

ФЕРМЕНТЫ



ФЕРМЕНТЫ –

*высокоэффективные
биологические катализаторы,
синтезируемые живыми
клетками*

Впервые обнаружены в дрожжах

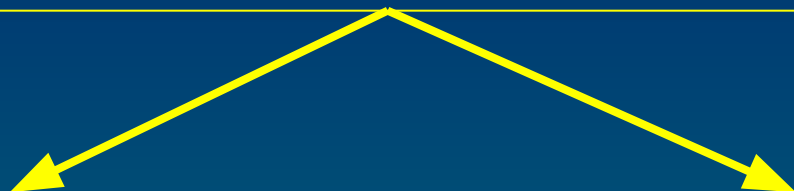
От греческого **«en zyme» - «в дрожжах»**



ЧРЕЗВЫЧАЙНО ВАЖНАЯ РОЛЬ



Участвуют во всех химических процессах



Клетка

Организм

Проявляют свою каталитическую активность в водной среде



ФЕРМЕНТЫ – ПРОСТЫЕ БЕЛКИ

СОСТОЯТ ТОЛЬКО ИЗ
ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

ГИДРОЛИЗУЮТСЯ ДО АМИНОКИСЛОТ

ПЕПСИН, ТРИПСИН, УРЕАЗА



ФЕРМЕНТЫ – СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

БЕЛОК + КОФАКТОР (ПРОСТЕТИЧЕСКАЯ ГРУППА)

Ионы металлов -

Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} ,
 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cl^-

Коферменты –

органические молекулы, производные
витаминов
НАД, НАДН, ФАД, ФМН,
перидоксальфосфат и др.

Стабилизация третичной/четвертичной
структуры ферментов
Связывание ферментов с субстратом
Ферментативный катализ

Ферментативный катализ (перенос
электронов, ионов водорода, CO_2 ,
Химических групп: амина, ацильных
и др.)



Ф Е Р М Е Н Т Ы – ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ

**Увеличивают скорость химической реакции
в миллионы/миллиарды раз**



**БЕЗ УЧАСТИЯ ФЕРМЕНТОВ ХИМИЧЕСКИЕ
РЕАКЦИИ ПРОТЕКАЮТ ТАК МЕДЛЕННО, ЧТО
ПОЧТИ НЕ ОКАЗЫВАЮТ ВЛИЯНИЯ НА МЕТАБОЛИЗМ**



Изоферменты

фермент, существующий в виде нескольких изоформ

- ферменты из одного источника
- катализируют одну и ту же реакцию
- отличаются по а/к составу
- могут иметь различный молекулярный вес
- разную электрофоретическую подвижность
- разные иммунологические/биохимические характеристики
- различный рН-оптимум
- разная стабильность
- разные способы регуляции

ЛДГ – 5 изоформ – тетрамеры – комбинация 2 типов субъединиц

КК – 2 субъединицы – 3 изоформы



**ОРГАНЫ И ТКАНИ ИМЕЮТ ХАРАКТЕРНЫЙ
ДЛЯ НИХ НАБОР ИЗОФЕРМЕНТОВ**

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛДГ, КК,
 α -АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ ВАЖНО ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ РЯДА ЗАБОЛЕВАНИЙ**

ОКОЛО 100 ФЕРМЕНТОВ ИМЕЮТ ИЗОФОРМЫ



СУБСТРАТЫ-

вещества, с которыми происходит химическое превращение под действием ферментов

СУБСТРАТЫ –

- ПРИРОДНЫЕ ВЕЩЕСТВА
- ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННЫЕ

**Фермент может иметь
один или несколько субстратов**



Каталитическая активность

Способность фермента превращать в продукт определенное количество молекул субстрата в единицу времени, оставаясь неизменным

**Ферменты могут
осуществлять
от 1 до 10^6 циклов превращений
субстрата в секунду**

*1 моль трипсина 100 цикл/сек, глюкозооксидаза –
17 000 цикл/сек, карбоангидраза – 600 000 цикл/сек*



АКТИВАТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Соединения, которые приводят фермент в каталитически активное состояние

Ионы двухвалентных металлов:
 Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}



ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Соединения, которые снижают каталитическую активность ферментов



ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

КОНКУРЕНТНЫЕ

СВЯЗЫВАЕТСЯ С АКТИВНЫМ
ЦЕНТРОМ ФЕРМЕНТА

↓ СКОРОСТЬ КАТАЛИЗА, СНИЖАЯ
ДОЛЮ МОЛЕКУЛ ФЕРМЕНТА,
СВЯЗЫВАЮЩИХ СУБСТРАТ

НЕКОНКУРЕНТНЫЕ

СВОЙ УЧАСТОК СВЯЗЫВАНИЯ
НА МОЛЕКУЛЕ ФЕРМЕНТА

↓ СКОРОСТЬ КАТАЛИЗА,
ИЗМЕНЯЯ
СТРУКТУРУ АКТИВНОГО
ЦЕНТРА ФЕРМЕНТА



СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТА

ДЕЙСТВИЕ КАЖДОГО ФЕРМЕНТА
СТРОГО ОГРАНИЧЕНО ОДНИМ ТИПОМ
РЕАКЦИИ И ОДНИМ СУБСТРАТОМ
(НЕБОЛЬШИМ ЧИСЛОМ СХОДНЫХ
ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ)



Международная единица активности

МЕ - КОЛИЧЕСТВО ФЕРМЕНТА, КОТОРОЕ КАТАЛИЗИРУЕТ ПРЕВРАЩЕНИЕ 1 МКМОЛЯ СУБСТРАТА ИЛИ ПОЛУЧЕНИЕ 1 МКМОЛЯ ПРОДУКТА В МИНУТУ В СТАНДАРТНЫХ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

$$1 \text{ кат.} = 6 \cdot 10^7 \text{ МЕ}$$

$$1 \text{ МЕ} = 16.67 \cdot 10^{-9} \text{ кат.}$$

Единица активности в системе СИ – катал (кат.) – количество фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата или получение 1 моля продукта в секунду



Классы ферментов

Номер класса	Название класса	Катлизируемые реакции
1	Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные
2	Трансферазы	Перенос групп
3	Гидролазы	Гидролиз
4	Лиазы	Расщепление негидролитическим путем связей С-С, отщепление групп с образованием двойной связи, присоединение по двойной связи
5	Изомеразы	Изомерные превращения
6	Лигаза	Присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии АТФ (или других высоко-энергетических соединений)



Ферменты участвуют во всех биологических процессах

Нарушение метаболизма, вызванное заболеванием, приводит к изменению концентрации соответствующих ферментов в биологических жидкостях

Определение активности ферментов в сыворотке крови и моче является незаменимым орудием в диагностике и мониторинге целого ряда заболеваний



Применение ферментов в медицине

- **диагностическое (энзимодиагностика)**
- **терапевтическое (энзимотерапия)**
- **в качестве специфических реактивов для определения ряда веществ (ферментативные методы определения субстратов)**



Энзимотерапия

Заместительная терапия - использование ферментов в случае их недостаточности:

Заместительная энзимотерапия эффективна при желудочно-кишечных заболеваниях, связанных с недостаточностью секреции пищеварительных соков. Например, пепсин используют при ахилии, гипо- и анацидных гастритах. Дефицит панкреатических ферментов также в значительной степени может быть компенсирован приёмом внутрь препаратов, содержащих основные ферменты поджелудочной железы (фестал, энзистал, мезим-форте и др.))



Энзимотерапия

Как элемент комплексной терапии - **применение ферментов в сочетании с другой терапией.**

В качестве дополнительных терапевтических средств ферменты используют при ряде заболеваний.

- Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин) применяют при местном воздействии для обработки гнойных ран с целью расщепления белков погибших клеток, для удаления сгустков крови или вязких секретов при воспалительных заболеваниях дыхательных путей.
- Ферментные препараты рибонуклеазу и дезоксирибонуклеазу используют в качестве противовирусных препаратов при лечении аденовирусных конъюнктивитов, герпетических кератитов.
- Ферментные препараты стали широко применять при тромбозах и тромбоземболиях. С этой целью используют препараты фибринолизина, стрептолиазы, стрептодеказы, урокиназы.
- Фермент гиалуронидазу (лидазу), катализирующий расщепление гиалуроновой кислоты, используют подкожно и внутримышечно для рассасывания контрактур рубцов после ожогов и операций (гиалуроновая кислота образует сшивки в соединительной ткани)



Применение ферментов в качестве специфических реактивов

- специфические эндонуклеазы, катализирующие разрывы межнуклеотидных связей ДНК, для диагностики фенилкетонурии, α - и β -талассемии и других наследственных болезней)
- глюкозооксидазу применяют для количественного определения глюкозы в моче и крови.
- Фермент уреазу используют для определения содержания количества мочевины в крови и моче.
- С помощью различных дегидрогеназ обнаруживают соответствующие субстраты, например пируват, лактат, этиловый спирт и др.



Значение энзимодиагностики

Известно около 20 тестов, основанных на количественном определении активности ферментов (и изоферментов), главным образом в крови (реже в моче), а также в биоптатах. В практическом плане энзимологические тесты должны помогать в ранней постановке и дифференциации диагноза, информировать о возможном исходе болезни.

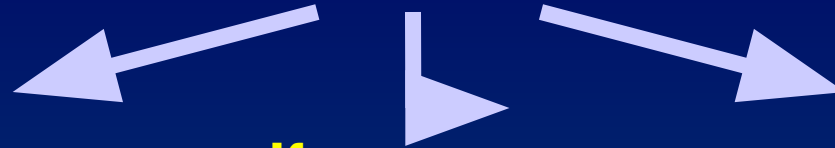


Энзимодиагностика

- постановка диагноза заболевания (или синдрома) на основе определения активности ферментов в биологических жидкостях человека
- В особую группу выделяются иммуноферментные диагностические методы, состоящие в применении антител, химически связанных с каким-либо ферментом, для определения в жидкостях веществ, образующих с данными антителами комплексы антиген — антитело.



Ферменты сыворотки



Секреторные

синтезируются клетками, поступают в кровь и выполняют специфические функции в кровяном русле, поэтому их называют собственно ферментами крови. Это ферменты свертывающей системы и фибринолиза, каллекриин-кининовой системы, холинэстераза и др.

Клеточные

поступают в кровь из органов и тканей. Уровень их сывороточной активности зависит от содержания энзимов в тканях, молекулярной массы, внутриклеточной локализации, прочности связи фермента со своей органеллой, а также от скорости гидролитического расщепления и элиминации

Экскреторные

образуются пищеварительными железами и из их секретов поступают в кровь (амилаза, липаза и др.).



Органоспецифические

которые находятся в одном-двух органах – это наиболее информативные энзимы, т.к. увеличение их активности свидетельствует о поражении этих органов.

Неспецифические

Активность обнаруживается во всех органах и тканях, поэтому по увеличению их сывороточной активности трудно судить о локализации первичных патологических изменений



Причины повышения активности клеточных ферментов в крови

- нарушение проницаемости мембраны клеток (при воспалительных процессах)
- нарушение целостности клеток (при некрозе)
- повышенная пролиферация клеток с ускорением клеточного цикла (например, при онкопролиферативных процессах)
- повышенный синтез ферментов
- обструкция путей секреции ферментов в полости
- снижение клиренса (например, активность амилазы в сыворотке повышается при острой почечной недостаточности)

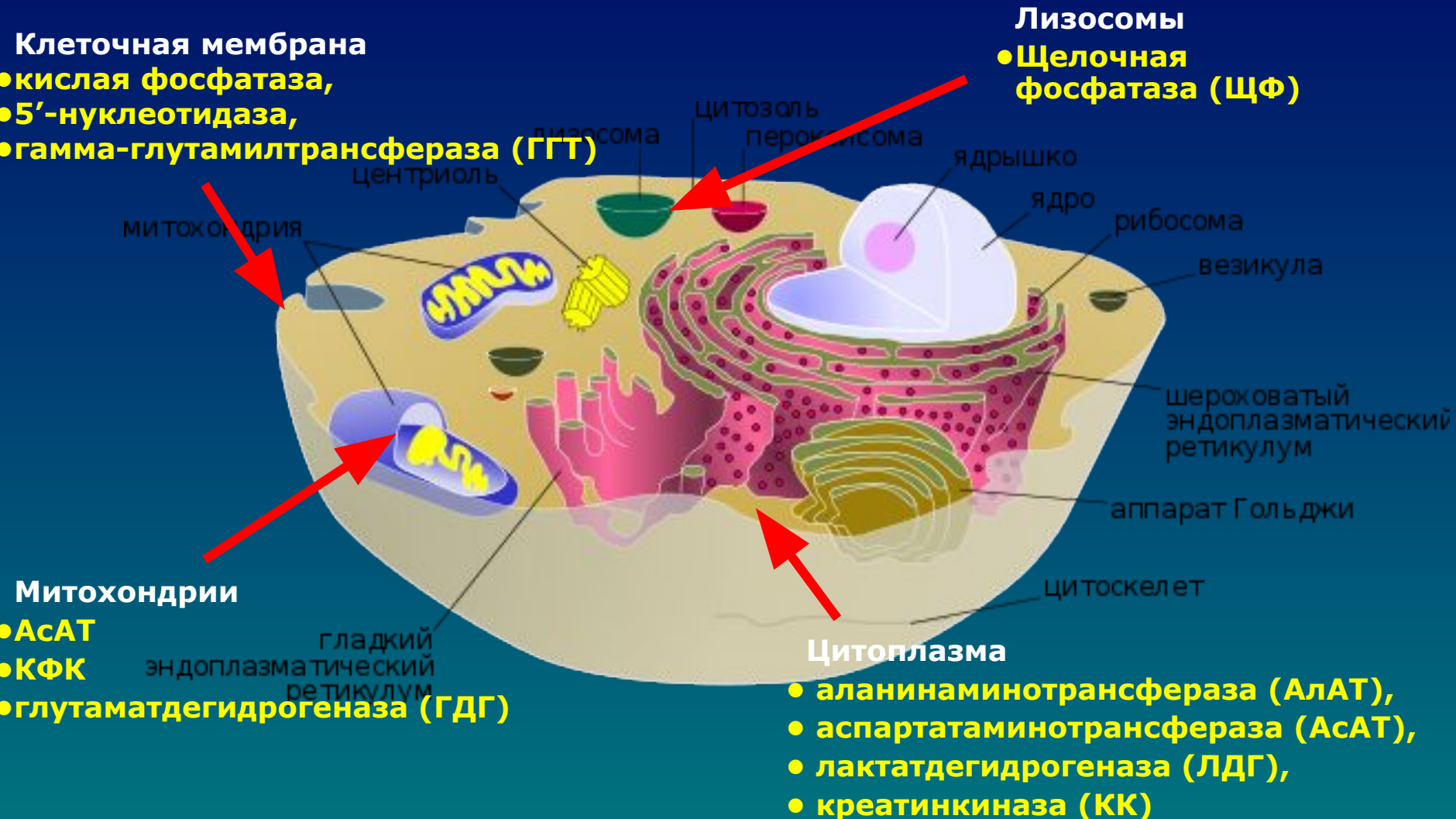


Факторы, определяющие концентрацию фермента в крови при повреждении клеток

- природа повреждающего воздействия,
- время действия и степень повреждения биомембран клеток и субклеточных структур органов,
- период полужизни (полураспада) в плазме крови каждого из диагностических ферментов,
- особенности распределения (топографии) ферментов в индивидуальных органах и тканях, а также их внутриклеточная локализация.



Примеры различной локализация ферментов в клетке



Причины понижения активности клеточных ферментов в крови (гипоферментемия)

- *Гипоферментемия* встречается относительно редко и касается в основном секреторных ферментов.
- В подавляющем большинстве случаев она связана с генетически детерминированными нарушениями синтеза определенных энзимов,
- реже – с ингибированием, усиленной деградацией или экскрецией



Механизмы удаления ферментов из крови

- Большинство ферментов катаболизируется плазменными протеазами и удаляется ретикулоэндотелиальной системой.
- Часть ферментов выделяется со слюной, желчью и другими секреторными жидкостями.
- Через почечный фильтр небольшие молекулы с молекулярной массой не более 60–70 кДа, (поэтому в норме количество экскретируемых ферментов невелико)



Основные правила дифференциальной диагностики

- *Определение более чем одного фермента.* Разные ткани содержат ферменты в разных количествах. Так, АлАТ и АсАТ содержатся в гепатоцитах и кардиомиоцитах, но АлАТ существенно больше в печени, а АсАТ в сердце. Поэтому при повреждении печени относительно больше повышается АлАТ, а при повреждении сердца – АсАТ.
- *Определение спектра изоферментов.* Данный подход основан на том, что отдельные изоформы характерны для разных тканей.
- *Определение активности ферментов в динамике.* Скорость изменения активности фермента в сыворотке определяется разницей между скоростью его появления в сыворотке и скоростью удаления из системы циркуляции. При инфаркте органа и некрозе поврежденных клеток в сыворотке крови происходит повышение активности внутриклеточных ферментов, специфичных для данной ткани, затем после выхода всего фермента активность его снижается. Важным является определение динамики изменения фермента и определение его активности в период повышения в сыворотке, т. к. слишком раннее взятие пробы для анализа может предшествовать подъему активности, слишком позднее – также не позволит получить необходимую информацию.



Не всегда активность фермента в сыворотке отражает тяжесть заболевания. Так, острое повреждение клеток при вирусном гепатите может сопровождаться очень высоким подъемом активности ферментов, которая будет падать по мере выздоровления. В то же время при циррозе печень может быть значительно сильнее вовлечена в патологический процесс, но скорость повреждения клеток ниже и активность ферментов в сыворотке будет повышена незначительно или будет находиться в пределах референтных значений. Этот пример еще раз подчеркивает, что любые результаты по исследованию активности ферментов в сыворотке должны быть обязательно сопоставлены с другими лабораторными анализами и с клинической картиной заболевания.



Перед тем как указывать на возможность патологического процесса, необходимо исключить возможность неспецифического повышения активности ферментов в сыворотке. Так, относительно невысокое повышение в плазме активности трансаминаз характерно для многих неспецифических патологических процессов. Тяжелая физическая работа, массивные внутримышечные инъекции могут привести к повышению активности КК в сыворотке. Некоторые лекарственные средства, в частности фенитоин, фенобарбитал могут индуцировать синтез микросомального фермента ГГТ и вызвать его повышение в сыворотке без всякого заболевания. Активность ферментов в сыворотке может меняться в результате агрегации с образованием макромолекул, например, при образовании комплексов с иммуноглобулинами, в которые вступают ЛДГ, ЩФ и КК.



Алкогольдегидрогеназа

- Алкогольдегидрогеназа (АДГ; КФ 1.1.1.1.) печеночный цитоплазматический фермент, класса оксидоредуктаз. АДГ является цинксодержащем ферментом и преимущественно располагается в центролобулярном регионе печени. Алкогольдегидрогеназа способна нейтрализовать небольшие дозы алкоголя. Содержится в организме южных народов, в том числе у украинцев, русских, но почти отсутствует у северных. Фермент катализирует в присутствии НАД окисление спиртов и ацеталей до альдегидов и кетонов.
- Идентифицированы изоферменты АДГ, специфичные для печени, слизистой желудка и почек. В больших количествах фермент находится лишь в печени, но небольшие его количества содержат почки. Следы фермента также обнаруживаются в сердечной и скелетной мускулатуре человека. В сыворотке крови здорового человека отсутствует. Активность АДГ ответственна за метаболическое превращение метанола и этиленгликоля в токсические соединения. Этот эффект тормозится введением этанола.



Алкогольдегидрогеназа

- Изоферментный спектр алкогольдегидрогеназы печени отражает патологические изменения в организме, что используется для диагностических целей. АДГ – семейство тесно связанных ферментов с выраженным полиморфизмом, что может влиять на скорость выведения этанола. Резкое повышение содержания фермента наблюдается при острых гепатитах (при этом его показатели приходят к норме раньше, чем показатели трансаминаз). При обтурационной желтухе, циррозах печени, инфаркте миокарда, мышечной дистрофии Эрба обычно не наблюдается повышения активности фермента в крови. Цианиды, йодоацетат тормозят действие энзима. Является специфическим для клеток печени. Появление его в сыворотке крови свидетельствует о повреждении клеток печени. Служит критерием выраженности гепатоцеллюлярного некроза и внутрипеченочного холестаза. АДГ рассматривается как высокочувствительный маркер аноксии печени с поражением центров долек.
- Изоформы алкогольдегидрогеназы имеют большое значение в дифференциальной диагностике заболеваний печени. Так, АДГ1 повышается при вирусных гепатитах, АДГ2 – при алкогольных гепатитах, активности АДГ3 так же, как и АДГ2, чаще увеличиваются при циррозе печени. Референтные пределы: $<2,8 \text{ МЕ/л} \cdot 0,017$ [$<0,05 \text{ мккат/л}$].



Альдолаза

- **Альдолаза** (фруктозобисфосфат-(фруктозодифосфат)-альдолаза; КФ 4.1.2.13) – фермент, относящийся к лиазам, катализирующий превращение фруктозо-1,6-дифосфата (бисфосфата) в дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат в процессе гликолиза. Фермент играет важнейшую роль в энергетическом обмене. Молекулярная масса фермента 147–180 кДа, состоит из двух полипептидных цепей. Альдолаза присутствует во всех тканях организма. Генетически обусловленная неполноценность альдолазы является причиной наследственной непереносимости фруктозы.
- В норме в сыворотке крови активность альдолазы составляет от 0,0038 до 0,02 (в среднем 0,012) мкмоль фруктозо-1,6-дифосфата, превращенного ферментом, содержащимся в 1 мл сыворотки крови, за 1 мин при 37 °С.
- Активность альдолазы в крови служит дополнительным диагностическим признаком ряда заболеваний. В ткани злокачественных опухолей фермент в несколько раз активнее, чем в неизмененных тканях, в эритроцитах активность фермента в 100 раз выше, чем в сыворотке крови, гемолиз существенно искажает результаты анализа. При ряде заболеваний (прогрессирующая мышечная дистрофия, инфаркт миокарда, активный ревматизм, рак, поражения печени и др.) активность альдолазы в крови повышается, причем тем значительнее, чем тяжелее протекает болезнь.
- В качестве унифицированного метода определения альдолазы принят метод Товарицкого–Валуйской, основанный на том, что продукты расщепления фруктозо-1,6-фосфата альдолазой при реакции с 2,4-динитрофенилгидразином образуют гидразоны, окрашенные в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.



Альфа-амилаза

Альфа-амилаза (1,4-а-D-глюкан глюканогидролаза; КФ 3.2.1.1) относится к группе гидролаз, катализирующих гидролиз полисахаридов до моно- и дисахаридов (мальтоза, глюкоза), разрушая связи между 1 и 4 атомами углерода



Альфа-амилаза

Плазма крови человека содержит альфа-амилазы двух изозимных типов:

- панкреатическую (Р-тип), вырабатываемую поджелудочной железой (40%)
- слюнную (S-тип), продуцируемую слюнными железами (60%)

Уровень активности альфа-амилазы в норме:

- в сыворотке 25–220 МЕ/л;
- в моче 10–490 МЕ/л



Альфа-амилаза

- Оба изофермента амилазы имеют молекулярную массу около 45 кДа, поэтому фильтруются в почках и экскретируются с мочой. 65 % амилазной активности мочи обусловлено панкреатической амилазой.
- Активность α -амилазы в течение дня и от одного дня к другому подвергается значительным изменениям. Поэтому для наблюдения за динамикой изменения активности фермента необходим забор крови для анализа в одно и то же время суток. Существуют индивидуальные различия этих показателей у обследуемых без патологии органов пищеварения.



Альфа-амилаза

- **Выявление гиперамилаземи и гиперамилазурии является важным, но не специфическим тестом для острого панкреатита; кроме того, повышение ее активности может быть кратковременным. Для повышения информативности полученных результатов исследования полезно определение активности амилазы крови и мочи сочетать с параллельным определением концентрации креатинина в моче и сыворотке крови. На основании этих данных рассчитывают индекс амилазо-креатининового клиренса по формуле**



Альфа-амилаза

- $\frac{AM \cdot KPC \cdot 100}{KPM \cdot AC}$

- где:

- AM – амилаза мочи

- AC – амилаза сыворотки

- KPM – креатинин в моче

- KPC – креатинин в сыворотке



Альфа-амилаза

- В норме амилазо-креатининовый индекс не выше 3
- Превышение считается признаком панкреатита, так как при панкреатите возрастает уровень истинно панкреатической амилазы, и ее клиренс осуществляется на 80 % быстрее клиренса амилазы слюны



Альфа-амилаза

- При заболеваниях, протекающих под маской панкреатита, содержание амилазы сыворотки может увеличиваться, но показатель амилазо-креатининового клиренса остается нормальным



Аминотрансферазы

- Аспартатаминотрансфераза
- (КФ 2.6.1.1. L-аспартат: 2-оксоглутарата-минотрансфераза, АСТ или АсАТ или более редкое название глутамат-оксалоацетаттрансаминаза (ГОТ)).
- Нормальные величины активности ферментов в сыворотке/плазме –
 - АсАТ: 10–30 МЕ/л



Аминотрансферазы

- Аланинаминотрансфераза
- (КФ 2.6.1.2. L-аланин: 2-оксоглутарата-минотрансфераза, АЛТ или АлАТ или более редкое название глутаматпируваттрансаминаза (ГТП)).
- Нормальные величины активности ферментов в сыворотке / плазме –
 - АлАТ: 7–40 МЕ/л



Аминотрансферазы

- Аминотрансферазы катализируют процессы трансаминирования.
- Они распределены по всем органам и тканям.
- Роль кофермента в трансаминазных реакциях играет пиридоксальфосфат (витамин В6).



Аминотрансферазы

- **АсАТ** имеет изоферменты, локализованные
 - в цитозоле,
 - в митохондриях,
- **АлАТ** – имеет изоферменты, локализованные
 - в цитозоле (преимущественно)
 - в митохондриях (незначительно)



Аминотрансферазы

- **АсАТ** в высоких концентрациях присутствует в клетках сердечной и скелетных мышц, печени, почках, поджелудочной железе и эритроцитах.
- **АлАТ** в высоких концентрациях присутствует в клетках печени и в меньшей степени в скелетных мышцах, почках и сердце.



Аминотрансферазы

- Поражение любого из этих органов и тканей может привести к существенному повышению трансаминаз в сыворотке крови



Аминотрансферазы

- Наиболее резкие изменения **АсАТ** наблюдаются при поражении сердечной мышцы.
-
- Например, при инфаркте миокарда активность АсАТ в сыворотке крови может повышаться в 4–5 раз. Между размерами очага инфаркта и активностью АсАТ в сыворотке имеется тесная корреляция: если в течение нескольких дней не происходит нормализация активности фермента, это свидетельствует о расширении зоны инфаркта.



Аминотрансферазы

- Снижение активности **АсАТ:**
- при недостаточности пиридоксина (витамина В6)
- при почечной недостаточности
- при беременности



Аминотрансферазы

- Повышение активности **АлАТ** наиболее часто отмечается при острых заболеваниях печени и желчных путей.



Аминотрансферазы

- Коэффициент де Ритис -
 - $\text{АсАТ/АлАТ} = 1,3 \pm 0,4$
- при заболеваниях печени – понижается
- при заболеваниях сердца – повышается



Гамма-глутамилтрансфераза

- Гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ; КФ 2.3.2.2)
- Катализирует перенос гамма-глутамилового остатка с гамма-глутамилового пептида на аминокислоту, другой пептид или иной субстрат. В организме человека фермент участвует в метаболизме глутатиона



Гамма-глутамилтрансфераза

- **Тест по определению активности ГГТ в последнее время приобретает все большее значение в диагностике заболеваний печени и гепато-билиарного тракта, т. к. отличается большей чувствительностью, чем применяемые с этой целью тесты на АлАТ, АсАТ и ЩФ.**



Гамма-глутамилтрансфераза

- Активность ГГТ в сыворотке крови повышается при любых патологиях печени и желчных путей.
- В зависимости от механизма повреждения печени степень увеличения активности ГГТ в сыворотке крови, заметно отличается, что позволяет успешно использовать этот маркер для дифференциальной диагностики заболеваний печени.



Гамма-глутамилтрансфераза

Существенное увеличение активности ГГТ наблюдается при холестазах, и лишь незначительное – при повреждении паренхимы печени (некрозе гепатоцитов).



Глутаматдегидрогеназа

- Глутаматдегидрогеназа (ГДГ; КФ 1.4.1.3) – фермент, катализирующий превращение глутамата в 2-оксоглутарат и аммиак.
-



Глутаматдегидрогеназа

- ГДГ в наибольшем количестве содержится в клетках печени.
- Фермент находится внутри митохондрий гепатоцитов, поэтому увеличение его активности отражает глубину цитолиза клеток – по степени ее повышения можно судить о тяжести патологического процесса.



Глутаматдегидрогеназа

- **Повышение активности ГДГ и ГГТ во многом сходно, но есть различия: высокая активность ГДГ наблюдается при острых повреждениях печени, а высокая ГГТ – при длительных патологических процессах в печени.**



Глутатионредуктаза

- Глутатионредуктаза (ГР; КФ 1.6.4.2) – НАДФ-зависимый фермент, катализирующий превращение окисленной формы глутатиона в восстановленную.



Глутатионредуктаза

- ГР присутствует практически во всех тканях, но наибольшее его содержание в почках, печени, сердце и эритроцитах.



Глутатионредуктаза

- **Повышение активности фермента наблюдается при гепатите, механической желтухе, сахарном диабете, при дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, серповидной и мегалобластной анемиях, после введения никотиновой кислоты, после физической нагрузки.**



Глутатионредуктаза

- Недостаток ГР отмечается при дефиците рибофлавина.



Глутатионпероксидаза

- Глутатионпероксидаза (ГП, КФ 1.11.1.9) – один из ключевых ферментов антиоксидантной системы организма, функцией которого является разрушение и инактивация пероксидов водорода и гидропероксидов (пероксидных радикалов) – токсичных соединений кислорода.



Глутатионпероксидаза

- Содержится практически во всех тканях. ГП клеток печени состоит из четырех субъединиц, каждая из которых содержит в активном центре атом селена.



Глутатионпероксидаза

- Пероксид водорода и активные радикалы образуются в результате пероксидного окисления липидов (ПОЛ), которые приводят к дестабилизации клеточных мембран и, в тяжелых случаях, к их разрушению. Активация ПОЛ наблюдается при различных заболеваниях: ишемия органов и тканей, сахарный диабет, атеросклероз и мн.др.



Глутатионпероксидаза

- **Определение ГП помогает оценить антиоксидантную способность организма при различных заболеваниях, а также у людей с повышенным риском селенового дефицита (в старческом возрасте, при плохом питании, курении, алкоголизме, стрессе, почечной недостаточности, химиотерапии и др.), рекомендовать назначение препаратов для антиоксидантной терапии и оценивать эффективность терапии.**



Глутатионпероксидаза

- Увеличение активности наблюдается при:
- дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы
- остром лимфоцитарном лейкозе
- талассемии



Глутатионпероксидаза

- Уменьшение активности ГП сопровождается:
- сердечно-сосудистые заболевания
- атеросклероз
- сахарный диабет
- аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит)
- процессы старения организма
- муковисцидоз
- шизофрению и маниакально-депрессивный психоз



Глутатионпероксидаза

- Уменьшение активности ГП значительно повышает риск возникновения раковых заболеваний



Глюкозо-6- фосфатдегидрогеназа

- Одним из основных поставщиков НАДФН для глутатионовой антиоксидантной системы является пентозофосфатный путь, ключевым ферментом которого является Г6ФДГ.



Глюкозо-6- фосфатдегидрогеназа

- **В большом количестве находится в эритроцитах и используется, в основном, для выявления на следственных заболеваний, связанных с дефицитом фермента – наиболее распространенной наследственной гемолитической анемии, обусловленной дефицитом активности Г6ФДГ эритроцитов.**



Изоцитратдегидрогеназа

- **Изоцитратдегидрогеназа (ИДГ; КФ 1.1.1.42) – фермент, имеющий 2 формы коферментной специфичности (НАД и НАДФ-зависимые) и катализирующий обратимое окисление изоцитрата до 2-оксоглутарата.**



Изоцитратдегидрогеназа

- НАДФ-зависимая форма присутствует во всех тканях, но наибольшая ее активность обнаружена в печени, скелетной мускулатуре, сердце.
- Повышение активности ИДГ является чувствительным показателем поражения паренхимы печени, тяжелом инфаркте легкого, миелолейкоза, мегалобластной анемии.



Каталаза

- Каталаза (КФ 1.11.1.6; H₂O₂: H₂O₂ – оксидоредуктаза) – фермент, катализирующий реакцию разложения пероксида водорода на воду и молекулярный кислород:
 - $2 \text{H}_2\text{O}_2 = \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$



Каталаза

- В клетках каталаза локализуется в пероксисомах.
- Биологическая роль каталазы заключается в деградации пероксида водорода, образующегося в клетках в результате действия ряда флавопротеиновых оксидаз и обеспечении эффективной защиты клеточных структур от разрушения под действием пероксида водорода.



Каталаза

- Каталазный индекс (отношение величины каталазной активности определенного объема крови к количеству эритроцитов в этом объеме), увеличивается при злокачественной и других макроцитарных анемиях



Каталаза

- Уменьшение активности каталазы отмечается при злокачественных новообразованиях в печени и почках, причем существует зависимость между величиной опухоли, скоростью ее роста и степенью уменьшения активности каталазы.



Креатинкиназа

- Креатинкиназа или креатинфосфокиназа (КК; КФ 2.7.3.2.) катализирует обратимую реакцию фосфорилирования креатинина с участием АТФ в результате чего образуются креатинфосфат и АДФ.



Креатинкиназа

- Фермент существует в виде трех изоферментов:
- КК-ВВ (КК-1) – мозговой,
- КК-МВ (КК-2) – сердечный
- КК-ММ (КК-3) – мышечный



Креатинкиназа

- Увеличение **общей КК**:
- травмы,
- операции,
- инфаркт миокарда,
- уменьшение кровоснабжения мышц,
- миопатии,
- дерматомиозит,
- мышечные дистрофии,
- миокардиты,
- отравления, сопровождающиеся комой,
- инфекционные болезни (например, брюшной тиф).



Креатинкиназа

- **КК-ММ** увеличивается в сыворотке при тех же состояниях, как и общая КК.



Креатинкиназа

- **КК-МВ**
 - увеличивается более чем в 1,5 раза при:
 - инфаркте миокарда
 - незначительно увеличивается при:
 - миокардитах
 - стенокардии
 - затяжной аритмии
 - шоке
 - тяжелых отравлениях



Креатинкиназа

- **КК-ВВ**

- незначительно повышается при:
 - некоторых формах рака
 - травме сердечной мышцы
 - заболеваниях соединительной ткани
 - у новорожденных при родовой травме мозга
-
- увеличиваться в 6 раз при:
 - родах (источником являются матка и плацента)



Лактатдегидрогеназа

- Лактатдегидрогеназа (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) катализирует обратимое восстановление пирувата до лактата, в качестве кофермента используется НАДН



Лактатдегидрогеназа

- ЛДГ имеет молекулярную массу около 134 кДа.
- ЛДГ тетрамер, состоящий из двух субъединиц – М (*muscle* – мышечная) и Н (*heart* – сердечная).
- В сыворотке присутствуют 5 изоферментов, различающиеся составом субъединиц.



Лактатдегидрогеназа

- ЛДГ - это цитозольный фермент, присутствует во всех клетках организма.
- В печени, сердце, почках, скелетной мышце и эритроцитах активность ЛДГ более чем в 500 раз выше, чем в сыворотке .



Изоферменты Лактатдегидрогеназы

Вид	Состав	Содержание в сыворотке
ЛДГ-1	H4	15–30 %
ЛДГ-2	H3M	22–50 %
ЛДГ-3	H2M2	15–30 %;
ЛДГ-4	H1M3	0–15 %
ЛДГ-5	M4	0–15 %



Лактатдегидрогеназа

Повышается при остром повреждении:

- сердца
- эритроцитов
- почек
- скелетных мышц
- печени
- легких
- кожи



Лактатдегидрогеназа

- **Общая активность ЛДГ в сыворотке крови не является специфическим тестом для определенной патологии. Поэтому необходимо разделять изоферменты ЛДГ и, затем, оценивать вклад каждого в общую активность, т.к. они органоспецифичны**



Лактатдегидрогеназа

- Однократное исследование ЛДГ-1 обладает клинической специфичностью в отношении инфаркта миокарда в 66 % случаев, а определение ее в динамике (через каждые 4–6 часов в течение суток) – в 86 %



Лактатдегидрогеназа

- Однократное исследование **ЛДГ1** обладает клинической специфичностью в отношении инфаркта миокарда в 66 % случаев, а определение ее в динамике (через каждые 4–6 часов в течение суток) – в 86 %



Лактатдегидрогеназа

- Повышение **ЛДГ1** отмечается также при опухолях репродуктивных органов: тератома, семинома яичка, дисгерминома яичника



Лактатдегидрогеназа

- **ЛДГ2, ЛДГ3 и ЛДГ4** обладают промежуточными свойствами. Активность этих изоферментов повышается при массивном разрушении тромбоцитов (эмболия легочной артерии, массивные гемотрансфузии) и вовлечении в патологический процесс лимфатической системы.



Лактатдегидрогеназа

- При нелимфоцитарных лейкозах увеличивается активность **ЛДГЗ** и **ЛДГ4**
- Увеличение **ЛДГЗ** иногда наблюдается при острых панкреатитах



Лактатдегидрогеназа

- Активность **ЛДГ4** возрастает при:
- поражении печени
- в активную фазу ревматизма
- кардиосклерозе с нарушением гемодинамики
- остром нефрите
- поражениях почек
- опухолях печени, предстательной железы, шейки матки, молочной железы, кишечника
- тяжелых формах диабета



Лактатдегидрогеназа

- **ЛДГ 5**

- Наибольшее содержание этого изофермента характерно для скелетных мышц, печени, кожи, слизистых оболочек, а также клеток некоторых злокачественных опухолей.
-
- Значительное увеличение отмечается при:
 - травмах, воспалительных и дегенеративных заболеваниях мышц
 - многих болезнях печени (гепатиты, циррозы и др.).
 - онкологических заболеваниях (например лимфолейкозы)
 - активная фаза ревматизма
 - глубоких поражениях почек, сопровождающихся их гипоксией, опухолях почек и отторжении пересаженной почки
 - при тяжелых формах диабета



Липаза

- Липаза (КФ 3.1.1.3) – фермент, катализирующий расщепление триглицеридов на глицерин и высшие жирные кислоты



Липаза

- Различают липазу :
- желудочного происхождения,
- поджелудочной железы,
- легких,
- кишечного сока,
- лейкоцитов и др.



Липаза

- **Определение активности липазы в крови является наиболее информативным критерием диагностики острого панкреатита.**
- **Содержание липазы увеличивается и снижается параллельно повышению и снижению активности амилазы, но нормализация ее уровня происходит позже нормализации амилазы**



Липаза

- Одновременное определение уровня альфа-амилазы (кровь и моча) и липазы – основа диагностики острого панкреатита. Повышение обоих или одного из ферментов выявляется у 98 % больных с острым панкреатитом.



5-Нуклеотидаза

- 5-Нуклеотидаза (5'-рибонуклеотид – фосфогидролаза; КФ 3.1.3.5) катализирует гидролиз только нуклеотид-5-фосфатов.
- Фермент распространен во многих тканях организма (печень, мозг, мышцы, почки, легкие, щитовидная железа, аорта).



5-Нуклеотидаза

- **Возрастание активности 5-нуклеотидазы происходит параллельно активности щелочной фосфатазы при холестазах любой локализации, но данный фермент более чувствителен по отношению к первичному и вторичному билиарному циррозу, а также к хроническому активному гепатиту.**



5-Нуклеотидаза

- Главное отличие 5-нуклеотидазы от щелочной фосфатазы: отсутствие реакции на костные заболевания. Считается, что 5-нуклеотидаза является специфической «желчной» фосфатазой.



Сорбитолдегидрогеназа

- Сорбитолдегидрогеназа (полиолдегидрогеназа, L-идитол, НАД+5-оксидоредуктаза, СДГ, КФ 1.1.1.14) катализирует реакцию окисления сорбитола до фруктозы, при этом происходит восстановление НАД



Сорбитолдегидрогеназа

- СДГ содержится преимущественно в цитоплазме гепатоцитов, поэтому повышение активности фермента специфично отражает поражение печени.



Супероксиддисмутаза

- **Супероксиддисмутаза (супероксид оксидоредуктаза, СОД, КФ 1.15.1.1.) фермент (металлопротеин), катализирующий реакцию превращения двух супероксидных радикалов друг с другом, превращая их в менее токсичный пероксид водорода и кислород .**



Супероксиддисмутаза

- При инфаркте миокарда СОД защищает сердечную мышцу от действия свободных радикалов, образующихся при ишемии, при этом в сыворотке крови при инфаркте миокарда регистрируется высокая активность фермента.



Супероксиддисмутаза

- **Степень повышения СОД обратно пропорциональна деятельности левого желудочка, что используется как маркер для оценки повреждения миокарда и при мышечной дистрофии.**



Супероксиддисмутаза

- Значительное увеличение активности СОД возможно при:
- ишемии органов
- нефропатии
- заболеваниях, сопровождающихся воспалением (ревматоидный артрит)
- сепсисе



Фосфатазы



- Ферменты, катализирующие разрыв сложноэфирной связи в моноэфирах фосфорной кислоты с образованием свободного ортофосфата (аниона ортофосфорной кислоты); относятся к классу гидролаз.



Щелочная фосфатаза

- Оптимум pH щелочной фосфатазы лежит в щелочной среде (pH 8,6–10,1).
- Фермент расположен на клеточной мембране и принимает участие в транспорте фосфора.



Щелочная фосфатаза

- В сыворотке несколько изоферментов ЩФ, **семь** из которых имеют наибольшее клинико-диагностическое значение.
- Для диагностических целей чаще всего проводят определение активности костной и печеночной форм фосфатазы



Щелочная фосфатаза

- 1. Костная ЩФ

- В кости ЩФ секретируется остеобластами, ее роль в формировании кости до конца не установлена. Предполагают, что она участвует в созревании матрикса и его минерализации.



Щелочная фосфатаза

● 1. Костная ЩФ

- Значительное увеличение ее активности в сыворотке крови наблюдается при повышенной деятельности остеобластов:
- рост костей (у детей активность выше, чем у взрослых; увеличивается эта активность в последний триместр беременности),
- возобновлении движений после длительного постельного режима,
- переломах, деформирующем остите,
- рахите.



Щелочная фосфатаза

● 2. Печеночная ЩФ

Представлена двумя изоферментами.

- 1 - основной фермент при патологии гепатобилиарного тракта
- 2 - основной фермент при гепатоцеллюлярной патологии



Щелочная фосфатаза

- **3. ЩФ желчи** - фермент холестаза
- Фермент высвобождается из поврежденных желчных протоков при:
- недостаточности выделения желчи, обусловленным нарушением ее выработки печеночными клетками (внутрипеченочный холестаз);
- прекращении тока желчи по желчным протокам (внепеченочный холестаз)



Щелочная фосфатаза

● 4. Кишечная ЩФ

- Синтезируется энтероцитами, поступает в просвет тонкого кишечника и частично всасывается в кровь. Вклад ее в общую активность ЩФ невелик. Ее активность может быть увеличена у лиц с I или III группой крови, особенно после приема пищи, при заболеваниях кишечника, сопровождающихся диареей.



Щелочная фосфатаза

• 5. Почечная ЩФ

- Частично всасывается в кровь, но в основном, экскретируется с мочой. Тест используется в диагностике заболеваний почек (гломерулонефрит, пиелонефрит, нефропатии).



Щелочная фосфатаза

• 6. Плацентарная ЩФ

- Появляется в сыворотке крови при беременности. Самое большое ее содержание отмечается в третьем триместре. Очень высокие цифры активности ЩФ наблюдаются у женщин с преэклампсией, что является следствием повреждения плаценты. Низкая активность ЩФ у беременных говорит о недостаточности развития плаценты



Щелочная фосфатаза

- **7. Неидентифицированные изоферменты ЩФ**

- **изоферменты Regan или Nagao
опухолевого происхождения**
- **наиболее часто определяются при раке
легкого**



Кислая фосфатаза

- Фосфатаза кислая (КФ, КФ 3.1.3.2) – фермент с широкой субстратной специфичностью, катализирующий расщепление сложноэфирных связей с образованием свободного ортофосфата, по спектру активности близкий к щелочной фосфатазе, от которой отличается иным действием на серосодержащие эфиры, оптимумом рН (4,7–6,0; у ЩФ – 8,4–9,4)



Кислая фосфатаза

- Под наименованием «кислая фосфатаза» подразумевают все фосфатазы, проявляющие оптимальную активность при $\text{pH} < 7,0$.
- Это ферменты, которые находятся в клетках различных тканей в лизосомах и вне их. Самая высокая концентрация кислой фосфатазы отмечается в предстательной железе (простатический изофермент)



Кислая фосфатаза

- Активность кислой фосфатазы сыворотки крови низкая в нормальных условиях.
- У мужчин примерно наполовину состоит из активности простатической фосфатазы, остальная активность связана с ферментом, происходящим из печени и разрушенных тромбоцитов и эритроцитов.
- У женщин кислая фосфатаза сыворотки происходит преимущественно из печени, эритроцитов и тромбоцитов.



Кислая фосфатаза

- **Определение кислой фосфатазы в сыворотке обычно используют для выявления или мониторинга рака простаты у мужчин**



Тартрат-резистентная кислая фосфатаза (TRACP 5B)

- TRACP5B – фермент, секретируемый исключительно остеокластами и попадающий в повышенном количестве в кровоток при увеличении количества и возрастании активности остеокластов.
- Определение уровня тартрат-резистентной кислой фосфатазы 5b может быть использовано в качестве маркера метастатического поражения скелета.

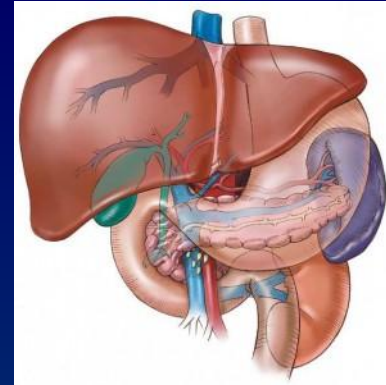


Холинэстераза

- В тканях человека обнаружены два различных фермента этого типа:
- *ацетилхолинэстераза* («истинная» холинэстераза; КФ 3.1.1.7), которая преимущественно находится в нервной ткани, скелетных мышцах и в низкой концентрации в эритроцитах;
- *сывороточная* или *псевдохолинэстераза*, которая широко распространена, присутствует в печени, поджелудочной железе, секретируется печенью в кровь. *Сывороточная холинэстераза* является ферментом, катализирующим реакцию гидролиза ацетилхолина



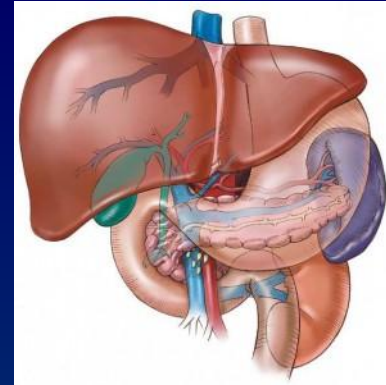
Холинэстераза



- **Определение активности холинэстеразы в сыворотке представляет наибольший клинический интерес как показатель состояния белково-синтезирующей функции печени**



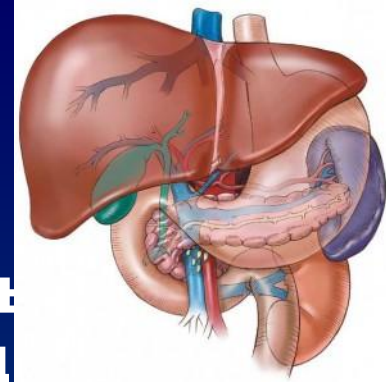
Холинэстераза



- **Снижение активности холинэстеразы наблюдается при тяжелых хронических заболеваниях печени.**



Холинэстераза



- **Повышение активности холинэстеразы наблюдается при нефротическом синдроме (усиление синтеза альбуминов печенью из-за быстрой потери мелкодисперсной фракции белков с мочой)**
- **Повышение холинэстеразы может наблюдаться при:**
 - ожирении
 - экссудативной энтеропатии.
 - артериальной гипертонии,
 - сахарном диабете,
 - столбняке,
 - маниакально-депрессивном психозе, депрессивных неврозах, тревоге



Эластаза



- **Эластаза-1 (панкреатическая) является протеолитическим ферментом, синтезируется в ацинарных клетках поджелудочной железы и экскретируется в просвет двенадцатиперстной кишки вместе с другими ферментами, в виде предшественника – проэластазы, которая активируется трипсином. Эластаза абсолютно специфична для поджелудочной железы и не определяется ни в каких других органах или тканях**



Эластаза



- Подобно другим панкреатическим ферментам (амилаза, липаза) показатель эластазы панкреатической начинает увеличиваться в крови в острый период панкреатита, что позволяет поставить диагноз этого заболевания.



Общие правила работы с ферментами

- 1. Нельзя сильно встряхивать растворы ферментов и допускать образование пены при их перемешивании, т. к. ферменты при этом могут инактивироваться в результате воздействия на них кислорода воздуха.**



Общие правила работы с ферментами

2. Растворенные, лиофильно высушенные реагенты, контрольные материалы и контрольные сыворотки, содержащие ферменты, перед использованием необходимо выдержать при комнатной температуре в течение времени, указанного в инструкции, чтобы фермент пришел в конформационно- активное состояние.



Общие правила работы с ферментами

- 3. Время начала и окончания ферментативной реакции следует фиксировать по секундомеру.**
- 4. Температура рабочего реагента должна быть такой, как указано в инструкции.**



Общие правила работы с ферментами

5. Не изменять соотношение рабочий реагент/сыворотка.
6. Нельзя разбавлять рабочий реагент.
7. Фотометрирование следует проводить в указанном в инструкции диапазоне.



Общие правила работы с ферментами

- 8. Длина оптического пути кюветы должна соответствовать инструкции.**
- 9. Калибровка для каждой серии обязательна.**
- 10. Тщательно мыть посуду, наконечники, пипетки...**



Общие правила работы с ферментами

- 11. Следить за качеством воды**
- 12. Использовать поверенные пипетки, особенно для микропроб.**
- 13. Учитывать, что гемолиз завышает содержание ферментов, а, хранение занижает.**



Общие правила работы с ферментами

14. Строго соблюдать условия хранения

15. Регулярно проверять правильность и воспроизводимость результатов анализов по контрольным сывороткам



Спектр ферментов, определяемых в ИДЦ

- » **Альфа амилаза (сыворотка и моча);**
- » **Амилаза панкреатическая;**
- » **Аспартатаминотрансфераза;**
- » **Аланинаминотрансфераза;**
- » **Фосфатаза щелочная ;**
- » **Лактатдегидрогеназа;**
- » **Гаммаглутамилтрансфераза ;**
- » **Липаза ;**
- » **Холинэстераза .**



Спасибо за внимание!

