

Медицинская ферментология

Презентация лекции по программе

03.01.04 Биохимия

основной профессиональной
образовательной

программы послевузовского
профессионального

образования

Лекция

подготовлена

д.м.н.,

профессором

Медицинская ферментология (энзимология)

■ Существуют тысячи болезней,
а здоровье бывает только одно

Л.Бернс

Разделы:

- Ферментодиагностика
- Ферментопатология
- Ферментотерапия

ФЕРМЕНТЫ – ПРОСТЫЕ БЕЛКИ

**СОСТОЯТ ТОЛЬКО ИЗ
ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ**

ГИДРОЛИЗУЮТСЯ ДО АМИНОКИСЛОТ

ПЕПСИН, ТРИПСИН, УРЕАЗА

ФЕРМЕНТЫ – СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

БЕЛОК + КОФАКТОР (ПРОСТЕТИЧЕСКАЯ ГРУППА)

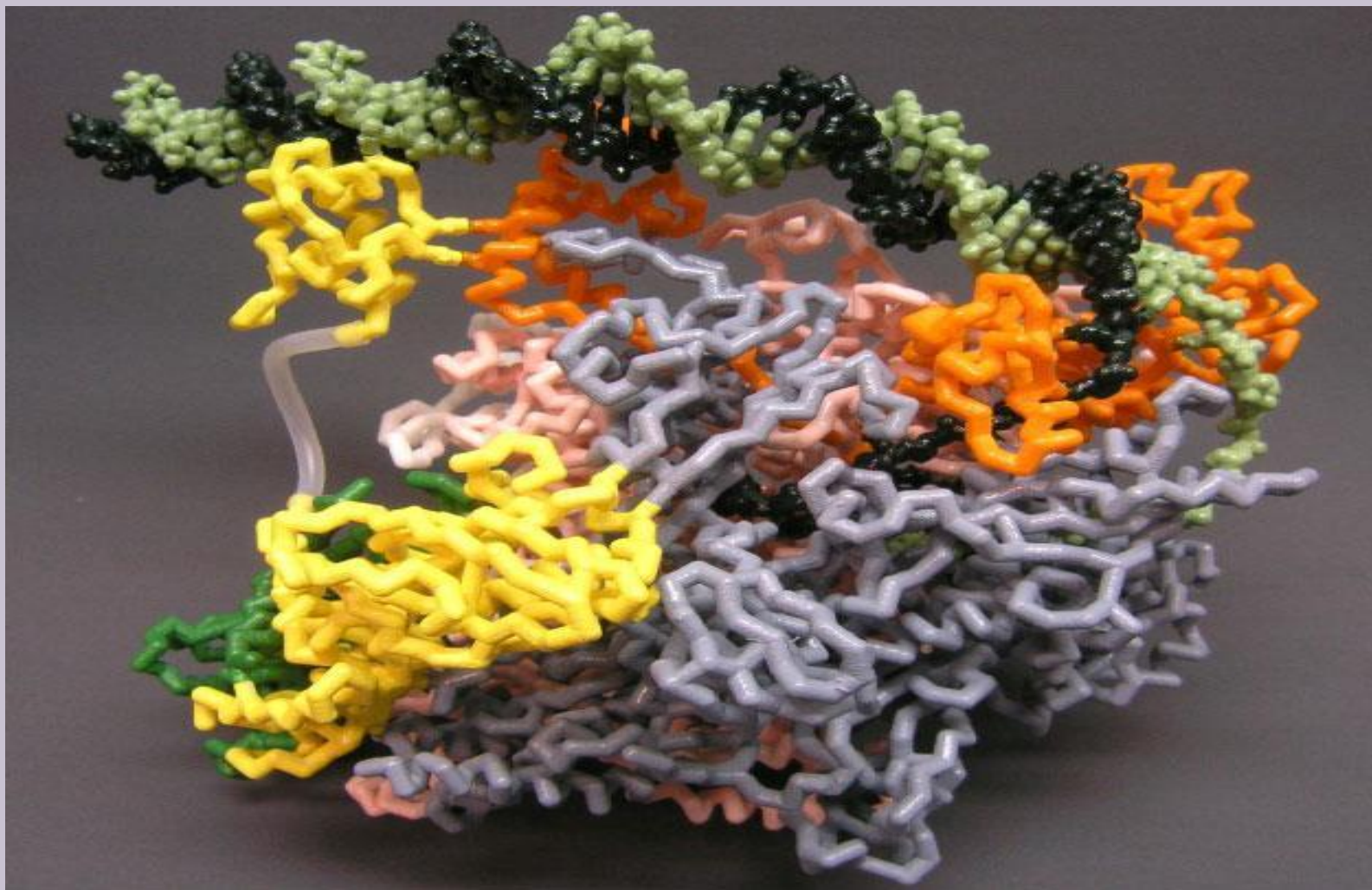
Ионы металлов -
 Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} ,
 Mn^{2+} , Cl^-

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.)

Нейлоновая модель РНК-полимеразы



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*

ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Соединения, которые снижают
каталитическую
активность ферментов

Ингибирование

обратимое

*активность
фермента
восстанавливается*

необратимое

*активность
фермента
не
восстанавливается*

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**

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**

Значение ферментов

- **Каталитическая** функция
- **Регуляторная** функция

Ферменты обладают высокой эффективностью, экономичностью, рациональностью, ювелирной точностью результатов работы в микропространстве клеток.

- **Защитная** функция -обезвреживание эндотоксинов и ксенобиотиков. Область исследования - ксенобиохимия

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

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.

Диагностическая

энзимология достигла огромных успехов , помогая врачу не только в постановке правильного диагноза и выяснения степени тяжести болезни, но и в определении правильности избранного метода лечения

Изменение количества фермента в крови

■ Гиперферментемия

- нарушение проницаемости клеточных мембран (пример - воспалительный процесс)

- лизис клеток (цитолиз) при действии разных факторов (токсины, гипоксия, недостаток АТФ и др.)

- клеточная пролиферация (опухоль)

Изменение количества ферментов

- Гипоферментемия
 - генетически обусловленная (первичная)
 - нарушение синтеза фермента (вторичная)
 - нарушение функций органа, синтезирующего фермент (например, печень)
- Дисферментемия - нарушение

Разделение ферментов по месту синтеза и выполнения функции

- Секреционные
- Индикаторные
- Экскреционные

Оценка ферментативных соотношений в сыворотке с позиции данной классификации используется для диагностики и дифференциальной диагностики патологии органов и тканей.

СЕКРЕЦИОННЫЕ ферменты

Ферменты, синтезируемые клетками органов и тканей, поступающие в кровь, где и выполняют свои специфические функции (ферменты свертывающей системы крови, холинэстераза)

При патологии в органах и тканях синтез этих ферментов нарушается и уровень в сыворотке крови снижается (пример, снижение активности холинэстеразы при заболеваниях печени)

Клеточные (индикаторные) ферменты

Ферменты, синтезируемые клетками органов и тканей и выполняющие функции в этих клетках (АЛТ, АСТ, ГЛДГ и др).

Количество их в крови зависит от

- внутриклеточной локализации фермента
- проницаемости клеточных мембран
- усиления клеточной пролиферации
- наличия и степени цитолиза клеток

ПРИ ПАТОЛОГИИ УРОВЕНЬ ЭТИХ ФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ УВЕЛИЧИВАЕТСЯ (ПРИМЕР, ПЕЧЕНЬ)

Экскреционные ферменты

- Ферменты, синтезирующиеся клетками желез ЖКТ, или, в частности, клетками внутри- и внепеченочных желчных протоков (ЩФ, ГГТ, ЛАП)
- При патологии (например, холестазае) уровень этих ферментов в сыворотке крови повышается.

Оценка ферментативных соотношений в сыворотке с позиции данной классификации используется для диагностики и дифференциальной диагностики патологии органов и тканей.

Принципы изменения концентрации различных видов ферментов

ЖЕЛЧЬ	ПЕЧЕНЬ	КРОВЬ		ЖЕЛЧЬ	ПЕЧЕНЬ	КРОВЬ	
			I				I
			II				II
			III				III
			IV				IV
В НОРМЕ				ПРИ ПАТОЛОГИИ			

I – секреторные ферменты (холинэстераза)

II,III – индикаторные ферменты (аминотрансферазы, сорбитдегидрогеназа)

IV – экскреционные ферменты (щелочная фосфатаза)

Диагностическая ценность ферментных исследований

Диагностическая ценность ферментных проб неоспорима. но несколько снижается (интерференция показателей) в связи с отсутствием

- специфичности сдвигов ферментативной активности
- органной принадлежности ферментов
- На ферментативную активность оказывает

влияние физиологическое состояние, физическая активность, возраст, травма, прием лекарственных препаратов

Подходы к увеличению информативности исследования ферментов в диагностике

1. Органная специфичность
2. Органоидная специфичность
3. Создание ферментных спектров, характерных для определенной патологии
4. Исследование изоферментов
5. Расчет ферментных коэффициентов
6. Создание ферментной карты, учитывающей биологические и патологические вариации ферментативной активности
7. Комплексное исследование с применением расчетных алгоритмов

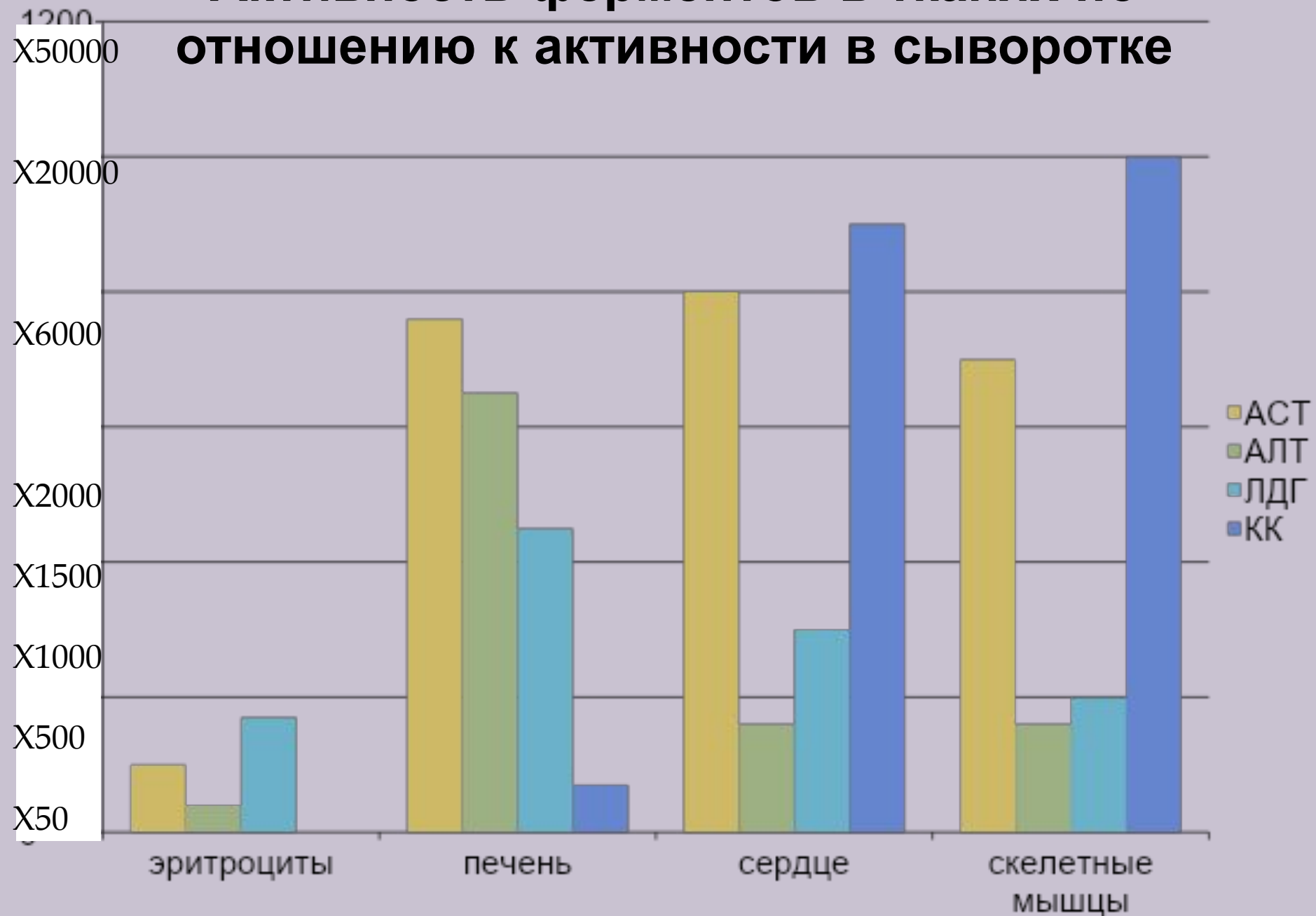
Органная специфичность

- ▣ Кардио – специфические (КФК)
- ▣ Печеночно – специфические (АЛТ, ГГТ, гистидаза)
- ▣ Ферменты костной ткани (ЩФ)

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ В НЕКОТОРЫХ ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА (МИКРОМОЛЬ СУБСТРАТА/ МИН/ Г СЫРОЙ МАССЫ ТКАНЕЙ)

НАЗВАНИЕ ФЕРМЕНТА	ПЕЧЕНЬ	СЕРДЕЧНАЯ МЫШЦА	СКЕЛЕТНАЯ МЫШЦА	ЭРИТРОЦИТЫ
АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗА	96	62	36	0,8
АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗА	60	3	3	0,1
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА	60	1	0,5	0,01
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА	156	124	147	37
КРЕАТИНКЕНАЗА	0,7	350	2030	0,01
АЛЬДОЛАЗА	6	5	48	1

Активность ферментов в тканях по отношению к активности в сыворотке



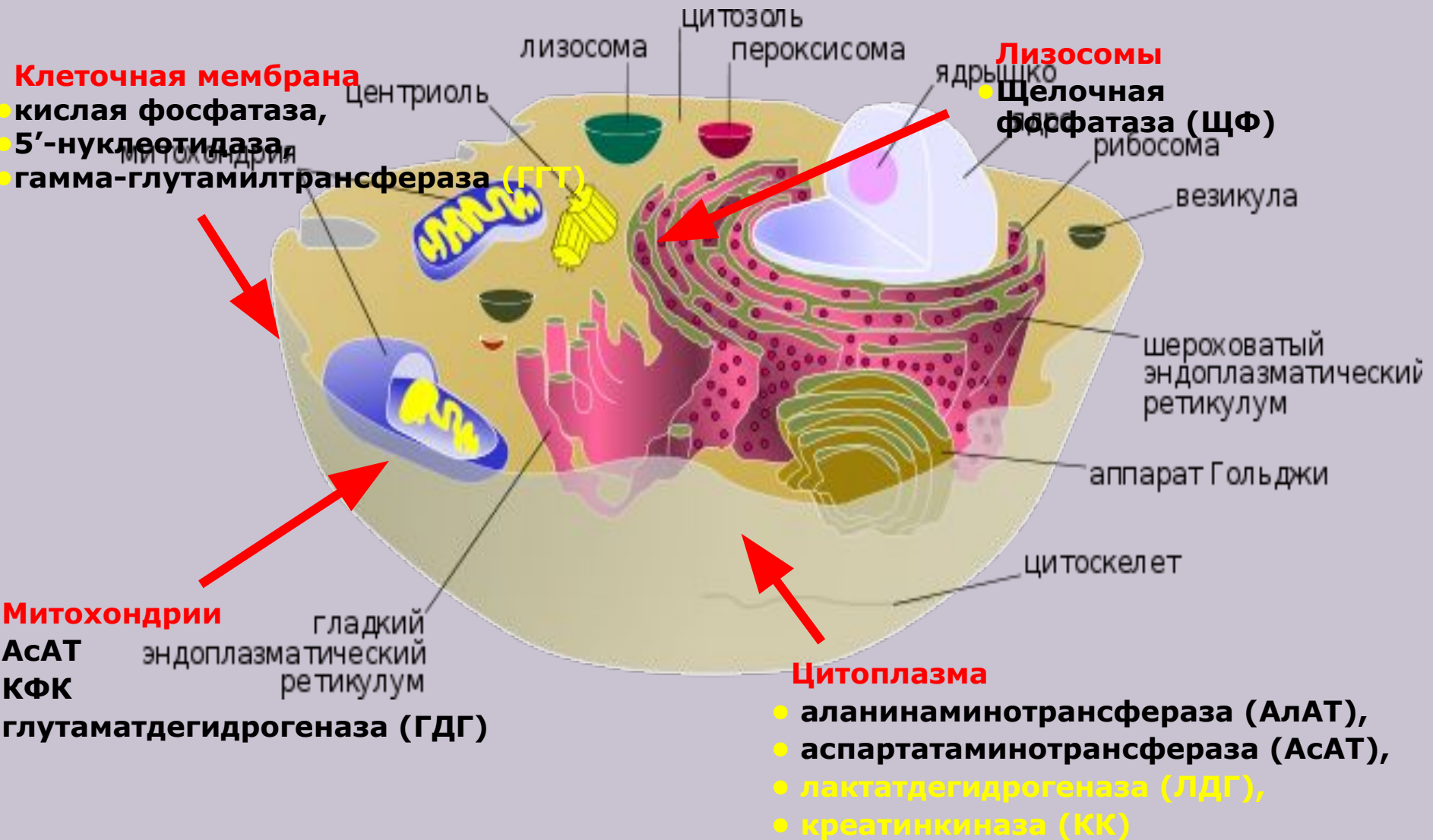
Органоидная специфичность ферментов

- Локализация ферментов в определенных компарментах клетки

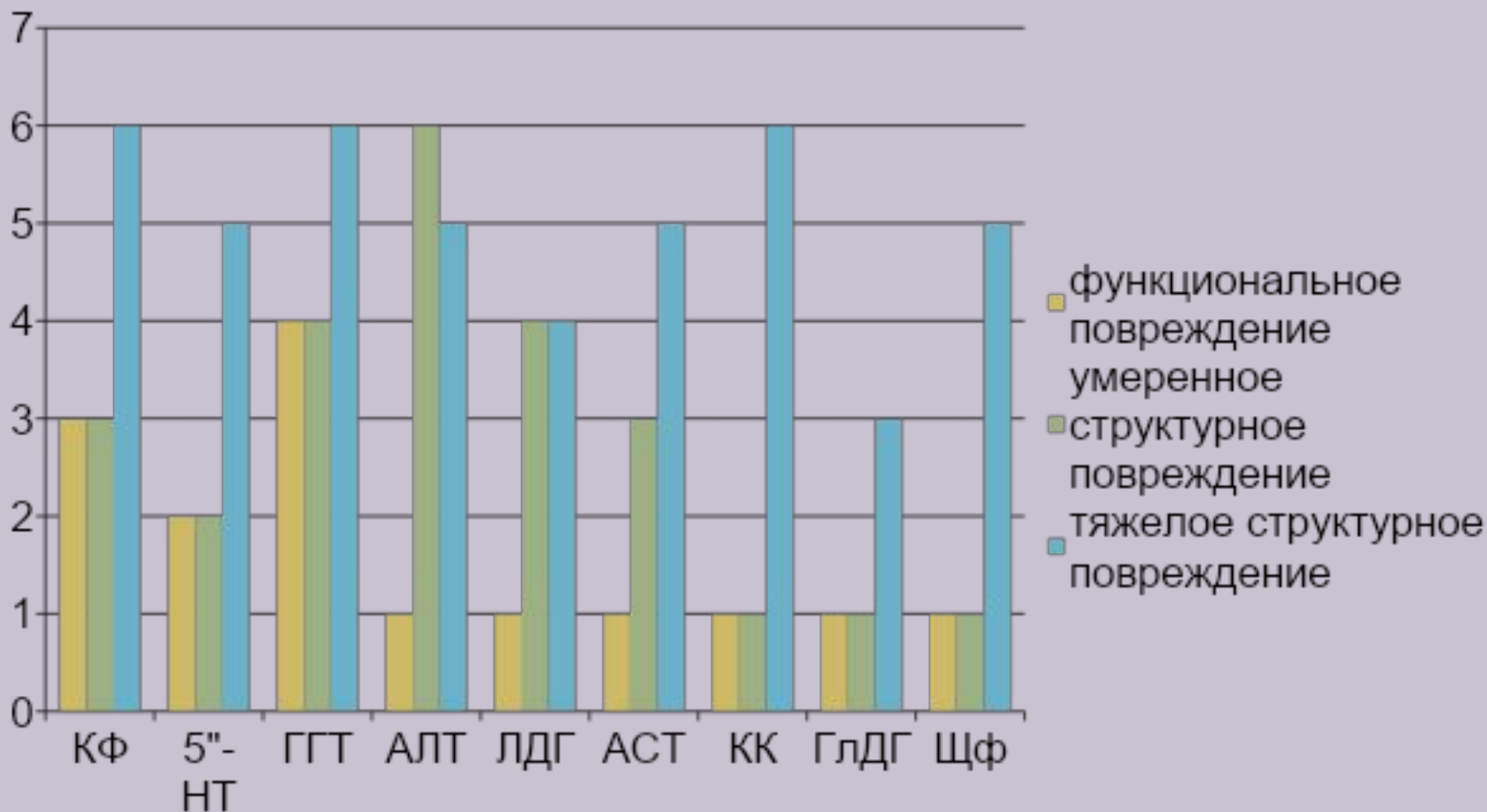
Определение активности ферментов и оценка результата в соответствии с локализацией ферментов в клетке имеет значение в диагностике:

- мембранные (аденилатциклаза)
- цитозольные (АЛТ)
- лизосомальные
- митохондриальные (АСТ)

Примеры различной локализация ферментов в клетке



Относительное повышение активности ферментов в сыворотке как маркер степени клеточного повреждения



Создание ферментного спектра патологии

- ОТНОСИТЕЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ ПРИ ОСТРОЙ ЗАГРУДИННОЙ ИЛИ АБДОМИНАЛЬНОЙ БОЛИ

ПАТОЛОГИЯ	ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ
ИНФАРКТ МИОКАРДА (средних размеров)	КК >>АсАТ>АлАТ>>амилаза>>ГлДГ
ОСТРАЯ ПРАВОЖЕЛУДОЧКОВАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ	АсАТ≈ АлАТ≈ ГлДГ >>КК >>амилаза
ЭМБОЛИЯ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ	АлАТ >АсАТ >ГлДГ >>КК >>амилаза
ПЛЕВРИТ	Нет повышения активности ферментов
ОККЛЮЗИЯ СОСУДОВ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ	АсАТ ≈ АлАТ > амилаза > ГлДГ > КК
ОСТРЫЙ ПАНКРЕАТИТ	амилаза >>АлАТ >АсАТ ≈ГлДГ >>КК
ПЕЧЕНОЧНАЯ КОЛИКА	АлАТ > АсАТ > ГлДГ >амилаза >>КК
ПОЧЕЧНАЯ КОЛИКА	Нет повышения активности ферментов
ШОК	КК >>АсАТ > АлАТ > ГлДГ >амилаза

Изоферменты

Множественные формы энзиматически-активных белков, кодируемые самостоятельным геном, находящиеся не только в отдельных органах одного и того же организма, но и в различных частях одной и той же клетки.

Изоферменты имеют идентичную каталитическую активность, но отличаются рядом физико-химических свойств, поведением в электрическом поле, неодинаковой степенью воздействия ингибиторов.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛДГ В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА (%)

	ИЗОФЕРМЕНТЫ ЛДГ				
СЕРДЦЕ	55	33	8	2	2
ПОЧКИ	41	42	13	3	1
ЭРИТРОЦИТЫ	41	44	10	3	2
МОЗГ	23	25	30	17	5
ПЛАЦЕНТА	12	18	15	30	25
ВИЛОЧКОВАЯ ЖЕЛЕЗА	10	11	30	28	21
СКЕЛЕТНЫЕ МЫШЦЫ	4	11	17	16	56
ПЕЧЕНЬ	1	4	11	17	67
НАДПОЧЕЧНИКИ	3	20	75	-	2

Изменения в индикаторах с момента возникновения инфаркта миокарда

Тест	Начало приема	Пик подъема	Возвращение к норме
КК	4-6 час	24 час	3-4 дня
КК-МВ	4 час	18 час	2 дня
КК-МВ2	1-6 час	4-8 час	12-48 час
АСТ	8 час	24-28 час	4 дня
ЛДГ	24 час	3 дня	8-9 дней
ЛДГ-1	24 час	3 дня	12 дней
Легкая цепь миозина	4 час	-	10-12 дней
Тропонин Т	1-6 час	10-20 час	5-14 дней
Тропонин I	3-6 час	18-20 час	5-7 дней
Миоглобин	1.5 час	6 час	34 час
Гликогенфорилаза ВВ	2 час	-	24 час

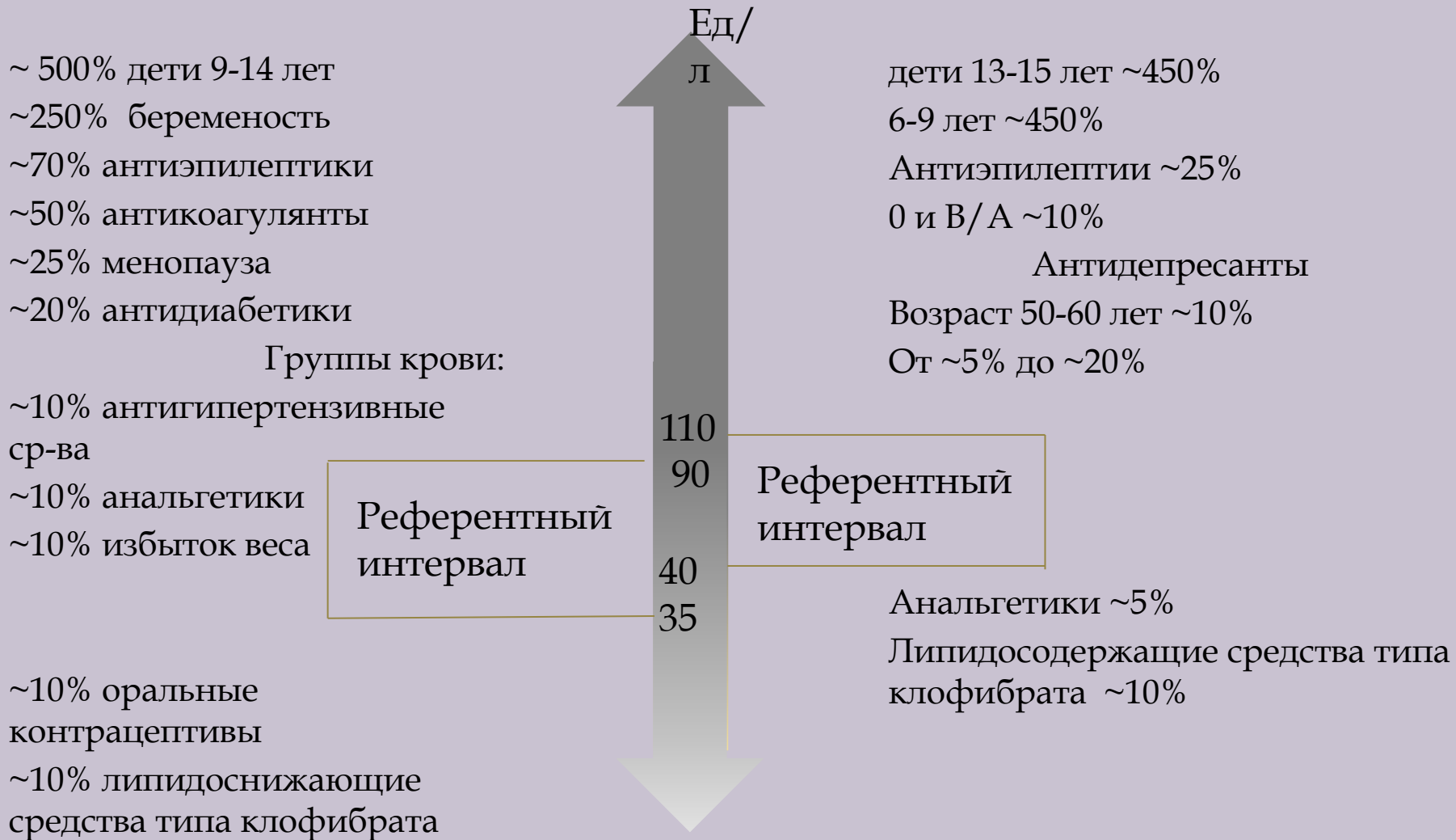
Расчет ферментных коэффициентов

Название соотношения/коэффициента	показатель
Де Ритиса	
Воспалительный тип аст/алт	≤1
Некротический тип аст/алт	≥1
АСТ+АЛТ/ГлДГ	
Метастазы и печень	≤10
Механическая желтуха	5-20
В случае острого начала цирроза печени и хронического гепатита	30-40
Холестатический гепатоз	40-50
Острый вирусный гепатит	≥50
Острый алкогольный гепатит	
ЛДГ/АСТ	
Гемолитическая желтуха	≥12
Гепатоцеллюлярная желтуха	≥12
ГГТ/АСТ	
Активный вирусный гепатит	
Токсический гепатит	≤1
Хронический персистирующий гепатит	
Хронический гепатит	
Острый алкогольный гепатит	1-3
Цирроз печени	
Алкогольный цирроз	3-6
Недавняя обструктивная желтуха	
Биллиарный цирроз	
Длительная обструктивная желтуха	≥6
Рак печени/метастазы в печень	

Диагностическая карта ферментной активности

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФОТАЗА

биологические вариации

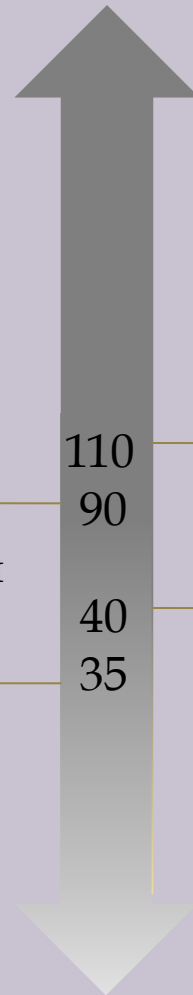


ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФОТАЗА

аналитическая вариация

пороги решений

- 500
- У детей- любое превышение этой величины требует изучения обмена в костях и функции печени
- 120
- Требуется верификации биологических или медицинских вариаций
- 60
- Величина в пределах Референтного интервала
- Позволяет исключить факторы биологической и патологической вариации



- Патологические вариации
- обструктивная желтуха
- Токсический гепатит
- Гепатит педжета
- Задержка плаценты
- Опухоли печени
- Остеобластические метастазы
- Вторичные поражения печени
- Пиелонефриты
- Гипертиреозидизм
- Цирроз
- Гиперпаратиреозидизм
- Остеомаляция
- Вирусный гепатит
- Недостаток витамина Д
- Хронический гепатит
- Остеолитические метастазы

Интерференция ферментов

При оценке уровня изменения ферментного показателя следует учитывать факторы, которые могут исказить истинную картину

- ▣ Процедура взятия и транспортировки материала
- ▣ Хранение исследуемого материала
- ▣ Период полураспада фермента
- ▣ Влияние проводимой терапии

Период полураспада ферментов

ФЕРМЕНТ (сокращ.)	ФЕРМЕНТ	ПЕРИОД ПОЛУРАСПА ДА
-	АМИЛАЗА	3 - 6 ч.
АлАТ (ГПТ)	АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗ А	47 ± 10 ч.
АсАТ (ГОТ)	АСПАРГАТАМИНОТРАНСФЕРА ЗА	17 ± 5 ч.
ГГТФ (ГГТП)	γ-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗА	3 - 4 дня
ГЛДГ	ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА	18 ± 1 ч.
ЛДГ ₁ (ГБДГ)	ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА (1)	113 ± 60 ч.
ЛДГ ₅	ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА (5)	10 ± 2 ч.
ХЭ	ХОЛИНЭСТЕРАЗА	Около 10 суток
ЩФ	ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА	3 - 7 суток

Фибротесты

- В 2007 ФиброТест признан Минздравом Франции как альтернативный биопсии печени, затем одновременно тест внедрен во многих странах мира, в том числе России (Инвитро)

Фибротесты

- Новые уникальные, неинвазивные тесты для диагностики:
 - стадий фиброза печени, стеатоза, стеатогепатита
 - активности некровоспалительного процесса в печени
- Тесты характеризуются различной чувствительностью, специфичностью, информативностью, диагностической ценностью
- Альтернатива биопсии печени

Биомаркеры для фибротестов

Разнообразие тестов определяется сочетанием следующих основных биомаркеров:

- количество тромбоцитов
- активность ферментов АСТ, АЛТ, ЩФ, ГГТП,
- протромбиновое время
- аполипопротеин А-1
- холестерин
- альбумин
- альфа-2-макроглобулин

Технология

- Определение биомаркера в сыворотке крови, каждый из которых является индикатором гепатита, принятыми методами
- Использование математических формул, которые для получения результата теста независимо проверяют каждый параметр
- Алгоритм включает переменные возраста, веса, роста и пола

Наиболее принятые комплексные тесты

- ▣ ФиброТест (ФиброТест, АктиТест)
- ▣ ФиброМакс (ФиброТест, СтеатоТест, АктиТест, АшТест, НешТест)

Фибро Тест и Фибро Макс

	ФиброТест	ФиброМакс
■ Альфа-2-макроглобулин	+	+
■ Гаптоглобин	+	+
■ Аполипопротеин А-1	+	+
■ ГГТ	+	+
■ Общий билирубин	+	+
■ АЛТ	+	+
■ АСТ		+
■ Глюкоза		+
■ Триглицериды		+
■ Общий холестерин		+

Область применения фибротестов

- Хронический гепатит С
- Хронический гепатит В
- Хронический гепатит С или В с коинфекцией ВИЧ
- Алкогольное заболевание печени (стеатоз, стеатогепатит)
- Стеатоз и неалкогольный стеатогепатит (диабет, избыточный вес, гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия, повышенное АД)
- Некровирусная активность

Ферментопатология

Из более чем двух тысяч наследственных болезней человека молекулярный механизм развития выяснен только у двух - трех десятков.

Чаще всего развитие болезни непосредственно связано

с наследственной недостаточностью или полным отсутствием синтеза единственного фермента в организме человека.

Ферментопатология - мукополисахаридоз



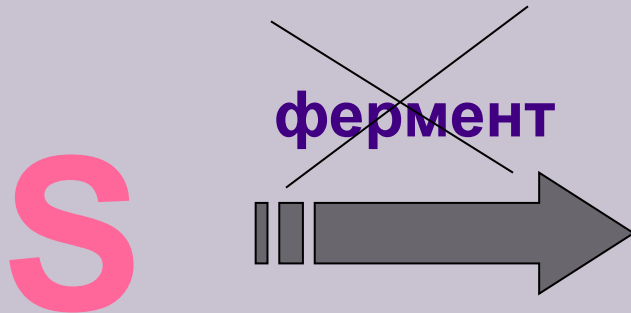
ФЕРМЕНТОПАТОЛОГИЯ

Первичные (наследственные, классические) ферментопатии

Патогенез I

- Накопление субстрата
- Образование необычных метаболитов
- Интоксикация субстратом или метаболитами и нарушение функции органов и систем

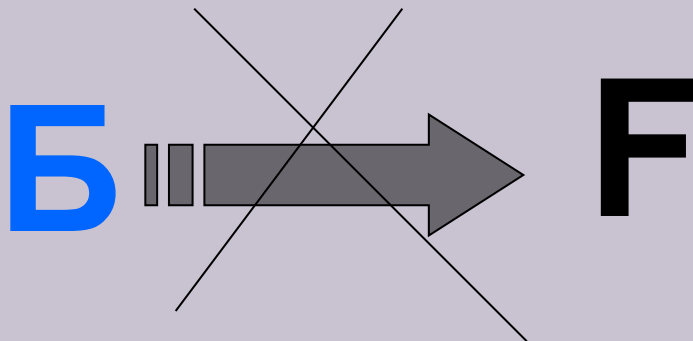
Механизмы развития молекулярных болезней



P

Ферментопатии

- Накопление субстрата (галактоземия, гликогенозы)
- Уменьшение продукта (агликогенозы)



F

Протеинопатии

Серповидно-клеточная анемия,
Первичные иммунодефициты

Патогенез II

- ▣ уменьшение продуктов реакции
- ▣ нарушение синтеза биологически активных веществ

Перспективы диагностики – **генетическое типирование болезней**, т.е. расшифровка генетического кода (предположительная стоимость процедуры к 2014г. -14000 долларов)

Энзимопатология-вторичные ЭНЗИМОПАТИИ

- ▣ Регуляторные (аллостерические)
- ▣ Алиментарные (недостаток витаминов, аминокислот)
- ▣ Токсические (интоксикация, вирусы, тяж. металлы –тиоловые яды, бактерии)
- ▣ Метаболические (рН)

Энзимотерапия

Применение ферментов

- ▣ Ускорение отторжения поврежденных тканей – **протеолитические ферменты**
- ▣ Лизирование экссудатов, деполимеризованных компонентов межклеточного матрикса – **лидаза**
- ▣ Улучшение тока межклеточной жидкости – **гиалуронидаза**
- ▣ Возмещение дефицита – **пищеварительные и др. ферменты**

Энзимотерапия

Применение ингибиторов ферментов

- Статины
- Ингибиторы АПФ
- Ингибиторы протеолитических ферментов (контрикал)

Системная энзимотерапия

Системная энзимотерапия – кооперативное терапевтическое воздействие целенаправленно составленных смесей ферментов растительного и животного происхождения.

Оказывая влияние на ключевые патофизиологические и патобиохимические процессы в организме, препараты системной энзимотерапии обладают противовоспалительным, противоотечным, фибринолитическим, иммуномодулирующим действием.

Биотехнологии на службе энзимотерапии

- Иммобилизация ферментов
- Повышение биодоступности
- Пролангирование действия за счет получения кишечнорастворимых форм и форм, гидролизующихся только во время всасывания

**спасибо
за
внимания**

