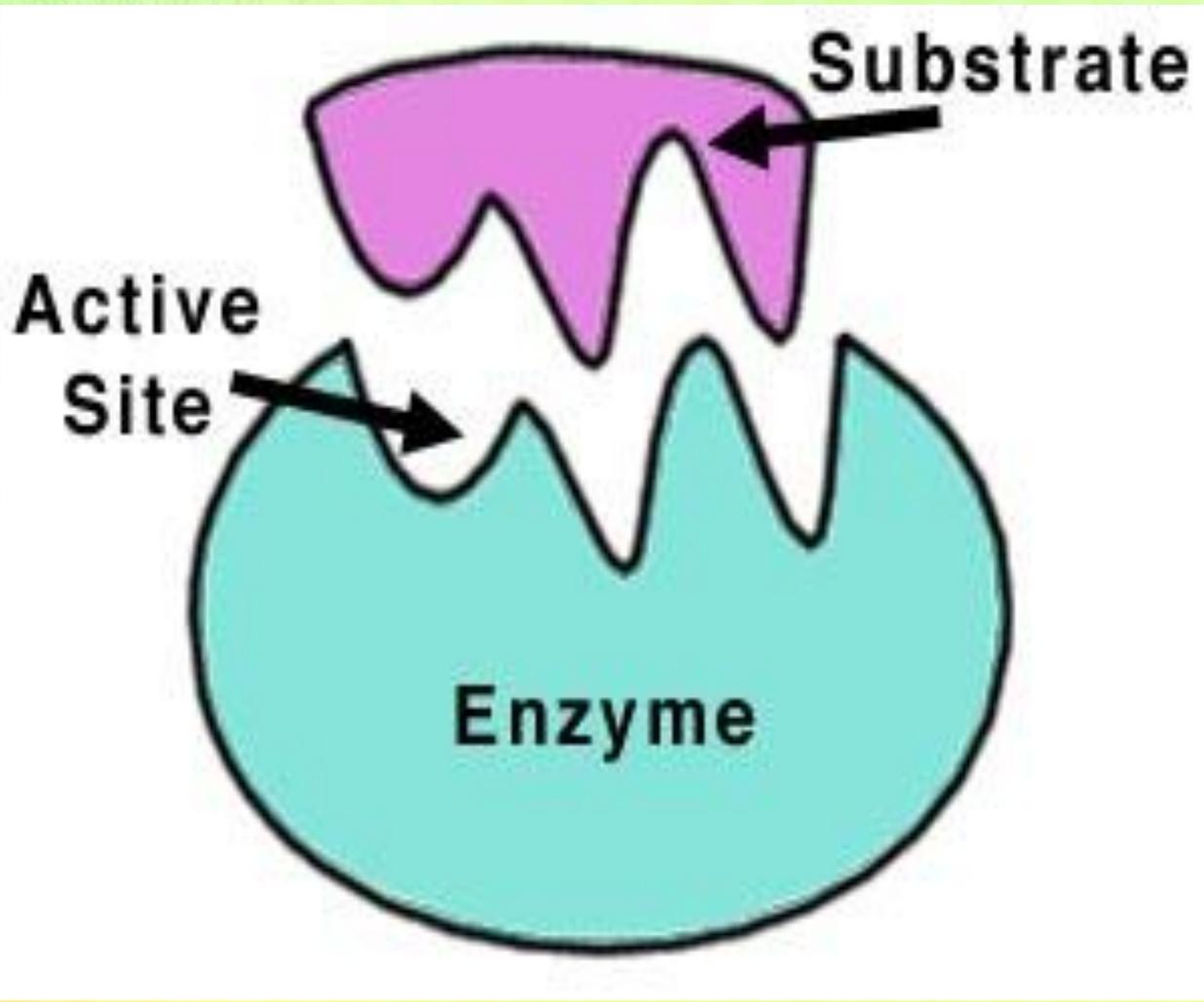


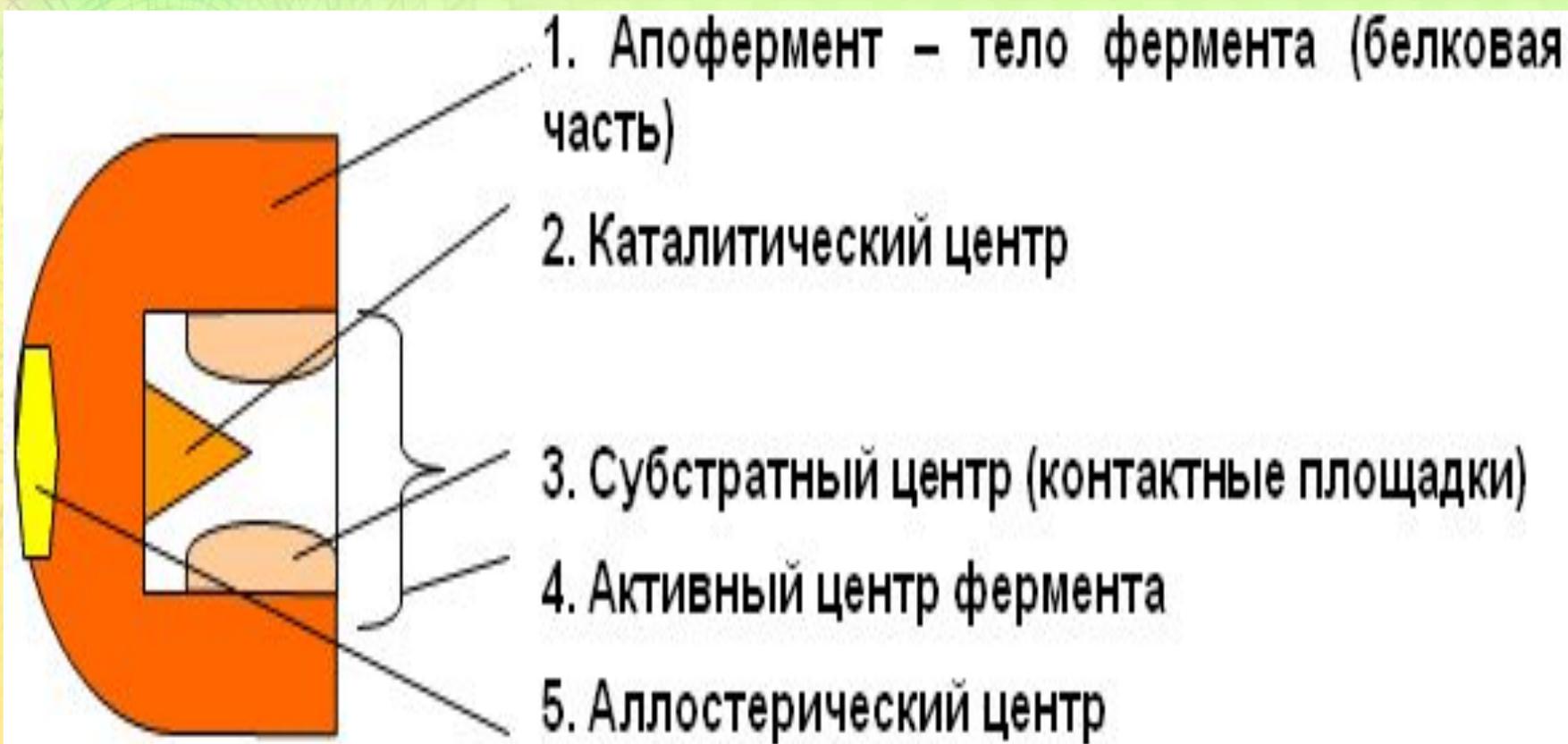


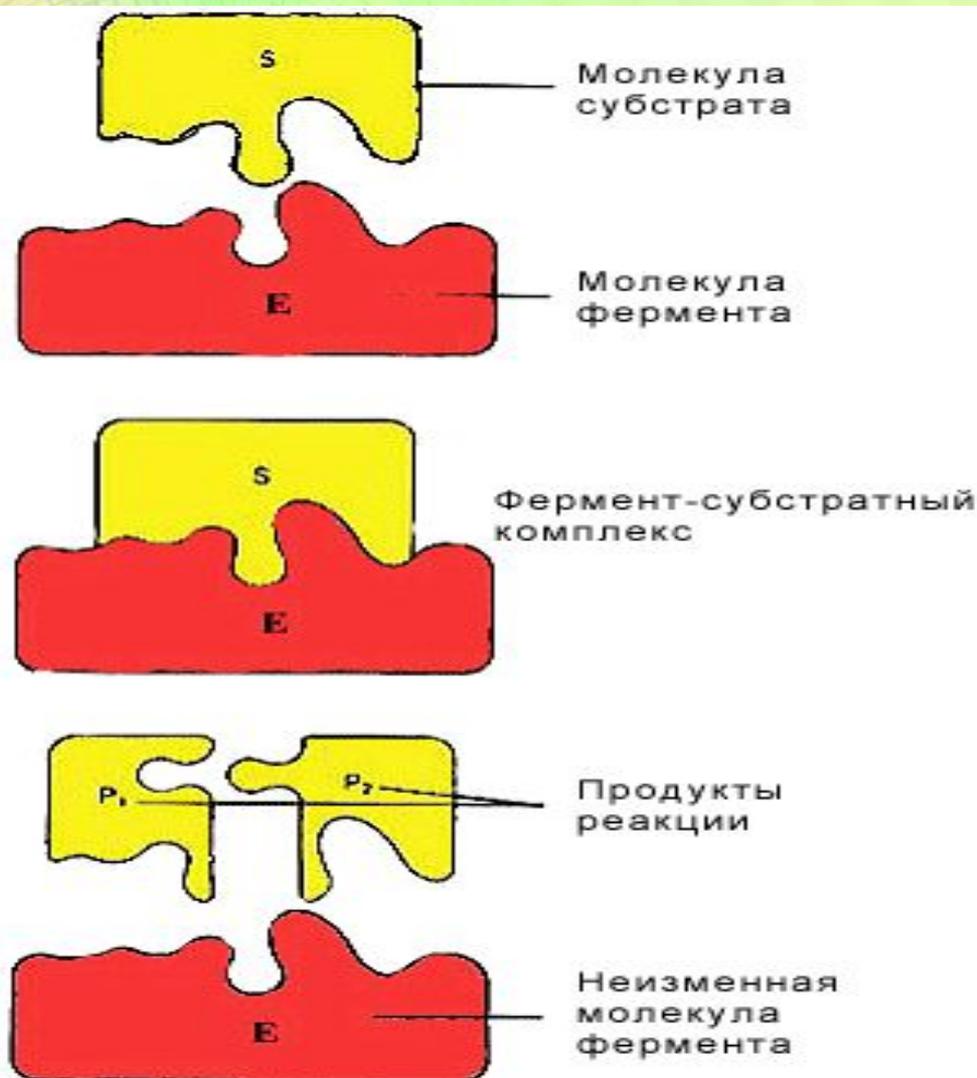
ФЕРМЕНТЫ

Ферменты-это белковые катализаторы практически всех биохимических реакций, происходящих в организме

- Высокая эффективность действия
- Все ферменты-это белки, не все белки ферменты
- Высокая специфичность







I. Активация фермента

II. Узнавание ферментом своего субстрата

III. Образование неактивного фермент-субстратного комплекса с помощью слабых водородных связей между субстратом и аминокислотами контактных участков

IV. Образование активного фермент-субстратного комплекса за счет каталитического участка

V. Образование продуктов реакции.

Классификация ферментов

- В основу классификации ферментов положен тип катализируемой химической реакции. Согласно этой классификации ферменты делят на шесть классов.
- Шифр каждого фермента содержит четыре цифры, разделенные точками.
- Первая цифра указывает номер одного из шести классов ферментов.
- Вторая цифра означает подкласс, характеризующий основные виды субстратов.
- Эти подклассы делятся на подподклассы, отличающиеся химической природой соединений (доноров и акцепторов). Это третья цифра.
- Четвертая цифра означает порядковый номер в алфавитном порядке

Классификация ферментов

Класс	Важнейшие представители
оксидоредуктазы	Дегидрогены, оксидазы, редуктазы, пероксидазы
трансферазы	Аминотрансферазы, фосфотрансферазы
гидролазы	Пептидазы, гликозидазы, эстеразы
лиазы	C-O лиазы
изомеразы	Цис-транс изомеразы
лигазы	

Факторы, влияющие на активность фермента

- Температура
- рН
- Концентрация фермента
- Концентрация субстрата
- Наличие ингибиторов (обратимые и необратимые)

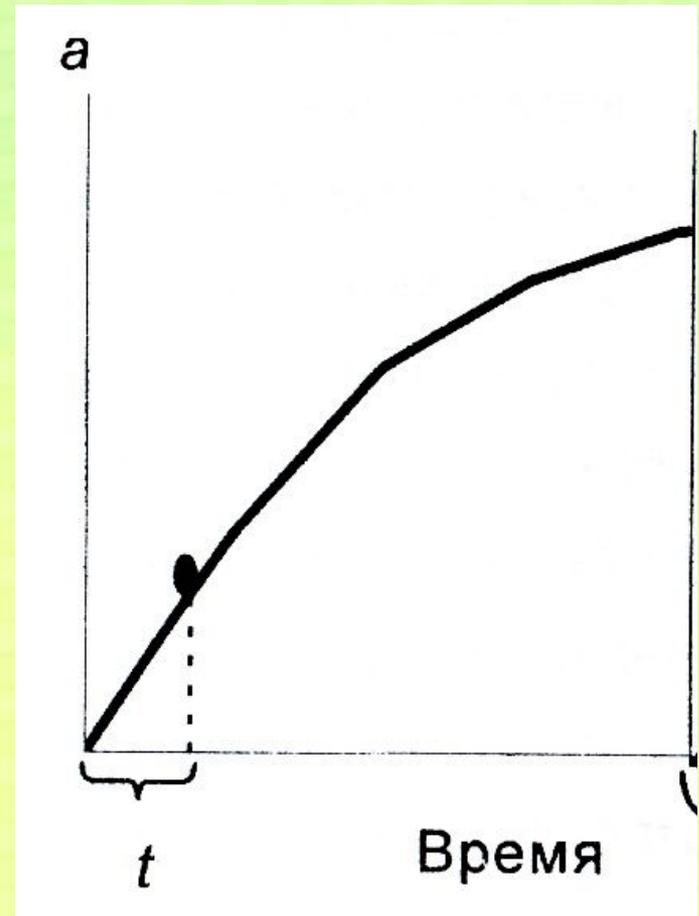
Регуляция осуществляется либо изменением активности фермента при его постоянной концентрации либо изменением концентрации фермента в результате ускорения или торможения синтеза фермента

Принципы определения активности ферментов

- **Метод по конечной точке**
- **Кинетический метод**
- **Радиоиммунный метод**
- **ИФА**
- **Иммунотурбидиметрия**
- **Иммунохемилюминесценция**
- **Флуоресценция**

Измерение по «конечной точке»

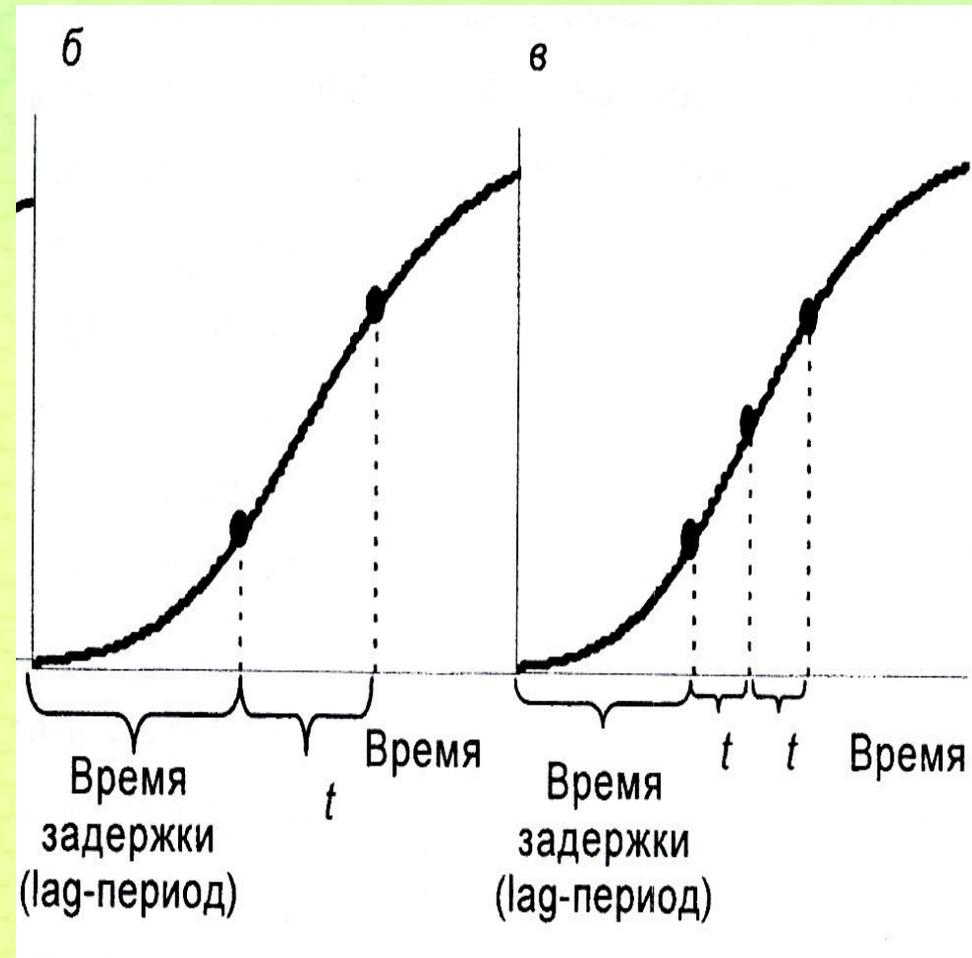
Измерения оптической плотности на линейном участке кинетической кривой по истечении определенного четко фиксированного времени от начала реакции, после чего в реакционную смесь добавляют реагент, останавливающий ферментативную реакцию. Применяется в большинстве рутинных методов



Кинетическое измерение

Двухточечное измерение
Оптическую плотность определяют на линейном участке кинетической кривой дважды, фиксируя интервал времени t между измерениями.

Оптическую плотность на линейном участке кинетической кривой определяют 3-5 раз через фиксированные интервалы времени t .
Используется для биохимических анализаторов

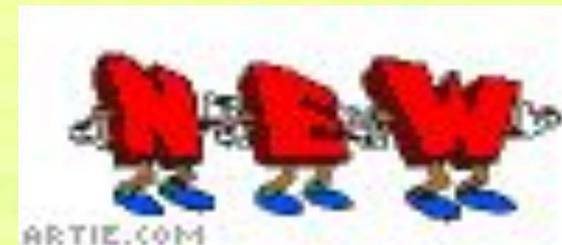


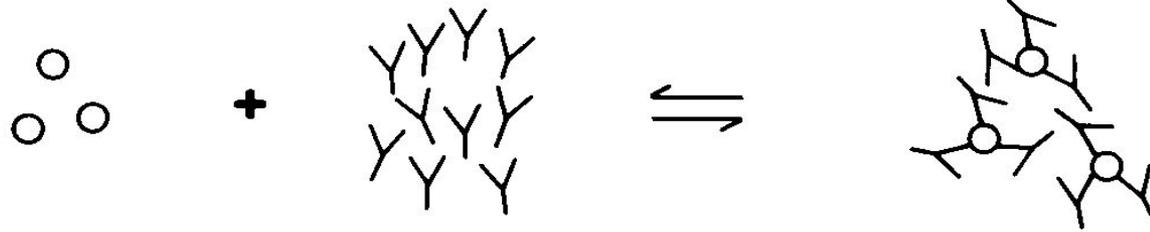
Кинетические методы

- Это определение меняющейся в ходе реакции оптической плотности **за равные промежутки времени**
- Требования: соответствующее фотометрическое оборудование, точное поддержание температуры, **правильный отсчет времени** (30 сек, 1 мин)
- Все одинаково перемешано и одной температуры

Иммунотурбидиметрия

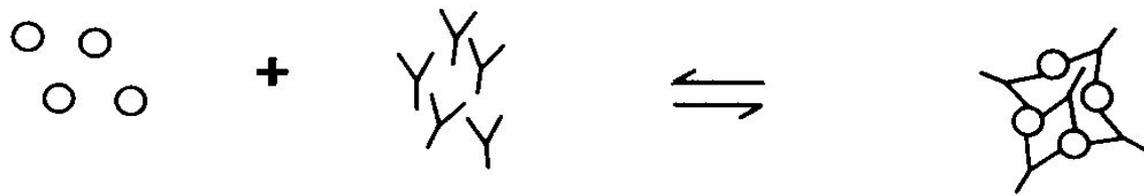
- Реакция антиген-антитело проявляется в растворе в виде образования агрегатов
- Калибровочный график нелинейный, не менее 5 концентраций. Строится для каждого белка, для каждого прибора, при любых изменениях исследований





Избыток антител

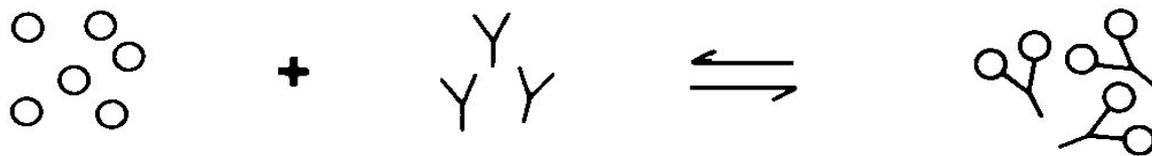
Все антигенные сайты (места связывания) заняты антителами и образование преципитата подавлено



Пропорциональное содержание антигенов и антител

Оптимальная пропорция, когда 2-3 молекулы антитела приходится на молекулу антигена.

Образуется преципитат



Избыток антигенов

Все антитела связаны, образования преципитата не происходит

Единицы активности фермента

- Международная система единиц – СИ
(универсальная система для всех областей науки и техники)
Катал - количество фермента, превращающего 1 моль субстрата за 1 секунду (кат/л=моль/(с·л))
- Международный биохимический союз
Международные единицы (МЕ)-количество фермента, превращающего 1 мкмоль субстрата в 1 минуту

Класс 1. Оксидоредуктаза

- Окислительно-восстановительные реакции
- ЛДГ является тетрамером, состоящим из двух типов субъединиц: Н и М. Поэтому ЛДГ представлена 5 изоферментами: ЛДГ1 – Н4;
- ЛДГ2 - Н3М1
- ЛДГ3 - Н2М2
- ЛДГ4 - Н1М3
- ЛДГ5 - М4

- В тканях с преимущественно аэробным путем обмена (сердце, головной мозг, почки) - ЛДГ1 и ЛДГ 2.
- В тканях с выраженной способностью к анаэробному обмену (печень, скелетная мускулатура) – ЛДГ 5
- Миометрий, надпочечники, селезенка, легкие, клетки крови – все изоферменты равномерно распределены

Класс 1. Оксидоредуктазы

- Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)-
цитоплазматический цинксодержащий
фермент углеводного обмена,
катализирующий важнейшую реакцию
гликолиза:

Превращение лактат \rightleftharpoons пируват
и обратная реакция

Непременный участник реакции-НАДН (никотинадениндинуклеотид)

Изоферментный состав:

ЛДГ2 ЛДГ1 ЛДГ3 ЛДГ4 ЛДГ5

- ЛДГ 1: эритроциты, тромбоциты, сердце, мозг
- ЛДГ 2: легкие, селезенка, сердце, эритроциты, тромбоциты
- ЛДГ 3: легкие, селезенка, надпочечники
- ЛДГ 4: мышцы
- ЛДГ 5: мышцы, печень

Клиническое значение оЛДГ



- **Инфаркт миокарда:** максимальная активность через 24-48 часов после ангинозного приступа, на 7 сутки снижается до нормы
- **ОСТРЫЕ ПАНКРЕАТИТЫ**
- Уровень ЛДГ умеренно увеличен при миокардитах и сердечной недостаточности с застойными явлениями в печени, при мегалобластных анемиях, остром лейкозе, патологии почек и печени, злокачественных заболеваниях брюшной полости и легких, при легочной эмболии, шоке, обширных ожогах, гипоксии

Референсные значения (Ед/л)

- До 2х лет менее 430**
 - От 2х до 10 лет менее 295**
 - Старше 12 лет менее 250**
- (DGKC UV-тест)**

Глутаматдегидрогеназа- органоспецифичный фермент печени

Активность значительно повышена при:
вирусных гепатитах, раке печени,
обострении цирроза, алкогольной
интоксикации, тяжелых токсических
поражениях печени, остром снижении
кровотока в печени, острым тромбозе
печеночных вен

Класс 2. Трансферазы

- Креатинкиназы (КК) – фермент, участвующий в энергопродукции, катализирует фосфорилирование креатина и его дефосфорилирование с образованием АТФ.

Класс 2. Трансферазы



Скорость прямой реакции максимальна при рН 9, обязательно присутствие магния, равновесие смещено в сторону обратной реакции

Гетерогенность КК

- КК-это димер, состоящий из двух субъединиц В (brain) и М (muscle).
- Образуются 3 пары субъединиц:

КК-ММ (КК-3, мышечный)

КК-МВ (КК-2, сердечный)

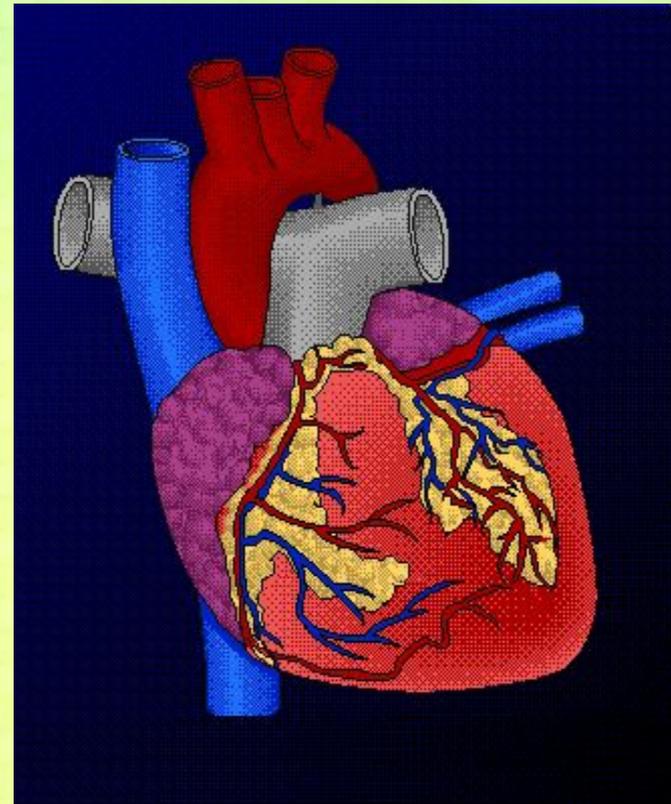
КК-ВВ (КК-1, мозговой)

ККмит



Диагностическое значение КК-МВ

- Повышение активности КК-МВ наиболее специфично для ИМ: увеличение через **4-8** часов после острого приступа, максимум через 12-24 часа, и на 2-3 сутки снижается до нормы
- Величина повышения КК-МВ соответствует величине пораженной зоны миокарда
- Характерная динамика: рост и падение



Повышение **оКК** наблюдается при:

- миокардитах, миокардиодистрофиях (повышение умеренное, более длительное)
- повреждении скелетной мускулатуры (КК-ММ), дегенеративные, воспалительные, токсические поражения мышц, прогрессирующая мышечная дистрофия- до 50 раз
- стрессе, травмы
- шизофрении, психозах
- при приеме алкоголя
- терапии статинами
- тяжелая физическая нагрузка



Гамма - глутамилтранспептидаза

- Гамма-глутамилтранспептидаза – фермент, катализирующий реакции переноса аминокислот из плазмы крови в клетки, а также реакции в процессах реабсорбции аминокислот из желчи и мочи в кровь.
- В больших количествах обнаруживается в эпителии извитых канальцев нефрона, в желчных канальцах. Наибольшая активность отмечается в цитоплазме и гладком эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов.
- Основным источником сывороточной активности фермента являются гепатоциты.

Гамма-глутамил транспептидаза

- Маркер холестаза (особенно лекарственного)
- Острый панкреатит
- Хронический активный гепатит в 7 раз выше, чем при остром гепатите и выше, чем АСАТ и АЛАТ
- Скрининг и контроль алкоголизма;
- Меланома, рак молочной железы и легких
- Гепатотоксичность и нефротоксичность лекарственных препаратов

**Превышение
в 10 раз и
более**

- Алкогольное поражение печени
- Холестаз
- Рак поджелудочной железы и метастазы в печень

В 5-10 раз

- Гепатит
- Цирроз
- острый! панкреатит

**Менее чем
в 5 раз**

- Алкоголизм
- Отравления
- Застойная сердечная недостаточность

**Не
повышается**

- Заболевания костной ткани
- Беременность
- У детей старше года

Референсные значения

- 1-3 года: менее 18 Ед/л
- 3-6 лет: менее 23 Ед/л
- 6-12 лет: менее 17 Ед/л
- Старше 17 лет жен: менее 32 Ед/л
- Старше 17 лет муж: менее 49 Ед/л

Аминотрансферазы

- Это ферменты печеночного профиля
- Наиболее чувствительные тесты при остром гепато-целлюлярном заболевании (цирроз, гепатит, СПИД, алкогольная болезнь печени) и массивном гепато-целлюлярном повреждении (гепатиты, кровотечения ЖКТ, острая сердечная недостаточность, сепсис, воздействие лекарств)

Аспартатаминотрансфераза

- Катализирует обратимую реакцию трансаминирования аминокислоты аспартата.
- Продукт трансаминирования – щавелево-уксусная кислота метаболизируется во многих направлениях, включая распад с выделением энергии, синтез глюкозы.

- АСТ широко распространена в органах и тканях организма человека, присутствует в митохондриях и цитоплазме клеток.
- Наибольшая активность обнаружена в сердечной мышце, затем по убыванию – в печени, скелетных мышцах, головном мозге, семенниках и почках.

Клиническое значение Асат

- **ИМ** повышается Асат через 6-8 часов, максимум через 18-24, снижение до нормы на 4-5 день
- Степень повышения отражает массу миокарда, вовлеченного в патологический процесс

Алгоритм принятия клинических решений

В 2 раза	Злоупотребление алкоголем
В 5 раз	Первичный цирроз, стеатонекроз
В 10 раз	Лекарственный гепатит, цирроз
В 20 раз	Злокачественная желтуха, инфекционный мононуклеоз
В 50 раз	Лекарственное поражение клеток печени
В 100 раз	Острые вирусные гепатиты

Показания к исследованию:

- Болезни печени
- Обследование контактных лиц в очаге вирусного гепатита (повышается до появления желтухи)
- Мониторинг больных с гепатитами (длительное повышение и превышение АСАТ предполагает начало развития некроза и плохой прогноз)
- Лечение статинами

- Референтные значения :
- 5 – 40 Ед/ л

Аланинаминотрансфераза

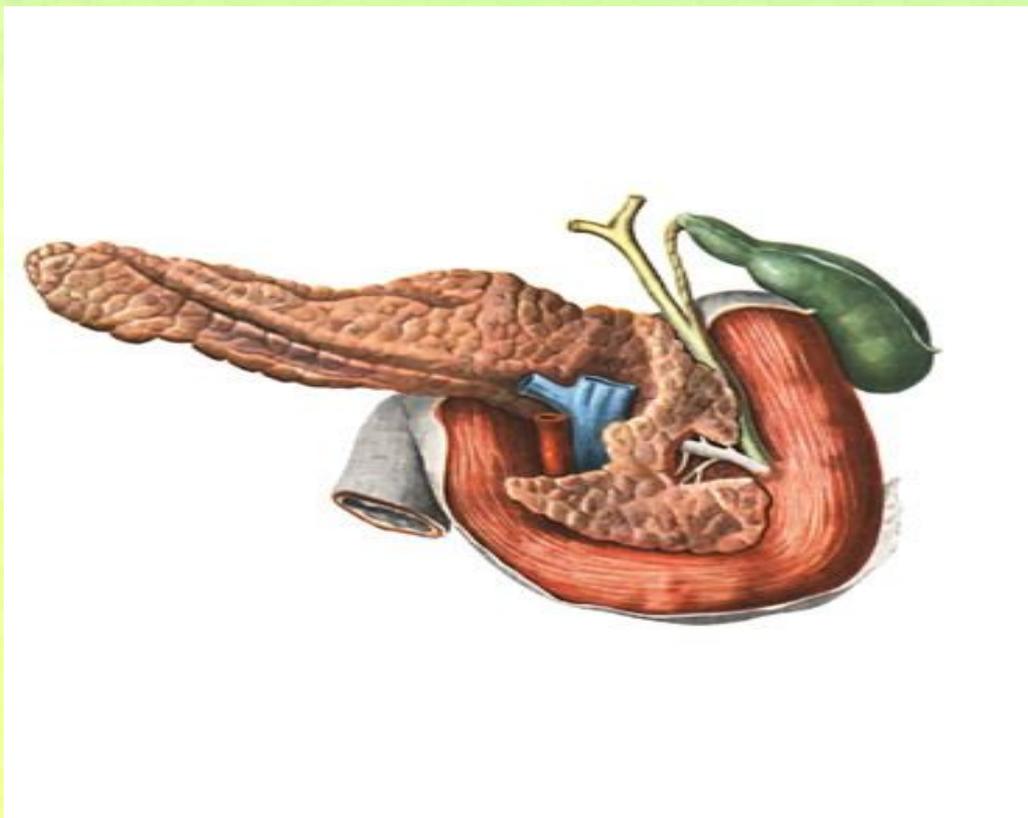
- Катализирует обратимую реакцию трансаминирования аминокислоты аланина. Продукт трансаминирования – пируват – метаболизируется во многих направлениях, включая распад с выделением энергии, синтез глюкозы.
- Наиболее высокая активность фермента обнаруживается в печени (цитоплазма гепатоцитов), поджелудочной железе, сердце, скелетных мышцах, эритроцитах, почках.

Повышение значений АЛАТ

- Некроз печеночных клеток любой этиологии
- Шок, гипоксия
- Цирроз печени
- Механическая желтуха
- Рак печени
- Жировой гепатоз
- Хронический алкоголизм
- Лечение гепатотоксическими препаратами

- **Исследуется сыворотка без гемолиза (в эритроцитах выше, чем в сыворотке)**
- **Референсные значения различаются у женщин и мужчин: жен до 31 Ед/л, у мужчин до 37 Ед/л**

3 класс. Гидролазы



Щелочная фосфатаза

- Группа ферментов, катализирующих гидролитическое отщепление фосфатной группы от различных органических соединений с максимальной активностью в щелочной среде.
- Референтные значения: Дети < 480 Ед/л, взрослые < 150 Ед/л

Щелочная фосфатаза (оптимум рН 8,6-10,1)

При электрофорезе выделяется 7 изоферментов:

- **Костный**
- **Печеночный**
- ЩФ желчи
- Кишечный
- Почечный
- Плацентарный
- Неидентифицированные изоферменты

Костный изофермент ЩФ (ВАР)- маркер активности остеобластов

- Локализован на поверхности остеобластов
- Значительное повышение отмечается при патологии костной ткани:

Клиническое значение костного изофермента (ВАР)

- **остеопороз, остеомаляция**
- **костный туберкулез**
- **остеосаркома, лейкоз**
- **беременность (N через 20 дн после родов)**



Фосфатаза щелочная печеночная

- Цирроз, некроз, инфильтрация печеночной ткани
- Гепатомегалия при сердечной недостаточности
- 2-10-кратное превышение: опухоли, кисты, абсцесс, паразиты, туберкулез, вирусные, токсические, алкогольные гепатиты

- **5-кратное – инфекционный мононуклеоз** (билирубин в норме)
- **10-кратное – опухоли поджелудочной железы**
- **15-20-кратное – первичный билиарный цирроз, рак печени**
- **Прием гепатоксичных препаратов (в 20 раз - начало лекарственного отравления)**

Кислая фосфатаза

- Группа ферментов, катализирующих гидролитическое отщепление фосфатной группы от различных органических соединений с максимальной активностью в кислой среде.
- Самая высокая активность кислой фосфатазы отмечается в предстательной железе.
- У женщин источниками фермента сыворотки крови являются печень, эритроциты и тромбоциты.

Кислая фосфатаза (рН ниже 7,0)

Простатическая кФ

- Контроль послеоперационной терапии андрогенами (ПСА подавляется, КФ не меняется)
- Маркер метаболизма костной ткани (синтезируется остеокластами)
- Мониторинг лечения остеопороза

Протеолитические ферменты

Осуществляют гидролиз (протеолиз) пептидной связи в белках

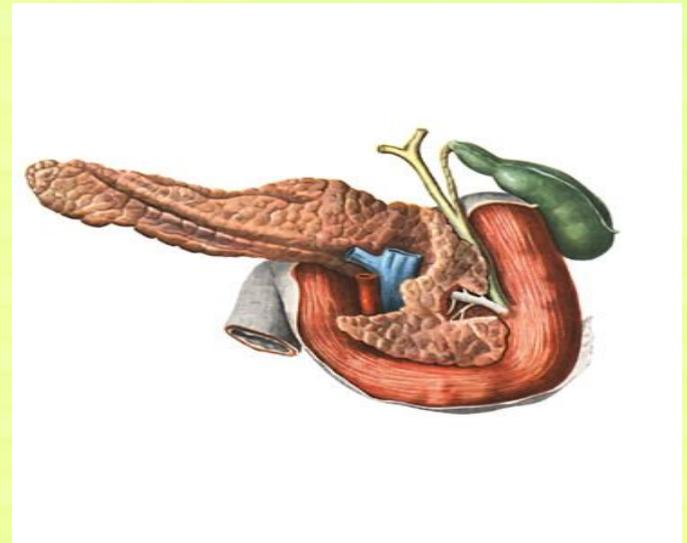
2/3 всех ферментов организма

Участвуют и регулируют: свертывание крови, фибринолиз, пищеварение, размножение, артериальное давление, водно-электролитный обмен, апоптоз, систему комплемента и иммунитета, презентация белков-антигенов, ВИЧ-заболевания

На каждый протеолитический фермент-10 ингибиторов

Трипсин

- **Панкреатоспецифичный**
- **Активатор всех панкреатических гидролитических ферментов** (химотрипсин, эластаза, фосфолипаза, карбоксипептидазы)

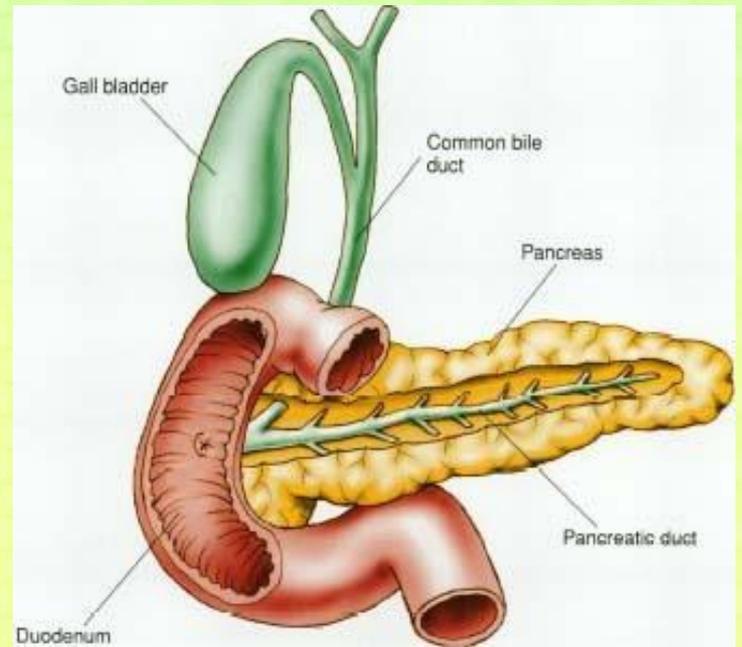


Острый панкреатит - ферментативное воспалительное поражение поджелудочной железы, вызванное активацией трипсиногена в ткани

- Трипсиноген-2 в моче (хроматографический экспресс-тест на полосках) отрицательный результат исключает ОП с точностью 99% всего за 5 минут
- Повышен в течение нескольких дней после приступа

Липаза – гидролиз триглицеридов с высвобождением жирных кислот

- Лизосомальный фермент
- Полностью реабсорбируется в почках, **поэтому в норме в моче отсутствует**



Липаза

- Значительное повышение отмечается при панкреатитах любого происхождения (особенно острого алкогольного)
- Динамика:
увеличивается с конца 3-4 суток, максимум на 5-6 сутки и повышена до 10-14 суток



Амилаза

- Гидролиз полисахаридов до простых моно и дисахаридов
- 40% панкреатическая и 60% слюнная амилаза
- Повышение более чем в 2 раза расценивается как симптом повреждения поджелудочной железы
- Эффективность исследования зависит от времени забора материала по отношению к обострению процесса

Амилаза

- Динамика активности:
повышается в первые часы острого (4-8 часов), обострения хронического панкреатита, максимум к концу первых суток, повышена 2-3 суток, на 4-8 сутки нормализуется
- При ОП в моче амилаза увеличивается на 6-10 часов позднее, чем в сыворотке, остается повышенной до 2 недель после приступа
- Недостатки: макроамилаза и почечная недостаточность



Кинетический метод, сыворотка натоцак

- Дети до года: 5-65 Ед/мл
- 1-70 лет: 25-125 Ед/мл
- Старше 70: 20-160 Ед/мл

Снижение уровня амилазы (и в крови и в моче):

- Недостаточность поджелудочной железы
- Выраженный муковисцидоз
- Панкреоэктомия
- Тяжелое поражение печени

