

Лекции: ЭНЗИМОЛОГИЯ

Дисциплина: биохимия (С2.Б.4)

Специальность: лечебное дело (31.05.01)

НГМУ, кафедра медицинской химии

Д.б.н., доцент Суменкова Дина Валерьевна

ЛЕКЦИЯ № 3

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Актуальность темы

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

План лекции

- Применение ферментов как реагентов в диагностике
- Применение ферментов в качестве лекарственных препаратов
- Исследование активности ферментов для диагностики заболеваний
- Энзимопатии

Цель лекции

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

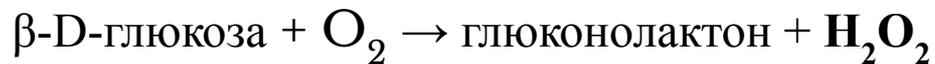


Ферменты как реагент



ПРИМЕРЫ:

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

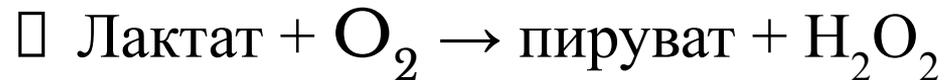


H_2O_2 в присутствии ионов меди окисляет фенолфталин до фенолфталеина (красный цвет при $\text{pH} > 7$, интенсивность окраски пропорциональна концентрации перекиси и глюкозы)



Ферменты как реагенты

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

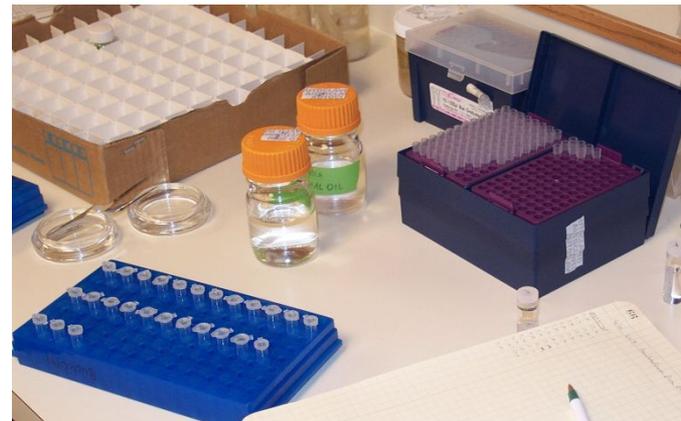


(интенсивность окраски пропорциональна содержанию лактата)



Ферменты как реагенты

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





Энзимотерапия



Применение ферментов (гидролазы)

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

ПРИМЕРЫ:

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

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



Энзимотерапия



- **Комплексная терапия** – применение ферментов в качестве дополнительного терапевтического средства

ПРИМЕРЫ:

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



Энзимотерапия

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



Энзимотерапия

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

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ИНЖЕНЕРНОЙ АКАДЕМИИ
«ПОЛИФЕРМ»

ПОВЯЗКА С ТРИПСИНОМ ПАМ-Т

Терапевтическая система пролонгированного действия для биокаталитического очищения инфицированных ран

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

стерильно! для местного применения **АТРАВМАТИЧНО!**

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



Энзимотерапия

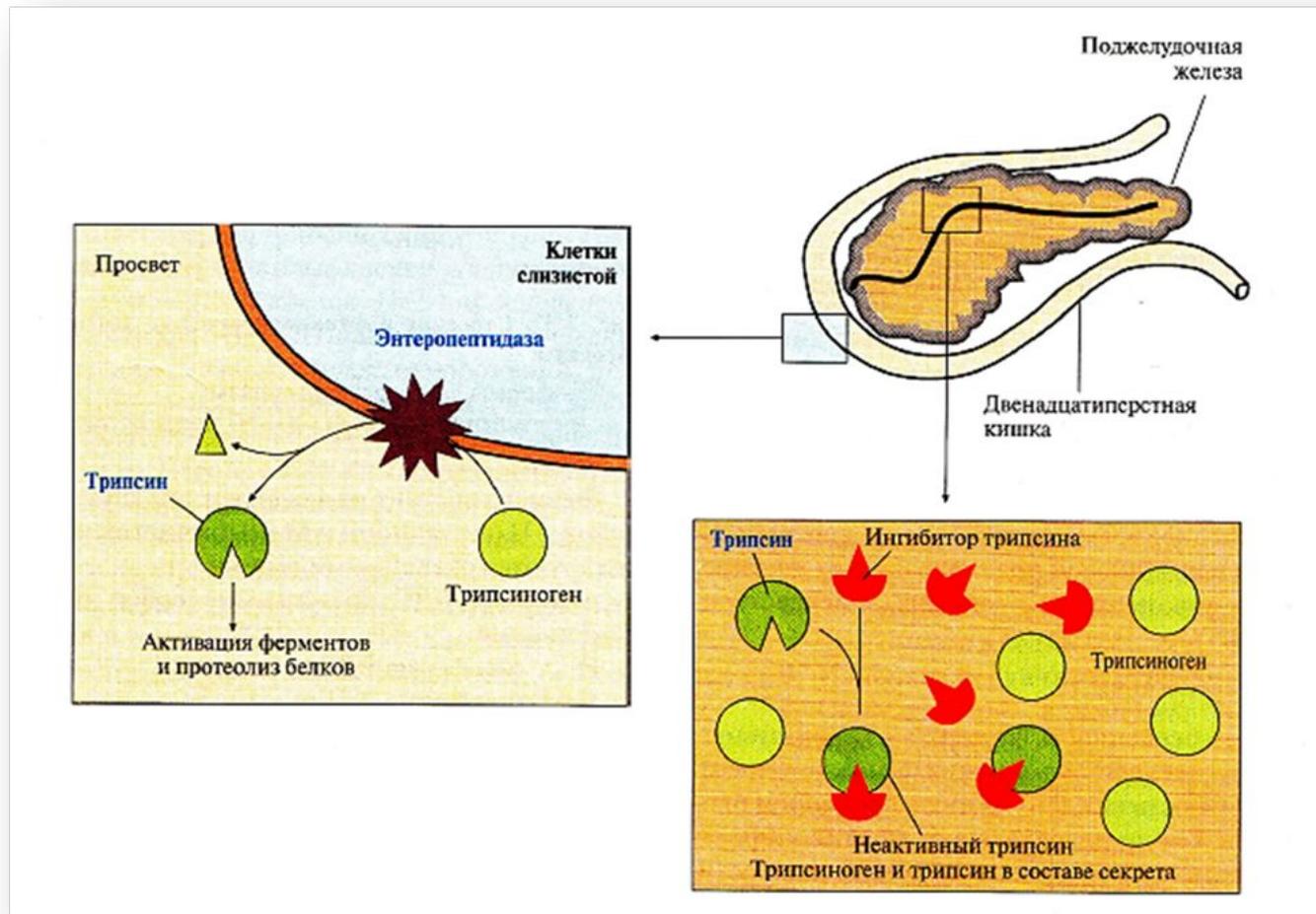
▣ **аспарагиназа, глутаминаза** – лечение лейкозов

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



Использование ингибиторов ферментов

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



Использование ингибиторов ферментов

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



Использование ингибиторов ферментов

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

Трудности энзимотерапии

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

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

Пути решения проблем

- ❑ Направленный транспорт ферментов
- ❑ Использование иммобилизованных ферментов

Иммобилизованные ферменты

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

Иммобилизованные ферменты: примеры

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



Энзимодиагностика

Постановка диагноза на основе определения активности ферментов в биологических жидкостях человека

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

СЕКРЕТОРНЫЕ
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ
ЭКСКРЕТОРНЫЕ

■ Секреторные (функциональные) ферменты

- синтезируются в печени
- «работают» в крови (субстрат фермента находится в крови)
- активность в крови выше, чем в ткани
- характеризуют белок-синтезирующую функцию печени

ПРИМЕРЫ:

- ✓ псевдохолинэстераза (ПХЭ)
- ✓ лецитин: холестерол ацилтрансфераза (ЛХАТ)
- ✓ проферменты свертывающей системы крови

▪ Внутриклеточные ферменты:

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

■ Экскреторные ферменты

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

ПРИМЕРЫ:

- ✓ **щелочная фосфатаза** (печень)
- ✓ **амилаза, липаза** (поджелудочная железа)
- ✓ **кислая фосфатаза** (простата)

«Требования» к ферментам энзимодиагностики

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

ПРИМЕРЫ:

- ✓ **панкреатическая липаза**
 - ✓ **печеночная глутаматпириформаттрансаминаза и аргиназа**
 - ✓ **ЛДГ1 и ЛДГ2 кардиомиоцитов**
 - ✓ **неспецифические ферменты АЛТ и АСТ** проявляют наибольшую активность в печени и сердце
-
- ❑ **Количество высвобождаемого в кровь фермента** должно быть пропорционально степени повреждения ткани и достаточно для определения его активности
 - ❑ **Активность ферментов стабильна** в течение достаточно длительного времени (сутки)

Изоферменты

- Множественные формы одного фермента, обусловленные различиями в структуре генов
 - катализируют одну и ту же реакцию

Различия изоформ

- ❖ физико-химические свойства (I структура, M.M., заряд)
- ❖ органоспецифичность
- ❖ субстратная специфичность
- ❖ кинетические характеристики: активность, сродство к субстрату
- ❖ способы регуляции, чувствительность к ингибиторам и активаторам

Пример изоферментов

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

Тип катализируемой реакции:
перенос фосфатной группы с АТФ на гексозы

Изоформы в диагностике

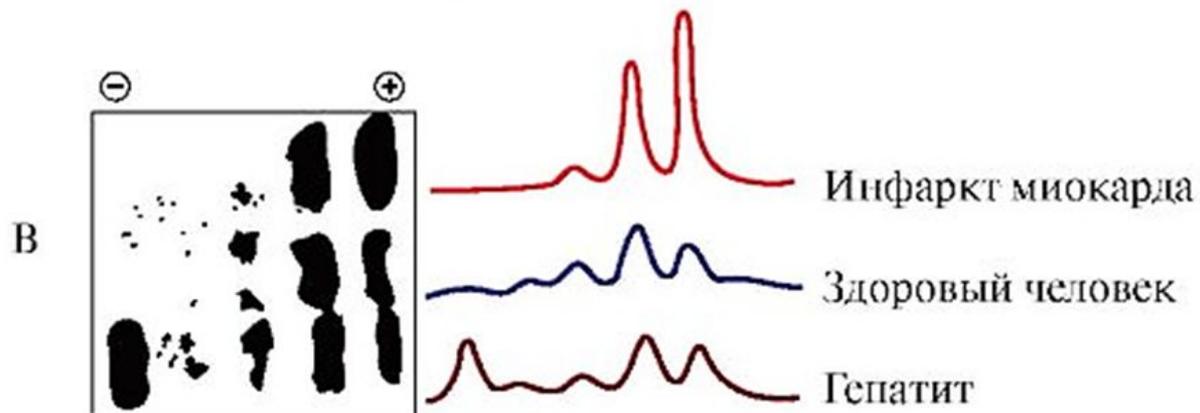
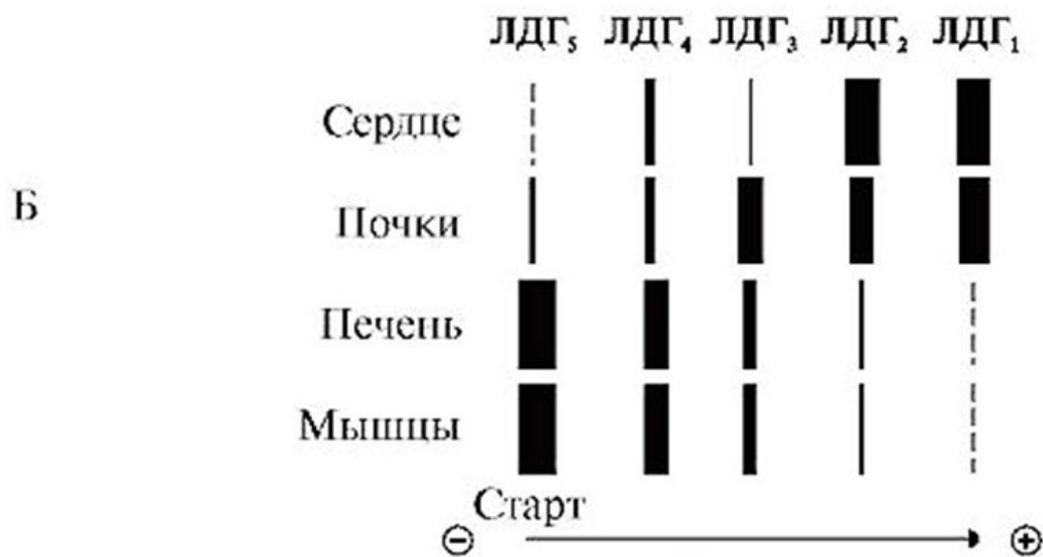
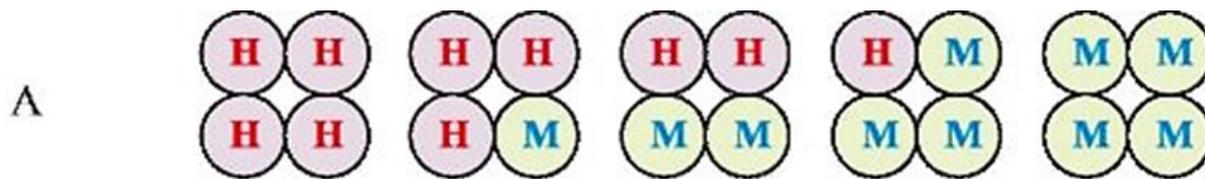
● Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)



Назовите класс фермента!

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

Назовите возможные комбинации субъединиц, образующие 5 изоформ!



Изоформы в диагностике

● Креатинкиназа (КК)



Назовите класс фермента!

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

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

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

Почему важно определять изоферментный состав, а не просто суммарную активность фермента? Суммарная активность фермента не предоставляет информации о локализации патологического процесса (например, активность ЛДГ может быть повышена при патологиях различных органов), а в некоторых случаях и о его наличии.

● ПРИМЕР

болезнь Тея-Сакса (ганглиозидоз)

Причина: нарушение синтеза α -субъединиц

гексозаминидазы → снижение активности изоформы А

Изоформа А ($2\alpha 2\beta$)

Изоформа В (4β)

Суммарная активность фермента при данной патологии нормальная (за счет повышенной концентрации изоформы В)

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

- АСТ (аспартатаминотрансфераза)
- АЛТ (аланинаминотрансфераза)

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

- Коэффициент де Ритиса повышен за счет преимущественного повышения активности АСТ (митохондриальной формы)
- ЛДГ 1 и ЛДГ 2 (лактатдегидрогеназа)
- КК-МВ (креатинкиназа)

Основные ферменты энзимодиагностики патологии печени

Воспаление, цитолиз, некроз (например, гепатит, цирроз)

- АЛТ, АСТ
- Коэффициент де Ритиса при вирусном гепатите менее 1 (преимущественное повышение АЛТ), при циррозе ≈ 1 (за счет «выхода» митох. АСТ)
- ЛДГ 4, ЛДГ 5
- ГГТ (гамма-глутамил трансфераза)

Синдром холестаза

- ЩФ (щелочная фосфатаза)
- ГГТ

Основные ферменты энзимодиагностики острого панкреатита

- Амилаза в крови или диастаза мочи
- Липаза



Энзимопатии

Патологические процессы, основанные на нарушении ферментативного катализа

□ первичные (наследственные)

- нарушается образование конечного продукта

ПРИМЕР: дефект **тирозиназы** → нарушение синтеза меланина → альбинизм

- накапливаются токсические метаболиты

ПРИМЕРЫ:

- ✓ **Фенилкетонурия** (недостаток **фенилаланингидроксилазы** → снижение образование тир из фен):

накопление фенилпирувата, фенилацетата → токсическое действие на мозг

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

- ✓ **Алкаптонурия - «черная моча»** (недостаток **оксигеназы гомогентизиновой кислоты**, реакция катаболизма *тир*):

гомогентизиновая кислота и алкаптоны откладывается в суставах → воспаление

□ вторичные (приобретенные)

Задание № 1

для самостоятельной работы

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

Задание № 2 для самостоятельной работы

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

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

Заключение

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

Литература

1. Биохимия: учебник для вузов / ред. Е. С. Северин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. -784 с. (С. 118-123)
2. Биологическая химия с упражнениями и задачами: учебник / ред. С.Е. Северин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. -624 с. (С. 99-112)
3. Биологическая химия: учебник для студентов медицинских вузов / А.Я. Николаев. – М.: Мед. информ. агенство, 2007. – 568 с.
4. Клиническая биохимия: электронное учебное издание / Новосиб. гос.мед.ун-т; сост. И. В. Пикалов [и др.]. - Новосибирск: Центр очно-заочного образования ГОУ ВПО НГМУ Росздрава, 2008