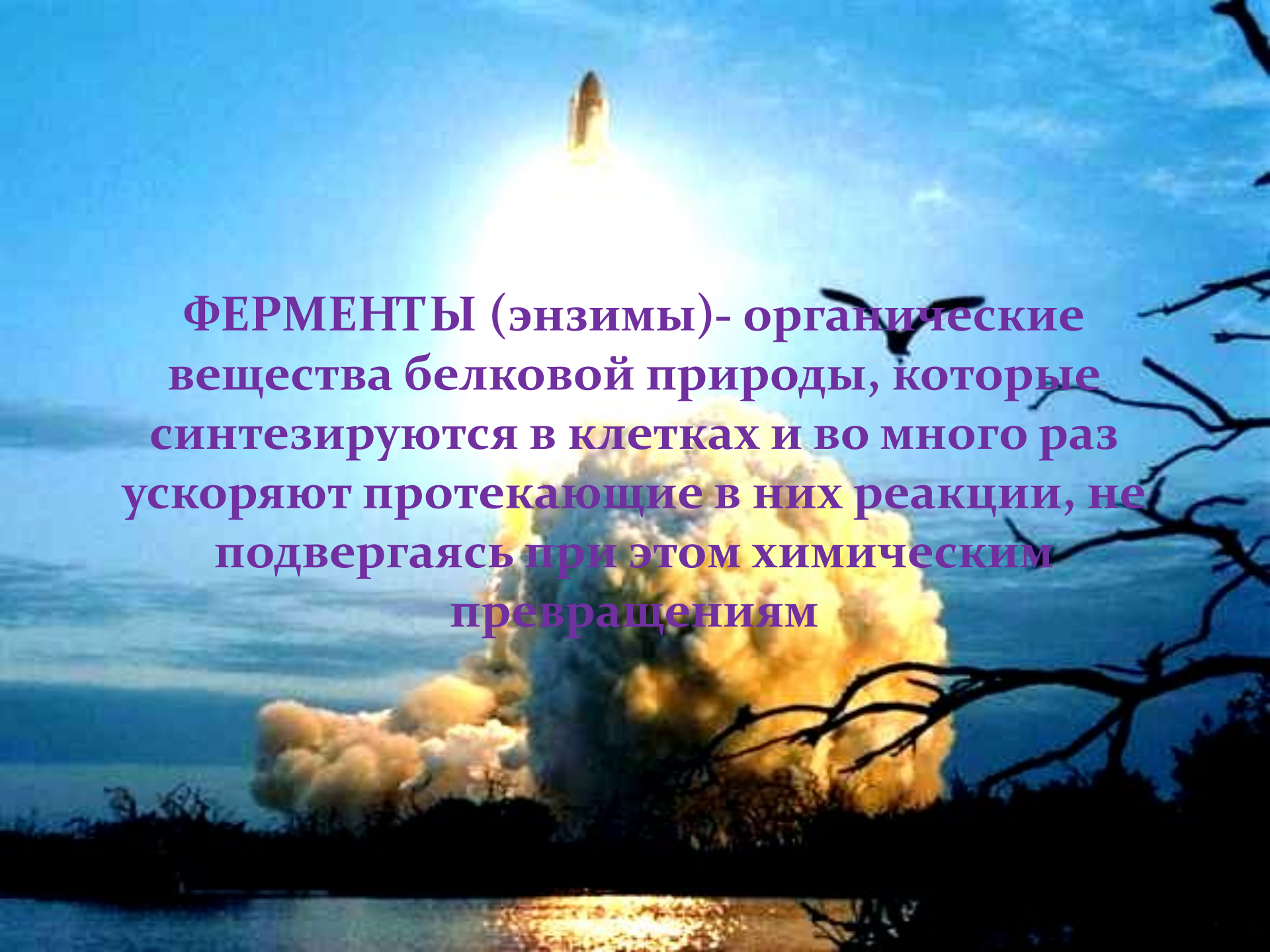


ЛЕКЦИЯ

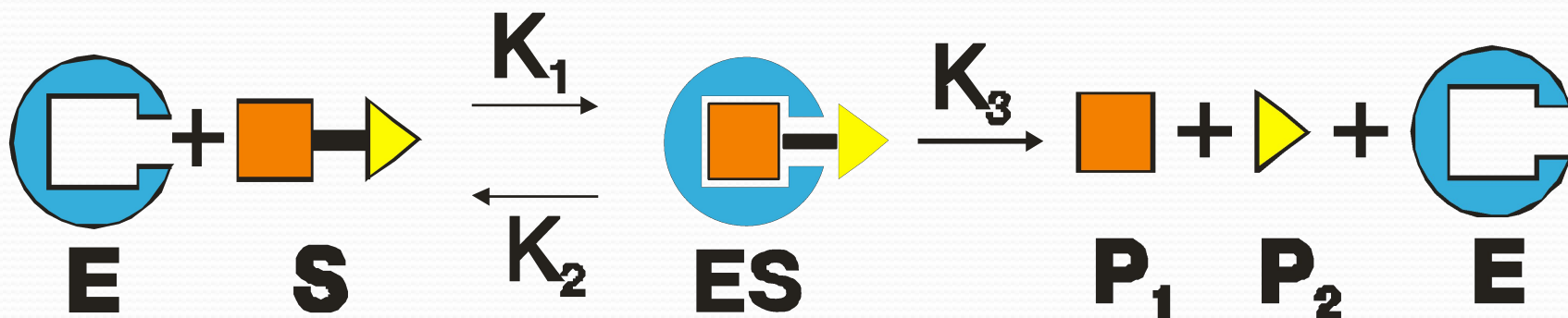
Лабораторная ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА

Д. м. н. Соловьев В.Г.

A photograph of a rocket launch at sunset or sunrise. The rocket is at the top center, emitting a large, bright plume of white and yellow smoke that fills the lower half of the frame. The sky is a deep blue, and the sun is low on the horizon, creating a warm glow. A single bird is in flight on the right side. The foreground shows dark silhouettes of trees and a body of water reflecting the light.

ФЕРМЕНТЫ (энзимы)- органические вещества белковой природы, которые синтезируются в клетках и во много раз ускоряют протекающие в них реакции, не подвергаясь при этом химическим превращениям

Схема ферментативной реакции



E – фермент;

S – субстрат;

ES – комплекс «фермент-субстрат»;

P₁, P₂ – продукты реакции;

K₁, K₂, K₃ – константы равновесия.

Свойства ферментов

1. Высокая биологическая активность

3. Высокая специфичность

2. Лабильность – способность к небольшим изменениям нативной конформации, ведущая к уменьшению каталитической активности

Типы специфичности ферментов

Стереохимическая - (L- аспартатдекарбоксилаза)

Абсолютная (субстратная) - (глюкокиназа)

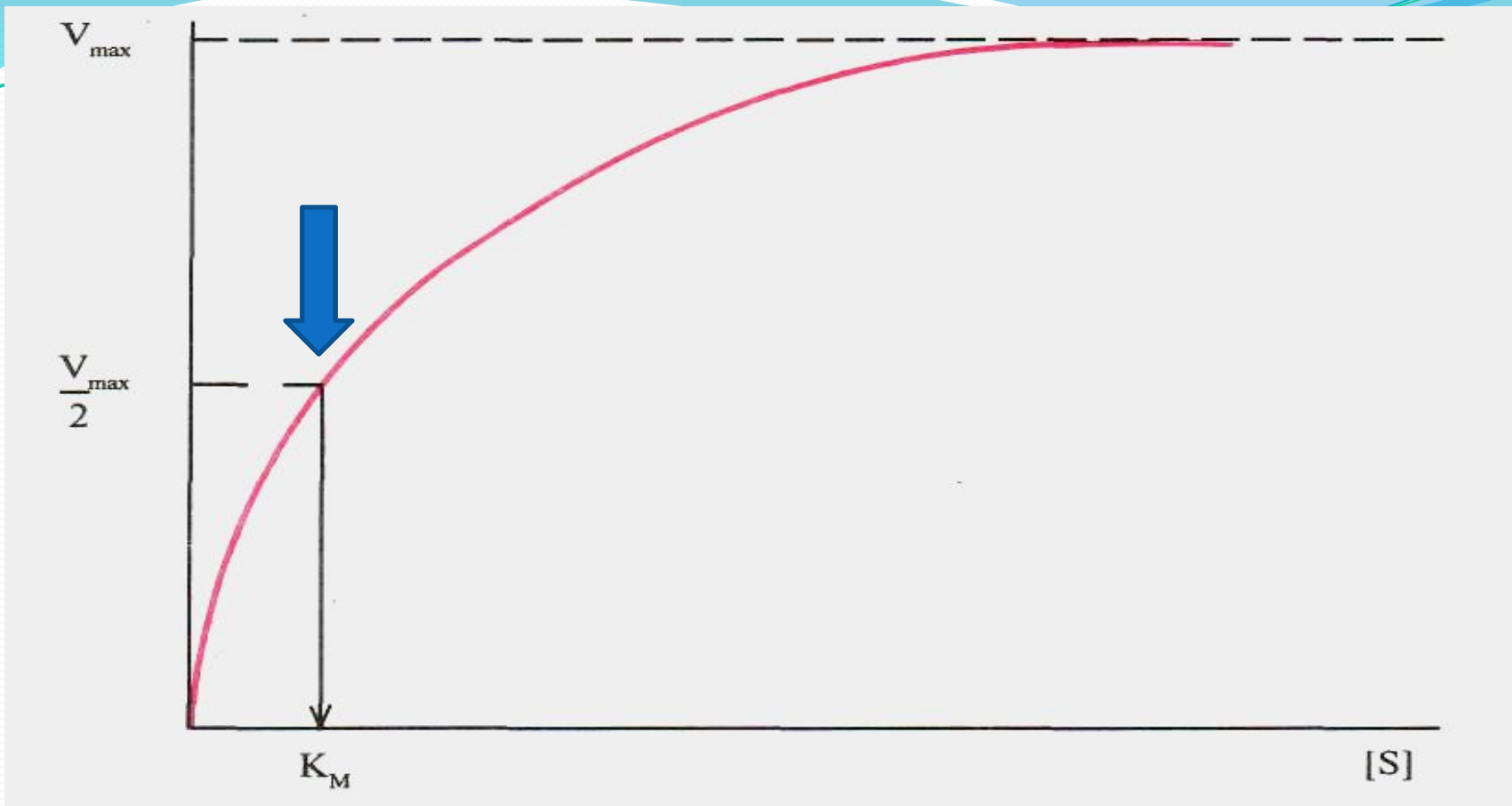
Относительная (групповая) - (трипсин, цитохром P₄₅₀)

Свойства ферментов

4) Зависимость ферментативной активности от физико-химических параметров среды

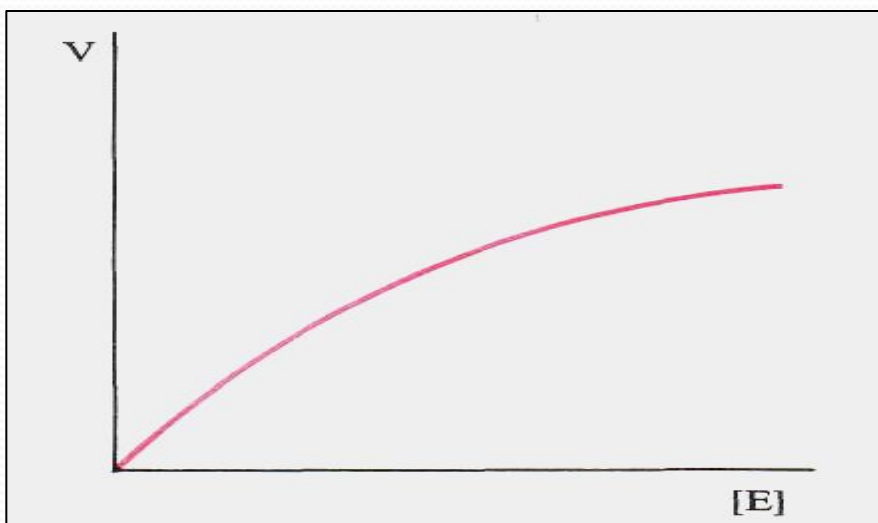
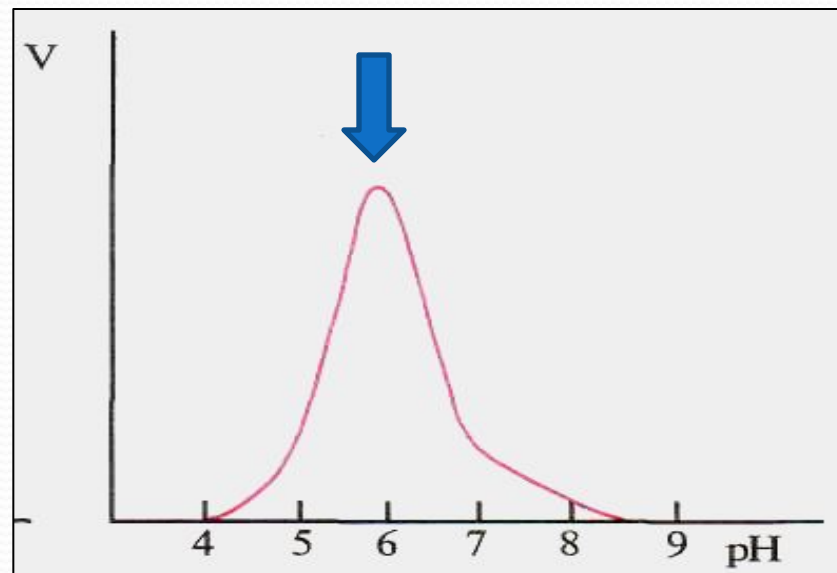
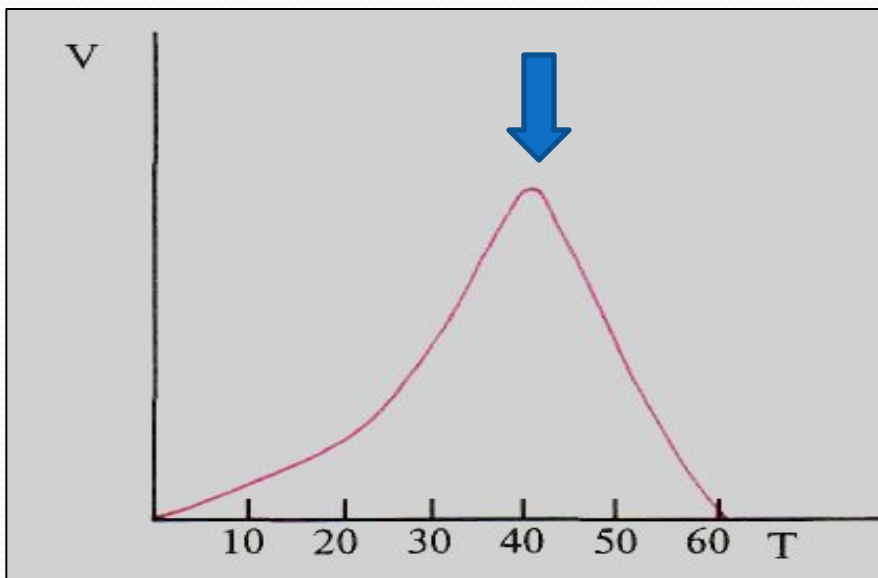
Основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции:

1. Концентрация субстрата;
2. Концентрация фермента;
3. pH среды;
4. Температура среды;
5. Активаторы и ингибиторы



Активность фермента численно равна скорости ферментативной реакции в оптимальных условиях на начальном линейном участке кинетической кривой при насыщающей концентрации субстрата

Зависимость от параметров среды



L. Michaelis
1875-1949



M. Menten
1879-1960

Номенклатура ферментов

Систематическое название

аспартат

амино

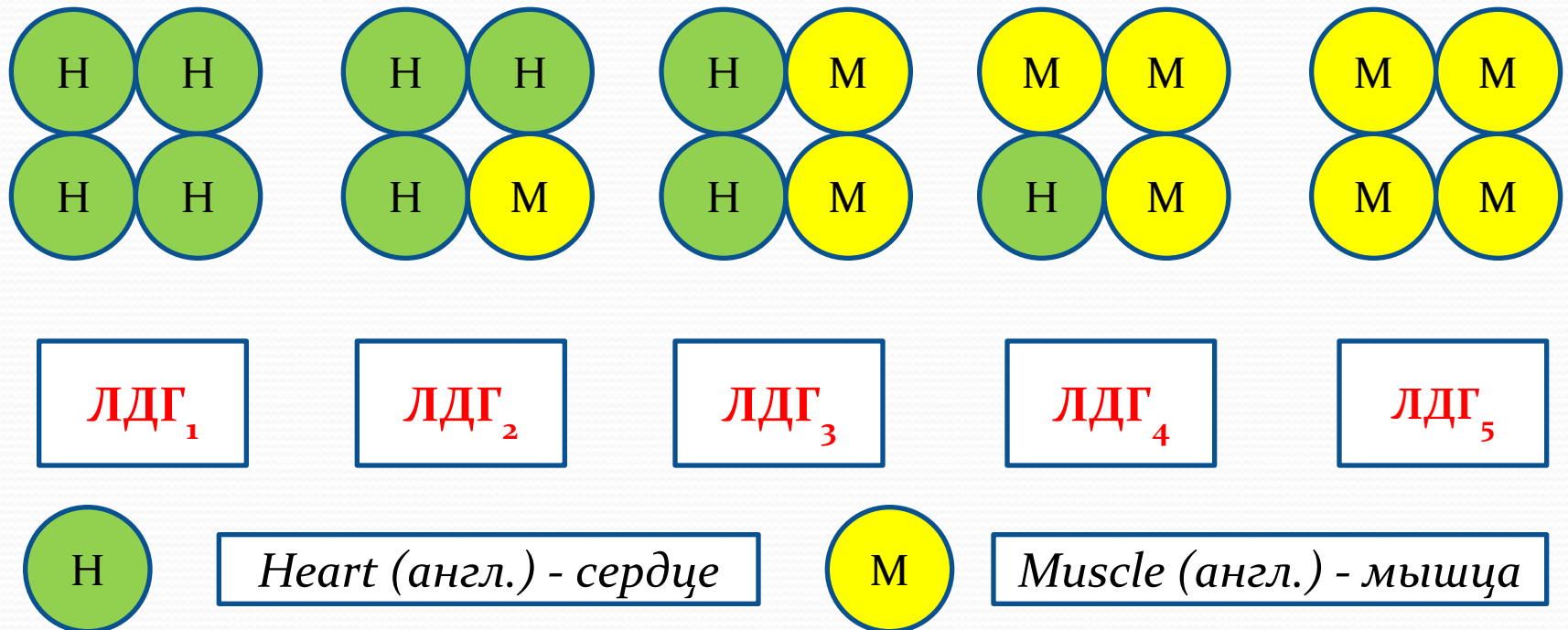
трансфер

аза

аспартатаминотрансфераза

Кодовое название (шифр)
1.1.1.38 - малатдегидрогеназа

Изоферменты – ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся по первичной структуре белка, кинетическим параметрам, условиям активации, особенностям связи апофермента и кофермента



Изоферменты лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

Скорость ферментативной реакции

Скорость реакции (V) – скорость, с которой *уменьшается концентрация субстрата или увеличивается концентрация продуктов реакции*

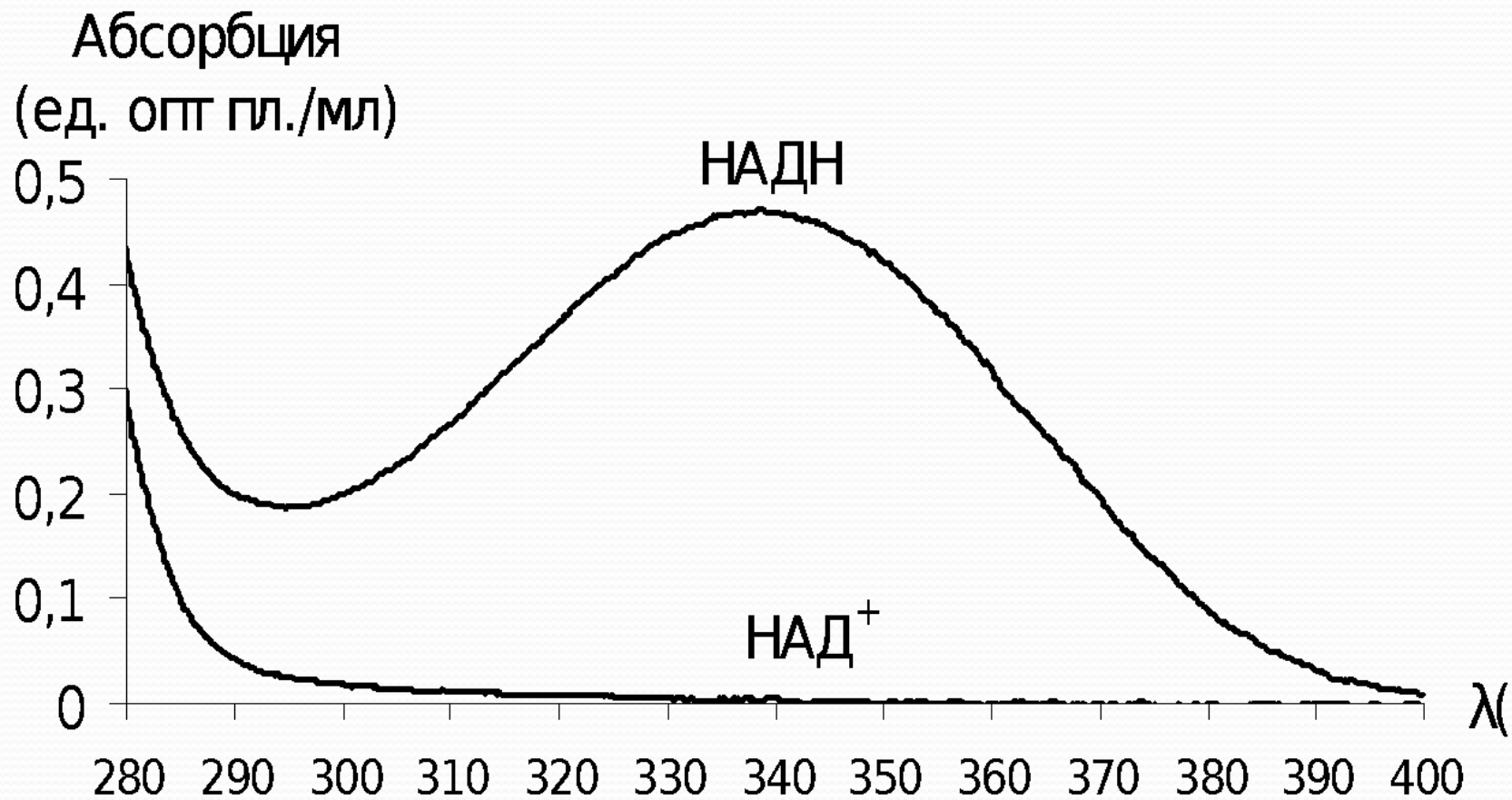
Скорость катализируемой ферментом реакции, а значит и **его активность** зависит от условий инкубации.

Так, повышение температуры всего на 1 °С приводит к увеличению скорости реакции на 2,5-20%, поэтому определение активности фермента проводят при фиксированных режимах (допустимо колебание $\pm 0,1^\circ\text{C}$).

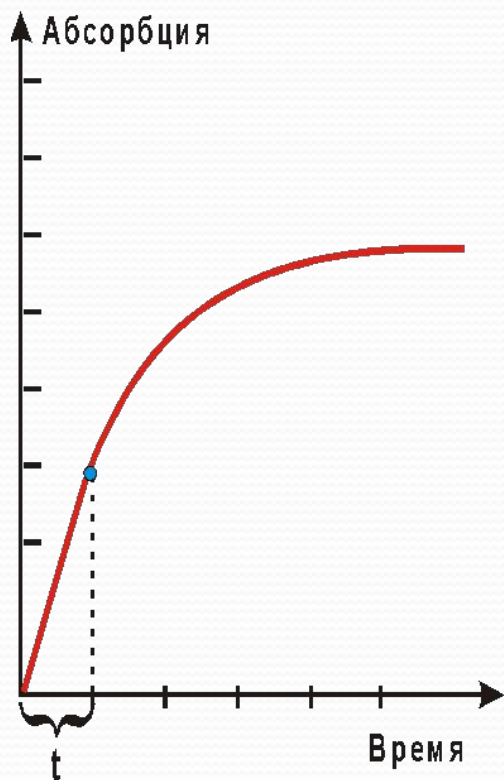
Концентрацию продукта реакции или субстратов можно определить следующими **способами**:

1. Прямое фотометрирование;
2. Окрашивание продукта или субстрата красителями;
3. Тест Варбурга

Спектр поглощения НАДН и НАД

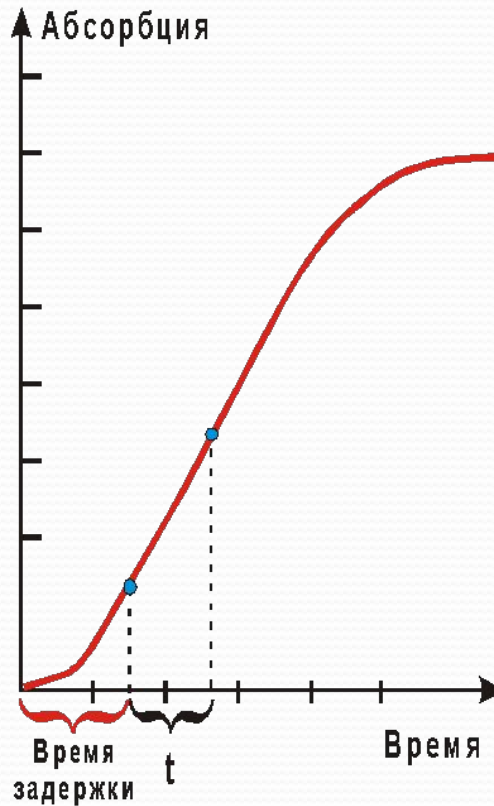


Способы измерения скорости реакции



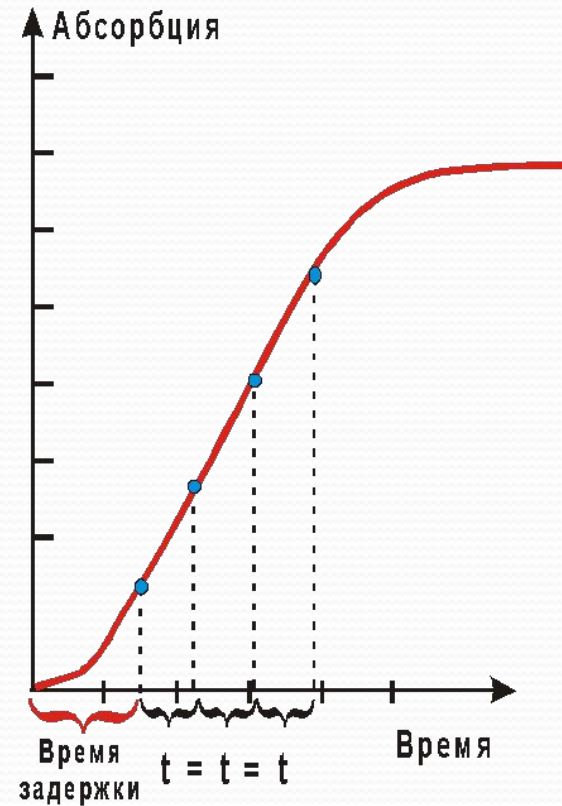
По “конечной точке”

$$\Delta A/\text{мин} = (A - A_{\text{хол}})/t$$



Двухточечное

$$\Delta A/\text{мин} = (A_2 - A_1)/t$$



Кинетическое

$$A/\text{мин} = \Delta A_{\text{ср}}/t$$

Расчет ферментативной активности

1. По калибратору
2. По калибровочной кривой
3. По коэффициенту экстинкции продукта или кофермента в восстановленной форме (НАДН, НАДФН)

Формула Бугера-Ламберта-Бера:

$$E = (\Delta A / \text{мин} \times V \times 1000) : (\epsilon \times l \times v), \text{ где}$$

E – активность фермента, Е/л; $\Delta A / \text{мин}$ – изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 мин, ед. опт. плотности/мин; V – объем реакционной смеси, мл; ϵ – миллимолярный коэффициент экстинкции, л/ммоль \times см; l – длина оптического пути, см; v – объем пробы (сыворотки), мл; 1000 – коэффициент пересчета активности в мкмоль/(мин Ч л).

Единицы измерения скорости реакции

Международная единица активности (U, ME, E, Ед) - это количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата или получение 1 мкмоль продукта в минуту в стандартных условиях.

Единица активности в системе СИ (катал) соответствует количеству фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата в секунду.

$$1 \text{ катал} = 6 \times 10^7 \text{ ME}$$
$$1 \text{ ME} = 16,67 \times 10^{-9} \text{ катал}$$

Основные правила в лабораторной энзимологии

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

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;

Основные правила в лабораторной энзимологии

3. Время начала и окончания ферментативной реакции **следует фиксировать по секундомеру**, причем в случае определения активности ферментов и кинетических методов определения аналитов для каждой отдельной пробы, а не для серии целиком, иначе результаты анализа будут неверны;

4. Перед началом ферментативной реакции температуру рабочего реагента необходимо **довести до значения, указанного в инструкции**, и обеспечить его поддержание в течение всего времени анализа с точностью $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$;

Основные правила в лабораторной энзимологии

5. Нельзя изменять соотношение «рабочий реагент/сыворотка». Его уменьшение в целях экономии может привести к получению заниженных результатов. При увеличении соотношения «рабочий реагент/сыворотка» снижается чувствительность метода;

6. Нельзя разбавлять рабочий реагент в целях экономии, так как при этом условия реакции (концентрация буфера, активаторов и т. д.) отклонятся от оптимальных, что приведет к занижению результатов;

Основные правила в лабораторной энзимологии

7. Если активность фермента или другого анализа в биологической жидкости превышает верхнюю границу линейности набора, то исследуемую **пробу необходимо разбавить строго в соответствии с рекомендациями**, изложенными в инструкции к набору (чем разбавлять и во сколько раз);

8. Фотометрирование следует **проводить в указанном в инструкции диапазоне длин волн**, отклонение может существенно снизить чувствительность метода. В случае расчета концентрации анализа или активности фермента по коэффициенту экстинкции длина волны должна точно соответствовать указанной в инструкции;

Основные правила в лабораторной энзимологии

9. Длина оптического пути кюветы для фотометрирования должна **соответствовать указанной в инструкции**. Использование кюветы с меньшей длиной пути снизит чувствительность метода;

10. При построении калибровочных кривых необходимо делать **не менее 4–5 параллельных определений** холостой пробы и каждого стандартного образца указанной в инструкции концентрации. Строить калибровочную кривую следует для каждой серии набора, а также при смене фотометрического оборудования.

Основные правила в лабораторной энзимологии

11. Калибровочную пробу, используемую для расчета концентрации аналита или активности фермента, необходимо ставить для каждой серии анализов в **четырёх параллелях**;

12. При работе с ферментативными наборами так же, как и при работе с другими наборами реагентов, желательно, а при отборе проб малых объемов (30–10 мкл) обязательно следует **пользоваться поверенными автоматическими микродозаторами**;

Основные правила в лабораторной энзимологии

13. Рекомендуется как можно **быстрее отделять сыворотку от сгустка**. Хранение сыворотки также неблагоприятно сказывается на результатах определения активности многих ферментов (они занижаются), поэтому следует измерять активность ферментов в сыворотке в день взятия крови у пациента;

15. Следует строго **соблюдать условия хранения ферментативных наборов и их компонентов**, указанные в инструкции, так как ферменты – термолабильные катализаторы. Хранение их при более высокой температуре может привести к быстрой инактивации. Некоторые ферменты в растворе при замораживании частично или полностью инактивируются.

Ферменты плазмы (сыворотки) крови

1. **Плазмоспецифические** (выполняют свою функцию в плазме крови): ферменты свертывающей, противосвертывающей, фибринолитической систем и др.

Диагностическое значение имеет **снижение активности**

О чем это свидетельствует?

А) О наличии **специфического патологического процесса** (например, гемофилия)

Б) О гипофункции органа, их синтезирующего (печень)

Ферменты плазмы (сыворотки) крови

2. **Органоспецифические:** синтезируются в клетках различных тканей, где и выполняют свои функции

Диагностическое значение имеет **повышение активности**

Это свидетельствует о **разрушении клеток**, синтезирующих данные ферменты:

Кардиомиоциты (АСТ, КФК, ЛДГ₁)

Гепатоциты (АЛТ, АСТ, ЛДГ₅)

Поджелудочная и слюнные железы (амилаза)

Желчные протоки (γ -ГТФ)

Простата (кислая фосфатаза)

Задание к зачету (заполнить таблицу)

Показатели	Референтные значения	Увеличение активности	Уменьшение активности
АСТ			
АЛТ			
α -амилаза			
КФК			
ЛДГ ₁			
ЛДГ ₅			
γ - ГТФ			
КФ			
ЩФ			