

RĂSPUNSURI LA ÎNTREBĂRI

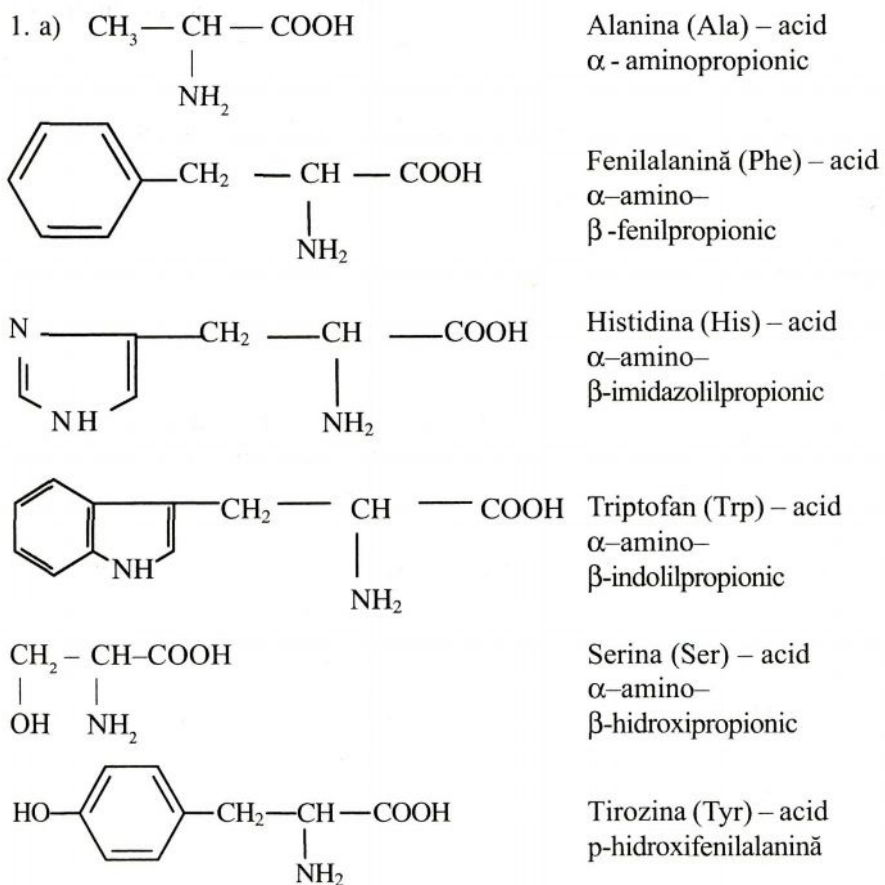
CAPITOLUL I

Structura și funcțiile proteinelor. Enzimele

TEMA 1

Introducere. Importanța biochimiei pentru medicină.

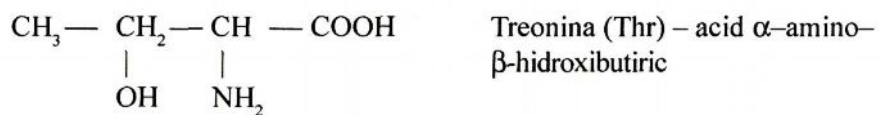
Aminoacizii. Reacțiile de culoare ale aminoacizilor și proteinelor



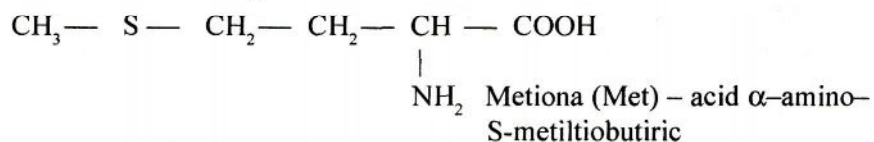


Cisteina (Cys) - acid α -amino- β -tiopropionic

b)

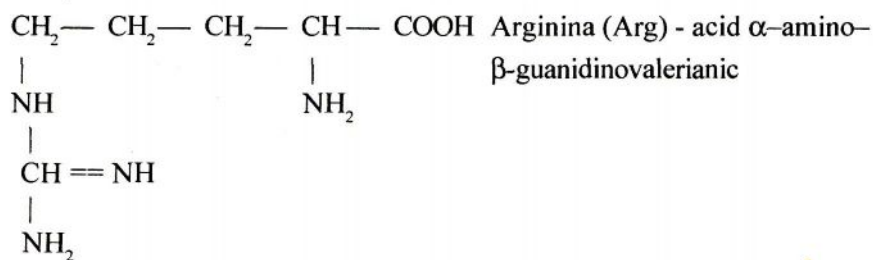


Treonina (Thr) - acid α -amino- β -hidroxibutiric

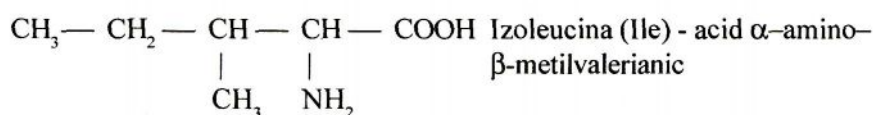


Metiona (Met) - acid α -amino-S-metiltiobutiric

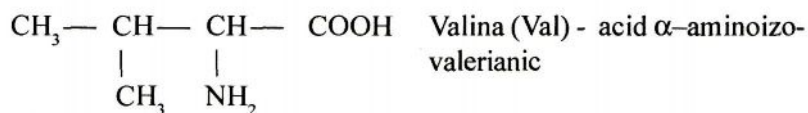
c)



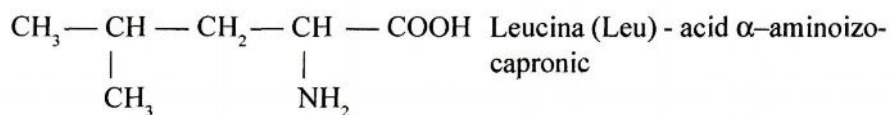
Arginina (Arg) - acid α -amino- β -guanidinovalerianic



Izoleucina (Ile) - acid α -amino- β -metilvalerianic

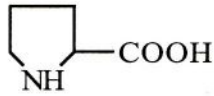


Valina (Val) - acid α -aminoizo-valerianic



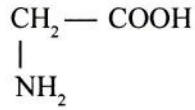
Leucina (Leu) - acid α -aminoizo-capronic

2. a) alanină, valină, leucină, izoleucină, fenilalanină, triptofan, metionină și prolină

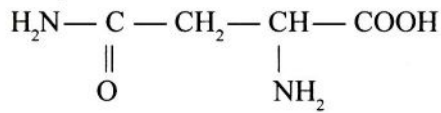


Prolina (Pro)

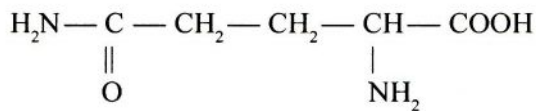
b) serină, treonină, tirozină, cisteină, asparagină, glutamină și glicocol.



Glicocol (Gly)

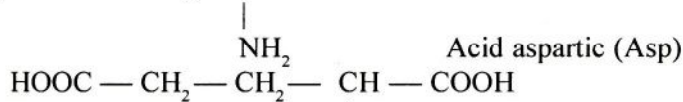


Asparagină (Asn)

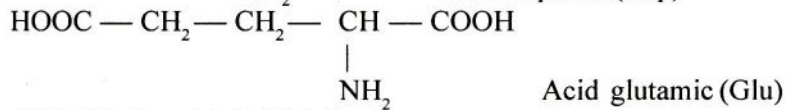


Glutamină (Gln)

c) $\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH}$

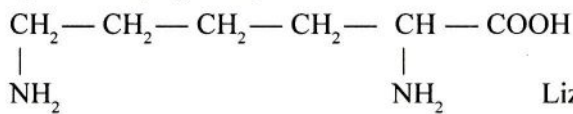


Acid aspartic (Asp)



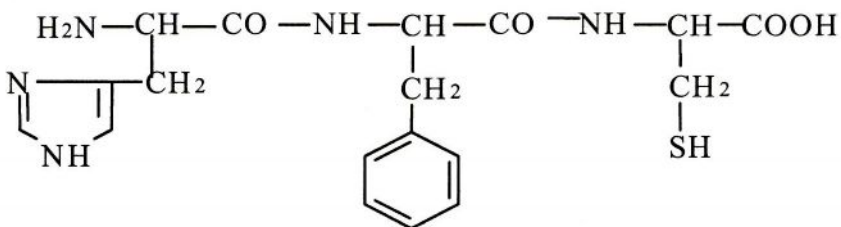
Acid glutamic (Glu)

d) Histidină, arginină și lizină:



Lizină (Lys)

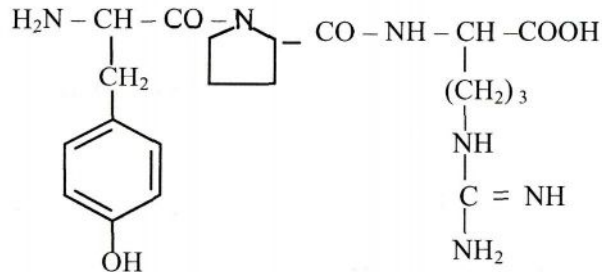
3.



Histidil - fenilalanil - cisteină

Acest tripeptid va da următoarele reacții de culoare:

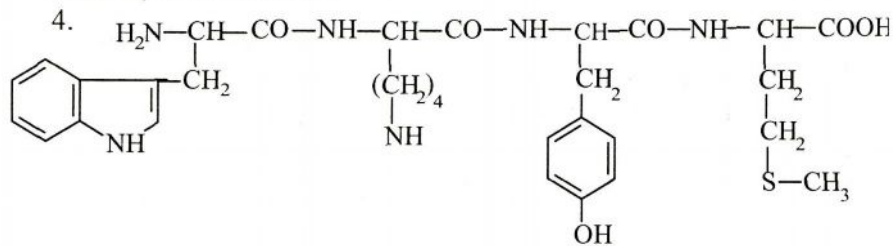
1. Reacția biuretelui (prezența legăturilor peptidice -NH-CO-);
2. Reacția cu ninhidrina (prezența resturilor de α - aminoacizi);
3. Reacția xantoproteică (prezența fenilalaninei);
4. Reacția Fol (prezența cisteinei).



Tirozil - prolil - arginină

Reacțiile pozitive de culoare ale acestui tripeptid sunt:

1. Reacția biuretelui (indică prezența legăturilor peptidice);
2. Reacția xantoproteică (indică prezența tirozinei);
3. Reacția cu ninhidrină.



Triptofil - lizil - tirozil - metionină
(Trp - Lys - Tyr - Met)

5. Conform regulilor matematicii, numărul de izomeri va fi: $1 \times 2 \times 3 = 6$.
6. Compusul nu este un peptid, deoarece el dă reacția biuretică negativă ceea ce indică absența legăturilor peptidice. Din cauză că compusul

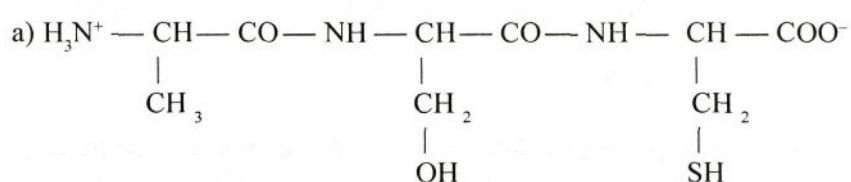
reacționează cu ninhidrina, formînd un complex de culoare albastră - violetă, el prezintă un α -aminoacid sau o amină.

7. Reacția lui Fol indică prezența în proteine a aminoacizilor ce conțin sulf legat slab - cisteina și cistina. Însă și alți compuși organici și anorganici ai sulfului, de exemplu tiolii, prezenți în lichidul biologic dau reacția Fol pozitivă, deci apare un precipitat negru de sulfură de plumb.

8. Reacția cu ninhidrină este o reacție caracteristică de culoare a α -aminoacizilor (colorație albastră - violetă) și deci reacția pozitivă indică prezența aminoacizilor liberi în soluție.

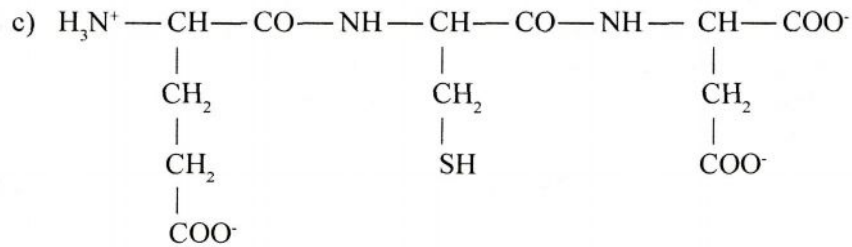
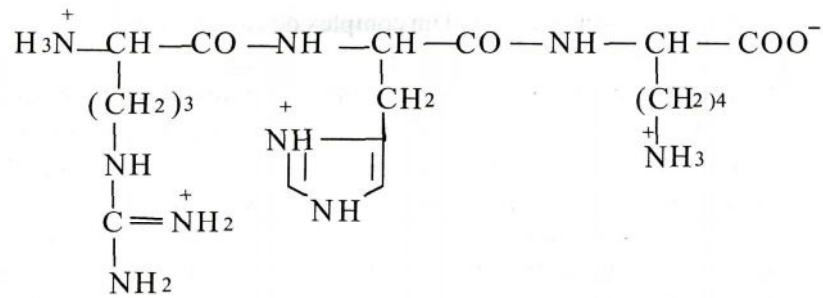
9. Hidroliza completă a proteinei duce la scindarea hidrofilică a tuturor legăturilor peptidice. De aceea sfîrșitul hidrolizei se poate stabili cu ajutorul reacției biuretului care în acest caz va fi negativă (colorație albastră), dar nu pozitivă (colorație violetă), ca în cazul hidrolizei incomplete.

10.



Funcția alcool din serină nu posedă proprietăți acido - bazice, iar funcția tioalcool din cisteină este acid foarte slab și se ionizează într-o măsură neglijabilă. Grupările care determină pH-ul mediului sunt grupările $-\text{NH}_3^+$ și $-\text{COO}^-$. În apă pură gruparea $-\text{NH}_3^+$ donează mai mulți protoni decît acceptă ionul $-\text{COO}^-$ din care cauză soluția apoasă a acestui tripeptid este slab acidă și punctul izoelectric (pI) este situat într-un mediu slab acid (pI < 7).

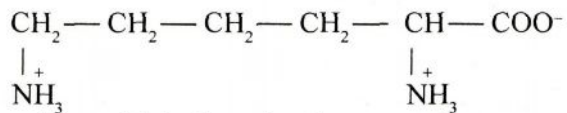
b) Lizina, arginina și histidina sunt aminoacizi bazici datorită prezenței în radicalii lor a funcției aminice (în lizină), a grupării guanidinice (în arginină) și a nucleului heterociclic al imidazolului (în histidină). Deci, în tripeptidul dat predomină grupările bazice și la dizolvarea lui în apă formează o soluție slab alcalină. Punctul izoelectric (pI) este situat într-un mediu slab alcalin (pI = 7-10).



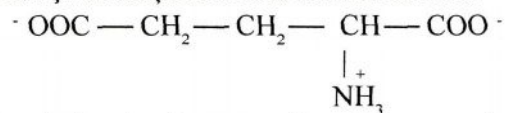
În acest tripeptid predomină grupările acide ale aminoacizilor dicarboxilici (aspartic și glutamic). Soluția apoasă este puternic acidă și punctul izoelectric este situat într-un mediu puternic acid.

11. În soluții aminoacizii se află în stare ionizată (ion amfoter, anion sau cation) care depinde de pH-ul soluției.

Spre catod vor migra următorii aminoacizi: lizina și arginina, deoarece ei sunt aminoacizi diaminomonocarboxilici și în soluție se găsesc sub formă de cationi:



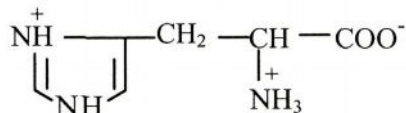
Spre anod va migra acidul glutamic, deoarece el este un aminoacid monoaminodicarboxilic și în soluție se află în formă anionică:



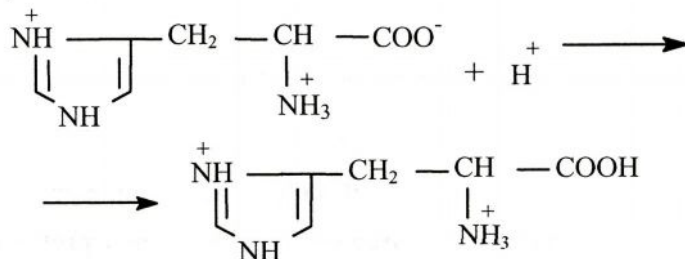
Aminoacizii glicina, alanina și valina sunt aminoacizi monoaminocarboxilici,

și deci, în soluție se află sub formă de ioni amfoteri. Punctul izoelectric al acestor aminoacizi este cca 6,0 și deci la electroforeză ei nu se deplasează nici spre catod, nici spre anod, ci rămân la locul de start.

12. Punctul izoelectric al histidinei este $pI = 7,58$.

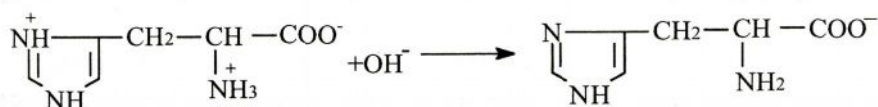


La $pH = 4,0$



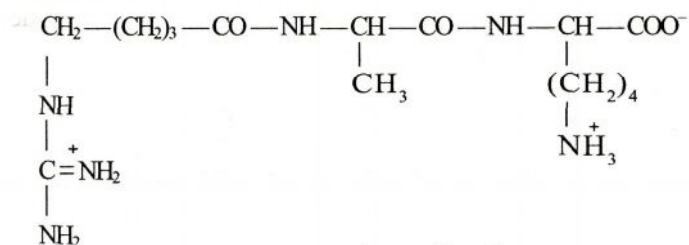
Histidina se află sub formă de cation și va migra spre catod.

La $pH=12,0$



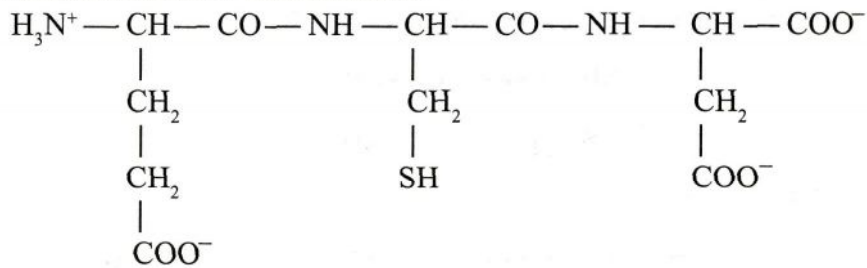
Histidina se află sub formă de anion și va migra spre anod.

13. Într-un astfel de tripeptid predomină aminoacizi diaminomonocarboxilici. Deci, el posedă sarcină electrică pozitivă din care cauză punctul izoelectric se află într-un mediu alcalin:



Arg - Ala - Lys

14. Într-un astfel de tripeptid predomină aminoacizi monoamino-dicarboxilici. Deci el posedă sarcină electrică negativă din care cauză punctul izoelectric se află într-un mediu acid.



Glu - Cys - Asp

TEMA 2

Structura chimică și rolul biologic al proteinelor

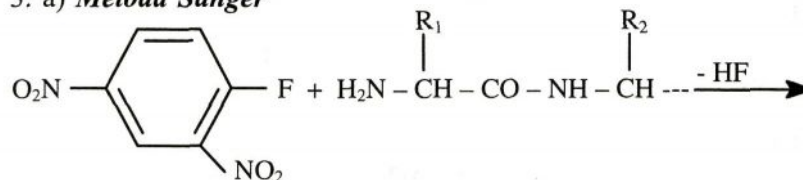
1. Factorii determinanți ai structurii terțiare a unei proteine sunt interacțiunile necovalente între radicali (R), punțile de hidrogen, legăturile ionice, interacțiunile hidrofobe. Resturile de cistienil formează legături covalente disulfurice -S-S- care leagă covalent regiuni mai depărtate ale lanțurilor polipeptidice.

2. a) Metodele de separare și purificare ale proteinelor (salifierea, precipitarea cu etanol, cromatografia, electroforeza, gel - filtrarea, cristalizarea etc.) pentru obținerea proteinei individuale.

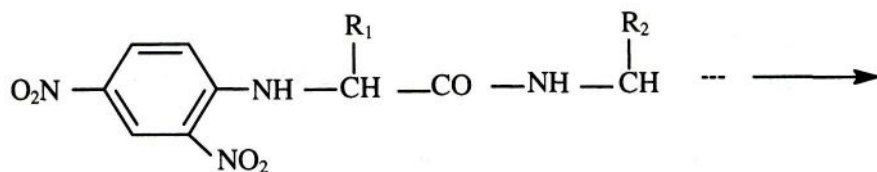
b) Hidroliza completă a proteinei obținute, hidroliză acidă, alcalină sau enzimatică, și obținerea hidrolizatului de proteină care prezintă un amestec de aminoacizi constituenți ai proteinei.

c) Pentru identificarea aminoacizilor din hidrolizat sunt utilizate reacțiile de culoare ale aminoacizilor, metodele cromatografice (cromatografia de schimb ionic, cromatografia de repartitie etc.).

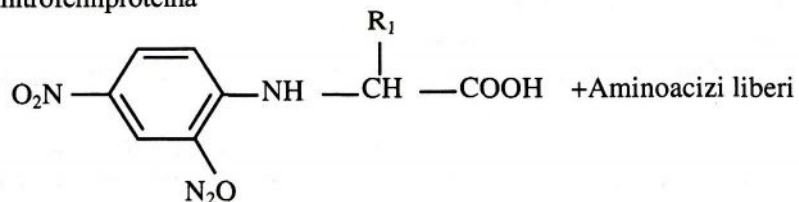
3. a) *Metoda Sanger*



2,4 - Dinitrofluorbenzen

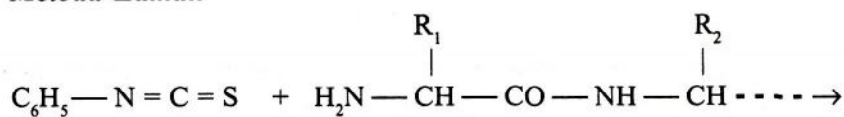


Dinitrofenilproteină

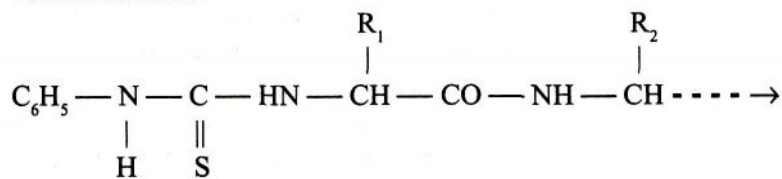


Dinitrofenilaminoacid

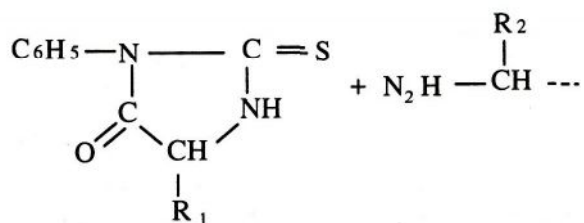
Metoda Edman



Fenilzotiocianat



Derivat feniltiohidantonic al proteinei

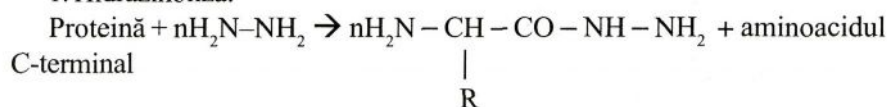


proteina n-1

Derivat feniltiohidantonic al aminoacidului N - terminal.

b)

1. Hidrazinoliza:



2. Reducere cu LiBH_4 - aminoacidul C-terminal se transformă în aminoalcoolul corespunzător.

3. Prin utilizarea carboxipeptidazelor.

c) Hidroliza parțială enzimatică a proteinei cu ajutorul tripsinei și chimotripsinei. Se obțin două seturi de fragmente peptidice.

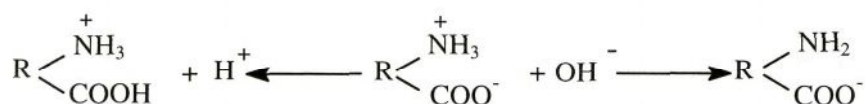
Separarea fragmentelor peptidice, determinarea compoziției în aminoacizi și determinarea secvenței aminoacizilor prin metoda Edman. Compararea secvențelor aminoacidice ale celor două seturi de fragmente peptidice și stabilirea secvenței aminoacidice a proteinei.

TEMA 3

Proprietățile fizico-chimice ale proteinelor. Metodele de separare, purificare și determinare a proteinelor

1. Moleculele de proteină au dimensiuni ce corespund particulelor coloidale din care cauză proteinele formează soluții coloidale. Prezența proteinei poate fi dovedită prin efectuarea reacțiilor de culoare specifice pentru proteine și aminoacizi (reacția biuretului, cu ninhidrina, xantoproteică ș.a.) .

2. Într-un mediu pronunțat acid sau alcalin proteinele au o încărcătură netă pozitivă sau negativă ceea ce împiedică agregarea și, deci, precipitarea moleculelor de proteină din soluție.

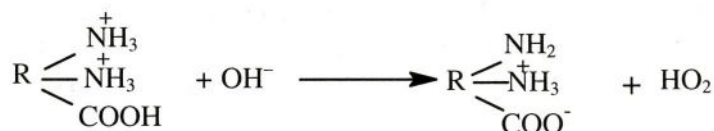


3. Toxinele sunt proteine termolabile de aceea se denaturează la prelucrarea termică și își pierd activitatea biologică, inclusiv toxicitatea.

4. În stabilitatea moleculelor de proteină în soluție apoasă intervin doi factori: apa de hidratare din molecula de proteină și sarcina electrică pe

care o posedă proteina. Îndepărtarea acestor factori duce la agregarea și precipitarea proteinei din soluție. Adăugarea etanolului la o soluție proteică apoasă crește forța de atracție dintre sarcinile de semn opus scăzând astfel gradul de ionizare al grupelor R ale proteinei.

5. Deoarece solubilitatea minimă a proteinei se află la pH - 9,1 care corespunde punctului izoelectric pI al proteinei, această valoare a pH - lui indică că în proteină predomină aminoacizi diaminomonocarboxilici - lizina, arginina.



Se prepară un sistem tampon pH-ul căruia corespunde punctului izoelectric al proteinei. În acest sistem tampon se introduce amestecul de proteine. Proteina cu pI egal cu pH-ul sistemului tampon se va precipita deoarece la acest pH moleculele de proteină nu au încărcătură electrică și deci nu există respingere electrostatică între moleculele de proteină vecine, care tind să se aglomereze și să se precipite. Celelalte proteine cu valori de pI izoelectric deasupra sau dedesubtul pH-lui sistemului tampon, rămân în soluție întrucât ele au o sarcină electrică netă de același semn. Acest procedeu de separare a proteinelor dintr-un amestec de proteine poartă denumirea de precipitare izoelectrică.

6. a) Hidroliza proteinei prezintă procesul de scindare a legăturilor peptidice -CO-NH- prin adăugarea elementelor apei. Hidroliza proteinei poate fi efectuată prin fierbere cu un exces de acid clorhidric concentrat, prin fierbere cu soluții concentrate de NaOH sau pe cale enzimatică cu ajutorul pepsinei, tripsinei etc. În caz de hidroliză dispar nu numai nivelurile superioare de structură secundară, terțiară și cuaternară ci și structura primară ceea ce duce la formarea unui amestec de aminoacizi din care este constituită proteina. Hidroliza proteinelor este un proces ireversibil.

b) Salifierea proteinelor este precipitarea proteinelor din soluție cu ajutorul concentrațiilor mari de săruri. Sulfatul de amoniu este preferat pentru salifierea proteinelor. Unul dintre factorii care intervin în salifiere este îndepărtarea apei de hidratare din molecula proteinei de către concentrația mare de sare, ceea ce duce la scăderea solubilității acesteia.

Salifierea este un procedeu important pentru separarea amestecurilor de proteine, deoarece fiecare proteină răspunde diferit la concentrația sărurilor neutre (de exemplu, albuminele se precipită prin adăugare de soluție saturată de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, iar globulinele - soluție semisaturată de sulfat de amoniu). Proteinele precipitate prin salifiere își păstrează conformația lor nativă și pot fi dizolvate din nou.

c) Modificarea conformației native a unei proteine poartă denumirea de denaturare, iar agenții care o provoacă sunt agenți denaturanți. În cursul denaturării unei proteine legăturile peptidice nu sunt rupte, deci structura primară rămâne intactă, spre deosebire de legăturile slabe necovalente care determină structurile de ordin superior ale unei proteine – secundară, terțiară, cuaternară.

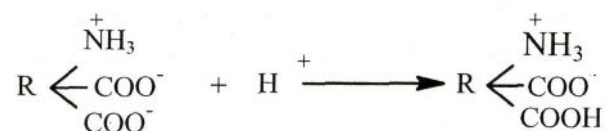
Caracteristica cea mai semnificativă a denaturării este faptul că proteina își pierde activitatea sa biologică specifică. Denaturarea este ireversibilă, însă în unele cazuri molecula denaturată proteică revine spontan la forma sa nativă, proces numit renaturare. Agenții denaturanți sunt temperaturile de 60-70 C°, radiațiile, pH -urile extreme, ureea, guanidina etc.

7. a) Solvenții organici acționează asupra interacțiunilor hidrofobe din conformația nativă a proteinei. Totuși la temperaturi joase etanolul și acetona nu posedă acțiune denaturantă.

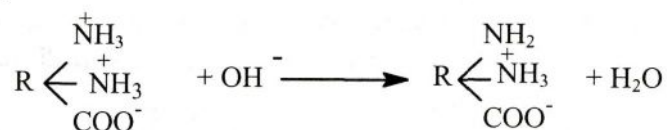
b) Acizii și bazele destabilizează structura proteinelor acționând asupra legăturilor electrostatice și schimbând raporturile de vecinătate între sarcinile + și - de pe suprafața moleculei.

c) Ureea și guanidina formează cu proteina numeroase legături de hidrogen dezorganizând astfel structura ei. Însă acțiunea acestor agenți este ușor reversibilă – după îndepărtarea ureei sau a guanidinei legăturile de hidrogen se reconstituie în cuprinsul moleculei proteice în același număr și în aceleași poziții ca în proteina nativă.

8. Majoritatea proteinelor au punctul izoelectric într-un mediu slab acid, deoarece în ele predomină grupările carboxil libere:



Protaminele și histonele sunt proteine bazice cu conținut înalt de acizi diamino-carboxilici - lizina și arginina, din această cauză punctul lor izoelectric se găsește într-un mediu slab alcalin:



9. a) La pH - 4,0 histonele au sarcină netă pozitivă și deci se află sub formă cationică, direcția de migrare - spre catod.

b) pH - 9,5 corespunde punctului izoelectric și histonele nu migrează nici spre catod, nici spre anod.

10. Proteinele prezintă coloizi liofili, și deci pot forma geluri. Particulele coloidale de proteină interacționează între ele și apare o structură reticulară internă din care cauză viscozitatea soluției crește. Formarea de gel se observă la coagularea sîngelui (formarea rețelei de fibrină).

Formarea gelului depinde de: 1. Concentrația soluției.

2. Temperatură.

3. Concentrația ionilor de hidrogen.

4. Prezența electroliților.

Formarea gelurilor se produce la creșterea concentrației soluției, la scăderea temperaturii, în punctul izoelectric se observă o viteză maximă de formare a gelului. Ionul SO_4^{2-} facilitează transformarea solului în gel.

11. Xerogelul prezintă gel sec, deci gelul lipsit de lichid. Ca exemplu de xerogeluri poate servi cauciucul, celuloza, gelatina uscată și alte proteine (albumina ș.a.).

12. Secarea liofilă a soluțiilor coloidale constă în îndepărtarea lichidului (apei) din soluția coloidală și obținerea xerogelului. Procedeu se efectuează în vid. Xerogelurile obținute se păstrează un timp mai îndelungat ceea ce prezintă importanță practică în industria de preparare a medicamentelor de origine proteică.

13. Proteinele globulare în soluție pot fi ușor separate de substanțele cu masă moleculară mică prin dializă și ultrafiltrare. Pentru aceasta se utilizează o membrană semipermeabilă (celofanul sau alte materiale sintetice) care reține moleculele de proteină și lasă să treacă moleculele mici solubile, așa ca glucoza sau sulfatul de amoniu, și moleculele de apă. În dializă îndepărtarea

substanțelor cu masă moleculară mică se efectuează prin înlocuirea de câteva ori a fazei apoase exterioare cu apă distilată, iar în ultrafiltrare se utilizează presiunea sau forța centrifugă.

14. Dacă se consideră că fiecărei molecule de proteină îi revine un atom de fier, atunci masa moleculară minimă a proteinei se calculează din raportul:

$$\begin{array}{l} 0,34\% \text{ ----- } 56 \\ 100\% \text{ ----- } x \end{array} \quad x = \frac{56 \times 100}{0,34} = 17.000\text{Da}$$

15. Dacă proteina conține un singur rest de triptofan, atunci masa moleculară a proteinei se calculează din raportul:

$$\begin{array}{l} 0,6\% \text{ ----- } 204 \\ 100\% \text{ ----- } x \end{array} \quad x = \frac{204 \times 100}{0,6} = 34.000\text{Da}$$

16. Alcoolul etilic și iodul fac parte din remediile antiseptice - preparate care au o acțiune puternică antimicrobiană. Aceste substanțe prezintă agenți denaturanți și deci provoacă denaturarea proteinelor bacteriilor din care cauză etanolul și iodul posedă acțiune bacteriostatică și bactericidă. Antisepticele sunt utilizate în practica chirurgicală la dezinfectarea mâinilor chirurgului și câmpului de operație, în tratamentul plăgilor, în tratamentul bolilor purulente ale pielii și mucoaselor.

17. Sărurile metalelor grele sunt agenți precipitanți, deci conduc la sedimentarea proteinelor din soluție.

Proteina denaturată fixează ionii metalelor grele și antrenează după sine în precipitat ionii metalelor grele. Această circumstanță este folosită în practica medicală: în intoxicațiile cu săruri ale metalelor grele, de exemplu, cu substrat coroziv. Bolnavului i se administrează în calitate de antidot mari cantități de albuș de ou sau lapte. Proteinele formează în stomac cu sărurile metalelor grele precipitate insolubile, astfel fiind curmată absorbția ionilor toxici de metal.

TEMA 4

Natura chimică și structura enzimelor. Mecanismul acțiunii enzimatice. Clasificarea enzimelor. Vitaminele în calitate de coenzime

1. În experiențe este utilizată amilaza salivară care scindează amidonul pe cale hidrolitică.

Toate enzimele sunt de natură proteică. Natura proteică a amilazei este dovedită prin faptul că dacă asupra amilazei acționăm cu o enzimă proteolitică, de exemplu cu pepsina, atunci se produce hidroliza amilazei și enzima își pierde capacitatea de a scinda amidonul.

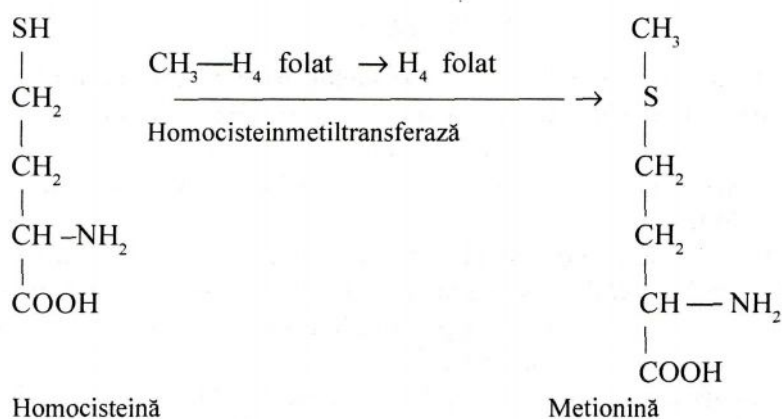
Atât amilaza cât și acidul sulfuric (catalizator nebiologic) pot scinda amidonul. Diferența de acțiune constă în aceea că amilaza hidrolizează amidonul în condiții blânde ($t = 37^{\circ}\text{C}$), pe când acidul sulfuric scindează amidonul la fierbere.

2. În organismele animale vitaminele nu reprezintă materiale structurale de felul proteinelor, glucidelor, lipidelor și nu au valoare energetică, dar îndeplinesc roluri funcționale importante. Majoritatea vitaminelor sunt constituenți coenzimatici, participând la multiple și variate reacții metabolice. Carența de vitamine în rația alimentară duce la stări patologice specifice numite hipo- și avitaminoze.

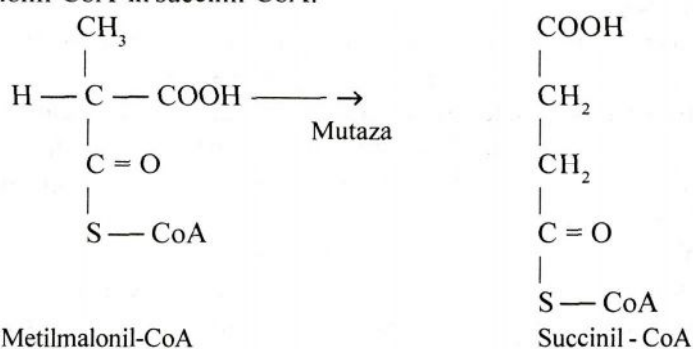
De exemplu, vitamina B_1 (tiamina) din alimente este supusă fosforilării cu ATP în celulele diverselor organe și țesuturi cu formare de coenzimă tiaminpirofosfat care participă în reacția de decarboxilare oxidativă a α -cetoacizilor (piruvat, α -cetoglutarat) și în reacția de transcetolare. Deci, în carența de vitamină B_1 în organism se acumulează acidul piruvic ceea ce atrage o serie de manifestări patologice: crampe musculare, fenomene toxice pentru sistemul nervos, modificări cardiace, iritabilitate, edeme etc.

3. Există două coenzime B_{12} -metilcobalamină și 5'-dezoxiadenozilcobalamină.

Metilcobalamina funcționează ca transportor al grupei metil de la N-metiltetra-hidrofolat la homocisteină care prin metilare se transformă în metionină.



Dezoxiadenozilcobalamina participã în reacția de transformare a L-metil-malonil-CoA în succinil-CoA:



4. Centrul activ al enzimei nu poate fi separat, deoarece în centrele active ale enzimelor s-au evidențiat grupări chimice de tip carboxil, amino, hidroxil și tio care aparțin resturilor de aminoacizi situați în diferite poziții în lanțul polipeptidic al proteinei - enzimă. Astfel, în centrul activ al chimotripsinei s-au identificat gruparea OH a serinei din poziția 195, gruparea carboxil a acidului aspartic din poziția 102 și nucleul imidazolic al histidinei din poziția 57. Ele sunt apropiate în spațiu ca urmare a conformației spațiale a chimotripsinei.

5. Centrul activ al enzimelor de natură exclusiv proteică este constituit în întregime din proteine și include următorii aminoacizi împreună cu grupările lor funcționale: serina, cisteina, histidina, tirozina, lizina ș.a. În situsul activ al

enzimelor de natură heteroproteică constituite din două componente, coenzimă și apoenzimă, se găsesc atât resturile de aminoacizi, cât și coenzimă.

6. Unele enzime în afară de centrul activ, care îndeplinește rol catalitic și de fixare a substratului, mai conțin și alt centru spațial, numit centru alosteric la care se fixează nu substratul, ci alți compuși, denumiți modulatori alosterici. Modulatorii schimbă activitatea enzimei în direcția creșterii activității (activatori alosterici). Astfel de enzime poartă denumirea de enzime alosterice, iar reglarea activității lor - reglare alosterică. S-a stabilit că produsul final al unei căi metabolice de biosinteză este inhibitorul alosteric al enzimei care catalizează prima din șirul reacțiilor implicate în biosinteză. Acest tip de inhibiție se numește inhibiție prin produs final, inhibiție de tip feedback sau retroinhibiție.

7. Toate trei enzime fac parte din clasa hidrolazelor care catalizează reacții de tipul: $R-R^* + HOH = R-H + R^*-OH$. α -amilaza (EC 3.2.1.1.) face parte din subclasa hidrolazelor care acționează asupra compușilor glucozidici (hidrolaze glicozidice).

Pepsina (EC 3.4.4.1.) face parte din subclasa hidrolazelor care acționează asupra legăturilor peptidice (hidrolaze peptidice).

Lipaza (EC 3.1.1.3.) face parte din subclasa hidrolazelor care acționează asupra esterilor carboxilici și hidrolizează triacilglicerolii.

8. 1. Oxidoreductaze.

2. Transferaze.

3. Hidrolaze.

4. Liaze.

5. Izomeraze.

6. Ligaze.

TEMA 5

Influența factorilor de mediu asupra activității enzimaticе.

Determinarea activității enzimaticе. Efectorii enzimatici

1. Specificitatea de substrat a enzimelor de natură heteroproteică depinde de apoenzimă, deoarece un număr relativ restrâns de cofactori, în special coenzimele în asociere cu diferite apoenzime, dau naștere unui număr foarte mare de heteroenzime, există câteva sute de dehidrogenaze a căror coenzimă este nicotinamidadeninucleotidul (NAD^+); piridoxalfosfatul joacă rol de coenzimă în reacțiile de transaminare a aminoacizilor,

în reacțiile de decarboxilare a aminoacizilor, participă la procesul de transulfurare, este parte integrală a glicogenfosforilazei.

2. Determinarea izoenzimelor lactatdehidrogenazei (LDH) în serul sanguin prezintă valoare diagnostică specifică. Astfel, creșterile de LDH₁ și LDH₂ cu LDH₁ mai mare decât LDH₂ sunt specifice pentru infarctul miocardic (miocardul este organ cu fosforilare oxidativă intensă), iar creșterile de LDH₁ și LDH₂ cu LDH₂ mai mare ca LDH₁ sunt caracteristice pentru anemia megaloblastică, anemia pernicioasă, stări hemolitice. LDH₅ este crescut în necroza hepatică și uneori în procesele neoplazice.

Izoenzima fosfatazei acide tartrico-sensibilă crește în carcinomul de prostată metastazat.

În infarctul miocardic paralel cu creșterea creatinfosfokinazei (CPK) se produc creșteri ale izoenzimei CPK/MB (forma MB fiind de proveniență strict miocardică). Investigarea izoenzimelor fosfatazei alcaline (hepatobiliară, osoasă și intestinală) permite localizarea leziunii care determină creșterea. Astfel, fosfataza alcalină osoasă are valori ridicate în rahitism, boala Paget, hiperparatiroidism, osteosarcoame, metastaze osteoblastice. Fosfataza alcalină hepatobiliară crește în colectaza intra- și extrahepatică.

3. Există mai multe modalități de activare a enzimelor:

a) Activarea prin ioni. Unii ioni metalici (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) și unii anioni (Cl^-) acționează drept activatori specifici pentru anumite enzime;

b) Activarea prin transformarea proenzimei în enzimă, spre exemplu, enterodocinaza, îndepărtează din tripsinogen (proenzimă inactivă) un hexapeptid terminal și îl transformă în tripsină (enzimă activă);

c) Activare prin intervenție asupra subunităților enzimatică. Protein-kinazele sunt constituite din două tipuri de subunități: R-reglatoare și C-catalitice. AMP-c se combină cu subunitățile reglatoare și le detașează de subunitățile catalitice a căror centre active devin astfel accesibile substratelor



d) Activare alosterică. Spre exemplu, fosfofructokinaza - enzimă glicolică care catalizează reacția fructozo-6-fosfat \rightarrow fructozo-1,6-difosfat este o enzimă alosterică activată de ADP și inhibată de ATP;

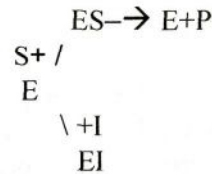
e) Activarea enzimelor prin procesele de fosforilare-defosforilare. Unele enzime sunt active în forma fosforilată (de exemplu, glicogenfosforilaza), altele în formă defosforilată (de exemplu, glicogensintetaza).

Inhibiția enzimelor

Inhibiția enzimelor poate fi reversibilă și ireversibilă. În inhibiția ireversibilă legătura enzimă - inhibitor este covalentă, iar în cea reversibilă este slabă.

Inhibiția reversibilă este de câteva tipuri:

a) Inhibiția competitivă. În acest caz inhibitorul este analogul structural și se află în competiție pentru centrul activ al enzimei. Reacțiile sunt următoarele:

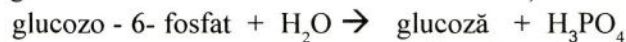


b) Inhibiția necompetitivă. În acest caz inhibitorul, structura căruia diferă de regulă destul de mult de structura substratului, se leagă în alt loc decât centrul activ al enzimei. Inhibitorul se combină nu numai cu enzima, formând complexul EI, ci și cu ES;

c) Inhibiție alosterică. Spre exemplu, în calea de biosinteză a colesterolului enzima alosterică β -hidroxi- β -metilglutaril - CoA - reductaza este inhibată de produsul final al acestei căi - colesterolul.

d) Inhibiție prin exces de substrat. În afară de complexul activ ES se poate forma și un complex cuprinzând mai multe substraturi - ESS, care este inactiv sau foarte puțin activ.

e) Inhibiție prin produși de reacție. Dacă produsul de reacție enzimatică se acumulează, el tinde să-și frâneze propria-i formare. Astfel, glucoza este inhibitorul glucozo - 6 - fosfatazei care catalizează reacția:



4. a) Influența temperaturii asupra activității enzimatică s-a demonstrat astfel: la temperatura optimă (38°C) amilaza salivară scindează amidonul (produsele de hidroliză a amidonului nu dau reacție de culoare pozitivă cu iodul), pe când saliva fiartă (s-a produs denaturarea amilazei) nu scindează amidonul și reacția cu iodul este pozitivă, deci apare culoare albastră.

Influența pH-lui asupra activității amilazei salivare s-a demonstrat prin următoarea experiență: se prepară un șir de soluții tampon cu diverse valori ale pH-ului care include și pH-ul optim (6,8) al amilazei salivare. La soluțiile tampon se adaugă salivă ce conține amilază și substratul ei – amidonul.

După adăugarea iodului se notează eprubeta unde a avut loc cea mai eficientă scindare a amidonului (cea mai deschisă culoare). pH-ul acestei eprubete corespunde pH-ului optim al amilazei.

b) Specificitatea de acțiune a amilazei se datorează faptului că ea acționează asupra amidonului (producții lui de hidroliză - maltoza și glucoza - dau reacția Haines pozitivă), și nu acționează asupra zaharozei care dă reacția Haines negativă - colorație albastră.

c) Inhibiția competitivă s-a demonstrat prin acțiunea acidului malonic asupra activității succinatdehidrogenazei care catalizează reacția de oxidare a succinatului în fumarat. Malonatul este inhibitorul competitiv al succinatdehidrogenazei. Proba de experiență include succinatdehidrogenaza, succinatul, acceptorul de hidrogen (2,6- diclorfenol-indofenol) și are loc decolorarea soluției. Pe când în proba, în care pe lângă reactivii sus-numiți se adaugă și malonat, lichidul nu se decolorează, deoarece oxidarea succinatului nu are loc din cauza inhibiției succinatdehidrogenazei de către malonat.

5. O metodă curentă de fracționare a proteinelor este cromatografia de afinitate. Dacă o proteină este susceptibilă să se combine specific cu un anumit compus, acesta se fixează prin covalență pe un suport pulverulent inert și se umple cu el o coloană de cromatografie. Aplicând pe coloana astfel pregătită amestecul proteic, va fi reținută numai proteina care se combină specific cu compusul. Separarea din amestec a proteinei se face cu un eluat potrivit.

6. În patologie mai des se observă creșterea activității enzimelor în serul sanguin, decât scăderea activității enzimelor plasmatiche nefuncționale. Creșterea se explică fie prin modificări de permeabilitate ale membranelor celulare, fie prin disfuncții masive ale celulelor producătoare (de exemplu, ale celulelor hepatice în hepatite și ciroze, a celor din mușchiul cardiac în infarctul de miocard etc.). De aceea dozarea activității lor în ser este extrem de utilă medicilor în precizarea diagnosticului și în urmărirea evoluției bolii. De exemplu, după infarctul de miocard crește activitatea serică a creatinfosfokinazei (CPK), aspartataminotransferazei (AST) și lactatdehidrogenazei (LDH). Cea mai rapidă creștere se semnalează în cazul CPK, cea mai lentă la LDH.

7. Pancreatina conține următoarele enzime: lipaza, fosfolipaza, colesterolesteraza, amilaza, tripsina, chimotripsina, elastaza, carboxipeptidaza.