

# ФЕРМЕНТЫ



# ФЕРМЕНТЫ –

*высокоэффективные  
биологические катализаторы,  
синтезируемые живыми  
клетками*

Впервые обнаружены в дрожжах

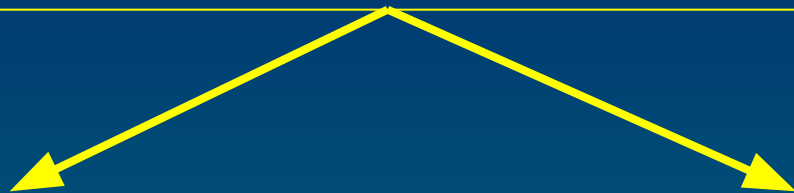
От греческого **«en zyme» - «в дрожжах»**



# 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 -

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

## 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,  $\text{CO}_2$ ,  
Химических групп: амина, ацильных  
и др.)



# **ФЕРМЕНТЫ – 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,  
 $\alpha$ -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	<b>Оксидоредуктазы</b>	Окислительно-восстановительные
2	<b>Трансферазы</b>	Перенос групп
3	<b>Гидролазы</b>	Гидролиз
4	<b>Лиазы</b>	Расщепление негидролитическим путем связей С-С, отщепление групп с образованием двойной связи, присоединение по двойной связи
5	<b>Изомеразы</b>	Изомерные превращения
6	<b>Лигазы</b>	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 тромбоэмболиях. 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,  $\alpha$ - и  $\beta$ -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)

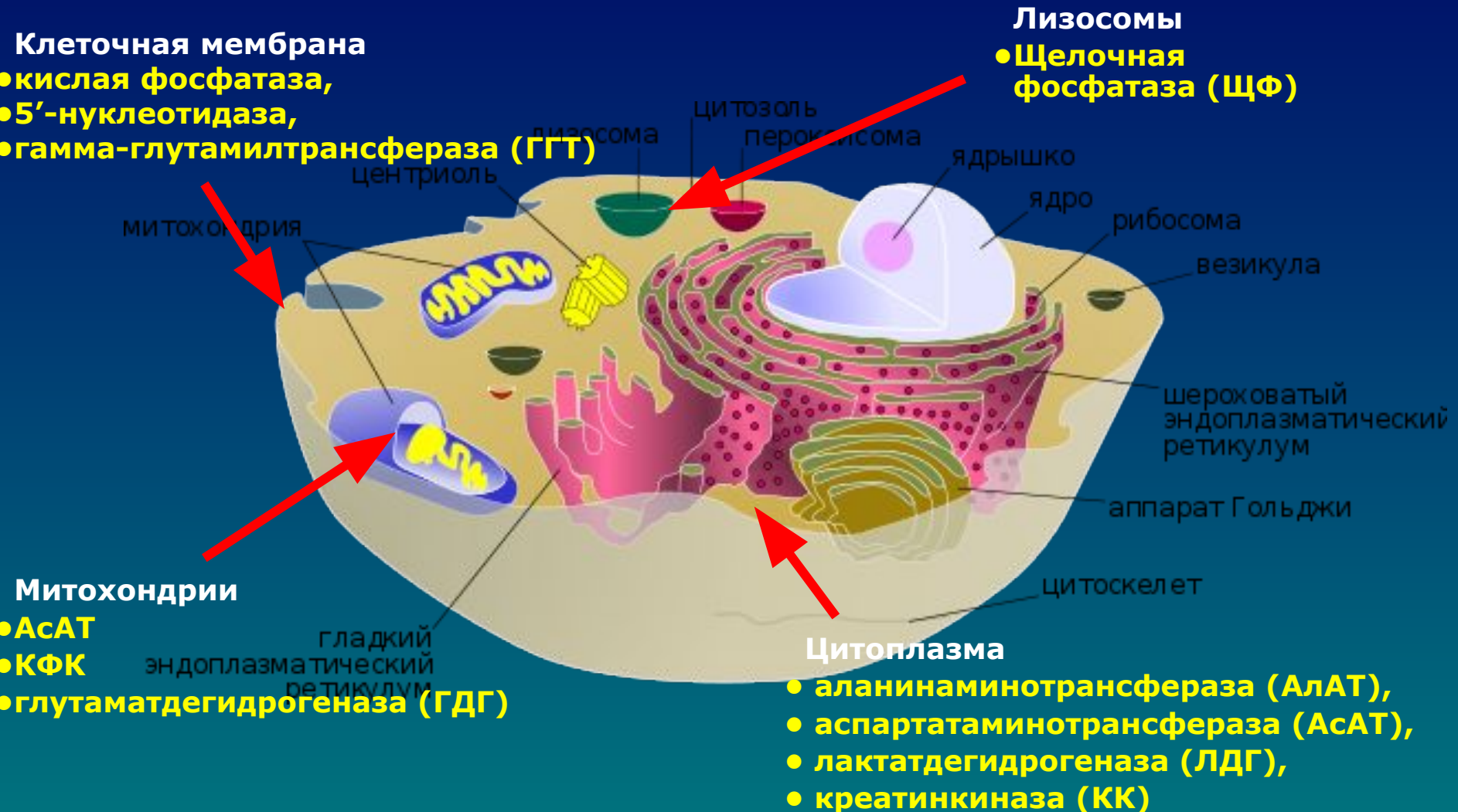


# Факторы, определяющие концентрацию фермента в крови при повреждении клеток

- 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:  $<2,8 \text{ ME/л} \cdot 0,017$  [ $<0,05 \text{ мккат/л}$ ].



# 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 Товарницкого–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- $\alpha$ -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 (P-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  $\alpha$ -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

- АМ · КРС · 100
- КРМ · АС
  
- где:
- АМ – амилаза мочи
- АС – амилаза сыворотки
- КРМ – креатинин в моче
- КРС – 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 -
  - **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 холестазае, 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, миелоблейкоза, мегалобластной анемии.**



# Каталаза

- Каталаза (КФ 1.11.1.6; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 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 **ЛДГ3** и **ЛДГ4**
- Увеличение **ЛДГ3** 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 рН щелочной фосфатазы лежит в щелочной среде (рН 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.

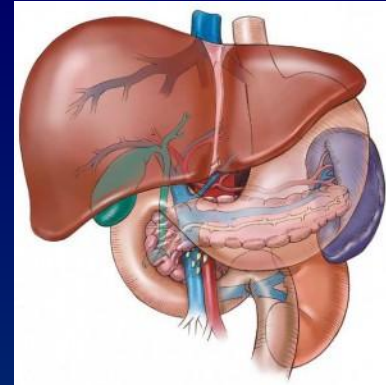


# Холинэстераза

- 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

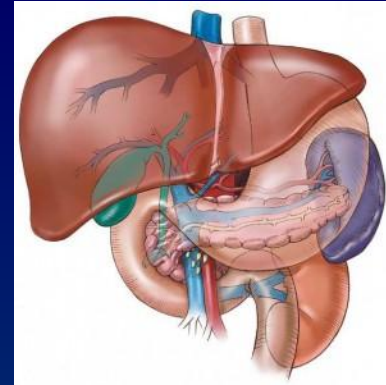


- **Определение активности холинэстеразы в сыворотке представляет наибольший клинический интерес как показатель состояния белково-синтезирующей функции печени**





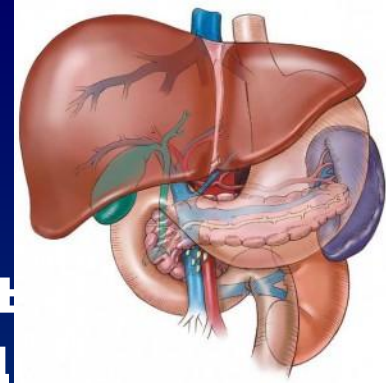
# Холинэстераза



- **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!**

