

ФЕРМЕНТЫ-3

Ферменты в диагностике

УЧАСТИИ

ФЕРМЕНТЫ В

Наумов А.В.

НАУМОВ А.В.

ФЕРМЕНТЫ-3

Изменение активности ферментов при патологии



Внутриклеточная локализация ферментов

- **Ядро** – ДНК полимераза.
- **Митохондрии** – ферменты цикла кребса, β - окисления жирных кислот, АсАТ
- **Цитоплазма** – ферменты гликолиза.

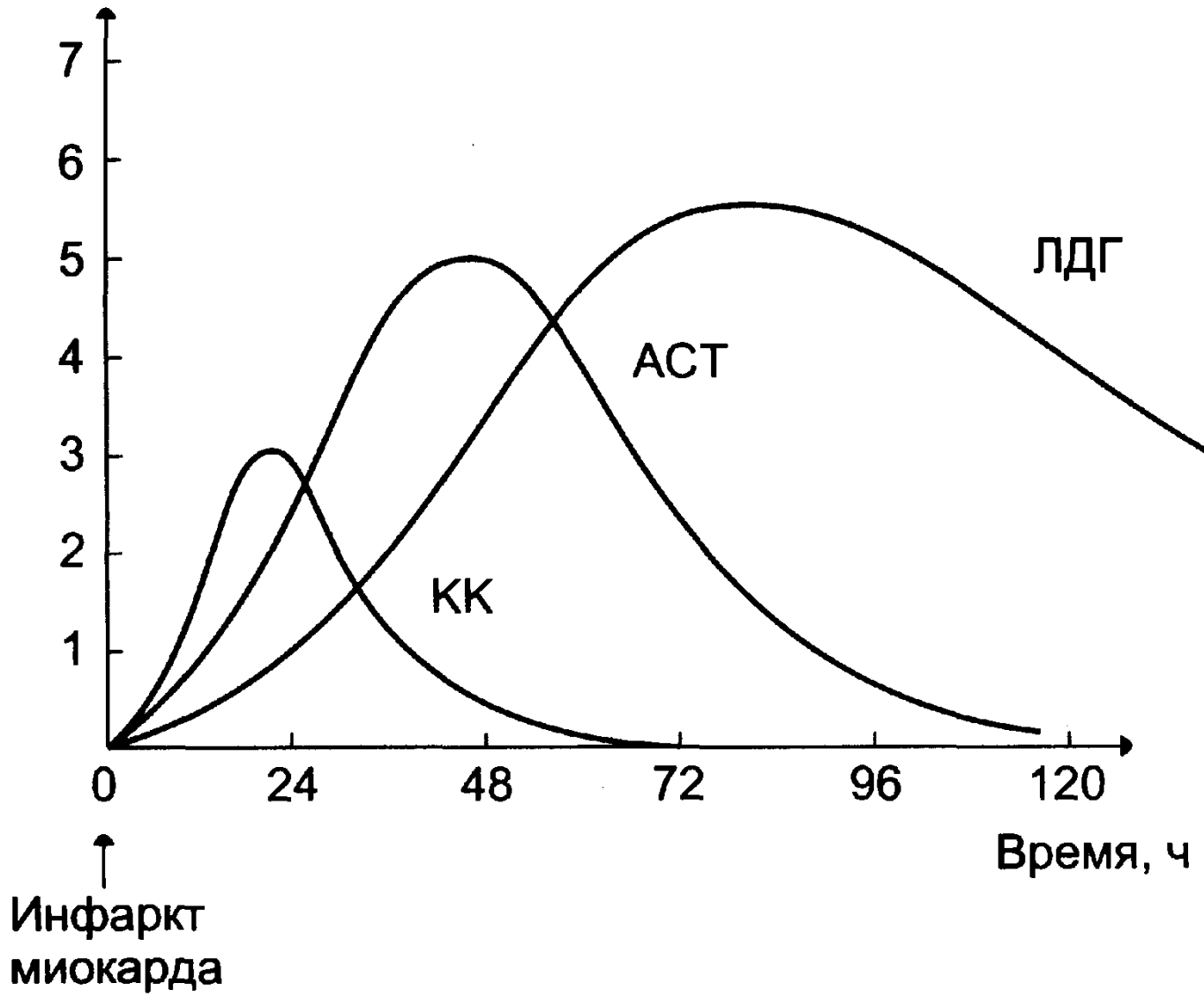
Происхождение ферментов СЫВОРОТКИ крови:



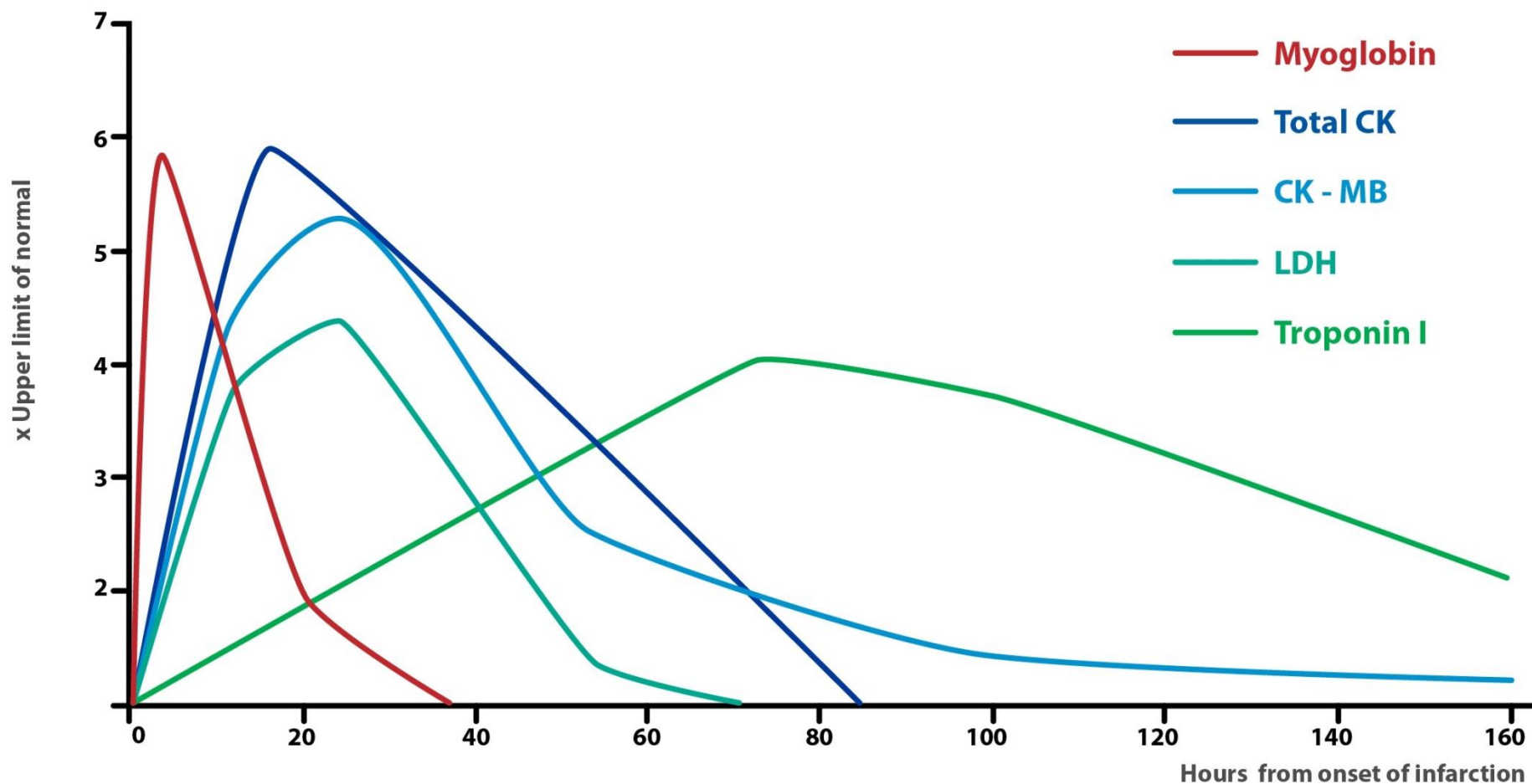
- **Секреторные** - собственные ферменты плазмы крови
 - протромбин,
 - проакцелерин.
- **Экскреторные**
 - амилаза
 - липаза
- **Индикаторные (клеточные)**

Органоспецифические ферменты (ИЗОферменты)

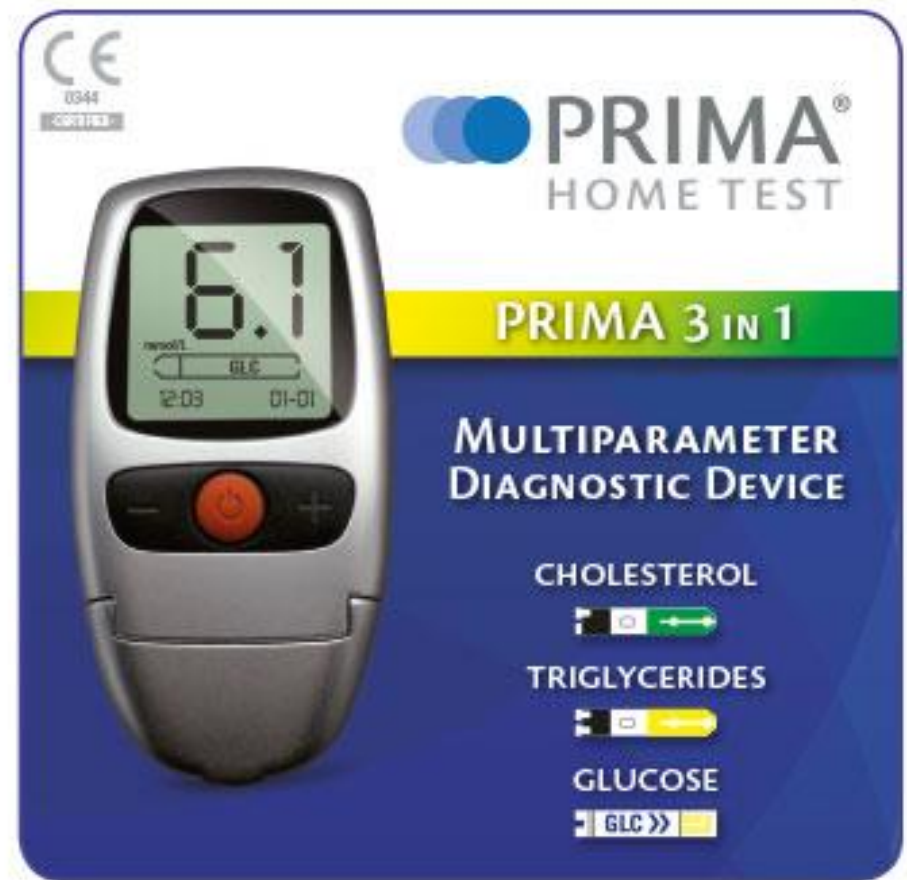
Фермент	Орган
ЛДГ ₁ ЛДГ ₂	миокард
ЛДГ ₄ ЛДГ ₅	печень, мышцы
амилаза	поджелудочная железа
АлАТ	печень
АсАТ	печень, миокард, п/п мышцы, почки, ПЖЖ, эритроциты
Кислая фосфатаза	предстательная железа



Инфаркт миокарда. Повышение ферментов-маркеров в сыворотке крови



Диагностические приборы



Энзимопатии

ЭНЗИМОПАТИИ

- заболевания, возникающие при
отсутствии фермента или нарушении
его активности.

Энзимопатии

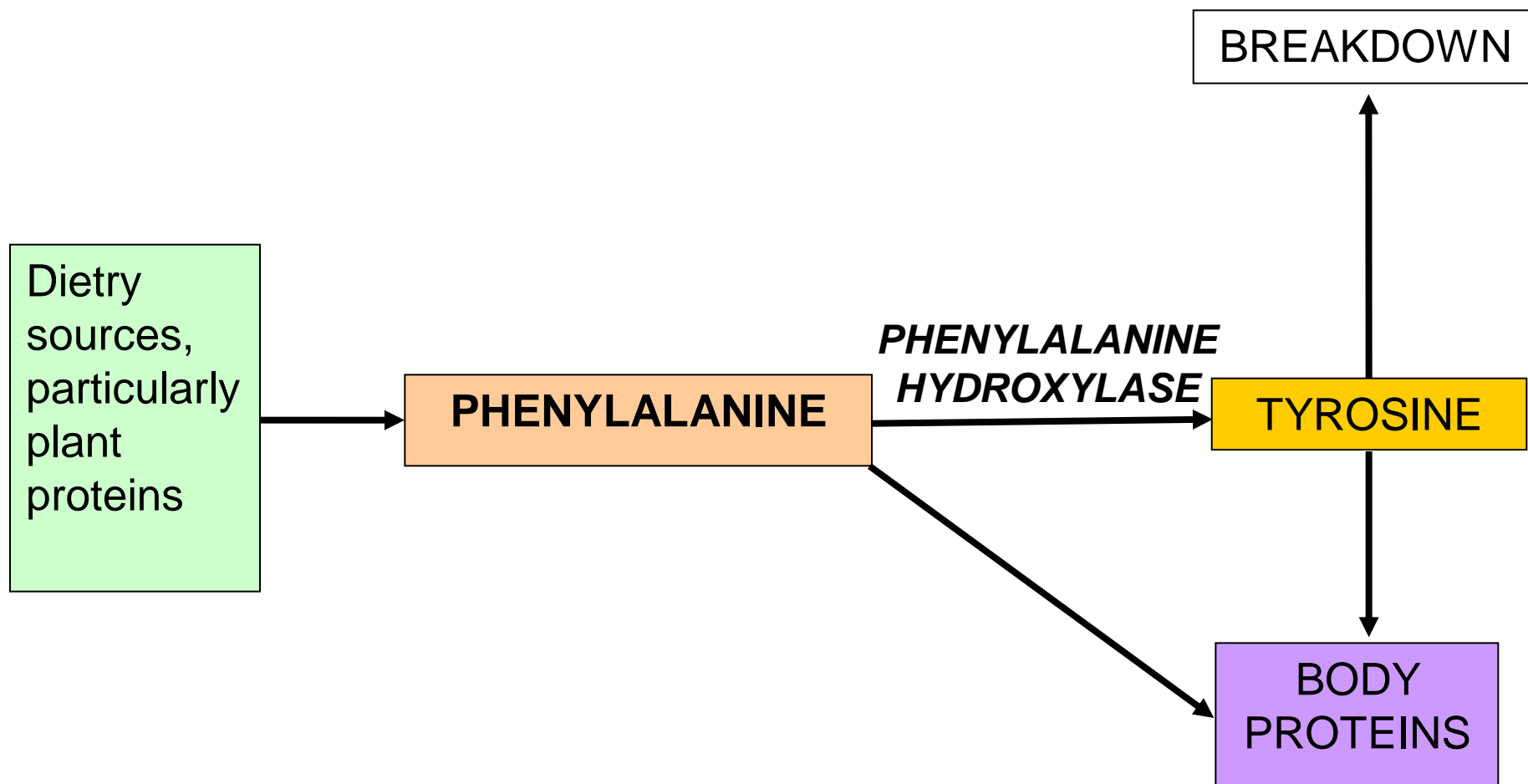
- ✓ **Наследственные (*первичные*) генетические** – характеризуются отсутствием, недостатком или дефектом структуры какого-либо фермента
 - ■ Альбинизм
 - ■ Фенилкетонурия
 - ■ Галактоземия
 - ■ Гликогенозы

- ✓ **Приобретённые (*вторичные*)**
 - - ингибирование фермента
 - - доступность кофакторов

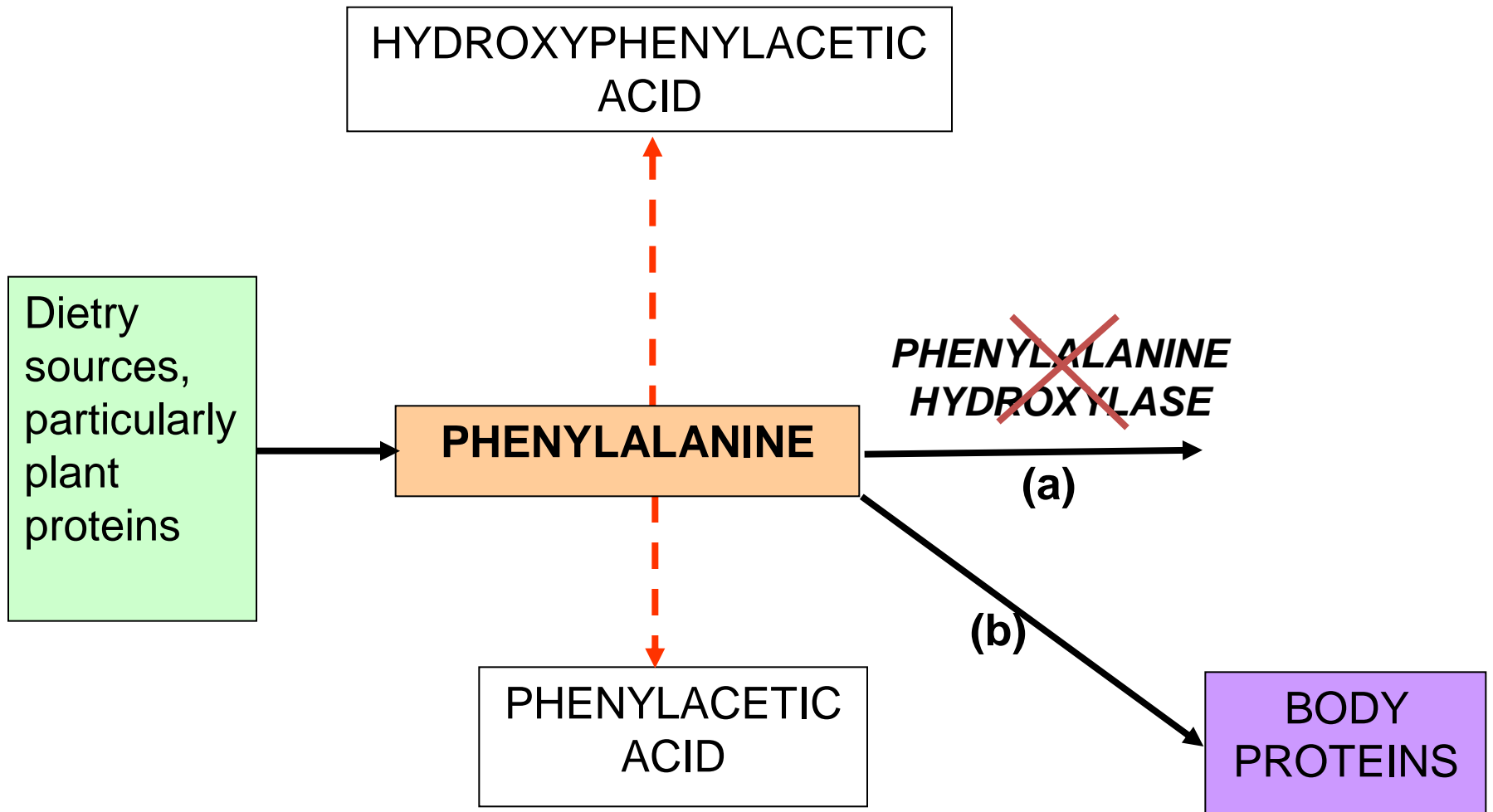


***Первичные
энзимопатии***

Нормальный метаболизм фенилаланина.



Фенилкетонурия

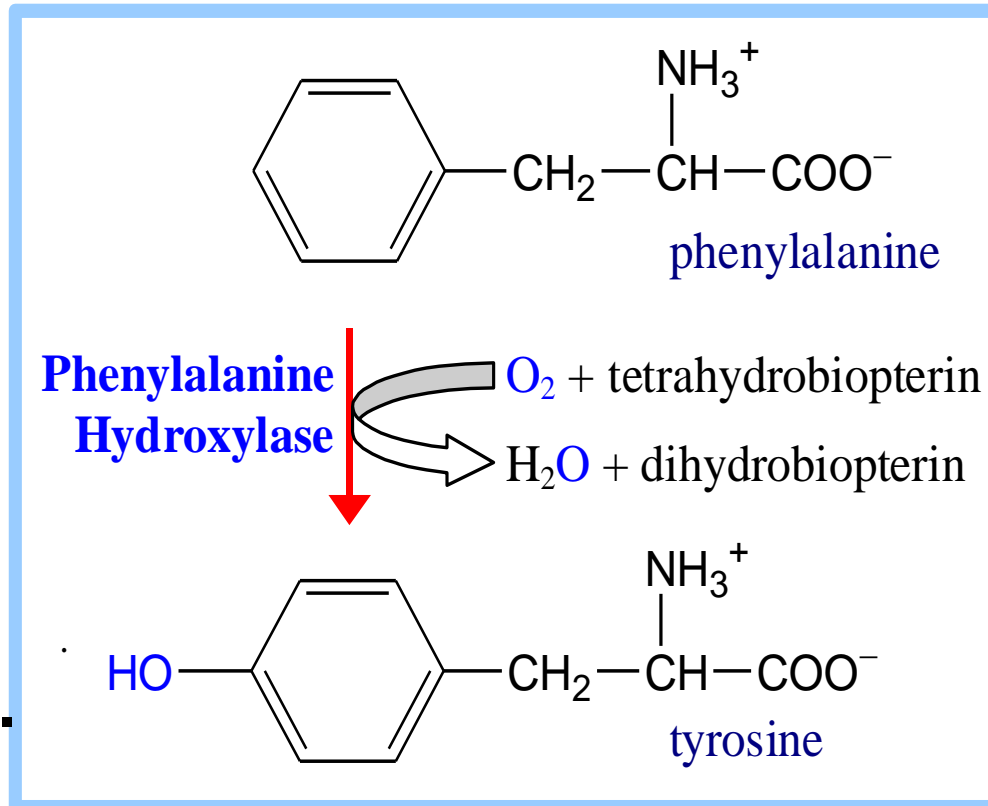


Генетическая
недостаточность
фенилаланин гидроксилазы
приводит к

фенилкетонури

и.

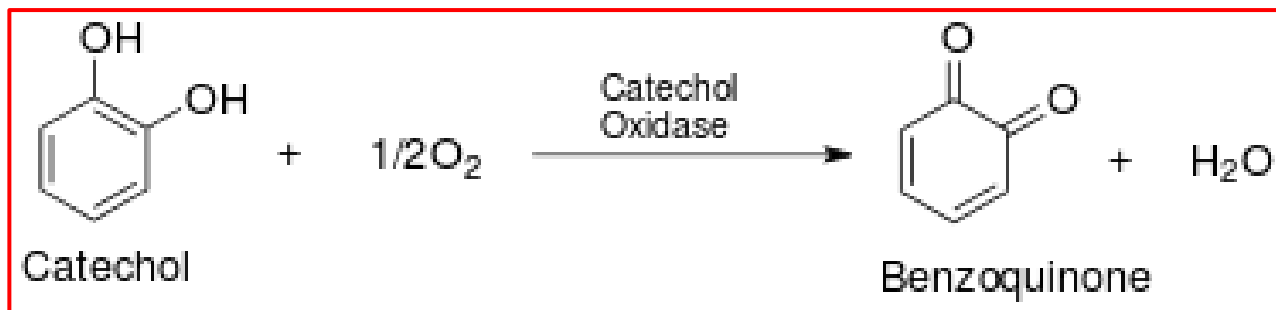
Phe & фенилпируват
накапливаются в крови и моче.



Phe - large, neutral amino acid (LNAA). LNAAs конкурируют за транспорт через **ГЭБ (blood–brain barrier)** белок-переносчик - large neutral amino acid transporter (**LNAAT**). При избытке **Phe** в крови происходит насыщение переносчика и снижение прочих **LNAAs** в мозгу. Недостаток приводит к нарушению развития мозга.

Альбинизм – недостаток *тирозиназы* и отсутствие **меланина** (пигмент кожи, волос, глаз) Носители очень чувствительны к солнечным лучам.





Тирозиназа –

- трансмембранный гликопротеин (13%),
- находится в меланосомах,
- содержит два атома меди в активном центре.

Алкаптанурия — недостаток **гомогенизина оксидазы**.

Накапливается гомогенизиновая кислота (продукт обмена тирозина), экскретируется в мочу и при окислении кислородом воздуха образует чёрный пигмент. Пигмент может накапливаться в тканях — **дегенеративный артрит**

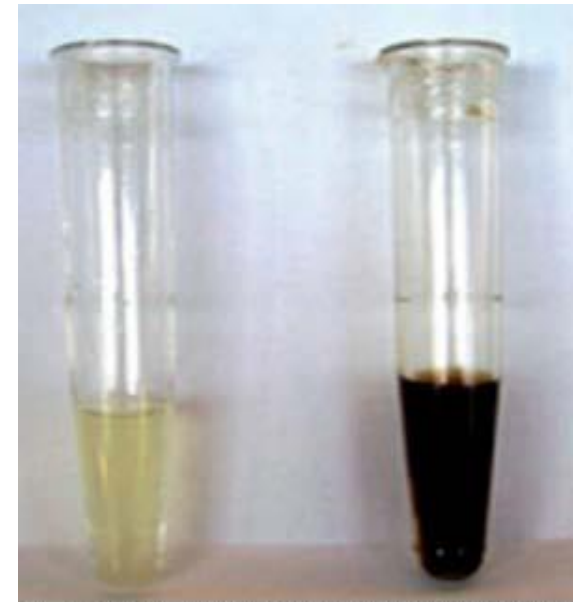


Fig. 3: Comparison of Colour of Freshly Voided Urine and Urine after 24 Hours

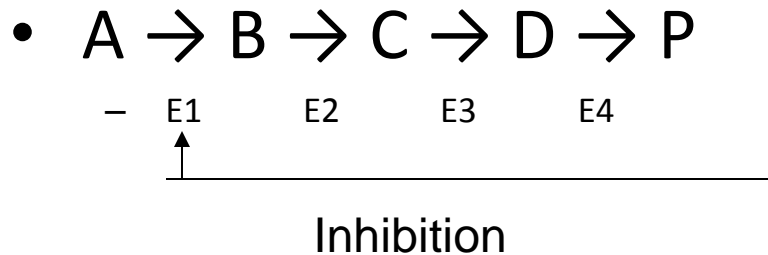




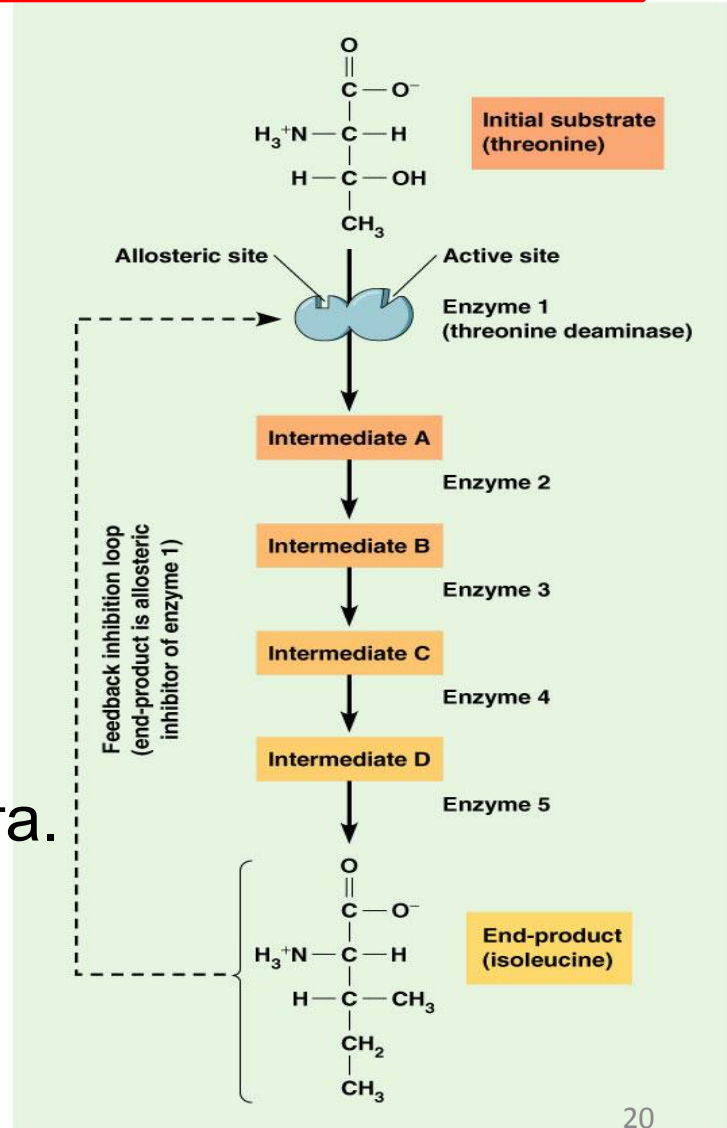


***Вторичные
энзимопатии***

Вторичные (приобретенные) ЭНЗИМОПАТИИ



Треонин дезаминаза ірегулюіруется
Ізолейціном..
Ізолейцін связывается с
аллостерическим центром фермента.
Аллостерический ингибитор



Вторичные энзимопатии

Доступность **кофакторов**:

- **недостаток** витаминов в питании;
- нарушение процессов **усвоения** и **транспорта** витаминов;
- недостаток или отсутствие **ферментов активации** витаминов
- изменение **сродства** кофермента к активному центру фермента.

**1/3 больных
чувствительны
к витаминотерапии**

Пиридоксин (В₆) – пиридоксальфосфат (PLP).

1,3 мг/день. В составе ~ **112** ферментов (3%).

Нарушения активности ферментов:

- *Аланин-глиоксилат аминотрансфераза – гипероксалатурия, **МКБ** и почечная недостаточность.*

OMIM 259900*

β-аланин: α-кетоглутарат трансаминаза.

Синдром Кохена – выраженная умственная отсталость сочетается с ожирением, мышечной гипотонией, гипоплазией нижней челюсти с выдающимися резцами, узкими руками и ногами и пр.

OMIM 216550*

*** Проект «Менделевское наследование у человека» (англ. Mendelian Inheritance in Man, MIM).**

- **Специфическая эритроидная синтетаза δ-аминолевулиновой кислоты** (митохондрий) – связанная с X хромосомой
сидеробластическая анемия OMIM 301300

Нарушен синтез дельта-АЛК (сукцинил Со-А + Gly), - недостаточное образование **копропорфирина** и **протопорфиринов** в эритроблестах и накопление в них Fe²⁺.

- **Кинурениназа** – превращает кинуренин (Trp) в антраниловую кислоту.

Нарушение умственного развития.

OMIM 236800

- **Декарбоксилаза ароматических L-аминокислот** - синтез дофамина и серотонина.

Нарушение развития , гипотония, и пр.

OMIM 107930

- **Орнитинаминотрансфераза** (митохондрий) (EC 2.6.1.13.) – гиратная (кольцевидная) атрофия сетчатки (OMIM 258870)*

Нарушение превращения орнитина в пролин.

Симптомы: атрофия сетчатки и пигментного эпителия глаз.

Вначале - «куриная» (сумеречная) слепота, в 60-70 лет - прогрессирующая дегенерация сетчатки и сосудистого сплетения глаз.

- **Цистатионин β-синтетаза.** (OMIM 236200)

Гипергомоцистеинемия, нарушения развития, сердечно-сосудистая и скелетная патология, и пр.

* Проект «Менделевское наследование у человека» (англ. Mendelian Inheritance in Man, MIM).

Тиамин (В₁) – 1,2 мг/д., **тиаминдифосфат**, 4 фермента.

Нарушения активности ферментов:

- **Дегидрогеназа АК с разветвлённой цепью** (МТ) – **болезнь кленового сиропа** - в моче Val, Leu, Ile - даёт запах кленового сиропа. **OMIM 248600.**

Симптомы: кетоацидоз, нарушение умственного развития, атаксия (**беспорядок, греч.**), слепота (> α-кетокислот).

- **Пируват декарбоксилаза** (МТ) – **болезнь Лея (Ли) (Leigh disease) подострая некротическая энцефаломиелопатия.**

Лактоацидоз, энцефаломиелопатия, нарушение умственного развития, атаксия, повышенная восприимчивость к инфекциям, мышечная слабость, гипотония и др.

OMIM 312170.

Ген в X хромосоме. У новорожденных девочек из-за лактоацидоза развивается **эпилептический синдром Веста** – неблагоприятный прогноз.

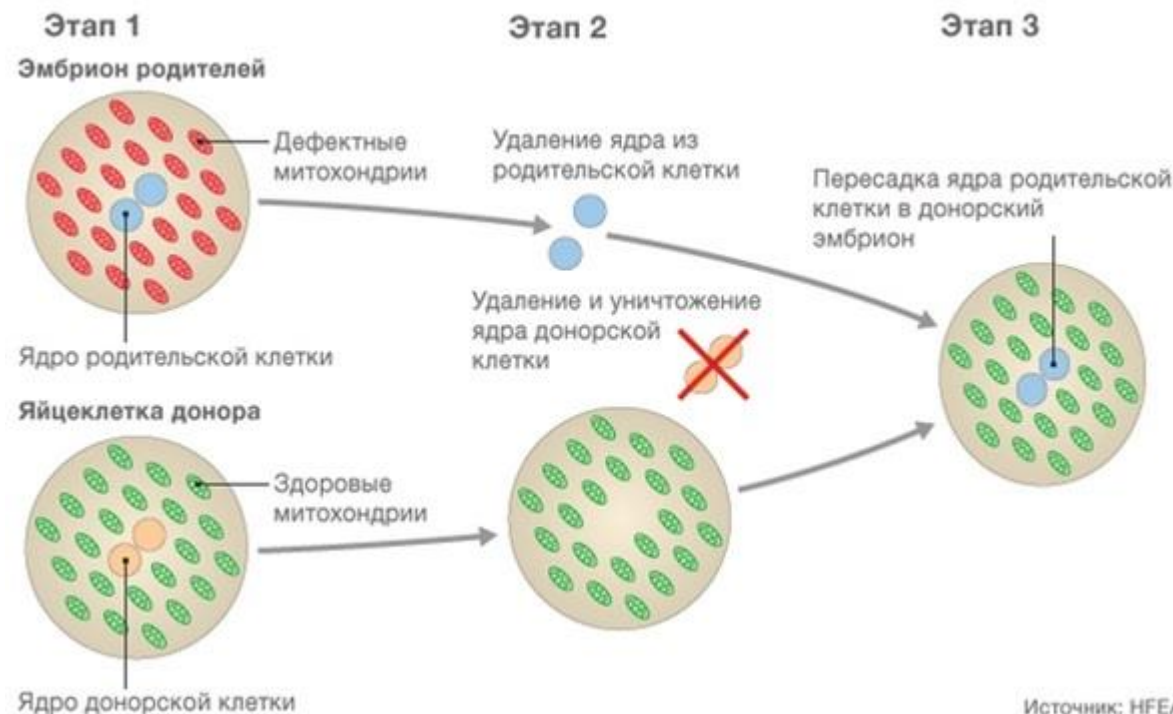
- **Мембранный переносчик тиамин** **SLC19A2** (белок мембран) – мегалобластическая анемия, сахарный диабет, нейросенсорная **глухота** **OMIM 603941.**
- **Тиамин пирофосфокиназа** - мегалобластическая анемия, сахарный диабет, нейросенсорная **глухота** **OMIM 606370.**
- **α -кетоглутарат дегидрогеназа** (митохондрии) - мегалобластическая анемия, сахарный диабет, нейросенсорная **глухота** **OMIM 203740.**

В сентябре 2016 года в Мексике рождён ребёнок "от трёх родителей"

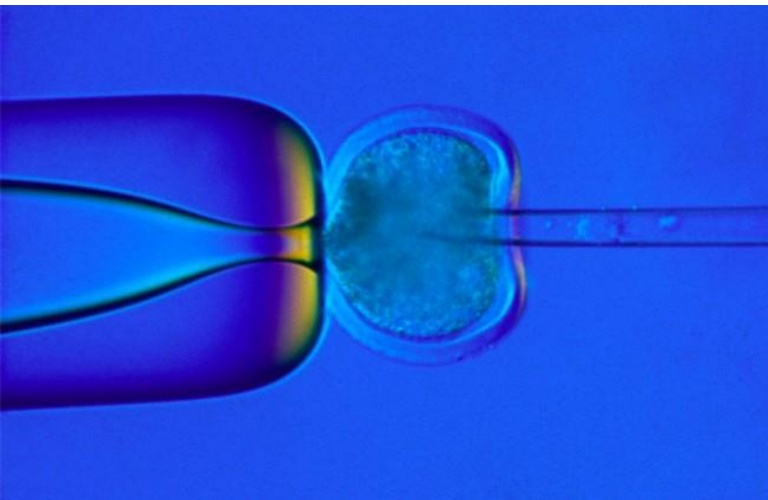
с использованием мтДНК третьего человека.

Родители - иорданская пара, чьи два ребенка
скончались от синдрома Лея

Метод 1: устранение дефектов в эмбрионе



Второй в мировой практике (01.2017) случай рождения ребенка с генетическим материалом от трех родителей произошел на **Украине.**



Рибофлавин (В₂) – 1,3 мг/день. **ФМН** и **ФАД**, в составе 4% (~ 150) ферментов.

- **метилен-ТНФ редуктаза** – **гипер**гомоцистинемия, сердечно-сосудистые заболевания, мигрень, диабетическая нефропатия, врождённые нарушения развития сердца **OMIM 236250.**
- **НАД(Ф)хинон оксидоредуктаза** – высокий риск лейкемии, урогенитальных опухолей **OMIM 125860.**
- **протопорфириноген оксидаза** – смешанная (пёстрая) порфирия, нейропсихиатрические нарушения, двигательная невропатия **OMIM 176200.**
- **комплекс I ЦПЭ митохондрий** – выраженные миопатии, непереносимость физических нагрузок, митохондриальные энцефаломиелопатии, лактоацидоз и острые нарушения мозгового кровообращения **OMIM 252010.**

- **короткоцепочечная-, средне- и длинно- ацил-КоА дегидрогеназа**

OMIM 201470, 201450, 201460.

Наиболее частыми являются дефицит **ацил-КоА-ДГ жирных кислот со средней длиной цепи (MCADD**, от англ. **Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiencies**) аутосомно-рецессивное заболевание, приводящее к смерти (в **60%** случаев).

К-304-Е (1: 20 000)

Некоторые симптомы MCADD:

- приступы рвоты,
- нейромышечные нарушения,
- метаболический ацидоз,
- эпилептические приступы,
- отставание в физическом развитии,
- гипогликемия и **синдром внезапной младенческой смерти** (развивается на фоне обильной утилизации глюкозы).

Энзимотерапия

Энзимотерапия

Применение ферментов в медицине

- **диагностическое** - определение активности ферментов в сыворотке крови и биологических жидкостях.
- **терапевтическое** – лекарства.
- **лабораторное** (аналитическое) - реагенты.

Ферменты в диагностике

Основные принципы для применения :

- если из-за **повреждения клеток** повышается концентрация внутриклеточных ферментов в крови или биологических жидкостях (моча);
- **количество** фермента достаточно для определения;
- **активность фермента** определяется лишь при повреждении клеток, стабильна на протяжении определённого времени и выше нормальных величин;
- **ферменты** имеет приоритет или абсолютную **локализацию** в определенных органах;
- имеется различие во **внутриклеточной** локализации.

Ферменты плазмы крови

- 1. Секреторные** - собственные ферменты крови - синтезируются в печени – место действия – кровь (*протромбин, проакцелерин, проконвертин, церулоплазмин, холинестераза* и др.)
- 2. Экскреторные** – попадают в кровь из секреторных органов – панкреатического сока, слюны и пр. (*амилаза, липаза*).
- 3. Клеточные** – попадают в кровь при повреждении клеток или тканей.

Ферменты плазмы крови

Клеточные ферменты в небольших количествах могут попадать в кровь также в результате:

- **диффузии** через неповреждённые мембраны
- при физиологическом **старении** клеток.

Повышение уровня в крови

- **некроз клеток;**
- **повышение проницаемости мембран;**
- **повышение внутриклеточного синтеза ;**
- **повышение уровня в тканях;**
- **повреждение механизма хранения/эксекреция.**

Понижение уровня в крови

1. Врождённое (генетическое)

2. Приобретённое:

- ингибирование фермента

- доступность кофакторов

Применение ферментов в лечении болезней

- Заместительная терапия (*мезим, фестал*)
- Лечение гнойно-некротических и рубцовых процессов (*химотрипсин, лидаза* (гиалуронидаза))
- Тромболитическая терапия (*фибринолизин, урокиназа*)
- Противоопухолевые препараты (*аспарагиназа*)
- Противомикробные препараты (*ДНКаза*)

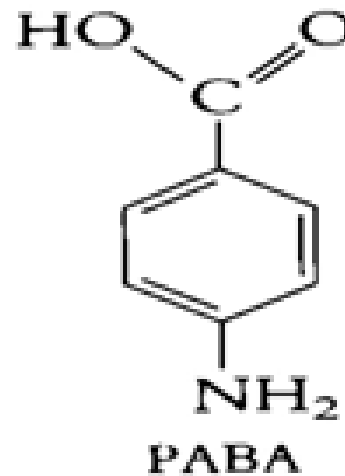
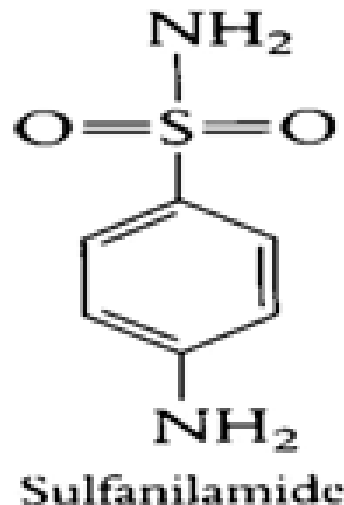
• **Анти**ферментные препараты

(лекарственные препараты – ингибиторы ферментов)

- **сульфаниламидные антибиотики (стрептоцид)** структурное сходств сульфаниламидного фрагмента с ПАБК - субстратом дигидроптероатсинтетазы, синтезирующим дигидроптероевую кислоту (конкурентное ингибирование).
- **антиметаболиты (5-фторурацил)**
- **ингибиторы протеолиза (контрикал, трасилол)**
- **ингибиторы моноаминооксидазы (антидепрессанты)**
- **ингибиторы ксантинооксидазы (аллопуринол)**
- **коферментные ингибиторы (антивитамины)**

3. лекарства ингибиторы ферментов

- **сульфаниламиды** - конкурентные ингибиторы реакций с парааминобензойной кислотой (ПАВА) в синтезе **фолиевой кислоты (vit. B₉)**, **кофермента** в реакциях синтеза **пуринов**.



Млекопитающие не синтезируют **витамин B₉**

3. лекарства ингибиторы ферментов

- Ингибитор ангиотензин превращающего фермента **Angiotensin-Converting-Enzyme inhibitor (ACE inhibitor)** .

Ангиотензиноген → ангиотензин-1

Лекарственный препарат для лечения **гипертонии**.

Представители—

captopril, enalapril, lisinopril, and etc.

3. лекарства ингибиторы ферментов

- Нестероидные противовоспалительные препараты. (НПВС)

Ингибируют активность *циклооксигеназы-1* (COX-1) и *циклооксигеназы-2* (COX-2), нарушают синтез **простагландинов** и **тромбоксанов**.



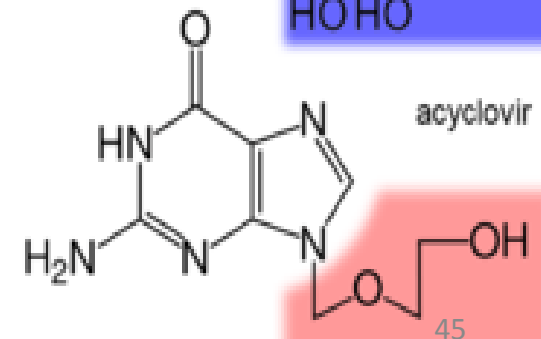
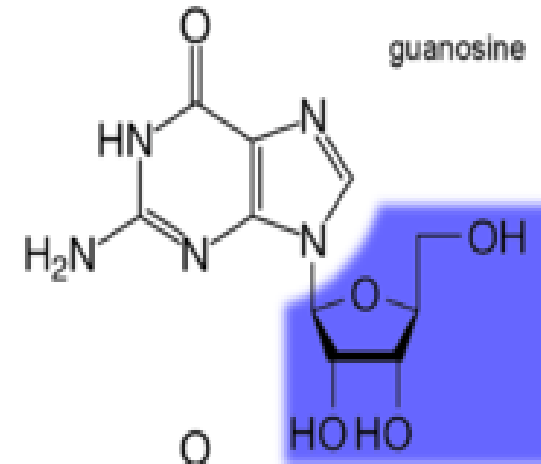
3. лекарства ингибиторы ферментов

Ацикловир - противовирусный препарат.

- *тимидин киназой* вирусов превращает **ацикловир** в **ацикловир монофосфат**, а затем в **ацикловир трифосфат (ACV-TP)**.

ACV-TP - конкурентный **ингибитор ДНК полимеразы** вируса герпеса.

It is on the **W**orld **H**ealth **O**rganization's List of Essential Medicines, the **most important medications** needed in a basic health system. (NP in 1988)



3. лекарства ингибиторы ферментов

- **Метотрексат** - препарат а) химиотерапии,
- б) подавляет активность иммунной системы.

Конкурентный ингибитор **дигидрофолат редуктазы (DHFR)**, фермента синтеза **тетрагидрофолата** – активной формы витамина B₉.

Его сродство к **DHFR** в 1000 раз выше, чем **фолата**

Элементы комплексной терапии

применение ферментов в сочетании с другой терапией

Трипсин - обработка гнойных ран

Фибринолизин - тромболитическая терапия

Лидаза - лечение рубцово-спаечных процессов

Энзимодиагностика

- постановка диагноза заболевания на основе определения активности ферментов в биологическом материале (биологические жидкости, ткани человека).



Использование **ферментов** в качестве
аналитических реактивов

<i>Глюкозооксидаза</i>	Определение концентрации глюкозы в крови
<i>Холестерол-оксидаза</i>	Определение холестерина в крови
<i>Липаза</i>	Определение ТАГ в крови
<i>Уреаза</i>	Определение мочевины в крови

Иммобилизованные ферменты

- ферменты, связанные с твердым носителем или помещенные в полимерную капсулу. Нашли широкое применение в энзимодиагностике и энзимотерапии.

Для иммобилизации ферментов используют два основных подхода:

- химическая модификация фермента
- физическая изоляция фермента в инертном материале

Использование **иммобилизированных ферментов** в аналитических и препаративных целях:

- ферментные электроды (**глюкозооксидаза**)
- тест-системы (**уреаза**)
- получение L-аминокислот
- обработка молока (**галактозидаза**)

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!