

Лекции: ЭНЗИМОЛОГИЯ

Дисциплина: биохимия (Б1.Б.15)

Специальность: педиатрия (31.05.02)

НГМУ, кафедра медицинской химии

Д.б.н., доцент Суменкова Дина Валерьевна

ЛЕКЦИЯ № 3

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ, или ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ

Актуальность темы

Широкое использование ферментов в медицинской практике – диагностике и терапии, - диктует необходимость изучения клинических аспектов ЭНЗИМОЛОГИИ

План лекции

- ❑ **Применение ферментов как реагентов в диагностике заболеваний**
- ❑ **Применение ферментов в качестве лекарственных препаратов (энзимотерапия)**
- ❑ **Исследование активности ферментов для диагностики заболеваний (энзимодиагностика)**
- **Дополнительные вопросы клинической энзимологии:**
 - Использование ингибиторов ферментов в качестве лекарственных препаратов
 - Энзимопатии

Цель лекции

- **Знать:**
 - пути использования ферментов в медицинской практике (примеры)
 - ферменты, используемые в энзимодиагностике, и сущность катализируемых ими химических реакций
- На основе полученных знаний формируется умение трактовать данные энзимологических исследований сыворотки крови детей и подростков (биохимический анализ крови)

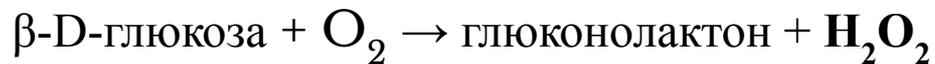


Ферменты как реагент



ПРИМЕРЫ:

- **Глюкозооксидаза** грибов (аэробная дегидрогеназа) – FAD-содержащий специфический фермент для определения глюкозы в моче и крови
 - Используется в глюкозооксидазных биосенсорах



H_2O_2 в присутствии ионов меди окисляет фенолфталин до фенолфталеина (красный цвет при $\text{pH} > 7$, интенсивность окраски пропорциональна концентрации перекиси и глюкозы)



Ферменты как реагенты

Определение лактата в крови для оценки тяжести шока, гипоксических состояний, сахарного диабета с помощью **лактатоксидазы и пероксидазы**

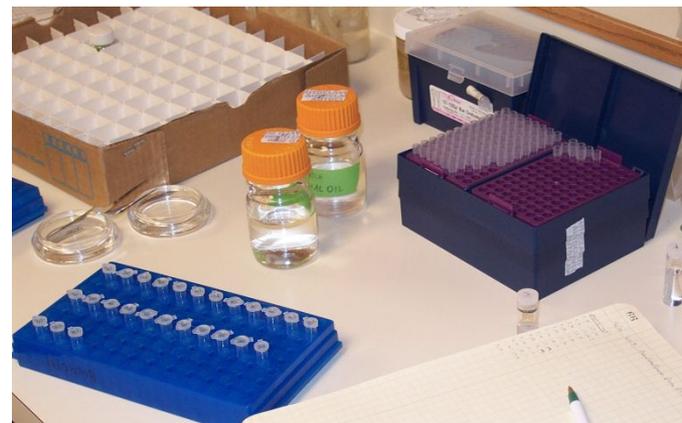


(интенсивность окраски пропорциональна содержанию лактата)



Ферменты как реагенты

- **Рестриктазы** бактерий (специфические эндонуклеазы) используются для исследования генома, например, в пренатальном скрининге наследственных заболеваний
- **Taq-полимераза** термофилов (*Thermus aquaticus*) необходима для проведения ПЦР-анализа в диагностике наследственных и инфекционных заболеваний, определении родства, судебной медицине





Энзимотерапия



Применение ферментов (гидролазы)

в качестве лекарственных препаратов Заместительная терапия – использование ферментов в случае их недостаточности

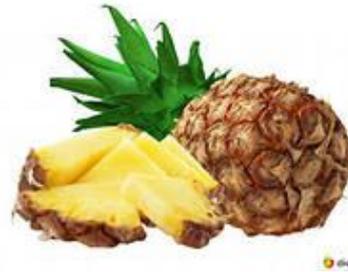
ПРИМЕРЫ:

- лечение желудочно-кишечных заболеваний, связанных с недостаточностью секреции пищеварительных соков

Препараты панкреатических ферментов трипсина, амилазы, липазы:
энзистал, мезим форте, фестал, панкреатин, пензитал



Энзимотерапия



- Комплексная терапия – применение ферментов в качестве дополнительного терапевтического средства

ПРИМЕРЫ:

- **фитогидролазы: бромелаин, папаин** (широкая субстратная специфичность, широкий диапазон pH)– пищеварение, косметология, рассасывание тромбов, активация иммунитета, удаление «сшивок» между биополимерами



Энзимотерапия

- ▣ **коллагеназа** (преп. коллализин)- рассасывание спаек и рубцов (фиброзных процессов) после ожогов и операций
- ▣ **гиалуронидаза** (преп. лидаза)- лечение фиброзных процессов, увеличение проницаемости тканей для анестетиков



Энзимотерапия

- **трипсин, химотрипсин** – лечение гнойно-некротических ран, эмфиземы легких, бронхита
- **фибринолизин** (плазмин)– разрушение тромба при тромбозах
- **РНК-аза и ДНК-аза** – противовирусное и антибактериальное действие (аденовирусный конъюнктивит, герпетический кератит)

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ИНЖЕНЕРНОЙ АКАДЕМИИ
«ПОЛИФЕРМ»

ПОВЯЗКА С ТРИПСИНОМ ПАМ-Т

Терапевтическая система пролонгированного действия для биокаталитического очищения инфицированных ран

Протеолитическая активность не менее 0,1 ПЕ/грамм
Состав: трипсин;
дигидроцеллюлоза;
впитывающий слой

стерильно! для местного применения **АТРАВМАТИЧНО!**

ТУ 9393-012-05824192-2003 Разрешено к применению МЗ РФ Регистрационный номер 29/01010103/5538-03 от 02.09.2003 г.	Размер: 10x10 см Количество: 1 шт. Стерилизовано γ -облучением 25 кГр Условия хранения: при температуре не выше +40° С
--	--



Энзимотерапия

▣ **аспарагиназа, глутаминаза** – лечение лейкозов

Лейкозные клетки не способны синтезировать *асн* и *глн* – аминокислоты, содержащие амидные группы, поэтому получают их из крови. Гидролитическое дезаминирование данных аминокислот с образованием аспартата и глутамата ограничивает опухолевые клетки в незаменимых для них аминокислотах, что и приводит к нарушению роста опухоли



Трудности энзимотерапии

- нестабильность ферментов
- антигенные свойства
- трудности доставки к пораженным органам

ПРИМЕР: действие фибринолизина не является строго специфичным (только для белка фибрина – основы тромба), он может повреждать факторы свертывания крови, вызывая геморрагический диатез

Пути решения проблем

- ❑ Направленный транспорт ферментов
- ❑ Использование иммобилизованных ферментов

Иммобилизованные ферменты

- **Иммобилизация** (лат. *immobilis* – неподвижный) – связывание молекул ферментов с носителем
 - **Преимущества:** устойчивость, нерастворимость в воде, пролонгированное действие, возможность многократного использования
 - **Носитель:** полимер (целлюлоза, сефароза, агароза, полиакриламид)
 - **Способы иммобилизации:**
 - ✓ образование ковалентных и нековалентных связей с носителем
 - ✓ полимеризация носителя в присутствии фермента
 - ✓ инкапсулирование (например, включение в липосому)

Использование иммобилизованных ферментов: примеры

- Иммобилизация протеолитических ферментов на целлюлозе: повязки, тампоны для обработки и лечения ран (см. слайд 12, повязка с трипсином на диальдегидцеллюлозе)
- Иммобилизация ферментов на колонках для экстракорпоральной перфузии крови типа «искусственная почка», «искусственная печень»



Энзимодиагностика

Постановка диагноза на основе определения активности ферментов в биологических жидкостях человека

Используются ферменты, которые по месту «работы» делят на 3 группы:

СЕКРЕТОРНЫЕ

ЭКСКРЕТОРНЫЕ

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ

■ Секреторные ферменты

- синтезируются в печени
- «работают» в крови (субстрат фермента находится в крови)
- активность в крови выше, чем в ткани
- **Характеризуют белок-синтезирующую функцию печени:** снижение активности свидетельствует о патологии печени, на фоне которой нарушается синтез белков

ПРИМЕРЫ:

- ✓ **псевдохолинэстераза (ПХЭ)**
- ✓ **проферменты свертывающей системы крови (факторы свертывания крови)**

■ Экскреторные ферменты

- синтезируются в экзокринных железах
- «работают» в полости органов
- активность в крови незначительная и обусловлена диффузией фермента
- **Активность в крови повышается при остром воспалении железы и, как следствие, затруднении оттока секрета в полость органа**

ПРИМЕРЫ:

- ✓ **щелочная фосфатаза печени** (маркер синдрома холестаза, например, при желчнокаменной болезни)
- ✓ **амилаза и липаза поджелудочной железы** (маркеры острого панкреатита)

▪ Внутриклеточные ферменты:

- ✓ **цитоплазматические:** **лактатдегидрогеназа (ЛДГ), аланин (аспарат) аминотрансфераза (АЛТ, АСТ), креатинкиназа (КК)**
- ✓ **митохондриальные:** **АСТ**
- ✓ **лизосомные:** **кислая фосфатаза**
 - Активность в ткани высокая
 - **Активность в крови незначительная** и является следствием нормально идущих процессов разрушения клеток (например, эритроцитов), повышенной проницаемости мембран в детском возрасте, выполнения тяжелой физической работы (повышение активности креатинкиназы)
 - **Значительное повышение активности в крови – признак патологии (воспаление, цитолиз, некроз)**
 - Незначительное повышение в крови цитозольных ферментов свидетельствует о воспалительном процессе, их резкое повышение – о цитолизе
 - Повышение в крови митохондриальных или ядерных ферментов – результат некроза

«Требования» к ферментам Энзимодиагностики

- ❑ **Органоспецифичность (тканеспецифичность)** фермента или его изоформ: преимущественная или абсолютная локализация в определенных органах

ПРИМЕРЫ:

- ✓ **панкреатическая липаза**
 - ✓ **печеночная глутаматпируваттрансаминаза и аспартатпируваттрансаминаза**
 - ✓ **ЛДГ1 и ЛДГ2 кардиомиоцитов**
 - ✓ неспецифические ферменты **АЛТ и АСТ** присутствуют во многих органах, но основным источником повышения их активности в крови являются патологии печени и сердца
-
- ❑ **Количество высвобождаемого в кровь фермента должно быть пропорционально степени повреждения ткани и достаточно для определения его активности**
 - ❑ **Стабильная активность ферментов в течение достаточно длительного времени (сутки)**

Изоферменты

- **Множественные формы одного олигомерного фермента (имеющего IV структуру), обусловленные различными комбинациями разных по структуре субъединиц**
 - **катализируют одну и ту же реакцию**

Различия изоформ

- ❖ физико-химические свойства (так как разная I структура, М.м., заряд)
- ❖ органоспецифичность
- ❖ субстратная специфичность
- ❖ активность
- ❖ способы регуляции, чувствительность к ингибиторам и активаторам

Пример изоферментов

Фермент	М.м. кДа	Орган	Субстрат	Км, ммоль/л	Активность мкмоль/мин на 1 г ткани	Регуляция
Гексокин аза (I–III)	104	Раз.	глюкоза фруктоза галактоза	≈ 0.01	Мозг – 10 Сердце – 4.8 Мышцы – 1.5 Жир – 0.15	Продукт – аллостерич еский ингибитор
Глюкокин аза (гексокин аза IV)	2000	Печень, Поджел удочная железа	глюкоза	10-20	Печень – 0.4 П.жел. – 2.1	Не аллостерич еский фермент

Тип катализируемой реакции:
перенос фосфатной группы с АТФ на гексозы

Изоформы в диагностике заболеваний

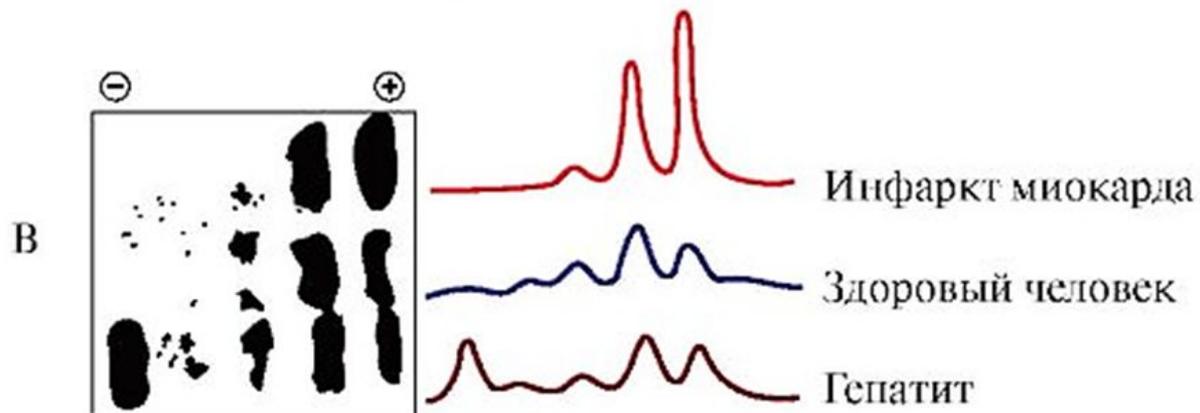
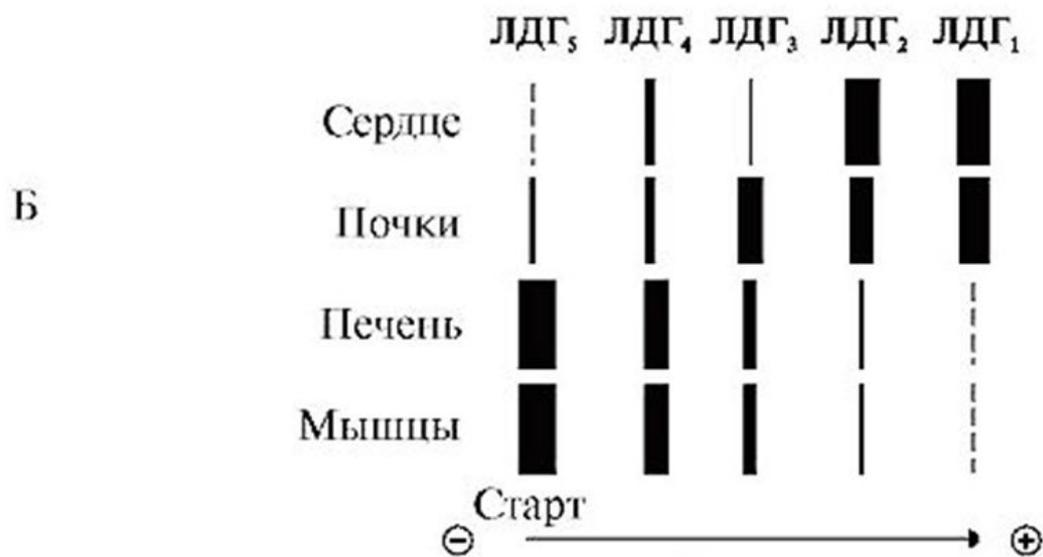
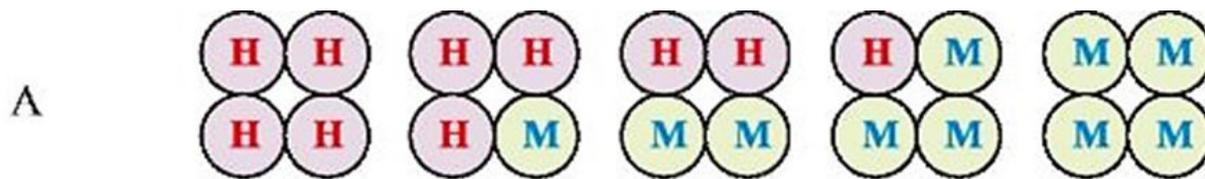
● Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)



Охарактеризуйте положение фермента в классификаторе!

- Внутриклеточный фермент
- Диагностика патологии сердца, печени, мышц
- Олигомерный белок: 4 субъединицы двух типов
 - ✓ М (англ. muscle – мышца)
 - ✓ Н (англ. heart – сердце)

Назовите возможные комбинации субъединиц, образующие 5 изоформ, и предположите органы их преимущественной локализации!



- **Лактатдегидрогеназа 1 и 2 – сердечные изоформы**
- Специфичность ЛДГ 1 и 2 выше к лактату, чем к пирувату, т.е. данные изоформы катализируют реакцию «лактат → пируват» при поступлении лактата из крови, где его постоянным источником являются эритроциты. Таким образом лактат используется кардиомиоцитами как источник энергии (АТФ образуется при дальнейшем катаболизме пирувата).
- Реакция «пируват → лактат» протекает при анаэробном гликолизе. Так как в кардиомиоцитах гликолиз преимущественно аэробный, активность ЛДГ других изоформ невысокая.
- Определение активности ЛДГ 1 и 2 используют в диагностике инфаркта миокарда на более поздних сроках после болевого приступа (через 2-3 суток), а также в динамике восстановления: чем быстрее нормализуется активность фермента, тем лучше.

Изоформы в диагностике заболеваний

● Креатинкиназа (КК)



Охарактеризуйте положение фермента в классификаторе!

- Креатинфосфат – энергетический субстрат в мышечной и нервной тканях
- Внутриклеточный фермент
- Олигомерный белок: димер из субъединиц 2-х типов
 - ✓ М (англ. muscle – мышца)
 - ✓ В (англ. brain – мозг)

Назовите возможные комбинации субъединиц, образующие 3 изоформы и предположите орган их преимущественной локализации!

- **КК-ММ** (скелетная мышца) – диагностика повреждений скелетных мышц
- **КК-МВ** (сердечная мышца) – диагностика инфаркта миокарда
- **КК-ВВ** (головной мозг) – не проникает через гематоэнцефалический барьер, поэтому в крови практически не определяется даже при инсультах (не имеет диагностического значения)

Почему важно определять изоферментный состав, а не просто суммарную активность фермента?

- Суммарная активность фермента не предоставляет информации о локализации патологического процесса. Так, например, суммарная активность ЛДГ может быть повышена при патологиях различных органов.
А в некоторых случаях суммарная активность фермента не предоставляет информации даже о наличии патологического процесса.

ПРИМЕР: **болезнь Тея-Сакса (ганглиозидоз)**

Причина: нарушение синтеза α -субъединиц **гексоаминидазы** → снижение активности изоформы А

Изоформа А ($2\alpha 2\beta$)

Изоформа В (4β)

Суммарная активность фермента при данной патологии оказывается нормальной (за счет компенсаторного повышения синтеза субъединицы β и, как следствие, повышенной концентрации изоформы В)

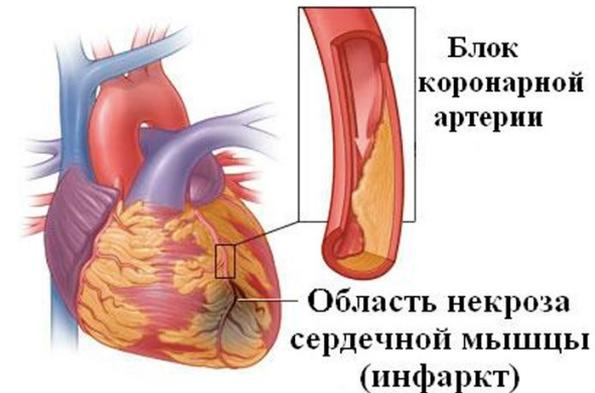
Основные ферменты энзимодиагностики патологии сердца, сопровождающейся цитолизом и некрозом (инфаркт миокарда)

Повышается активность внутриклеточных ферментов в крови:

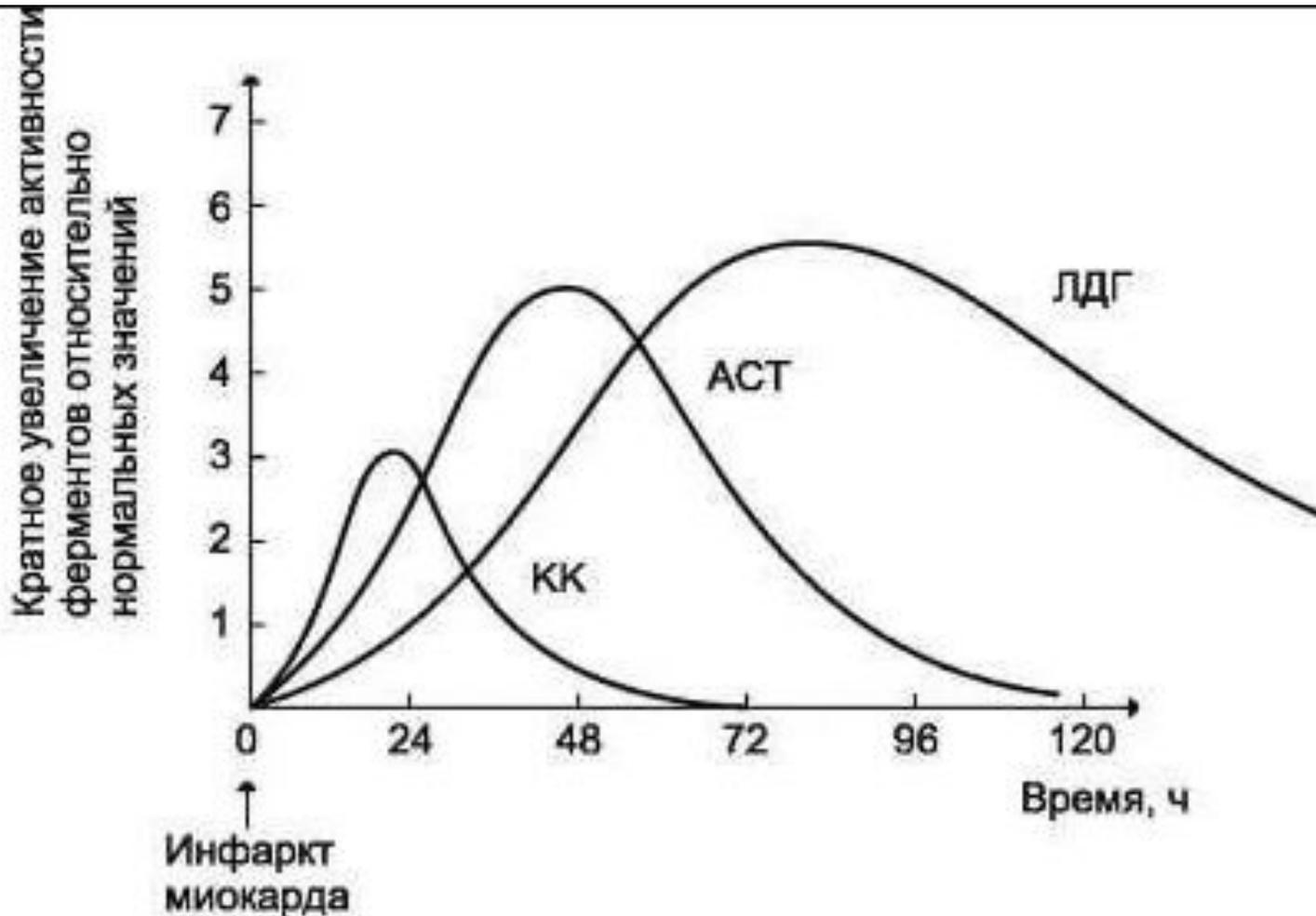
- **КК-МВ** (креатинкиназа, изоформа МВ)
- **АСТ** (аспартатаминотрансфераза)
- **АЛТ** (аланинаминотрансфераза)

АСТ / АЛТ – коэффициент де Ритиса
(в норме $1,33 \pm 0,42$)

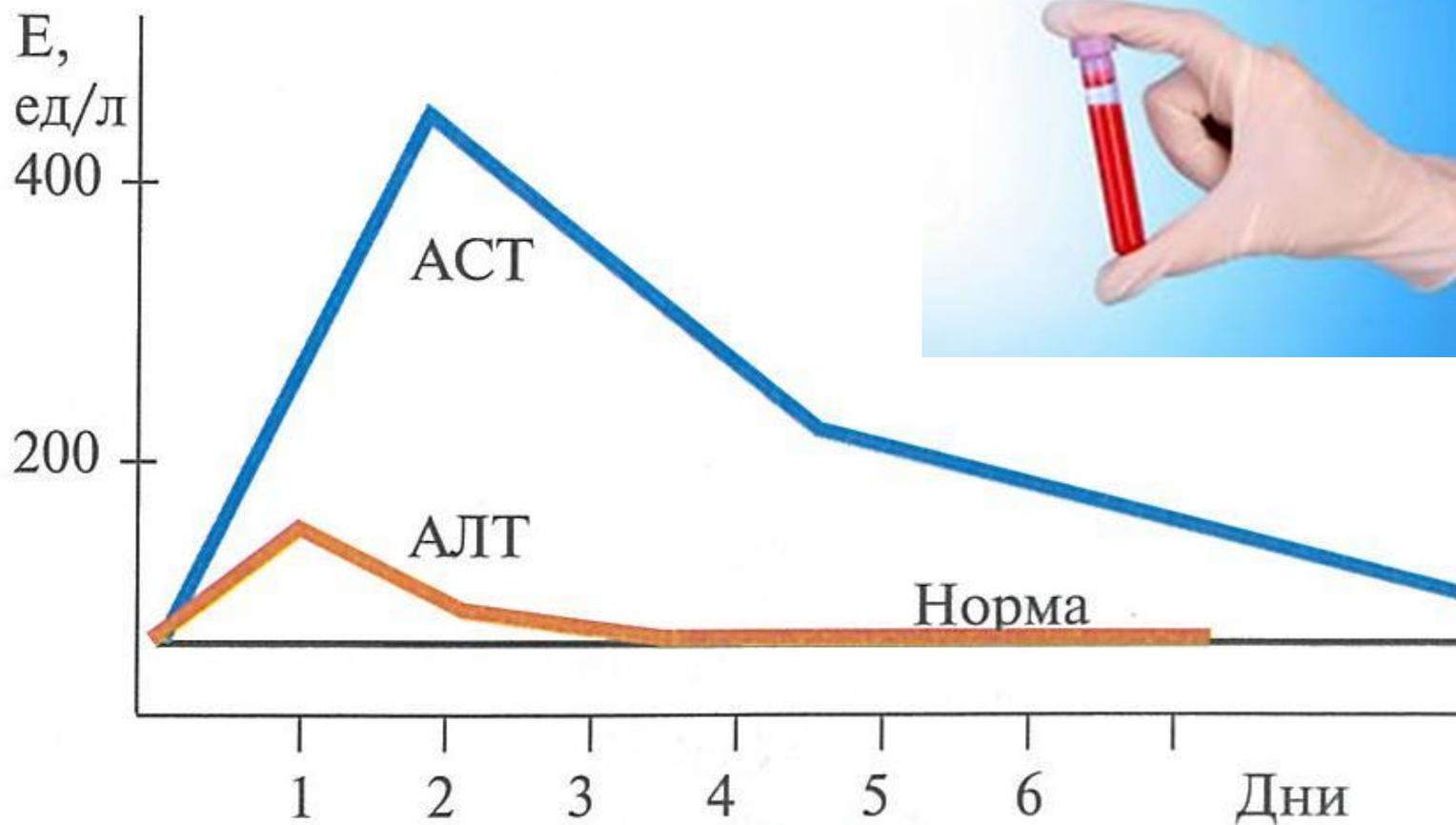
- **Коэффициент де Ритиса** повышен за счет преимущественного повышения активности АСТ (митохондриальной формы)
- **ЛДГ 1 и ЛДГ 2** (лактатдегидрогеназа, изоформы 1 и 2)



Динамика изменения активности ферментов энзимодиагностики инфаркта миокарда



Динамика изменения активности АСТ и АЛТ при инфаркте миокарда



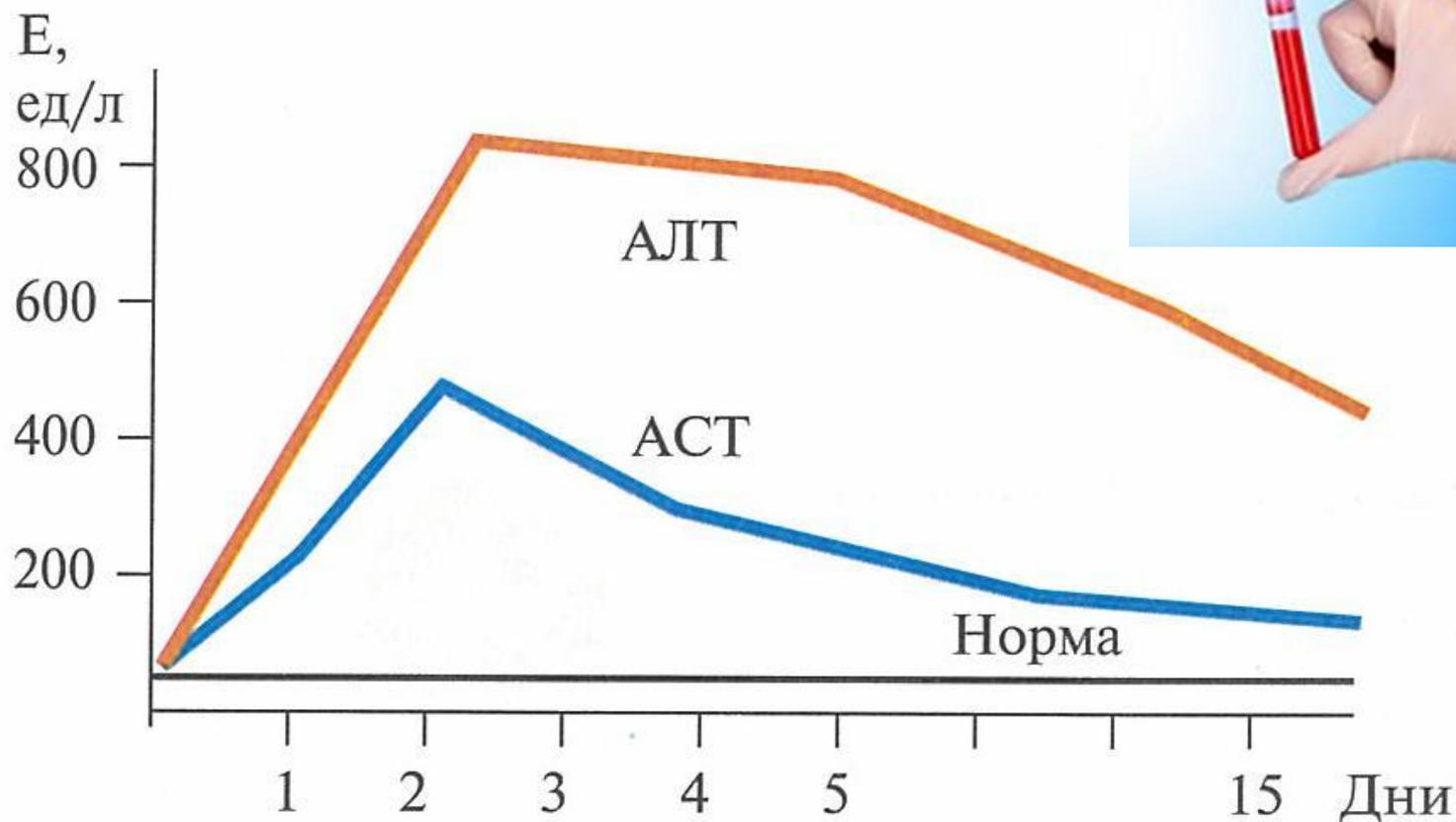
Основные ферменты энзимодиагностики патологии печени

Воспаление, цитолиз, некроз (гепатит, цирроз)

Повышается активность внутриклеточных ферментов в крови:

- **АЛТ, АСТ**
- **Коэффициент де Ритиса** при вирусном гепатите < 1 за счет преимущественного повышения цитозольного АЛТ вследствие цитолиза при сохранении целостности внутриклеточных органоидов
- Коэффициент де Ритиса при циррозе ≈ 1 на фоне высокой активности обоих ферментов за счет «выхода» АСТ из разрушенных митохондрий
- **ЛДГ 4, ЛДГ 5**

Динамика изменения активности АЛТ и АСТ при вирусном гепатите



Основные ферменты

Энзимодиагностики патологии печени

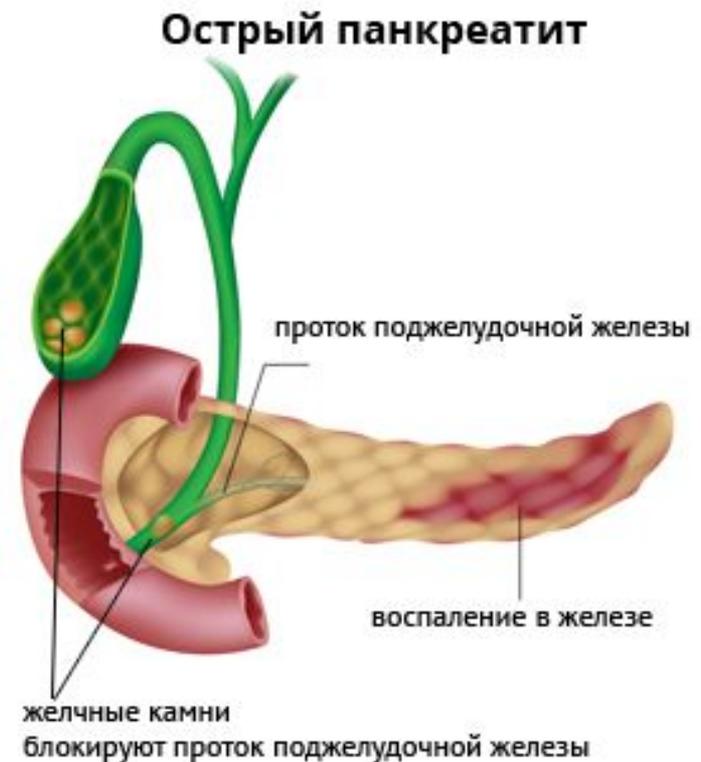
Синдром холестаза

- **Повышается активность экскреторного фермента печени в крови – ЩФ (печеночной изоформы щелочной фосфатазы – гидролазы фосфоэфирных связей)**
- **Повышается активность ГГТ, или ГГТП (гамма-глутамил трансферазы, или транспептидазы) – фермента цитоплазматической мембраны клеток различных органов, участвующего в транспорте аминокислот в клетку. Причина повышения активности ГГТ при холестазахе – отщепление фермента от ЦПМ под действием желчных кислот.**
- **ГГТ является также маркером алкогольной болезни печени.**

Основные ферменты энзимодиагностики острого панкреатита

**Повышается активность экскреторных
ферментов в крови:**

- Амилаза (диастаза мочи)
- Липаза



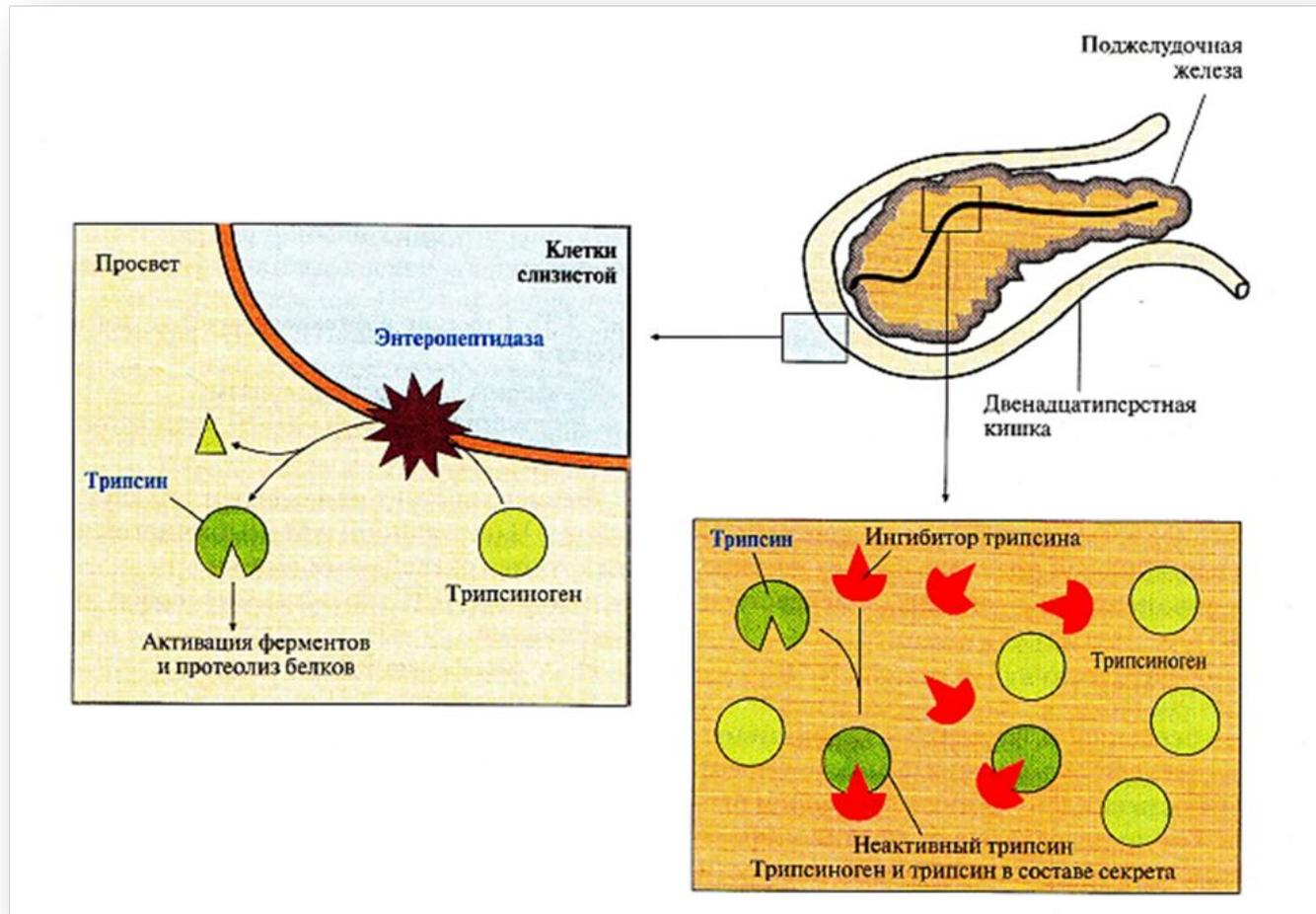
Дополнительные вопросы клинической энзимологии

Использование ингибиторов ферментов в качестве
лекарственных препаратов

Энзимопатии

Использование ингибиторов ферментов

- **Ингибиторы протеаз** в терапии острых панкреатитов (контрикал, трасилол, пантрипин и др.)



Использование ингибиторов ферментов

- **Ингибиторы протеаз** в терапии HCV инфекции - новый класс препаратов для лечения гепатита С
 - Действие препаратов направлено непосредственно на вирус гепатита: они подавляют или блокируют ключевые внутриклеточные этапы размножения вируса
 - В настоящее время одобрено использование препаратов: **симепревир** (Россия), **телапревир** (Incivek) и **боцепревир** (Victrelis) (США, страны ЕС). Их применение в составе комбинированной терапии существенно повышает эффективность лечения пациентов.



Использование ингибиторов ферментов

- Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента – лечение гипертензии (берлиприл, вазолонг и др.)
- Ингибиторы ксантиноксидазы – лечение подагры (аллопуринол)
- Ингибиторы ферментов синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот – лечение бактериальных, вирусных инфекций, онкологических заболеваний, например
- ✓ ингибиторы обратной транскриптазы – лечение ВИЧ-инфекции

Энзимопатии

Патологические процессы, основанные на нарушении ферментативного катализа по причине мутации генов ферментов или нарушения экспрессии (синтеза фермента)

□ **первичные** (наследственные)

- нарушается образование конечного продукта

ПРИМЕР: **Альбинизм**

нарушение синтеза меланина из-за дефекта **тирозиназы**

- **накапливаются токсические метаболиты**

ПРИМЕР: **Фенилкетонурия**

снижение образование тирозина из фенилаланина из-за недостатка **фенилаланингидроксилазы** приводит к накоплению фенилпирувата и фенилацетата → токсическое действие на мозг

нарушение транспорта *тир* в мозг → снижение синтеза дофамина, норадреналина

□ **вторичные** (приобретенные)

Задание № 1

для самостоятельной работы

- В современной клинической лабораторной диагностике широко используется метод иммуноферментного анализа (ИФА). Используя интернет-ресурсы, изучите информацию о данном методе и составьте конспект по вопросам:
 1. Принцип метода ИФА.
 2. Роль ферментов как реагентов в ИФА-диагностике.
 3. Значение ИФА в диагностике заболеваний.

Задание № 2 для самостоятельной работы

Используя интернет-ресурсы, заполните таблицу «Ферменты энзимодиагностики» и определите класс фермента

Фермент и его изоформы	Норма в крови (с учетом возраста и пола)	Клинико-диагностическое значение (с указанием изоформ)
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)		
Аланинаминотрансфераза (АЛТ)		
Аспартатаминотрансфераза (АСТ)		
Креатинкиназа (КК)		
Гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ)		
Щелочная фосфатаза (ЩФ)		
Псевдохолинэстераза (ПХЭ)		
Панкреатическая липаза		
Панкреатическая амилаза		

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАЗМЫШЛЕНИЯ

- Почему активность аминотрансфераз у детей раннего возраста выше, чем у взрослых?
- Почему активность псевдохолинэстеразы у детей раннего возраста ниже, чем у взрослых?
- Почему активность щелочной фосфатазы костной ткани у детей, выше чем у взрослых?



Заключение

- Ферменты используются в диагностике заболеваний как специфические реагенты
- Препараты ферментов используются в заместительной и комплексной терапии
- Определение активности ферментов – важный этап диагностики заболеваний, а также контроля эффективности проводимой терапии
- В основе многих наследственных заболеваний лежит нарушение ферментативного катализа

Литература

1. Биохимия: учебник для вузов / ред. Е. С. Северин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. -768 с.
2. Биологическая химия с упражнениями и задачами: учебник / ред. С.Е. Северин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. -624 с. (С. 99-103)
3. Биологическая химия: учебник для студентов медицинских вузов / А.Я. Николаев. – М.: Мед. информ. агенство, 2007. – 568 с.
4. Клиническая биохимия: электронное учебное издание / Новосиб. гос.мед.ун-т; сост. И. В. Пикалов [и др.]. - Новосибирск: Центр очно-заочного образования ГОУ ВПО НГМУ Росздрава, 2008