamina .

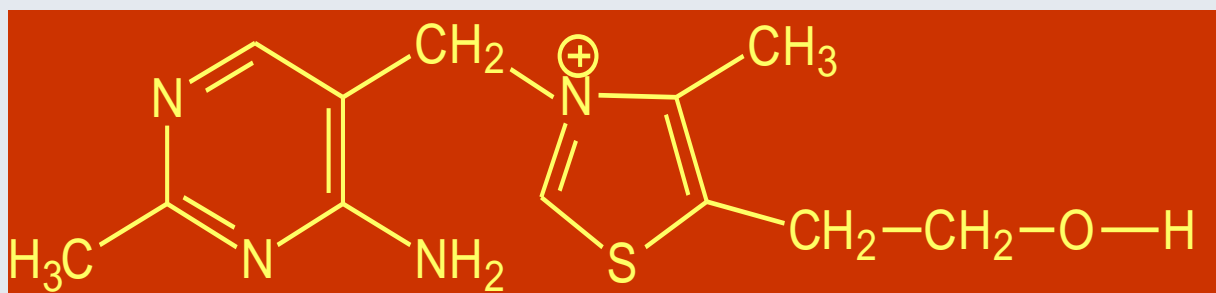
- **Struktura tiamin-pirofosfata (TPP)**



- Najvažniji tip reakcije u kojoj tiamin-difosfat učestvuje kao prostetična grupa nekog enzima, jeste **dekarboksilovanje α -ketokiselina, piruvata i α -ketogutarata**. Reaktivni centar TPP-a je u C₂-tiazolskom prstenu koji lako otpušta proton i gradi **karbanjon**.

Tiamin - Vitamin B1

- **Vitamin B1** (tiamin, aneurin) - je jedan od najranije poznatih vitamina rastvorljivih u vodi. Sastoji se iz pirimidinskog i tiazolskog prstena, koji su međusobno povezani metilenskim mostom.



TPP koenzim niza enzima

- Kompleks *piruvat dehidrogenaze*
- Kompleks *piruvat dekarboksilaze* u fermentaciji etanola
- Kompleks *α -ketoglutarat dehidrogenaze*
- Kompleks *dehidrogenaza AK razgranatih lanaca* (leucin, izoleucin, valin)
- *Transketolaza*

Koenzimi **IZOMERAZA, LIGAZA i HIDROLAZA...**

- **IZOMERAZE** - su proteinski enzimi za čiju katalitičku funkciju nije potreban koenzim. Izuzetak je enzim ***mutaza*** koja u metabolizmu ugljenih hidrata omogućava prebacivanje fosfatne grupe sa jednog C atoma u skeletu na drugi.
- Tipična reakcija ovog tipa je transformacija 3-fosfoglicerata u 2-fosfoglicerat djelovanjem enzima ***3-fosfoglicerat mutaze***, kao jedna od važnih reakcija u drugoj fazi glikolize.

- **LIGAZE** - u reakcijama koje katalizuju koriste nukleozid-fosfate (najčešće ATP, UDP, CTP i GTP) kao koenzime, biotin kod karboksilovanja, a u aktiviranju aminokiselina t-RNA.

- ***HIDROLAZE - su grupa enzima za čiju katalitičku aktivnost nisu potrebni koenzimi!!!!!!***

Vitamin C

- **Vitamin C** (L-askorbinska kiselina) - je vitamin koji je prvo izolovan iz limuna, a zatim i iz paprike. Vitamin C može lako preći u dehidro oblik čime se tumači njegova uloga u ***oksidoredukcionim procesima***.
- Iako ne sadrži karboksilnu grupu ima kiseo ukus koji potiče od **enolnih-OH grupa** (na C2 i C3) koje su sposobne da disocijacijom otpuštaju H⁺ jone.
- Kao en-diol spada u redoks sisteme pri čemu reverzibilno prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu.

Uloga vitamina C u organizmu

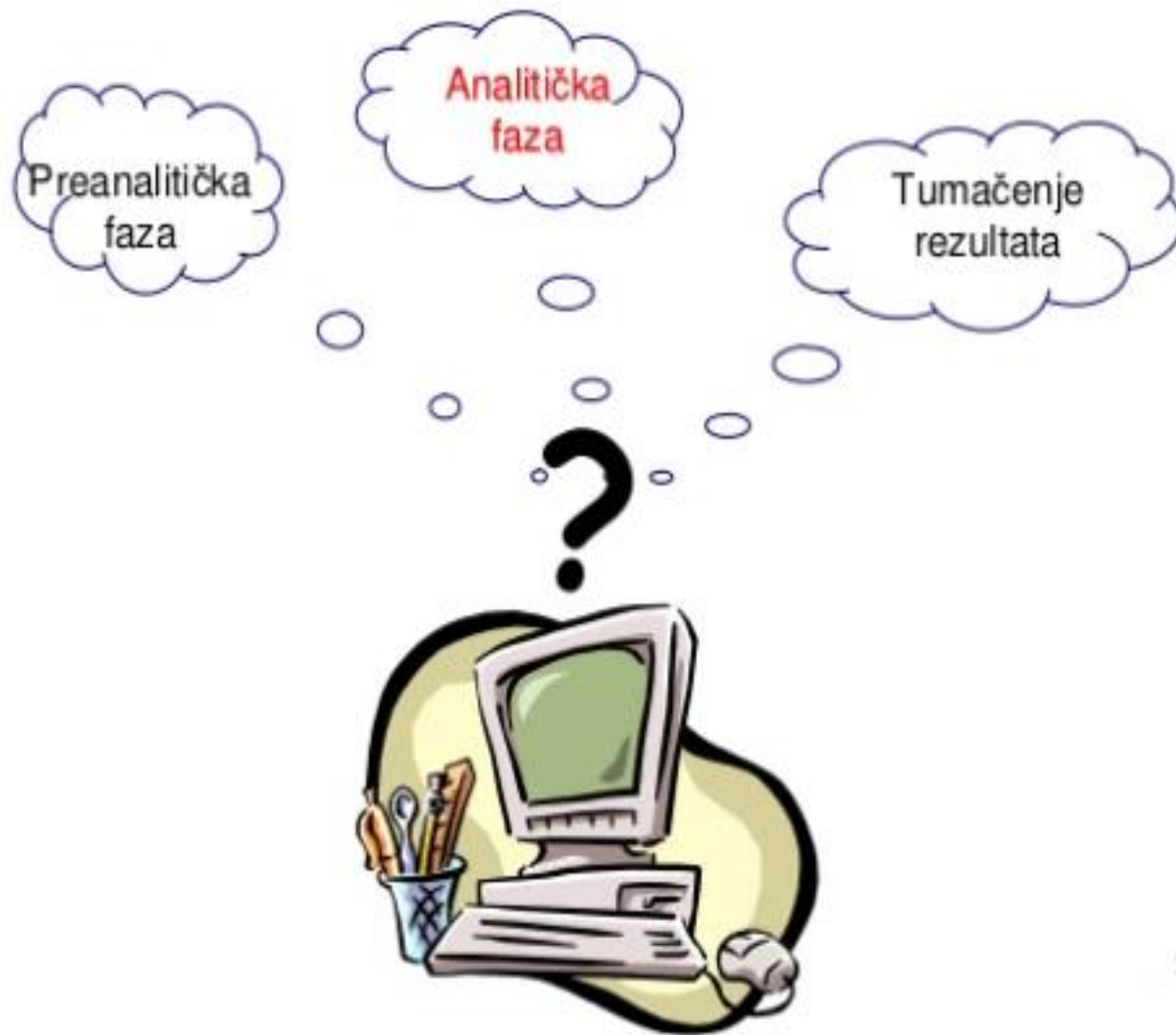
- Sinteza kolagena i karnitina
- Metabolizam masnih kiselina
- Antioksidativna
- Funkcija ćelijskog disanja
- Stimulacija imunološkog odgovora (interferon, antitijela, leukociti)
- Antivirusna aktivnost
- Antihistaminik u dozama većim od 1 mg/dnevno
- Bitan kod sinteze hormona nadbubrega

Metalni joni - neorganski kofaktori

- **Esencijalni elementi u tragovima** – kofaktori (Fe, Mg, Mn, Co, Cu, Zn, Mo). Postoje izuzeci:
- **Hrom** – ne spada u kofaktore, ali niske vrijednosti uzrokuju poremećaj tolerancije glukoze;
- **Ca** – potreban za punu aktivnost mnogih enzima (sintaza azotoksida, protein fosfataza, adenilat kinaza) i ćelijska signalna molekula;
- **Jod** – dio strukture hormona štitaste žlijezde;
- **Fe₂S₂ klaster** – kordinira putem četiri cisteinska ostatka;
- U nekim slučajevima potrebno je **prisustvo i organskog i neorganskog kofaktora** – hem proteini (porfirinski prsten i Fe);
- Nekad je potrebno **prisustvo nekoliko kofaktora** – PDK (TPP, NAD, CoA, FAD i Mg).

Analitičke metode u kliničkoj enzimologiji

Laboratorijsko određivanje aktivnosti enzima



Enzimaska analiza

1. Određivanje katalitičke aktivnosti enzima u biološkim materijalima
2. Određivanje koncentracije pojedinih supstanci pomoću enzima
3. Određivanje koncentracije supstanci pomoću reagenasa obeleženih enzimima

Metode određivanja aktivnosti enzima

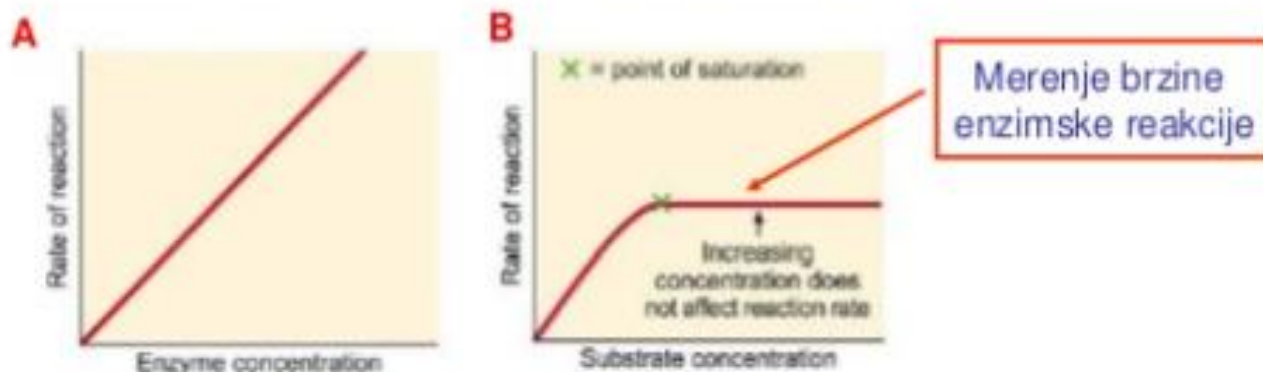


Fig. 1: Effect of the concentrations of enzyme and substrate on the rate of an enzyme-catalyzed reaction

Tri parametra

V-brzina; E-aktivnost enzima; S- koncentracija supstrata;

A. [S] - konstanta

B. [S] - raste

Dva osnovna postupka određivanja aktivnosti enzima

- Diskontinuirani
- Kontinuirani

Izračunavanje aktivnosti enzima

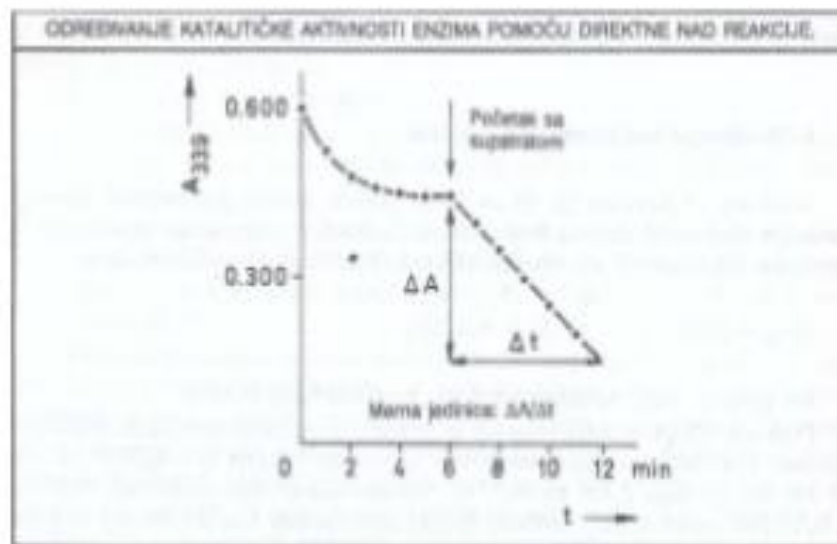
- Spektrofotometrijske metode meri se $\Delta A/\Delta t$
- $\Delta A/\text{min}$
- 340 nm; 339 nm
- Putem molarnog apsorpcionog koeficijenta
- **NADH na 339 nm je $6,3 \times 10^3 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$**

$$U/L = \Delta A/\text{min} \times \frac{1}{6,3 \times 10^{-3}} \times \frac{\text{UZ}}{\text{ZA}}$$

$$U/L = F \times \Delta A/\text{min}$$

Ranije

$$6,22 \times 10^3 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$



Merenje i izražavanje aktivnosti enzima

- **Katalitička aktivnost enzima**
- Jedinice za izražavanje aktivnosti enzima u SI sistemu
- **Katal mol/s**
- Katalitička količina nekog enzima koja transformiše 1 mol supstrata za sekund pod određenim uslovima
- Mikrokatal, nanokatal, pikokatal

- **Internacionalna jedinica (IJ, U, IU)**
- Količina enzima koja transformiše jedan mikromol supstrata u jednom minutu pod standardnim uslovima
- $1 \text{ U} = 1 \mu\text{ mol/min} = 1/60 \mu\text{ mol/s} = 1/60 \mu\text{ kat} = 16,67 \text{ nkat}$

Enzimi kao analitički reagensi

- Merenje metabolita (supstrata)
 - Ravnotežne metode
 - Kinetičke metode
- Imunoeseji
- Analitička primena imobiliziranih enzima
- Restrikcioni enzimi i analiza DNK
- PCR – lančana reakcija polimerizacije

Imunoesej

- U imunoeseju, enzimski obeležena antitela ili antigeni prvo reaguju sa ligandom, a zatim se dodaje supstrat ispitivanog enzima
- Kao enzimski obeleživači koriste se:
 - Alkalna fosfataza
 - Peroksidaza iz rena
 - Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
 - Beta-galaktozidaza
- Modifikacija ove metode je enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) u kome je jedna od reakcionih komponenti vezana za površinu čvrste faze.
- Princip testa

(b) Sandwich ELISA

