

ЭНЗИМОДИАГНОСТИ КА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

- В клинической лабораторной практике речь всегда идет не о количестве фермента, а об его активности, поскольку:
- 1. Измерить абсолютное количество фермента в биологической жидкости крайне сложно вследствие малого его количества и трудностей выделения в чистом виде.

-
- 2. Абсолютное количество ничего не говорит о его активности. Абсолютное количество фермента может быть большое, а активность низкая вследствие влияния тех или иных факторов и наоборот.

-
- Для определения активности фермента используют 2 основных подхода:
 - 1. Убыль субстрата.
 - 2. Прирост продукта.

ПОНЯТИЕ СТАНДАРТНЫХ УСЛОВИЙ

- Для того чтобы сравнивать данные об активности ферментов разных определений необходимо проводить их в одинаковых условиях которые называются стандартными. Для создания стандартных условий пользуются следующими правилами:

-
- 1. Оптимальное для определяемого фермента значение pH;
 - 2. Концентрация субстрата выше насыщающей;
 - 3. Для сложных ферментов концентрация кофакторов (ионы металлов, коферментов) выше насыщающей;

-
- 4. Время инкубирования смеси строго лимитируется;
 - 5. Стандартная температура принята за 25C° . Другая температура измерения специально оговаривается в методике.

ЕДИНИЦЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

- Поскольку в большинстве случаев измерить количество фермента в абсолютных единицах невозможно, на практике пользуются условными единицами основанными на линейной зависимости скорости реакции от количества фермента.

Международная единица фермента (Е) – это такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль вещества за 1 мин.

Определяют по формуле:

$$E = \frac{\text{количество превращенного субстрата, мкмоль}}{\text{навеска ткани, г} * \text{время инкубации, мин}}$$

Удельная активность фермента – масса фермента (в миллиграммах), способной превратить 1 мкмоль субстрата за 1 мин в стандартных условиях. Выражается в (мкмоль/мин)/мг белка.

Определяется по формуле:

Число единиц фермента (Е) в образце

Масса белка в мг в этом образце

1 катал (кат) – кол-во фермента, способное осуществить превращение 1 моля субстрата за 1 сек)

На практике чаще используют мккат и нкат

Принципы и последовательность действий при выделении ферментов

Ткань



Размельчение

Экстракция в мягких условиях (например 0,25м р-р сахарозы) и гомогентизация (разрушение клеточной структуры).

Последовательное центрифугирование (основано на различной седиментации субклеточных структур)

Очистка и выделение белка (высаливание, хроматография, диализ и др.)

ИЗОФЕРМЕНТЫ

- Обнаружены в 1959 году методом геле-электрофореза. Это ферменты которые катализируют одну и ту же реакцию, но различаются по кинетическим свойствам, а/к составу, либо по последовательности а/к остатков. Наличие изоферментов обусловлено генетически.

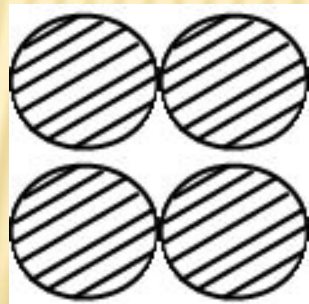
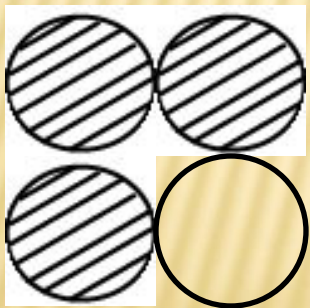
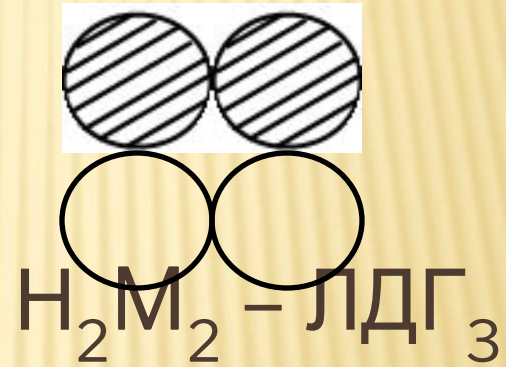
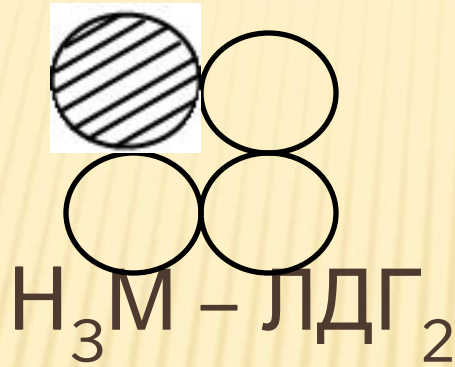
-
- Существует понятие множественные формы ферментов – это негенетически обусловленные модификации одного и того фермента (например активная и неактивная липаза).
 - Т.о. изоферменты – это ферменты которые катализируют одну и ту же реакцию, но в разных условиях.

-
- Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – фермент, катализирующий обратимое восстановление пирувата до лактата. Является белком с четвертичной структурой. Состоит из 4-х субъединиц. Молекулярная масса каждого протомера 35 кД, соответственно тетрамера 140 кД.

-
- В цитоплазме клеток и сыворотке крови ЛДГ имеет 5 изоферментов, представленных 5 различными комбинациями 2-х типов полипептидных цепей.

H – (heart) – сердце ○

M – (muscle) – мышца ●



-
- N-протомеры несут более выраженный отрицательный заряд, чем M-протомеры. Т.о. чем больше в комбинации N-протомеров, тем в большей степени данный белок перемещается к аноду. В связи с этим выделяют 5 типов ЛДГ.

ЛДГ₅

~~старт~~

ЛДГ₄

ЛДГ₃

ЛДГ₂

ЛДГ₁

Анод
+

-
- ЛДГ 1 работает в аэробных условиях (сердце), следовательно с небольшим количеством субстрата, следовательно имеет высокую степень специфичности, следовательно низкую K_m .
 - ЛДГ 5 работает в анаэробных условиях (мышца), следовательно большое количество субстрата, следовательно большая K_m .

-
- Т.о. ЛДГ1 участвует в окислении лактата в пируват в тканях с аэробным типом метаболизма (миокард, мозг, почки, эритроциты, тромбоциты).
 - ЛДГ5 оптимизирована для превращения пирувата в лактат в тканях с высоким уровнем гликолиза (скелетные мышцы, печень).

КРЕАТИНФОСФОКИНАЗА (КФК)

- Катализирует обратимый перенос фосфатного остатка между АТФ и креатином с образованием АДФ и креатинфосфата. КФК – димер, состоящий из 2-х субъединиц с молекулярной массой 41 кД и активном центре в каждом протомере.

Креатинфосфокиназа (КФ 2.7.3.2.)

Креатин + АТФ $\xrightarrow{\text{КФК}}$ креатинфосфат + АДФ

Выделяют 2 типа субъединиц:

B – brain (мозг)

M – muscle (мышцы)

Соответственно двум формам молекула КФК имеет следующие варианты:

BB – головной мозг

BM – миокард

MM – мышца

ЭНЗИМОПАТОЛОГИЯ

- Наука которая изучает заболевания связанные с нарушением функционирования энзимов. Нарушения функционирования энзимов – энзимопатии могут быть:
 - 1. Наследственные;
 - 2. Токсические;
 - 3. Алиментарные;
 - 4. Связанные с нарушением ферментных процессов в клетке.

1. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ЭНЗИМОПАТИИ

- Включают в себя врожденные генетические заболевания обусловленные недостаточной активностью фермента или полное выпадение синтеза данного фермента.
- Например:
 - 1. Фенилкетонурия;
 - 2. Галактоземия;
 - 3. Алкаптонурия;
 - 4. Гликогенозы

2. ТОКСИЧЕСКИЕ ЭНЗИМОПАТИИ

- Обусловлены:
- а) Воздействием на организм токсинов, инфекционных агентов
- Например: патологическая активация токсином холерного вибриона аденилатциклазы
- б) передозировка лекарственных средств

3. АЛИМЕНТАРНЫЕ - ПИЩЕВЫЕ

- Обусловлены недостатком поступления витаминов, микроэлементов.
- Например: цинга. Нарушается процесс гидроксирования остатков пролина.

- **4. Связаны с нарушением кровоснабжения ткани, недостатком кислорода и др.**

ОРГАНОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

- Существуют ферменты присутствующие практически во всех органах и тканях. Как правило эти ферменты обеспечивают основы жизнедеятельности клетки. В то же время для функционирования высокодифференцированных клеток существуют специальные ферменты которые называют органоспецифическими, т.к. они встречаются в одном, двух органах.

-
- В клинической лабораторной практике активность ферментов чаще всего определяют в плазме крови. Ферменты плазмы крови подразделяют:
 - 1. Секреторные – синтезируются в печени, выполняют в крови определенную функцию (факторы свертывания крови).

-
- 2. Экскреторные – синтезируются в печени, выделяются с желчью, но при определенных условиях могут попадать в кровь (щелочная фосфатаза, лейцинаминопептидаза).
 - 3. Индикаторные (внутриклеточные) – в норме в плазме определяются только в следовых количествах, поскольку выполняют внутриклеточные функции. При разрушении клеток выходят в кровь, что лежит в основе энзимодиагностики.

-
- Для диагностики имеют значения следующие состояния:
 - 1. Гиперферментемия – увеличенный синтез или выброс фермента из пораженного органа;
 - 2. Гипоферментемия;
 - 3. Появление фермента в норме отсутствующего.

ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА ИНФАРКТА МИОКАРДА

- Патогенез: нарушение кровоснабжения участка сердечной мышцы приводит к разрушению кардиомиоцитов и резкому увеличению в крови следующих ферментов:

Изменение активности некоторых ферментов при остром инфаркте миокарда

Фермент	Начало увеличения активности, ч	Максимум увеличения активности, ч	Возвращение к норме, сут	Ожидаемое увеличение активности(во сколько раз)
Креатинфосфокиназа (КФК) ВМ	2 – 4	24 – 36	3 – 6	В 3 – 30
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) общая	8 – 10	48 – 72	8 – 9	В 2 – 4
ЛДГ ₁ и ЛДГ ₂	8 – 10	24 – 92	10 – 12	
Аспартатаминотрансфераза (АСТ)	4 – 6	24 – 48	4 – 7	В 4 – 12
Альдолаза (АЛД)	4 – 6	24 – 48	2 – 9	В 2 – 5

Заболевания печени

Разрушение гепатоцитов приводит к \uparrow АЛТ
(аланинаминотрансфераза) в сыворотке крови

На практике часто используют коэффициент Ритиса:
АСТ/АЛТ $N = 1,33$

Увеличение коэффициента Ритиса свидетельствует о поражении сердца, снижение – поражение печени

ГГТ – γ – глутамилтранспептидаза \uparrow в сыворотке крови только при токсических гепатитах (алкогольное отравление, наркотики, седативные препараты и др.). «Отсеивающий» тест для дифференциальной диагностики гепатитов.

ЩФ (щелочная фосфатаза) - \uparrow в крови при нарушении оттока желчи (механическая желтуха), холангиты

$$\text{Коэффициент Шмидта} = \text{АСТ} + \frac{\text{АЛТ}}{\text{ГлДГ}}$$

ГлДГ – глутаматдегидрогеназа

К.ш. > 30 – при гепатитах с острым и хроническим течением и при циррозе печени

5 – 15 – при механической (обтурационной) желтухе

ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

- Основным ферментом для энзимодиагностики является α -амилаза. α -амилаза мочи называется диастаза. Повышение активности амилазы в крови в 2 раза и более должно расцениваться как симптом поражения поджелудочной железы.

-
- Небольшое увеличение активности дает основание заподозрить патологию поджелудочной железы, но иногда может наблюдаться при других заболеваниях (паротит).

Заболевание поджелудочной железы

Клиническая ситуация	↑ активности амилазы
1. Острый панкреатит	+ + +
2. Препятствие оттоку панкреатического сока	+ + +
3. Обострение хронического панкреатита	+ +
4. Травма поджелудочной железы	+ +
5. Заворот тонкой кишки	+
6. Перфорация язвы желудка или 12. п. к.	+

При поражениях поджелудочной железы отмечается также увеличение активности трипсина и липазы

ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ДРУГИХ ОРГАНОВ

- Основана на явлении органоспецифичности

Рак предстательной железы	↑КФ (кислой фосфатазы)
Рахит	↑ЩФ (щелочная фосфатаза)
Острая и хроническая пневмония	↑ЛДГ _{2,3}
Рак молочной железы	↑липазы
Прогрессирующая мышечная дистрофия	↑КФК ММ (креатинфосфокиназа)
Заболевания почек	↑глицин – амидинотрансфераза

ПРИНЦИПЫ ЭНЗИМОТЕРАПИИ

- Энзимотерапия – использование в лечебных целях ферментов и лекарственных средств влияющих на активность ферментов. Основные подходы:
 - 1. Ферментные препараты.
 - 2. Коферменты.
 - 3. Активаторы.
 - 4. Ингибиторы.